

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Analýza fytopatogenů pomocí  
hmotnostní spektrometrie**

**Disertační práce**

**Jana Beinhauer**

**Olomouc 2015**

„Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala samostatně za použití citované literatury“

V Olomouci dne 23. 10. 2015

Jana Beinhauer

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji především svému školiteli prof. Mgr. Marku Šebelovi, Dr. za odborné vedení, veškeré cenné rady a připomínky, které mi poskytl, a také za trpělivost a čas, které mi během této práce věnoval. RNDr. Pavlovi Řehulkovi, Ph.D., z Ústavu molekulární patologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové, bych chtěla poděkovat za odborné konzultace, a taktéž za velice užitečné a hodnotné rady, informace a zkušenosti. Děkuji také Mgr. Martinu Rausovi, Ph.D. za odbornou pomoc v oblasti výpočetní techniky a všem pracovníkům Oddělení biochemie proteinů a proteomiky (CRH) a katedry biochemie PřF UP v Olomouci za jejich ochotu kdykoliv pomoci a poradit. Dále bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D., z Oddělení fytopatologie a mikrobiologie Katedry botaniky, PřF UP v Olomouci, která mi poskytla odborné informace, materiál a užitečné rady z oblasti biologie a fytopatologie houbových organismů, také paní Drahomíře Vondrákové a Věře Zoubkové a celému Oddělení fytopatologie a mikrobiologie Katedry botaniky, PřF UP v Olomouci, za pomoc při přípravě a pěstování biologického materiálu, rady a zkušenosti Rovněž Mgr. Aleně Hanzalové, Ph.D., z Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i. v Praze, děkuji za poskytnutý materiál a odborné informace v oblasti problematiky rzí (*Puccinia* spp.). Mé poděkování patří profesorovi Günterovi Allmaierovi za umožnění pobytu v podobě několika krátkodobých stáží, jež se uskutečnily v rámci Česko-rakouské vědecko-technické spolupráce na Institutu chemických technologií a analytiky Fakulty technické chemie Technické univerzity ve Vídni, kde jsem mohla provádět své analýzy na hmotnostním spektrometru Axima CFR<sup>+</sup> (Shimadzu Kratos Analytical). Nejen jemu, ale i doktorce Martině Marchetti-Deschmann, Dipl.-Ing. Michaele Helmel a celé jeho vědecké skupině bych chtěla poděkovat za ochotu vždy pomoci a poradit, zvláště pak za hodnotné rady a zkušenosti v oblasti hmotnostní spektrometrie intaktních mikroorganismů, které jsem během svého pobytu získala a mohla využít při experimentech ve své diplomové práci. V neposlední řadě děkuji i Kevinovi A. Schugovi, PhD., z Oddělení chemie a biochemie Texaské univerzity v Arlingtonu, jenž mi (za finanční podpory projektu ChempharmNet, CZ.1.07/2.4.00/31.0130) umožnil strávit v jeho vědecké skupině šest měsíců a nahlédnout do oblasti analýzy estrogenů pomocí hmotnostní spektrometrie (tedy oblasti odlišné od tématu mé práce). Děkuji za odbornou, ale i přátelskou pomoc, kterou mi během pobytu v USA poskytovali členové této vědecké skupiny. Nakonec bych chtěla poděkovat mé rodině, za lásku a podporu během celého studia, a přátelům za pozitivní energii.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Mgr. Jana Beinhauer (roz. Chalupová)
Typ práce	Disertační
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum; Katedra biochemie PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	prof. Mgr. Marek Šebela, Ph.D.
Konsultant	RNDr. Pavel Řehulka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	<p>Mikroskopické houby patří mezi nejrozšířenější rostlinné patogeny působící značné ekonomické ztráty zemědělských plodin. Jedná se o eukaryotní organismy patřící zejména do říše hub (Fungi) a dalších samostatných říší (Protista, Chromista, Myxomycota). Tradiční přístupy identifikací jsou časově, manuálně a finančně náročné, je třeba zkušených fytopatologů a značné množství vzorku. Tato práce se zabývá identifikací a proteomickou analýzou fytopatogenů, zvláště obligátních biotrofních parazitů jako jsou peronospor (říše Chromista, řád Peronosporales), padlí (říše Fungi, řád Erysiphales) a rzi (říše Fungi, řád Pucciniales) pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Analýza představuje jak metody přímého získávání unikátních peptidových/proteinových profilů desorbovaných přímo z povrchu intaktních buněk či spor (IC/IS) pomocí laserové desorpce/ionizace za účasti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) ve spojení s analyzátoři doby letu (time-of-flight, TOF), tak přístupy proteomické, kdy jsou proteiny extrahované ze spor blíže identifikované. Předchozí metoda vyvinutá pro identifikaci peronospor a padlí byla aplikována na další patogeny (rasy <i>Bremia lactucae</i>, <i>Blumeria graminis</i>, zástupce rodu <i>Botrytis</i>, rodu <i>Puccinia</i>). Analýza zahrnuje použití směsi kyseliny ferulové (FA) a sinapové (SA) v poměru 5:15 mg·ml<sup>-1</sup>, v roztoku acetonitrilu (ACN) a 2,5% kyseliny trifluoroctové (TFA) v objemovém poměru 7:3 (v/v). Získaná hmotnostní spektra rozšiřují dosavadní databázi o nové unikátní peptidové/proteinové profily. Následně jsme zjistili, že alternativní přístupy analýzy získávání MS profilů patogenů představující 1) smývání spor přímo z listu roztokem matrice a 2) otisk povrchu listu na oboustrannou lepicí pásku nebo na MALDI destičku, jež byly aplikovány u listu rajčete napadeného <i>O. neolycopersici</i>, urychlují metodu získání typických signálů přímo z povrchu listu, avšak skýtají jistá omezení,</p>

takže je nelze použít univerzálně na všechny patogeny.

S cílem najít markery infekce *B. lactucae* a *O. neolycopersici* bylo pomocí několika proteomických přístupů identifikováno 156 respektive 90 proteinů extrahovaných do roztoku matrice (ACN/2,5%TFA, 7:3, v/v). Signály ve fingerprintových spektrech byly ztotožněny s 12 respektive 8 proteiny. Většina z nich představuje ribosomální proteiny.

Protokol pro IC/IS MALDI MS rostlinných patogenů rodu *Puccinia* byl optimalizován na sporách *P. triticina*. Ty byly promývány v roztoku ACN/0.1% TFA (7:3, v/v), a suspendovány přímo ve směsi voda/roztok matrice (FA:SA, 5:15 mg·ml<sup>-1</sup> v ACN/2.5%TFA, 7:3, v/v) v objemovém poměru 1:1. Pro homogennější povrch kokystalů spor s matricí byla vybrána technika dvou vrstev (2LV). Protokol byl aplikován i na další druhy rzi a jejich izoláty, které jsme schopni pomocí programu BIOSPEAN rozlišit. Podobně jako v předchozím případě, byla provedena extrakce proteinů ze spor *P. graminis* a *P. striiformis*. Analýza odhalila 40 a 30 proteinů, z nichž bylo možno tři proteiny od každé rzi přiřadit ke třem signálům ve spektru. Tyto výsledky představují metodu pro identifikaci a rozlišení rostlinných patogenů a jejich fyziologických ras pomocí MALDI-TOF MS, poprvé také u rzi. Přítomnost charakteristických proteinových markerů by v budoucnu mohla usnadnit určování a charakterizaci houbových rostlinných patogenů.

Klíčová slova	fytopatogen, rzi, peronospora, padlí, optimalizace, identifikace, biotypizace, IC/IS MS (hmotnostní spektrometrie intaktních buněk nebo spor), marker
Počet stran	67
Počet příloh	3
Jazyk	Český

## Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Mgr. Jana Beinhauer (birth Chalupová)
Title	Phytopathogens analysis using mass spectrometry
Type of thesis	PhD. thesis
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research; Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	prof. Mgr. Marek Šebela
Consultant	Dr. Pavel Řehulka
The year of presentation	2015
Abstract	<p>This work deals with the identification and proteomic analysis of phytopathogens, especially obligate biotrophic parasites such as downy mildews (Kingdom Chromista, order Peronosporales), powdery mildews (Kingdom Fungi, order Erysiphales) and rusts (Kingdom Fungi, order Pucciniales) using mass spectrometry (MS). Analysis represents both the method of direct acquisition of unique peptide / protein profiles of intact cells/spores (IC/IS) matrix-assisted laser desorption / ionization (MALDI) in connection with time-of-flight analyzers (TOF) and proteomic approaches where detailed information about proteins extracted from spores is obtained. Following the previous work, the method developed for the identification of downy and powdery mildews was applied to other pathogens (<i>Bremia lactucae</i> races, <i>Blumeria graminis</i> races, representatives of <i>Botrytis</i> and <i>Puccinia</i> genus). This method comprising the use of MALDI matrix mixture containing ferulic acid (FA) and sinapinic (SA) in the ratio of 5:15 mg·ml<sup>-1</sup> in a solution of acetonitrile (ACN) and 2.5% trifluoroacetic acid (TFA) in a volume ratio of 7: 3 (v/v). The resulting mass spectra expand the database of unique peptide / protein profiles. Alternative approaches of MS analyses performed directly from plant material: 1) washing out the spores directly from the host leaf by matrix solution 2) imprinting the leaf surface on double-sided tape or directly on the MALDI plate were applied with a tomato leaf covered by <i>O. neolycopersici</i> spores. Although these alternative applications speedup method for obtaining the typical signals directly from leaf surface, they provide certain limitations. Thus we assumed that it cannot be applied universally to all pathogens.</p>

In order to find markers of infection from *B. lactucae* and *O. neolycopersici* spores several proteomic approaches were used and 156 respectively 90 proteins extracted in a solution matrix (ACN / 2.5% TFA, 7: 3, v / v) were identified. From them, 12 and 8 proteins were assigned to signals in fingerprint spectra, respectively. Most of them are represented by ribosomal proteins.

Protocol for IC/IS MALDI MS analysis of *Puccinia* genus plant pathogens was optimized on spores of *P. triticina*. They were washed in a solution of ACN / 0.1% TFA (7: 3 v / v) and directly suspended in water / matrix solution (FA: SA 5:15 mg·ml<sup>-1</sup> in ACN / 2.5% TFA, 7: 3, v / v) in a volume ratio 1: 1. For more homogenous surface of matrix-spores cocrystals two layers (2LV) technique was chosen. The protocol was applied to other species of rust fungi and their isolates which is possible to differentiate using BIOSPEAN. Like in the previous case, proteins were extracted from spores of *P. graminis* and *P. striiformis*. Analysis revealed 40 and 30 proteins of which three proteins were assigned to three signals in the spectrum in both pathogens. These results represent a method for identification and discrimination of plant pathogens and their physiological races by MALDI-TOF MS, for the first time for analysis of rusts. The presence of characteristic protein markers could facilitate the identification and characterization of fungal plant pathogens.

Keywords	phytopathogen, downy mildews, powdery mildews, rusts, optimization, identification, biotyping, IC/ISMS (intact cell/spore mass spectrometry), marker
Number of pages	67
Number of appendices	3
Language	Czech

## OBSAH

1.	ÚVOD .....	10
2.	ROSTLINNÉ PATOGENY .....	11
2.1.	Mykózy a jejich charakteristika .....	11
2.2.	Životní strategie a infekce hostitelské rostliny .....	12
3.	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE INTAKTNÍCH MIKROORGANISMŮ .....	13
3.1.	Analýza intaktních mikroorganismů pomocí ESI-MS .....	14
3.2.	Aplikace ambientních ionizačních technik pro detekci intaktních mikroorganismů .....	15
3.3.	Analýza intaktních mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS .....	17
3.3.1.	Analýza intaktních mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS .....	18
3.3.2.	Aplikace IC/IS MALDI-TOF-MS při analýze bakterií .....	21
3.3.3.	Využití MALDI-TOF-MS při analýze houbových organismů .....	22
4.	PROTEOMICKÉ PŘÍSTUPY PŘI CHARAKTERIZACI ROSTLINNÝCH PATOGENŮ .....	24
4.1.	Přínos proteomiky pro rozlišování druhů, kmenů a ras fytopatogenních mikroorganismů .....	26
5.	CÍLE PRÁCE .....	28
6.	PŘEHLED METOD .....	29
6.1.	Příprava vzorků spor studovaných patogenů .....	29
6.2.	MALDI-TOF MS intaktních spor .....	29
6.2.1.	Analýza IC/IS MALDI-TOF MS z povrchu listů hostitelských rostlin .....	31
6.2.1.1.	Smývání spor padlí z povrchu listu .....	31
6.2.1.2.	Otisk spor padlí z povrchu listu .....	31
6.2.2.	Optimalizace přípravy vzorku rzi ( <i>Puccinia</i> spp.) pro IC/IS MS .....	32
6.2.3.	Databáze a analýza dat z IC/IS MALDI-TOF MS .....	32
6.3.	Proteomická analýza fytopatogenů .....	33
6.3.1.	Analýza proteinů <i>B. lactucae</i> a <i>O. neolycopersici</i> pomocí hmotnostně-spektrometrických přístupů .....	33
6.3.2.	nanoLC-MALDI hmotnostní spektrometrie a MS/MS analýzy peptidů rzi .....	34
6.3.3.	Analýza dat .....	34
6.3.4.	Predikce buněčné lokalizace a funkční analýza proteinů .....	34
7.	VÝSLEDKY .....	36
7.1.	Výsledky zpracované ve formě rukopisu .....	36



7.1.1. Identifikace proteinů extrahovaných ze spor <i>Bremia lactucae</i> a <i>Oidium neolycopersici</i> během analýzy MALDI- TOF hmotnostní spektrometrie intaktních spor .....	36
7.1.1.1. Komentáře k výsledkům .....	40
7.1.2. MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie intaktních spor a proteomická analýza patogenních hub rodu <i>Puccinia</i> .....	41
7.1.2.1. Komentáře k výsledkům .....	44
7.2. Ostatní výsledky .....	46
7.2.1. Získávání peptidových/proteinových profilů z intaktních spor patogenů .....	46
7.2.2. Analýza IC/ISMS z povrchu listů hostitelských rostlin .....	48
7.2.2.1. Smývání spor padlí z povrchu listu.....	48
7.2.2.2. Otisk spor padlí z povrchu listu.....	49
7. 2. 3. Diskuze .....	50
8. ZÁVĚR .....	52
SEZNAM ZKRATEK.....	54
SEZNAM LITERATURY.....	55
ŽIVOTOPIS .....	64
Příloha 1 .....	i
Příloha 2 .....	ii
Příloha 3 .....	iii

#### SEZNAM PŘÍLOH:

**Příloha 1:** Chalupová J., Raus M., Sedlářová M., Šebela M. (2014) Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances* 32: 230-241.

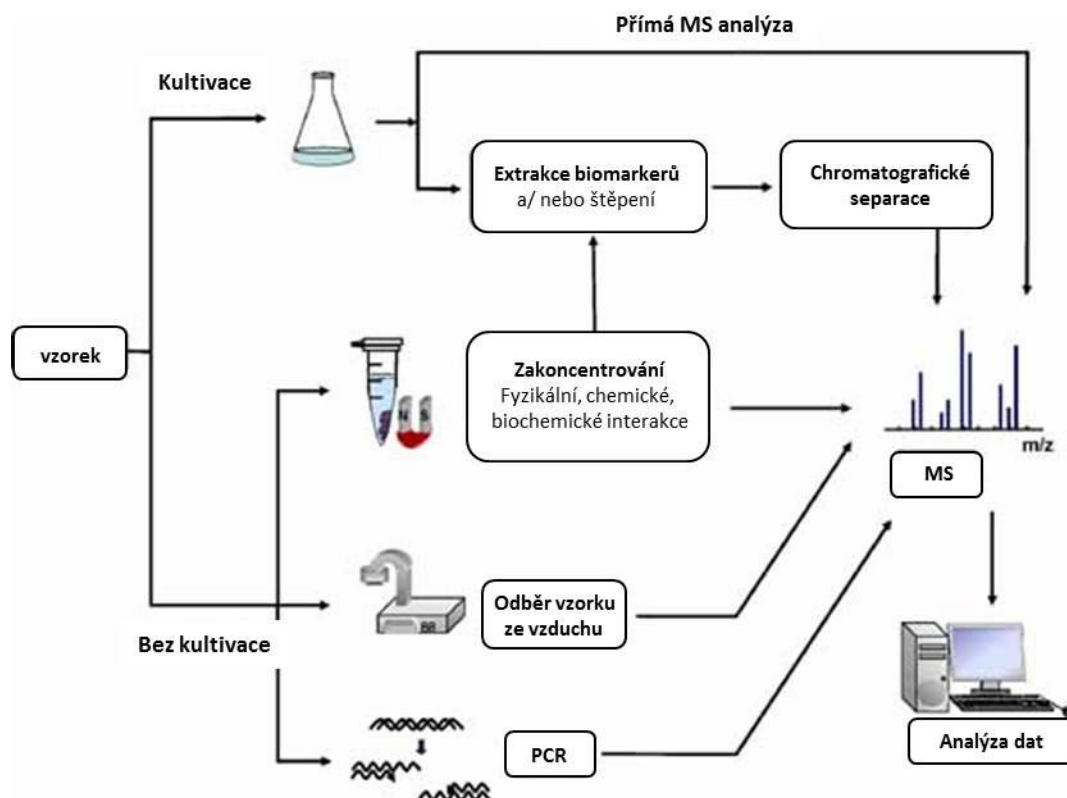
**Příloha 2:** Beinhauer J., Lenobel R., Loginov D., Chamrád I., Řehulka P., Sedlářová M., Marchetti-Deschmann M., Allmaier G., Šebela M. (rukopis článku v přípravě) Identification of *Bremia lactucae* and *Oidium neolycopersici* proteins extracted for intact spore MALDI mass spectrometry biotyping.

**Příloha 3:** Beinhauer J., Raus M., Hanzalová A., Horčíčka P., Šebela M. (rukopis článku v přípravě) Intact spore MALDI-TOF mass spectrometry and proteomic analysis of *Puccinia* pathogenic fungi.

## 1. ÚVOD

Včasná, jednoduchá a spolehlivá identifikace patogenních mikroorganismů je rozhodující pro zahájení efektivní léčby chorob. Přesná diagnostika pomocí klasických technik je mnohdy časově náročná a komplikovaná, zejména při analýze komplexních biologických vzorků. Přitom včasné rozpoznání původce může pomoci minimalizovat riziko nákazy a epidemické rozšíření nemoci. Hlavní požadavky na moderní metody vhodné pro identifikaci mikroorganismů je jejich robustnost, snadná manipulace se vzorky, nízká cena analýzy, rychlost a výkonnost. Většinu těchto požadavků splňuje hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry, MS), jakožto mocný nástroj biologických a chemických oborů, zvláště proteomiky, kde vedle stanovení přesných molekulových hmotností, určení sekvence či struktury látek, studia interakcí molekulových komplexů je atraktivní alternativou klasických molekulových či biochemických metod identifikace mikroorganismů (Demirev a Fenselau, 2008).

Vzorky patogenních mikroorganismů (bakterií, oomycet, mikromycet) různého původu mohou být analyzovány pomocí MS s využitím různých metod a technik. Obr. 1 popisuje schéma využití jednotlivých přístupů MS pro jejich identifikaci a charakterizaci. V případě, že jsme schopni si vzorek kultivovat či napěstovat, můžeme potenciální biomarkery analyzovat a charakterizovat buď přímou MS analýzou (tzv. analýza intaktních buněk či spor mikroorganismů neboli IC/IS MS, podrobněji popsáno níže) nebo prostřednictvím nástrojů proteomiky - extrakce, štěpení a separace s následnou identifikací pomocí MS. V případě, že nemáme čistou kulturu studovaných mikroorganismů, jelikož jsou součástí komplexní biologické matrice, je třeba si jej z této směsi zakoncentrovat pomocí různých afinitních metod založených na fyzikálních, chemických nebo biochemických interakcích, a následně taktéž využít identifikaci pomocí MS. Další možností je spojení hmotnostní spektrometrie s přímým odběrem vzorků ze vzduchu („air sampling“) nebo polymerázovou řetězovou reakcí (polymerase chain reaction, PCR). Neznámé mikroorganismy jsou poté identifikovány z databází pomocí vyhledávacích nástrojů nebo různých počítačových algoritmů. Výhody přímé analýzy intaktních mikroorganismů pomocí MS je hlavně rychlost a nenáročná příprava vzorku. V případě podrobnější analýzy mikrobiálních biomarkerů lze použít preparačních a frakcionačních metod, založených převážně na chromatografii a elektroforéze, kde daná příprava vzorku může celkovou analýzu zpomalit (Ho a Reddy, 2011)



**Obr. 1** Přehled přístupů identifikace a charakterizace mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie (upraveno podle Ho a Reddy, 2011)

## 2. ROSTLINNÉ PATOGENY

Mezi původce infekčních chorob rostlin patří houby, oomycety, prvoci, bakterie, fytoplazmy, viry, viroidy a virům podobné organismy, obecně označované jako fytopatogeny. K rozvoji choroby dochází vlivem narušení metabolismu hostitelské rostliny vyznačující se typickými makroskopickými a mikroskopickými příznaky. Největší podíl chorob hospodářsky významných rostlin představují mykózy, což jsou onemocnění způsobené houbami a houbám podobnými organismy, taxonomicky řazenými mezi do říší Protista či Chromista (Agrios, 2005).

