



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# CHARAKTERIZACE PROTEOMU RHODOSPORIDIUM TORULOIDES POMOCÍ LC-MS/MS

CHARACTERIZATION OF RHODOSPORIDIUM TORULOIDES PROTEOME USING LC-MS/MS

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. David Brušík

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.

BRNO 2022

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1764/2021 Akademický rok: 2021/22  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student: **Bc. David Brušík**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.**

### Název diplomové práce:

Charakterizace proteomu *Rhodospiridium toruloides* pomocí LC–MS/MS

### Zadání diplomové práce:

Předmětem diplomové práce bude analýza proteomu kvasinek *R. toruloides* kultivovaných za různých podmínek za účelem charakterizace metabolických procesů vedoucích k produkci průmyslově významných metabolitů.

V rámci diplomové práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) rešerše – metabolismus kvasinek; proteomické postupy
- 2) kultivace kvasinek *R. toruloides* při různém C/N poměru
- 3) lýza kvasinek a zpracování metodou FASP zahrnující rovněž proteolytické štěpení trypsinem
- 4) analýza peptidů metodou LC–MS/MS a vyhodnocení dat pomocí metody "label-free" kvantifikace

### Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. David Brušík  
student

-----  
prof. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Charakterizace rozdílně regulovaných proteinů je zásadní pro identifikaci metabolických drah a jejich pochopení v souvislosti s tvorbou významných produktů vybraného kmene kvasinek. Tato diplomová práce je zaměřena na analýzu proteomu kvasinek *Rhodospiridium toruloides* kultivovaných za různých podmínek. V teoretické části je popsán metabolismus zmíněných kvasinek s charakteristikou významných metabolitů. Další část rešerše je zaměřena na proteomické přístupy a bottom-up proteomiku od přípravy vzorku až po stanovení hmotnostní spektrometrií. Experimentální část se zabývá kultivací kvasinek při různých C/N poměrech, dále izolací a stanovením proteinů využitím metody FASP zahrnující proteolytické štěpení trypsinem, LC-MS/MS analýzou a databázovým vyhledáváním.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Proteomika, bottom-up proteomika, protein, karotenogenní kvasinky, *Rhodospiridium toruloides*.

## **ABSTRACT**

Characterization of differentially regulated proteins is crucial for the identification of metabolic pathways and their understanding in connection with the creation of important products of a selected strain of yeast. This diploma thesis focuses on the proteome analysis of the *Rhodospiridium toruloides* cultivated under different conditions. The metabolism of these yeasts with the characteristics of important metabolites is described in the theoretical part. The next part of the thesis is focused on proteomic approaches and bottom-up proteomics from the sample preparation to mass spectrometry analysis. The experimental part deals with the cultivation of yeast at different C/N ratios, next the isolation and determination of proteins using the FASP method, which includes proteolytic cleavage by trypsin, LC-MS/MS analysis and the database search.

## **KEY WORDS**

Proteomics, bottom-up proteomics, protein, carotenogenic yeast, *Rhodospiridium toruloides*.

BRUŠTÍK, David. *Charakterizace proteomu Rhodosporidium toruloides pomocí LC-MS/MS*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/142652>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Zbyněk Zdráhal.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucímu své diplomové práce prof. RNDr. Zbyňku Zdráhalovi, Dr. a konzultantce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a veškerou pomoc spojenou s tvorbou diplomové práce. Velké poděkování patří rovněž Mgr. Kateřině Hanákové, Ph.D a Mgr. Kristíně Gömöryové za proměření vzorků a za pomoc s bioinformatickou analýzou. Také bych rád poděkoval Ing. Martinu Szotkowskému, Ph.D., Ing. Jiřímu Holubovi a Ing. Samueli Šimanskému za pomoc a odborné rady spojené s kultivací.

# OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	Teoretická část .....	8
2.1	Karotenogenní kvasinky .....	8
2.1.1	Rod Rhodosporidium .....	8
2.2	Metabolismus červených kvasinek a jejich významné metabolity .....	8
2.2.1	Karotenoidy .....	9
2.2.1.1	Funkce karotenoidů .....	11
2.2.1.2	Biosyntéza karotenoidů .....	11
2.2.2	Lipidy .....	12
2.2.2.1	Klasifikace lipidů .....	13
2.2.2.2	Mastné kyseliny .....	13
2.2.2.3	Biosyntéza mastných kyselin .....	14
2.2.2.4	$\beta$ -oxidace mastných kyselin .....	16
2.2.2.5	Ergosterol .....	17
2.2.2.6	Ubichinony .....	17
2.3	Úvod do proteomiky .....	18
2.4	Proteomické přístupy .....	18
2.5	Bottom-up proteomika .....	19
2.5.1	Příprava vzorků .....	20
2.5.1.1	Metody přípravy vzorku v bottom-up proteomice a jejich výhody .....	20
2.5.1.2	Metoda FASP (filter aided sample preparation) .....	21
2.6	HPLC a UHPLC separace .....	23
2.6.1	Kolony v proteomice .....	24
2.7	Hmotnostní spektrometrie .....	25
2.7.1	Instrumentace .....	25
2.7.2	Fragmentační techniky .....	26
2.7.3	Akviziční techniky MS dat .....	27
3	Experimentální část .....	29
3.1	Chemikálie .....	29
3.1.1	Chemikálie pro kultivaci kvasinek .....	29
3.1.2	Chemikálie pro lýzi buněk .....	29
3.1.3	Chemikálie pro 1D-SDS-PAGE elektroforézu .....	29
3.1.4	Chemikálie pro FASP .....	29
3.1.5	Chemikálie pro extrakci .....	29
3.2	Přístroje a pomůcky .....	29
3.2.1	Přístroje a pomůcky pro kultivaci kvasinek .....	29
3.2.2	Pomůcky a přístroje pro izolaci a analýzu proteinů .....	30
3.3	Biologický materiál .....	30
3.3.1	Vybraný kmen kvasinek .....	30
3.4	Kultivace kvasinek .....	30

3.4.1	Příprava a zaočkování pevného média .....	30
3.4.2	Příprava inokula I a II.....	31
3.4.3	Příprava a zaočkování produkčních médií .....	31
3.4.4	Odběry vzorků.....	32
3.5	Izolace, frakcionace a stanovení proteinů.....	32
3.5.1	Proteinová extrakce .....	32
3.5.2	SDS-PAGE elektroforéza.....	33
3.5.3	Metoda FASP (Filter assisted sample preparation).....	33
3.5.4	Extrakce ethylacetátem .....	33
3.5.5	Kyselá extrakce .....	33
3.5.6	LC-MS/MS analýza.....	34
3.5.7	Vyhledávání v databázích .....	34
4	Výsledky a diskuze .....	36
4.1	Výsledky 1D SDS-PAGE.....	36
4.2	Výsledky a porovnání proteinového zastoupení kultivovaných kvasinek.....	38
4.2.1	C/N 13; 96 hod - C/N 13; 48 hod .....	39
4.2.1.1	Biologické procesy.....	39
4.2.1.2	Lokalizace proteinů.....	41
4.2.1.3	Molekulární funkce.....	42
4.2.2	C/N 150; 96 hod - C/N 150; 48 hod .....	45
4.2.2.1	Biologické procesy.....	45
4.2.2.2	Lokalizace proteinů.....	47
4.2.2.3	Molekulární funkce.....	48
4.2.3	C/N 150; 96 hod - C/N 13; 96 hod .....	49
4.2.3.1	Biologické procesy.....	49
4.2.3.2	Lokalizace proteinů.....	50
4.2.3.3	Molekulární funkce.....	52
4.2.4	Shrnutí .....	53
5	Závěr .....	55
6	Seznam použitých zdrojů .....	56
7	Seznam použitých zkratk.....	63
8	Přílohy .....	64

## 1 ÚVOD

Kvasinkový kmen *Rhodospiridium toruloides* náleží mezi červené kvasinky charakterizující se významnou produkcí lipidů a karotenoidních pigmentů. Právě produkce těchto pigmentů, jako je  $\beta$ -karoten,  $\gamma$ -karoten, torulen, thorularodin a astaxantin způsobuje zabarvení kvasinkových kolonií do žluto-oranžové až červené barvy. V posledním desetiletí mnoho studií prokázalo, že tento kmen kvasinek je slibnou platformou pro produkci lipidů hlavně díky vysoké odolnosti vůči stresu a schopnosti využívat rozmanité typy substrátů jako jsou monosacharidy (včetně hexózy, pentózy), oligosacharidy (sacharóza, maltóza, celobióza, trehalóza, rafinóza, melezitóza), alkoholy (ethanol, glycerol, mannitol, sorbitol), organické kyseliny (acetát, laktát, sukcinát, citrát), mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, kyselina galakturonová a další. Lipidy, jako triacylglyceroly a deriváty mastných kyselin, byly dříve získávány z rostlin a živočišných tuků. Jedná se o důležité suroviny pro výrobu biopaliv a chemikálií na bázi lipidů. Ve srovnání s extrakcí z olejnatých plodin a rostlin má mikrobiální produkce lipidů řadu výhod, včetně rychlejšího výrobního procesu a jeho optimalizaci. Karotenoidy jsou využívány v mnoha aplikacích ve farmaceutickém, potravinářském či krmivářském průmyslu. I proto je vynakládáno intenzivní úsilí zaměřující se na studium těchto mikroorganismů.

Proteomika je vědní disciplína, která se zabývá studiem proteinů. Během několika posledních desetiletí se proteomická analýza založená na hmotnostní spektrometrii stala hlavním nástrojem, který je v současnosti schopen detekovat a kvantifikovat tisíce proteinů v rámci jedné analýzy. Aby bylo možno lépe porozumět produkci zmíněných lipidů a karotenoidních pigmentů, je důležité analyzovat rozdílně regulované proteiny za daných kultivačních podmínek a tímto způsobem identifikovat metabolické dráhy zodpovědné za jejich produkci.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Karotenogenní kvasinky

Jedná se o skupinu kvasinek, které jsou schopny akumulovat karotenoidní pigmenty, jako je  $\beta$ -karoten,  $\gamma$ -karoten, torulen, thorularodin a astaxantin. Tyto pigmenty zabarvují kvasinkové kolonie do žluto-oranžového až červeného zbarvení, a proto jsou označovány jako červené kvasinky. Složení karotenoidů v jednotlivých buňkách ovlivňuje typ kultivovaných kvasinek, složení živného média a vnější podmínky prostředí, jako je přísun světla, jeho intenzita a přítomnost oxidantů. Karotenogenní kvasinky náleží do oddělení *Basidiomycota*. V současné době je známá celá řada červených kvasinek. Radí se sem rody *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Cystofilobasidium*, *Kockovaella* a *Phaffia*. Za vhodných podmínek se mnohé ze zmiňovaných rodů vyznačují vysokou produkcí lipidů. Složení mastných kyselin v těchto lipidech je charakteristické vysokým obsahem polynenasycených a mononenasycených mastných kyselin, které najdou široké využití v potravinářském, farmaceutickém a zemědělském průmyslu. Kromě schopnosti akumulovat karotenoidní pigmenty a lipidy mohou některé z těchto kvasinek účinně odstraňovat těžké kovy z odpadních vod. V následující části bude popsán rod *Rhodospiridium*, který byl vybrán pro tuto práci [1, 2].

#### 2.1.1 Rod *Rhodospiridium*

Nejznámějším kmenem je *Rhodospiridium toruloides*. Může se vyskytovat jak v kvasinkové, tak v myceliální podobě. V přírodě se nachází v dužině borovicového dřeva, půdě, mořské vodě a listech rostlin. Je schopen využívat rozmanité zdroje uhlíku a energie, např. monosacharidy (včetně hexóz a pentóz); oligosacharidy (sacharóza, maltóza, celobióza, trehalóza, rafinóza, melezitóza); alkoholy (ethanol, glycerol, mannitol, sorbitol); organické kyseliny (acetát, laktát, sukcinát, citrát); mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a také kyselinu D-galakturonovou. Přebytečný uhlík je ukládán ve formě triacylglycerolů (TAG). Tyto lipidy mohou tvořit až 75 % sušiny buněk v závislosti na podmínkách růstu a lze je používat jako surovinu při výrobě bionafty druhé generace [3, 4].

### 2.2 Metabolismus červených kvasinek a jejich významné metabolity

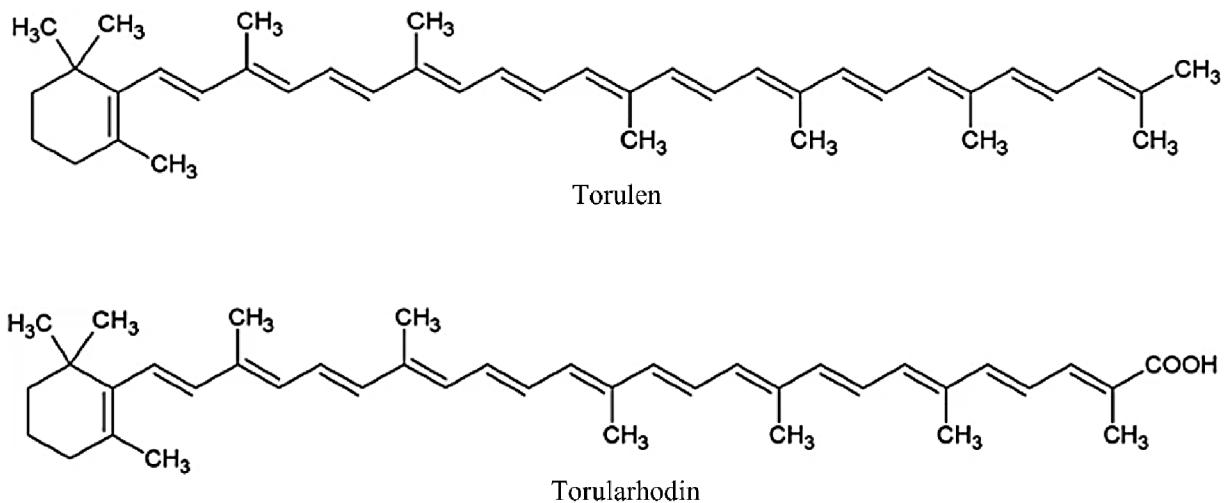
Metabolismus lze definovat jako soubor chemických a fyzikálních procesů buňky. Zahrnuje přeměnu reaktantů a tvorbu produktů pomocí propracovaných regulací na mnoha úrovních, které jsou klíčové pro využití kvasinkových buněk v biotechnologických procesech. Za vhodných a kontrolovaných kultivačních podmínek lze využít kvasinky k produkci lipidických primárních metabolitů, jako jsou neutrální lipidy, fosfolipidy, mastné kyseliny či ergosterol, který je integrální součástí kvasinkových biomembrán. Sekundární metabolismus je označení pro takové dráhy metabolismu, které nejsou nezbytně nutné pro přežití organismu (např. produkce antibiotik, pigmentů). Indukce sekundárního metabolismu je spojena s konkrétními podmínkami prostředí. Pokud mají mikroorganismy nedostatek živin, začnou produkovat řadu sekundárních metabolitů, které podporují jejich přežití. Kvasinky vykazují relativně nízký stupeň buněčné diferenciaci, ale přesto se prezentují komplexním metabolismem, jež vede k produkci široké škály sekundárních metabolitů a extracelulárních enzymů. V biotechnologii mají kvasinky výhodu v relativně snadné kultivaci ve fermentorech a jsou používány pro průmyslovou velkovýrobu. Biomasu obohacenou vhodnou směsí primárních a sekundárních metabolitů lze využít především v krmivářských a potravinářských aplikacích. Obecně je biosyntéza jednotlivých metabolitů řízena hladinami a aktivitami enzymů podílejících se na celkovém toku uhlíku metabolickým systémem. Účinnost závisí na spolupráci jednotlivých drah zapojených do tohoto procesu. Která dráha je potlačena nebo aktivována se liší podle složení produkčního média, kultivačních podmínek, druhu mikroorganismu a jeho vývojového stádia [1].



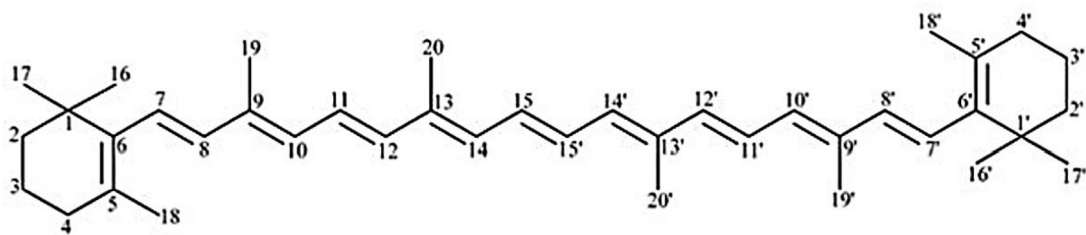
### 2.2.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou obsáhlou skupinou molekul, které lze najít u většiny živých forem. Jedná se o žluté, oranžové až červené pigmenty syntetizované nejen rostlinami. Některé mikroorganismy, včetně bakterií, řas, plísní a kvasinek rodů *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* a *Phaffia* jsou schopny produkovat karotenoidy přirozeně. Zvířata nedokážou syntetizovat karotenoidy, a proto je nutné tyto pigmenty přidávat do krmiv chovaných druhů (např. lososů), jelikož správná barva masa lososa či pstruha je základním požadavkem zákazníků.

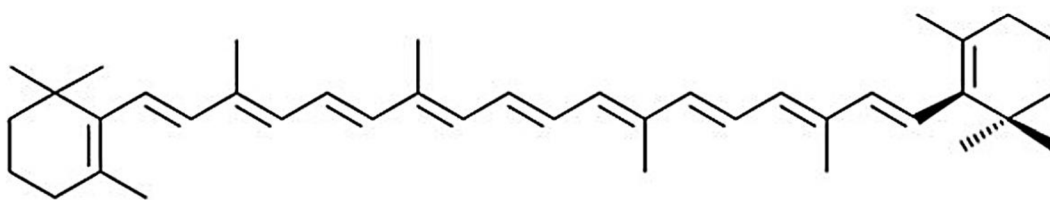
Struktura karotenoidů je odvozena od fytoenu. Řadí se mezi izoprenoidy, konkrétně mezi tetraterpeny (uhlovodíky) nebo tetraterpenoidy (jejich kyslíkaté deriváty). Většinu tvoří uhlovodíky se 40 atomy uhlíku, které obsahují dva terminální kruhové systémy spojené řetězcem konjugovaných dvojných vazeb nebo polyenovým systémem. Dále lze karotenoidy rozdělit na monocyklické (torulen, torularhodin), bicyklické ( $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten) a alifatické (lykopen). Strukturální vzorce vybraných karotenoidů jsou znázorněny na obrázku 1 a obrázku 2 [5, 6, 7].



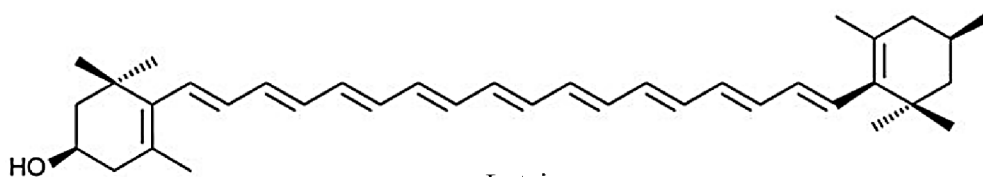
Obrázek 1: Znázornění vzorců vybraných karotenoidů [8]



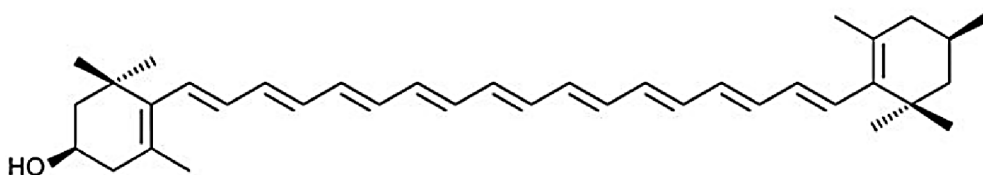
$\beta$ -Karoten



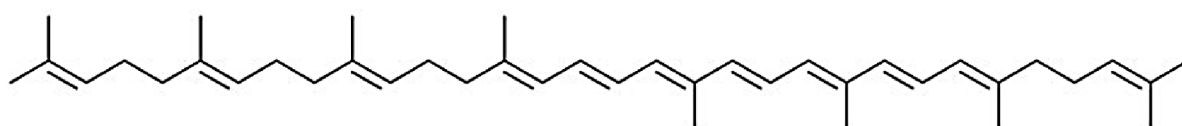
$\alpha$ -Karoten



Lutein



Zeaxantin



Lycopene

Obrázek 2: Znázornění vzorců vybraných karotenoidů [6]

### 2.2.1.1 *Funkce karotenoidů*

Karotenoidy se vyznačují řadou funkcí, jako je jejich původní evoluční role fotosyntetických pigmentů, funkcí antioxidantů, funkcí provitaminů A či funkcí pigmentů podílející se na přitažlivosti opylovačů květin a partnerů pro rozmnožování. Karotenoidy provitaminu A,  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten a  $\beta$ -kryptoxantin, mohou být v lidském těle přeměněny na retinol (vitamín A).

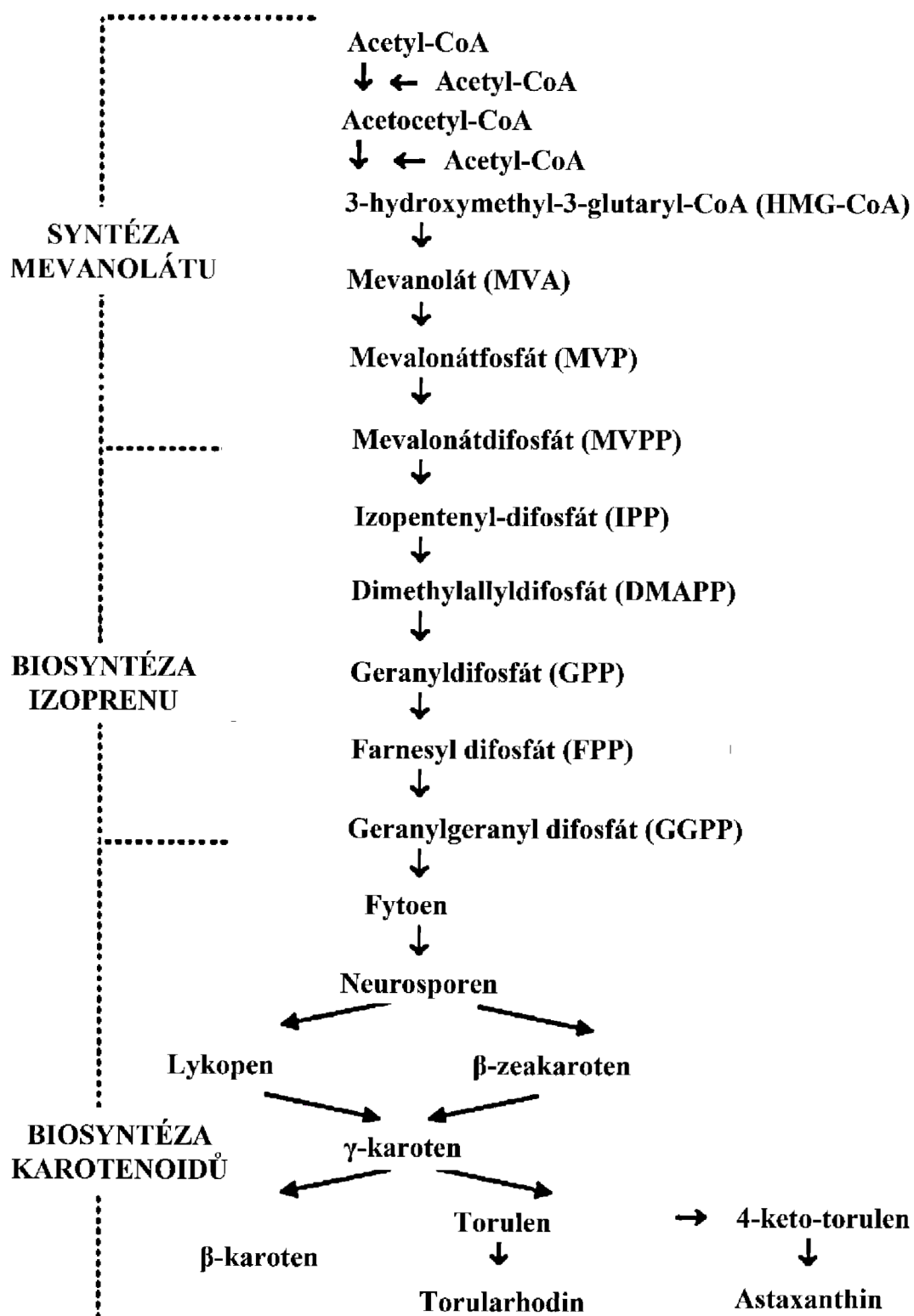
Příkladem karotenoidu s antioxidačním účinkem je  $\beta$ -karoten. V lidském těle je schopen vylučovat volné kyslíkové radikály vyskytující se v tkáních. Vzhledem k jeho konjugované alkylové struktuře je schopen stabilizovat volné peroxylové radikály. Karotenoidy jsou také prezentovány jako substance s protirakovinnými účinky [5, 6, 9].

### 2.2.1.2 *Biosyntéza karotenoidů*

Jak už bylo zmíněno, karotenoidy jsou v přírodě syntetizovány rostlinami a mnoha mikroorganismy. Kromě malého počtu bakteriálních karotenoidů s 30, 45 nebo 50 atomy uhlíku představují karotenoidy s 40 atomy uhlíku většinu z více než 600 známých struktur. Všechny karotenoidy jsou odvozeny z izoprenoidní dráhy. Průběh biosyntézy karotenoidů běžně zahrnuje tři kroky:

1. tvorba isopentenylidifosfátu (IPP)
2. tvorba fytoenu
3. cyklizace a další reakce lykopenu

Výchozí látkou je acetyl-CoA, který je konverzován na 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) za katalýzy HMG-CoA syntázy. HMG-CoA je poté přeměněn na sloučeninu o šesti uhlících, kyselinu mevalonovou (MVA), která je prvním specifickým prekurzorem biosyntetické dráhy terpenoidů. MVA je dále konvertována na isopentenylidifosfát (IPP) řadou reakcí zahrnujících fosforylaci MVA kinázou následovanou dekarboxylací. Molekula IPP je následně izomerizována na dimethylallyldifosfát (DMAPP). Kondenzací jedné molekuly DMAPP a tří molekul isopentenylidifosfátu (IDP) vzniká diterpen geranylgeranylidifosfát (GGDP), který je prekurzorem poloviny karotenoidů obsahujících 40 atomů uhlíku. Kondenzací dvou molekul GGDP „hlava-hlava“ vzniká první bezbarvý karotenoid fytoen. Následné desaturační reakce prodlužují systém konjugovaných dvojných vazeb za vzniku neurosporenu nebo lykopenu. Po desaturaci se biosyntéza karotenoidů větví na acyklické a cyklické karotenoidy. Syntéza cyklických karotenoidů zahrnuje cyklizaci jedné nebo obou koncových skupin lykopenu či neurosporenu. Lykopen působí jako prekurzor cyklických karotenoidů a podléhá řadě metabolických reakcí (např. cyklizaci) za vzniku  $\beta$ -karotenu,  $\gamma$ -karotenu, torulenu, torularhodinu a astaxantinu.  $\gamma$ -karoten je hlavním bodem větvení a působí jako prekurzor pro  $\beta$ -karoten a torulen. Biosyntéza karotenoidů je schématicky znázorněna na obrázku 3 [1, 5].



Obrázek 3: Schématické znázornění biosyntézy karotenoidů [5]

## 2.2.2 Lipidy

Lipidy jsou definovány jako přírodní látky obsahující vázané mastné kyseliny o více než třech atomech uhlíku v molekule. Jedná se o heterogenní skupinu sloučenin, pro níž je typická nerozpustnost nebo jen částečná rozpustnost ve vodě, ale dobrá rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech (např. v chloroformu, benzenu). Patří sem tuky, oleje, vosky a další příbuzné sloučeniny. Lipidy náleží mezi významné složky potravin a jsou nezbytné pro zdraví a vývoj organismu. Kromě vysoké energetické hodnoty se vyznačují obsahem esenciálních mastných kyselin nebo také vitamínů rozpustných v tucích. Lipidy jsou v lidské těle ukládány v tukové tkáni a fungují jako zásoba a zdroj energie. Dále zajišťují tepelnou izolaci v podkožní tkáni a v okolí některých orgánů. Lipidy v kombinaci s proteiny se označují jako lipoproteiny. Tvoří významnou součást buněčných a mitochondriálních membrán a také umožňují transport lipidů krví [9, 10, 11].

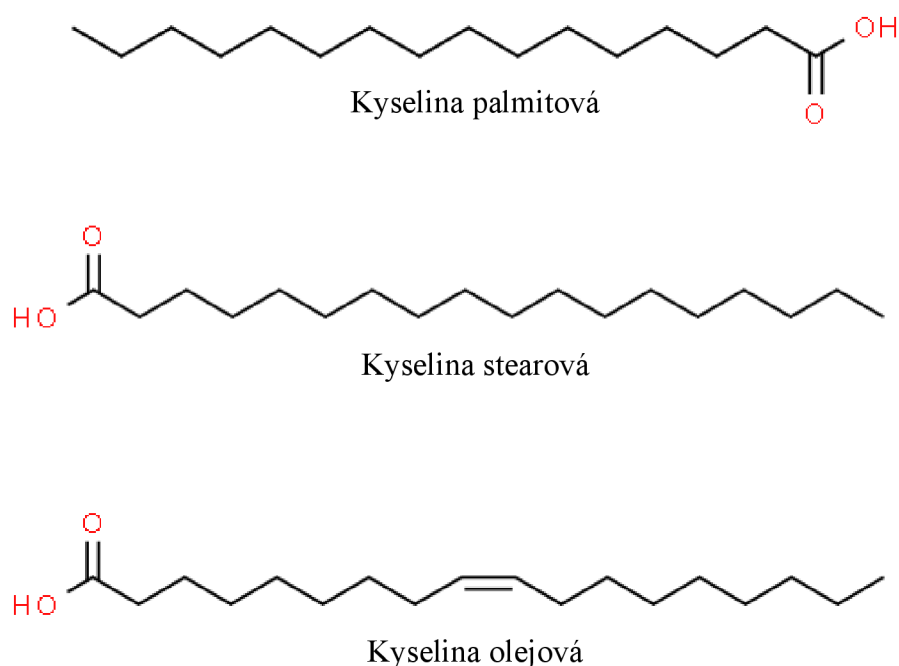
### 2.2.2.1 Klasifikace lipidů

Lipidy lze klasifikovat následovně:

1. Jednoduché lipidy, které jsou charakterizovány jako estery mastných kyselin s různými alkoholy. Tato skupina lipidů se dále dělí na tuky a vosky.
  - Tuky – jsou složeny z esterů mastných kyselin a jako alkohol je zde zastoupen glycerol. Tuky v tekuté formě se označují jako oleje.
  - Vosky – obsahují estery mastných kyselin s vyššími jednosytnými alkoholy.
2. Složené lipidy, které kromě esterů mastných kyselin a alkoholu obsahují další funkční skupiny.
  - Fosfolipidy – kromě esterů mastných kyselin a alkoholu obsahují zbytek kyseliny fosforečné. Mohou obsahovat i dusíkaté báze a jiné substituenty. Rozlišujeme glycerolfosfolipidy (alkoholem je glycerol) a sfingofosfolipidy (alkoholem je sfingosin).
  - Glykolipidy – jsou složeny z mastné kyseliny, sfingosinu a ze sacharidové složky.
  - Ostatní složené lipidy jako sulfolipidy, aminolipidy nebo lipoproteiny.
3. Odvozené lipidy, mezi něž se řadí mastné kyseliny, glycerol, steroidy, alkoholy (včetně sterolů a glycerolu), mastné aldehydy a ketolátky, uhlovodíky, v tucích rozpustné vitamíny a hormony. Jako neutrální lipidy se označuje cholesterol či acylglyceroly, jelikož nenesou žádný náboj [9].

### 2.2.2.2 Mastné kyseliny

Jsou definovány jako karboxylové kyseliny s dlouhými uhlovodíkovými řetězci. Vyskytují se hlavně ve formě esterů v přírodních tucích a olejích, ale je známa taky jejich neesterifikovaná forma v podobě volných mastných kyselin. Z pravidla mají mastné kyseliny, vyskytující se v přírodních tucích, nevětvený řetězec se sudým počtem uhlíkových atomů. Je to dáno tím, že jsou syntetizovány z dvouuhlíkatých jednotek. Pro vyšší rostliny a živočichy je typický výskyt zbytků mastných kyselin s 16 a 18 atomy uhlíku (kyselina palmitová, stearová, linolová – viz obrázek 4). Dle obsahu dvojných vazeb se rozlišují mastné kyseliny nasycené (bez dvojných vazeb) a nenasycené (obsah jedné nebo více dvojných vazeb). Z hlediska výživy jsou mastné kyseliny nejvýznamnější složkou lipidů [9, 10, 11].