### 2.1. Mykózy a jejich charakteristika

Zástupci hub a oomycet jsou z morfologického hlediska velice podobné – většina druhů vykazuje vláknitý růst v podobě mycelia, tvoří pohlavní a nepohlavní spory. Oomycety byly proto po dlouhá léta považovány za třídu spadající do říše hub. Základní rozdíly ve fyziologii, biochemii a genetice však brzy odhalily, že patří do odlišné větve fylogenetického stromu eukaryot. Na základě srovnání genů kódujících, mezi jinými, také malé ribozomální jednotky, aktin a tubulin, bylo prokázáno, že na rozdíl od hub, jež mají společného předka s živočišnou říší, mají oomycety

blíž k heterokontním řasám a jsou řazeny do samostatné říše Chromista; syn. Straminipili nebo Stramenopila (Baldauf *et al.*, 2000; Bhadauria *et al.*, 2009b)

Mezi důležité rozdíly morfologických a fyziologických znaků hub a oomycet patří složení buněčné stěny, rozdílné metabolické dráhy při syntéze lysinu, morfologie mycelia, ploidie a také citlivost na fungicidy. Houby jsou převážnou část svého životního cyklu haploidní nebo dikaryotické, zatímco oomycety jsou převážně diploidní. Mycelium u hub bývá přehrádkované, kdežto oomycety jej mívají nepřehrádkované. Buněčná stěna oomycet je složena z celulózy,  $\beta$ -1,3-glukanů a  $\beta$ -1,6-polyglukanů. Chitin ( $\beta$ -1,4-glukan), jenž je hlavní složkou buněčné stěny hub, byl detekován jen u několika oomycet v malém množství. Liší se také reakcí k běžným fungicidům, což je známkou rozdílných biosyntetických drah (Latijnhouwers *et al.*, 2003)

## 2.2. Životní strategie parazitů a průběh infekce hostitelské rostliny

Existují tři základní způsoby života parazitů na hostitelských rostlinách. Biotrofní parazité rostou a rozmnožují se pouze na živých hostitelských rostlinách. Živiny získávají díky blízkým interakcím s živými rostlinnými buňkami. Mezi takové parazity patří *Ustilago maydis* původce sněti kukuřičné. Řada biotrofů nemůže být pěstována na umělých médiích, takovýmito zástupcům, kteří obvykle tvoří specializované hyfy (haustoria) pro získání živin z rostliny, pak říkáme obligátní biotrofní parazité. Mezi ně patří například zástupci čeledí Peronosporaceae a Albuginaceae, tj. „pravých plísní“ řadící se do již zmiňované třídy Oomycetes, z hub potom zástupci padlí (řád Erysiphales), rzi (Uredinales), sněti (Ustilaginales), či známý původce námelu *Claviceps purpurea*. Pokud mikromycety netvoří haustoria a můžeme je pěstovat na živných médiích, patří mezi fakultativně biotrofní parazity, jako např. původce černě listů rajčat *Cladosporium fulvum*, který byl donedávna považován za nekrotrofa. Nekrotrofní druhy žijí na mrtvých rostlinných buňkách. Před osídlením rostlinného pletiva jej usmrtí. *Botrytis*, *Alternaria* jsou příklady houbových nekrotrofů, u oomycet jsou to například zástupci rodů *Pythium* a *Aphanomyces*. Hemibiotrofní parazité mají přechodný způsob života. Nejdříve navážou s hostitelskou rostlinou biotrofní vztah, ale následně rostlina v pokročilém stádiu infekce umírá a parazit pokračuje v růstu jako nekrotrof. Mezi tyto parazity patří například *Magnaporthe grisea*, napadající rýži, a další druhy spadající do rodů *Colleotrichum* a *Venturia*. Mezi oomycetami jsou to pak zástupci rodů *Pythium* a *Phytophthora* (Agrios, 2005).

Infekce patogena zahrnuje několik základních kroků. Začíná uchycením parazita na povrchu hostitelské rostliny, dále následuje vniknutí do hostitelského pletiva, množení, kolonizace a tvorba reprodukčních struktur. Pro udržení infekce je také důležitá odolnost patogena vůči hostitelskému imunitnímu systému a následnému poškození pletiv. Patogen využívá různé

mechanismy oklamání či zničení hostitelských buněk. Rozšíření infekce závisí na interakcích mezi faktory patogena a hostitele (Khan *et al.*, 2010)

Diagnostika původců rostlinných chorob pomocí klasických biologických metod využívá znalostí specifity interakce patogen-hostitel, symptomů hodnocených převážně mikroskopickými technikami, či molekulární biologie (Agrios, 2005). Výhody a nevýhody těchto metod v souvislosti s využitím nové metody identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie jsou shrnuty a diskutovány v přehledovém článku (Příloha 1).

### 3. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE INTAKTNÍCH MIKROORGANISMŮ

Schopnost zaznamenat biomarkerové ionty v širokém rozmezí hodnot  $m/z$ , jež jsou unikátní a reprezentativní pro určitý mikroorganismus tvoří v současné době základ pro využití hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii (Fenselau a Demirev, 2001). Tento přístup byl poprvé navržen v roce 1975, kdy Anhalt a Fenselau pomocí MS v kombinaci s pyrolytickou ionizací elektronem získali unikátní a charakteristická hmotnostní spektra pro odlišné druhy bakterií (Anhalt a Fenselau, 1975). Biomarkerové ionty představovaly v těchto experimentech ubichinony, menachinony a další převážně těžké látky s nízkou molekulární hmotností. V následujících letech přibývaly experimenty charakterizace mikroorganismů různými technikami MS spojených s pyrolýzou. Díky silné fragmentaci molekul však neposkytovaly tyto tvrdé ionizační techniky dostatek informací, které by umožnily podrobněji rozlišit jednotlivé rody uvnitř jednoho druhu mikroorganismů.

V 80. letech se spolu s příchodem nových ionizačně-desorpčních technik (desorpce plasmou; PD, laserová desorpce; LD, ionizace nárazem rychlých atomů; FAB) začaly vyvíjet další přístupy identifikace mikroorganismů (Heller *et al.*, 1987b). Značné úspěchy byly zaznamenány například s technikou FAB, kde bylo možno z lyofilizovaných buněk bakterií detekovat polární lipidy a molekuly v rozmezí molekulových hmotností 600 – 1000 Da (Heller *et al.*, 1987a). Přestože se již mluví o takzvaných měkkých ionizačních technikách, stále zde dochází k částečným fragmentacím analytů a velké molekuly jako proteiny dosud nebylo možno pomocí těchto technik zaznamenat.

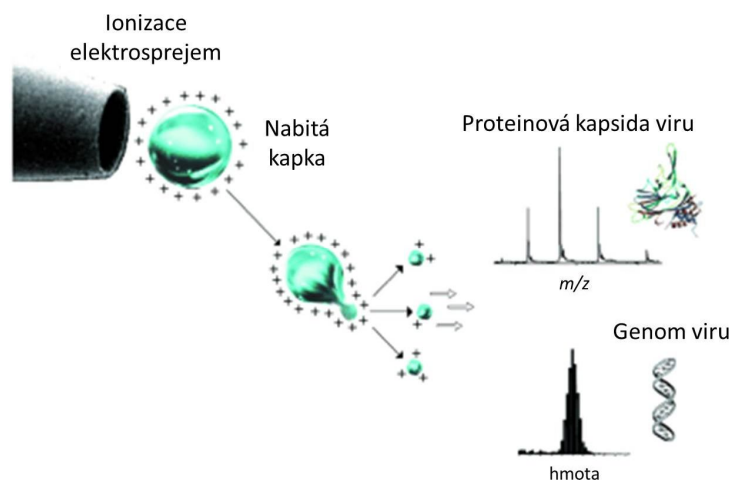
Velký pokrok při identifikaci intaktních mikroorganismů nastal s vývojem nových měkkých ionizačních technik. Zvláště ionizace elektrosprejem („electrospray ionization“, ESI) a laserová ionizace a desorpce za účasti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization“, MALDI) jsou doposud nejčastěji využívanými technikami. Při analýze intaktních mikroorganismů umožňují desorpci/ionizaci jak nízkomolekulárních, tak vysokomolekulárních látek, a tedy i proteinů jako hodnotných biomarkerů (Claydon *et al.*, 1996; Despeyroux *et al.*, 1996; Goodacre *et al.*, 1999; Holland *et al.*, 1996; Krishnamurthy *et al.*, 1996; Siuzdak *et al.*, 1996; Vaidyanathan *et al.*, 2001).

Další alternativu analýzy přímé ionizace vzorku intaktních mikroorganismů přinesl vývoj takzvaných ambientních technik. Pracují za atmosférického tlaku a vzorek je během analýzy zcela přístupný okolí, jelikož se nevkládá přímo do přístroje a není třeba jakkoliv jej upravovat (Demirev a Fenselau, 2008).

### **3.1. Analýza intaktních mikroorganismů pomocí ESI-MS**

Ionizace elektrosprejem je založena na principu tvořit ionty analytů v plynné fázi přímo z roztoku (Yamashita a Fenn, 1984). Schopnost převést proteiny a nukleové kyseliny do plynné fáze byl jeden z hlavních důvodů pro analýzu intaktních částic viru pomocí ESI-MS (Bothner a Siuzdak, 2004).

Tato technika byla poprvé použita k charakterizaci proteinů intaktních kapsidových částic viru *CrPV* (*cricket paralysis virus*) infikujícího bezobratlé, potenciálně se řadího mezi zástupce čeledi Picornaviridae (Despeyroux *et al.*, 1996). Pomocí tří identifikovaných kapsidových proteinů (VP1, VP2, VP3) a porovnáním s lidskou podobou virálních kapsidových proteinů VP4 bylo potvrzeno jeho správné zařazení. Další studie se poté zabývaly testováním limitů ionizace elektrosprejem spojených s analýzou intaktních částic viru. Bothner a Siuzdak v několika pracích shrnuli analýzu intaktních virových částic pomocí ESI-MS a popisují studium supramolekulárních virových komplexů, nativních struktur biomolekul, charakterizace virálních proteinů, sledování dynamiky virálních kapsid (Bothner a Siuzdak, 2004; Siuzdak *et al.*, 1996), jež velice usnadní charakterizaci a studium virových populací a mohou jednodušeji sledovat rychlé evoluční změny. První aplikace ESI-MS k charakterizaci intaktních gramnegativních a gram pozitivních bakterií byla popsána skupinou Goodacre *et al.* (1999). Z analýzy byla potvrzena možnost rozlišení bakterií na poddruhové úrovni. Další studie podobně popisuje analýzu aerobních bakterií tvořících endospory rodu *Bacillus* a *Brevibacillus* pomocí ESI-MS po přímém nástřiku celé suspenze intaktních spor bez předešlé separace. Posléze byla potvrzena i vysoká podobnost spektra intaktních buněk se spektry lyzátů (Vaidyanathan *et al.*, 2001). V obou zmíněných případech analýzy intaktních bakterií pomocí ESI-MS je důležitým faktorem napětí vkládané na vstupní kapiláru v iontovém zdroji, a tedy jeho optimalizace na daný vzorek, jelikož volba napětí velice ovlivňuje spektrální informace (Goodacre *et al.*, 1999; Vaidyanathan *et al.*, 2001).



**Obr. 2** Ionizace elektrosprejem (ESI) umožňuje analýzu virálních proteinů i genetického materiálu. Schopnost ESI generovat intaktní mnohonásobně nabitě ionty v plynné fázi vedla k analýze virálních proteinů a nukleových kyselin (upraveno podle Bothner a Siuzdak, 2004)

Výhodou vzniku několikanásobně nabitých molekul je přesnější určení molekulových hmotností, také lze kombinovat ESI-MS s různými separačními technikami. Přestože tyto předchozí práce potvrzují možnost využití metody ESI-MS pro intaktní mikroorganismy, stále zde převládá požadavek na rychlou nenáročnou techniku s jednoduchou interpretací dat. Nutnost dekonvoluce spekter mnohonásobně nabitých iontů a citlivost na soli a detergenty lehce znemožňuje rychlou analýzu, navíc, tendence ucpávat zařízení elektrospreje suspenzí intaktních spor či buněk taktéž znevýhodňuje tuto metodu (Demirev a Fenselau, 2008; Fenselau a Demirev, 2001; Kemptner *et al.*, 2009b).

### 3.2. Aplikace ambientních ionizačních technik pro detekci intaktních mikroorganismů

V souvislosti s analýzou intaktních mikroorganismů lze zmínit například desorpční electrospray (DESI), který využívá kombinace desorpce iontů se sprejovacími technikami. Lze pracovat s pevným i kapalným vzorkem bez nutnosti použití matrice či úpravy vzorku, jež se umístí na terčík ze skla nebo teflonu. Povrch analytu je sprejován proudem nabitých kapek a iontů sprejovací kapaliny. Takto vznikají sekundární ionty analytu, jež jsou desorbovány ze sprejovaného povrchu a unášeny do hmotnostního analyzátoru skrz vstupní kapiláru (Takáts *et al.*, 2004). Vedle peptidů, proteinů a farmaceutických látek byly pomocí DESI-MS analyzovány i bakterie. Charakteristická hmotnostní spektra, zahrnující převážně ionty mastných kyselin, byla získána přímou analýzou buněk bakterií třech kmenů *Escherichia coli* (DH10B, JM109 a XL1-Blue) a dvou kmenů *Salmonella typhimurium* (TL212 a LT1). Díky získání reprodukovatelných spekter se potvrdila schopnost rozlišit tyto bakterie na poddruhové úrovni (Song *et al.*, 2009)

Podobně, Meetani a spol. (2007) popsali využití DESI-MS pro detekci, charakterizaci a diferenciaci sedmi bakteriálních druhů (*Bordetella bronchiseptica*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* a *Staphylococcus aureus*). Aplikace DESI-MS byla provedena taktéž jako *in vivo* experiment na intaktním povrchu *B. subtilis* rostoucího přímo na agarovém médiu (Song *et al.*, 2009). Přestože výhodou DESI-MS techniky je nenáročná příprava vzorku a analýza přímo z povrchu studovaného materiálu, je vhodná spíše pro analýzu nízkomolekulárních látek. V případě analýzy proteinů je třeba vzorek upravit a příprava vzorku je tudíž náročnější (Lu *et al.*, 2014).

Další z ambientních technik, která byla poprvé aplikována k analýze bakteriálních profilů esterů mastných kyselin (Pierce *et al.*, 2007), je přímá analýza v reálném čase („direct analysis in real time“, DART). Umožňuje analýzu povrchů jak v plynné, kapalně, tak i v pevné fázi bez nutnosti jakkoliv vzorek předem upravovat. Proces ionizace zahrnuje interakci mezi excitovanými atomy plynu (helium, neon, dusík) a molekulami analytu, kdy v případě přenosu energie z excitované molekuly dusíku či neonu na molekulu analytu vzniká nejčastěji kation radikál ( $M^{+*}$ ) nebo při použití helia jako ionizačního plynu zprostředkovávajícího ionizaci molekul vody za vzniku protonovaných klastrů, které poskytnou proton molekule analytu za tvorby  $[M+H]^+$  (Cody *et al.*, 2005). Ve spojení s analyzátozem doby letu (time-of-flight, TOF) byla tato technika použita ke studiu intaktních buněk bakterií *Coxiella burnetii*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* v roce 2007 (Pierce *et al.*, 2007).

Ambientní alternativou ionizace MALDI ve vakuu je MALDI za podmínek atmosférického tlaku (AP-MALDI). Byla vyvinuta a patentována v roce 1999 (Laiko a Burlingame, 1999). Od ionizace za vysokého vakua se v mnoha směrech výrazně neliší (povaha matrice, poměry množství matrice k analytu, příprava vzorku, hustota laserového paprsku, povrch MALDI destičky). Oba přístupy jsou založeny na procesu tvorby plynné fáze analytu vznikající po laserové desorpční ionizaci vzorku v pevném stavu. U AP-MALDI je však ionizace vzorku ovlivněna a doprovázena dalšími, s atmosférickým tlakem souvisejícími, reakcemi (termalizace vibračně excitovaných iontů, ion-iontové a ion-molekulové interakce), a tudíž může být tato fáze prodloužena. Výhody AP-MALDI spočívají v kompatibilitě s komerčně dostupnými hmotnostními spektrometry, a podobně, tak jako předchozí jmenované ambientní techniky, manipulace se vzorkem a MALDI analýza jsou umožněny za normálních podmínek atmosférického tlaku (Laiko *et al.*, 2000). Aplikace AP-MALDI ve spojení s iontovou pastí byla prokázána při analýze cyklických lipopeptidů, jakožto biomarkerů lyofilizovaných spor a kultur bakterie rodu *Bacillus globigii* (BG). Výzkum byl dále rozšířen o studium aerosolů BG spor sbíraných přímo z ovzduší, následně přichycených na oboustrannou lepicí pásku na MALDI destičce (Madonna *et al.*, 2003). Snadnější přístup a manipulace se vzorkem má především pro studium intaktních mikroorganismů přítomných

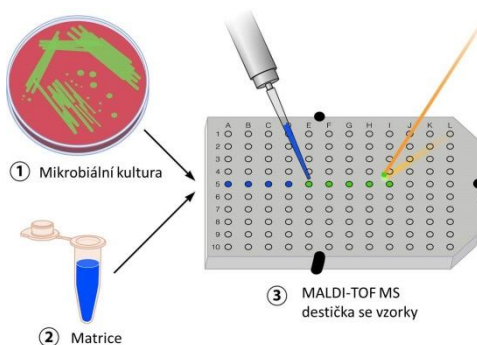


v ovzduší důležitá opodstatnění a skýtá možnost propojení MS s kolektory a přístroji k jejich zachycení přímo ze vzduchu a následné zakoncentrování přímo na MALDI destičku (Laiko *et al.*, 2000).

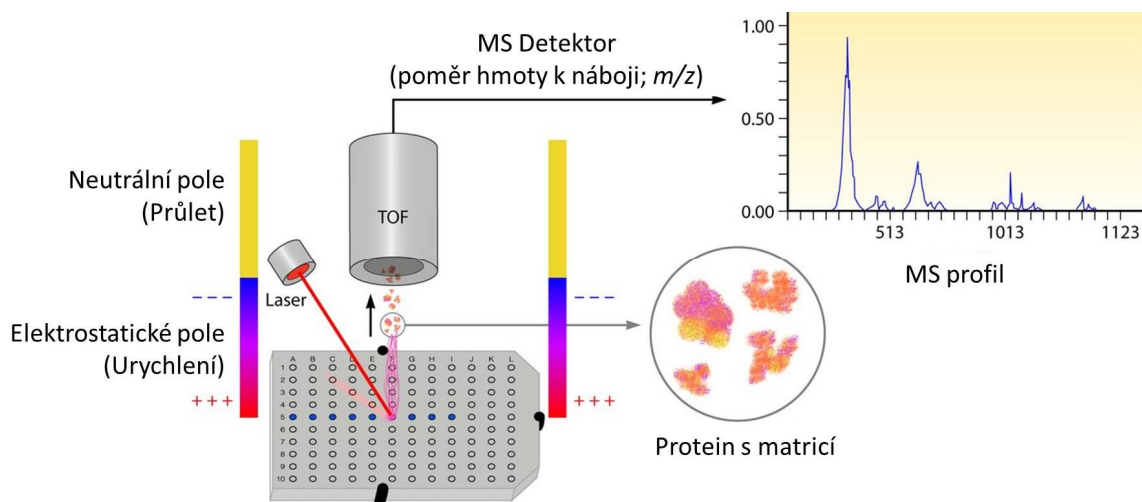
### 3.3. Analýza intaktních mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS

Doposud nejrozšířenější ionizační technikou využívanou pro analýzu intaktních mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie je MALDI (Demirev a Fenselau, 2008). Při ionizaci dochází většinou k tvorbě jednorázově nabitých iontů, a ve spojení s průletovými analyzátoři doby letu („time-of-flight“, TOF) lze dosáhnout širokého rozmezí hodnot  $m/z$ . Navíc je tato technika tolerantní k solím a detergentům, což usnadňuje přípravu vzorku představujícího převážně suspenzi intaktních spor či buněk mikroorganismů bez nutnosti předešlé úpravy vzorku zahrnující lýzi, extrakci či separaci biomolekul. Přímé profilování je pak založeno na porovnávání specifických hmotnostních spekter proteinů, peptidů a jiných komponent buněk mikroorganismů (Cain *et al.*, 1994; Fenselau a Demirev, 2001).

Princip analýzy pomocí MALDI-TOF MS spočívá v nanesení suspenze intaktních buněk či spor spolu s roztokem matrice na destičku či nosič (Obr. 3). Matrice bývá v nadbytku a představuje slabou organickou kyselinu absorbující UV-zářeni. Během vysušení vznikají kokrystaly matrice se vzorkem. Po vložení destičky do hmotnostního spektrometru, kde je udržováno vakuum, je vzorek vystaven krátkým impulsům laseru, jehož energie umožní odpaření a matrice nesoucí vzorek a zprostředkovává jeho ionizaci. Na základě své hmotnosti a náboje jsou pak ionty dále urychleny v elektrickém poli (Obr. 4) skrz průletovou trubici až k detektoru (Wieser *et al.*, 2012).



**Obr. 3** Schématické znázornění identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS intaktních buněk či spor. Bakterie, kvasinky či houby jsou odebrány z živného média a nanášena přímo na MALDI destičku. Vzorky jsou převrstveny roztokem matrice a vysušeny. Destička je následně vložena do MALDI-TOF MS přístroje a vzorek je analyzován pomocí příslušného softwaru pro identifikaci mikroorganismů (upraveno dle Clark *et al.*, 2013).



**Obr. 4.** Schématické znázornění MS analýzy ionizovaných intaktních mikroorganismů. Vzorek na MALDI destičce je bombardován laserem, což způsobí desorpci a ionizaci matrice nesoucí analyt. Vzniklé ionty jsou urychlovány do průletové trubice a tam rozděleny na základě jejich poměru hmoty k náboji ( $m/z$ ). Na základě získaných  $m/z$  hodnot je generováno MS spektrum představující specifický MS profil mikroorganismu, jež je následně porovnávám s referenčními spektry v databázi (upraveno dle Clark *et al.*, 2013).

### 3.3.1. Důležité aspekty při přípravě vzorku pro IC/IS MALDI-TOF-MS

Obecně, pro všechny aplikace MALDI techniky je příprava vzorku důležitá pro optimální citlivost, reprodukovatelnost a přesnost určení hmotnosti. Při charakterizaci intaktních mikroorganismů je třeba ještě navíc narušit nebo rozrušit jejich buněčnou stěnu. V tomto případě se buď k suspenzi buněk či spor ještě před samotnou aplikací matrice nebo přímo do roztoku matrice často přidávají silné organické kyseliny (Fenselau a Demirev, 2001), například kyselina octová (Thomas *et al.*, 1998), trifluoroctová, TFA (Karty *et al.*, 1998; Ryzhov *et al.*, 2000; Scholl *et al.*, 1999) nebo mravenčí, FoA (Madonna *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1998). Přidavek kyseliny je také logický krok při měření v pozitivním módu pro zvýšení ionizační účinnosti a obecně zlepšuje rozpustnost, a tudíž i samotnou extrakci proteinů do roztoku. Skoro 70 % publikací popisuje použití 0,1% (v/v) TFA jako přídavek ke vzorku, k roztoku matrice nebo k oběma (Šedo *et al.*, 2011). Organická rozpouštědla jako methanol, ethanol, isopropanol a acetonitril (ACN) jsou dalším častým aditivem k roztoku matrice. Většinou pozitivně ovlivňují intenzitu signálů ve spektru (Fenselau a Demirev, 2001; Šedo *et al.*, 2011). Mnohdy je velice důležité nalézt vhodný poměr kyseliny a rozpouštědla přítomných v roztoku matrice. Ve většině optimálních případů pak převažuje přítomnost ACN, který je výjimečný pro svou schopnost dobře rozpouštět jak matici, tak uvolněné proteiny a peptidy (Šedo *et al.*, 2011).

Kvalitu získaných výsledků ovlivňuje i výběr vhodné matrice a technika nanášení vzorku s matricí na MALDI destičku. Homogenní povrch kokystalů má pozitivní vliv na reprodukovatelnost a rozlišení získaných MS spekter (Fenselau a Demirev, 2001; Šedo *et al.*, 2011). Mezi nejčastěji používané matice patří kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA), kyselina sinapová (SA), kyselina dihydroxybenzoová (DHB), kyselina ferulová (FA), v některých případech také kyselina 3,4-dihydroxyskořicová, respektive kávová (CA), 5-chloro-2-merkaptobenzothiazolu (CMBT), 2-merkaptobenzothiazolu (MBT), kyselina [2-(4-hydroxyphenylazo)]benzoová (HABA) (Fenselau a Demirev, 2001; Chalupová *et al.*, 2014; Šedo *et al.*, 2011).

CHCA je matrice využívaná zvláště pro peptidy a malé proteiny a více než v polovině prací zabývajících se MALDI-TOF profilováním bakterií byla použita. Obvykle je zmiňována v porovnání s jinými matricemi v případech lepší citlivosti (Keys *et al.*, 2004; Ruelle *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1998) a vyššího počtu detekovaných signálů v oblasti nižších hodnot  $m/z$  (Elhanany *et al.*, 2001; Horneffer *et al.*, 2004; Nilsson, 1999; Ruelle *et al.*, 2004; Ryzhov a Fenselau, 2001; Shaw *et al.*, 2004; Vargha *et al.*, 2006). Naopak nevýhody byly shledány v souvislosti s nižším rozlišením signálů v porovnání s jinými matricemi (Nilsson, 1999), zvýšenou mírou rozšířených píků (Ramirez a Fenselau, 2001) nebo nedostatkem signálů v rozmezí vyšších hodnot  $m/z$  (Dieckmann *et al.*, 2008; Madonna *et al.*, 2000; Meetani a Voorhees, 2005). Naopak autoři některých prací, jež porovnávaly CHCA s jinými matricemi, zaznamenaly pravý opak, tj. větší rozlišení signálu (Jones *et al.*, 2003) nebo detekci signálů ve vyšších oblastech  $m/z$  (Williams *et al.*, 2003).

Druhou často používanou matricí v oblasti profilování intaktních bakterií pomocí MALDI-TOF MS je SA. Ze všech prací je upřednostňována ve 25 procentech, jelikož je zdůrazňován její potenciál lepší ionizace látek relativně vyšších molekulových hmotností (Moura *et al.*, 2008; Ryzhov a Fenselau, 2001; Shaw *et al.*, 2004). Nejlepší poměr signálu k šumu a intenzitu mezi testovanými matricemi zaznamenali Ochoa a Harrington (2005). Kvalitu spekter v souvislosti s nízkým výskytem rozšiřování signálů (Ramirez a Fenselau, 2001), vyšší přesnost naměřené hmoty a reprodukovatelnost díky homogennímu povrchu vzorku (Vaidyanathan *et al.*, 2001) nebo rozlišení signálu (Jones *et al.*, 2003) jsou klady této matrice.

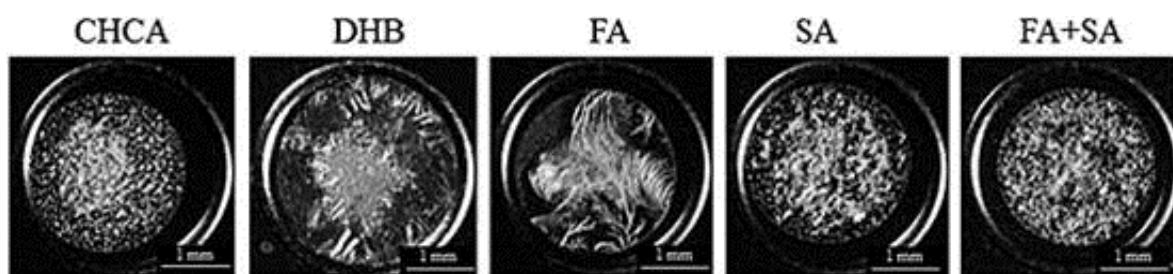
DHB je obecně brána za univerzální matrici. O její aplikovatelnosti v bakteriálním profilování lze však polemizovat. Zhruba 10 procent autorů jí preferuje, jiní však zmiňují velice slabou detekci peptidových/proteinových signálů (Ruelle *et al.*, 2004; Vargha *et al.*, 2006). Jiní vytýkají nízkou homogenitu vzorku (Dieckmann *et al.*, 2008; Horneffer *et al.*, 2004), nízkou citlivost (Wang *et al.*, 1998) nebo neschopnost ionizovat vysokomolekulární látky (Dieckmann *et al.*, 2008; Meetani a Voorhees, 2005).

Kyselina ferulová (FA) byla poprvé zmíněna Nilssonem (1999), později Madonnou a spol. (2000), kteří popisují u této matrice schopnost ionizovat látky o vyšší molekulové hmotnosti.

Nilsson (1999) vyzdvihl dobré rozlišení signálu a reprodukovatelnost. Madonna a spol. (2000) pozorovali lepší poměr signálu k šumu. Této matrici je naopak vytýkána tvorba nehomogenního povrchu kokystalů (Ruelle *et al.*, 2004; Vaidyanathan *et al.*, 2001) a nízká intenzita signálů (Keys *et al.*, 2004; Ruelle *et al.*, 2004).

Vedle těchto nejčastěji používaných matric, je řada dalších, které byly pro bakteriální profilování testovány. Například Evason, Claydon a Gordon (2001) vyvinuli dva rozdílné protokoly pro přípravu vzorku gram pozitivních a gramnegativních bakterií, kde v prvním případě doporučují použít CMBT, kdežto v druhém případě je vhodnější matrice CHCA. Tyto výsledky dobře korespondovaly s prací Keys a kolektivu (2004).

Snaha o získání výsledků co nejvyšší kvality dovedla některé vědecké skupiny k možnosti spojit pozitivní vlastnosti jednotlivých matric dohromady. Různé vzájemné kombinace HABA, MBT a 2',4'-dihydroxyacetofenon (DHAP) byly porovnány pro analýzu extraktu *E. coli* (Domin *et al.*, 1999). Jiné kombinace matric CHCA, FA a SA byly hodnoceny při optimalizaci a vývoji metody pro identifikaci peronospor a padlí (Chalupová *et al.*, 2012). V práci Helmel a spol. (2014) byla pro analýzu intaktních buněk mycelií plísně *Penicillium chrysogenum* směs matric FA a SA o koncentracích 2,5 a 22,5 mg·ml<sup>-1</sup> shledána jako optimální kombinace (Obr. 5). Vznikající směsné kokystal analytu a matrice pozitivně ovlivnily homogenitu povrchu, a tudíž i reprodukovatelnost poměr signálu k šumu (Domin *et al.*, 1999; Helmel *et al.*, 2014; Chalupová *et al.*, 2012). V obou posledních případech se jednalo o studium intaktních buněk mikroskopických hub, zástupců eukaryot, a tudíž i vývoj a aplikace MALDI-TOF MS intaktních buněk plísní se v některých případech liší od bakteriálních. Tato problematika týkající se analýzy intaktních buněk mikroskopických hub je podrobněji diskutována v přehledovém článku (Příloha 1).



**Obr. 5.** Mikroskopické obrázky krystalů vytvořených kokrytalizací různých typů matrice se suspenzí spor (zleva doprava: CHCA, DHB, FA, SA a binární směs matric FA+SA). Aplikace na MALDI destičku s nerezovým povrchem (převzato z Helmel *et al.*, 2014).

Způsob nanášení matrice a suspenze spor patří mezi další faktory ovlivňující výsledky analýz. Mezi nejčastěji používané techniky patří vysušená kapka („dried-droplet“, DD), smíšené objemy („mixed-volume“, V), sendvičová metoda, metoda dvou vrstev („two-layer“, 2LV) (Dong

*et al.*, 2009; Kemptner *et al.*, 2009a; Vaidyanathan *et al.*, 2002). Stejně, tak jako v případě kombinace dvou a více matric je cílem získat homogenní povrch a kvalitní spektra o vysoké reprodukovatelnosti, rozlišení a poměru signálu k šumu. Díky velké komplexitě a různorodosti studovaných mikroorganismů je tedy třeba hledat optimální podmínky pro konkrétní analýzu.

Z důvodu velkého významu bakterií v oblasti medicíny, národní bezpečnosti či potravinovém průmyslu, byla převážná část studií zpočátku zaměřena na optimalizaci metody pro analýzu bakteriálních buněk. Postupně se od těchto metod začaly rozvíjet aplikace na další, eukaryotní organismy.

### **3.3.2. Aplikace IC/IS MALDI-TOF-MS při analýze bakterií**

Tato rychlá, citlivá a jednoduchá metoda může v souvislosti s charakterizací bakterií představovat různé oblasti využití (Dalluge, 2000; Lay Jr., 2000; Sporns a Wang, 1998). První studie Caina, Lubmana a Webera (1994) či Hollanda a kolektivu (1996) prokázaly schopnost MALDI-TOF MS poskytovat bakteriální fingerprint („otisk prstu“). Později se tato metoda stává slibným nástrojem k identifikaci bakterií například v klinických laboratořích. Chen a kolektiv (2000) popsali použití MALDI-TOF MS ke „screeningu“ bakteriální kontaminace při výrobě léčiv. Rychlá analýza bakteriálních kultur může také přispět k bezpečnější ochraně a kontrole potravin (Fedele *et al.*, 1999; Holland *et al.*, 2000). Na základě monitorování biomarkerů intaktních buněk patogena *Staphylococcus aureus* bylo navrženo rozlišování kmenů, jež jsou rezistentní nebo citlivé na jistá léčiva (Edwards-Jones *et al.*, 2000). Rychlý screening může navíc usnadnit práci v oblasti lékařské a veterinární diagnostiky. Například Haag a kolektiv (1998) popsali rychlou charakterizaci kmenů bakterií rodu *Haemophilus*. U pacientů byli schopni určit, zda s touto infekcí pacienti již do nemocnice přišli nebo je získaná teprve v nemocnici. V posledních letech byla publikována referenční spektra mnoha klinicky významných mikroorganismů (Lynn *et al.*, 1999; Nilsson, 1999; Winkler *et al.*, 1999). Nedávné studie potvrdily užitečnost MALDI-TOF MS přístupu pro identifikaci velké sady bakteriálních izolátů představujících klinické patogeny. Například Degand a kolektiv (2008) byli schopni správně zidentifikovat 549 z 559 bakteriálních vzorků izolovaných od pacientů s cystickou fibrózou na úrovni druhu a 9 na úrovni rodu. Vzorky byly porovnány s databází zahrnující MALDI-MS profily 58 referenčních kmenů. Na základě těchto a dalších prací se postupně vyvíjejí identifikační systémy založené na hmotnostní spektrometrii, jež alespoň částečně nahrazují metody metabolického profilování a metody biochemické (Cherkaoui *et al.*, 2010; Seng *et al.*, 2009; van Veen *et al.*, 2010). Díky širokému přijetí a ocenění významu tohoto nástroje, je vše ještě podporováno udílením oficiálních akreditací a certifikací pro MALDI-TOF identifikační systémy v diagnostice bakterií (Burak *et al.*, 2010). Identifikační protokoly byly validovány v mnoha laboratořích. Přístupnost této metody by mohla být postupně rozšiřována i díky

účinnějšímu zautomatizování přípravy vzorků (Lange *et al.*, 2008) a identifikace pomocí MALDI-TOF MS by mohla být začleněna k existující laboratorní rutině.

Zvláštní potenciál lze vidět také v mikrobiologii životního prostředí. Doposud však existují jisté limity, které toto využití omezují. Budoucí aplikace MALDI-TOF MS v mikrobiologii bude záviset na rozšíření databází pro oblasti veterinární medicíny, bezpečnosti potravin, průmyslové mikrobiologie, úpravy pitné vody, farmakologie či rostlinné patologie.

### **3.3.3. Využití MALDI-TOF-MS při analýze houbových organismů**

#### **Identifikace houbových mikroorganismů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (Příloha 1)**

Skupina eukaryotických mikroorganismů jako plísně, rzi, kvasinky je obecně označována jako mikroskopické houby. Široká škála těchto zástupců jsou důležitými producenty enzymů, organických látek, léčiv, antibiotik. Mnoho z nich naopak produkuje škodlivé toxiny způsobující nemoci lidí a zvířat. Negativní dopad na zemědělství mají také rostlinné patogeny (Bennett, 1998; Bills, 2004; Santos *et al.*, 2010). V souvislosti s detekcí mykóz postihující lidi, zvířata i rostliny a identifikací původce těchto chorob jsou v současné době standardní biologické metody v některých případech nedostačující. Na základě výsledků a zkušeností získaných při identifikaci bakterií byla IC/IS MALDI-TOF MS také zavedena pro diferenciaci mikroskopických hub. Na rozdíl od bakterií jsou buňky houbových organismů větší, a jejich buněčná stěna je pevnější. Převážně obsahuje glukany a chitin (v případě zástupců říše hub) či glukany a celulosu (v případě oomycet) nebo mannoproteiny (v případě kvasinek) (Carlile a Watkinson, 2001). Vzhledem k rozdílům od prokaryotických bakterií a celkové různorodosti této velké skupiny je třeba vyvinout modifikované přístupy zaměřující se na přípravu vzorku, výběr vhodné matrice, techniky nanášení a další kroky spojené s identifikací intaktních buněk či spor pomocí MALDI-TOF MS. Problematika MALDI-TOF MS analýzy vláknitých hub je popsána v přehledovém článku Santose a kolektivu (2010), který však nepokrývá studium a charakterizaci kvasinek. Havlíček a kolektiv (2013) shrnuli současné využití hmotnostní spektrometrie v diagnostice mikroorganismů se zaměřením na přístrojové vybavení. Využití MALDI-TOF MS pro analýzu hub v klinických mikrobiologických laboratořích podrobně popisují dvě publikace z roku 2013 (Clark *et al.*, 2013; Posteraro *et al.*, 2013). Doposud však nikde nebyly zmínky o aplikacích a využití této metodiky v jiných odvětvích. Tento přehledový článek je tudíž zaměřen na MALDI-TOF MS identifikaci mikroskopických hub v různých oblastech vědy a diagnostiky. Práce krátce pojednává o standardních biologických metodách určování plísní a houbových mikroorganismů, kde taktéž zmiňuje jejich jistá úskalí a omezení, jež otevírají prostor pro využití hmotnostně-spektrometrických strategií. Počátek vývoje