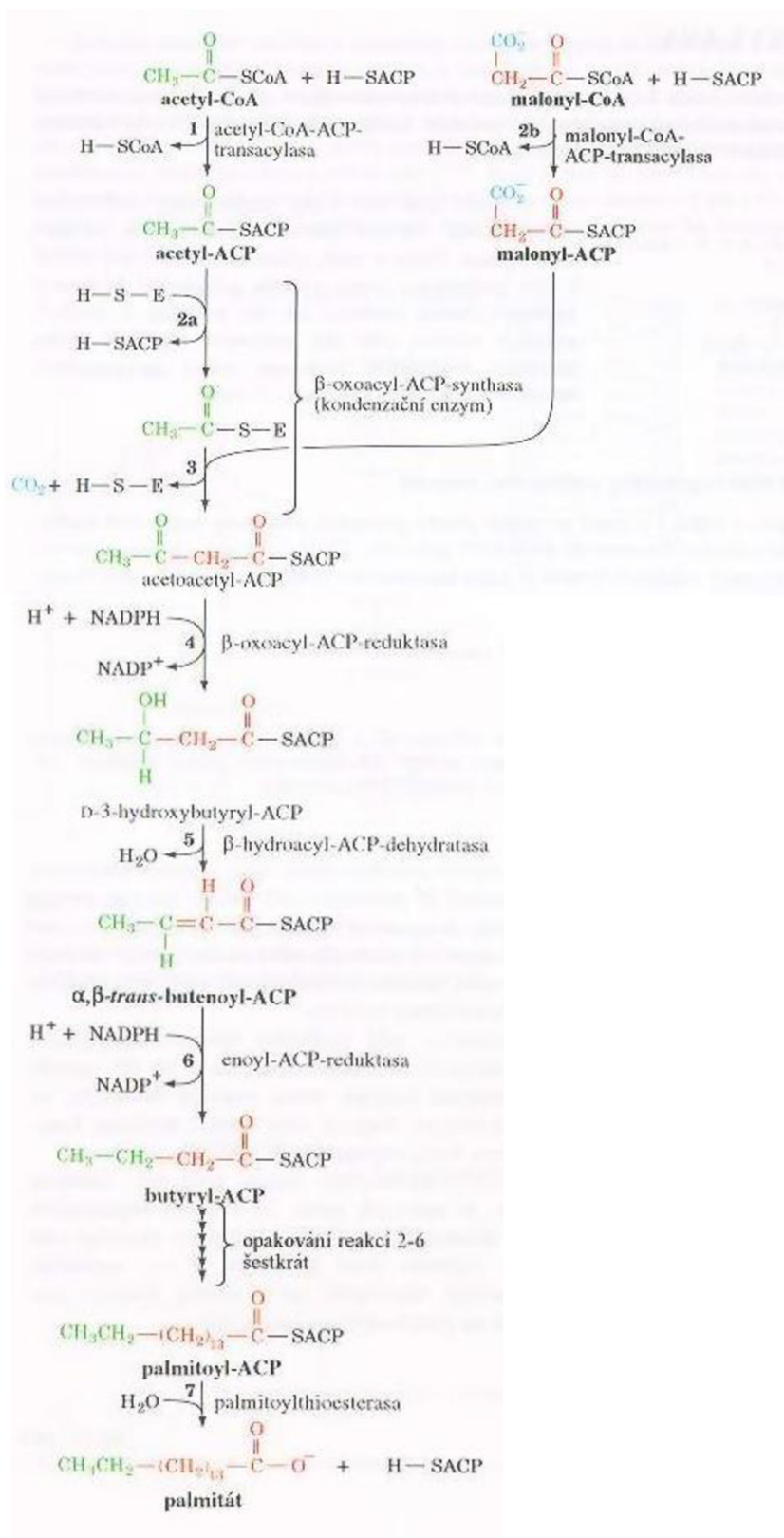
Obrázek 4: Příklady vzorců mastných kyselin [10]

### 2.2.2.3 Biosyntéza mastných kyselin

Biosyntéza mastných kyselin je anabolický proces probíhající v cytosolu buněk, přesněji v endoplazmatickém retikulu. Výchozí látkou je acetyl-CoA. Ze vznikajícího malonyl-CoA se syntetizují kondenzačními reakcemi nasycené mastné kyseliny. Biosyntéza probíhá v cyklech, kdy každým cyklem se prodlouží řetězec mastné kyseliny o 2 atomy uhlíku. Pro tuto dráhu je typická přítomnost proteinu ACP (acyl carrier protein), jež je přenašečem acylových skupin. Redoxním koenzymem je NADPH. Biosyntetická dráha je spřažena s hydrolyzou ATP, která působí jako hnací síla reakce. Nejprve probíhá ATP-dependentní karboxylace katalyzovaná acetyl-CoA-karboxylázou za vzniku malonyl-CoA. Tento krok je nevratný. Následuje exergonická dekarboxylace malonylové skupiny v kondenzační reakci katalyzované syntazou mastných kyselin.

Pro biosyntézu je nezbytný multienzymový komplex syntazy mastných kyselin, který zajišťuje účinnost této dráhy. Tvoří jej dvě podjednotky, které jsou propojeny disulfidickým můstkem. Na počátku dráhy je acetyl-CoA za katalýzy acetyltransacylasy přeměněn na acetyl-ACP. Poté pomocí enzymu malonyltransacylasy vzniká malonyl-ACP. Za pomoci enzymu  $\beta$ -oxoacylsyntazy dochází ke kondenzaci acetyl-ACP a malonyl-ACP a současně k dekarboxylaci malonyl-ACP za vzniku acetoacetyl-ACP. Poté dochází k jeho redukci za katalýzy  $\beta$ -oxoacylreduktázy a vzniká  $\beta$ -hydroxybutyryl-ACP. Následuje dehydratace pomocí  $\beta$ -hydroxyacyldehydratázy za vzniku  $\alpha,\beta$ -trans-butenoyl-ACP a další redukce enoylreduktázou na butyryl-ACP. Opakovanou reakcí molekuly butyryl-ACP a s další molekulou malonyl-ACP se acyl postupně prodlužuje až na 16 atomů uhlíku za vzniku palmitoyl-ACP. Palmitoyl-ACP je poté za katalýzy palmitoylesterázy hydratován, odštěpí se ACP a vzniká kyselina palmitová.

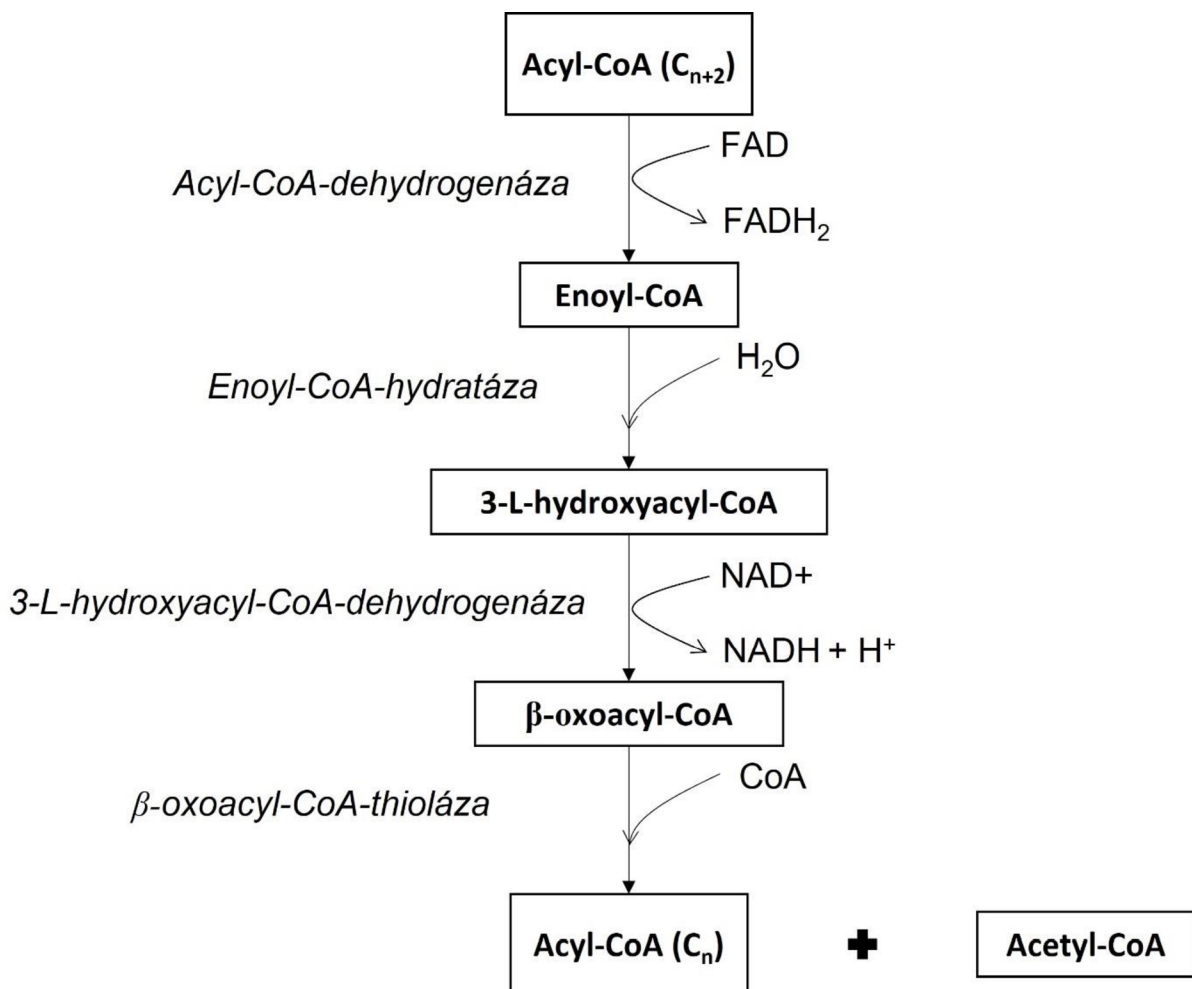
Celý proces je znázorněn na obrázku 5. Reakcí palmitoyl-ACP s malonyl-ACP může dojít ke vzniku stearoyl-ACP a spolu s palmitoyl-ACP působí jako výchozí látky pro biosyntézu nenasycených mastných kyselin (palmitolejové a olejové) katalyzovanou desaturázami [9, 10, 11].



Obrázek 5: Průběh biosyntézy kyseliny palmitové [11]

#### 2.2.2.4 $\beta$ -oxidace mastných kyselin

$\beta$ -oxidace je katabolická dráha, která umožňuje odbourávání mastných kyselin, kdy se z molekuly mastné kyseliny postupně odštěpuje acetyl-CoA a řetězec se zkracuje o 2 atomy uhlíku. I přes skutečnost, že výchozí látka biosyntézy mastných kyselin a konečný produkt jejich odbourávání je totožný, zmíněné procesy nejsou pouhou obrácenou reakcí.  $\beta$ -oxidace probíhá v mitochondriích, redoxními koenzymy jsou  $\text{NAD}^+$ , FAD a jedná se o aerobní proces. Nejdříve je nutné mastné kyseliny aktivovat. To je jediný krok v této dráze, kde je potřeba dodat energii z ATP. V přítomnosti ATP a CoA vzniká za katalýzy acyl-CoA-syntázy „aktivní“ forma mastné kyseliny acyl-CoA. Následuje odtržení dvou atomů vodíku z uhlíku 2( $\alpha$ ) a 3( $\beta$ ), což je katalyzováno acyl-CoA-dehydrogenázou a vzniká enoyl-CoA. Adice vody v přítomnosti enoyl-CoA-hydratázy vede ke tvorbě 3-L-hydroxyacyl-CoA. Poté dochází k další dehydrogenaci za katalýzy 3-L-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenázy a vzniká  $\beta$ -oxoacyl-CoA, který je nakonec rozštěpen působením  $\beta$ -oxoacyl-CoA-thiolázy na acetylCoA a acyl-CoA, jež je o 2 atomy uhlíku kratší než výchozí substrát. Zjednodušené schéma  $\beta$ -oxidace je zobrazeno na obrázku 6 [9, 10, 11].

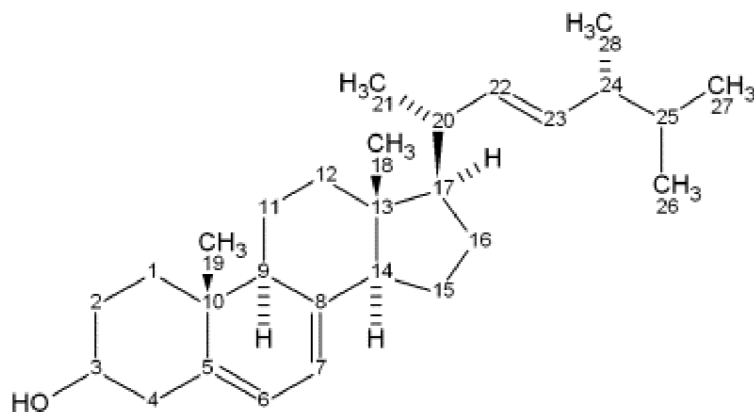


Obrázek 6: Schématické znázornění  $\beta$ -oxidace [12]



### 2.2.2.5 Ergosterol

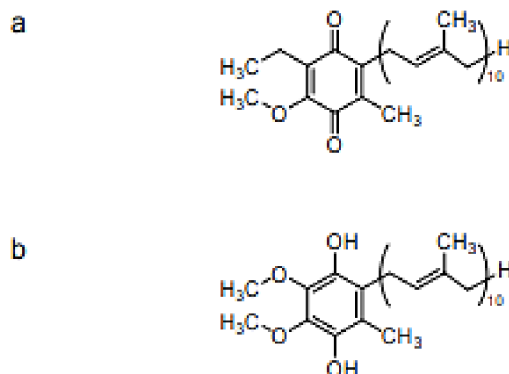
Ergosterol je v tuku rozpustná sloučenina se steroidní strukturou vyskytující se v rostlinách, houbách a v mikroorganismech, jako jsou kvasinky či trypanozomy. Nachází se v buněčných stěnách, kde je jeho funkcí zajištění správného fungování lipidické membrány. Ovlivňuje její permeabilitu a aktivitu membránových procesů. Také je lokalizován v cytosolu a účastní se procesů látkové výměny. Pro kvasinky je důležitá jeho fyziologická funkce, a to regulace proteinkinázy, která je zásadní pro iniciaci růstu. Dále podporuje syntézu fosfatidylinositolu. Pro člověka je důležitý, protože je prekurzorem vitamínu D. Pomocí ultrafialové složky slunečního záření dochází ke štěpení struktury (B jádra) a vzniká cholekalciferol (vitamín D<sub>2</sub>). Strukturální vzorec ergosterolu je zobrazen na obrázku 7 [9, 11, 13].



Obrázek 7: Strukturální vzorec ergosterolu [13]

### 2.2.2.6 Ubichinony

Jedná se o lipofilní látky, jejichž strukturu tvoří benzochinon s isoprenylovými podjednotkami v postranním řetězci. K zástupcům ubichinonů patří koenzym Q10 (též ubichinon, Q). Byl objeven na konci 50. let, kdy byl izolován z mitochondrií hovězího srdce. Jedná se o přenašeč elektronů v respiračním řetězci spojující flavoproteiny s cytochromem b. Nachází se v mitochondriích, kde je za aerobních podmínek v oxidované formě jako chinon nebo za anaerobních podmínek v redukované formě jako chinol – viz obrázek 8. Koenzym Q je součástí mitochondriálních lipidů. Obecně se ubichinony prezentují antioxidačním účinkem a chrání buňky před poškozením volnými radikály obdobně jako strukturálně podobný vitamín E [10, 11, 14].



Obrázek 8: Strukturální vzorec oxidované formy (a) a redukované formy (b) koenzymu Q [14]

### 2.3 Úvod do proteomiky

Termín „proteomika“ byl popsán v roce 1995 a byl definován jako rozsáhlá charakterizace celého souboru proteinů buněčné linie, tkáně nebo organismu. Dnes se setkáváme se dvěma definicemi proteomiky. První definice omezuje rozsáhlou analýzu genových produktů na studie zahrnující pouze proteiny. Druhá kombinuje proteinové studie s jinými typy analýz, jako je např. analýza mRNA, genomika, či kvasinkový dvouhybridní systém [15].

Termín proteom zavedl v roce 1994 Marc Wilkins, aby popsal proteiny jako doplněk genomových dat. Označuje tak všechny proteiny produkované či modifikované organismem (např. člověk, zvíře, rostlina, bakterie) nebo živým systémem (např. orgán, buněčná kultura). Proteoforma je označení pro všechny formy proteinu pocházející z určitého genu, zahrnující změny vzniklé variabilitou genu, alternativním sestřihem RNA transkriptu nebo posttranslačními modifikacemi. Proteotyp je charakterizován jako soubor proteinů, který se vyskytuje v daném místě a čase. Identifikace celého proteomu určité buňky, tkáně, orgánu nebo organismu je kvůli velké rozmanitosti proteinů, a jejich proteoforem velmi obtížná. Mohou být exprimovány na různých úrovních – od velmi hojných proteinů (např. aktin), po méně hojné (např. transkripční faktory) - v různých buňkách, tkáních, orgánech. Posttranslační modifikace (PTM) jsou v proteinech rovněž různorodé. To vede k tvorbě obrovského množství proteoforem, což extrémně ztěžuje proteomické experimenty. Mezi nejznámější druhy posttranslačních modifikací jsou řazeny fosforylace, glykosylace, lipidové modifikace, metylace, acetylace a ubiquitinace [16, 17, 18].

Rozvoj v proteomice byl umožněn díky paralelnímu vývoji ve čtyřech oblastech:

- rozvoj separačních technik, pro separaci komplexních proteinových a peptidových směsí
- neustálý vývoj metod hmotnostní spektrometrie pro přesnou hmotnostní a chemickou strukturní analýzu
- neustálý posun ve výzkumu genomu a takto narůstající množství peptidových/proteinových sekvencí ukládaných v databázích
- vývoj nových bioinformatických nástrojů ke zjednodušení analýzy velkého množství zejména hmotnostně spektrometrických dat [19, 20, 21, 22, 23, 24].

### 2.4 Proteomické přístupy

Ke studiu proteomiky lze přistupovat z více hledisek např. použitá metodologie, účel, cíl. Mezi nejpoužívanější přístupy se řadí [25, 26]:

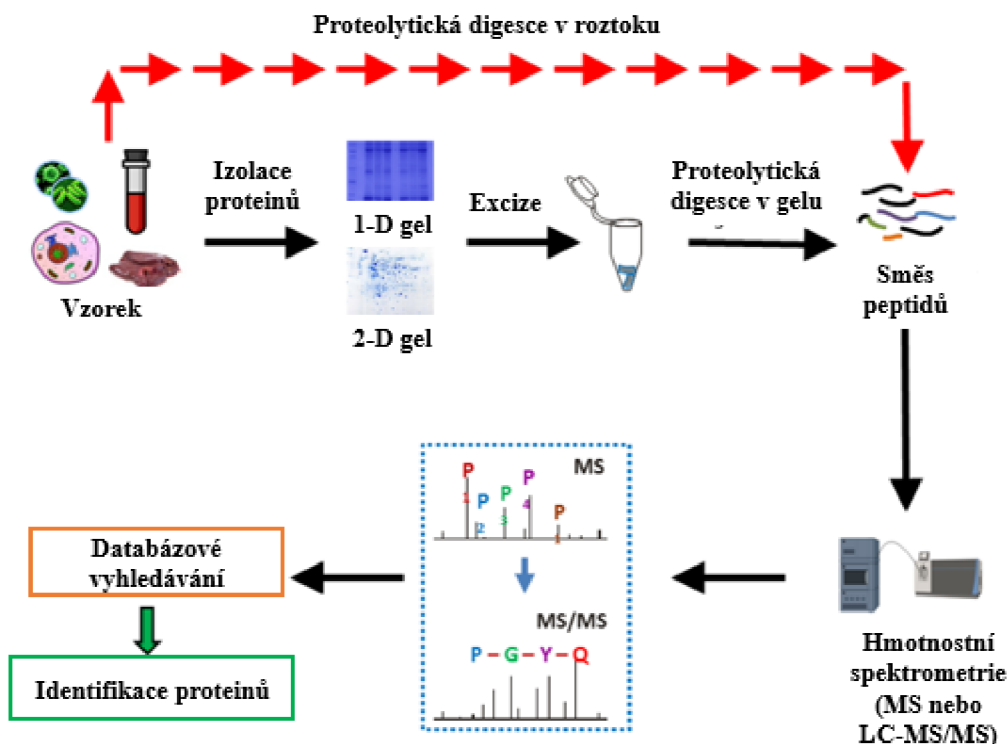
1. Diferenční proteomika - také označována jako srovnávací. Zabývá se analýzou komplexních směsí bílkovin. Bílkovinné složení je závislé na aktuálním stavu organismu. Změna stavu organismu může vést ke změnám ve složení bílkovin. Tyto odlišnosti jsou pozorovány se snahou identifikace rozdílně se vyskytující bílkoviny.
2. Funkční proteomika – přístup, který se zaměřuje na studium proteinových interakcí v souvislosti s funkcí bílkovin a jejich zapojení do buněčných procesů. Získané údaje mohou mít zásadní význam pro studium mechanismu a léčby nemocí nebo vývoj organismu.
3. Strukturní proteomika - přístup založený na studiu prostorové struktury bílkovin. Ve strukturní proteomice je využívána řada technik, jako je rentgenová krystalografie, nukleární magnetická rezonance (NMR), MS apod. Získané informace jsou využívány k pochopení strukturního chování bílkovin a mají využití v proteinovém inženýrství při modifikaci bílkovin pro specifické účely (výroba léčiv, průmyslových enzymů apod.).

Z hlediska vlastní analýzy proteinů rozlišujeme dva základní přístupy:

1. Bottom-up přístup – který je založen na štěpení proteinů na peptidy. Vzniklé peptidy jsou pak analyzovány po odpovídající separaci hmotnostní spektrometrií. Na základě zpracování MS dat získaných analýzou peptidů jsou pak pomocí databázového prohledávání identifikovány proteiny. Do této skupiny metod patří i shotgun proteomika.
2. Top-down přístup – je založen na MS/MS fragmentaci celého intaktního proteinu bez předchozího štěpení na peptid. Tento přístup vyžaduje MS instrumentaci s vysokým rozlišením. Výhodou tohoto přístupu je možnost analýzy intaktního proteinu včetně kompletního stavu PTM.

## 2.5 Bottom-up proteomika

Většina proteomických analýz používá proteázy k digesci proteinů na peptidy. Peptidy jsou poté analyzovány v přístroji umožňujícím tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS) a získané údaje o poměrech hmotnosti ku náboji peptidů a jejich odpovídajících fragmentů a predikovaná sekvence jsou použity k odvození informací o proteinech ve vzorku. Schéma bottom-up proteomického experimentu je zobrazeno na obrázku 9 [27].



Obrázek 9: Schéma bottom-up proteomického experimentu – z biologického vzorku jsou izolovány proteiny - 1D/2D gelová elektroforéza pro kontrolu kvality proteinové extrakce a hrubého rozdělení bílkovin dle molekulové hmotnosti – bodové/pásové vyřiznutí – proteolytická digescce v gelu – analýza LC-MS/MS – vyhodnocení pomocí databázového vyhledávání – identifikace proteinů, bioinformatická analýza [27]

Bottom-up proteomika využívá výhod, které mají peptidy oproti proteinům: peptidy je možné snáze separovat kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (RPLC), jsou dobře ionizovatelné a způsob fragmentace je předvídatelnější. To se promítá v robustní metodice, která se vyznačuje vysoce výkonnou analýzou umožňující identifikaci a kvantifikaci tisíců proteinů ze složitých lyzátů. Dnes jsou bottom-up přístupy, využívající datově závislý sběr dat (DDA), základními

technologemi proteomiky. Pracovní postupy, nazývané shotgun proteomika, se zasloužily o velké množství proteinových identifikací a byly použity k řešení většiny dnes dostupných, komplexních a úplných proteomů, včetně prvních náčrtů lidského proteomu. Nové strategie sběru dat, jako je monitorování vybraných reakcí (SRM), dále zvyšují citlivost metody a reprodukovatelnost kvantifikace jednotlivých proteinů. V současné době se intenzivně vyvíjí přístup na bázi datově nezávislého sběru dat (DIA), který se stává hlavní hnací metodikou budoucnosti. Cílem je získat detailnější popis komplexních vzorků [28, 29, 30, 31, 32, 33, 34]. Charakteristickým znakem bottom-up proteomiky je rozsáhlé využívání digesce proteázami, které má také ale své nevýhody. V bottom up přístupu je k digesci standardně využíván trypsin. Jedná se o velmi účinnou proteázu s vysokou katalytickou aktivitou. Specificky štěpí proteiny na peptidy, které obsahují na C-koncích zbytky bazických AMK argininu nebo lysinu. Tento způsob štěpení je ideální pro analýzu tandemovou hmotnostní spektrometrií s kolizně indukovanou disociací (CID). I přes efektivitu trypsinu, 56 % všech generovaných peptidů obsahuje méně než 7 AMK zbytků. Tyto peptidy jsou tedy příliš malé na to, aby mohly být identifikovány pomocí MS. Kromě toho pouze zlomek těchto peptidů poskytuje užitečné fragmentační sekvence [35, 36, 37, 38].

Omezené informace o sekvenci získané z malých peptidů většinou postačují k určení skupiny proteinů, nejsou však často dostatečné k identifikaci proteoforem [26].

### **2.5.1 Příprava vzorků**

Cílem proteomiky je komplexní analýza všech proteinů v daném vzorku. Pro úspěšné provedení experimentu je nejdůležitějším krokem právě příprava vzorku. Pokud tento krok nebude uskutečněn v potřebné kvalitě, správné provedení dalších kroků ztrácí na důležitosti. Na rozdíl od proteomiky jsou v případě genomiky a transkriptomiky nukleové kyseliny relativně konstantní, pokud jsou diskutovány fyzikálně-chemické vlastnosti. K jejich izolaci téměř z jakéhokoliv vzorku lze využít univerzální standardní metody a pufrů. V proteomice tyto způsoby využít nelze. Funkční skupiny postranních řetězců aminokyselin se vyznačují velkou rozmanitostí, ať už velikostí náboje či hydrofobicity. To je důvodem, proč využití univerzálního pufru není možné [39].

V genomice lze také využít metody založené na amplifikaci DNA, které jsou označovány jako PCR reakce. Umožňují produkci velkého množství cílové DNA v jediném, spolehlivém a snadno proveditelném kroku; v oblasti proteomiky však podobné alternativy nejsou známy. Biologické směsi se vyznačují velkou rozmanitostí proteinů v chemickém ohledu, tvaru i velikosti. Velmi významným rozdílem je hojnost jednotlivých proteinů. Některé lze nalézt v nepatrném množství (jednotky kopií proteinu v buňce), zatímco jiné se mohou vyskytovat v několika milionech na jednu buňku. I přes neustálý rozvoj a zdokonalování hmotnostních spektrometrů v selektivitě a citlivosti nemůže žádný dnes dostupný přístroj vyřešit takto komplexní směsi jediným měřením. Proto je třeba použít různé separační postupy, aby se zjednodušilo a zefektivnilo využití proteomické analýzy [40, 41].

Mezi metody používané pro přípravu vzorku je obvykle zahrnována extrakce proteinů z biologické komplexní směsi, odstranění neproteinových kontaminantů (DNA, cukry, tuky, lipidy), odstraňování zbytkových solí a frakcionace ke zjednodušení vzorku.

#### **2.5.1.1 Metody přípravy vzorku v bottom-up proteomice a jejich výhody**

Bottom-up proteomika využívá nesbalené proteiny, které jsou snadno dostupné pro proteázy, a tak vzniká více peptidů pro MS analýzu. Lýze tkání či buněk je realizována za použití silných denaturantů (močovina, guanidin) a iontovými detergenty (SDS) [42].

V závislosti na použitém vzorku může být užitečným krokem odstranění proteinů s vysokou četností (např. albuminu) nebo naopak obohacení proteinů (např. při analýze fosfoproteinů) [43].

Techniky, poskytující nejvyšší selektivitu a citlivost pro proteiny vyskytující se v malém množství, jsou afinitní chromatografie a imunoprecipitace. Použitelnost těchto metod závisí na dostupnosti podpůrných látek nebo protilátek [44, 45].

Pro odstranění malých molekul je možno využít dialýzu, výměnu pufrů, molekulových sít, srážení proteinů, chromatografií nebo elektroforézu. Mezi nejjednodušší, nejméně nákladnou metodu odsolování je využíváno srážení organickými rozpouštědly jako je aceton nebo methanol či chloroform. V proteomické analýze je široce používána metoda 1D-SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného) a v menší míře také 2D-PAGE (dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu). Tyto metody slouží kromě odstranění solí, detergentů a dalších malých molekul ze vzorku také k frakcionaci proteinů na základě jejich molekulových hmotností (SDS-PAGE) nebo na základě jejich izoelektrického bodu a molekulové hmotnosti (2D-PAGE). SDS-PAGE je levná a vysoce spolehlivá metoda. Svým rozlišením přesahuje vylučovací chromatografii [28, 46, 47].

Při přípravě vzorku pro bottom-up proteomickou analýzu je nutno postupovat obezřetně a snažit se předejít znehodnocení analýzy. Příprava vzorku může být ovlivněna mnoha faktory:

- Neúplnou dezintegrací, neúplnou solubilizací proteinů a kontaminací během manipulace se vzorky.
- Mezi kontaminující sloučeniny patří detergenty používané jak pro solubilizaci vzorku, tak pro čištění laboratorního skla.
- Mezi další běžné kontaminující sloučeniny patří také látky uvolňující se vyluhováním z plastů. Přítomnost ftalátů má pak za následek zkreslení výsledků.
- Keratiny z kůže a prachu jsou dalším běžným kontaminantem, které prodlužují čas detekce a snižují počet užitečných zaznamenaných spekter. Proto je bezpodmínečně nutné nosit rukavice a pečlivě otřít povrchy, aby se tato kontaminace minimalizovala.
- Dalšími častými bílkovinnými kontaminantami jsou lysozym, DNáza a RNáza, které jsou aplikovány v kroku zpracování buněk, hovězí sérový albumin, složky hmotnostních markerů z elektroforézy, trypsin a další proteázy z kroku digesce [48, 49].

Problémy s přípravou vzorků pro bottom-up proteomickou analýzu jsou ve velké míře výsledkem obrovské variability vlastností bílkovin. K dispozici je velké množství metod a technologií, z nichž každá je přizpůsobena konkrétním vzorkům a skupinám proteinů. S takovou rozmanitostí a množstvím možností ze kterých lze vybírat, je těžké vybrat nejvhodnější metodu pro daný vzorek. Příprava vzorků je obvykle realizována ve více krocích, je náchylná ke ztrátám, kontaminaci, přičemž je často i časově náročná a pracná. Výsledkem těchto komplikací může být nižší reprodukovatelnost současných metod přípravy vzorku [50].

### **2.5.1.2 Metoda FASP (*filter aided sample preparation*)**

Metoda FASP je často zjednodušeně chápána jako série ultrafiltračních kroků zadržujících proteiny na ultrafiltrační membráně, umožňující postupnou eluci činidel s nízkou molekulovou hmotností. Po enzymatickém štěpení proteinů a v konečné fázi procesu umožňuje separaci peptidů. I když se tento zjednodušený pohled zdá věrohodný, nejedná se o pouhou filtraci.

Skutečnosti ovlivňující FASP metodu [51, 52]:

1. Denaturované proteiny jsou objemnější než ve svém nativním stavu. Metoda FASP byla vyvinuta pro zpracování tkáňových extraktů připravených pomocí SDS. SDS je v biochemii široce používaný detergent díky jeho schopnosti účinně denaturovat proteiny. Tato denaturace způsobuje zvýšení objemu denaturovaných proteinů oproti uspořádanému zabalenému stavu. Důsledkem tohoto jevu je skutečnost, že proteiny s molekulovou hmotností hluboko pod hodnotou cut-off ultrafiltrační membrány

nemohou projít přes její póry. Například jaderné histony, které mají molekulovou hmotnost kolem 10 000 Da, se kvantitativně zadržují v ultrafiltrační membráně s hodnotou cut-off 50 000 Da.

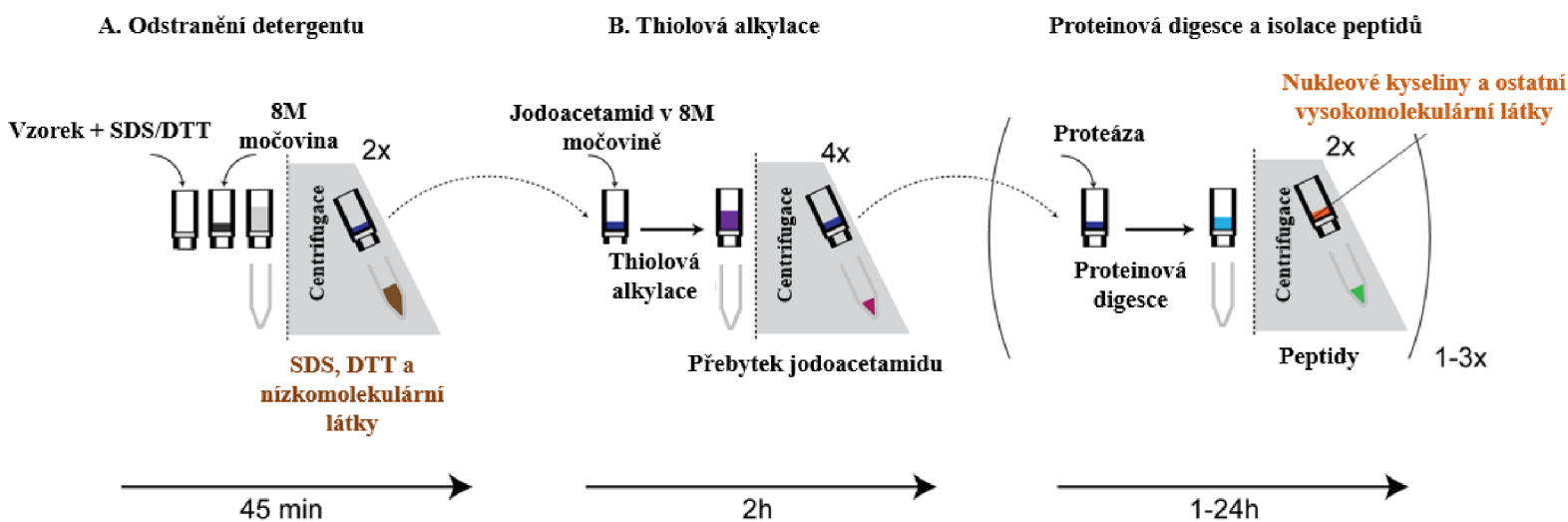
2. Filtr s velkými póry usnadňuje odstranění SDS. Detergenty jsou široce používány v molekulárních biologických vědách, ale mechanismus jejich působení často zůstává bez povšimnutí. Klíčovým parametrem, charakterizujícím účinek detergentu, je kritická koncentrace micel (CMC). Pod touto koncentrací se detergenty vyskytují jako monomery a téměř nepřispívají k solubilizaci hydrofobního materiálu. Molekuly detergentu nad CMC se organizují do micel. Mícely řídí proces solubilizace včleňováním hydrofobních molekul do micel a tedy dochází k vytvoření směsných micel nebo micelám podobných proteinových detergentních komplexů. Extrakce tkání vede k tvorbě heterogenní soustavy micel. Při pokojové teplotě ve vodě tvoří SDS micely o průměrné velikosti 20 000. Smíšené micely SDS a dalších biologických složek mohou tuto velikost přesáhnout.

Protože enzymatické štěpení proteinů lze provádět pouze v nepřítomnosti nebo přítomnosti pouze stopových množství SDS, je odstranění detergentu klíčovým krokem v procesu přípravy vzorku. Vzhledem k velikosti nemohou být SDS micely a SDS směsné micely prakticky odděleny od solubilizovaných proteinů ultrafiltrací. Aby se toho dosáhlo kvantitativním způsobem, musí být detergentní micely kontrahovány nebo disociovány. Ve FASP metodě se k tomu využívá koncentrovaná močovina.

3. Renaturace proteinů. Odstranění detergentu a následné významné snížení koncentrace močoviny nebo její eliminace může vést k renaturaci polypeptidů. Renaturace in vitro je ovšem pomalý proces a ve složitých směsích proteinů a v přítomnosti dalších buněčných složek s vysokou molekulovou hmotností, jako je DNA a polysacharidy, je téměř nereálná.

Pracovní postup FASP se skládá ze tří klíčových kroků (viz obrázek 10) [52, 53]:

- a) odstranění SDS
- b) chemická modifikace thiolových skupin
- c) štěpení proteinů a purifikace peptidů. Tento krok lze rozšířit postupným štěpením jedním nebo dvěma dalšími enzymy, což vede k vytvoření jedinečných populací peptidů. Tato metoda je označována jako FASP s vícenásobným enzymatickým štěpením (MED-FASP).



Obrázek 10: Znázornění pracovního postupu metody FASP [52]

V prvním kroku metody FASP se SDS-extrakt zředí pufrům obsahujícím 8M močovinu a detergent spolu s dalšími nízkomolekulárními složkami buňky se odstraní opakovanou filtrací za pomoci centrifugace. Je důležité, aby doba centrifugace byla dostatečně dlouhá k dosažení eluce 95 % naneseného roztoku. Obvykle je při pokojové teplotě zapotřebí 15–20 minut na jednu filtraci. Alkylace thiolových skupin cysteinu nastává po první filtraci a pokračuje během následujících filtračních kroků, dokud není odstraněno alkylační činidlo. Jako alkylační činidlo se využívá jodacetamid.

Dále je močovina vyměněna (pomocí ultrafiltrace) za digesční pufr a poté jsou proteiny štěpeny trypsinem nebo jiným enzymem štěpícím protein. Po štěpení proteinů jsou vzniklé peptidy filtrovány přes membránu. V tomto kroku jsou peptidy purifikovány z vysokomolekulárních látek, včetně neúplně štěpených polypeptidů a peptidů nesoucích části velkých posttranslačních modifikací [52].

## 2.6 HPLC a UHPLC separace

V současné době je metoda kapalinové chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) běžnou a nepostradatelnou analytickou technikou využívanou pro proteomické účely. Toto spojení iniciovalo vývoj nových ionizačních metod a vedla k široké škále rozhraní zaměřených na separaci různých směsí biologických komplexů. Ionizace za atmosférického tlaku (API) byla první metodou pro přímé propojení eluátu roztoku s hmotnostním analyzátozem [54, 55].

Cílem těchto metod je rozlišení a identifikace všech generovaných peptidů ze štěpených proteinů v daném proteomu. Jedná se o obtížný úkol z mnoha důvodů. Například proteom v séru může obsahovat až 20 000 proteinů s dynamickým rozsahem koncentrací  $10^{11}$ , což může při proteolytickém štěpení vést ke vzniku více než 600 000 peptidů nepočítaje PTM. Separace takových komplexních peptidových směsí je kritickým aspektem pro jejich identifikaci pomocí MS. Obecný princip HPLC separace směsí komplexních peptidů je založen na jejich interakci se stacionární fází a mobilní fází v koloně [56].

Mezi režimy HPLC vyvinuté pro peptidovou frakcionaci/sekvenční separaci patří [57, 58]:

1. Chromatografie na reverzní fázi (RP- HPLC) – frakcionace na základě hydrofobicity
2. Iontoměničová chromatografie (IEX) – frakcionace na základě náboje
3. Gelová permeační chromatografie (SEC) – frakcionace na základě rozdílů ve velikosti peptidů; používá se pouze ve speciálních případech

Metodu SEC je možno aplikovat v přístupech top-down ke studiu intaktních proteinů. Jedná se o metodu oblíbenou pro separaci dle velikosti částic. Vzhledem k faktu, že SEC je považován za chromatografickou metodu s nízkým rozlišením, která vyžaduje zředěné vzorky, je používána technika SEC s kombinací kolon o různých velikostech pórů, aby bylo dosaženo vysokého rozlišení při separaci komplexní směsi proteinů s širokým rozsahem molekulových hmotností (10–223 kDa) [59, 60].

V proteomice je možné také využívat tzv. vícerozměrnou technologii identifikace proteinů (MudPIT). Směs proteinů je podrobena specifické enzymatické digesci (obvykle za použití trypsinu a endoproteinázy LysC) a výsledná peptidová směs je následně oddělena silným kationtoměničem (SCX) a vysoce účinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (RP-HPLC). Kombinace HPLC, izoelektrické fokusace a kapilární elektroforézy je používána ke zlepšení separace komplexních proteinových směsí [61, 62, 63, 64, 65].

Metoda RP-HPLC se používá ve většině bottom-up proteomických experimentech k separaci proteolyticky generovaných peptidů díky své reprodukovatelnosti a robustnosti [66, 67].

Proteomické přístupy bottom-up i top-down jsou plně závislé na použitých separačních technologiích, které slouží k [26]:

- zajištění pokrytí proteomu ve velkém měřítku v daném čase
- pokrytí širokého rozmezí koncentrací proteinů, včetně stopových množství různých proteinů

Mnoho proteomických přístupů používá kombinaci IEX/RPLC, kde preferovaným RP ligandem zůstávají oktadecylsilany (C18) a výběr iontových ligandů experimentálně závisí na třídě peptidů, které mají být separovány [68, 69].

### 2.6.1 Kolony v proteomice

Výběr vhodné kolony (s dokonalou schopností separace proteinů/peptidů) je důležitým krokem při analýze. Hlavní typy analytických kolon, které se v současné době používají ve výzkumu proteomiky, mají různé vlastnosti s ohledem na použitý materiál, velikosti částic uvnitř kolony, délce a průměru. Účinné separace komplexních peptidových směsí v proteomických studiích bylo dosaženo použitím nano-LC/UHPLC a kapilárních kolon obsahujících C8 nebo C18 skupiny, či monolitických kapilár na bázi oxidu křemičitého [70, 71, 72, 73, 74].

V proteomické analýze je zásadní schopností možnost manipulace s velmi malým množstvím biologického materiálu. V případě metody UHPLC se využívá kapilárních kolon naplněných C-18 modifikovanými částicemi oxidu křemičitého o malém průměru a separace probíhá za vysokých tlaků. Kapacita kolony je charakterizována jako maximální množství vzorku, které může být danou kolonou separováno a tato hodnota závisí na složení mobilní fáze, složení vzorku apod. Bylo prokázáno, že maximální kapacitu kolony pro separaci peptidů lze zvýšit asi 1,5krát, pokud bude dosaženo snížení velikostí částic z 3  $\mu\text{m}$  na méně než 2  $\mu\text{m}$  [74].

Další možností je využití monolitických kolon. Tyto kolony jsou tvořeny jediným kusem stacionární fáze, která vykazuje vysokou permeabilitu a nízkou odolnost vůči přenosu hmoty. To je důvodem, proč jsou monolitické kolony vhodné pro separaci analytů s nízkými difúzními konstantami (např. separace proteinů, peptidů, nukleových kyselin či syntetických polymerů). První monolity byly syntetizovány jako membrány na bázi metakrylátů. V roce 1996 byl syntetizován monolit na bázi oxidu křemičitého pro použití v LC. Uvádí se, že monolity na bázi křemíku jsou vhodnější pro separaci malých molekul, zatímco polymerní monolity jsou užitečnější pro analýzu makromolekul. Monolitické kapilární kolony lze vyrábět v laboratoři bez nutnosti cenově nákladného média či rozpouštědla. Porovnání metod HPLC a UHPLC je uvedeno v tabulce 1 [74, 75, 76, 77, 78].

Tabulka 1: Porovnání metod HPLC a UHPLC [79, 80, 81]

HPLC	UHPLC
využívá materiál s větším průměrem částic v koloně	využívá materiál s menším průměrem částic v koloně
separace v prostředí nižšího tlaku	separace v prostředí vyššího tlaku
velikost částic přibližně 3-5 $\mu\text{m}$	velikost částic přibližně 1,7 $\mu\text{m}$
tlak 50-600 bar	tlak až 1000 bar
méně účinná separace s nižším rozlišením	účinnější separace s výrazně vyšším rozlišením
nižší rychlost separace	vyšší rychlost separace (až 9krát)
nižší citlivost separace	vyšší citlivost separace (až 3-5krát)
vyšší spotřeba rozpouštědla při separaci	nižší spotřeba rozpouštědla při separaci
nižší cena	vyšší cena



Problematické uvolňování tepla vznikající v koloně jako následek aplikace vysokého tlaku v systému UHPLC bylo vyřešeno použitím užších průměrů kolon. Zmenšování průměrů kolon má ovšem za následek technické problémy, jako je [26]:

- Problém s těsněním LC systému
- Potřeba velmi vysokých protitlaků při vysokých rychlostech průtoku
- Kontaminace

## 2.7 Hmotnostní spektrometrie

### 2.7.1 Instrumentace

Proteomická analýza využívá hmotnostní spektrometrii pro komplexní analýzu vzorků proteinů. Jedná se o špičkovou technologii vhodnou pro charakterizaci proteinů. Je široce používána pro identifikaci a kvantifikaci proteinů, charakterizaci proteinových interakcí či PTM [38].

Hmotnostní spektrometr se obecně skládá z iontového zdroje, který převádí molekuly analytu na ionty v plynné fázi, hmotnostního analyzátoru, který dělí ionty dle poměru hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ) a detektoru, který detekuje počet iontů při každé hodnotě  $m/z$  [38, 82, 83].

Vývoj elektrosprejové ionizace (ESI) a laserově desorpční ionizace v přítomnosti organické matrice (MALDI) způsobil revoluci v analýze proteinů pomocí MS. ESI je běžně používanou technikou ionizace peptidů nebo proteinů pro MS analýzu. Ionizuje látky v roztoku za atmosferického tlaku, a proto bývá tento typ ionizace často spojován s kapalinovou chromatografií [38, 82, 83].

Hmotnostní analyzátor je ústřední součástí technologie MS. V proteomice se běžně používají tyto základní typy hmotnostních analyzátorů:

- orbitrap
- iontová past (IT), lineární iontová past (LIT)
- kvadrupól (Q)
- analyzátor doby letu (TOF)
- iontový cyklotron s Fourierovou transformací (FTICR)

Také je možno využít přístrojů, které kombinují schopnosti jednotlivých hmotnostních analyzátorů. Lze sem zařadit např. Q-q-Q, Q-q-LIT, Q-TOF, TOF-TOF a LIT-FTICR [83]. Tyto analyzátorů jsou klíčem k udržení citlivosti, přesnosti, rozlišení a ke generování hmotnostních spekter (MS/MS spekter). Mohou být použity jednotlivě nebo navzájem kombinovány, aby se využily výhody každého z nich [38, 84].

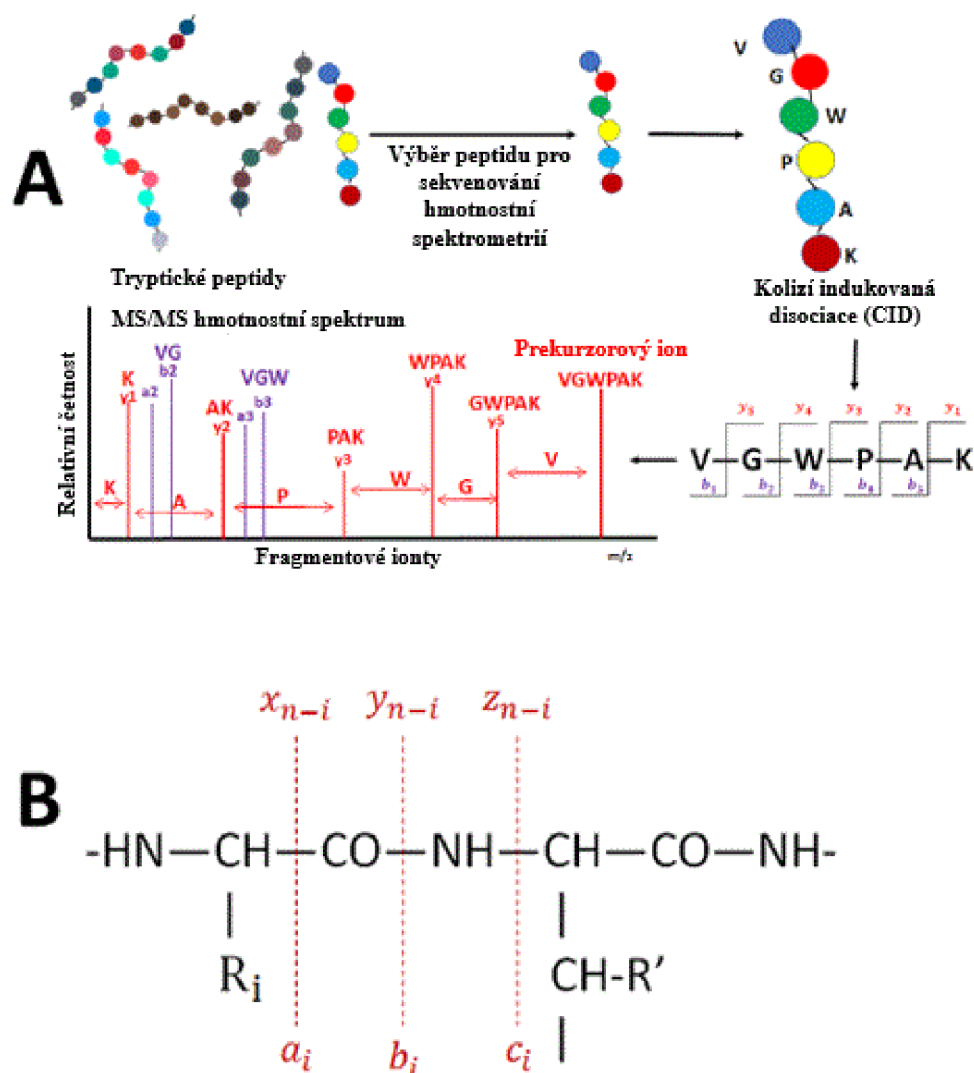
Přístroje MS jsou obvykle srovnávány s přístroji nukleární magnetické rezonance (NMR), protože jsou cenově náročné a vyžadují pravidelnou údržbu. Robustnost, relativní jednoduchost kroků přípravy vzorků, vysoce výkonná analýza a citlivost MS však zůstávají nepřekonanými [85, 86].

### 2.7.2 Fragmentační techniky

Je důležité zajistit, aby byly peptidy během analýzy disociovány. Pro hmotnostní spektrometry jsou využívány jednotlivé fragmentační/disociační techniky [26]:

1. disociace vyvolané srážkou (CID)
2. disociace záchytem elektronu (ECD)
3. disociace přenosem elektronu (ETD)
4. vysokoenergetické kolizní disociace (HCD).

Během CID MS/MS fragmentace vznikají zejména fragmenty štěpením peptidové vazby. Pokud vzniknout ionty fragmentů obsahující N-konec původního peptidu, jsou označovány jako ionty  $b_i$ , kdy  $i$  označuje počet aminokyselin v daném fragmentu. Analogicky, fragmenty obsahující C-konec, jsou označovány  $y_{n-i}$  ( $n$  je celkový počet aminokyselin v peptidu). V menším rozsahu mohou vznikat i další fragmenty typu  $a$  a  $x$  (viz obrázek 11). Předvídatelnost fragmentace peptidů umožňuje identifikaci proteinů pomocí databázového prohledávání nebo i určení peptidových sekvencí pomocí *de novo* sekvenování [26].



Obrázek 11: Korepondence mezi aminokyselinovou sekvencí peptidu a píky fragmentových iontů, které jsou produkovány v MS/MS (A); zobrazení teoreticky fragmentovaných iontů, které mohou být produkovány fragmentací peptidu (B) [26]

Jednotlivé disociační techniky produkují různé typy fragmentovaných iontů. Například při využití ECD fragmentace vznikají přednostně ionty typu  $c$  a  $z$  (viz obrázek 11), jsou štěpeny disulfidové vazby, avšak PTM zůstávají nedotčené. Tato metoda je typicky využívána přístroji FTICR MS. Podobnou technikou je i ETD fragmentace, která je využívána zejména u iontových pastí. Ve spojení s orbitrapem, jako hmotnostním analyzátozem, se hojně využívá HCD fragmentace [26].

### 2.7.3 Akviziční techniky MS dat

S rozvojem využití MS v proteomice byly současně vyvíjeny i metody sběru MS dat. Mezi hlavní akviziční techniky patří [26]:

- Data Dependent Analysis (DDA)
- Data Independent Analysis (DIA)
- Selected Reaction Monitoring (SRM)
- Parallel Reaction Monitoring (PRM).

DDA je strategie sběru dat, která vybírá k fragmentaci (MS/MS) prekurzorové ionty podle intenzity. Při akvizici v DDA modu jsou systematicky znevýhodněny minoritní komponenty, což vede k jejich nekonzistentní detekci a kvantifikaci. Tento problém narůstá s komplexností analyzovaných vzorků [87, 88].

DIA je akviziční metoda, při které jsou peptidy postupně fragmentovány v na sebe navazujících „oknech“ o daném rozsahu poměrů  $m/z$ , v rámci daného „okna“ všechny najednou. Tato metoda umožňuje analýzu peptidů, aniž by byla omezena jakýmkoli výběrem jednotlivých prekurzorů. DIA nabízí několik výhod oproti DDA pro charakterizaci komplexních proteinů. Na rozdíl od DDA, která postupně detekuje, vybírá a fragmentuje jednotlivé ionty, DIA systematicky paralelizuje fragmentaci detekovatelných iontů bez ohledu na jejich intenzitu, čímž poskytuje kompletnější sadu detekovaných signálů, lepší reprodukovatelnost pro identifikaci, lepší přesnost a citlivost pro kvantifikaci a takto bohatší pokrytí proteinů [89, 90].

SRM je technika MS určená pro kvantitativní analýzu vybraných proteinů v biologických směsích. Jedná se o vysoce selektivní a citlivou metodu. SRM spočívá ve výběru fragmentační reakce. V případě využití analyzátoru Q-q-Q jsou kvadrupóly Q1 a Q3 nastaveny na vybrané hodnoty  $m/z$  prekurzoru a vybraného fragmentu. Zaznamenávané jsou pouze prekurzory, ze kterých při fragmentaci v kolizní cele vzniká určený fragment. Absence skenování umožňuje zaměřit se na prekurzor a fragmentové ionty po delší dobu, čímž se zvyšuje citlivost [91].

PRM je další cílená metoda detekce prováděná pomocí hmotnostních spektrometrů s vysokým rozlišením, jako je kvadrupól-Orbitrap (q-OT). Podobně jako SRM může být PRM použita k ověření množství vybraných proteinů a jejich PTM. I když jsou metody SRM a PRM srovnatelné, PRM je nejvhodnější pro detekci a kvantifikaci proteinů na úrovni attomol v komplexním vzorku [92, 93].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Chemikálie

#### 3.1.1 Chemikálie pro kultivaci kvasinek

- Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)
- Bakteriologický pepton, Himedia (Indie)
- Glycerol, Lach-Ner (ČR)
- Hydroxid draselný p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)
- Močovina p.a, Lach-ner s.r.o (ČR)

#### 3.1.2 Chemikálie pro lýzi buněk

- SDT pufr - 4% (w/w) SDS; 0,1M DTT; 0,1M Tris-HCl; pH 7,6 (Sigma Aldrich, USA, Serva, Německo)

#### 3.1.3 Chemikálie pro 1D-SDS-PAGE elektroforézu

- Rozlišovací dělicí pufr - 1,5M Tris-HCl, pH 8,8 (Penta, ČR; Serva, Německo)
- Zaostřovací koncentrační pufr - 0,5M Tris-HCl, pH 6,8 (Penta, ČR; Serva, Německo)
- Běžící pufr - 0,025M Tris Báze, 0,192M Glycin, 0,19M SDS, pH 8,3 (Penta, ČR; Serva, Německo)
- Rozlišující gel (10 ml) 12% - rozlišující pufr 2,5 ml; akrylamide-bis 4 ml (37,5:1); 10% SDS 100  $\mu$ l; 10% APS 50  $\mu$ l, TEMED 5  $\mu$ l; 3,4 ml ddH<sub>2</sub>O (Penta, ČR; Sigma Aldrich, USA, Serva, Německo)
- Zaostřovací koncentrační gel (10ml) 4% - zaostřovací koncentrační pufr 2,5 ml, akrylamide-bis 1,3ml (37,5:1), 10% SDS 100  $\mu$ l, 10% APS 50  $\mu$ l, TEMED 15  $\mu$ l, 6,1 ml ddH<sub>2</sub>O (Penta, ČR; Sigma Aldrich, USA, Serva, Německo)
- Proteinový marker (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Xtra Standards, Bio-Rad, USA)
- Barvivo Coomassie Brilliant blue G 250

#### 3.1.4 Chemikálie pro FASP

- Jodoacetamid (Sigma Aldrich, USA)
- Močovina (Sigma Aldrich, USA)
- Hydrogenuhličitan amonný (Sigma Aldrich, USA)
- Trypsin (Promega, USA)

#### 3.1.5 Chemikálie pro extrakci

- Ethylacetát (Sigma Aldrich, USA)
- Kyselina mravenčí (Sigma Aldrich, USA)
- Polyethylen glykol (Sigma Aldrich, USA)
- Acetonitril (Sigma Aldrich, USA)

### 3.2 Přístroje a pomůcky

#### 3.2.1 Přístroje a pomůcky pro kultivaci kvasinek

- Klasické laboratorní sklo
- Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (Německo)
- GKB Color Digital CCD kamera (Tchajwan)
- Mini Vortex Mixers, Ohaus (Čína)
- Centrifuga Sigma, Laborzentrifugen (Německo)

- Analytické váhy Boeco (Německo)
- Laminární box Aura mini BioTech (ČR)
- Třepačka Yellow line (Německo)

### 3.2.2 Pomůcky a přístroje pro izolaci a analýzu proteinů

- Extrakční skleněné kuličky (Diagenode, Belgie)
- Sonikátor Bioruptor (Diagenode, Belgie)
- ThermoMixer C (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga 5417R (Eppendorf, Německo)
- Elektroforetická aparatura Mini-PROTEAN® 3 (Bio-Rad, USA)
- FASP kolonka Microcon 30 kDa (Eppendorf, Německo)
- V-1 plus, Vortex (bioSan, Lotyšsko)
- Speedvac® Concentrator model SPD111V-230 (ThermoFisher Scientific, USA)
- LC-MS/MS sestava (Thermo Fisher Scientific, USA)
  - Ultimate 3000 RSLCnano
  - Orbitrap Exploris 480
  - Předkolona - cartridge type,  $\mu$ Precolumn, 300  $\mu$ m ID, 5mm long; C18 PepMap100, 5 $\mu$ m particles, 100 Å; P/N 160454
  - Analytická kolona: EASY spray column, Acclaim PepMap RSLC C18 column (2  $\mu$ m particles, 75  $\mu$ m  $\times$  250 mm; PN ES902)
  - EASY spray ion source

## 3.3 Biologický materiál

### 3.3.1 Vybraný kmen kvasinek

Pro tuto práci byl zvolen kvasinkový kmen *Rhodosporidium toruloides*. Tento kmen byl získán ze sbírky „Culture Collection of Yeasts“ (CCY), která je součástí Chemického ústavu Slovenské akademie věd se sídlem v Bratislavě na Slovensku.

Tabulka 2: Kvasinky použité v této práci

Název kmene	Kód kmene
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	CCY 062-002-004

## 3.4 Kultivace kvasinek

Kultivace vybraného kmene kvasinek probíhala ve čtyřech na sebe navazujících fázích. V první fázi kultivace bylo připraveno upravené pevné YPD-agarové médium, které bylo zaočkováno příslušným kmenem kvasinek. V dalších dvou fázích bylo postupně provedeno přeočkování do inokulačního média I a II. V poslední fázi kultivace bylo provedeno zaočkování produkčních médií. Při celém procesu kultivace byla udržována optimální laboratorní teplota, dostatek světla a celý proces probíhal za neustálého třepání na třepačce.

### 3.4.1 Příprava a zaočkování pevného média

Připravené pevné médium, jehož složení je uvedeno v tabulce 3, bylo sterilizováno při teplotě 120 °C po dobu 40 minut ve vysokotlakých hrncích a následně bylo za sterilních podmínek převedeno do sterilních Petriho misek. Po ochlazení byly Petriho misky v laminárním boxu pod UV světlem uzavřeny parafilmem a uchovány v lednici pro pozdější použití.

Pro zaočkování zmíněného pevného média v Petriho misce bylo použito několik kliček zásobní kultury daného kmene kvasinek. Byly použity zásobní kultury skladované při teplotě -80 °C v chladicím boxu. Skladovací médium obsahovalo směs kvasinkové kultury v YPD médiu

a glycerolu jako kryoprotektiva v poměru 1:1. Pro optimální namnožení buněk byla kultura ponechána na agarových plotnách po dobu 3 dnů.

Tabulka 3: Složení pevného upraveného YPD média

Složka média	Množství
Voda	1000 ml
Pepton	20 g
Kvasniční autolyzát	10 g
Glycerol	20 ml
Agar	20 g

### 3.4.2 Příprava inokula I a II

Po optimální proliferaci buněk byla kultura připravena na přeočkování do kapalného inokulačního média. Složení tohoto média je uvedeno v tabulce 4. Připravené kapalném médium bylo rovněž sterilizováno při teplotě 120 °C po dobu 40 minut. Po následném ochlazení na laboratorní teplotu bylo kapalném médium zaočkováno tak, že na 10 ml média byla použita jedna očkovací klička.

Po 24 hodinách bylo dle přiloženého složení v tabulce 4 připraveno druhé kapalném inokulační médium. Po jeho sterilizaci a ochlazení bylo k naočkování použito 60 ml kultury a následně bylo ponecháno 24 hodin k pomnožení buněk.

Tabulka 4: Složení kapalných upravených YPD médií

Složka média	YPG 1	YPG 2
Voda	100 ml	300 ml
Bakteriologický pepton	2 g	6 g
Kvasinkový autolyzát	1 g	3 g
Glycerol	2 ml	6 ml

### 3.4.3 Příprava a zaočkování produkčních médií

Produkční média byla připravena dle složení, které je uvedeno v tabulce 5. V této práci bylo testováno pět různých C/N poměrů a to C/N 13, 25, 50, 100 a 150. Pro každý C/N poměr byly připraveny 2 Erlenmayerovy baňky o objemu 0,5 l. Všech deset připravených médií bylo opět vysterilizováno, ochlazené na laboratorní teplotu a k naočkování bylo použito inokulum II o objemu 30 ml. Poté byly Erlenmayerovy baňky se zaočkovanými produkčními médii přemístěny na třepačky, kde pokračovala kultivace za optimálních podmínek.

Tabulka 5: Složení jednotlivých C/N poměrů produkčních médií

Složka média	C/N 13	C/N 25	C/N 50	C/N 100	C/N 150
Voda	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,07 g	0,07 g	0,07 g	0,07 g	0,07 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 g	0,4 g	0,4 g	0,4 g	0,4 g
Glycerol	2,405 g	4,626 g	9,251 g	18,503 g	27,754 g
Močovina	0,181 g	0,181 g	0,181 g	0,181 g	0,181 g

### 3.4.4 Odběry vzorků

Byly provedeny dva odběry vzorků, a to po 48 a 96 hodinách kultivace. Odběry byly provedeny totožně. Vzorky byly převedeny do centrifugačních zkumavek a centrifugovány po dobu 5 minut rychlostí otáčení 4500 rpm. Následně byl supernatant nahrazen destilovanou vodou, zkumavky byly rovnoměrně vyváženy a jejich obsah byl rozsuspendován na vortexu. Nakonec byla provedena další centrifugace za stejných podmínek a po odstranění supernatantu byly vzorky zamrazeny.

### 3.5 Izolace, frakcionace a stanovení proteinů

V tabulce 6 je zobrazen přehled jednotlivých vzorků kvasinek kultivovaných v této práci.

Tabulka 6: Seznam vzorků používaných v této práci

Číslo vzorku	C/N poměr	Doba kultivace	Označení vzorku
1	C/N 13	96 hod	C/N13_96hod_1
2	C/N 13	96 hod	C/N13_96hod_2
3	C/N 25	96 hod	C/N25_96hod_1
4	C/N 25	96 hod	C/N25_96hod_2
5	C/N 50	96 hod	C/N50_96hod_1
6	C/N 50	96 hod	C/N50_96hod_2
7	C/N 100	96 hod	C/N100_96hod_1
8	C/N 100	96 hod	C/N100_96hod_2
9	C/N 150	96 hod	C/N150_96hod_1
10	C/N 150	96 hod	C/N150_96hod_2
11	C/N 13	48 hod	C/N13_48hod_1
12	C/N 13	48 hod	C/N13_48hod_2
13	C/N 25	48 hod	C/N25_48hod_1
14	C/N 25	48 hod	C/N25_48hod_2
15	C/N 50	48 hod	C/N50_48hod_1
16	C/N 50	48 hod	C/N50_48hod_2
17	C/N 100	48 hod	C/N100_48hod_1
18	C/N 100	48 hod	C/N100_48hod_2
19	C/N 150	48 hod	C/N150_48hod_1
20	C/N 150	48 hod	C/N150_48hod_2

#### 3.5.1 Proteinová extrakce

V této části práce byl nejprve připraven SDT pufr. Následně byly odebrané vzorky rozmrazeny. Horký pufr o objemu 500 µl a teplotě 95 °C byl přidán do všech dvaceti vzorků, které byly následně inkubovány po dobu 30 minut a při teplotě 95 °C v termomixéru za současného míchání (800 rpm). Vzorky byly poté ochlazeny na laboratorní teplotu a centrifugovány při 4500 x g po dobu 5 minut. Následně byl supernatant převeden do 2ml vialek. Usazené kvasinkové pelety byly rozptýleny špičkou pipety a bylo k nim přidáno 200 µl SDT pufru. Do každé sonikační zkumavky o objemu 1,5 ml bylo přidáno asi 40-50 mg extrakčních skleněných kuliček a k nim nachystané objemy dispergovaných kvasinek. Byla provedena sonikace v množství 30 cyklů (30 s zapnuto/30 s vypnuto) při teplotě 4 °C, po které navazovala centrifugace při 6000 x g po dobu 2 minut. Takto získané supernatanty byly přidány do 2ml vialek se supernatantem odebraným dříve. Nakonec byla provedena ještě jedna centrifugace při 20000 x g po dobu 2 minut při laboratorní teplotě a získaný supernatant byl použit v další části experimentu.

### 3.5.2 SDS-PAGE elektroforéza

Pro kontrolu kvality předcházející extrakce proteinů byla provedena jednorozměrná SDS-PAGE elektroforéza, která rozděluje izolované proteiny podle jejich molekulových hmotností. Byl připraven 12% polyakrylamidový gel. Po ztuhnutí gelu byly do vytvořených jamek napipetovány proteinové roztoky v objemu 5  $\mu$ l na každou jamku. Do prázdné jamky byl také nanesen standard (žebříček). Gel byl následně vložen do elektroforetické vany, převrstven pufrem, do systému bylo vloženo elektrické napětí a zahájena elektroforéza. Vizualizace byla prováděna pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue G-250.

### 3.5.3 Metoda FASP (Filter assisted sample preparation)

Předem připravené roztoky: IAA – 0,05M jodoacetamid v roztoku UA  
UA – 8M močovina v 0,1M Tris-HCl pufru o pH 8,5  
AB – 0,05M  $\text{NH}_4\text{CO}_3$

Pro metodu FASP byl zvolený objem vzorků následovný: vzorky 1-5, 11-20 byly využity v objemu 100  $\mu$ l, vzorky s očíslováním 6-10 v objemu 60  $\mu$ l. Tato metoda byla provedena v kolonce Microcon s membránou o definované hodnotě pórů, „cut-off“ 30 kDa. Ke vzorku bylo přidáno 200  $\mu$ l UA a vzorek byl centrifugován při 14000 x g a teplotě 25 °C (další centrifugace probíhaly za stejných podmínek, pokud není uvedeno jinak). Tento krok byl opakován ještě jednou. Po odebrání odpadu ze sběrné zkumavky bylo napipetováno na filtr 100  $\mu$ l IAA. Takto připravené kolonky byly inkubovány při laboratorní teplotě a rychlosti otáček 900 rpm po dobu 1,5 min a poté 20 min při rychlosti otáček 350 rpm, vše při laboratorní teplotě a v temnu. Následně bylo přidáno 100  $\mu$ l UA a provedena centrifugace. Tento krok byl opakován třikrát. V další fázi bylo přidáno 100  $\mu$ l AB v MilliQ vodě (MQ) a proběhla centrifugace. Tento krok byl opět opakován třikrát. V další části probíhalo enzymatické štěpení, kdy bylo přidáno 49  $\mu$ l 50mM AB v MQ a 1  $\mu$ l trypsinu o koncentraci 1  $\mu$ g/ $\mu$ l v 50mM AB v MQ. Inkubace trvala 18 hod při teplotě 37 °C. Poté následovala eluce naštěpených peptidů z filtračních jednotek do nových sběrných zkumavek a centrifugace. Nakonec bylo na filtrační jednotky přidáno 50  $\mu$ l 50mM roztoku AB v MQ a provedena centrifugace. Tento krok byl proveden dvakrát.