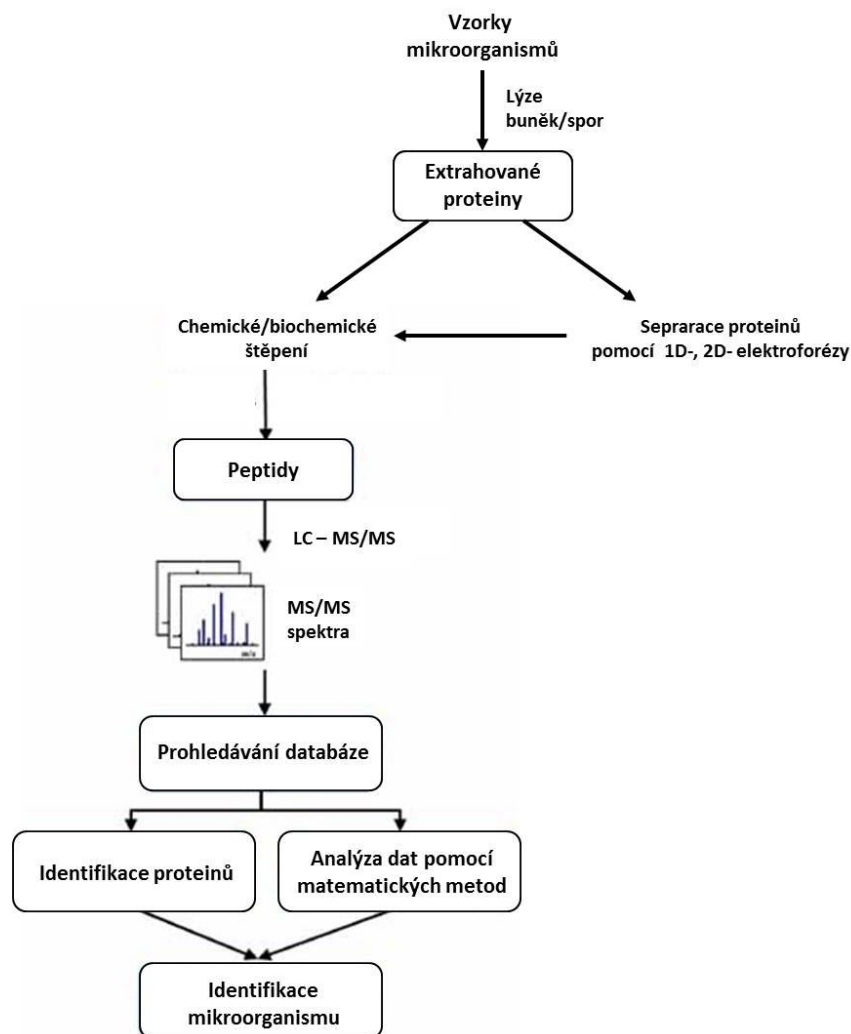
metodiky IC/IS MALDI-TOF MS pro houbové mikroorganismy je spojován s rokem 2000, kdy se objevují první experimenty spojené s analýzou spor plísní rodu *Penicillium*, *Scitalidium*, *Trichophyton*, či *Aspergillus* (Li *et al.*, 2000; Welham *et al.*, 2000). Hmotnostní spektra jsou získávána díky laserové ablaci buněčné stěny spor v důsledku narušení působení kyselých roztoků matrice (Li *et al.*, 2000). Různé varianty matric jsou zmiňovány při optimalizacích protokolů pro jednotlivé druhy plísní, z nichž nejtypičtější jsou popsány na obrázku (Příloha 1, Fig. 2). Článek se zaměřuje na analýzu plísní rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, dále se zmiňuje potenciální využití této metody v biotechnologiích, medicíně a fytopatologii. Větší část fytopatologických aplikací MS přístupu je věnována vývoji metody pro identifikaci peronospor a padlí pomocí IC/IS MALDI-TOF MS na modelových organismech plísní salátové (*Bremia lactucae*) a padlí rajčatovém (*Oidium neolycopersici*), což jsou výsledky mé diplomové práce. Následně byla metoda aplikována i na identifikaci těchto biotrofních fytopatogenů přímo z povrchu biologického materiálu (Chalupová *et al.*, 2012) a na další zástupce peronospor a padlí (nepublikovaná data). Tento přehledový článek celkově sumarizuje a diskutuje současnou perspektivu metody pro identifikaci houbových organismů, kde zvláště zdůrazňuje rozdílnost s bakteriální buňkou. V této souvislosti je mnohdy nezbytné dodatečně narušit rigidní fungální buňky či spory a následná extrakce a identifikace proteinů může některé analýzy prodloužit. Žádná univerzální metoda doposud nebyla pro MALDI-TOF MS houbových mikroorganismů vyvinuta. Je zde proto kladen velký důraz na optimální přípravu vzorku, jež vychází z předchozích prací. Tento přístup je zvláště využíván pro analýzu vláknitých hub rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Zmiňované práce jasně naznačují silný potenciál metody pro využití v humánní a veterinární medicíně, fytopatologii a experimentální botanice, monitorování kontaminací při znečištění životního prostředí, průmyslové výrobě či mikrobiálních technologiích. Většina jmenovaných oblastí se zaměřuje na rozlišení houbových mikroorganismů na úrovni druhů či kmenů. S pomocí bioinformačních nástrojů jsou poté odborníci na MS analýzu schopni poskytovat data, jež odhalí i nové druhy a pomohou lépe uspořádat taxonomický systém založen na klasických biologických metodách (Kallow *et al.*, 2010). Obecně, identifikace a charakterizace houbových mikroorganismů vychází z peptidových/proteinových profilů poskytujících charakteristické biomarkery – signály v rozmezí  $m/z$  hodnot od 1000 do 20000. Pro budoucí vývoj MALDI-TOF MS metodologie je tudíž zapotřebí neustálé obnovování a vylepšování stávajících komerčních databází i přístrojového vybavení, a taktéž budování nových databází pro specializované vědecké účely. Je zde stále velká mezera mezi znalostí IC/IS MS peptidových/proteinových profilů a proteomickou identifikací biomolekul poskytujících příslušné signály ve spektrech. Spojením těchto dvou přístupů se tedy hmotnostní spektrometrie stává nenahraditelnou metodou v rychlé a spolehlivé identifikaci mikroorganismů, ale také v podrobnější analýze jednotlivých komponent patogenních buněk či

spor, jež mohou sloužit jako biomarkery, faktory specifické ve vztahu patogen-hostitel, nebo jsou důležitými metabolity, či toxiny.

#### **4. PROTEOMICKÉ PŘÍSTUPY PŘI CHARAKTERIZACI ROSTLINNÝCH PATOGENŮ**

Termín proteomika byl poprvé použit v roce 1997. Je definován jako „systematická analýza proteomu, tedy souboru všech proteinů nacházející se v buňce, tkáni či organismu“ (James, 1997). V případě podrobnější analýzy mikrobiálních biomarkerů lze použít proteomických přístupů na základě preparačních a frakcionačních metod, založených převážně na chromatografii a elektroforéze. Obr. 6 popisuje strategii charakterizace a identifikace mikroorganismů pomocí nástrojů proteomiky. Proteiny jsou extrahovány z buněk či spor mikroorganismů. Směsi proteinů jsou následně rozdělovány pomocí gelové elektroforézy (1D, 2D – elektroforéza) a jednotlivé pásy či frakce těchto proteinů pak štěpeny v gelu, nebo je směs extrahovaných proteinů štěpena v roztoku rovnou. Peptidové štěpy jsou poté separovány pomocí kapalinové chromatografie a analyzovány tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Získaná MS/MS spektra jsou prohledávána skrz proteomické databáze, pomocí nichž lze identifikovat extrahované proteiny, a z toho následně i odvodit původce choroby (Ho a Reddy, 2011). Tato strategie se používá zvláště u mikroorganismů (převážně bakteriálních), u nichž byl již sekvencován genom.





**Obr. 6** Schematický diagram proteomických přístupů při identifikaci mikroorganismů založených na MS/MS analýze (upraveno podle Ho a Reddy, 2011)

V posledních letech se se vzrůstajícím počtem kompletně sekvencovaných genomů houbových patogenů a oomycet zvyšuje i zájem o studium jejich proteomu. Celkově již přes 100 genomů patogenních houbových mikroorganismů bylo kompletně sekvencováno, z toho 23 z nich přísluší rostlinným patogenům (Broad Institute Database, <http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/projects/fungal-genome-initiative/fungal-genomics>, 20150515; Phytopathogenic Fungi and Oomycete EST database, verze 1.6, <http://cogeme.ex.ac.uk/>). Jelikož mají rostlinné patogeny celosvětově enormní dopad na rostlinnou produkci, strategie, jak je rychle identifikovat a najít specifické biomarkery, ale také jak pochopit proces infekce, interakce patogen-hostitel, vývoj patogena a studovat virulence stále nabývá na významu (González-Fernández a Jorriñ-Novo, 2012). Přehled proteomických studií fytopatogenních hub a oomycet byl shrnut v práci Bhadauria a kolektiv (2009a) nebo González-Fernández a spol. (González-Fernández *et al.*, 2010; González-

Fernández a Jorrin-Novo, 2012). Mnoho z nich se zabývá studiem rozdílů v proteomu během různých stádií vývoje patogena – hyfy, cysty (spory), klíčící cysty (spory), mycelia, haustoria, apresoria. Sekreční proteiny hrají u fytopatogenních mikroorganismů velice důležitou roli při napadení, pronikání a kolonizaci hostitelské rostliny, proto jsou komponenty sekretomu (soubor sekrečních proteinů) důležitou a častou problematikou proteomických studií. Další významnou oblastí proteomických studií je sledování změn proteinového profilu hostitelské rostliny a patogena při jejich vzájemné interakci nebo porovnávání proteinových profilů v souvislosti s rozlišením patogenních kmenů či virulentních a avirulentních ras (Bhadauria *et al.*, 2009a; González-Fernández *et al.*, 2010; González-Fernández a Jorrin-Novo, 2012). Kritickým krokem je efektní extrakce studovaných proteinů a účinná lýze buněčné stěny. Extrakční protokol lze shrnout následujícím heslem: „pokud daný protein umíme extrahovat a rozpustit, jsme schopni jej detekovat a identifikovat“ (Jorrin-Novo *et al.*, 2009). Volba extrakčního postupu se odvíjí od povahy proteinů, jež hodláme studovat. Většina protokolů zahrnuje precipitaci extrahovaných proteinů pomocí organických rozpouštědel, nejčastěji kombinace trichloroctová kyselina/acetón s následným rozpuštěním precipitantu v příslušném pufru (González-Fernández *et al.*, 2010). U proteomických analýz fytopatogenních mikroorganismů je z velké části využíváno klasické „bottom-up“ nebo „shotgun“ strategie (Bhadauria *et al.*, 2009a; Domon a Aebersold, 2006; González-Fernández a Jorrin-Novo, 2012).

#### **4.1. Přínos proteomiky pro rozlišování druhů, kmenů a ras fytopatogenních mikroorganismů**

Podrobnější informace o proteinovém profilu a jeho změnách mezi druhy, rasami, populacemi, vývojovými stádii mohou přesněji identifikovat patogeny nebo najít nově vznikající virulence, či odlišit virulentní rasy od nevirulentních. Většina publikovaných prací využívá mycelia pěstovaná *in vitro* a separaci proteinů pomocí dvojrozměrné elektroforézy (2-DE) spojenou s hmotnostní spektrometrií (González-Fernández *et al.*, 2010). Askomyceta *Botrytis cinerea*, nekrotrofní patogen způsobujícího významné škody mnohých zemědělsky důležitých plodin, je jedním z častých předmětů studia a identifikaci proteinů, které mají souvislost s virulencí (Fernández-Acero *et al.*, 2006). Komparativní proteomická analýza dvou různých virulentních kmenů odhalila jak kvalitativní, tak kvantitativní rozdíly v 2-DE proteinových profilech (Fernández-Acero *et al.*, 2007). Rozdílné kmeny *B. cinerea* „divokého typu“ (wild-type) byly rozlišeny pomocí jednorozměrné elektroforézy (1-DE) i 2-DE. Některé z identifikovaných proteinů, jako malát-dehydrogenasa nebo peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa, z mycelia, a endopolygalakrutonasa, aspartová proteasa či cerato-palatin, ze sekretomu, byly popsány jako virulentní faktory zahrnuté při napadení hostitelských tkání nebo v souvislosti s patogenicitou a vývojem patogena (González-Fernández *et al.*, 2014). Podobně Xu a kolektiv (2007) analyzovali

proteomický profil šesti odlišných izolátů *Curvularia lunata*, patogena kukuřice, pomocí 1-DE a 2-DE s účelem najít spojitost s jejich virulencí. Pomocí 1-DE byly izoláty rozděleny do tří skupin s odlišnými virulencemi. Pomocí 2-DE bylo rozlišeno 423 spotů, mezi nimiž 29 bylo specifických pro daný izolát a 39 se lišilo kvantitativně. *Pyrenophora-tritici repentis*, původce světle hnědé skvrnitosti pšenice, produkuje několik hostitel-specifických toxinů, jež určují slučitelnost určitých ras patogena s citlivými varietami pšenice. K lepšímu porozumění virulentních a avirulentních homologů byl porovnán myceliární a sekreční proteom. Analýza odhalila množství proteinů, jež jsou ve virulentních rasách nadprodukovány, jako je například a-mannosidasa, exo-1,3-glukanasa a heat-shock proteiny (Cao *et al.*, 2009). Podobně, 25 rozdílných proteinů bylo nalezeno u dvou různě agresivních izolátů půdní plísně *Verticillium dahliae*, původce vadnutí u mnoha rostlin. Některé identifikované proteiny měly spojitost s rolí v odpovědi na stres, kolonizaci, biosyntéze melaninu, antibiotické odolnosti, plísňové penetraci (El-Bebany *et al.*, 2010). Šulc a kolektiv (2009) porovnávali proteinové profily intaktních spor 24 kmenů *Aspergillus* pomocí MALDI-TOF MS, vyvinuli databázi, jež může sloužit k jejich typizaci a charakterizaci. Následně optimalizovali protokol pro extrakci proteinů ze spor, jejichž identifikace by mohla později přispět k efektivnější diagnostice. Podobně byla optimalizována metoda pro MALDI-TOF MS charakterizaci a identifikaci intaktních spor obligátních biotrofních rostlinných parazitů, perospor a padlí (Chalupová *et al.*, 2012) Na tuto práci navazuje proteomická analýza proteinů uvolněných ze spor během IC/IS MALDI-TOF MS analýzy a některé z nich byly přiřazeny k signálům viditelným v proteinových profilech modelových organismů *Bremia lactucae* a *Oidium neolycopersici* (Příloha 2). Většina těchto prací tedy využívá klasické „bottom-up“ či „shotgun“ strategie. V případě, že známe genom daného patogena, lze naměřené hmotnosti signálů viditelných v MALDI-TOF MS spektrech rovnou přiřadit k jejich teoretickým hmotnostem, jež jsou s pomocí různých bioinformatických softwarů od genomu odvozené. Takto tomu bylo například u buněčných lyzátů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Zde byly signály v MS spektru ztotožněny s proteiny, jež jsou odvozeny zejména od proteinů mitochondriálního původu a proteinů ribosomálních (Amiri-Eliasi a Fenselau, 2001).

## 5. CÍLE PRÁCE

- 1) Literární rešerše o biochemické analýze patogenních mikroorganismů
- 2) Sběr dalších peptidových/proteinových profilů rostlinných fytopatogenů za účelem rozšiřování databáze
- 3) Optimalizace a alternativní přístupy k IC/IS MALDI-TOF MS z povrchu listů hostitelských rostlin
- 4) Identifikace proteinů uvolněných během kyselé extrakce při IC/IS MALDI-TOF MS za účelem najít biomarkery infekce
- 5) Optimalizace protokolu pro IC/IS MALDI-TOF MS rostlinných patogenů

## 6. PŘEHLED METOD

Analýza fytopatogenů, zahrnovala jak metody přímého získávání unikátních peptidových/proteinových profilů intaktních spor pomocí MALDI-TOF MS, tak přístupy proteomické. Práce byla z větší části zaměřená na obligátní biotrofní parazity rostlin, jež mají značný dopad na zemědělství a byly poskytnuty spolupracujícími pracovišti (Tab. 1). Při analýze IC/IS MALDI-TOF MS se vycházelo z předchozí práce (Chalupová *et al.*, 2012), kde byla optimalizována metoda pro studium peronospor a padlí. Proteomický pohled následně rozšiřuje tuto problematiku o detailnější studium proteinů uvolněných ze spor během IC/IS MALDI-TOF MS (spory *Bremia lactucae*, *Oidium neolycopersici*). Kombinace hmotnostně-spektrometrických metod a proteomických přístupů jsou blíže popsány v prvním příloženém rukopisu (Příloha 2). U spor rží, zástupců rodu *Puccinia*, bylo nutno přechodit metodu pro IC/IS MALDI-TOF MS optimalizovat, následně byli vybráni dva zástupci této skupiny (*Puccinia striiformis*, *Puccinia graminis*), u nichž byla taktéž provedena podobná analýza proteinů. Veškeré detailní informace jsou popsány ve druhém příloženém rukopisu (Příloha 3). Níže popsané metody tedy shrnují a doplňují protokoly používané ve zmiňovaných rukopisech (Příloha 2 a 3).

### 6.1. Příprava vzorků spor studovaných patogenů

Spory plísní a jejich patotypů (Tab. 2) byly získávány přímo z napadených hostitelských rostlin buď omýváním či vytřepáváním do vody, v případě peronospor a padlí. Nebo byly sklepávány do suché zkumavky či odsávány pomocí cyklonového separátoru, v případě rží (Hanzalová, 2008). U plísní rodu *Botrytis* byly sbírány přímo z živného média (bramborový agar s dextrosou, PDA). Takto získané vzorky byly poté dále promyty ve vodě, nebo roztoku ACN/0.1% TFA (v/v) a vzniklá suspenze spor byla zahuštěna na potřebnou koncentraci ( $10^9$  spor.ml<sup>-1</sup>) a dále zpracována k analýze IC/IS MALDI-TOF MS (Chalupová *et al.*, 2012) nebo k extrakci proteinů (viz Příloha 2). U spor rodu *Puccinia* byl poté proces přípravy optimalizován (viz dále) a podrobný postup je popsán ve druhém příloženém rukopisu (viz Příloha 3).

### 6.2. MALDI-TOF MS intaktních spor

Analýza intaktních spor patogenů byla prováděna na MALDI-TOF hmotnostních spektrometrech Microflex LRF20 (Bruker Daltonik) a Axima CFR<sup>+</sup> (Shimadzu Kratos Analytical) vybavených dusíkovým laserem o vlnové délce 337 nm. Hmotnostní spektra byla měřena v lineárním módu pro pozitivně nabitě ionty. Při měření IC/IS MALDI-TOF MS byly použity různé typy MALDI destiček - nerez („stainless steel“, SS) DE2115, na bázi polymeru („polymer-based“, PB) Fleximass TO430, Fleximass TO483, SS, a 10mm MTP („microtitre plate“, destička mikrotitračního formátu) plain MALDI destička TO469 (Shimadzu Kratos Analytical), dále pak

MSP („microcount target plate“ microScout – iontový zdroj přístroje Microflex LRF20) ground steel target (Bruker Daltonik), MSP AnchorChip target (Bruker Daltonik) a MSP Big AnchorChip target (Bruker Daltonik). Podrobný popis nastavení je uveden v předchozí práci (Chalupová *et al.*, 2012) a přiloženém rukopisu (viz Příloha 3).

**Tab. 1** Seznam patogenů, jež byly analyzovány pomocí hmotnostně-spektrometrických<sup>a</sup> a proteomických přístupů<sup>b</sup>, jejich hostitelských rostlin a zdroj získaného materiálu

Název		Rasa/ patotyp	Hostitelský druh - latinsky	Hostitelský druh - česky	Zdroj <sup>c</sup>
<sup>a,b</sup> <i>Bremia lactucae</i>	Plíseň salátová	BL 16 BL 22, BL 25, BL 27, 12/05, 16/1/08	<i>Lactuca sativa</i> <i>Lactuca serriola</i>	locika salátová  locika kompasová	Sbírka UPOC
<sup>b</sup> <i>Oidium neolycopersici</i>	Padlí rajčatové	CS2	<i>Solanum esculentum</i>	rajče jedlé	Sbírka UPOC
<sup>a</sup> <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	Padlí travní	1541, 2567, 4515, 7557	<i>Hordeum vulgare</i>	ječmen setý	ÚEB AVČR
<sup>a</sup> <i>Botrytis cinerea</i>	Plíseň šedá	<sup>d</sup> F-16, <sup>d</sup> F-314	<i>Cucumis sativus</i> -	okurka setá	CCM
<sup>a</sup> <i>Botrytis aclada</i>	Plíseň česneková	<sup>d</sup> F-17	<i>Allium cepa</i> -	cibule kuchyňská	CCM
<sup>a</sup> <i>Botrytis fabae</i>	Plíseň bobová	<sup>d</sup> F-59	Fabaceae-	bobovité	CCM
<sup>a,b</sup> <i>Puccinia graminis</i>	Rez travní	2, 5, 9, 10, 11, 12	<i>Triticum aestivum</i>	pšenice setá	VÚRV
<sup>a,b</sup> <i>Puccinia striiformis</i>	Rez plevová	směs	<i>Triticum aestivum</i>	pšenice setá	VÚRV
<sup>a</sup> <i>Puccinia triticina</i>	Rez pšeničná	1(Finsko), 347, 628, 1947, 4003, 9585, 9657, 9668	<i>Triticum aestivum</i>	pšenice setá	VÚRV
<sup>a</sup> <i>Puccinia coronata</i>	Rez ovesná	směs	<i>Avena sativa</i>	oves setý,	VÚRV

(a) Patogeny, jež byly analyzovány pomocí IC/IS MALDI-TOF MS a jejich získané peptidové/proteinové profily uloženy do databáze.