### 3.5.4 Extrakce ethylacetátem

Dalším krokem zvoleným pro přečištění výsledné peptidové směsi byla extrakce. K odstranění reziduí SDS byl využit ethylacetát jako extrakční činidlo. Ke vzorkům byl přidán 1 ml ethylacetátu a směs byla promíchávána v termomixéru po dobu 2 min (2000 rpm). Pro oddělení jednotlivých vrstev bylo provedeno odstředování při rychlosti otáček 13400 rpm, laboratorní teplotě a po dobu 30 s. Horní ethylacetátová vrstva byla následně odpipetována. Přidání 1 ml ethylacetátu, protřepání, odstředění a odstranění bylo provedeno celkem třikrát. Bylo odstraněno maximální množství ethylacetátu za pomoci 200 $\mu$ l pipety. Zbytek ethylacetátu byl odpařen (40-60 min).

### 3.5.5 Kyselá extrakce

Přečištěná směs peptidů z ethylacetátové extrakce byla přenesena do autosamplerové TPX vialky, kde bylo pipetováno 1,5  $\mu$ l 0,01% roztoku PEG. Do mikrozkušavky bylo pipetováno 25  $\mu$ l 5% roztoku kyseliny mravenčí a 25  $\mu$ l 100% roztoku acetonitrilu. Tato směs byla vortexována po dobu 10 s a následně pipetována do autosamplerové TPX vialky. Do další mikrozkušavky bylo pipetováno 100  $\mu$ l 100% roztoku acetonitrilu. Tento roztok byl vortexován opět po dobu 10 s a pipetován do autosamplerové TPX vialky. Nakonec byla směs v autosamplerové TPX vialce 28 min odpařována a poté zředěna MQ na objem 30  $\mu$ l. Pro



následující LC-MS analýzu byl vzorek zředěn tak, že z objemu 30 µl byl použit 1 µl vzorku, ke kterému byly přidány 4 µl 5% kyseliny mravenčí a 15 µl MQ.

### 3.5.6 LC-MS/MS analýza

Pro LC-MS/MS byly použity přístroje Ultimate 3000 RSLCnano a Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific). Směs peptidů byla separována pomocí LC gradientové eluce trvající 104 minut. Složení mobilní fáze a průběh gradientu dokládá tabulka 7.

Použitou ionizační technikou byl elektrosprej, jako fragmentační technika byla využita HCD fragmentace.

Tabulka 7: Parametry gradientové eluce

	<b>Složka A – 0,1% kyselina mravenčí ve vodě</b>	<b>Složka B – 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu</b>	
<b>Čas [min]</b>	<b>Procentuální zastoupení [%]</b>	<b>Procentuální zastoupení [%]</b>	<b>Průtok [nl/min]</b>
0	3	97	500
2	3	97	500
3	3	97	300
4	3	97	300
94	37	63	300
101	80	20	300
104	80	20	300

### 3.5.7 Vyhledávání v databázích

Získaná MS/MS data byla zpracována použitím programu DIA-NN (verze 1,8) [94]. Dále byl použit režim „library free search“ s využitím následujících proteinových databází:

- UniProtKB – Rhodosporidium toruloides
  - Taxonomie: Rhodosporidium toruloides
  - ID taxonu: 5286
  - Verze z 24. 5. 2021
  - Celkem 7496 sekvencí
- cRAP contaminant database
  - databáze obsahující kontaminace
  - založeno na <http://www.thegpm.org/crap/>
  - celkem 112 proteinových sekvencí
  - verze 181122
  - od finálních výsledků byly nalezené kontaminace odděleny

Výsledky vyhledávání v databázi byly nastaveny tak, aby se řídily těmito prahovými hodnotami falešně pozitivních výsledků (FDR):

- úroveň prekursoru: 1 % FDR
- hladina proteinové skupiny: 1 % FDR

Pro filtrování vytvořeného seznamu proteinů byly nastaveny následující minimální prahové hodnoty počtu peptidů

- minimální počet proteotypických peptidů: 1

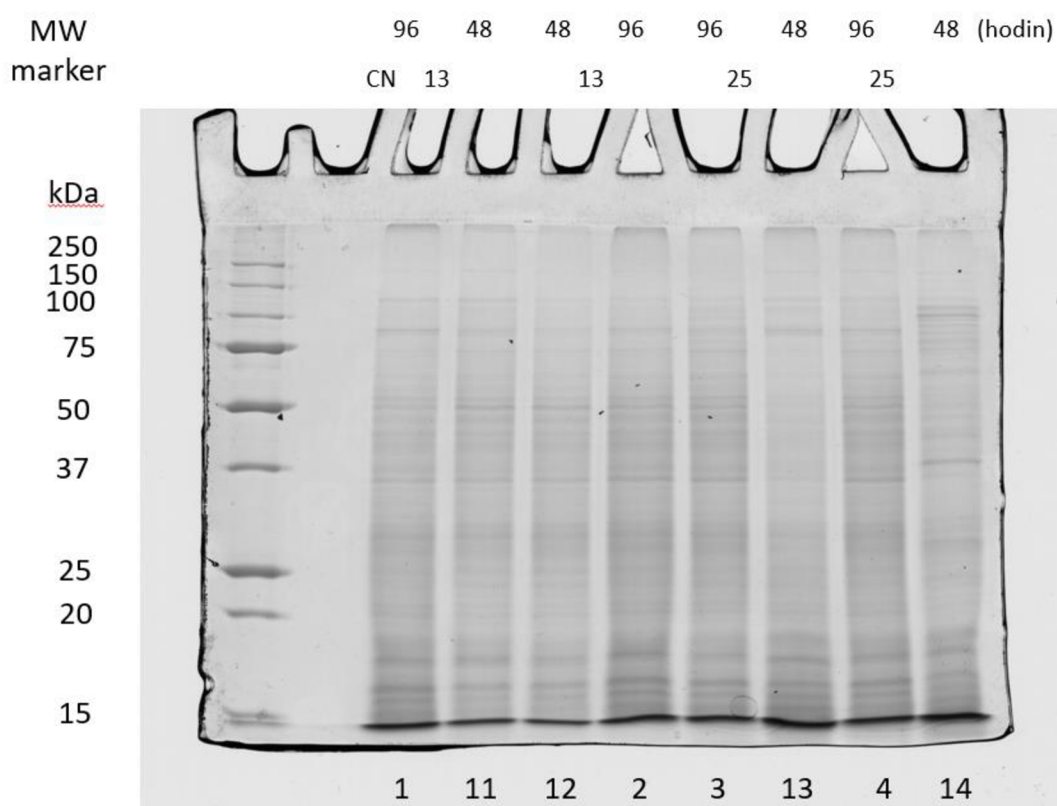
Pro následující vyhodnocení byla použita bioinformatická databáze DAVID [95] s následujícími parametry:

- pro vyhledávání byly použity IDs proteinů
- jako identifikátor byl nastaven UNIPROT\_ACCESSION
- typ seznamu: Gene List
- druh: *Rhodospiridium toruloides*
- v analýze byl využit „Functional Annotation Tool“

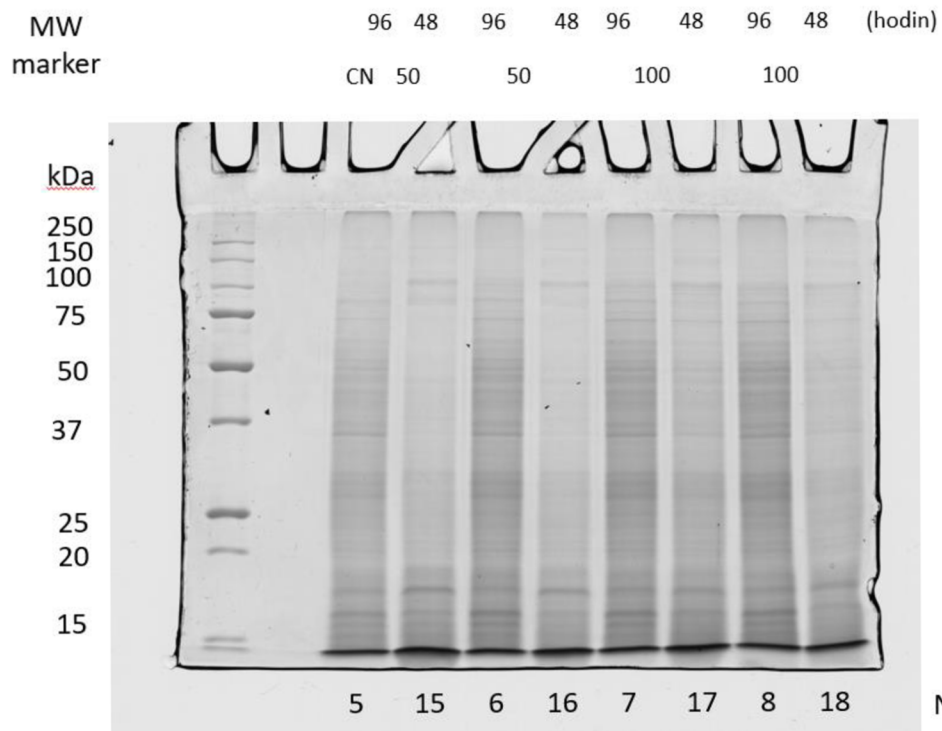
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Výsledky 1D SDS-PAGE

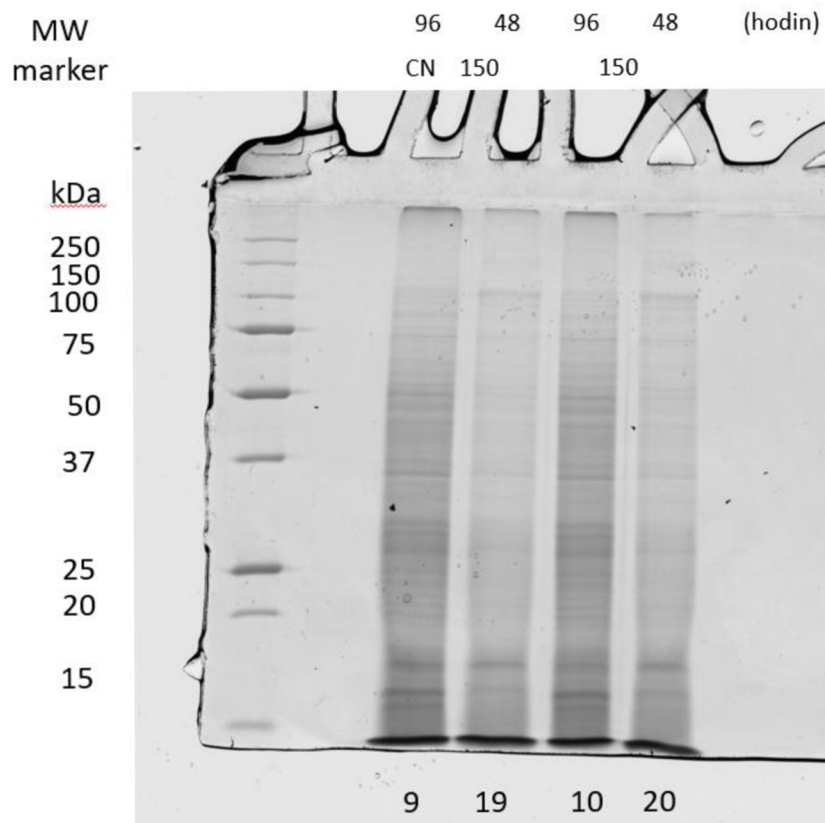
Dle výše přiloženého postupu byla provedena jednorozměrná SDS-PAGE. Na obrázcích 12, 13 a 14 jsou vyobrazeny výsledky. Z obrázků je patrné, že obecně nejintenzivnější proužky vykazují proteiny s nízkou molekulovou hmotností (cca 15-18 kDa). Dále je možné vidět, že vzorky kultivované 96 hodin měly bohatší zastoupení proteinů než vzorky kultivované pouze 48 hodin. Největší množství proteinů lze vizuálně zaznamenat u kvasinek kultivovaných na produkčních médiích o poměru C/N 100 a C/N 150 v čase kultivace 96 hodin. Naopak u nižších C/N poměrů a kratší doby kultivace byly znázorněny proteiny v menším množství. Z této skutečnosti lze usoudit, že délka kultivace a složení produkčních médií (C/N) má významný vliv na množství proteinů produkovaných tímto kmenem kvasinek.



Obrázek 12: Zobrazení výsledků 1D SDS-PAGE



Obrázek 13: Zobrazení výsledků 1D SDS-PAGE



Obrázek 14: Zobrazení výsledků 1D SDS-PAGE

## 4.2 Výsledky a porovnání proteinového zastoupení kultivovaných kvasinek

Vzorky kvasinek rodu *Rhodospiridium toruloides* kultivovaných za různých podmínek byly naštěpeny a následně analyzovány LC-MS/MS. Výsledkem byla detekce 4986 proteinů v rámci celého datasetu. Po zpracování dat byly určeny skupiny proteinů s rozdílnou regulací pro vybrané dvojice vzorků, zejména změny v proteinovém složení v závislosti na době kultivace pro jednotlivé C/N poměry, následně i změny pozorované u kvasinek kultivovaných s použitím krajních hodnot C/N poměrů. V tabulce 8 jsou shrnuty jednotlivé podmínky a porovnání vybraných experimentů. U všech experimentů jsou popsány C/N poměry použitých kultivačních médií, časové údaje týkající se doby kultivace kvasinek a počty rozdílně regulovaných proteinů pro jednotlivá srovnání. Kultivace všech vzorků o příslušných C/N poměrech byla provedena ve dvou paralelních opakování a pro každý experiment jsou vyhodnoceny kvalitativní a kvantitativní změny proteinů. Tato práce bude z důvodu velkého rozsahu detailněji zaměřena pouze na uvedená srovnání (zvýrazněna šedě v tabulce 8).

Tabulka 8: Přehled a porovnání jednotlivých experimentů zahrnující kvalitativní a kvantitativní změny upregulovaných a downregulovaných proteinů

Podmínky experimentu (C/N poměr; doba kultivace)	kvalitativní změny		kvantitativní změny	
	Počet upregulovaných proteinů	Počet downregulovaných proteinů	Počet upregulovaných proteinů	Počet downregulovaných proteinů
C/N 13; 96 hod - C/N 13; 48 hod	66	32	0	0
C/N 25; 96 hod - C/N 25; 48 hod	45	16	6	3
C/N 50; 96 hod - C/N 50; 48 hod	34	18	0	0
C/N 100; 96 hod - C/N 100; 48 hod	43	12	203	190
C/N 150; 96 hod - C/N 150; 48 hod	44	11	378	272
C/N 150; 48 hod - C/N 13; 48 hod	79	65	456	490
C/N 150; 96 hod - C/N 13; 96 hod	61	39	69	91

Kvalitativní změny (např. pro C/N 150\_96 hod-C/N 150\_48 hod) jsou vyhodnoceny dle následujících kritérií:

- Upregulované proteiny jsou takové, které se vyskytovaly v obou vzorcích použitého kultivačního média o daném poměru (C/N 150) v čase kultivace 96 hodin a současně se nevyskytovaly v žádném vzorku daného C/N poměru v čase kultivace 48 hodin.
- Downregulované proteiny jsou ty, které se nevyskytovaly v žádném vzorku použitého poměru (C/N 150) v čase kultivace 96 hodin a současně se vyskytovaly v obou vzorcích daného C/N poměru v čase kultivace 48 hodin.

Kvantitativní změny (např. pro C/N 150\_96 hod-C/N 150\_48 hod) jsou vyhodnoceny dle následujících kritérií:

- Pro upregulované proteiny platí:  
 $\log_2 FC > 1$ ; adj. p < 0,05
- Pro downregulované proteiny platí:  
 $\log_2 FC < (-1)$ ; adj. p < 0,05
- FC je hodnota využívající se k definování rozdílu mezi dvěma skupinami dat, v tomto případě porovnání kultivace daného C/N poměru ve dvou časových úsecích.

- Hodnota  $p$  je označována jako hodnota pravděpodobnosti a získává se z  $t$  testů. Aby byly omezeny falešně pozitivní výsledky, používá se upravená tzv. adjustovaná hodnota  $p$ .

Rozdíly regulovaných proteinů byly podrobeny bioinformatickému zpracování s využitím bioinformatické databáze „DAVID Bioinformatics Resources“ [95]. Proteiny byly hodnoceny dle tří základních kategorií: molekulární funkce, biologické procesy, kterých se účastní a také byla popsána lokalizace daných proteinů v buňce. Je potřeba dodat, že dostupné databáze pro charakterizaci proteomu kvasinek *Rhodospiridium toruloides* nejsou dostatečně anotovány a počet vyhodnocených proteinů zmíněnou bioinformatickou databází je nízký, což může ovlivnit výstupy této práce.

Z důvodu přehlednosti jsou seznamy anotovaných proteinů pro jednotlivé kategorie uvedeny jen u poměru C/N 13; 96 hod - C/N 13; 48 hod, u ostatních poměrů jsou pak v příloze.

#### 4.2.1 C/N 13; 96 hod - C/N 13; 48 hod

Byly určeny upregulované a downregulované proteiny kvasinkových kultur kultivovaných na produkčních médiích o poměru C/N 13 ve dvou časových bodech. Proteinové složení vzorku odebraného po 96 hodinách kultivace bylo porovnáváno se vzorkem odebraným po 48 hodinách. Nastaveným kritériím vyhovělo 66 upregulovaných a 32 downregulovaných proteinů.

##### 4.2.1.1 Biologické procesy

V tabulkách 9 a 10 je zobrazeno rozdělení upregulovaných a downregulovaných proteinů dle zařazení do biologického procesu. V již zmíněné bioinformatické databázi bylo z upregulovaných proteinů nalezeno a přiřazeno 11 zástupců k příslušnému biologickému procesu, z downregulovaných proteinů to byly 3 zástupci.

Tabulka 9: Biologické procesy upregulovaných proteinů

Accession	Označení proteinu	Biologický proces
A0A0K3CIK5	6-O-methylguanine-DNA methyltransferase	Oprava, poškození DNA
A0A0K3C6U0	ATP-dependent DNA helicase PIF1(PIF1)	Oprava, poškození, rekombinace DNA
A0A0K3CET7	Acyl-coenzyme A oxidase	Metabolismus lipidů, metabolismus mastných kyselin
A0A0K3CP87	Proteophosphoglycan 5	Buněčný cyklus, poškození DNA
A0A0K3C899	BY PROTMAP: gi 647396115 emb CDR38138.1  RHTO0S03e04390g1_1 [Rhodospiridium toruloides](FGENESH: predicted gene_1.688)	Transport
A0A0K3CPI6	BY PROTMAP: gi 647400787 emb CDR46538.1  RHTO0S12e05864g1_1 [Rhodospiridium toruloides](FGENESH: predicted gene_14.23)	Transkripce, regulace transkripce
A0A0K3C7R7	CLASP_N domain-containing protein	Buněčný cyklus, buněčné dělení, mitóza

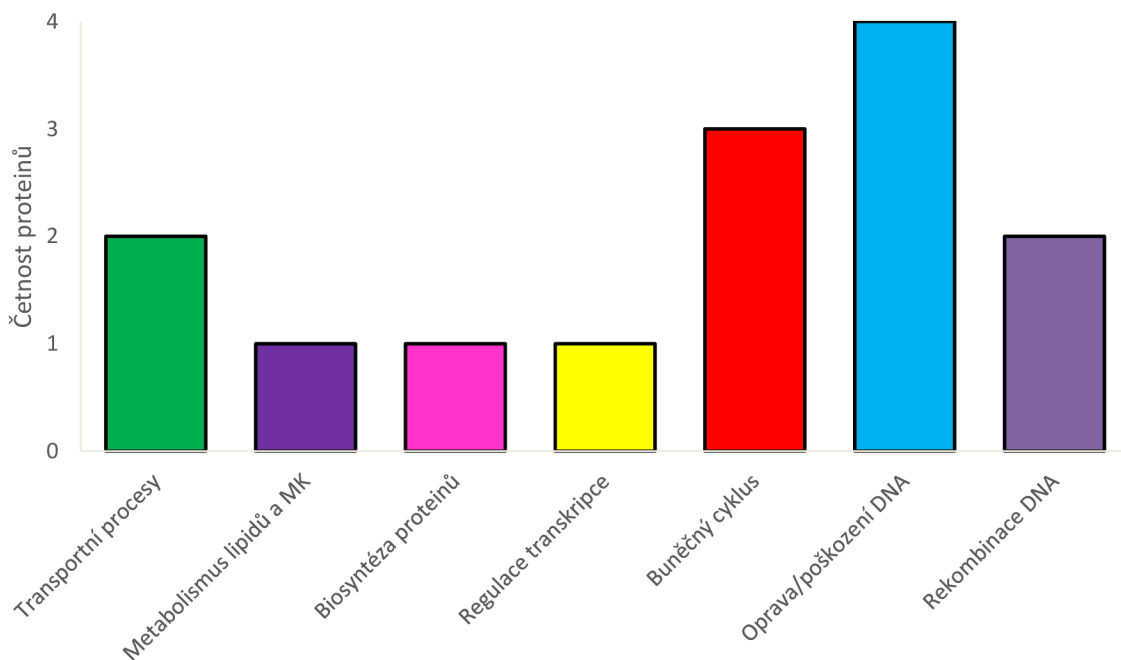
A0A061BLW6	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit	Buněčný cyklus, buněčné dělení
A0A0K3CBS7	DNA repair protein RAD51 homolog	Oprava, poškození, rekombinace DNA
A0A0K3C8V7	FGENESH: predicted gene_2.117 protein	Transport proteinů, transport
A0A0K3CDW2	RNA helicase	Biosyntéza proteinů

Tabulka 10: Biologické procesy downregulovaných proteinů

Accession	Označení proteinu	Biologický proces
A0A0K3CB66	putative Cation diffusion facilitator	Transport
A0A0K3CR85	MFS transporter, sugar transporter	Transport sacharidů, transport
A0A0K3CBB3	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 5	Transkripce, regulace transkripce

Z grafu 1 je patrné, že nejvíce upregulovaných proteinů se účastní opravy či poškození DNA. Upregulovaná ATP-dependntní DNA helikáza PIF1 je enzym, který je důležitý např. pro replikaci DNA. Katalyzuje rozvinutí dvoušroubovice DNA ve směru 5' a 3', což je poháněno hydrolýzou ATP. Zvýšené množství tohoto proteinu by mohlo dokazovat intenzivnější rozmnožování kvasinek. Významné zastoupení mají také proteiny podílející se na buněčném cyklu a dělení buňky. Z proteinů podílejících se na metabolismu lipidů byla upregulována acylCoA oxidáza. Jedná se o enzym, který se účastní odbourávání mastných kyselin, jež jsou významným zdrojem energie. Mezi upregulovanými proteiny byla detekována také RNA helikáza, která umožňuje rozvinutí struktury RNA a účastní se biosyntézy proteinů, což by mohlo znamenat vyšší proteosyntetickou aktivitu. Transportní procesy jsou také typické pro další nalezené proteiny.

Graf 1: Rozdělení upregulovaných proteinů podle přiřazených biologických procesů za daných podmínek



#### 4.2.1.2 Lokalizace proteinů

V tabulkách 11 a 12 je popsáno umístění upregulovaných a downregulovaných proteinů v buňce. V použité bioinformatické databázi bylo nalezeno a rozděleno 18 upregulovaných a 16 downregulovaných proteinů podle příslušné lokalizace v buňce.

Tabulka 11: Lokalizace upregulovaných proteinů

Accession	Označení proteinu	Buněčná komponenta
A0A0K3C6U0	ATP-dependent DNA helicase PIF1 (PIF1)	Mitochondrie, jádro
A0A0K3CET7	Acyl-coenzyme A oxidase	Peroxisom
A0A0K3C8K3	BTB domain-containing protein	Membrána
A0A0K3CMF5	glycosyltransferase family 2 protein	Membrána
A0A0K3CR36	MFS phosphate transporter	Membrána
A0A0K3C701	Major Facilitator Superfamily protein	Membrána
A0A0K3C638	BY PROTMAP: gi 647395522 emb CDR36997.1  RH00S02e09560g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_1.154)	Membrána
A0A0K3C899	BY PROTMAP: gi 647396115 emb CDR38138.1  RH00S03e04390g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_1.688)	Membrána
A0A0K3CPI6	BY PROTMAP: gi 647400787 emb CDR46538.1  RH00S12e05864g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_14.23)	Jádro
A0A0K3C7R7	CLASP_N domain-containing protein	Mikrotubuly
A0A0K3CBM8	Cation_ATPase_N domain-containing protein	Membrána
A0A0K3CBS7	DNA repair protein RAD51 homolog	Jádro
A0A0K3CGG4	FGENESH: predicted gene_6.465 protein	Membrána
A0A0K3CAS7	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 10	Jádro
A0A0K3CJ87	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 17	Jádro
A0A0K3CIU7	Sphingolipid 4-desaturase	Membrána
A0A0K3CC72	UDP-N-acetylglucosamine transferase subunit ALG13	Endoplazmatické retikulum
A0A0K3CQH0	Uncharacterized protein	Membrána

Tabulka 12: Lokalizace downregulovaných proteinů

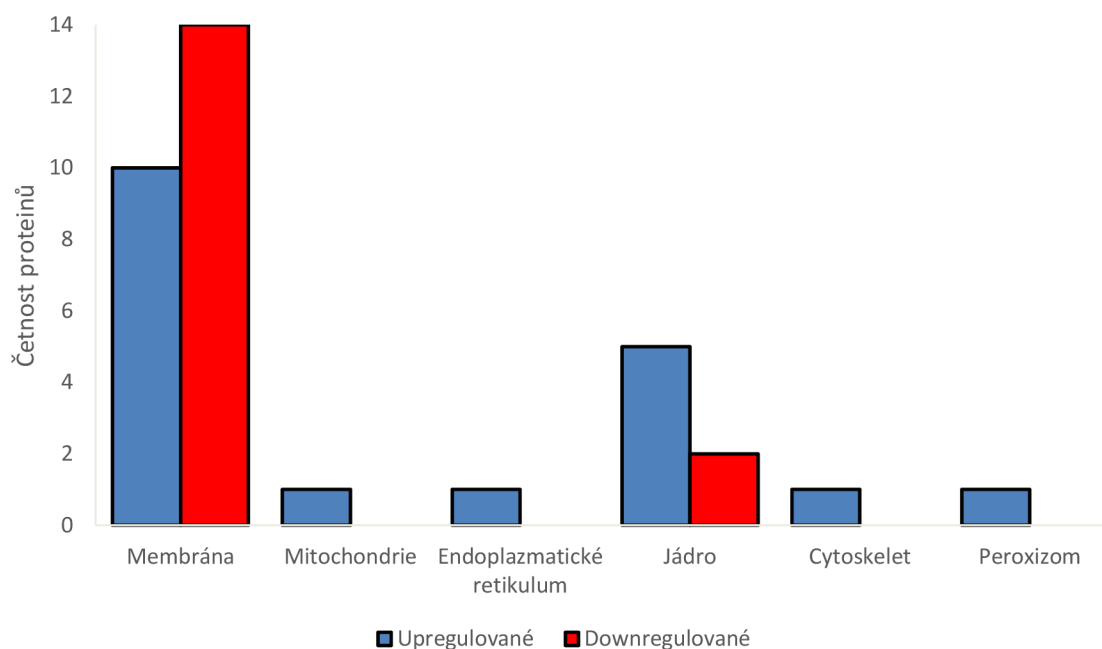
Accession	Označení proteinu	Buněčná komponenta
A0A0K3CQI8	Vacuolar DHA amino acid exporter	Membrána
A0A0K3C8Q0	Proteophosphoglycan ppg4	Membrána
A0A0K3CC85	Zinc finger protein ZIC 5	Membrána
A0A0K3CBJ2	UDP-galactose transporter	Membrána
A0A0K3CB66	putative Cation diffusion facilitator	Membrána



A0A0K3CR85	MFS transporter, sugar transporter	Membrána
A0A0K3CI49	vesicle transport protein GOT1B	Membrána
A0A0K3CQU8	BY PROTMAP: gi 647394313 emb CDR35542.1  RH00S01e01640g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_10.279)	Membrána
A0A0K3CGR9	Derlin	Membrána
A0A0K3CM34	FGENESH: predicted gene_11.114 protein	Membrána
A0A0K3CL85	FGENESH: predicted gene_13.100 protein	Chromozom
A0A0K3CCF1	FGENESH: predicted gene_6.202 protein	Membrána
A0A0K3CEC3	GPI ethanolamine phosphate transferase 2	Membrána
A0A0K3CBB3	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 5	Jádro
A0A0K3C718	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CE47	Uncharacterized protein	Membrána

Výsledky uvedené v grafu 2 ukazují, že nejvíce proteinů je lokalizováno v membráně, menší zastoupení je poté v jádře buněk. Downregulované proteiny se vyskytovaly v membráně ve větším množství než upregulované. Naopak upregulovaných proteinů bylo více identifikováno v jádře. Je tedy patrné, že vyšší výskyt upregulovaných proteinů v jádře (např. ATP-dependentní DNA helikáza) souvisí s rozmnožováním kvasinek a proteosyntézou. Ostatní části buňky byly zastoupeny minimálně.

Graf 2: Porovnání upregulovaných a downregulovaných proteinů dle umístění v buňce za daných podmínek



#### 4.2.1.3 Molekulární funkce

Rozdělení upregulovaných a downregulovaných proteinů je zobrazeno v tabulkách 13 a 14. Tyto proteiny byly vloženy do již zmíněné bioinformatické databáze, ve které bylo vygenerováno a rozděleno 21 upregulovaných a 6 downregulovaných proteinů na základě molekulární funkce.

Tabulka 13: Molekulární funkce upregulovaných proteinů

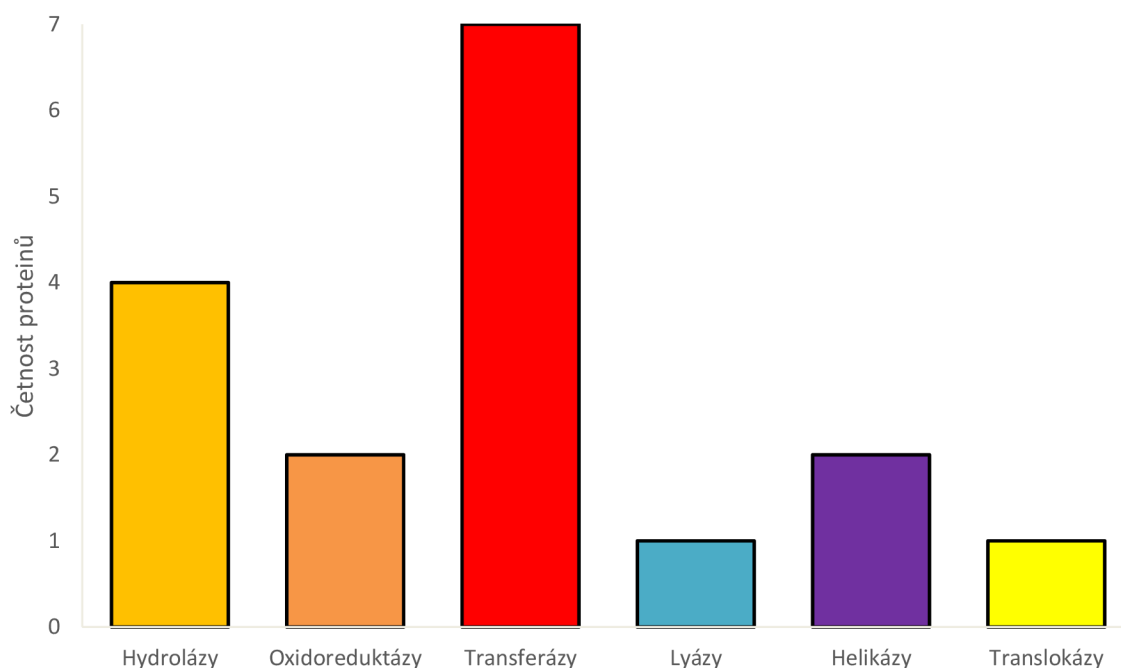
Accession	Označení proteinu	Molekulární funkce
A0A0K3CIK5	6-O-methylguanine-DNA methyltransferase	Transferáza
A0A0K3CEV0	AGC/NDR protein kinase	Kináza, serin/threonin-proteinkináza, transferáza
A0A0K3C6U0	ATP-dependent DNA helicase PIF1(PIF1)	DNA-vazebný protein, helikáza, hydroláza
A0A0K3CV70	putative TfdA family taurine dioxygenase	Dioxygenáza, oxidoreduktáza
A0A0K3CV08	kinesin family member 11	Motorický protein
A0A0K3CMT0	checkpoint serine/threonine-protein kinase	Kináza, transferáza
A0A0K3C8F1	kinesin family member 20/23	Motorický protein
A0A0K3CMF5	glycosyltransferase family 2 protein	Transferáza
A0A0K3C9Q0	ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	Transferáza
A0A0K3CFN2	xaa-pro aminopeptidase	Aminopeptidáza, hydroláza, proteáza
A0A0K3C518	phosphatidylserine decarboxylase	Dekarboxyláza, lyáza
A0A0K3CBI3	BY PROTMAP: gi 647400408 emb CDR45830.1  RHTO0S11e05314g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_3.207)	Oxidoreduktáza
A0A0K3CPI6	BY PROTMAP: gi 647400787 emb CDR46538.1  RHTO0S12e05864g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_14.23)	DNA-vazebný protein
A0A0K3CBM8	Cation_ATPase_N domain-containing protein	Translokáza
A0A061BLW6	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit	Kináza, transferáza
A0A0K3CBS7	DNA repair protein RAD51 homolog	DNA-vazebný protein
A0A0K3CAS7	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 10	Aktivátor
A0A0K3CJ87	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 17	Aktivátor
A0A0K3C9W3	Putative phospholipase	Hydroláza
A0A0K3CDW2	RNA helicase	Helikáza, hydroláza, iniciační faktor
A0A0K3CC72	UDP-N-acetylglucosamine transferase subunit ALG13	Glykosyltransferáza, transferáza

Tabulka 14: Molekulární funkce downregulovaných proteinů

Accession	Označení proteinu	Molekulární funkce
A0A0K3CBQ6	Arylsulfotransferase (ASST)-domain containing protein	Transferáza
A0A0K3CIP8	beta-1,3-mannanase	Hydroláza
A0A0K3C8P3	opioid growth factor receptor-like protein	Receptor
A0A0K3CL85	FGENESH: predicted gene_13.100 protein	Transferáza
A0A0K3CEC3	GPI ethanolamine phosphate transferase 2	Transferáza
A0A0K3CBB3	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 5	Aktivátor

V níže přiloženém grafu 3 byly upregulované proteiny rozděleny dle katalytické aktivity. Z grafu je patrné největší zastoupení upregulovaných proteinů jako transferáz. Druhé největší zastoupení mají hydrolázy. Transferázy jsou enzymy, které se podílejí na přenosu široké škály skupin, jako je např. přenos fosfátové skupiny (kinázy) či přenos glykosidové skupiny (glykosyltransferázy) z tohoto seznamu. Hydrolázy katalyzují štěpení vazeb v molekulách prostřednictvím molekuly vody a z přiloženého seznamu se jedná např. o proteázu či aminopeptidázu.