(b) Patogeny, jež byly podrobeny proteomické analýze. (c) UPOC, Sbírka katedry botaniky PFF UP v Olomouci; ÚEB AVČR, Sbírka Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky v Olomouci; CCM, Česká sbírka mikroorganismů, PFF MU v Brně; VÚRV, Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha-Ruzyně. (d) Označení kmenu uloženého ve sbírce CCM, není označením rasy, *B. cinerea* byla pěstována na umělých živných médiích

### 6.2.1. Analýza IC/IS MALDI-TOF MS z povrchu listů hostitelských rostlin

Při vývoji metody pro IC/IS MALDI-TOF MS analýzu peronospor a padlí a bylo dosaženo specifických peptidových/proteinových profilů přímo z listu hostitelských rostlin (Chalupová *et al.*, 2012). Ačkoliv tato technika zjednodušuje zpracování spor z listu, mnohdy skýtá taktéž svá úskalí (fixace biologického materiálu na MALDI destičku, sušení listu, udržení rovne analyzované plochy listu). Proto byly navrženy další možnosti, jak získat informace o peptidovém/proteinovém profilu původce choroby okamžitě a snadněji, aniž by se list s povlakem spor musel složitě připravovat a vkládat do hmotnostního spektrometru:

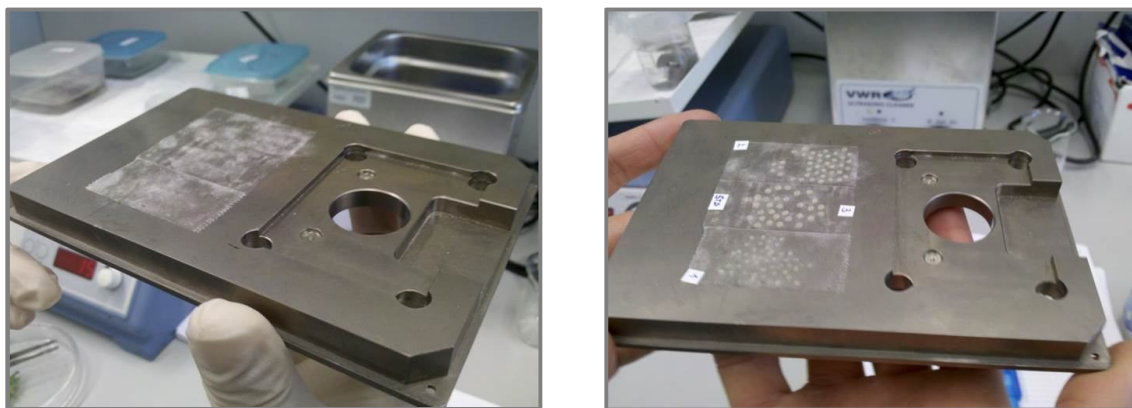
- 1) smývání spor pomocí roztoku matrice přímo z listu a nanesení této získané suspenze přímo na MALDI destičku
- 2) otisk povrchu listu na lepicí pásku a následná analýza pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

#### 6.2.1.1. Smývání spor padlí z povrchu listu

Práce byla prováděna s padlím rajčatovým (*Oidium neolyopersici*) parazitujícím na rajčeti setém (*Solanum esculentum* cv. Amateur). Pro omývání spor přímo z povrchu listu byla použita destilovaná voda a roztok matrice používané pro MALDI-TOF MS fytopatogenů (ferulová kyselina, FA: sinapová kyselina, SA v poměru 5: 15 mg·ml<sup>-1</sup>, v roztoku acetonitrilu, ACN : 2.5% trifluoroctová kyselina, TFA, v poměru 7:3, v/v). Byly zkoušeny různé objemy použité pro smývání, a porovnány výsledky mezi suspenzemi získanými ve vodě a v roztoku matrice. Vzorčky byly sbírány 3, 9, 10 a 14 dní po inokulaci rajčete. Taktéž byl omýván list, který nejevil známky infekce pouhým okem (na povrchu listu nebyl viditelný specifický práškový povrch spor), jako negativní kontrola sloužil list neinfikovaný padlím, jako pozitivní kontrola suspenze spor. Na MALDI destičku byla aplikována suspenze získaná po smytí spor z listu do vody (1μl) a na ni roztok matrice (1μl) nebo suspenze získaná po smytí spor z listu do roztoku matrice (2μl), či pouze extrakt spor získaný po odpipetování supernatantu ze suspenze spor (2μl).

#### 6.2.1.2. Otisk spor padlí z povrchu listu

Alternativní analýza byla prováděna pomocí otisku povrchu listů rajčete se sporulací padlí rajčatového (*O. neolyopersici*) buď na oboustrannou lepicí pásku, nebo přímo na povrch MALDI destičky. Provedení otisku povrchu listu víckrát na jedno místo umožnilo dosáhnout zahuštění spor zachycených na pásce/destičce. Následovala aplikace roztoku matrice (FA:SA, 5:15, mg·ml<sup>-1</sup> v roztoku ACN:2.5% TFA, v/v) v různých objemech (1, 1.5, 2, 3 μl). Otisk spor listu bez použití pásky byl proveden na čistý povrch MALDI destičky.



**Obr. 7** MALDI destička TO469 (Shimadzu Kratos Analytical) s nalepenou oboustrannou lepicí páskou. Po otisku povrchu listu se sporami (vlevo), po nanesení matrice (vpravo).

### 6.2.2. Optimalizace přípravy vzorku rzí (*Puccinia* spp.) pro IC/IS MS

Při analýze intaktních spor patogenů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie je stěžejní a velice důležitá příprava vzorku. Prvotní měření, příprava vzorku, roztoku matrice a nanášení vzorku na MALDI destičku byla prováděna na základě protokolu vyvinutého dříve pro analýzu peronospor a padlí (Chalupová *et al.*, 2012). Proces přípravy vzorku byl inspirován a navazuje na tuto práci. Díky odlišné morfologii spor rzí, zvláště silně hydrofobnímu povrchu a výraznému pigmentu a velikosti, bylo nutno předchozí postup optimalizovat. Během optimalizace protokolu byly hledány roztoky vhodné k promývání a následnému suspendování spor, vhodná koncentrace suspenze spor, kombinace matric poskytující homogenní povrch kokystalů matrice se vzorkem a reprodukovatelná spektra. Byly taktéž porovnány tři různé způsoby nanášení spor s matricí na destičku (DD, V, 2LV). Pro optimalizaci byla použita rez pšeničná (*Puccinia triticina*) z pšenice (*Triticum aestivum*). Popis optimalizace metody je podrobněji popsán v připraveném rukopisu (viz Příloha 3).

### 6. 2. 3. Databáze a analýza dat z IC/IS MALDI-TOF MS

MS spektra výše popsáných patogenů a jejich izolátů byla nahrána do databáze, která je součástí programu BIOSPEAN (Raus a Šebela, 2013) a následně porovnávána a zpracována pro další účely. Tato volně přístupná internetová aplikace (<http://software.cr-hana.upol.cz>) umožňuje vypočítat hodnoty podobnosti (v procentech) mezi vybranými spektry. Pro vyhodnocení proteinových profilů jednotlivých patogenů a jejich izolátů byla zkonstruována virtuální spektra představující typické signály překrývající se v 80 %. Takováto virtuální spektra byla mezi sebou porovnávána. Na základě počtu přiřazených identických signálů, dělených jejich celkovým počtem ve spektru, byla vypočtena hodnota skóre (při toleranci přiřazení shodných signálu  $\pm 0,5$  Da). Ze získaných hodnot průměrné podobnosti byl vytvořen diagram.



### 6.3. Proteomická analýza fytopatogenů

Studium proteomu plísní a houbových organismů nabývá v posledních letech čím dál víc na důležitosti. Vedle studia vzájemných interakcí hostitel-patogen se nabízí možnost odhalit markery infekce, či proteiny zodpovědné za odolnost patogena vůči obranným mechanismům hostitele. Doposud je zde však velká mezera mezi znalostí IC/IS MS peptidových/proteinových profilů a proteomickou identifikací biomolekul poskytujících příslušné signály ve spektrech. V této práci je kladen důraz na analýzu proteinů uvolněných ze spor během IC/IS MALDI-TOF MS. Strategie využití proteomických nástrojů již byla popsána výše (Obr. 5), jednotlivé kroky této práce jsou zmíněny v následujícím textu, konkrétněji jsou však popsány v příložených rukopisech (Příloha 2 a 3).

Extrakce proteinů ze spor byla pro napodobení rozpouštědla matrice, jež na ně působí během IC/IS MALDI-TOF MS, prováděna do roztoku ACN s 2,5% (v/v) TFA. Doba inkubace pak simulovala čas, po který roztok matrice působí na spory předtím, než se vytvoří směsné krystaly. Takto získané extrakty byly následně zpracovány k separaci pomocí elektroforézy nebo ke štěpení v roztoku jak je blíže popsáno v příložených rukopisech (Příloha 2 a 3).

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) byla použita pro separaci proteinů extrahovaných z *B. lactucae* a *O. neolycopersici*. Za účelem nalezení vyššího rozlišení separace nízkomolekulárních látek byly SDS-PAGE prováděny v několika opakováních o různých variantách složení: 1. Tris-glycin (Laemmli, 1970) – 15 % - T, 3 % C rozlišující gel a 4 % T, 3 % C zaostřující gel; 2. Tris-tricin (Schägger a von Jagow, 1987) – 15,5 % T, 6 % C rozlišující gel a 4% T, 3 % C zaostřující gel. Další varianta představovala separaci pomocí tricininové SDS-PAGE v přítomnosti 6 M močoviny (Sigma-Aldrich, Německo). Podrobnosti jsou uvedeny v rukopisu (Příloha 2).

Ke štěpení proteinů byl u všech případů použit trypsin modifikovaný raffinósou (Šebela *et al.*, 2006). Štěpení v gelu (zahrnující redukci a alkylaci) a následná extrakce peptidů prováděna podle standardního protokolu (Shevchenko *et al.*, 2006). Štěpení v roztoku bylo prováděno v přítomnosti 100 mM hydrogenuhličitanu triethylamonného. Tento postup zahrnoval redukci tris-(2-karboxyethyl) fosphinem a alkylaci iodacetamidem (viz Příloha 2 a 3).

#### 6.3.1. Analýza proteinů *B. lactucae* a *O. neolycopersici* pomocí

##### hmotnostně-spektrometrických přístupů

Analýza tryptických peptidů pro identifikaci proteinů z extraktů *B. lactucae* a *O. neolycopersici* zahrnovala kombinaci různých hmotnostně-spektrometrických přístupů. Pomocí peptidového mapování na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Microflex LRF 20 (Bruker Daltonik, Německo) byly analyzovány vzorky získané po separaci v 15% SDS-PAGE. MALDI-

TOF/TOF přístroj, model 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, USA) byl použit k analýze proteinů z *O. neolycopersici* separovaných pomocí 15% SDS-PAGE a 16,5% tricin-SDS PAGE a *B. lactucae* získané po separaci v 16,5% tricin-SDS-PAGE. Rozdělení tryptických peptidů pomocí nanoprůtokové kapalinové chromatografie (nanoLC) nanoEASY (Bruker Daltonik) s následnou detekcí na hmotnostním přístroji UHR-Q-TOF maXis (Bruker Daltonik, Německo) byla provedena u obou patogenů jak po tricinové elektroforéze, tak po štěpení proteinové směsi v roztoku. Analýza gelových frakcí z tricinové elektroforézy, byla prováděna s využitím MALDI-TOF/TOF MS přístroje Ultraflex extreme (Bruker Daltonik), jenž operuje v nepřímém spojení s nanoLC Dionex UltiMate3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific, Německo). Jednotlivé parametry a nastavení přístrojů jsou uvedeny v rukopisu (Příloha 2).

### **6. 3. 2. nanoLC-MALDI hmotnostní spektrometrie a MS/MS analýzy peptidů rží**

Tryptické peptidy vzniklé po štěpení extraktů proteinů z *P. striiformis* a *P. graminis* v roztoku separovány pomocí nanoLC (Dionex UltiMate3000 RSLCnano, Thermo Fisher Scientific) s následnou detekcí na přístroji Ultraflex extreme (Bruker Daltonik). Podrobnosti nastavení separace a MS/MS analýzy jsou uvedeny v rukopisu (Příloha 3).

### **6. 3. 3. Analýza dat**

Surová data získaná po analýze peptidů všech výše popsaných studovaných patogenů byla zpracována programem DataAnalysis 4.2 SP4 (Bruker Daltonik), nahrána do programu ProteinScape 3.1 (Bruker Daltonik) a prohledávána skrz vybrané databáze, interně vytvořené z aminokyselinových sekvencí proteinů vybraných příbuzných patogenů (tj. rodu *Phytophthora* pro *B. lactucae*, resp. rodu *Blumeria* pro *O. neolycopersici*, u rží databáze sekvencí zástupců řádu Pucciniales), jež byly staženy z Uniprot deponitáře ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Bližší informace o parametrech vyhledávání jsou popsány v rukopisech (Příloha 2 a 3).

### **6. 3. 4. Predikce buněčné lokalizace a funkční analýza proteinů**

Aminokyselinové sekvence identifikovaných necharakterizovaných proteinů nebo proteinových fragmentů *B. lactucae* nebo *O. neolycopersici* byly prohledávány a porovnávány pomocí programu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Tato prohledávání byla prováděna za účelem nalezení celé sekvence identifikovaných fragmentů, podrobnější informace o proteinové rodině nebo doméně u necharakterizovaných proteinů a sjednocení přístupových čísel, jež byly získány z různých databází (viz Příloha 2). Volně dostupná webová databáze Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) byla použita k funkční analýze necharakterizovaných proteinů *P. striiformis* a *P. triticulturae*, k jejich klasifikaci do proteinové rodiny či předurčení přítomnosti

domény nebo důležitých míst (Mitchell *et al.*, 2015), viz Příloha 3. Ve všech případech identifikovaných proteinů byla buněčná lokalizace předpovězena pomocí programu Wolf PSORT (Horton *et al.*, 2007).

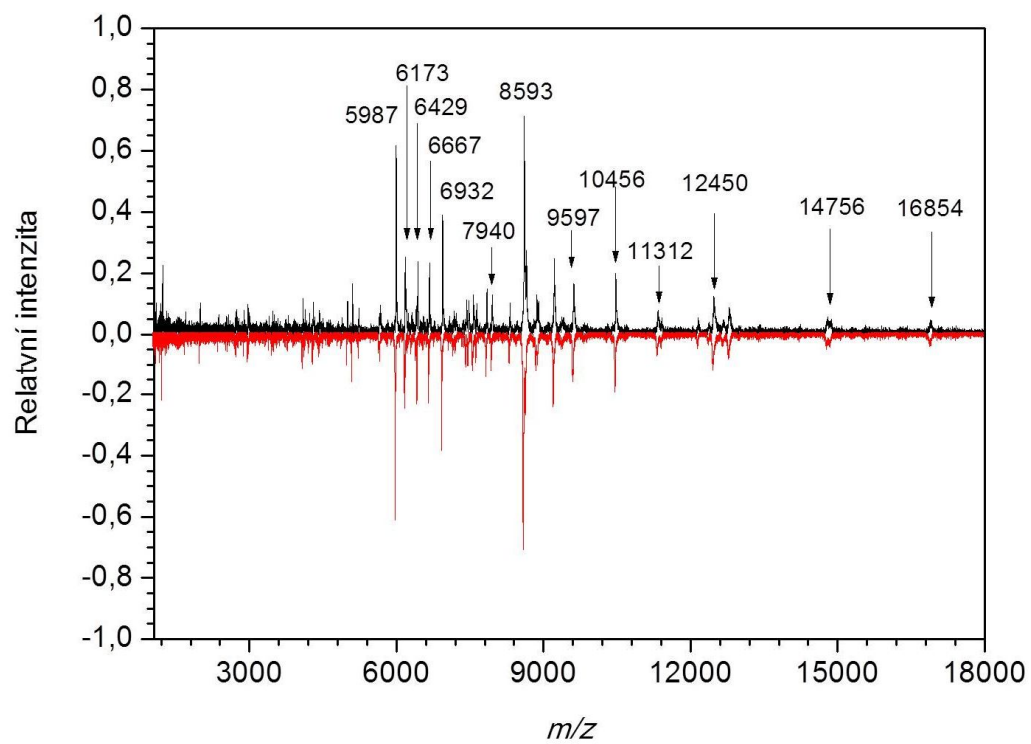
## 7. VÝSLEDKY

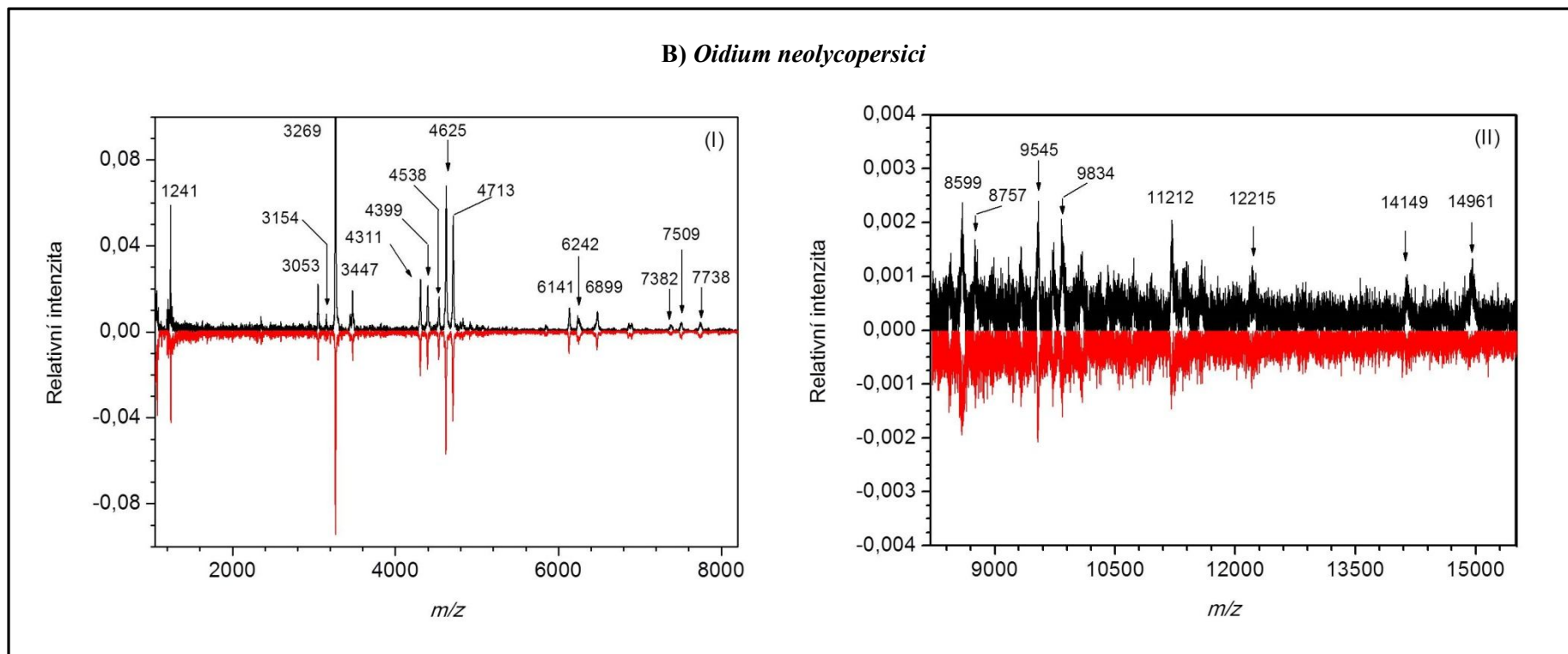
### 7.1. Výsledky zpracované ve formě rukopisu

#### 7.1.1. Identifikace proteinů extrahovaných ze spor *Bremia lactucae* a *Oidia neolycopersici* během analýzy MALDI- TOF hmotnostní spektrometrie intaktních spor (Příloha 2)

Peronospory (říše Chromista, řád Peronosporales) a padlí (říše Fungi, řád Erysiphales) způsobují značné ekonomické ztráty zemědělských plodin. Prostřednictvím nepohlavních spor jsou roznášeny větrem, a tak dochází k rychlému šíření nemoci až k epidemiím (Latijnhouwers *et al.*, 2003). Plíseň salátová (*Bremia lactucae*) je celosvětově rozšířený patogen lociky seté (*Lactuca sativa*), která ničí převážně semenáčky nebo mladé rostlinky pěstovaného salátu, ale napadá mnoho dalších rostlin z čeledi Asteraceae (Webster a Weber, 2007). Je dlouhá léta využívána jako modelový organismus interakcí hostitel-patogen (Lebeda *et al.*, 2008). Padlí rajčatové (*Oidium neolycopersici*) se rozšířilo ze západní Evropy do dalších evropských center produkce rajčat a Severní Ameriky. Spolu s jeho blízkého příbuzného *O. lycopersici*, představuje vážnou hrozbu pro globální rajče rostoucí (Kiss *et al.*, 2001). Tento rukopis volně navazuje a rozvíjí problematiku řešenou v předchozí studii (Chalupová *et al.*, 2012). Zabývá se především detailnější analýzou proteinů těchto dvou rostlinných patogenů, uvolněných ze spor během IC/IS MALDI-TOF MS. Pro identifikaci proteinových markerů bylo aplikováno několik proteomických přístupů. Proteiny byly extrahované za podmínek simulující analýzu spor pomocí IC/IS MALDI-TOF MS, extrakční roztok představoval směs acetonitrilu a zředěné kyseliny trifluoroctové. Po porovnání MS spekter intaktních spor a MS spekter generovaných z extraktu spor bylo potvrzeno, že všechny charakteristické signály typické pro výše jmenované plísně se v obou spektrech překrývají, což dokazuje podobnost peptidového/proteinového složení (Obr. 8). Po zpracování extraktů, separaci obsažených proteinů elektroforézou a štěpení trypsinem bylo identifikováno 156 proteinů ze vzorku *B. lactucae* a 90 proteinů z extraktu *O. neolycopersici*. Přestože jsme původně očekávali přítomnost převážně povrchových (extracelulárních) proteinů, většinu z nich představují intracelulární proteiny, poukazující na pravděpodobnou lýzi spor během extrakce. Jedná se o první studii výše jmenovaných patogenních organismů, jež pomohla odhalit 12 a 8 pravděpodobných markerových proteinů, jež byly přiřazeny k šesti a pěti charakteristickým signálům v IC/IS MS profilech (Tab. 2). Většina z nich je zahrnuta v procesech biosyntézy. Pro rozsáhlejší a přesnější interpretaci je ovšem důležitá znalost genomové sekvence. Mezi nimi jsme byli u obou patogenů schopni nejspolehlivěji určit tři proteiny, jež byly přiřazeny signálům o  $m/z$  7940, 8593 a 16854 pro *B. lactucae*;  $m/z$  7738, 9545 a 11212 pro *O. neolycopersici* (Tab. 2).