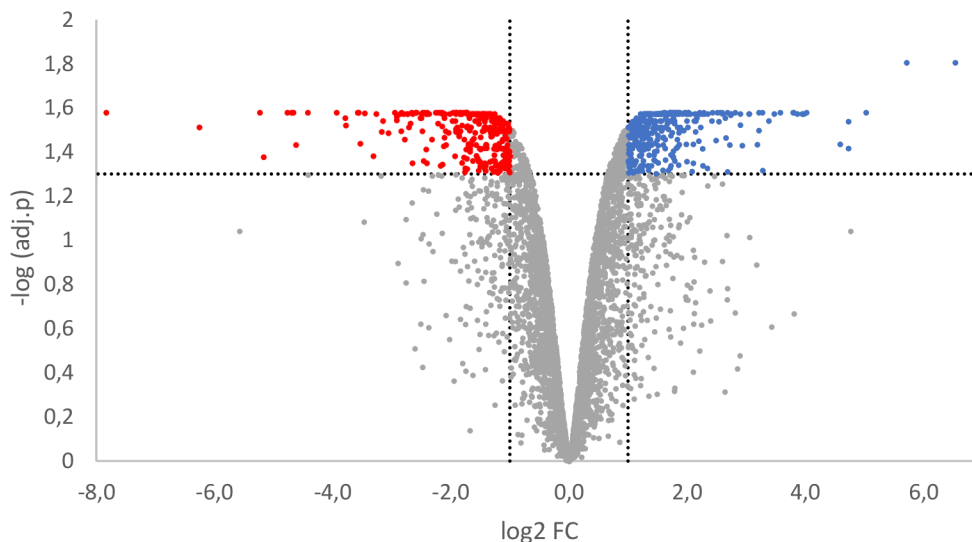
Graf 3: Rozdělení upregulovaných proteinů dle katalytické aktivity za daných podmínek



#### 4.2.2 C/N 150; 96 hod - C/N 150; 48 hod

Na produkčním médiu o poměru C/N 150 byly kultivovány vzorky kvasinek a jejich upregulované a downregulované proteiny byly vůči sobě porovnány. Vzorek odebraný po 96 hodinách byl porovnán se vzorkem odebraným po 48 hodinách. V grafu 4 je znázorněn výběr upregulovaných a downregulovaných proteinů podle kritérií popsanych výše v kapitole 4.2. Celkem bylo vyselektováno 422 upregulovaných a 283 downregulovaných proteinů.

Graf 4: Výběr upregulovaných a downregulovaných proteinů z celého souboru zanalyzovaných proteinů podle kritérií vysvětlených v kapitole 4.2



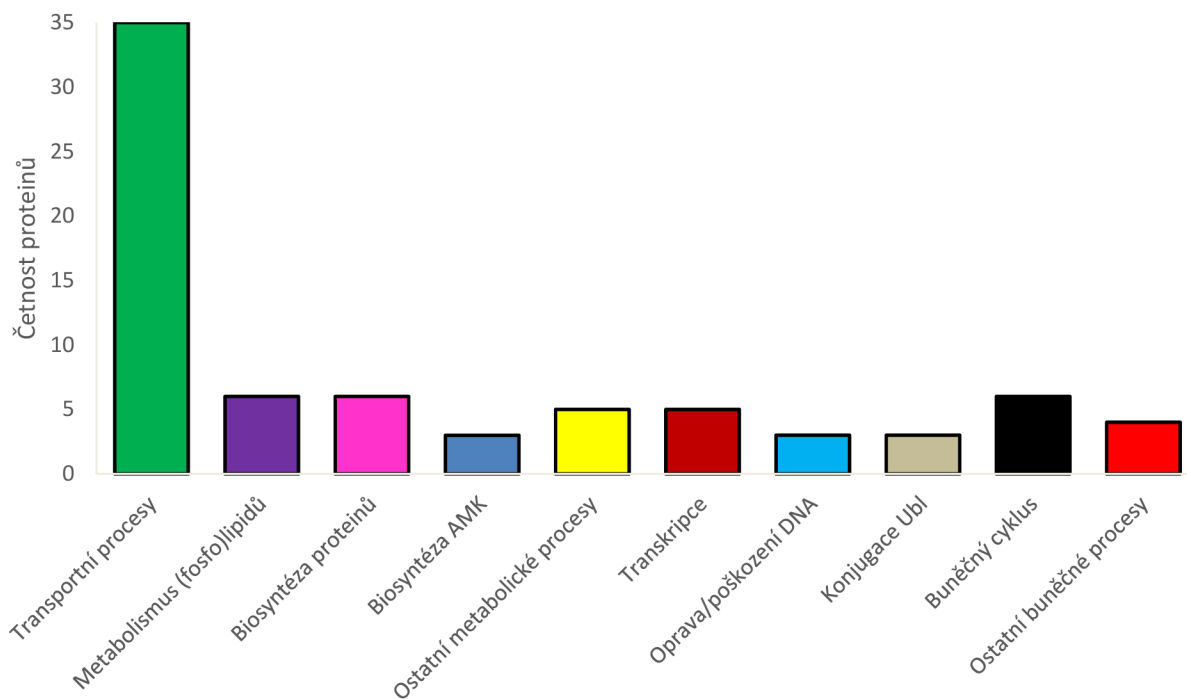
##### 4.2.2.1 Biologické procesy

Pro zapojení v konkrétních biologických procesech bylo nalezeno 77 upregulovaných a 31 downregulovaných proteinů. V grafu 5 jsou rozděleny upregulované proteiny mezi jednotlivé biologické procesy. Největší zastoupení upregulovaných proteinů zaujímají transportní procesy, jako je např. transport elektronů, transport proteinů, transport sacharidů apod. Mezi další méně zastoupené procesy je řazen metabolismus lipidů a fosfolipidů, např. protein 3-hydroxyacyl-CoA dehydratáza. Jedná se o enzym katalyzující dehydrataci 3-hydroxyacyl-CoA na trans-2,3-enoyl-CoA, což jsou meziprodukty biosyntézy mastných kyselin. Dále byly v menší míře vyhodnoceny proteiny účastníci se biosyntézy proteinů a buněčného cyklu.

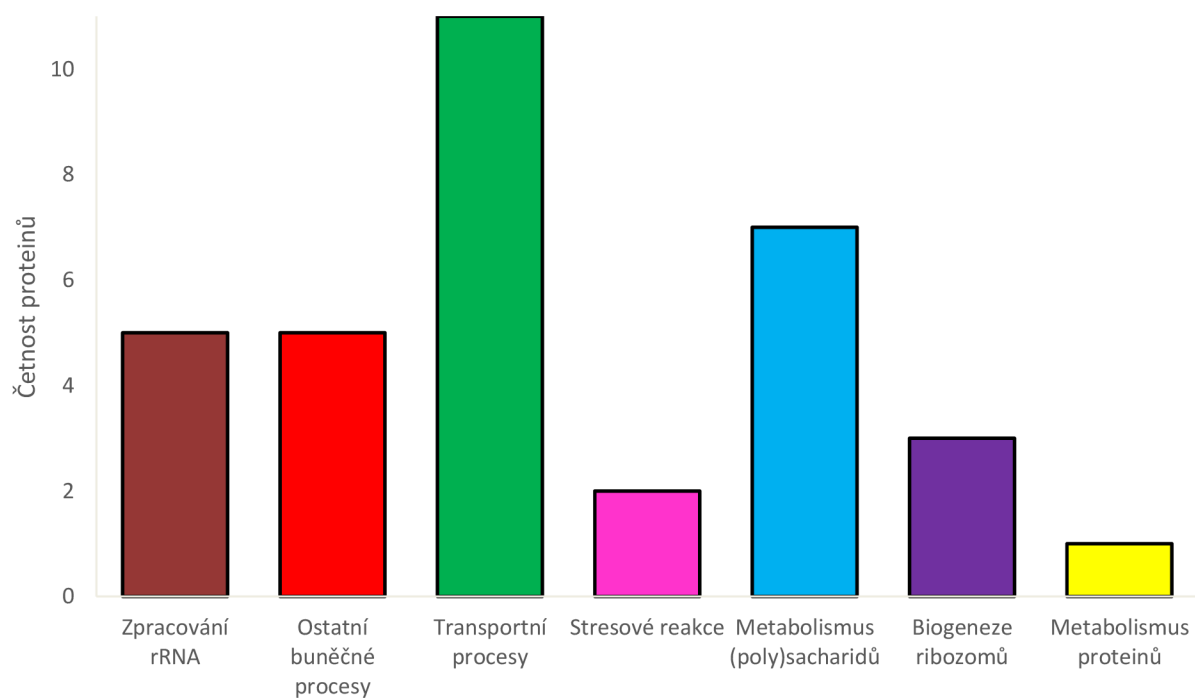
Graf 6 obsahuje obdobné rozdělení downregulovaných proteinů. I v tomto případě převládají proteiny účastní se transportních procesů, jako je transport mRNA, transport elektronů či transport proteinů. Významně jsou také zastoupeny metabolismy sacharidů a polysacharidů, v menší míře pak proteiny účastníci se zpracování RNA.

Výpis upregulovaných a downregulovaných proteinů vygenerovaných za výše popsanych podmínek je zobrazen v příloze v tabulkách 15 a 16.

Graf 5: Rozdělení upregulovaných proteinů do jednotlivých biologických procesů za daných podmínek



Graf 6: Rozdělení downregulovaných proteinů do jednotlivých biologických procesů za daných podmínek

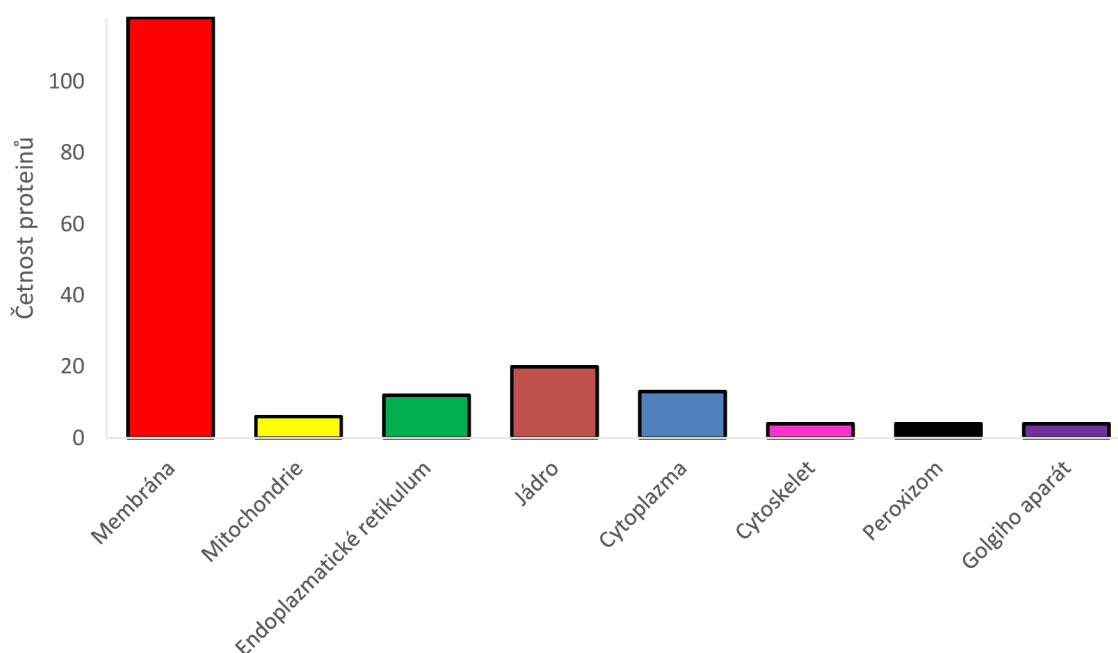


#### 4.2.2.2 Lokalizace proteinů

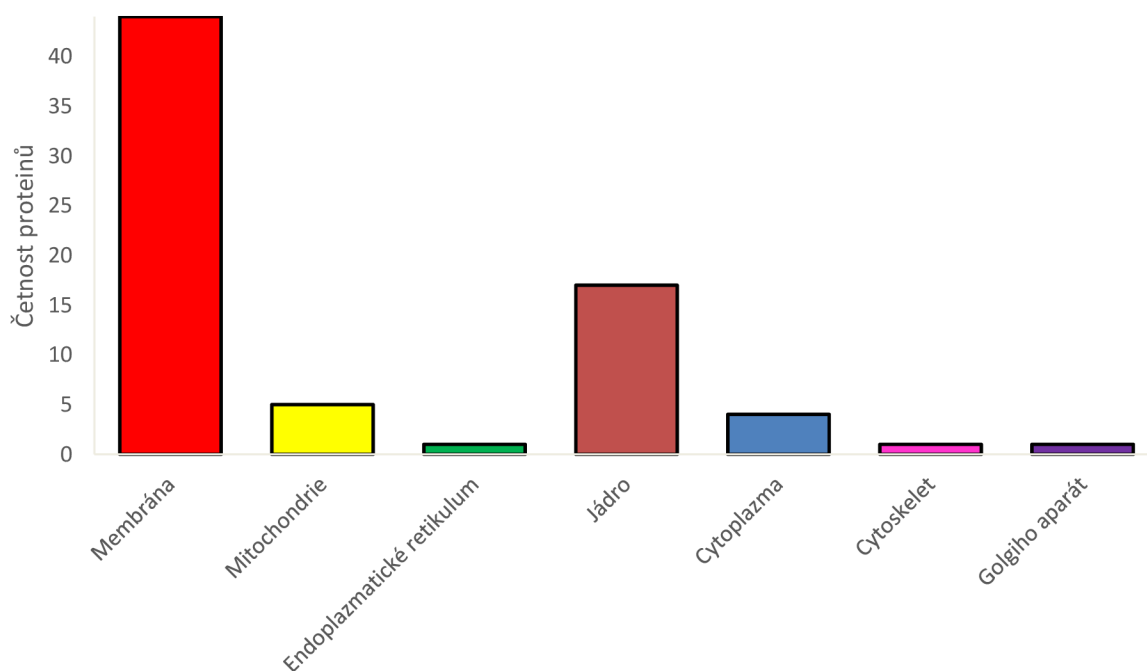
Z grafů 7 a 8 je patrné, že suverénně největší množství upregulovaných i downregulovaných proteinů se nachází v membráně. Dalším významným umístěným těchto proteinů je jádro. Upregulované proteiny měly současně lehce zvýšený výskyt v endoplazmatickém retikulu a cytoplazmě vůči ostatním lokalizacím. Downregulované proteiny se častěji vyskytovaly v mitochondriích a rovněž v cytoplazmě ve srovnání s jinými částmi buňky.

Pomocí databáze bylo přiřazeno 177 upregulovaných a 70 downregulovaných proteinů k příslušné části buňky. V příloze jsou umístěny tabulky 17 a 18 obsahující seznamy upregulovaných a downregulovaných získaných za definovaných podmínek.

Graf 7: Rozdělení upregulovaných proteinů dle lokalizace v buňce za daných podmínek



Graf 8: Rozdělení downregulovaných proteinů dle lokalizace v buňce za daných podmínek

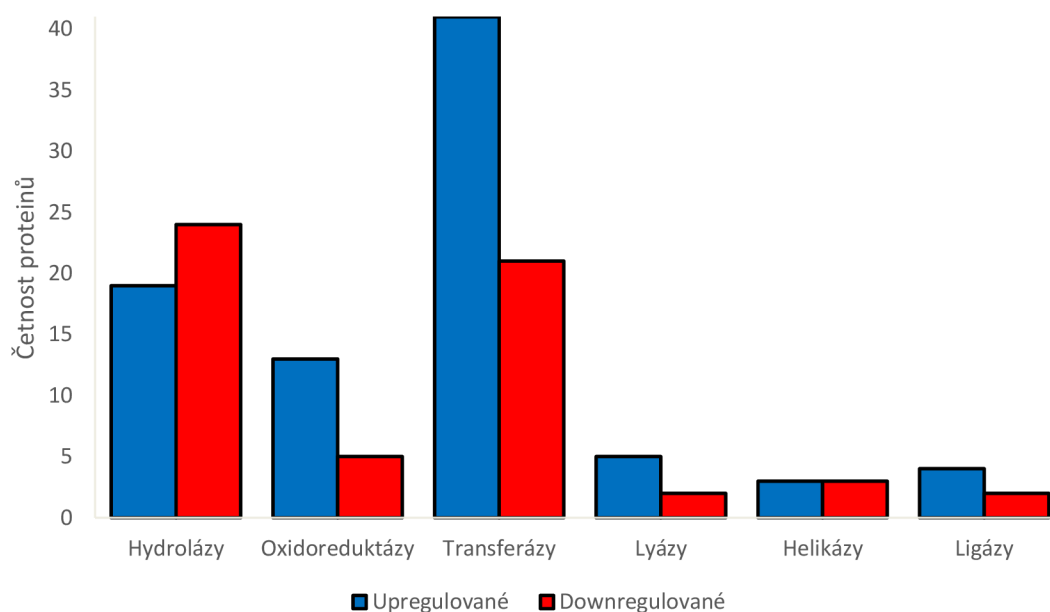


#### 4.2.2.3 Molekulární funkce

Celkem bylo vyhodnoceno 122 upregulovaných a 66 downregulovaných proteinů. V grafu 9 je zobrazeno jejich porovnání na základě katalytické aktivity. Z grafu lze vidět, že upregulované proteiny se z pohledu katalytické aktivity nejvíce vyskytují jako transferázy, méně zastoupenými kategoriemi jsou pak hydrolázy a oxidoreduktázy. Downregulované proteiny mají naopak největší zastoupení jako hydrolázy, ovšem významně zastoupené jsou také transferázy. Ostatní kategorie jsou zastoupeny v menší míře.

V příloze jsou v tabulkách 19 a 20 zobrazeny jednotlivé seznamy vygenerovaných upregulovaných a downregulovaných proteinů za definovaných podmínek.

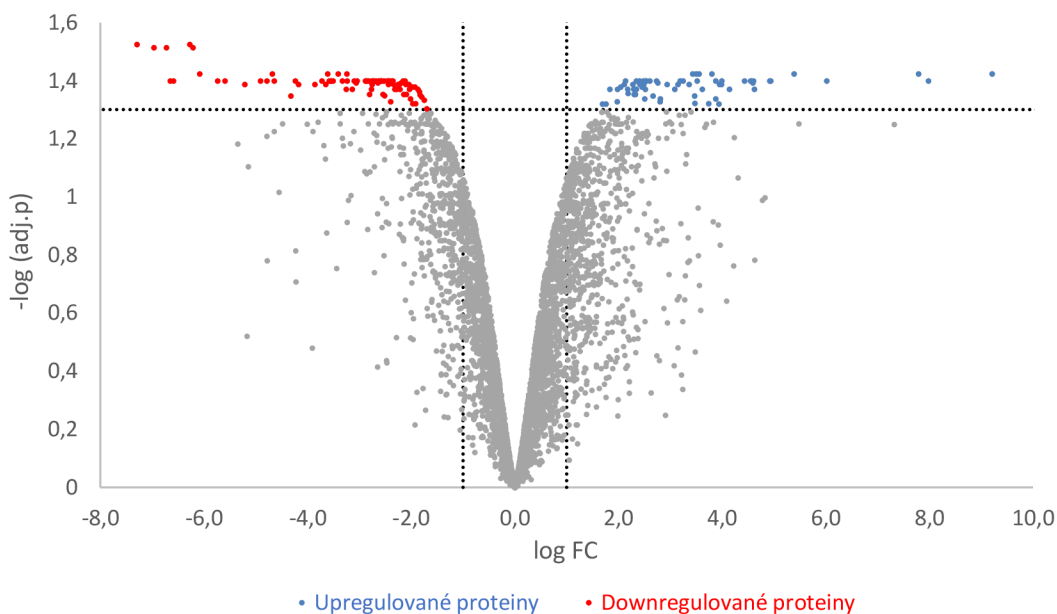
Graf 9: Porovnání katalytické aktivity upregulovaných a downregulovaných proteinů za daných podmínek



### 4.2.3 C/N 150; 96 hod - C/N 13; 96 hod

Bylo porovnáváno složení proteinů kvasinkové kultury produkované na živném médiu o poměru C/N 150 a složení proteinů kvasinkové kultury produkované na živném médiu o poměru C/N 13. Obě kultivace trvaly 96 hodin. V grafu 10 je znázorněn výběr upregulovaných a downregulovaných proteinů podle kritérií popsanych výše v kapitole 4.2. Bioinformatickou databází bylo vyhodnoceno 130 upregulovaných a 130 downregulovaných proteinů, které byly poté rozděleny do jednotlivých kategorií.

Graf 10: Výběr upregulovaných a downregulovaných proteinů z celého souboru identifikovaných proteinů podle kritérií vysvětlených v kapitole 4.2



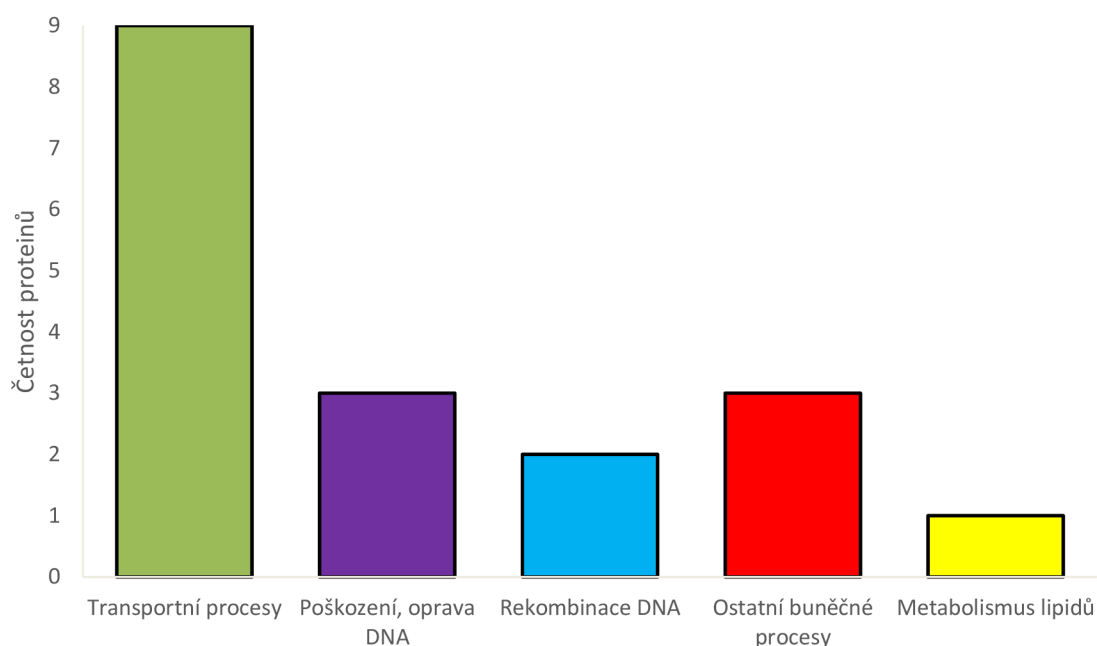
#### 4.2.3.1 Biologické procesy

Do biologických procesů bylo zařazeno 16 upregulovaných a 15 downregulovaných proteinů. V následujících grafech 11 a 12 lze vidět, že největší zastoupení upregulovaných i downregulovaných proteinů náleží transportním procesům, jako je např. transport elektronů, transport iontů či transport rRNA. Upregulované procesy se také v menší míře podílí na poškození a opravě DNA. Downregulované proteiny se zase účastní biosyntézy sacharidů a polysacharidů.

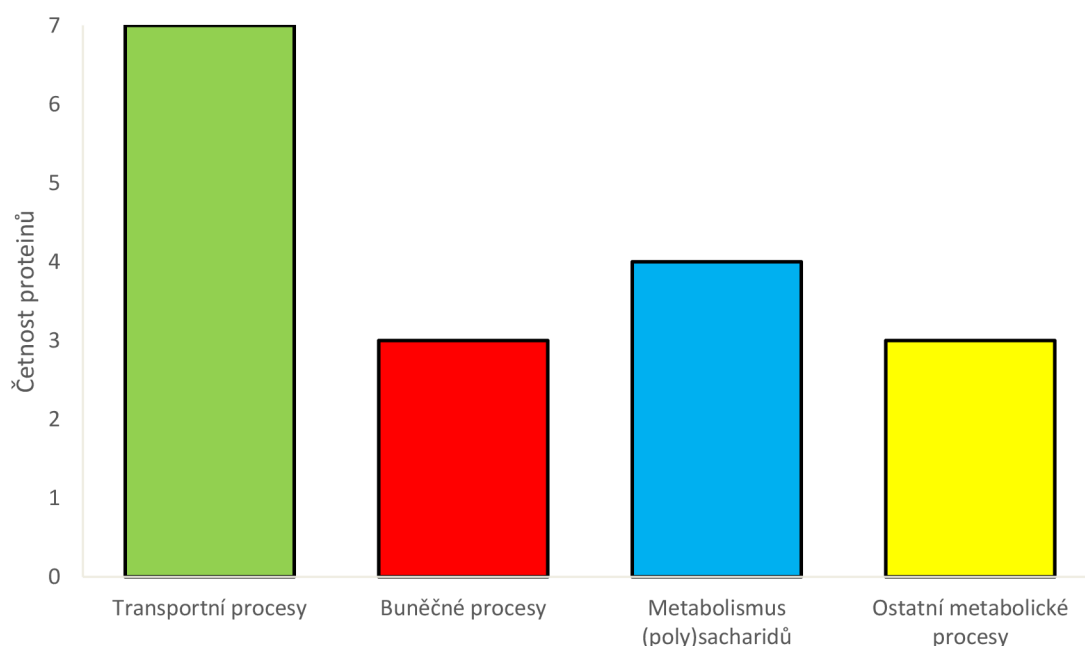
V příloze jsou zobrazeny tabulky 21 a 22, ve kterých se nacházejí seznamy vyhodnocených proteinů za daných podmínek.



Graf 11: Rozdělení upregulovaných proteinů do jednotlivých biologických procesů za daných podmínek



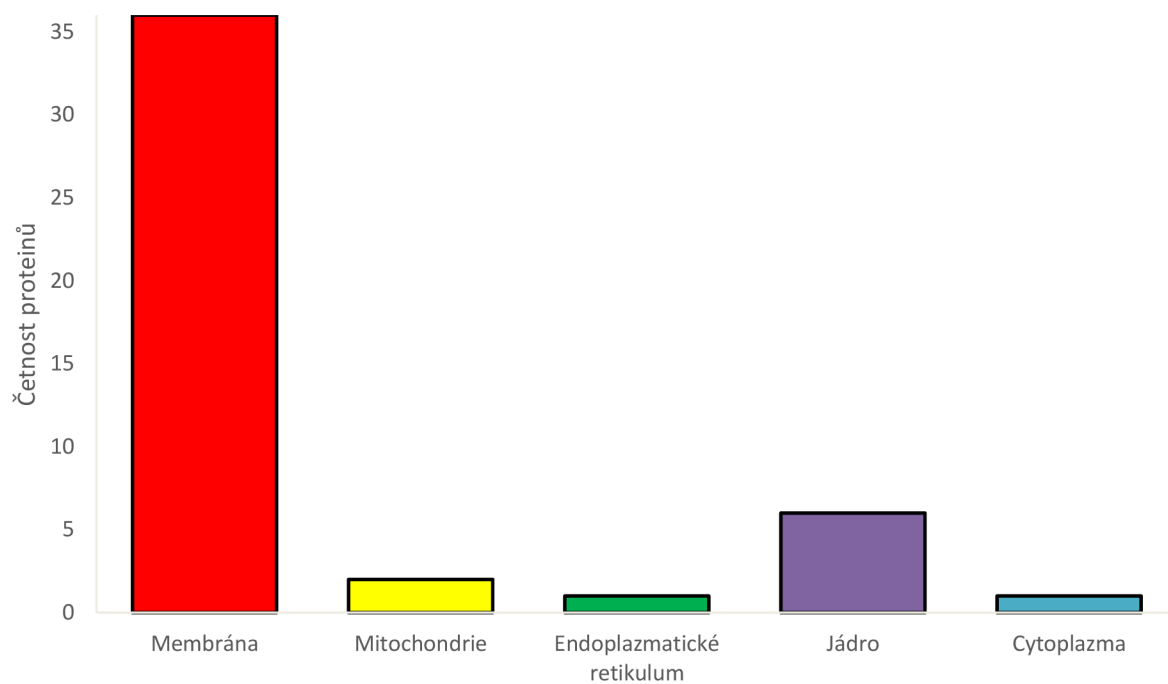
Graf 12: Rozdělení downregulovaných proteinů do jednotlivých biologických procesů za daných podmínek



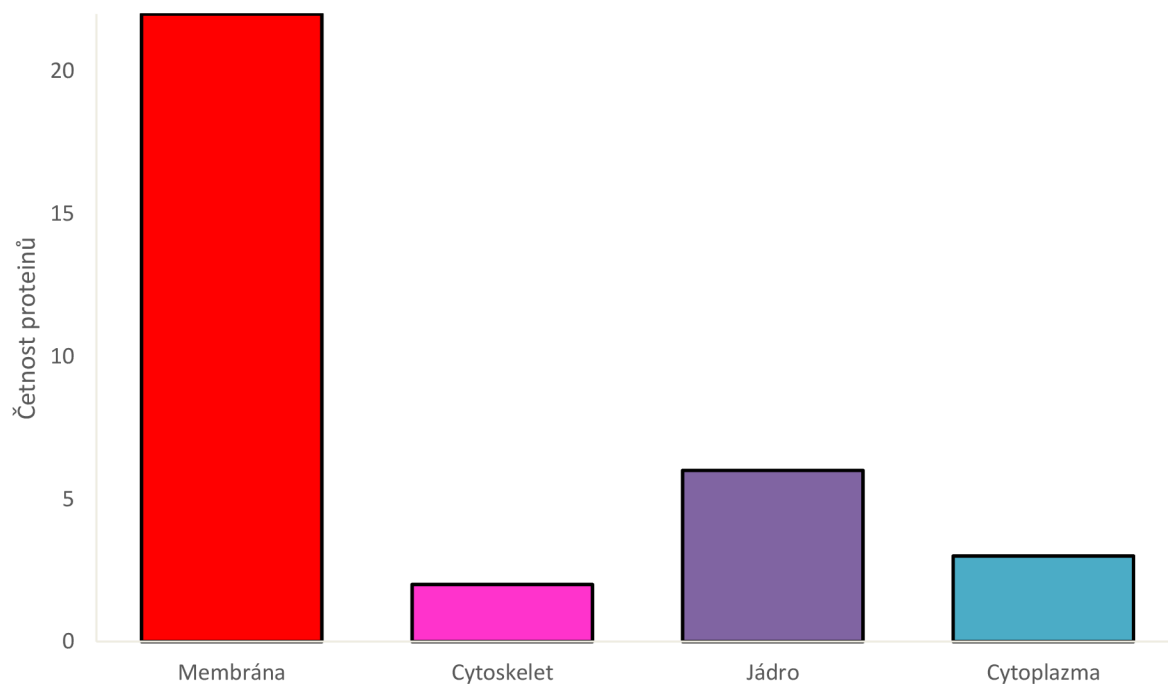
#### 4.2.3.2 Lokalizace proteinů

Pomocí bioinformatické databáze bylo vygenerováno 45 upregulovaných a 30 downregulovaných proteinů. Z grafů 13 a 14 je patrné, že největší zastoupení upregulovaných i downregulovaných proteinů je v membránách. Další významně zastoupenou organelou je jádro, ostatní orgány jsou zastoupeny v menším množství. V příloze jsou umístěny tabulky 23 a 24, obsahující seznam upregulovaných a downregulovaných proteinů získaných za definovaných podmínek.