A) *Bremia lactucae*





**Obr. 8** MALDI-TOF hmotnostní spektra charakteristických peptidových/proteinových profilů: (A) *B. lactucae*; spektra byla získána měřením intaktních spor (horní spektrum) a extraktu v ACN/2.5% v/v TFA, 7:3 v/v (dolní spektrum); (B) *O. neolycopersici*; podobně, spektra byla získána měřením intaktních spor (horní spektrum) a extraktu v ACN/2.5% v/v TFA, 7:3 v/v (dolní spektrum). K dosažení optimálního zobrazení je panel (B) rozdělen do dvou částí (I a II) s různým zvětšením. Všechny experimenty byly provedeny na hmotnostním spektrometru Microflex LRF20 v lineárním pozitivním módu. Jako matrice byla použita směs FA:SA (5:15 mg·ml<sup>-1</sup>) v roztoku ACN/2.5% v/v TFA, 7:3 v/v (Chalupová *et al.*, 2012). Pro přehlednost byla spektra získaná z extraktů zvýrazněna červenou barvou a hodnoty intenzit signálů byly vynásobeny -1 pro zrcadlové zobrazení.

**Tab. 2** Přiřazení identifikovaných proteinů k charakteristickým signálům v IC/IS MALDI-TOF MS spektrech

<i>Bremia lactucae</i>				
$m/z^a$	Molekulová hmotnost (kDa) <sup>b</sup>	Protein <sup>b</sup>	Organismus <sup>b</sup>	Přístupové číslo <sup>b</sup>
7940	7.8	40S ribosomal protein S28 <sup>c</sup>	<i>Phytophthora parasitica</i>	gi 6754188381
8593	8.7	40S ribosomal protein S21	<i>Phytophthora infestans</i>	gi 301108027
10456	10.6	hypothetical protein PPTG_17805 <sup>c</sup> (cpn10 superfamily)	<i>Phytophthora parasitica</i>	gi 675210393
	10.6	10 kDa chaperonin	<i>Phytophthora infestans</i>	gi 301114337
	10.7	60S ribosomal protein L37a	<i>Phytophthora infestans</i>	gi 301106014
12450	12.4	60S ribosomal protein L30	<i>Phytophthora infestans</i>	gi 301123397
	12.6	Histone H2B	<i>Phytophthora infestans</i>	gi 301117766
14756	14.7	Histone H2A	<i>Phytophthora infestans</i>	gi 301118384
	14.8	Ubiquitin-ribosomal fusion protein, putative	<i>Phytophthora infestans</i>	gi 301108213
	14.9	Histone H2A	<i>Phytophthora infestans</i>	gi 301118386
	14.9	Putative uncharacterized protein (Ribosomal L28 family)	<i>Phytophthora sojae</i>	gi 348687801
16854	16.8	60S ribosomal protein L23a	<i>Phytophthora infestans</i>	gi 301119741
<i>Oidium neolycopersici</i>				
$m/z^a$	Molekulová hmotnost (kDa) <sup>b</sup>	Protein <sup>b</sup>	Organismus <sup>b</sup>	Přístupové číslo <sup>b</sup>
7738	7.7	protein component of the small (40S) ribosomal subunit <sup>c</sup>	<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i>	gi 521770671
9545	9.5	Splicing factor 3B subunit 10 SF3b10	<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i>	gi 528300502
11212	11.2	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i>	gi 528301960
14149	14.0	60S ribosomal protein L31	<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i>	gi 528297817
	14.1	Histone H2B	<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i>	gi 528301389
	14.3	Histone H2A	<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i>	gi 521769929
14961	14.7	60S ribosomal protein L23	<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i>	gi 528290044
	14.7	40S ribosomal protein S22	<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i>	gi 528297605

(a) Poměr hmotnosti a náboje ( $m/z$ ), hodnota popisující charakteristické signály v hmotnostním spektru. (b) Identifikace pocházejí z prohledávání v databázích pomocí programu Mascot. (c) Program BLAST byl využit k přiřazení intaktních proteinů homologních k sekvencím získaných fragmentů.

#### 7.1.1.1. Komentáře k výsledkům

Obr. 8 nám graficky znázorňuje signály typické pro dva studované biotrofy, plíseň salátovou (*B. lactucae*, 8A) a padlí rajčatové (*O. neolycopersici*, 8 B, C), jež se překrývají jak při MALDI-TOF MS analýze intaktních spor, tak při měření pouhého extraktu ze spor. Po identifikaci proteinů z extraktů pomocí různých přístupů jsme tedy mohli přiřadit pravděpodobné markery, jež by odpovídaly těmto typickým signálům (viz Tab. 2). Tato práce přispěla k vyvinutí metody identifikace fytopatogenních hub a oomycet pomocí IC/IS MALDI-TOF MS nalezením charakteristických signálů pocházejících především z proteinů ribozomů. Díky jejich vysoce konzervativním sekvencím, které se drobně liší pouze v aminokyselinovém složení mezi jednotlivými druhy, je lze považovat za markery pro biotypizaci nebo identifikaci fytopatogenů, podobně jako již bylo navrženo u bakterií (Pineda *et al.*, 2003). Navíc je tato informace v souladu s dřívější detekcí ribozomálních proteinů u spor plísně *Gibberella zeae* (Dong *et al.*, 2014), kde identifikovali proteiny přímo po digesci proteinů na destičce.

Vedle těchto proteinů, jsme u obou organismů identifikovali například malátdehydrogenasu nebo peptidyl-prolyl cis-trans isomerasu, jež byly již dříve popsány u *Botrytis cinerea* jako virulentní faktory důležité pro invazi do hostitelských pletiv, patogenicitu a vývoj patogena (González-Fernández *et al.*, 2014). Podobně jako v práci Rampitsch *et al.* (2006) jsme identifikovali heat shock proteiny a 14-3-3 proteiny, jež mají taktéž významnou roli v patogenezí. Analýza *Pyrenophora-tritici* odhalila množství proteinů, jež jsou ve virulentních rasách nadprodukovány, jako jsou například heat-shock proteiny (Cao *et al.*, 2009).



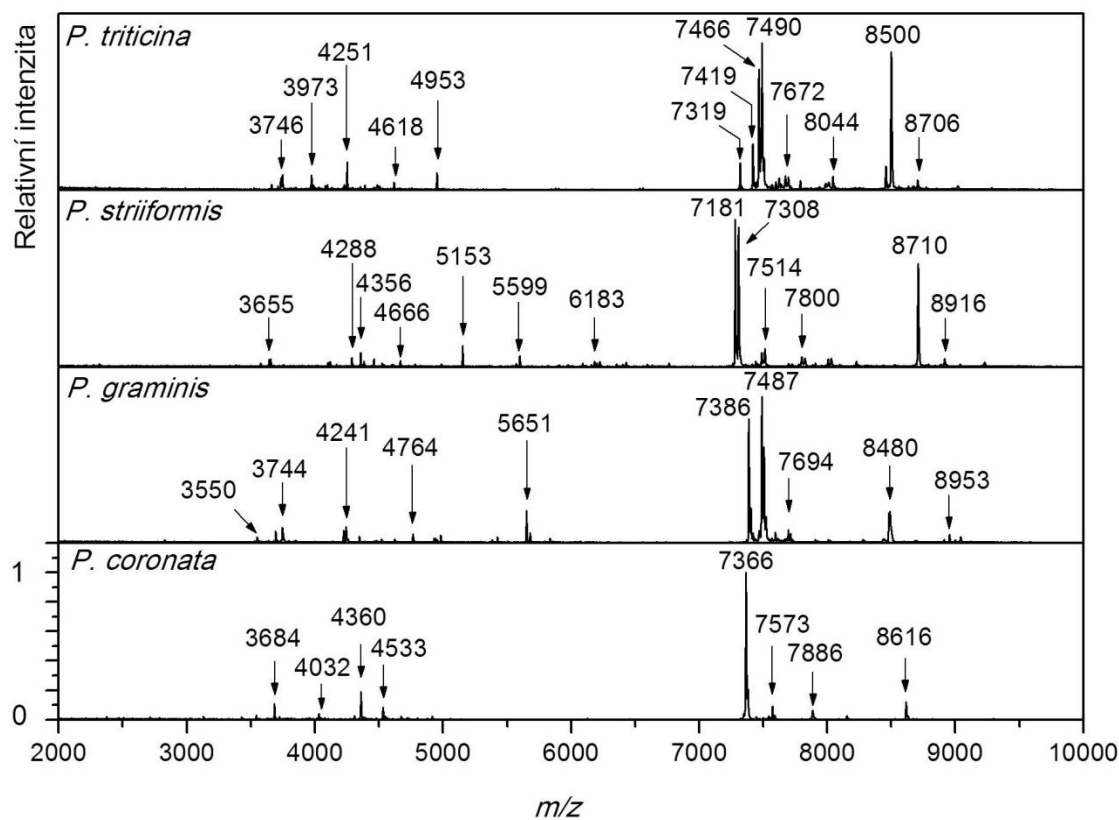
### 7. 1. 2. MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie intaktních spor a proteomická analýza patogenních hub rodu *Puccinia*. (Příloha 3)

Rzi jsou obligátní biotrofní parazitické houby způsobující velké ekonomické ztráty důležitých zemědělských plodin. Ke svému životu potřebují žijící hostitelskou rostlinu. Onemocnění se jeví jako žluté až hnědé, bílé nebo černé skvrny viditelné nejčastěji na listech nebo stonku hostitelské rostliny (Webster a Weber, 2007). Největší zemědělské ztráty byly v posledních letech zaznamenány působením zástupců rodu *Puccinia* patřícího do oddělení Basidiomycota, kde jsou klasifikovány do řádu *Pucciniales* (dříve *Uredinales*) (Tavares *et al.*, 2014). Tyto druhy navíc vytvářejí takzvané specializované formy (*formae speciales*, *f. sp.*), které napadají pouze jeden druh hostitelské rostliny nebo mají omezený počet hostitelů ve skupině. Navíc, uvnitř jednoho druhu, či *formae specialis* můžeme popsat různé typy fyziologických ras (patotypů), které se liší pouze ve specifické reakci (virulenci, avirulenci) k danému genotypu hostitelské rostliny (Anikster *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2011). V České republice patří mezi nejznámější původce chorob tři zástupci: *Puccinia triticina* (rez pšeničná), *Puccinia graminis* (rez travní) a *Puccinia striiformis* (rez plevová) (Bartos, 2010). Dalším významným parazitem je rez ovesná (*P. coronata*) (Klenová-Jiráková *et al.*, 2010). Přestože chemické ošetření snižuje tyto ztráty, je finančně nákladné. Mnohem ekonomičtějším a ekologickým způsobem ochrany před patogeny je kultivace a pěstování odolných kultivarů (Ellis *et al.*, 2014). Navzdory doposud vypěstovaným rezistentním odrůdám pšenice, vývoj a rychlé šíření nových virulentních ras (patotypů) stále překonává tyto nové variety (Hanzalová *et al.*, 2012). V praxi je určování a rozlišování patotypů velmi časově a manuálně náročné a je zde třeba odborných fytopatologů. Nabízí se tedy možnost využití analýzy intaktních spor pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie k rychlejší analýze a určování rzí.

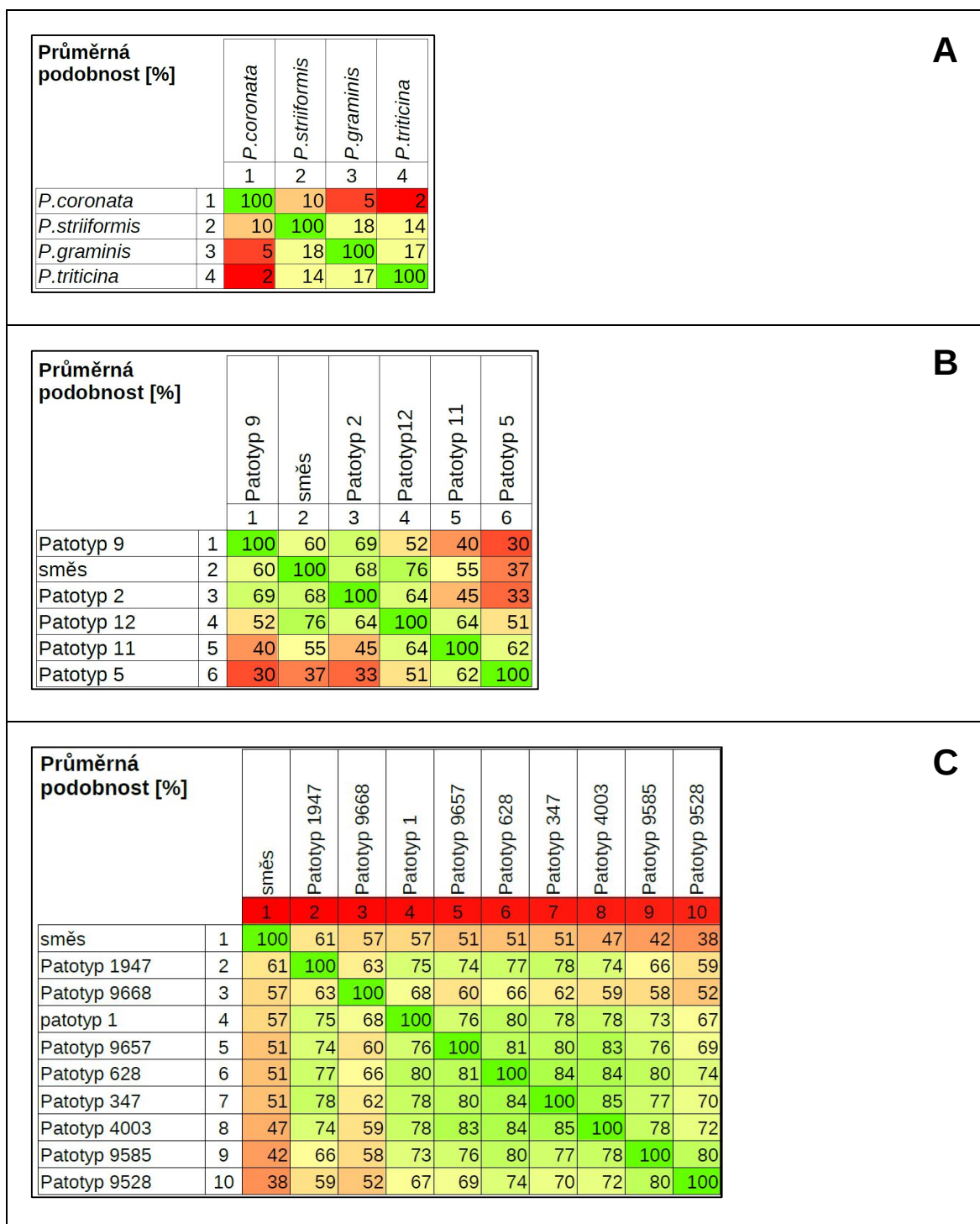
Tato práce navazuje na metodiku vyvinutou pro IC/IS MALDI-TOF MS peronospor a padlí (Chalupová *et al.*, 2012) a popisuje vývoj a optimalizaci metody pro identifikaci a rozlišení rzí. Během optimalizací (aplikovaných na *P. triticina*) byla stanovena optimální koncentrace spor v suspenzi ( $50 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) a její množství nanášené na MALDI destičku (1  $\mu\text{l}$  suspenze v matrici: voda, plus 0,5  $\mu\text{l}$  matrice, 2LV), kombinace matric FA a SA o koncentracích v poměru 5:15  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  v roztoku ACN/2.5% TFA (7:3, v/v) (Chalupová *et al.*, 2012) poskytovala nejspokojivější výsledky při měření MS spekter. Výsledný protokol byl pak použit na další zástupce, tedy *P. graminis*, *P. striiformis* a *P. coronata* zahrnující i jejich jednotlivé patotypy. Získali jsme peptidové/proteinové profily hmotnostních spekter různých druhů rzí (Obr. 9) a jejich patotypů. Na základě různých poměrů podobnosti typických signálů v peptidových/proteinových profilech jednotlivých patotypů lze tyto izoláty zastupující domnívané patotypy rozlišit (Obr. 10).

Pro doplnění informací o proteinovém složení jsme provedli extrakci ze spor *P. striiformis* a *P. graminis* do roztoku ACN/2,5% (v/v) TFA, 7:3 (v/v) a analýzu pomocí nanoLC-MALDI-TOF/TOF

MS/MS. 40 proteinů bylo identifikováno u *P. striiformis* a 30 proteinů jsme detekovali z extraktu *P. graminis*, z nichž 6 bylo identifikováno vzájemně u obou patogenů (viz Supplementary table 1, 2, příloha 3). Ačkoliv byla většina proteinů shledána jako neznámé, po funkční analýze jsme byli schopni odhadnout jejich zařazení. Identifikované proteiny ukazují na důležitost rychlé změny v proteinové expresi (ribosomální proteiny), rychlé odpovědi a obranných mechanismů při interakci hostitel-patogen (14-3-3 proteiny, heat shock proteiny, thaumatin) (Campo *et al.*, 2004; Rampitsch *et al.*, 2006; Thara *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003) a také extracelulární mechanismy k invazi hostitele a získání živin, buněčná adheze, signalizace, tvorba konidií (Bailey a Ebbola, 1998; Bakkeren a Gold, 2004). Nakonec jsme byli schopni přiřadit 3 a 3 proteiny k signálům viditelným ve spektru *P. striiformis* a *P. graminis* (Tab. 3), jež by mohly v budoucnu sloužit jako markery k bližšímu určení patogeneze. Tato práce otvírá nové možnosti pro studium a rozlišování patogenů způsobujících rzihost na důležitých zemědělských plodinách.



**Obr. 9** IC/IS MALDI-TOF MS peptidové/proteinové profily zástupců rodu *Puccinia*. Spektra směsí patotypů *P. triticultura*, *P. striiformis*, *P. graminis* a *P. coronata* ( $50 \mu\text{g spor} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) byla získána v lineárním módu pro pozitivně nabitě ionty. Použita byla matrice FA:SA, 5:15  $\text{mg ml}^{-1}$  v roztoku ACN/2.5% v/v TFA, 7:3 (v/v), nanášení vzorku metodou 2LV.



**Obr. 10** 2-D diagramy podobnosti spekter. Grafické znázornění bylo provedeno za použití programu BIOSPEAN (volně dostupný na v <http://software.cr-hana.upol.cz>) pomocí procentuálních hodnot podobnosti vypočtených z IC / IS MALDI-TOF hmotnostních spekter. (A) srovnání *P. triticina*, *P. graminis*, *P. Coronata* a *P. striiformis*; (B) srovnání patotypů *P. graminis*; (C) srovnání patotypů *P. triticina*.