Graf 13: Rozdělení upregulovaných proteinů dle lokalizace v buňce za daných podmínek



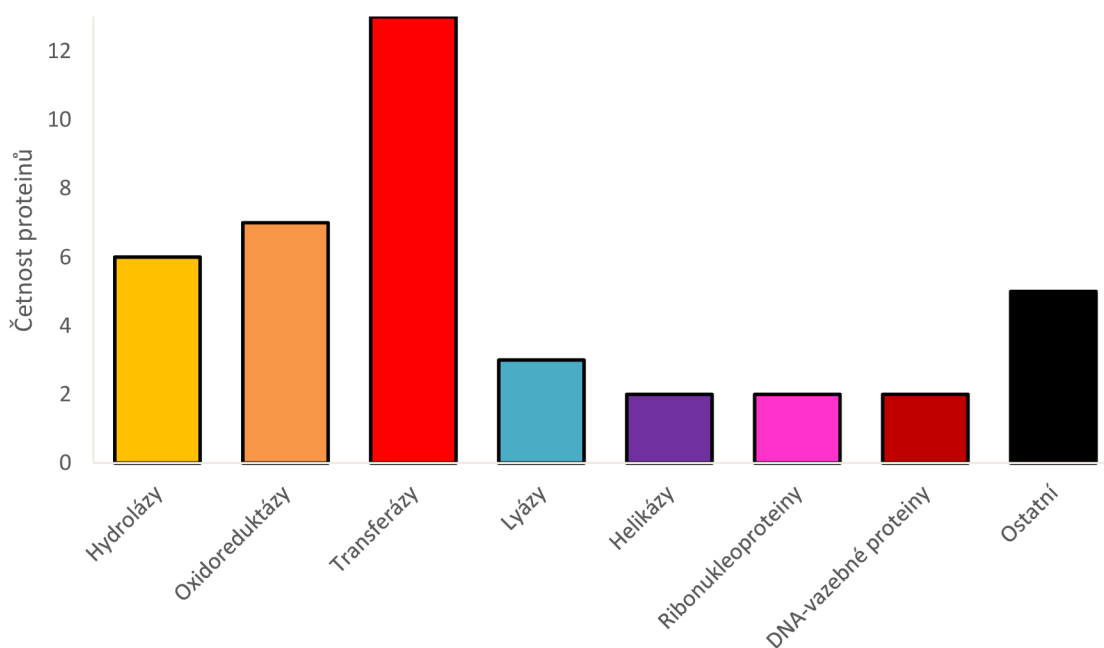
Graf 14: Rozdělení downregulovaných proteinů dle lokalizace v buňce za daných podmínek



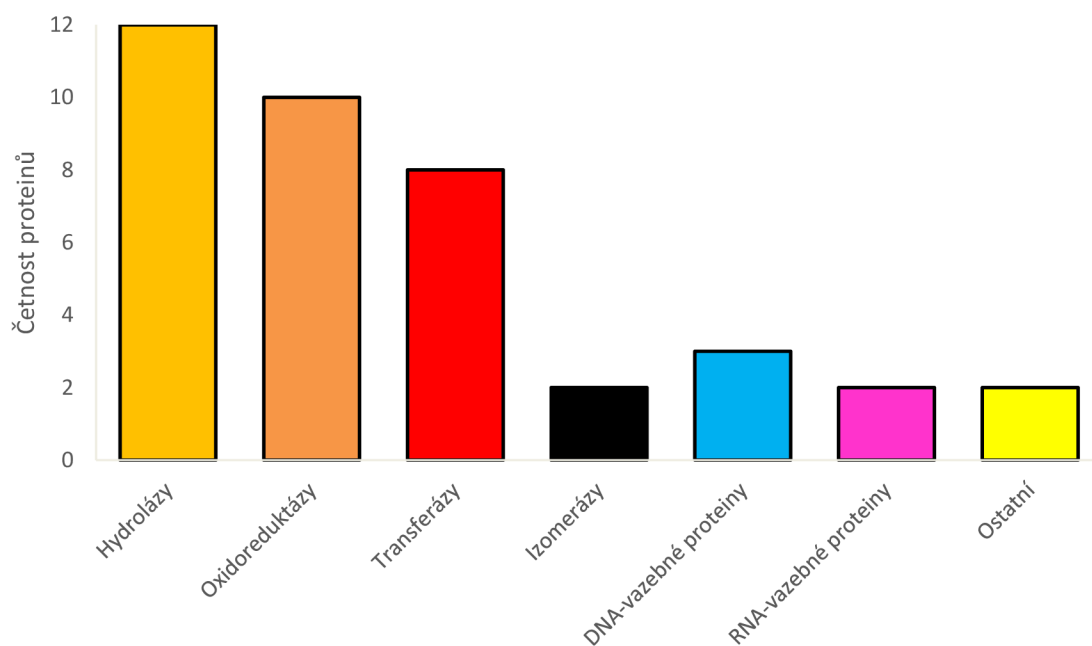
### 4.2.3.3 Molekulární funkce

V databázi bylo nalezeno 35 upregulovaných a 37 downregulovaných proteinů s definovanou molekulární funkcí. V grafech 15 a 16 jsou znázorněny četnosti těchto proteinů. Z grafů je patrné, že největší zastoupení mají enzymy. Mezi nejvíce zastoupené upregulované proteiny jsou řazeny transferázy, významně jsou také zastoupeny oxidoreduktázy a o něco méně hydrolázy. U downregulovaných proteinů se nejhojněji vyskytovaly hydrolázy, méně pak oxidoreduktázy a transferázy. Ostatní molekulární funkce nebyly významně zastoupeny. Nejvíce zastoupené molekulární funkce a jejich srovnání je navíc vyznačeno v grafu 17. V příloze jsou zobrazeny tabulky 25 a 26 obsahující upregulované a downregulované proteiny, které byly vygenerovány příslušnou bioinformatickou databází.

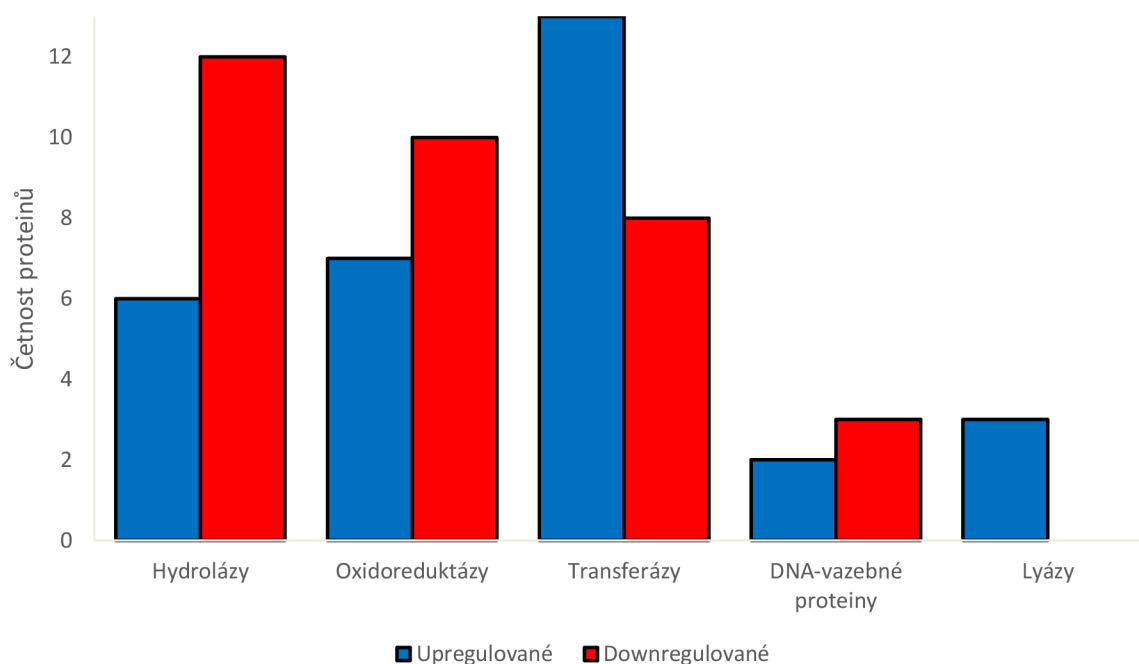
Graf 15: Rozdělení upregulovaných proteinů dle molekulární za daných podmínek



Graf 16: Rozdělení downregulovaných proteinů dle molekulární funkce za daných podmínek



Graf 17: Porovnání nejvíce zastoupených molekulárních funkcí upregulovaných a downregulovaných proteinů pro dané podmínky



#### 4.2.4 Shrnutí

Karotenogenní kvasinky *Rhodospiridium toruloides* se řadí mezi basidiomycota. Přiložená studie dokazuje, že tyto kvasinky jsou schopny dosáhnout hustoty buněk přes 100 g/l a lze je tedy považovat za silného producenta lipidů [97]. Tyto kvasinky byly kultivovány dvojestupňovou inokulací a byli převedeny z upraveného YPD média, přes dvě inokula do produkčních médií bohatých na obsah C a omezených na obsah N.

Podle popsaných kritérií byly vyselektovány a vyhodnoceny rozdílně regulované proteiny, které jsou zobrazeny a rozděleny dle kategorií v grafech 1-17. V této práci byly nalezeny 2 proteiny, které se vyskytovaly jako upregulované ve všech třech zmiňovaných experimentech. Jedná se o C-4 methylsterol oxidázu a ATP-dependentní DNA helikázu. C-4 methylsterol oxidáza je protein, který se váže na ionty železa, vykazuje oxidoreduktázovou aktivitu a podílí se na biosyntéze lipidů. ATP-dependentní DNA helikáza je enzym, který je důležitý např. pro replikaci DNA. Katalyzuje rozvinutí dvoušroubovice DNA ve směru 5' a 3', což je poháněno hydrolýzou ATP.

Dále pak bylo zjištěno, že 7 proteinů účastnících se metabolismu lipidů, 7 proteinů podílejících se na metabolismu proteinů, 3 proteiny figurující v metabolismu AMK a 1 protein podílející se na cyklu trikarboxylových kyselin bylo upregulováno ve vzorcích kultivovaných 96 hodin proti vzorkům kultivovaným 48 hodin. Lze tedy vyvodit, že koncentrace těchto proteinů se zvyšovala v posledních 48 hodinách kultivace, tedy v pozdní fázi akumulace lipidů. Mezi proteiny se zvýšenou hladinou byla nalezena např. 3-hydroxyacyl-CoA dehydratáza. Jedná se o enzym biosyntézy mastných kyselin katalyzující dehydrataci 3-hydroxyacyl-CoA na trans-2,3-enoyl-CoA a jeho zvýšená přítomnost svědčila o intenzivnějším procesu syntézy lipidů. Dále pak AcylCoA oxidáza, která se účastní  $\beta$ -oxidace mastných kyselin. RNA-helikáza, enzym zodpovědný za rozvinutí šroubovice RNA, což je řízené hydrolýzou ATP. Zvýšené množství tohoto enzymu v pozdní fázi kultivace by mohlo poukazovat na zvýšenou proteosyntetickou aktivitu. Citrullin-aspartát ligáza je enzym zapojený do biosyntézy L-arginin z L-ornithinu a karbamoylfosfátu. Threonin dehydratáza se podílí na 1. kroku dílčí dráhy, která syntetizuje 2-oxobutanoát z L-threoninu. Tato dílčí dráha je součástí dráhy

biosyntézy L-isoleucinu. Sukcinát dehydrogenáza je jediným enzymem Krebsova cyklu vázaným na mitochondriální membránu, který katalyzuje dehydrogenaci sukcinátu na fumarát. Jedná se o pomyslnou křižovatku mezi Krebsovým cyklem a dýchacím řetězcem, kdy sukcinát dehydrogenáza přenáší vodík na FAD. Dále bylo nalezeno 7 proteinů podílejících se na metabolismu poly(sacharidů), které byly downregulovány a vyskytovaly se více u vzorků s ukončenou kultivací již po 48 hodinách. Dalo by se tedy říct, že upregulované proteiny vztažené na dobu kultivace byly spíše zapojeny do metabolismu lipidů, downregulované proteiny do metabolismu sacharidů.

U porovnání vzorků kvasinek, kultivovaných na produkčních médiích o odlišném složení (C/N 150 a C/N 13) po stejnou dobu (96 hodin) byl nalezen 1 upregulovaný protein zapojený v metabolismu lipidů a 4 proteiny zapojené do metabolismu (poly)sacharidů. I tyto výsledky nasvědčují, že upregulované proteiny jsou zapojeny spíše do metabolismu lipidů a downregulované proteiny do metabolismu sacharidů.

Již je známo, že za podmínek nedostatku dusíku je TCA cyklus významně inhibován a metabolický tok je posunut k biosyntéze lipidů [97]. Ačkoli je v této práci vyhodnoceno velké množství proteinů produkovaných kvasinkami *Rhodospiridium toruloides*, byly nalezeny jen jednotky proteinů přímo souvisejících s metabolismem lipidů. Důvodem by mohla být doposud nedostatečná anotace proteinů těchto kvasinek v dostupných bioinformatických databázích.

## 5 ZÁVĚR

Cílem této práce je charakterizace proteomu *Rhodospiridium toruloides* (CCY 062-002-004) kultivovaných za různých podmínek pomocí LC-MS/MS. Tyto karotenoidní kvasinky jsou významné tím, že kromě karotenoidů jsou schopny akumulovat intracelulární lipidy v obsahu 75 % hmotnosti sušiny a syntetizovat ergosterol a ubiquinon. Kultivace byla provedena v pěti různých C/N poměrech (13, 25, 50, 100 a 150) a sledována ve dvou časových bodech, tedy po 48 a 96 hodinách. Kvasinkové buňky byly lyzovány a k izolaci a proteolytickému štěpení proteinů byla využita metoda FASP. Následně byly vzniklé peptidy pročištěny ethylacetátovou extrakcí a analyzovány pomocí LC-MS/MS. Data byla poté bioinformaticky zpracována a prohledána v příslušných databázích.

Pro kontrolu kvality extrakce proteinů z kvasinkových buněk byla provedena jednorozměrná SDS-PAGE elektroforéza rozdělující izolované proteiny podle jejich molekulových hmotností. Bylo potvrzeno, že doba kultivace a použitý C/N poměr má významný vliv na zastoupení proteinů. U vyšších C/N poměrů (100, 150) a delší doby kultivace (96 hodin) bylo detekováno větší množství proteinů než u nižších C/N poměrů a kratší doby kultivace.

Celkově bylo identifikováno 4986 proteinů. U vybraných experimentů byly k nalezeným up/downregulovaným proteinům přiřazeny molekulární funkce, biologické procesy, kterých se účastní a také byla popsána jejich lokalizace v buňce. Je nutné dodat, že proteom kvasinek rodu *Rhodospiridium toruloides* ještě není důkladně prozkoumán a počet databází využívaných k získání těchto charakteristik je značně limitován, což negativně ovlivňuje robustnost výsledků bioinformatické analýzy.

Mezi molekulárními funkcemi proteinů byla nejvíce detekována katalytická aktivita. Ze všech identifikovaných enzymů byly nejhojněji obsaženy tři hlavní třídy: transferázy, hydrolázy a oxidoreduktázy. Obecně u upregulovaných proteinů měly největší zastoupení transferázy, u downregulovaných převládaly hydrolázy. Kromě katalytické aktivity byly významněji obsaženy také DNA či RNA vazebné proteiny. Podobných výsledků bylo dosaženo v příložené studii, kde převládala rovněž katalytická aktivita [96].

Pro lokalizaci proteinů mezi jednotlivé buněčné komponenty bylo zjištěno, že u všech experimentů jsou nejvíce zastoupeny membránové a jaderné proteiny, v menší míře pak proteiny nacházející se v cytoplazmě.

Z biologických procesů byly obecně nejvíce zastoupeny proteiny účastnící se transportních procesů. Další významnou kategorií byly metabolické procesy. Ze získaných informací by se dalo konstatovat, že upregulované proteiny se z pohledu metabolických drah více podílely na metabolismu lipidů, naopak u downregulovaných proteinů převažoval metabolismus sacharidů, což je v souladu s již publikovanou studií [97]. Bylo popsáno také velké množství proteinů podílejících se na buněčných procesech, jako je transkripce, oprava či poškození DNA nebo rekombinace DNA.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MAROVA, Ivana, Milan CERTIK a Emilia BREIEROV. Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds. MATOVIC, Miodrag Darko, ed. *Biomass - Detection, Production and Usage* [online]. InTech, 2011, 2011-09-09 [cit. 2022-04-04]. ISBN 978-953-307-492-4. Dostupné z: doi:10.5772/19235
- [2] WALKER, Graeme M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Chichester: John Wiley and Sons, 1998. ISBN 0471964468.
- [3] LYMAN, Mathew, Salustra URBIN, Cheryl STROUT a Bonnee RUBINFELD. The Oleaginous Red Yeast *Rhodotorula/Rhodospiridium*: A Factory for Industrial Bioproducts. PEIXOTO BASSO, Thalita, ed. *Yeasts in Biotechnology* [online]. IntechOpen, 2019, 2019-8-7 [cit. 2022-04-05]. ISBN 978-1-78923-927-0. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.84129
- [4] WEN, Zhiqiang, Sufang ZHANG, Chuks Kenneth ODOH, Mingjie JIN a Zongbao K ZHAO. *Rhodospiridium toruloides* - A potential red yeast chassis for lipids and beyond. *FEMS Yeast Research* [online]. 2020, 20(5) [cit. 2022-04-05]. ISSN 1567-1356. Dostupné z: doi:10.1093/femsyr/foaa038
- [5] FRENGOVA, Ginka I. a Dora M. BESHKOVA. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2009, 36(2), 163-180 [cit. 2022-04-12]. ISSN 1367-5435. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-008-0492-9
- [6] HIGDON, JANE. Carotenoids. <https://oregonstate.edu/> [online]. [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/carotenoids#references>
- [7] VELÍŠEK, Jan. *The Chemistry of food*. 2. opr. vyd. Chichester: Wiley, 2014. ISBN 978-1-118-38384-1
- [8] KOT, Anna M., Stanisław BŁAŻEJAK, Iwona GIENKA, Marek KIELISZEK a Joanna BRYŚ. Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry?. *Microbial Cell Factories* [online]. 2018, 17(1) [cit. 2022-05-06]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-018-0893-z
- [9] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. Praha: H & H, 1998. Lange medical book. ISBN 80-85787-38-5.
- [10] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [11] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-44-9.
- [12] ŠÍCHO, Vladislav, Zdeněk VODRÁŽKA a Blanka KRÁLOVÁ. *Potravinářská biochemie. 2. dopl. a přeprac. vyd.* Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1981, 360 s. : il. ; 8°
- [13] DOHNAL, Vlastimil, Alena JEŽKOVÁ a Jiří SKLÁDANKA. Ergosterol: Klíčový steroid hub. *Kontakt* [online]. 2009, 10(2), 449-454 [cit. 2022-04-14]. ISSN 12124117. Dostupné z: doi:10.32725/kont.2008.066
- [14] RAUCHOVÁ, H. et al. SOUČASNÝ POHLED NA KOENZYM Q. In *Chem. listy* [online]. 2009.103, s. 32-39. [cit. 2022-04-14]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_01\\_32-39.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_01_32-39.pdf)
- [15] GRAVES, Paul R. a Timothy A. J. HAYSTEAD. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2002, 66(1), 39-63 [cit. 2021-04-23]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.66.1.39-63.2002

- [16] Swinbanks, D. Australia Backs Innovation, Shuns Telescope. *Nature* 1995, 378, 653.
- [17] Corthals, G.L.; Wasinger, V.C.; Hochstrasser, D.F.; Sanchez, J.C. The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research. *Electrophoresis* 2000, 21, 1104–1115.
- [18] ZDRÁHAL, Zbyněk. Základy proteomiky [online prezentace]. [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: [https://moodlearchiv.ro.vutbr.cz/pluginfile.php/484323/mod\\_resource/content/1/A\\_CH\\_II\\_P03.pdf](https://moodlearchiv.ro.vutbr.cz/pluginfile.php/484323/mod_resource/content/1/A_CH_II_P03.pdf)
- [19] Sperling, K. From proteomics to genomics. *Electrophoresis* 2001, 22, 2835–2837.
- [20] Loo, J.A.; DeJohn, D.E.; Du, P.; Stevenson, T.I.; Loo, R.R.O. Application of mass spectrometry for target identification and characterization. *Med. Res. Rev.* 1999, 19, 307–319.
- [21] Aicher, L.; Wahl, D.; Arce, A.; Grenet, O.; Steiner, S. New insights into cyclosporine A nephrotoxicity by proteome analysis. *Electrophoresis* 1998, 19, 1998–2003.
- [22] Zhang, N.; Aebersold, R.; Schwilkowski, B. ProbID: A probabilistic algorithm to identify peptides through sequence database searching using tandem mass spectral data. *Proteomics* 2002, 2, 1406–1412.
- [23] Tsai, P.L.; Chen, S.F. A Brief Review of Bioinformatics Tools for Glycosylation Analysis by Mass Spectrometry. *Mass Spectrom* 2017, 6, S0064.
- [24] Nefedov AV, Gilski MJ, Sadygov RG. Bioinformatics Tools for Mass Spectrometry-Based High-Throughput Quantitative Proteomics Platforms. *Curr Proteomics*. 2011 Jul;8(2):125-137. doi: 10.2174/157016411795678020. PMID: 23002391; PMCID: PMC3448448.
- [25] CHMELÍK, Josef. Proteomický průvodce. *Chemické listy*. 2005, 99, 12, s. 883 – 885. Dostupný také z [www: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005\\_12\\_883-885.pdf>](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_12_883-885.pdf).
- [26] DUPREE, Emmalyn J., Madhuri JAYATHIRTHA, Hannah YORKEY, Marius MIHASAN, Brindusa Alina PETRE a Costel C. DARIE. A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of This Field. *Proteomes* [online]. 2020, 8(3) [cit. 2021-5-7]. ISSN 2227-7382. Dostupné z: doi:10.3390/proteomes8030014
- [27] Dupree, E.J.; Jayathirtha, M.; Yorkey, H.; Mihasan, M.; Petre, B.A.; Darie, C.C. A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of This Field. *Proteomes* 2020, 8, 14. <https://doi.org/10.3390/proteomes8030014>
- [28] Rogers, J.C.; Bomgarden, R.D. Sample preparation for mass spectrometry-based proteomics; from proteomes to peptides. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer New York LLC: New York, NY, USA, 2016; Volume 919, pp. 43–62
- [29] Cristobal, A.; Marino, F.; Post, H.; Van Den Toorn, H.W.P.; Mohammed, S.; Heck, A.J.R. Toward an Optimized Workflow for Middle-Down Proteomics. *Anal. Chem.* 2017, 89, 3318–3325.
- [30] Kim, M.S.; Pinto, S.M.; Getnet, D.; Nirujogi, R.S.; Manda, S.S.; Chaerkady, R.; Madugundu, A.K.; Kelkar, D.S.; Isserlin, R.; Jain, S.; et al. A draft map of the human proteome. *Nature* 2014, 509, 575–581.
- [31] Wilhelm, M.; Schlegl, J.; Hahne, H.; Gholami, A.M.; Lieberenz, M.; Savitski, M.M.; Ziegler, E.; Butzmann, L.; Gessulat, S.; Marx, H.; et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* 2014, 509, 582–587.
- [32] Addona, T.A.; Abbatiello, S.E.; Schilling, B.; Skates, S.J.; Mani, D.R.; Bunk, D.M.; Spiegelman, C.H.; Zimmerman, L.J.; Ham, A.J.L.; Keshishian, H.; et al. Multi-site



- assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. *Nat. Biotechnol.* 2009, 27, 633–641.
- [33] Gillet, L.C.; Leitner, A.; Aebersold, R. Mass Spectrometry Applied to Bottom-Up Proteomics: Entering the High-Throughput Era for Hypothesis Testing. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2016, 9, 449–472.
- [34] BOUCHAL, Pavel, Petr LAPČÍK, Jakub FAKTOR and David POTĚŠIL. DDA, DIA, či directDIA: závisle, s knihovnou či bez? Praktické porovnání přístupů pro různé typy proteomických experimentů (DDA, DIA, or directDIA: dependently, with library, or without? Practical comparison of approaches for different types of proteomics experiments). In 6. Neformální proteomické setkání, Olomouc, 29.11.-30.11.2019, in Book of Abstracts, p. 35. 2019.
- [35] Fenyő, D.; Beavis, R.C. The GPMDB REST interface. *Bioinformatics* 2015, 31, 2056–2058.
- [36] Kiser, J.Z.; Post, M.; Wang, B.; Miyagi, M. *Streptomyces erythraeus* trypsin for proteomics applications. *J. Proteome Res.* 2009, 8, 1810–1817.
- [37] Tsiatsiani, L.; Heck, A.J.R. Proteomics beyond trypsin. *FEBS J.* 2015, 282, 2612–2626.
- [38] Aebersold, R.; Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003, 422, 198–207.
- [39] Lovrić, J. *Introducing Proteomics: From Concepts to Sample Separation, Mass Spectrometry and Data Analysis*; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2011; p. 283.
- [40] Fitcher, B.; Latter, G.I.; Monardo, P.; McLaughlin, C.S.; Garrels, J.I. A Sampling of the Yeast Proteome. *Mol. Cell. Biol.* 1999, 19, 7357–7368.
- [41] Kim, H.; Dan, K.; Shin, H.; Lee, J.; Wang, J.I.; Han, D. An efficient method for high-pH peptide fractionation based on C18 StageTips for in-depth proteome profiling. *Anal. Methods* 2019, 11, 4693–4698.
- [42] Feist, P.; Hummon, A.B. Proteomic challenges: Sample preparation techniques for Microgram-Quantity protein analysis from biological samples. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 3537–3563.
- [43] Nilsson, C.L.; Dillon, R.; Devakumar, A.; Shi, S.D.H.; Greig, M.; Rogers, J.C.; Krastins, B.; Rosenblatt, M.; Kilmer, G.; Major, M.; et al. Quantitative phosphoproteomic analysis of the STAT3/IL-6/HIF1 $\alpha$  signaling network: An initial study in GSC11 glioblastoma stem cells. *J. Proteome Res.* 2010, 9, 430–443.
- [44] Kim, B.; Araujo, R.; Howard, M.; Magni, R.; Liotta, L.A.; Luchini, A. Affinity enrichment for mass spectrometry: Improving the yield of low abundance biomarkers. *Expert Rev. Proteom.* 2018, 15, 353–366.
- [45] Ten Have, S.; Boulon, S.; Ahmad, Y.; Lamond, A.I. Mass spectrometry-based immuno-precipitation proteomics—The user’s guide. *Proteomics* 2011, 11, 1153–1159.
- [46] Gundry, R.L.; White, M.Y.; Murray, C.I.; Kane, L.A.; Fu, Q.; Stanley, B.A.; Van Eyk, J.E. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2009, 90, 10–25
- [47] Tubaon, R.M.; Haddad, P.R.; Quirino, J.P. Sample Clean-up Strategies for ESI Mass Spectrometry Applications in Bottom-up Proteomics: Trends from 2012 to 2016. *Proteomics* 2017, 17, 1700011.
- [48] Xu, B.; Zhang, Y.; Zhao, Z.; Yoshida, Y.; Magdeldin, S.; Fujinaka, H.; Ismail, T.A.; Yaoita, E.; Yamamoto, T. Usage of electrostatic eliminator reduces human keratin contamination significantly in gel-based proteomics analysis. *J. Proteom.* 2011, 74, 1022–1029.

- [49] Keller, B.O.; Sui, J.; Young, A.B.; Whittall, R.M. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2008, 627, 71–81.
- [50] Doellinger, J.; Schneider, A.; Hoeller, M.; Lasch, P. Sample Preparation by Easy Extraction and Digestion (SPEED)—A Universal, Rapid, and Detergent-free Protocol for Proteomics Based on Acid Extraction. *Mol. Cell. Proteom.* 2020, 19, 209–222.
- [51] M. Howard, B. Achour, Z. Al-Majdoub, A. Rostami-Hodjegan, J. Barber GASP and FASP are complementary for LC-MS/MS proteomic analysis of drug-metabolizing enzymes and transporters in pig liver *Proteomics*, 18 (24) (2018), Article e1800200
- [52] WIŚNIEWSKI, Jacek R. Filter Aided Sample Preparation – A tutorial. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2019, **1090**, 23-30 [cit. 2022-02-24]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2019.08.032
- [53] J.R. Wisniewski, M. Mann Consecutive proteolytic digestion in an enzyme reactor increases depth of proteomic and phosphoproteomic analysis *Anal. Chem.*, 84 (6) (2012), pp. 2631-2637
- [54] Wolters, D.A.; Washburn, M.P.; Yates, J.R., 3rd. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal. Chem.* 2001, 73, 5683–5690.
- [55] Horning, E.C.; Carroll, D.I.; Dzidic, I.; Haegele, K.D.; Horning, M.G.; Stillwell, R.N. Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent stream. *J. Chromatogr. Sci.* 1974, 12, 725–729.
- [56] Anderson, N.L.; Anderson, N.G. The human plasma proteome—History, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteom.* 2002, 1, 845–867.
- [57] Mant, C.T.; Chen, Y.; Yan, Z.; Popa, T.V.; Kovacs, J.M.; Mills, J.B.; Tripet, B.P.; Hodges, R.S. HPLC analysis and purification of peptides. *Methods Mol. Biol.* 2007, 386, 3–55.
- [58] Neverova, I.; Van Eyk, J.E. Application of reversed phase high performance liquid chromatography for subproteomic analysis of cardiac muscle. *Proteomics* 2002, 2, 22–31.
- [59] Duong-Ly, K.C.; Gabelli, S.B. Gel filtration chromatography (size exclusion chromatography) of proteins. *Methods Enzym.* 2014, 541, 105–114.
- [60] Cai, W.; Tucholski, T.; Chen, B.; Alpert, A.J.; McIlwain, S.; Kohmoto, T.; Jin, S.; Ge, Y. Top-Down Proteomics of Large Proteins up to 223 kDa Enabled by Serial Size Exclusion Chromatography Strategy. *Anal. Chem.* 2017, 89, 5467–5475.
- [61] Kline, K.G.; Wu, C.C. MudPIT analysis: Application to human heart tissue. *Methods Mol. Biol.* 2009, 528, 281–293
- [62] Motoyama, A.; Venable, J.D.; Ruse, C.I.; Yates, J.R., 3rd. Automated ultra-high-pressure multidimensional protein identification technology (UHP-MudPIT) for improved peptide identification of proteomic samples. *Anal. Chem.* 2006, 78, 5109–5118.
- [63] Issaq, H.J.; Chan, K.C.; Janini, G.M.; Conrads, T.P.; Veenstra, T.D. Multidimensional separation of peptides for effective proteomic analysis. *J Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005, 817, 35–47.
- [64] Washburn, M.P.; Wolters, D.; Yates, J.R., 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* 2001, 19, 242–247.
- [65] Lambert, J.P.; Ethier, M.; Smith, J.C.; Figeys, D. Proteomics: From gel based to gel free. *Anal. Chem.* 2005, 77, 3771–3787.

- [66] Aguilar, M.I. Reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Methods Mol. Biol.* 2004, 251, 9–22.
- [67] Solovyeva, E.M.; Lobas, A.A.; Kopylov, A.T.; Ilina, I.Y.; Levitsky, L.I.; Moshkovskii, S.A.; Gorshkov, M.V. FractionOptimizer: A method for optimal peptide fractionation in bottom-up proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 2018, 410, 3827–3833.
- [68] Nogueira, R.; Lammerhofer, M.; Lindner, W. Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase. *J. Chromatogr. A* 2005, 1089, 158–169.
- [69] Phillips, H.L.; Williamson, J.C.; van Elburg, K.A.; Snijders, A.P.; Wright, P.C.; Dickman, M.J. Shotgun proteome analysis utilising mixed mode (reversed phase-anion exchange chromatography) in conjunction with reversed phase liquid chromatography mass spectrometry analysis. *Proteomics* 2010, 10, 2950–2960.
- [70] Vasconcelos Soares Maciel, E.; de Toffoli, A.L.; Sobieski, E.; Domingues Nazario, C.E.; Lancas, F.M. Miniaturized liquid chromatography focusing on analytical columns and mass spectrometry: A review. *Anal. Chim. Acta* 2020, 1103, 11–31.
- [71] Zuvella, P.; Skoczylas, M.; Jay Liu, J.; Ba Czek, T.; Kaliszan, R.; Wong, M.W.; Buszewski, B. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chem. Rev.* 2019, 119, 3674–3729.
- [72] Maya, F.; Paull, B. Recent strategies to enhance the performance of polymer monoliths for analytical separations. *J. Sep. Sci.* 2019, 42, 1564–1576.
- [73] Luo, Q.; Shen, Y.; Hixson, K.K.; Zhao, R.; Yang, F.; Moore, R.J.; Mottaz, H.M.; Smith, R.D. Preparation of 20-microm-i.d. silica-based monolithic columns and their performance for proteomics analyses. *Anal. Chem.* 2005, 77, 5028–5035.
- [74] VAN DE MEENT, Michiel H.M. a Gerhardus J. DE JONG. Novel liquid-chromatography columns for proteomics research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2011, 30(11), 1809-1818 [cit. 2022-03-12]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2011.06.012
- [75] SVEC, Frantisek; HUBER, Christian G. Monolithic materials: promises, challenges, achievements. 2006.
- [76] TENNIKOVA, T.B., M. BLEHA, F. ŠVEC, T.V. ALMAZOVA a B.G. BELENKII. High-performance membrane chromatography of proteins, a novel method of protein separation. *Journal of Chromatography A* [online]. 1991, 555(1-2), 97-107 [cit. 2022-03-12]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)87170-3
- [77] MINAKUCHI, Hiroyoshi, Kazuki NAKANISHI, Naohiro SOGA, Norio ISHIZUKA a Nobuo TANAKA. Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* [online]. 1996, 68(19), 3498-3501 [cit. 2022-03-12]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac960281m
- [78] Andjelkovic, U.; Tufegdzic, S.; Popovic, M. Use of monolithic supports for high-throughput protein and peptide separation in proteomics. *Electrophoresis* 2017, 38, 2851–2869.
- [79] Denoroy, L.; Zimmer, L.; Renaud, B.; Parrot, S. Ultra high performance liquid chromatography as a tool for the discovery and the analysis of biomarkers of diseases: A review. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2013, 927, 37–53.
- [80] Wilson, I.D.; Nicholson, J.K.; Castro-Perez, J.; Granger, J.H.; Johnson, K.A.; Smith, B.W.; Plumb, R.S. High resolution “ultra performance” liquid chromatography

- coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *J. Proteome Res.* 2005, 4, 591–598.
- [81] Neue, U.D.; Kele, M.; Bunner, B.; Kromidas, A.; Dourdeville, T.; Mazzeo, J.R.; Grumbach, E.S.; Serpa, S.; Wheat, T.E.; Hong, P.; et al. Ultra-performance liquid chromatography technology and applications. *Adv. Chromatogr.* 2010, 48, 99–143.
- [82] Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F.; Whitehouse, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989, 246, 64–71.
- [83] HAN, Xuemei, Aaron ASLANIAN a John R YATES. Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2008, **12**(5), 483–490 [cit. 2022-03-13]. ISSN 13675931. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2008.07.024
- [84] Strathmann, F.G.; Hoofnagle, A.N. Current and Future Applications of Mass Spectrometry to the Clinical Laboratory. *Am. J. Clin. Pathol.* 2011, 136, 609–616.
- [85] Lenz, E.; Bright, J.; Knight, R.; Westwood, F.; Davies, D.; Major, H.; Wilson, I. Metabonomics with <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry applied to the investigation of metabolic changes caused by gentamicin-induced nephrotoxicity in the rat. *Biomark* **2005**, 10, 173–187.
- [86] Channaveerappa, D.; NgounouWetie, A.G.; Darie, C.C. Bottlenecks in Proteomics: An Update. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, 1140, 753–769.
- [87] Bateman, N.W.; Goulding, S.P.; Shulman, N.J.; Gadok, A.K.; Szumlinski, K.K.; MacCoss, M.J.; Wu, C.C. Maximizing peptide identification events in proteomic workflows using data-dependent acquisition (DDA). *Mol. Cell. Proteom.* 2014, 13, 329–338.
- [88] TEO, Guoshou, Sinae KIM, Chih-Chiang TSOU, Ben COLLINS, Anne-Claude GINGRAS, Alexey I. NESVIZHSHKII a Hyungwon CHOI. MapDIA: Preprocessing and statistical analysis of quantitative proteomics data from data independent acquisition mass spectrometry. *Journal of Proteomics* [online]. 2015, **129**, 108–120 [cit. 2022-03-14]. ISSN 18743919. Dostupné z: doi:10.1016/j.jprot.2015.09.013
- [89] Doerr, A. DIA mass spectrometry. *Nat. Methods* 2014, 12, 35.
- [90] Bilbao, A.; Varesio, E.; Luban, J.; Strambio-De-Castillia, C.; Hopfgartner, G.; Müller, M.; Lisacek, F. Processing strategies and software solutions for data-independent acquisition in mass spectrometry. *Proteomics* 2015, 15, 964–980.
- [91] Lange, V.; Picotti, P.; Domon, B.; Aebersold, R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: A tutorial. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, 4, 14.
- [92] Rauniyar, N. Parallel reaction monitoring: A targeted experiment performed using high resolution and high mass accuracy mass spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16, 28566–28581.
- [93] Ronsein, G.E.; Pamir, N.; von Haller, P.D.; Kim, D.S.; Oda, M.N.; Jarvik, G.P.; Vaisar, T.; Heinecke, J.W. Parallel reaction monitoring (PRM) and selected reaction monitoring (SRM) exhibit comparable linearity, dynamic range and precision for targeted quantitative HDL proteomics. *J. Proteom.* **2015**, 113, 388–399.
- [94] *GitHub* [online]. [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: <https://github.com/vdemichev/DiaNN>
- [95] *DAVID Bioinformatics Resources* [online]. [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <https://david.ncifcrf.gov>
- [96] LIU, Hongwei, Xin ZHAO, Fangjun WANG, Yonghong LI, Xining JIANG, Mingliang YE, Zongbao K. ZHAO a Hanfa ZOU. Comparative proteomic analysis of *Rhodosporidium toruloides* during lipid accumulation. *Yeast* [online]. 2009, 26(10), 553–566 [cit. 2022-04-27]. ISSN 0749503X. Dostupné z: doi:10.1002/yea.1706

- [97] LI, Yonghong, Zongbao (Kent) ZHAO a Fengwu BAI. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2007, 41(3), 312-317 [cit. 2022-05-08]. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2007.02.008

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PTM	Posttranslační modifikace
2D PAGE	Dvourozměrná gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
AMK	Aminokyseliny
NMR	Nukleární magnetická rezonance
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Hmotnostní spektrometrie v prostoru
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
RPLC	Kapalinová chromatografie na reverzní fázi
DDA	Datově závislý sběr dat
SRM	Monitorování vybraných reakcí („selected reaction monitoring“)
DIA	Datově nezávislý sběr dat
CID	Kolizně indukovaná disociace
SDS – PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
ESI	Elektrosprejová ionizace
MALDI	Laserově desorpční ionizaci v přítomnosti organické matrice
SDS	Dodecylsírán sodný
API	Ionizace za atmosférického tlaku
SEC	Vylučovací chromatografie
IEX	Iontoměničová chromatografie
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
UHPLC	Ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie
IT	Iontová past
Q	Kvadrupól
TOF	Analyzátor doby letu
FTICR	Iontový cyklotron s Fourierovou transformací
FASP	FASP (Filter assisted sample preparation)
MQ	MilliQ voda
IPP	Isopentenylidifosfát
MVA	Kyselina mevalonová
DMAPP	Dimethylallyldifosfát
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA
GGDP	Geranylgeranylidifosfát
TCA	Cyklus trikarboxalových kyselin

## 8 PŘÍLOHY

Tabulka 15: Biologické procesy upregulovaných proteinů při C/N 150; 96 hod - C/N 150; 48 hod

Accession	Označení proteinu	Biologický proces
A0A0K3CSZ1	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	Metabolismus lipidů, biosyntéza lipidů, biosyntéza fosfolipidů, metabolismus fosfolipidů
A0A0K3CIK5	6-O-methylguanine-DNA methyltransferase	Oprava, poškození DNA
A0A0K3C8Y1	AP complex subunit sigma	Transport proteinů, transport
A0A0K3C6U0	ATP-dependent DNA helicase PIF1	Oprava, poškození, rekombinace DNA
A0A0K3CM93	Alternative oxidase	Transport elektronů, dýchací řetězec, transport
A0A0K3CC54	Ammonium transporter	Transport
A0A0K3CI67	Peptide transporter MTD1	Transport
A0A0K3CJK9	hexose transport-related protein	Transport
A0A0K3CF05	Zinc transporter 1	Transport
A0A0K3CAM4	Transcription initiation factor IIB	Biosyntéza proteinů, transkripce, regulace transkripce
A0A0K3CNY1	RING finger domain-containing protein	Konjugace Ubl, zpracování rRNA
A0A0K3CNT2	Thiazole biosynthetic enzyme	Biosyntéza thiaminu
A0A0K3CRU2	NADH dehydrogenase subunit 9, partial (Mitochondrion)	Transport
A0A0K3CR85	MFS transporter, sugar transporter	Transport sacharidů, transport
A0A0K3CFN8	condensin complex subunit 3	Buněčný cyklus, buněčné dělení, kondenzace DNA, mitóza
A0A0K3CUF1	MFS transporter, sugar:H <sup>+</sup> symporter	Transport
A0A0K3CR05	cation diffusion facilitator	Transport
A0A0K3CT59	NADH-ubiquinone oxidoreductase B14 subunit	Transport elektronů, dýchací řetězec, transport
A0A0K3CKR4	ER lumen protein retaining receptor	Transport proteinů, transport
A0A0K3CAC8	translation initiation factor eIF-2B gamma subunit	Biosyntéza proteinů
A0A0K3CIF5	clathrin assembly protein ap47	Transport proteinů, transport
A0A0K3CLA2	ER to Golgi transport protein yif1	Transport proteinů, transport
A0A0K3CJH3	peroxisomal carrier protein, adenine nucleotide transporter	Transport
A0A0K3CRF5	MFS transporter, sugar:H <sup>+</sup> symporter	Transport
A0A0K3CK15	transcription coactivator	Transkripce, regulace transkripce
A0A0K3CCU2	MFS monosaccharide transporter	Transport
A0A0K3CCS5	Beta-glucosidase	Metabolismus sacharidů, degradace polysacharidů

A0A0K3CK58	BY PROTMAP: gi 647396692 emb CDR39131.1  RHTO0S04e01970g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_9.279)	Transport
A0A0K3CD27	BY PROTMAP: gi 647398000 emb CDR41530.1  RHTO0S06e02718g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_2.116)	Metabolismus lipidů
A0A0K3CPI6	BY PROTMAP: gi 647400787 emb CDR46538.1  RHTO0S12e05864g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_14.23)	Transkripce, regulace transkripce
A0A0K3CQ03	BY PROTMAP: gi 647402411 emb CDR48665.1  RHTO0S19e01970g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_13.231)	Transport iontů, transport
A0A0K3CCZ6	L-arabinose isomerase	Transport sacharidů, transport
A0A0K3CG57	Branchpoint-bridging protein	Zpracování mRNA, sestřih mRNA
A0A0K3C7R7	CLASP_N domain-containing protein	Buněčný cyklus, buněčné dělení, mitóza
A0A0K3CAM9	Chitin synthase	Biogeneze/degradace buněčné stěny
A0A0K3CJ95	Citrulline--aspartate ligase	Biosyntéza argininu, AMK
A0A0K3CGC2	Coatomer subunit zeta	Transport proteinů, transport Endoplazmatické retikulum – Golgiho aparát, transport
A0A0K3CST1	Condensin complex subunit 1	Buněčný cyklus, mitóza
A0A0K3C7Y2	Copper transporter	Transport mědi, transport iontů, transport
A0A061B7C7	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	Transport elektronů, dýchací řetězec, transport
A0A0K3C8F4	D-fructose-6-phosphate amidotransferase	Replikace DNA
A0A0K3CG19	DNA mismatch repair protein	Oprava, poškození DNA
A0A0K3C7E2	DNA polymerase	Replikace DNA
A0A0K3CGA6	DNA replication licensing factor MCM7	Buněčný cyklus
A0A061BG80	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB7	Transkripce
A0A0K3CJX4	Diacylglycerol O-acyltransferase	Metabolismus lipidů, biosyntéza lipidů
A0A061AF09	Dynein light chain	Transport
A0A0K3CQS7	ERF-3	Biosyntéza proteinů
A0A0K3C7H5	Elongation factor 1-alpha	Biosyntéza proteinů
A0A0K3CL01	Elongation of fatty acids protein	Biosyntéza lipidů
A0A0K3CJ08	FGENESH: predicted gene_9.135 protein	Biosyntéza proteinů



A0A0K3C9F4	GDP-mannose transporter	Transport
A0A0K3CLK6	General substrate transporter	Transport
A0A0K3CMU3	Glycerophosphocholine acyltransferase 1	Metabolismus lipidů, biosyntéza lipidů, biosyntéza fosfolipidů, metabolismus fosfolipidů
A0A0K3CPP7	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-36 specific	Transkripce, regulace transkripce
A0A0K3CKZ2	Mitochondrial carrier domain-containing protein	Transport
A0A0K3CK36	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit	Transport elektronů, dýchací řetězec, transport
A0A0K3CF18	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	Transport elektronů, dýchací řetězec, transport
A0A0K3CML2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	Transport
A0A0K3CBK6	Peroxisomal membrane protein PEX16	Biogeneze peroxisomů
A0A0K3CBB8	Protein GET1	Transport
A0A0K3CT44	Protein transport protein SFT2	Proteinový transport, transport
A0A061AF36	Protein transport protein Sec61 subunit beta	Transport
A0A0K3CFA7	Protein-tyrosine-phosphatase	Buněčný cyklus, buněčné dělení
A0A0K3CCY8	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Cyklus trikarboxylových kyselin
A0A0K3C5L0	Threonine dehydratase	Biosyntéza AMK
A0A0K3CFC2	Timeless protein-domain containing protein	Buněčný cyklus
A0A0K3CFK6	Transcription elongation factor 1 homolog	Biosyntéza proteinů
A0A0K3CD58	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Konjugace Ubl
A0A0K3CL79	Ubiquitin thioesterase OTU1	Konjugace Ubl
A0A0K3CSH5	Uncharacterized protein	Transport elektronů, transport iontů, transport
A0A0K3CPD3	V-type proton ATPase proteolipid subunit	Transport vodíkových iontů, transport iontů, transport
A0A0K3CTI0	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase	Biosyntéza mastných kyselin, metabolismus mastných kyselin, metabolismus lipidů, biosyntéza lipidů
A0A0K3CUX3	Autophagy-related protein 9	Autofagie, transport proteinů, transport
A0A0K3CC49	putative Purine-cytosine permease	Transport
A0A0K3CBZ2	proton-dependent oligopeptide transporter, POT family	Transport peptidů, transport proteinů, transport
A0A0K3C7F1	catechol 1,2-dioxygenase	Katabolismus aromatických uhlovodíků

Tabulka 16: Biologické procesy downregulovaných proteinů při C/N 150; 96 hod - C/N 150; 48 hod

Accession	Označení proteinu	Biologický proces
A0A0K3C7L1	ATP-dependent RNA helicase dbp-4	Biogeneze ribozomů, zpracování rRNA
A0A0K3CB50	AdoMet-dependent rRNA methyltransferase SPB1(SPB1)	Zpracování rRNA
A0A0K3CPJ8	Proteophosphoglycan 5	Buněčný cyklus, buněčné dělení, mitóza
A0A0K3CDV8	Methyltransferase type 11	Transport
A0A0K3CP38	Nucleolar protein NOP2	Biogeneze ribozomů
A0A0K3CQQ2	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm6	Zpracování rRNA
A0A0K3CGM9	glutaredoxin	Transport elektronů, transport
A0A0K3CDQ0	CigA protein	Metabolismus sacharidů, metabolismus fukózy
A0A0K3CDY6	heat shock protein/chaperonin	Stresová reakce
A0A0K3C987	mitochondrial RNA splicing protein	Transport
A0A0K3CL52	Beta-glucosidase	Metabolismus sacharidů, degradace polysacharidů
A0A0K3CPS2	Beta-glucosidase	Metabolismus sacharidů, degradace polysacharidů
A0A0K3C752	Component of oligomeric Golgi complex 4	Transport proteinů, transport
A0A0K3C5N8	Chitin deacetylase	Metabolismus sacharidů, degradace chitinu, degradace polysacharidů, biogeneze/degradace buněčné stěny
A0A0K3CAD2	Chitin deacetylase	Metabolismus sacharidů, degradace chitinu, degradace polysacharidů, biogeneze/degradace buněčné stěny
A0A0K3CFL2	Chitin deacetylase	Metabolismus sacharidů, degradace chitinu, degradace polysacharidů, biogeneze/degradace buněčné stěny
A0A0K3CAN1	Chitinase	Metabolismus sacharidů, degradace chitinu, degradace polysacharidů
A0A0K3CHP9	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) endonuclease	Oprava, poškození DNA
A0A0K3C4V2	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	Stresová reakce
A0A0K3CPI1	FGENESH: predicted gene_14.18 protein	Transport proteinů, translokace, transport
A0A0K3CA34	FGENESH: predicted gene_5.20 protein	Oprava, poškození DNA
A0A0K3C408	GTP-binding nuclear protein	Transport
A0A0K3CBP1	Protein CASP	Transport

A0A0K3CK78	Ribosomal RNA-processing protein 8	Zpracování rRNA
A0A0K3CPA1	Ribosome biogenesis protein ERB1	Zpracování rRNA, biogeneze ribozomů
A0A0K3CKD5	THO complex subunit 1 transcription elongation factor-domain containing protein	Biosyntéza proteinů
A0A0K3CB19	Trafficking protein particle complex subunit	Transport Endoplazmatické retikulum – Golgiho aparát, transport
A0A061AFY5	Transcription and mRNA export factor SUS1	Transport mRNA, transport proteinů, transkripce, regulace transkripce, translokace
A0A0K3CBX0	Uncharacterized protein	Transport
A0A061BHE2	V-type proton ATPase subunit	Transport
A0A0K3CB08	Origin recognition complex subunit 4	Replikace DNA

Tabulka 17: Lokalizace upregulovaných proteinů při C/N 150; 96 hod - C/N 150; 48 hod

Accession	Označení proteinu	Buněčná komponenta
A0A0K3CSZ1	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	Membrána
A0A0K3CEK9	ANAPC4_WD40 domain-containing protein	Membrána
A0A0K3C8Y1	AP complex subunit sigma	Buněčná membrána, membrána
A0A0K3CJ29	ATP-citrate synthase	Cytoplazma
A0A0K3C6U0	ATP-dependent DNA helicase PIF1	Mitochondrie, jádro
A0A0K3CD17	Aa_trans domain-containing protein	Membrána
A0A0K3CLC0	Acyltransferase-domain containing protein	Membrána
A0A0K3CM93	Alternative oxidase	Membrána
A0A0K3CC54	Ammonium transporter	Membrána
A0A0K3CQQ9	Delta 8-sphingoloid desaturase protein	Membrána
A0A0K3CQI8	Vacuolar DHA amino acid exporter	Membrána
A0A0K3CI67	Peptide transporter MTD1	Membrána
A0A0K3CJK9	hexose transport-related protein	Membrána
A0A0K3CF05	Zinc transporter 1	Membrána
A0A0K3CBE7	Proteophosphoglycan ppg4	Membrána
A0A0K3CBU0	Proteophosphoglycan ppg4	Membrána
A0A0K3CW07	EXS family protein/ERD1/XPR1/SYG1 family protein	Membrána
A0A0K3CGP6	DnaJ domain-containing protein	Membrána
A0A0K3CDY7	putative Sphingosine hydroxylase	Membrána
A0A0K3CMS9	Phosphatase and actin regulator	Cytoplazma
A0A0K3CD76	U3 small nucleolar ribonucleoprotein IMP3	Virion
A0A0K3CNM6	BY PROTMAP: gi 342321137 gb EGU13072.1  Ras-2 [Rhodotorula glutinis ATCC 204091](FGENESH: predicted gene_12.293)	Buněčná membrána, membrána
A0A0K3CKV8	putative Response to unfolded-protein	Membrána

A0A0K3CH86	Glycosyltransferase family 49 protein	Membrána
A0A0K3CJ23	Proteophosphoglycan ppg4	Membrána
A0A0K3CCB3	Proteophosphoglycan 5	Membrána
A0A0K3CBP2	delta-12 fatty acid desaturase	Membrána
A0A0K3CNA1	MFS efflux transporter	Membrána
A0A0K3C6C8	hpp family protein	Membrána
A0A0K3CHM4	Golgi membrane protein	Membrána
A0A0K3CL36	lectin,mannose-binding 2	Membrána
A0A0K3CN21	MFS transporter, drug:H+ antiporter	Membrána
A0A0K3CR85	MFS transporter, sugar transporter	Membrána
A0A0K3CMW5	DnaJ family protein	Membrána
A0A0K3CFN8	condensin complex subunit 3	Chromozom
A0A0K3CCM7	oligosaccharyltransferase complex subunit gamma	Membrána
A0A0K3CBP3	zinc-binding alcohol dehydrogenase	Membrána
A0A0K3CUF1	MFS transporter, sugar:H+ symporter	Membrána
A0A0K3CR05	cation diffusion facilitator	Membrána
A0A0K3CPM6	signal peptidase complex subunit 2	Endoplazmatické retikulum, membrána
A0A0K3CQP2	actin regulatory protein	Jádro
A0A0K3CKY0	COPII-coated vesicle protein Surf4/Erv29	Membrána
A0A0K3CA62	calcofluor white hypersensitive protein	Membrána
A0A0K3CT59	NADH-ubiquinone oxidoreductase B14 subunit	Mitochondriální vnitřní membrána, mitochondrie, membrána
A0A0K3CKR4	ER lumen protein retaining receptor	Endoplazmatické retikulum, membrána
A0A0K3CCD1	bax inhibitor family protein	Membrána
A0A0K3CR36	MFS phosphate transporter	Membrána
A0A0K3CQ86	MFS phosphate transporter	Membrána
A0A0K3C875	vacuolar transporter chaperone 4	Membrána
A0A0K3CKZ5	laccase	Membrána
A0A0K3CIF5	clathrin assembly protein ap47	Membrána
A0A0K3CLA2	ER to Golgi transport protein yif1	Endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, membrána
A0A061AGE6	cytochrome b5 type b (Outer mitochondrial membrane)	Membrána
A0A0K3CP58	MFS transporter, siderophore-iron:H+ symporter	Membrána
A0A0K3CRQ9	ER-derived vesicles protein ERV14	Membrána
A0A0K3CE05	integral membrane DUF1751 family protein	Membrána
A0A0K3CRF5	MFS transporter, sugar:H+ symporter	Membrána
A0A0K3CW30	protein of auxin efflux carrier family	Membrána
A0A0K3CR88	Bestrophin/UPF0187 family protein	Membrána
A0A0K3CJD3	fructose facilitator	Membrána
A0A0K3CJT6	putative membrane permease	Membrána
A0A0K3CDR6	vacuolar transporter chaperone 1	Membrána
A0A0K3C625	protein of Emopamil-binding family	Membrána

A0A0K3CKD0	cytochrome c oxidase assembly protein COX15	Membrána
A0A0K3CK15	transcription coactivator	Jádro
A0A0K3CCT3	MAGE family protein	Membrána
A0A0K3CCU2	MFS monosaccharide transporter	Membrána
A0A0K3C6P7	MFS transporter, siderochrome-iron transporter	Membrána
A0A0K3CE64	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	Membrána
A0A0K3CKU0	DUF250 domain containing protein	Membrána
A0A0K3CE04	secretory carrier-associated membrane protein	Membrána
A0A0K3CGZ4	SH3 domain protein	Membrána
A0A0K3CIJ2	protein of uncharacterized CysZ family	Membrána
A0A0K3CHJ9	iron permease FTR1	Membrána
A0A0K3C703	DUF726 domain protein	Membrána
A0A0K3C452	BY PROTMAP: gi 647394889 emb CDR36124.1  RHTO0S01e14774g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_1.200)	Membrána
A0A0K3CGC2	Coatomer subunit zeta	Golgiho aparát, membrána, cytoplazma
A0A0K3CDE2	BY PROTMAP: gi 647395055 emb CDR36291.1  RHTO0S01e18470g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_6.537)	Membrána
A0A0K3CK58	BY PROTMAP: gi 647396692 emb CDR39131.1  RHTO0S04e01970g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_9.279)	Membrána
A0A0K3CH50	BY PROTMAP: gi 647396724 emb CDR39189.1  RHTO0S04e02630g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_9.251)	Membrána
A0A0K3CD27	BY PROTMAP: gi 647398000 emb CDR41530.1  RHTO0S06e02718g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_2.116)	Membrána, Endoplazmatické retikulum
A0A0K3CPI6	BY PROTMAP: gi 647400787 emb CDR46538.1  RHTO0S12e05864g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_14.23)	Jádro

A0A0K3CQ03	BY PROTMAP: gi 647402411 emb CDR48665.1  RHTO0S19e01970g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_13.231)	Membrána
A0A0K3CCZ6	L-arabinose isomerase	Membrána
A0A0K3CE94	SPOSA6832_04754, partial	Membrána, peroxizom
A0A0K3CC90	C2H2-type domain-containing protein	Jádro
A0A0K3C7R7	CLASP_N domain-containing protein	Mikrotubuly
A0A0K3CAM9	Chitin synthase	Buněčná membrána, membrána
A0A0K3CLT3	Chromatin modification-related protein	Jádro
A0A0K3CST1	Condensin complex subunit 1	Chromozom, jádro
A0A0K3C7Y2	Copper transporter	Membrána
A0A061BJB9	Cysteine-rich PDZ-binding protein	Cytoplazma
A0A061B7C7	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	Vnitřní mitochondriální membrána, mitochondrie, membrána
A0A0K3CAM0	D-aminoacyl-tRNA deacylase	Cytoplazma
A0A0K3C8F4	D-fructose-6-phosphate amidotransferase	Jádro
A0A0K3C7E2	DNA polymerase	Jádro
A0A0K3CGA6	DNA replication licensing factor MCM7	Jádro
A0A0K3CGR9	Derlin	Membrána
A0A0K3CJX4	Diacylglycerol O-acyltransferase	Membrána, Endoplazmatické retikulum
A0A0K3C934	Dolichyl-phosphate-mannose--protein mannosyltransferase	Membrána
A0A0K3CD54	Dynactin subunit 6	Cytoskelet, cytoplazma
A0A061AF09	Dynein light chain	Cytoskelet, dynein, mikrotubuly, cytoplazma
A0A0K3CB39	ER membrane protein complex subunit 4	Membrána, Endoplazmatické retikulum
A0A0K3CL01	Elongation of fatty acids protein	Membrána
A0A0K3CHR0	Emp24/gp25L/p24 family/GOLD-domain containing protein	Membrána
A0A0K3CM51	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	Cytoplazma
A0A0K3CLR0	FGENESH: predicted gene_10.68 protein	Cytoskelet, mikrotubuly, cytoplazma
A0A0K3CM34	FGENESH: predicted gene_11.114 protein	Membrána
A0A0K3CPH3	FGENESH: predicted gene_15.20 protein	Membrána
A0A0K3CC39	FGENESH: predicted gene_4.100 protein	Membrána
A0A0K3CGN0	FGENESH: predicted gene_7.374 protein	Membrána
A0A0K3CFE4	FGENESH: predicted gene_8.150 protein	Membrána
A0A0K3CIA7	FGENESH: predicted gene_8.73 protein	Membrána
A0A0K3CKG8	FGENESH: predicted gene_9.137 protein	Membrána
A0A0K3CCW8	Formate dehydrogenase	Cytoplazma

A0A0K3C9F4	GDP-mannose transporter	Golgiho aparát, membrána
A0A0K3CLK6	General substrate transporter	Membrána
A0A0K3CMU3	Glycerophosphocholine acyltransferase 1	Membrána
A0A061B3Q8	Histone H2A	Chromozom, jádro
A0A061BI63	Histone H2B	Chromozom, jádro, nukleozomové jádro
A0A061AJU7	Histone H3	Chromozom, jádro, nukleozomové jádro
A0A0K3C456	Histone H4	Chromozom, jádro, nukleozomové jádro
A0A0K3CPP7	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-36 specific	Chromozom
A0A0K3CNF4	Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase	Cytoplazma
A0A0K3CRE4	Mannosyltransferase	Membrána
A0A0K3CK36	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit	Vnitřní mitochondriální membrána, mitochondrie, membrána
A0A0K3CF18	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	Vnitřní mitochondriální membrána, mitochondrie, membrána
A0A0K3CML2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron- sulfur protein 4, mitochondrial	Membrána
A0A0K3CM95	Non-specific serine/threonine protein kinase	Membrána
A0A0K3CCQ9	PRA1 family protein	Membrána
A0A0K3CJV3	Peroxin-13	Membrána
A0A0K3C6D1	Peroxisomal biogenesis factor 11	Membrána, peroxizom
A0A0K3CBK6	Peroxisomal membrane protein PEX16	Peroxisom
A0A0K3CBB8	Protein GET1	Endoplazmatické retikulum, membrána
A0A0K3CE29	Protein YIP	Membrána
A0A0K3CT44	Protein transport protein SFT2	Golgiho aparát, membrána
A0A061AF36	Protein transport protein Sec61 subunit beta	Membrána
A0A0K3CFA7	Protein-tyrosine-phosphatase	Jádro
A0A0K3C8H3	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	Cytoplazma
A0A0K3CMZ9	Signal sequence receptor subunit alpha	Endoplazmatické retikulum, membrána
A0A0K3CS00	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] cytochrome b small subunit	Membrána
A0A0K3CCY8	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Vnitřní mitochondriální membrána, mitochondrie, membrána
A0A0K3CFC2	Timeless protein-domain containing protein	Jádro
A0A0K3CFK6	Transcription elongation factor 1 homolog	Jádro
A0A0K3CL79	Ubiquitin thioesterase OTU1	Cytoplazma

A0A0K3CIT2	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CNY7	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CLY1	Uncharacterized protein	Jádro
A0A0K3CSH5	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CG64	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CCW6	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CED9	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CCR6	Uncharacterized protein	Endoplazmatické retikulum, membrána
A0A0K3CP09	Uricase	Peroxisom
A0A0K3CPD3	V-type proton ATPase proteolipid subunit	Membrána, vakuola
A0A0K3CTI0	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase	Endoplazmatické retikulum, membrána
A0A0K3CDJ2	Vezatin domain-containing protein	Membrána
A0A0K3CBR4	acidPPc domain-containing protein	Membrána
A0A0K3CAU4	acidPPc domain-containing protein	Membrána
A0A0K3CUX3	Autophagy-related protein 9	Membrána
A0A0K3CQV5	Proteophosphoglycan ppg4	Membrána
A0A0K3CC49	putative Purine-cytosine permease	Membrána
A0A0K3CJR0	zinc metalloprotease	Membrána
A0A0K3CBZ2	proton-dependent oligopeptide transporter, POT family	Membrána
A0A0K3CCV2	siderophore iron transporter mirC	Membrána
A0A0K3CKM8	BY PROTMAP: gi 647403073 emb CDR49247.1  RH00S24e01728g1_1 [Rhodospiridium toruloides](FGENESH: predicted gene_9.449)	Membrána
A0A0K3CM75	Cation efflux family-domain containing protein	Membrána
A0A0K3C4I1	Derlin	Membrána
A0A0K3CM32	FGENESH: predicted gene_10.203 protein	Membrána
A0A0K3CRT4	FGENESH: predicted gene_17.141 protein	Membrána
A0A0K3CH69	FGENESH: predicted gene_7.116 protein	Membrána
A0A0K3CC72	UDP-N-acetylglucosamine transferase subunit ALG13	Endoplazmatické retikulum
A0A0K3CDG5	Uncharacterized membrane protein	Endoplazmatické retikulum
A0A0K3C6Y4	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CE47	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CEZ7	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CHT5	Uncharacterized protein	Membrána



Tabulka 18: Lokalizace downregulovaných proteinů při C/N 150; 96 hod - C/N 150; 48 hod

Accession	Označení proteinu	Buněčná komponenta
A0A0K3CCG8	2-(3-amino-3-carboxypropyl)histidine synthase subunit 2	Cytoplazma
A0A0K3CB50	AdoMet-dependent rRNA methyltransferase SPB1(SPB1)	Jádro
A0A0K3CFL9	Alkaline-phosphatase-like, core domain-containing protein	Membrána
A0A0K3CBB6	Aminomethyltransferase	Mitochondrie
A0A0K3CA02	purine nucleoside permease	Membrána
A0A0K3C8D8	putative cytochrome P450 monooxygenase	Membrána
A0A0K3C8Q0	Proteophosphoglycan ppg4	Membrána
A0A0K3CBD9	Cytochrome c oxidase assembly protein COX11	Membrána
A0A0K3CC85	Zinc finger protein ZIC 5	Membrána
A0A0K3CPJ8	Proteophosphoglycan 5	Centromera, chromozom, cytoplazma, kinetochor
A0A0K3CGF7	putative Kex protein	Membrána
A0A0K3CDV8	Methyltransferase type 11	Jádro
A0A0K3CHS2	Proteophosphoglycan ppg4	Membrána
A0A0K3CEI5	putative Vacuolar membrane protein	Membrána
A0A0K3CK40	Cleft lip and palate associated transmembrane protein	Membrána
A0A0K3CQ32	protein of Nucleotide-diphospho-sugar transferase, predicted family	Membrána
A0A0K3C604	protein of integral membrane protein, Mpv17/PMP23 family	Membrána
A0A0K3CQQ2	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm6	Jádro, spliceozom
A0A0K3CTK4	chitin deacetylase	Membrána
A0A0K3CD79	mitochondrial ABC transporter ATM	Membrána
A0A0K3C8N6	Lipid-binding START domain protein	Membrána
A0A0K3CF55	ATP-binding cassette transporter	Membrána
A0A0K3CEI8	Glycoside hydrolase, family 5	Membrána
A0A0K3CLY4	adiponectin receptor protein	Membrána
A0A0K3CU01	protein of Nucleotide-diphospho-sugar transferase, predicted family	Membrána
A0A0K3CUC5	protein of lipase, class 3 family	Membrána
A0A0K3C757	glycoside hydrolase family 16 protein	Membrána
A0A0K3CFK0	endothelin-converting enzyme, metalloendopeptidase	Membrána
A0A0K3C987	mitochondrial RNA splicing protein	Mitochondrie
A0A0K3CEW1	potassium:hydrogen antiporter	Membrána
A0A0K3CKV0	BY PROTMAP: gi 647394599 emb CDR35830.1  RH00S01e08042g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_10.5)	Membrána

A0A0K3C5N8	Chitin deacetylase	Buněčná membrána, membrána
A0A0K3CAD2	Chitin deacetylase	Buněčná membrána, membrána
A0A0K3CFL2	Chitin deacetylase	Buněčná membrána, membrána
A0A0K3C752	Component of oligomeric Golgi complex 4	Membrána
A0A0K3CB65	Cortical protein marker for cell polarity- domain containing protein	Membrána
A0A0K3C4V2	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	Endoplazmatické retikulum
A0A0K3C6Z5	FGENESH: predicted gene_1.91 protein	Membrána
A0A0K3CL37	FGENESH: predicted gene_10.100 protein	Jádro
A0A0K3CIN8	FGENESH: predicted gene_10.227 protein	Membrána
A0A0K3CPI1	FGENESH: predicted gene_14.18 protein	Membrána, mitochondrie
A0A0K3CA34	FGENESH: predicted gene_5.20 protein	Jádro
A0A0K3CEW5	FGENESH: predicted gene_5.471 protein	Jádro
A0A0K3CE44	FGENESH: predicted gene_5.609 protein	Membrána
A0A0K3CDP8	FGENESH: predicted gene_5.86 protein	Membrána
A0A0K3CC11	Fip1 domain-containing protein	Jádro
A0A0K3CIK1	Fms-interacting protein-domain containing protein	Jádro
A0A0K3C408	GTP-binding nuclear protein	Jádro
A0A0K3CQ89	General transcription and DNA repair factor IIH helicase subunit XPD	Jádro
A0A0K3CKV1	Glycine cleavage system H protein	Mitochondrie
A0A0K3CL41	P-type phospholipid transporter	Membrána
A0A0K3CJ99	Pescadillo homolog	Jádro
A0A0K3CFV9	Pre-rRNA-processing protein PNO1	Jádro
A0A0K3CBP1	Protein CASP	Golgiho aparát, membrána
A0A061AP40	RHTO0S04e04522g1_1(FGENESH: predicted gene_9.173)	Membrána
A0A0K3CK78	Ribosomal RNA-processing protein 8	Jádro
A0A0K3CPA1	Ribosome biogenesis protein ERB1	Jádro
A0A0K3CD96	SCO1/SenC-domain containing protein	Membrána
A0A061AFY5	Transcription and mRNA export factor SUS1	Jádro, cytoplazma
A0A0K3CQY8	Tubulin-specific chaperone A	Cytoskelet, mikrotubuly, cytoplazma
A0A0K3CPG5	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CAR1	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3C9L3	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CKE7	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CPY6	VWFA domain-containing protein	Mitochondrie
A0A0K3CB08	Origin recognition complex subunit 4	Jádro
A0A0K3CMK0	BY PROTMAP: gi 647399466 emb CDR44280.1  RHTO0S09e01970g2_1 [Rhodospiridium	Membrána

	toruloides](FGENESH: predicted gene_11.264)	
A0A0K3CLV6	CAP10 domain-containing protein	Membrána
A0A0K3CCF1	FGENESH: predicted gene_6.202 protein	Membrána
A0A0K3CNH8	Uncharacterized protein	Membrána