**Tab. 3** Přiřazení identifikovaných proteinů k charakteristickým signálům v IC/IS MALDI-TOF MS spektrech

<i>Puccinia striiformis</i>				
$m/z^a$	Molekulová hmotnost (kDa) <sup>b</sup>	Protein <sup>b</sup>	Organismus <sup>b</sup>	Přístupové číslo <sup>b</sup>
8710	8,6	conidiation-specific protein 6	<i>Puccinia triticina</i>	A0A0C4EIJ7_PUCT1
14581	14,8	histon H3	<i>Puccinia triticina</i>	A0A0C4EUQ7_PUCT1
15989	16,1	ribosomal protein S11	<i>Puccinia triticina</i>	A0A0C4EVJ6_PUCT1
<i>Puccinia graminis</i>				
$m/z^a$	Molekulová hmotnost (kDa) <sup>b</sup>	Protein <sup>b</sup>	Organismus <sup>b</sup>	Přístupové číslo <sup>b</sup>
7386	7,3 7,4	glucose-repressible protein	<i>Puccinia graminis f. sp. tritici</i> / <i>Puccinia triticina</i>	E3K3W2_PUCGT A0A0C4EXN8_PUCT
8548	8,6 8,6	conidiation-specific protein 6	<i>Puccinia graminis f. sp. tritici</i> / <i>Puccinia triticina</i>	A0A0C4EIJ7_PUCT1 E3L4A3_PUCGT
9122	9,1	unknown-function protein	<i>Puccinia graminis f. sp. tritici</i>	E3KID1_PUCGT

(a) Poměr hmotnosti a náboje ( $m/z$ ), hodnota popisující charakteristické signály v hmotnostním spektru. (b) Identifikace pocházejí z prohledávání v databázích pomocí programu Mascot (c) Program BLAST byl využit k přiřazení intaktních proteinů homologních k sekvencím získaných fragmentů.

#### 7.1.2.1. Komentáře k výsledkům

Obr. 9 ukazuje unikátní peptidové/proteinové profily čtyř zástupců rodu *Puccinia* (*P. triticina*, *P. striiformis*, *P. graminis* a *P. coronata*), z nichž každý vzorek ve skutečnosti pochází ze směsi různých patotypů (není známo složení). Je zde vidět podobný vzorec profilů u všech čtyř zástupců s charakteristickými signály zaznamenanými ve dvou oblastech:  $m/z$  3000 – 6000 a 7000 – 9000, z nichž signály v druhé oblasti vykazují obecně vyšší intenzitu. Podobně byla získána i spektra patotypů *P. graminis* a *P. triticina* (Fig. 3A, 3B, Příloha 3), jež jsou podrobněji popsána v přiloženém rukopisu (Příloha 3). Pozorované rozdíly v profilech spekter byly dále hodnoceny pomocí programu BIOSPEAN (Raus a Šebela, 2013). Hodnoty podobnosti jsou vyjádřeny procentuálně. Zkonstruované diagramy podobnosti jsou zobrazeny na Obr. 10. Ačkoliv se na první pohled zdají peptidové/proteinové profily jednotlivých zástupců (Obr. 9) velice podobné, ve skutečnosti se jedná pouze o omezený počet těch signálů, které se vzájemně překrývají, což dokazuje diagram na Obr. 10A. *P. graminis*, *P. triticina* a *P. striiformis* se vyskytují na téměř stejné úrovni vzájemné podobnosti (14-18 %), zatímco *P. coronata* vykazuje vzdálenější vztah: 10% podobnost k *P. striiformis*, 5% k *P. graminis* a 2% k *P. triticina*. IC/IS MALDI-TOF hmotnostní spektra pěti patotypů *P. graminis* dokazuje použitelnost této metody pro jejich odlišení. Patotypy 2,

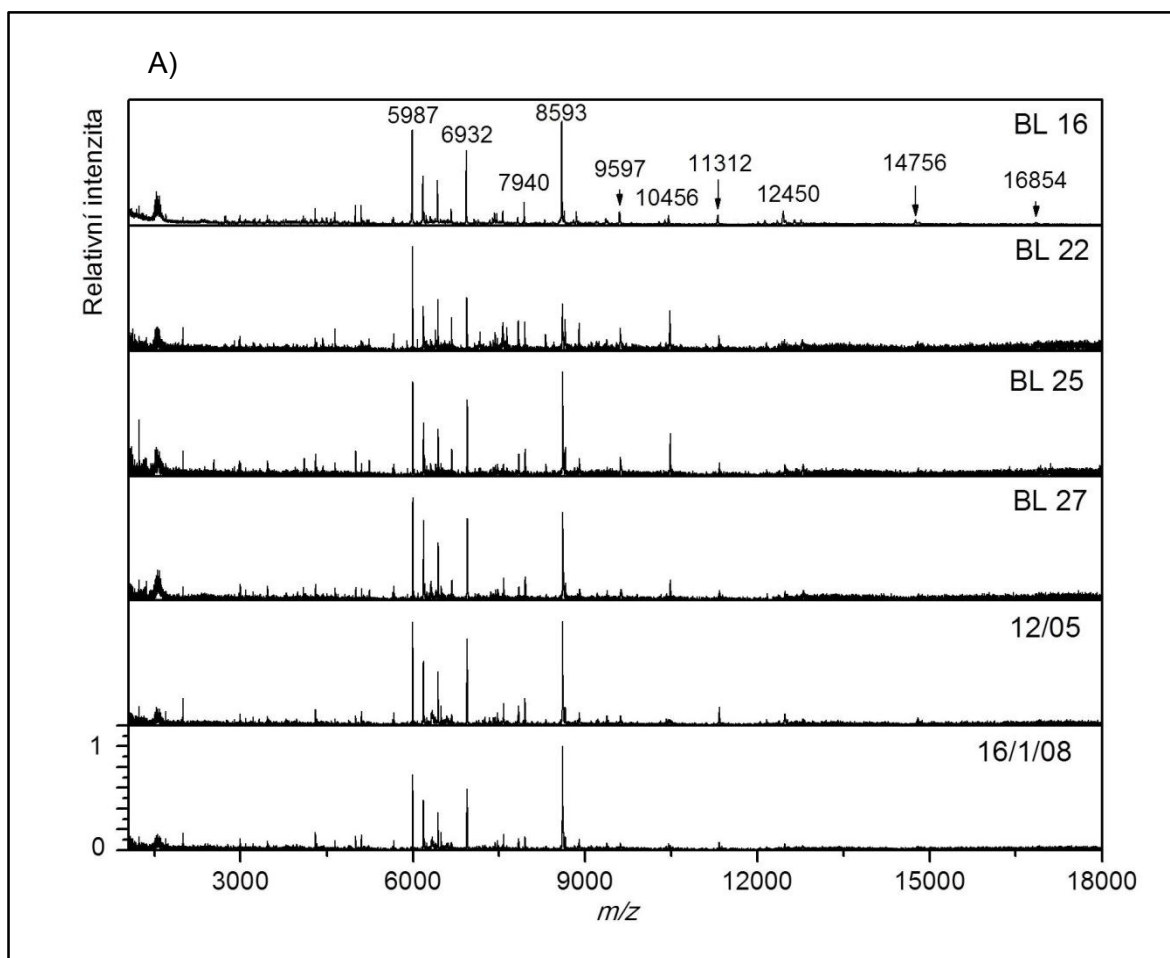
9 a 12 se mezi sebou vzájemně úzce podobají (Obr. 10B) stejně tak jako ke směsi poskytující typické IC/IS MALDI-TOF hmotnostní spektrum *P. graminis* (Obr. 9). Patotypy 5 a 11 jsou mnohem vzdálenější od ostatních spekter, ale vzájemně se podobají přibližně v 60 %. Větší skupina patotypů byla srovnána pro *P. triticina* (Obr. 10C). V tomto případě byl patotyp 9668 shledán jako nejvzdálenější v porovnání s ostatními. Srovnáváním pomocí programu BIOSPEAN byla potvrzena funkčnost tohoto nástroje. Zjištěné rozdíly mezi *P. graminis* a *P. triticina* byly ověřeny analýzou vzorků rzi travní kontaminovanou rzí pšeničnou. Menší kontaminace lze jen s obtížemi zjišťovat dle virulence na hostitelských rostlinách. Metoda by mohla po dalším rozpracování přispět k stanovení homogenity spor např. pro molekulární analýzy.

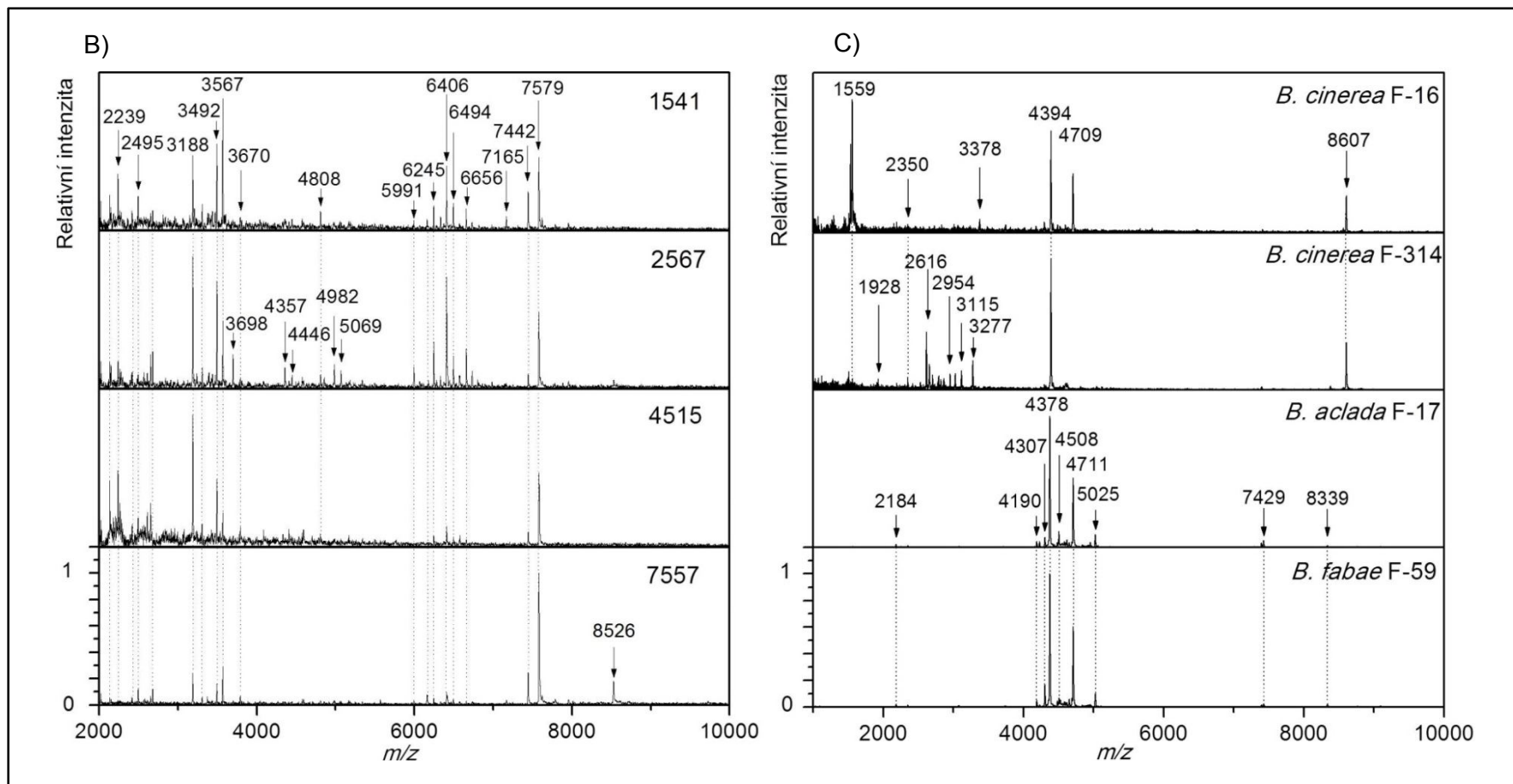
Jako finální výstup experimentů pro identifikace proteinů byly hodnoceny typické MS profily *P. striiformis* a *P. graminis* (Obr. 9) k nalezení spojitosti mezi markerovými signály a extrahovanými proteiny. Pro přiřazení signálů ze spekter na základě jejich hodnoty  $m/z$  byla určena tolerance  $\pm 0,3\text{kDa}$  molekulové hmotnosti proteinů. Tento interval zahrnoval předpokládané odchylky  $\pm 0,1\text{kDa}$ , vzniklé z IC/IS MS měření, a odchylky vycházející z předpokladu možných rozdílů v aminokyselinové sekvenci mezi studovanými patogeny a jejich blízkými příbuznými, od nichž byly proteiny z databáze odvozeny. U obou fytopatogenů jsme byli schopni přiřadit jen neznámé proteiny (Tab. 3). U *P. striiformis* ty byly 3: pro konidiaci specifický protein 6 (přístup. číslo A0A0C4EIJ7\_PUCT1) s molekulovou hmotností 8,6 kDa byl přiřazen signálu  $m/z$  8710, histon H3 (A0A0C4EUQ7\_PUCT1) s molekulovou hmotností 14,8 kDa byl považován za signál s v MS spektru s hodnotou  $m/z$  14581 a ribosomální protein S11 (A0A0C4EVJ6\_PUCT1), o molekulové hmotnosti 16,1 kDa, jsme přiřadili k signálu s  $m/z$  15989. V MS spektru *P. graminis* jsme našli tři signály, jejichž  $m/z$  hodnota by mohla odpovídat molekulovým hmotnostem několika identifikovaných proteinů. 2 glukoso-represibilní proteiny (E3K3W2\_PUCGT; 7,3 kDa; a A0A0C4EXN8\_PUCT1; 7,4 kDa) byly přiřazeny k signálu  $m/z$  7387, 2 pro konidiaci specifické proteiny 6 (A0A0C4EIJ7\_PUCT1 a E3L4A3\_PUCGT) s molekulovou hmotností 8,6 kDa byly navrženy k přiřazení signálu o  $m/z$  8548. A poslední protein s neznámou funkcí (E3KID1\_PUCGT) s molekulovou hmotností 9,1 kDa jsme přiřadili k signálu o  $m/z$  9122.

## 7.2. Ostatní výsledky

### 7.2.1. Získávání peptidových/proteinových profilů z intaktních spor patogenů

Na základě metody optimalizované pro IC/IS MALDI-TOF MS analýzy spor padlí a peronospor (Chalupová *et al.*, 2012), byla postupně získávána MS spektra dalších zástupců obligátních biotrofů rodů *Bremia*, *Blumeria* a nekrotrofních parazitů, zástupců rodu *Botrytis* a jejich izolátů. Tato MS spektra byla uložena do vybudované a stále se rozšiřující databáze, kde mohou v budoucnu posloužit jako referenční spektra při identifikaci neznámého vzorku. Na Obr. 11 jsou vidět MALDI-TOF peptidové/proteinové profily izolátů *B. lactucae* (A), *B. graminis* (B) a *Botrytis* spp. (C) získané za použití optimalizovaného systému matric FA:SA (5:15 mg·ml<sup>-1</sup>) v roztoku ACN:2.5% TFA (7:3, v/v) a techniky vysušené kapky (Chalupová *et al.*, 2012).





**Obr. 11** Studium vnitrodruhové variability fytopatogenů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektra peptidových/proteinových profilů zahrnuté do databáze sw BIOSPEAN. (A) Rasy a izoláty *Bremia lactucae*: BL 16, BL 22, BL 25, BL 27, 12/05 a 16/1/08; (B) izoláty *Blumeria graminis*: 1541, 2567, 4515, a 7557; (C) zástupci patogenů rodu *Botrytis*: *B. cinerea* F-16, *B. cinerea* F-314, *B. aclada* F-17 a *B. fabae* F-59. Spektra byla získána za použití optimalizovaného protokolu: matrice FA:SA (5:15 mg·ml<sup>-1</sup>) v roztoku ACN:2.5% TFA (7.3, v/v) technikou vysušené kapky. Měřeno na přístroji Microflex LRF20 (Bruker Daltonik).

Obr. 11A zahrnuje srovnání MS spekter profilů ze spor různých izolátů plísně salátové (*B. lactucae*). U modelového izolátu BL 16, dříve využitého pro optimalizaci metody, jsou vyznačeny signály, které tvoří charakteristický vzor profilu tohoto patogena. Zvláště signály 5987, 6932 a 8593, jež se vyskytují ve spektru vždy jako nejintenzivnější. Další signály (9597, 10456, 11312, 12450, 14756, 16854) se poté vyskytují s různou intenzitou a v různém poměru k výše jmenovaným intenzivním signálům. Porovnání profilů izolátů padlí ječmene (*B. graminis* f. sp. *hordei*) je znázorněno na Obr. 11B. I zde je vidět typický překryv charakteristických píků (pro přehlednost vyznačeno přerušovanou spojnicí mezi spektry jednotlivých izolátů). Profil izolátu 2567 je navíc doplněn o signály 3698, 4537, 4446, 4892 a 5609. Signál 8526 objevuje u izolátu 7557. Na Obr. 11C je vidět lehce odlišný případ porovnání peptidových/proteinových profilů patogenů rodu *Botrytis*, jež parazitují na různých hostitelských rostlinách. Nejedná se tudíž přímo o izoláty jednoho druhu patogena. Při porovnání spekter je vidět typické signály společné pro oba druhy *B. cinerea* (F-16 a F-314): 1559, 2350, 4394 a 8607. Odlišné signály u F-16 jsou 3378 a 4709, u F-314 pak například 1928, 2616, 2954, 3115, 3277. U *B. aclada* a *B. fabae* lze pozorovat společné markery o *m/z* 2184, 4190, 4307, 4378, 4508, 4711, 5025, 7429 a 8339.

### 7.2.2. Analýza IC/ISMS z povrchu listů hostitelských rostlin

V návaznost na předchozí problematiku IC/IS MS analýzy peronospor a padlí přímo z listu hostitelských rostlin (Chalupová *et al.*, 2012) byly navrženy další možnosti, jak získat informace o peptidovém/proteinovém profilu původce choroby okamžitě a snadněji, aniž by se list s povlakem spor musel složitě připravovat a vkládat do hmotnostního spektrometru:

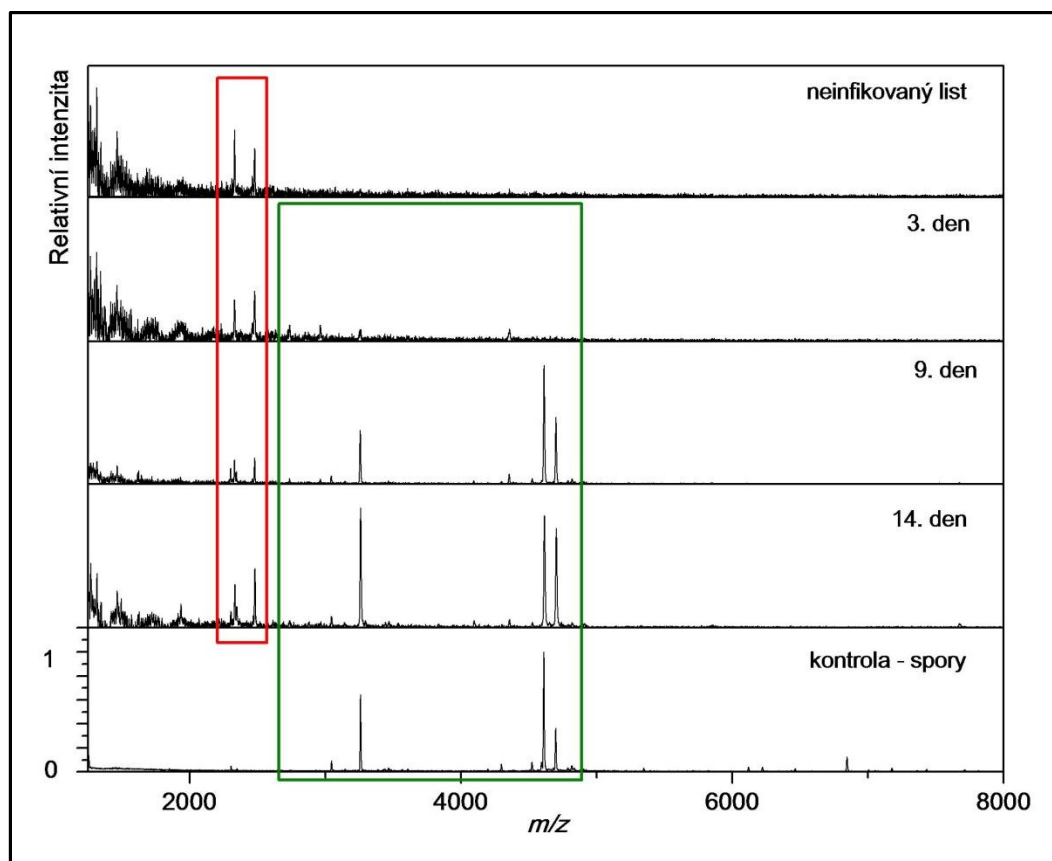
#### 7.2.2.1. Smývání spor padlí z povrchu listu

Analýzu suspenze konidií *Oidium neolycopersici* (padlí rajčatové) demonstruje Obr. 12, kde je vidět srovnání profilů získaných po smývání spor roztokem matrice přímo z listu rajčete 3., 9. a 14. den po inokulaci. Jako negativní kontrolu sloužil list neinfikovaný, pro pozitivní kontrolu pak spektrum ze suspenze spor. Červený rámeček vyznačuje oblast signálů, jež jsou viditelné u vzorků, které byly získány přímým omýváním povrchu infikovaného i neinfikovaného listu rajčete. V zeleném rámečku jsou vyznačeny signály, jež se shodují se signály viditelnými u profilu *Oidium neolycopersici* získaného přímo ze spor.