Tabulka 19: Molekulární funkce upregulovaných proteinů při C/N 150; 96 hod - C/N 150; 48 hod

Accession	Označení proteinu	Molekulární funkce
A0A0K3CSZ1	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	Transferáza
A0A0K3CKL1	30S ribosomal protein S10	Ribonukleoprotein
A0A0K3C4B5	40S ribosomal protein S4	RNA-vazebný protein
A0A0K3CIK5	6-O-methylguanine-DNA methyltransferase	Transferáza
A0A061BI04	60S ribosomal protein L32	Ribonukleoprotein
A0A0K3CKR0	60S ribosomal protein L41	Ribonukleoprotein, ribozomální protein
A0A0K3CJ29	ATP-citrate synthase	Transferáza
A0A0K3C6U0	ATP-dependent DNA helicase PIF1	DNA-vazebný protein, helikáza, hydroláza
A0A0K3CLC0	Acyltransferase-domain containing protein	Acyltransferáza, transferáza
A0A0K3C948	Alpha/Beta hydrolase fold	Hydroláza
A0A0K3CGG6	Arylamine N-acetyltransferase	Transferáza
A0A0K3CPK2	putative DNA-binding protein cre-1	DNA-vazebný protein
A0A0K3CBD8	Phenol 2-monooxygenase	Monooxygenáza
A0A0K3CMB0	RNA binding protein	RNA-vazebný protein
A0A0K3CQW1	putative GNAT family acetyltransferase	Transferáza
A0A0K3CD72	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit	Kináza, transferáza
A0A0K3CAM4	Transcription initiation factor IIB	Iniciální faktor
A0A0K3C9C9	putative Ubiquitin-protein ligase	Ligáza
A0A0K3CNY1	RING finger domain-containing protein	Transferáza
A0A0K3CV70	putative TfdA family taurine dioxygenase	Dioxygenáza, oxidoreduktáza
A0A0K3CI24	Skeletal muscle/kidney enriched inositol 5-phosphatase	Hydroláza
A0A0K3CD76	U3 small nucleolar ribonucleoprotein IMP3	Virový nukleoprotein, RNA-vazebný protein
A0A0K3CNP7	Ubiquitin-protein ligase E3	Ligáza
A0A0K3CMP9	Assimilatory sulfite reductase	Oxidoreduktáza
A0A0K3CH86	Glycosyltransferase family 49 protein	Transferáza
A0A0K3CGW8	Phenylalanine ammonia-lyase	Lyáza
A0A0K3C7C1	ADP-ribose pyrophosphatase	Dioxygenáza, oxidoreduktáza
A0A0K3CRU2	NADH dehydrogenase subunit 9, partial (Mitochondrion)	Translokáza

A0A0K3CJI3	iron complex transport system ATP-binding protein	Hydroláza
A0A0K3CCM7	oligosaccharyltransferase complex subunit gamma	Transferáza
A0A0K3CBP3	zinc-binding alcohol dehydrogenase	Oxidoreduktáza
A0A0K3CMT0	checkpoint serine/threonine-protein kinase	Kináza, transferáza
A0A0K3C5J8	alkylated DNA repair protein alkB-like protein	Methyltransferáza, transferáza
A0A0K3CIW7	60S ribosomal protein l18	Ribonukleoprotein
A0A0K3CKR4	ER lumen protein retaining receptor	Receptor
A0A0K3CK82	O-acetylhomoserine aminocarboxypropyltransferase	Transferáza
A0A0K3CQ96	fumarate reductase flavoprotein subunit	Oxidoreduktáza
A0A0K3CAC8	translation initiation factor eIF-2B gamma subunit	Iničiační faktor
A0A0K3CLQ0	G2/mitotic-specific cyclin 1/2	Cyklin
A0A0K3CQJ9	cystathionine gamma-lyase	Lyáza
A0A0K3CIX0	diamine N-acetyltransferase	Transferáza
A0A0K3CP89	C-22 sterol desaturase	Monooxygenáza, oxidoreduktáza
A0A0K3CFH2	mitochondrial large subunit ribosomal protein L45	Ribonukleoprotein, ribozomální protein
A0A0K3CRY9	zinc-type alcohol dehydrogenase	Oxidoreduktáza
A0A0K3CMN7	acetyltransferase GNAT family	Transferáza
A0A0K3CNT9	G2/mitotic-specific cyclin 3/4	Cyklin
A0A0K3CA59	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	Hydroláza
A0A0K3CAG1	peptide alpha-N-acetyltransferase	Transferáza
A0A0K3CNI5	serine/threonine protein kinase Nrc-2	Kináza, serin/threonin-proteinkináza, transferáza
A0A0K3CN62	RNA exonuclease 1	Exonukleáza, hydroláza, nukleáza
A0A0K3CK15	transcription coactivator	DNA-vazebný protein
A0A0K3C9R6	uridine nucleosidase Urh1	Glykosidáza, hydroláza
A0A0K3C9S0	mitochondrial inner membrane metallopeptidase Oma1	Hydroláza, proteáza
A0A0K3C9T8	60S ribosomal protein l19	Ribonukleoprotein
A0A0K3CAL3	60S ribosomal protein l13	Ribonukleoprotein
A0A0K3CMA6	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase beta subunit	Transferáza
A0A0K3CF31	bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase	Kináza, transferáza
A0A0K3CLC8	Mitogen-activated protein kinase HOG1	Kináza, transferáza
A0A0K3CPI6	BY PROTMAP: gi 647400787 emb CDR46538.1  RHTO0S12e05864g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_14.23)	DNA-vazebný protein

A0A0K3CRD2	BY PROTMAP: gi 647401048 emb CDR46990.1  RHTO0S13e04478g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_18.75)	Kináza, serin/threonin- proteinkináza, transferáza
A0A0K3CQ03	BY PROTMAP: gi 647402411 emb CDR48665.1  RHTO0S19e01970g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_13.231)	Iontový kanál
A0A0K3CCZ6	L-arabinose isomerase	Izomeráza
A0A0K3C7N2	ribosomal protein L35Ae, partial	Ribonukleoprotein
A0A0K3CCS5	Beta-glucosidase	Glykosidáza, hydroláza
A0A0K3CAM9	Chitin synthase	Glykosyltransferáza, transferáza
A0A0K3CLT3	Chromatin modification-related protein	Regulátor chromatinu
A0A0K3CJ95	Citrulline--aspartate ligase	Ligáza
A0A0K3CBY2	Class I glutamine amidotransferase-like protein	Transferáza
A0A0K3CAM0	D-aminoacyl-tRNA deacylase	RNA-vazebný protein, tRNA-vazebný protein, hydroláza
A0A0K3C8F4	D-fructose-6-phosphate amidotransferase	DNA-vazebný protein, helikáza, hydroláza, transferáza
A0A0K3CG19	DNA mismatch repair protein	DNA-vazebný protein
A0A0K3C7E2	DNA polymerase	Transferáza, DNA-vazebný protein, nukleotidyltransferáza
A0A0K3CGA6	DNA replication licensing factor MCM7	DNA-vazebný protein, helikáza, hydroláza
A0A0K3CJX4	Diacylglycerol O-acyltransferase	Transferáza
A0A0K3C934	Dolichyl-phosphate-mannose--protein mannosyltransferase	Transferáza
A0A061AF09	Dynein light chain	Motorický protein
A0A0K3CL01	Elongation of fatty acids protein	Transferáza
A0A0K3CM51	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G(TIF35)	RNA-vazebný protein
A0A0K3C960	FGENESH: predicted gene_2.75 protein	Oxidoreduktáza
A0A0K3CC39	FGENESH: predicted gene_4.100 protein	Transferáza
A0A0K3CJ92	FGENESH: predicted gene_8.281 protein	RNA-vazebný protein
A0A0K3CJ08	FGENESH: predicted gene_9.135 protein	Iniciační faktor
A0A0K3CSP6	Glutamine synthetase	Ligáza
A0A0K3CMU3	Glycerophosphocholine acyltransferase 1	Acyltransferáza, transferáza
A0A061B3Q8	Histone H2A	DNA-vazebný protein
A0A061BI63	Histone H2B	DNA-vazebný protein
A0A061AJU7	Histone H3	DNA-vazebný protein
A0A0K3C456	Histone H4	DNA-vazebný protein

A0A0K3CPP7	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-36 specific	Methyltransferáza, represor, transferáza
A0A0K3CNF4	Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase	Kináza, transferáza
A0A0K3CLA8	Lysine ketoglutarate reductase	Multifunkční enzym
A0A0K3CRE4	Mannosyltransferase	Transferáza
A0A0K3CNE3	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	Transferáza
A0A0K3CM95	Non-specific serine/threonine protein kinase	Kináza, serin/threonin-proteinkináza, transferáza
A0A0K3CFD6	Peptidase_M48 domain-containing protein	Hydroláza, metaloproteáza, proteáza
A0A0K3CM52	Peroxin-12	Kináza, transferáza
A0A061B552	Protein-synthesizing GTPase	Hydroláza
A0A0K3CFA7	Protein-tyrosine-phosphatase	Hydroláza, proteinová fosfatáza
A0A0K3CNG8	Pyridoxal 5'-phosphate synthase	Oxidoreduktáza
A0A0K3CB42	Pyridoxal phosphate-dependent transferase	Aminotransferáza, transferáza
A0A0K3CCW5	Pyridoxal phosphate-dependent transferase	Transferáza
A0A0K3CC63	RING-type E3 ubiquitin transferase	Transferáza
A0A0K3CIL2	RRM domain-containing protein	RNA-vazebný protein
A0A0K3CUU9	Ribonucleoside-diphosphate reductase	Allosterický enzym
A0A0K3C732	Ribosomal protein L37	RNA-vazebný protein
A0A0K3C8H3	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	Izomeráza, Rotamáza
A0A0K3CMZ9	Signal sequence receptor subunit alpha	Receptor
A0A0K3C5L0	Threonine dehydratase	Lyáza
A0A0K3CFC2	Timeless protein-domain containing protein	Inhibitor replikace DNA
A0A0K3CFK6	Transcription elongation factor 1 homolog	Elongační faktor
A0A0K3C7V9	Tryptophan synthase	Lyáza
A0A0K3CVX1	UDP-glucose pyrophosphorylase	Nukleotidyltransferáza, transferáza
A0A0K3CD58	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Proteáza, hydroláza, thiolová proteáza
A0A0K3CL79	Ubiquitin thioesterase OTU1	Proteáza, hydroláza, thiolová proteáza
A0A0K3CLN4	Uncharacterized protein	RNA-vazebný protein, tRNA-vazebný protein
A0A0K3CSH5	Uncharacterized protein	Oxidoreduktáza
A0A0K3CTI0	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase	Lyáza
A0A0K3CBR4	acidPPc domain-containing protein	Oxidoreduktáza, peroxidáza
A0A0K3CJR0	zinc metalloprotease	Hydroláza, metaloproteáza, proteáza

A0A0K3C7F1	catechol 1,2-dioxygenase	Dioxygenáza, oxidoreduktáza
A0A0K3CFP8	Dipeptidase	Hydroláza, dipeptidáza, proteáza
A0A0K3CC72	UDP-N-acetylglucosamine transferase subunit ALG13	Glykosyltransferáza, transferáza

Tabulka 20: Molekulární funkce downregulovaných proteinů při C/N 150; 96 hod - C/N 150;  
48 hod

Accession	Označení proteinu	Molekulární funkce
A0A0K3CCG8	2-(3-amino-3-carboxypropyl)histidine synthase subunit 2	Transferáza
A0A0K3C7L1	ATP-dependent RNA helicase dbp-4	Helikáza, hydroláza, RNA-vazebný protein
A0A0K3CGK4	Alpha/Beta hydrolase fold	Hydroláza
A0A0K3CBB6	Aminomethyltransferase	Methyltransferáza, transferáza
A0A0K3C8D8	putative cytochrome P450 monooxygenase	Monooxygenáza, oxidoreduktáza
A0A0K3CEZ6	Glycoside hydrolase family 32 protein	Glykosidáza, hydroláza
A0A0K3CGF7	putative Kex protein	Hydroláza, proteáza
A0A0K3CDV8	Methyltransferase type 11	Methyltransferáza, transferáza
A0A0K3C7W2	putative UbiE/COQ5 family methyltransferase	Transferáza
A0A0K3CVM4	tRNA dimethylallyltransferase	Transferáza
A0A0K3CMD6	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase	Acyltransferáza, transferáza
A0A0K3CQ32	protein of Nucleotide-diphospho-sugar transferase, predicted family	Transferáza
A0A0K3C6V0	Endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	Endonukleáza, exonukleáza, hydroláza, nukleáza
A0A0K3CQQ2	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm6	RNA-vazebný protein
A0A0K3CQ13	60S ribosomal protein l28	Ribonukleoprotein
A0A0K3CAX9	glycoside hydrolase family 18 protein	Hydroláza
A0A0K3CD85	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O- methyltransferase	Methyltransferáza, transferáza
A0A0K3C6J0	small subunit ribosomal protein S27Ae	Ribonukleoprotein
A0A0K3CFE2	Esterase, SGNH hydrolase-type domain protein	Hydroláza
A0A0K3CEI8	Glycoside hydrolase, family 5	Glykosidáza, hydroláza
A0A0K3CLQ1	exopolyphosphatase	Hydroláza
A0A0K3CLY4	adiponectin receptor protein	Receptor
A0A0K3CU01	protein of Nucleotide-diphospho-sugar transferase, predicted family	Transferáza
A0A0K3CQL2	sphingomyelin phosphodiesterase	Hydroláza
A0A0K3CCK1	aspartic proteinase	Hydroláza, proteáza

A0A0K3CDN9	protein tyrosine phosphatase	Proteinová fosfatáza
A0A0K3CDQ0	CigA protein	Transferáza
A0A0K3C757	glycoside hydrolase family 16 protein	Hydroláza
A0A0K3CFK0	endothelin-converting enzyme, metalloendopeptidase	Hydroláza, metaloproteáza, proteáza
A0A0K3CDY6	heat shock protein/chaperonin	Chaperon, hydroláza
A0A0K3C9X3	DNA helicase	Helikáza, hydroláza
A0A0K3CJY1	cytochrome c oxidase copper chaperone	Chaperon
A0A0K3CES6	nicotinamide N-methyltransferase, putative	Methyltransferáza, transferáza
A0A0K3C772	medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	Oxidoreduktáza
A0A0K3CCF2	BY PROTMAP: gi 647398283 emb CDR42043.1  RHTO0S06e09098g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_3.547)	Acyltransferáza, transferáza
A0A0K3C8B5	BY PROTMAP: gi 647399839 emb CDR44810.1  RHTO0S10e01024g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_2.133)	RNA-vazebný protein
A0A0K3CL52	Beta-glucosidase	Glykosidáza, hydroláza
A0A0K3CPS2	Beta-glucosidase	Glykosidáza, hydroláza
A0A0K3CAN1	Chitinase	Glykosidáza, hydroláza
A0A0K3CHP9	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) endonuclease	Lyáza
A0A0K3CL37	FGENESH: predicted gene_10.100 protein	DNA-vazebný protein
A0A0K3CJ98	FGENESH: predicted gene_11.96 protein	RNA-vazebný protein
A0A0K3CA50	FGENESH: predicted gene_3.55 protein	Dioxygenáza, oxidoreduktáza
A0A0K3CA34	FGENESH: predicted gene_5.20 protein	Hydroláza
A0A0K3CIH1	FGENESH: predicted gene_8.474 protein	Transferáza
A0A0K3CMS1	Fe2OG dioxygenase domain-containing protein	Oxidoreduktáza
A0A0K3CQ89	General transcription and DNA repair factor IIIH helicase subunit XPD	Helikáza, hydroláza, DNA-vazebný protein
A0A0K3C8W7	Glycosyl transferase family 64 domain-domain containing protein	Transferáza
A0A0K3C9Y8	L-galactono-gamma-lactone oxidase	Oxidoreduktáza
A0A0K3CHM2	Methionine--tRNA ligase	Ligáza
A0A0K3CKI7	Nicotinate phosphoribosyltransferase	Glykosyltransferáza, ligáza, transferáza
A0A0K3CL41	P-type phospholipid transporter	Translokáza
A0A0K3CNK0	Protein arginine methyltransferase NDUFAF7	Transferáza
A0A0K3CN27	Protein-tyrosine-phosphatase	Proteinová fosfatáza, hydroláza



A0A0K3C9S5	Pyridoxal phosphate-dependent transferase	Dekarboxyláza, lyáza, transferáza
A0A0K3CFD0	Pyridoxal phosphate-dependent transferase	Transferáza
A0A0K3CK78	Ribosomal RNA-processing protein 8	Transferáza
A0A0K3CKD5	THO complex subunit 1 transcription elongation factor-domain containing protein	Elongační faktor
A0A0K3C8E0	Terpenoid cyclases/protein prenyltransferase alpha-alpha toroid	Prenyltransferáza, transferáza
A0A061AFY5	Transcription and mRNA export factor SUS1	Aktivátor, regulátor chromatinu
A0A0K3CQY8	Tubulin-specific chaperone A	Chaperon
A0A0K3CIX2	Uncharacterized protein	RNA-vazebný protein
A0A0K3CH03	alpha-1,2-Mannosidase	Glykosidáza, hydroláza
A0A0K3CB08	Origin recognition complex subunit 4	DNA-vazebný protein
A0A0K3CLV6	CAP10 domain-containing protein	Transferáza
A0A0K3C6Z7	Carboxylic ester hydrolase	Hydroláza, serinová esteráza

Tabulka 21: Biologické procesy upregulovaných proteinů při C/N 150; 96 hod - C/N 13; 96 hod

Accession	Označení proteinu	Biologický proces
A0A0K3C6U0	ATP-dependent DNA helicase PIF1 (PIF1)	Poškození, oprava DNA, rekombinace DNA
A0A0K3CB66	putative Cation diffusion facilitator	Transport
A0A0K3CR85	MFS transporter, sugar transporter	Transport sacharidů, transport
A0A0K3CUF1	MFS transporter, sugar:H <sup>+</sup> symporter	Transport
A0A0K3CR05	cation diffusion facilitator	Transport
A0A0K3CC76	mitochondrial carrier protein, family 25	Transport
A0A0K3CJD1	cell division control protein 7	Buněčný cyklus, buněčné dělení
A0A0K3CRF5	MFS transporter, sugar:H <sup>+</sup> symporter	Transport
A0A0K3CRJ0	UV DNA damage endonuclease	Poškození DNA, excize DNA, oprava DNA
A0A0K3CK84	Catalase	Protein účastní se rozkladu peroxid vodíku
A0A0K3CBS7	DNA repair protein RAD51 homolog	Poškození, oprava DNA, rekombinace DNA
A0A0K3CL01	Elongation of fatty acids protein	Biosyntéza lipidů
A0A0K3CAI4	Magnesium transporter	Transport iontů, transport
A0A0K3CBB3	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 5	Transkripce, regulace transkripce
A0A0K3CNC5	Mitochondrial carrier domain-containing protein	Transport
A0A0K3CSH5	Uncharacterized protein	Transport elektronů, transport iontů, transport

Tabulka 22: Biologické procesy downregulovaných proteinů při C/N 150; 96 hod - C/N 13; 96 hod

Accession	Označení proteinu	Biologický proces
A0A0K3CET7	Acyl-coenzyme A oxidase	Metabolismus mastných kyselin, metabolismus lipidů
A0A0K3CI67	Peptide transporter MTD1	Transport
A0A0K3CB08	Origin recognition complex subunit 4	DNA replikace
A0A0K3C7F1	catechol 1,2-dioxygenase	Katabolismus aromatických uhlovodíků
A0A061B4J3	vesicular-fusion protein Sec17	Transport, transport Endoplazmatické retikulum - Golgiho aparát
A0A0K3CM19	ABC transporter	Transport
A0A0K3C899	BY PROTMAP: gi 647396115 emb CDR38138.1  RH00S03e04390g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_1.688)	Transport
A0A0K3CCZ6	L-arabinose isomerase	Transport sacharidů, transport
A0A0K3CL52	Beta-glucosidase	Metabolismus sacharidů, degradace polysacharidů
A0A0K3CPS2	Beta-glucosidase	Metabolismus sacharidů, degradace polysacharidů
A0A0K3CEJ8	Chitin deacetylase	Metabolismus sacharidů, degradace chitinu, degradace polysacharidů, biogeneze/degradace buněčné stěny
A0A0K3C9F1	Chitinase	Metabolismus sacharidů, degradace chitinu, degradace polysacharidů
A0A0K3C8P9	DASH complex subunit DAD1	Buněčný cyklus, buněčné dělení, mitóza
A0A0K3CQM6	Exportin-T	Transport
A0A061AFY5	Transcription and mRNA export factor SUS1	Transport mRNA, transport proteinů, transkripce, regulace transkripce, translokace, transport

Tabulka 23: Lokalizace upregulovaných proteinů při C/N 150; 96 hod - C/N 13; 96 hod

Accession	Označení proteinu	Buněčná komponenta
A0A0K3CL17	60Kd inner membrane protein-domain containing protein	Membrána
A0A0K3CIU4	ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase	Cytoplazma
A0A0K3C6U0	ATP-dependent DNA helicase PIF1(PIF1)	Mitochondrie, jádro
A0A0K3CQL8	deoxynucleotidyltransferase	Jádro
A0A0K3CQI8	Vacuolar DHA amino acid exporter	Membrána
A0A0K3C8Q0	Proteophosphoglycan ppg4	Membrána

A0A0K3CC85	Zinc finger protein ZIC 5	Membrána
A0A0K3CBJ2	UDP-galactose transporter	Membrána
A0A0K3CGE5	Bub2 protein	Membrána
A0A0K3CB66	putative Cation diffusion facilitator	Membrána
A0A0K3CML9	Proteophosphoglycan ppg4	Membrána
A0A0K3CIL5	GABA permease	Membrána
A0A0K3CR85	MFS transporter, sugar transporter	Membrána
A0A0K3CUF1	MFS transporter, sugar:H+ symporter	Membrána
A0A0K3CR05	cation diffusion facilitator	Membrána
A0A0K3CCD1	bax inhibitor family protein	Membrána
A0A0K3CQ86	MFS phosphate transporter	Membrána
A0A0K3CI49	vesicle transport protein GOT1B	Membrána
A0A0K3CRF5	MFS transporter, sugar:H+ symporter	Membrána
A0A0K3CW30	protein of auxin efflux carrier family	Membrána
A0A0K3CQU8	BY PROTMAP: gi 647394313 emb CDR35542.1  RH00S01e01640g1_1 [Rhodospiridium toruloides](FGENESH: predicted gene_10.279)	Membrána
A0A0K3CBZ3	BY PROTMAP: gi 647396290 emb CDR38323.1  RH00S03e08240g1_1 [Rhodospiridium toruloides](FGENESH: predicted gene_1.527)	Membrána
A0A0K3CKM8	BY PROTMAP: gi 647403073 emb CDR49247.1  RH00S24e01728g1_1 [Rhodospiridium toruloides](FGENESH: predicted gene_9.449)	Membrána
A0A0K3CBM8	Cation_ATPase_N domain-containing protein	Membrána
A0A0K3CBS7	DNA repair protein RAD51 homolog	Jádro
A0A0K3CEY2	DUF2231 domain-containing protein	Membrána
A0A0K3CGR9	Derlin	Membrána
A0A0K3CL01	Elongation of fatty acids protein	Membrána
A0A0K3CM34	FGENESH: predicted gene_11.114 protein	Membrána
A0A0K3CL85	FGENESH: predicted gene_13.100 protein	Chromozom
A0A0K3CRT4	FGENESH: predicted gene_17.141 protein	Membrána
A0A0K3CH69	FGENESH: predicted gene_7.116 protein	Membrána
A0A0K3CEC3	GPI ethanolamine phosphate transferase 2	Membrána
A0A0K3CJF0	Holocytochrome c-type synthase	Membrána
A0A0K3CAI4	Magnesium transporter	Membrána, mitochondrie, vnitřní mitochondriální membrána
A0A0K3CRE4	Mannosyltransferase	Membrána
A0A0K3CBB3	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 5	Jádro
A0A0K3C608	Nrap protein-domain containing protein	Jádro
A0A0K3CLG8	Ste24 endopeptidase	Membrána

A0A0K3C718	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CNY7	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CSH5	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CB69	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CE47	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CCR6	Uncharacterized protein	Endoplazmatické retikulum, membrána

Tabulka 24: Lokalizace downregulovaných proteinů při C/N 150; 96 hod - C/N 13; 96 hod

Accession	Označení proteinu	Buněčná komponenta
A0A0K3CET7	Acyl-coenzyme A oxidase	Perioxozom
A0A0K3CLJ2	putative Amino acid/metabolite permease	Membrána
A0A0K3CI67	Peptide transporter MTD1	Membrána
A0A0K3C8D8	putative cytochrome P450 monooxygenase	Membrána
A0A0K3CB08	Origin recognition complex subunit 4	Jádro
A0A0K3C994	amino acid transmembrane transporter	Membrána
A0A0K3CUG4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	Membrána
A0A0K3CEM6	amino acid transmembrane transporter	Membrána
A0A061B4J3	vesicular-fusion protein Sec17	Membrána
A0A0K3CRS8	high-affinity nicotinic acid transporter	Membrána
A0A0K3CDQ6	Bestrophin/UPF0187 protein	Membrána
A0A0K3CP15	L-fucose transporter	Membrána
A0A0K3CM19	ABC transporter	Membrána
A0A0K3C899	BY PROTMAP: gi 647396115 emb CDR38138.1  RH00S03e04390g1_1 [Rhodospiridium toruloides](FGENESH: predicted gene_1.688)	Membrána
A0A0K3CN42	BY PROTMAP: gi 647399488 emb CDR44314.1  RH00S09e02410g1_1 [Rhodospiridium toruloides](FGENESH: predicted gene_11.242)	Membrána
A0A0K3C9C4	BY PROTMAP: gi 647401743 emb CDR48098.1  RH00S16e01200g1_1 [Rhodospiridium toruloides](FGENESH: predicted gene_2.277)	Membrána
A0A0K3CCZ6	L-arabinose isomerase	Membrána
A0A0K3CEJ8	Chitin deacetylase	Membrána, buněčná membrána
A0A0K3C8P9	DASH complex subunit DAD1	Chromozom, cytoskelet, mikrotubuly, jádro, cytoplazma
A0A0K3CQM6	Exportin-T	Jádro, cytoplazma
A0A0K3CA73	FGENESH: predicted gene_2.577 protein	Membrána
A0A0K3CDP8	FGENESH: predicted gene_5.86 protein	Membrána
A0A0K3C8A5	Histone H2A	Chromozom, jádro

A0A0K3CSI3	Long-chain-alcohol oxidase	Membrána
A0A061AFY5	Transcription and mRNA export factor SUS1	Jádro, cytoplazma
A0A0K3C9U5	Tubulin beta chain	Mikrotubuly
A0A0K3CNH8	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CAR1	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CG97	Uncharacterized protein	Membrána
A0A0K3CNR1	zf-C2HE domain-containing protein	Jádro

Tabulka 25: Molekulární funkce upregulovaných proteinů při C/N 150; 96 hod - C/N 13; 96 hod

Accession	Označení proteinu	Molekulární funkce
A0A061AUV7	60S ribosomal protein l34	Ribonukleoprotein
A0A0K3CIU4	ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase	Kináza, lyáza, transferáza
A0A0K3C6U0	ATP-dependent DNA helicase PIF1	DNA-vazebný protein, helikáza, hydroláza
A0A0K3CMU6	Aurora kinase	Kináza, serin/threonin-proteinkináza, transferáza
A0A0K3CQL8	deoxynucleotidyltransferase	Transferáza
A0A0K3CV70	putative TfdA family taurine dioxygenase	Dioxygenáza, oxidoreduktáza
A0A0K3CKN2	Polysaccharide lyase family 14 protein	Lyáza
A0A0K3CIY5	RNA helicase	Helikáza, hydroláza
A0A0K3CIP8	beta-1,3-mannanase	Hydroláza
A0A0K3C7Q7	putative glycosyltransferase family 49 protein	Transferáza
A0A0K3CAX2	cytochrome P450, family 51 (Sterol 14- demethylase)	Methyltransferáza, monooxygenáza, oxidoreduktáza, transferáza
A0A0K3CCW4	monooxygenase	Monooxygenáza, oxidoreduktáza
A0A0K3CAL5	monooxygenase	Monooxygenáza, oxidoreduktáza
A0A0K3CAC4	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate- homocysteine S-methyltransferase	Methyltransferáza, transferáza
A0A0K3CJD1	cell division control protein 7	Kináza, transferáza
A0A0K3CP32	glutathione S-transferase	Transferáza
A0A0K3C8P3	opioid growth factor receptor-like protein	Receptor
A0A0K3CRJ0	UV DNA damage endonuclease	Endonukleáza, hydroláza, nukleáza
A0A0K3CK84	Catalase	Oxidoreduktáza, peroxidáza
A0A0K3CBM8	Cation_ATPase_N domain-containing protein	Translokáza
A0A0K3CB46	Cyclin-like protein	Cyklin
A0A0K3CBS7	DNA repair protein RAD51 homolog	DNA-vazebný protein

A0A0K3CFP8	Dipeptidase	Dipeptidáza, hydroláza, proteáza
A0A0K3CL01	Elongation of fatty acids protein	Transferáza
A0A0K3CL85	FGENESH: predicted gene_13.100 protein	Transferáza
A0A0K3C9X7	FGENESH: predicted gene_2.703 protein	Ribonukleoprotein
A0A0K3CEC3	GPI ethanolamine phosphate transferase 2	Transferáza
A0A0K3CJF0	Holocytochrome c-type synthase	Lyáza
A0A0K3C9Y8	L-galactono-gamma-lactone oxidase	Oxidoreduktáza
A0A0K3CRE4	Mannosyltransferase	Transferáza
A0A0K3CBB3	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 5	Aktivátor
A0A0K3C608	Nrap protein-domain containing protein	RNA-vazebný protein
A0A0K3CLG8	Ste24 endopeptidase	Hydroláza, metaloproteáza, proteáza
A0A0K3CSH5	Uncharacterized protein	Oxidoreduktáza
A0A0K3CJR4	[RNA-polymerase]-subunit kinase	Kináza, serin/threonin-proteinkináza, transferáza

Tabulka 26: Molekulární funkce downregulovaných proteinů při C/N 150; 96 hod - C/N 13; 96 hod

Accession	Označení proteinu	Molekulární funkce
A0A0K3C7H7	AP2 associated kinase 1	Kináza, transferáza
A0A0K3CA32	Acyl-CoA N-acyltransferase	Acyltransferáza, transferáza
A0A0K3C948	Alpha/Beta hydrolase fold	Hydroláza
A0A0K3C8D8	putative cytochrome P450 monooxygenase	Monooxygenáza, oxidoreduktáza
A0A0K3CIC8	putative hydrolase	Hydroláza
A0A0K3C569	Thiol methyltransferase 1	Transferáza
A0A0K3CB08	Origin recognition complex subunit 4	DNA-vazebný protein
A0A0K3C6V0	Endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	Endonukleáza, exonukleáza, hydroláza, nukleáza
A0A0K3CK82	O-acetylhomoserine aminocarboxypropyltransferase	Transferáza
A0A0K3CFE5	subtilisin-like protease	Hydroláza, proteáza, serinová proteáza
A0A0K3CKB9	subtilisin-like protease	Hydroláza, proteáza
A0A0K3C7F1	catechol 1,2-dioxygenase	Dioxygenáza, oxidoreduktáza
A0A0K3CD23	(R,R)-butanediol dehydrogenase / diacetyl reductase	Oxidoreduktáza
A0A0K3CL65	GMP synthase	Transferáza
A0A0K3CCK1	aspartic proteinase	Hydroláza, proteáza
A0A0K3CNX0	peroxisomal 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase	Izomeráza
A0A0K3CM96	mitochondrial peroxiredoxin 6, 1-Cys peroxiredoxin	Antioxidant, peroxidáza

A0A0K3CBI3	BY PROTMAP: gi 647400408 emb CDR45830.1  RHTO0S11e05314g1_1 [Rhodosporidium toruloides](FGENESH: predicted gene_3.207)	Oxidoreduktáza
A0A0K3CCZ6	L-arabinose isomerase	Izomeráza
A0A0K3CL52	Beta-glucosidase	Glykosidáza, hydroláza
A0A0K3CPS2	Beta-glucosidase	Glykosidáza, hydroláza
A0A0K3C6Z7	Carboxylic ester hydrolase	Hydroláza, serinová esteráza
A0A0K3C9F1	Chitinase	Glykosidáza, hydroláza
A0A0K3CQM6	Exportin-T	RNA-vazebný protein
A0A0K3CA73	FGENESH: predicted gene_2.577 protein	Oxidoreduktáza
A0A0K3CMS1	Fe2OG dioxygenase domain-containing protein	Oxidoreduktáza
A0A0K3CCX7	Fumarylacetoacetase	Hydroláza
A0A0K3C8A5	Histone H2A	DNA-vazebný protein
A0A0K3CSI3	Long-chain-alcohol oxidase	Oxidoreduktáza
A0A0K3CEU3	Malic enzyme	Oxidoreduktáza
A0A061BDL3	Protein-serine/threonine kinase	Kináza, transferáza
A0A0K3C9T9	Ribonuclease T(2)	Endonukleáza, hydroláza, nukleáza
A0A0K3CPK1	Small RNA 2'-O-methyltransferase	RNA-vazebný protein, transferáza
A0A0K3CNT8	TauD domain-containing protein	Dioxygenáza, oxidoreduktáza
A0A0K3C8E0	Terpenoid cyclases/protein prenyltransferase alpha-alpha toroid	Prenyltransferáza, transferáza
A0A061AFY5	Transcription and mRNA export factor SUS1	Aktivátor, regulátor chromatinu
A0A0K3CNR1	zf-C2HE domain-containing protein	DNA-vazebný protein