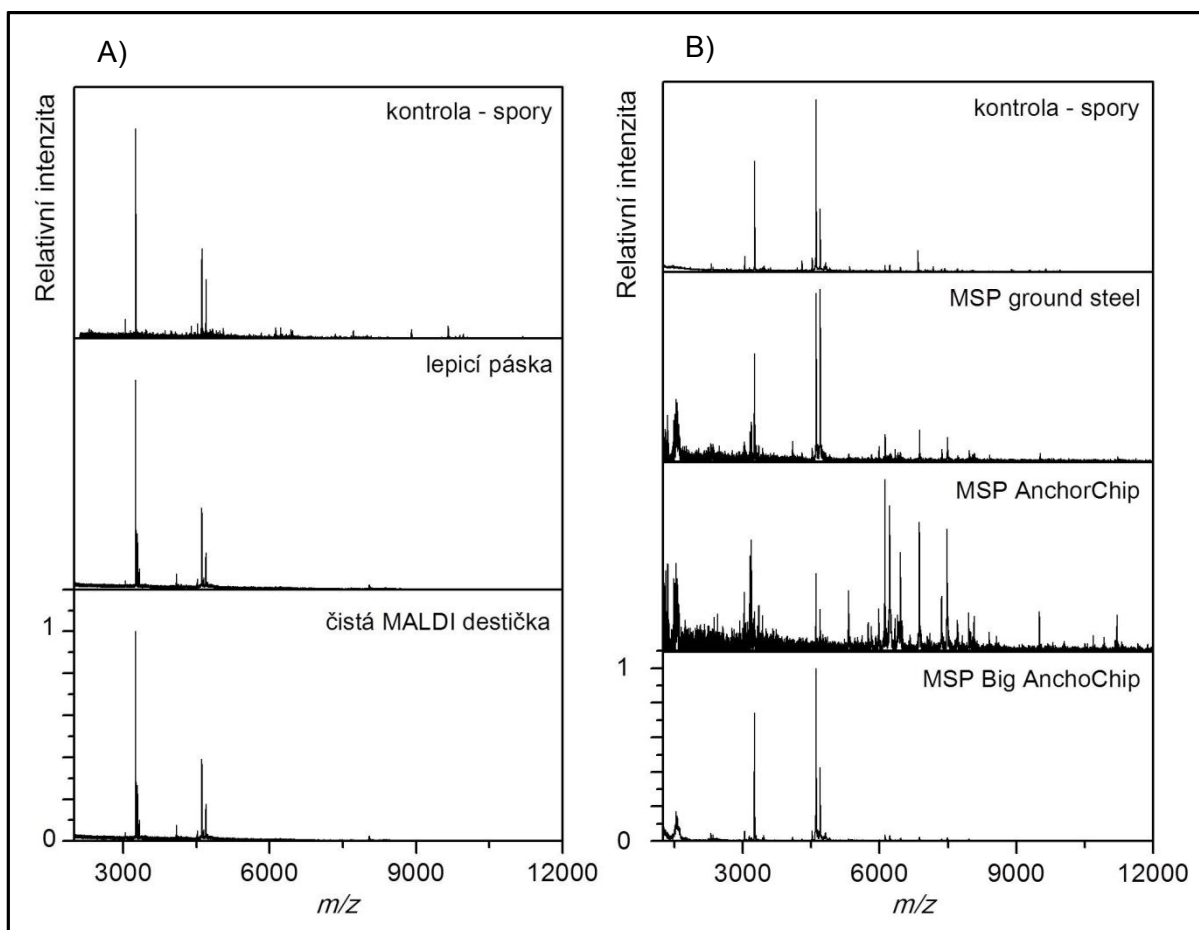


### 7.2.2.2. Otisk spor padlých z povrchu listu

Alternativní analýza *O. neolycopersici* byla prováděna pomocí otisku povrchu napadených listů rajčete buď na oboustrannou lepicí pásku nebo přímo na povrch MALDI destičky. Obr. 13 srovnává data získaná z těchto měření. Nejdříve jsou zde porovnána spektra získaná měřením otisku spor na oboustrannou lepicí pásku a poté i na čistou MALDI destičku na přístroji od firmy Shimadzu (Obr. 13 A), následně ještě byly porovnány otisky listů na různé typy MALDI destiček od firmy Bruker (Obr. 13 B). Získaná MS spektra měřená jak po otisku na lepicí pásku, tak na samotnou MALDI destičku, se shodují s peptidovým/proteinovým profilem kontroly zahrnující charakteristické signály *O. neolycopersici* (Obr. 13 A). Při porovnání MS spekter získaných po otisku na různých MALDI destičkách lze také pozorovat shodující se charakteristické signály, typické pro *O. neolycopersici*, avšak u destičky s AnchorChip povrchem je charakteristický vzor profilu ovlivněn vyšší intenzitou signálů v rozmezí hodnot  $m/z$  od 6000 do 12000.



**Obr. 12** Porovnání MALDI-TOF hmotnostních spekter peptidových/proteinových profilů získaných po smývání spor listů rajčete pomocí roztoku matrice. Na MALDI destičku byly aplikovány 2  $\mu\text{l}$  suspenze získané po smytí spor z listu do roztoku matrice FA:SA (5:15  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) v roztoku ACN:2.5% TFA (7.3, v/v). Měřeno na přístroji Microflex LRF20 (Bruker Daltonik).



**Obr. 13** Porovnání MALDI-TOF hmotnostních spekter peptidových/proteinových profilů po otisku spor z listů rajčete na oboustrannou lepící pásku a na čistou MALDI destičku. (A) Spektra získaná měřením otisku spor na oboustrannou lepící pásku a poté i čistou MALDI destičku TO469 na přístroji Axima CFR<sup>+</sup> (Shimadzu Kratos Analytical). (B) Srovnání spekter po otisku listů na různé typy MALDI destiček od firmy Bruker (měřeno na Microflex LRF20, Bruker Daltonik). Po otisku byl na povrch spor nanesen 1  $\mu$ l matrice FA:SA (5:15  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) v roztoku ACN:2.5% TFA (7.3, v/v).

### 7.2.3. Diskuze

Na základě optimalizovaného protokolu (Chalupová *et al.*, 2012) jsme byli schopni získávat další peptidové/proteinové profily rostlinných patogenů, zvláště izolátů (fyziologických ras) obligátních biotrofních parazitů jako jsou *Bremia lactucae* a *Blumeria graminis*. Z dostupných nekrotrofních parazitů byli studováni zástupci rodu *Botrytis*. Již na první pohled je zřejmé, že profily jednotlivých izolátů plísňe salátové a padlí rajčatového (Obr. 11A a 11B) se v rámci druhu výrazněji neliší v celkovém vzoru typických signálů. Různé izoláty /rasy jednoho druhu biotrofních, se liší schopností napadat různé variety hostitelské rostliny. (Webster a Weber, 2007). Podrobnější souvislost mezi proteinovým profilem dané fyziologické rasy a faktory virulence doposud není známa. Pro toto studium je nezbytné získat větší množství vzorků představující různé sady

fyziologických ras a následně provést podrobnější proteinovou analýzu u každé rasy. Prvotní analýza a vývoj metody pro identifikaci proteinů viditelných v MS spektrech je popsána v příloženém rukopisu (viz Příloha 2). Dalším příkladem jsou charakteristické profily zástupců rodu *Botrytis* (Obr. 11C). Mezi jednotlivými druhy si lze pak všimnout většího rozdílu, mezi typickými signály, zde již neporovnáváme jednotlivé izoláty. Naopak zástupci rodu *Botrytis* patří mezi patogeny se širokým hostitelským okruhem, jež jsou schopny infikovat, zvláště druh *Botrytis cinerea* u něhož je známo, že napadá 200 druhů dvouděložných rostlin (Staats *et al.*, 2005). Tyto výsledky, na něž se díváme z hmotnostně-spektrometrického hlediska, dokládají tedy použitelnost této metody k jejich rozlišení. Vnitrodruhové variabilita jednotlivých fytopatogenů je studována zároveň i molekulárními metodami a ne vždy se daří nalézt spolehlivé markery pro identifikaci jejich jednotlivých ras a patotypů. Stejně tak i vztahy hmotnostních spekter k jednotlivým charakteristikám patogenity (virulence, agresivita) určitých izolátů/kmenů/ras patogena je komplexní problematikou, která vyžaduje podrobné studium s většími sadami vzorků a diskusi odborníků z oblasti proteomiky a fytopatologie. Pro další optimalizace a vývoj metod pro charakterizaci fytopatogenů byly dále podrobněji studováni zástupci obligátních biotrofních parazitů (viz níže).

Výše uvedené výsledky ukazují, jak během smývání spor z povrchu listu roztokem matrice dochází k uvolnění proteinů, což urychluje přípravu vzorku ve srovnání se smýváním vodou a následným nanášením matrice (není ukázáno). Charakteristické signály jsou zvýrazněny zeleným rámečkem (obr. 12). Při srovnání s kontrolním spektrem suspenze spor jsou však ve spektru spor smývaných přímo z listu přítomny nové signály (v Obr. 12, označeno červeným rámečkem), pocházející z listu rajčete. Je tedy nutné provést kontrolní analýzu hostitelských pletiv tak, aby mohly být signály proteinů původem z rostliny a fytopatogena odlišeny. Urychlení získání vzorku přímo z biologického materiálu může mnohdy usnadnit celou analýzu, je však nutné znát konkrétní referenční spektra pro hledaného patogena, jelikož signály pocházející z hostitelské rostliny mohou ovlivnit získané výsledky a posléze identifikaci. Tuto metodu lze tedy doporučit pouze v případech rychlé kontroly přítomnosti známého původce infekce.

Na rozdíl od výše zmíněného problému, varianty otisku povrchu infikovaného listu poskytují shodující se profily s charakteristickými signály *O. neolycopersici* (obr. 13 A) a výrazně zjednodušují proces přípravu vzorku. V případě oboustranné lepicí pásky je třeba pečlivěji provést kalibraci, neboť ve spektrech se negativně projevuje vyšší šum. V případě přímého otisku na MALDI destičku (obr. 13B) je však třeba upozornit na různou přilnavost spor studovaných patogenů, kterou je nutno předem ověřit, což do jisté míry omezuje použití této alternativní metody na určitý typ patogenů.

## 8. ZÁVĚR

Mezi zástupci hub (říše Fungi) a oomycet (říše Chromista) byla identifikována řada druhů, které narušují metabolismus rostlin. Včasná determinace fytopatogenů může pomoci minimalizovat riziko šíření chorob, což je významné především u zemědělských plodin, pěstovaných v monokulturách. Tato disertační práce je zaměřena na studium původců mykóz rostlin pomocí hmotnostní spektrometrie. V posledních letech se tato metoda ukázala jako vhodný alternativní nástroj k identifikaci a charakterizaci mikroorganismů, zvláště využití ionizace vzorku za účasti matrice ve spojení s průletovými analyzátory (MALDI-TOF). Jedná se o relativně rychlý, na čas a materiál nenáročný přístup, jak identifikovat mikrobiálního původce choroby. Výstupem jsou hmotnostní spektra představující peptidové/proteinové profily, jež jsou unikátní pro určitý typ patogena (Fenselau a Demirev, 2001)

Na základě výsledků a zkušeností jiných autorů získaných v předchozích letech při identifikaci bakterií byla metoda pro analýzu intaktních spor či buněk (IC/IS MALDI-TOF MS) také zavedena pro diferenciaci mikroskopických hub a oomycet. Literární rešerše zaměřená na MALDI-TOF MS identifikaci houbových mikroorganismů v různých oblastech vědy a diagnostiky je zpracována ve formě přehledného článku Chalupová *et al.* (2014) s názvem „Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry“, který byl publikován v časopise *Biotechnology Advances* 32: 230-241 (Příloha 1).

Téma mé disertační práce volně navazuje na problematiku řešenou v mé diplomové práci, která se zabývala vývojem metody pro identifikaci a biotypizaci rostlinných patogenů, konkrétně zástupců peronospor a padlí pomocí IC/IS MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (Chalupová *et al.*, 2012). Metoda byla dále aplikována na další původce mykóz rostlin (tabulka 2) s cílem ověřit její univerzálnost. Předmětem studia byly zejména obligátní biotrofní parazity, jež potřebují pro svůj vývoj živé hostitelské rostliny (zástupci oomycet, askomycet i basidiomycet). Aplikovatelnost metody byla ovšem potvrzena i u nekrotrofních parazitů ze skupiny *Botrytis*.

Získané peptidové/proteinové profily jsou ukládány do postupně se rozšiřující databáze, která je součástí programu BIOSPEAN (Raus a Šebela, 2013), kde slouží jako referenční spektra k porovnávání studovaných izolátů a případné identifikaci neznámých vzorků. Byly také navrženy alternativní přístupy identifikace patogenů přímo z rostlinného materiálu (*Oidium neolycopersici* na listu rajčete), představující otisk povrchu listu na oboustrannou lepicí pásku nebo přímo na MALDI destičku.

Následně je tato problematika rozšířena o detailnější studium proteinů uvolněných ze spor během IC/IS MALDI-TOF MS (spory *B. lactucae*, *O. neolycopersici*). Strategie metod a dosažené výsledky jsou podrobně diskutovány v příloženém rukopise (Příloha 2). U spor rzi, zástupců rodu *Puccinia*, bylo nutno přechodit metodu pro IC/IS MALDI-TOF MS optimalizovat, poté byly

vybrány dva druhy z této skupiny (*Puccinia striiformis*, *Puccinia graminis*), u nichž byla provedena podobná analýza proteinů jako v přechozím případě u plísně a padlí. Veškeré detailní informace jsou popsány v dalším přiloženém rukopise (Příloha 3).

## SEZNAM ZKRATEK

2LV	technika dvou vrstev („two-layer volume“)
ACN	acetonitril
AP	atmosférický tlak („atmospheric pressure“)
CA	kyselina kávová („caffeic acid“)
Da	Dalton
DD	technika vysušené kapky („dried droplet“)
DESI	desorpční elektrosprej („desorption electrospray“)
DHB	2,5-dihydroxybenzoová
ESI	ionizace elektrosprejem („electrospray ionization“)
FA	kyselina ferulová
FoA	kyselina mravenčí („formic acid“)
f. sp.	speciální formy („ <i>formae speciales</i> “)
CHCA	$\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina („ $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid“)
CMBT	5-chloro-2-merkaptobenzothiazol
HABA	kyselina [2-(4-hydroxyphenylazo)]benzoová
IC/IS MS	hmotnostní spektrometrie intaktních buněk nebo spor („intact cell/spore mass spectrometry“)
kDa	kilodalton, jednotka molekulové hmotnosti (1 kDa = 1000 D, Daltonů)
LC	kapalinová chromatografie („liquid chromatography“)
MALDI	laserová ionizace a desorpce za účasti matrice („matrix-assisted laser
MBT	2-merkaptobenzothiazol
MS	hmotnostní spektrometrie („mass spectrometry“)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
nanoLC	nanoprůtoková kapalinová chromatografie
PMF	peptidové mapování („peptide mass fingerprinting“)
RCF	relativní centrifugační síla („relative centrifugal force“)
SA	kyselina sinapová („sinapic acid“)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
TFA	trifluoroctová kyselina (trifluoroacetic acid“)
TOF	analyzátor doby letu („time of flight“)
V	technika smíšených objemů („mixed-volume technic“)

## SEZNAM LITERATURY

- Agrios, G.N., 2005. Plant Pathology, Fifth Edition, 5 edition. ed. Academic Press, *Amsterdam ; Boston*.
- Amiri-Eliasi, B., Fenselau, C., 2001. Characterization of Protein Biomarkers Desorbed by MALDI from Whole Fungal Cells. *Anal. Chem.* **73**, 5228–5231.
- Anhalt, J.P., Fenselau, C., 1975. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal. Chem.* **47**, 219–225.
- Anikster, Y., Eilam, T., Bushnell, W.R., Kosman, E., 2005. Spore dimensions of Puccinia species of cereal hosts as determined by image analysis. *Mycologia* **97**, 474–484.
- Bailey, L., Ebbole, D., 1998. The fluffy gene of *Neurospora crassa* encodes a Gal4p-type C6 zinc cluster protein required for conidial development. *Genetics* **148**, 1813–1820.
- Bakkeren, G., Gold, S., 2004. The path in fungal plant pathogenicity: many opportunities to outwit the intruders? *Genet. Eng. (N. Y.)* **26**, 175–223.
- Baldauf, S.L., Roger, A.J., Wenk-Siefert, I., Doolittle, W.F., 2000. A Kingdom-Level Phylogeny of Eukaryotes Based on Combined Protein Data. *Science* **290**, 972–977.
- Bartoš, P., 2010. Rusts epidemics and their implications in wheat breeding and research in the Czech Republic. A scientific report. *Czech J. Genet. Plant Breed. - UZEI Czech Repub.*
- Bennett, J.W., 1998. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotechnol.* **66**, 101–107.
- Bhadauria, V., Banniza, S., Wang, L.-X., Wei, Y.-D., Peng, Y.-L., 2009a. Proteomic studies of phytopathogenic fungi, oomycetes and their interactions with hosts. *Eur. J. Plant Pathol.* **126**, 81–95.
- Bhadauria, V., Banniza, S., Wei, Y., Peng, Y.-L., 2009b. Reverse Genetics for Functional Genomics of Phytopathogenic Fungi and Oomycetes. *Int. J. Genomics* **2009**, 1-11.
- Bills, G., 2004. (Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods). Academic Press Inc.
- Bothner, B., Siuzdak, G., 2004. Electrospray ionization of a whole virus: analyzing mass, structure, and viability. *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.* **5**, 258–260.
- Burak, S., Engels-Schwarzlose, S., Erhard, M., Welker, M., Gehrt, A., 2010. Official accreditation of a MALDI-TOF MS based identification system for diagnostic microbiology. *Int J Med Microbiol* **299**.
- Cain, T.C., Lubman, D.M., Weber, W.J., Vertes, A., 1994. Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, 1026–1030.
- Campo, S., Carrascal, M., Coca, M., Abián, J., San Segundo, B., 2004. The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: A proteomics approach. *Proteomics* **4**, 383–396.
- Cao, T., Kim, Y.M., Kav, N.N.V., Strelkov, S.E., 2009. A proteomic evaluation of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat, reveals major differences between virulent and avirulent isolates. *Proteomics* **9**, 1177–1196.

- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., 2001. *The Fungi*, Second Edition, 2 edition. ed. Academic Press, San Diego, Calif.
- Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A., Wolk, D.M., 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 547–603.
- Claydon, M.A., Davey, S.N., Edwards-Jones, V., Gordon, D.B., 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1584–1586.
- Cody, R.B., Laramée, J.A., Durst, H.D., 2005. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal. Chem.* **77**, 2297–2302.
- Dalluge, J.J., 2000. Mass spectrometry for direct determination of proteins in cells: applications in biotechnology and microbiology. *Fresenius J. Anal. Chem.* **366**, 701–711.
- Degand, N., Carbonnelle, E., Dauphin, B., Beretti, J.-L., Bourgeois, M.L., Sermet-Gaudelus, I., Segonds, C., Berche, P., Nassif, X., Ferroni, A., 2008. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Cystic Fibrosis Patients. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3361–3367.
- Demirev, P.A., Fenselau, C., 2008. Mass Spectrometry for Rapid Characterization of Microorganisms. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1**, 71–93.
- Despeyroux, D., Phillpotts, R., Watts, P., 1996. Electrospray Mass Spectrometry for Detection and Characterization of Purified Cricket Paralysis Virus (CrPV). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 937–941.
- Dieckmann, R., Helmuth, R., Erhard, M., Malorny, B., 2008. Rapid Classification and Identification of Salmonellae at the Species and Subspecies Levels by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7767–7778.
- Domin, M.A., Welham, K.J., Ashton, D.S., 1999. The effect of solvent and matrix combinations on the analysis of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 222–226.
- Domon, B., Aebersold, R., 2006. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* **312**, 212–217.
- Dong, H., Kemptner, J., Marchetti-Deschmann, M., Kubicek, C.P., Allmaier, G., 2009. Development of a MALDI two-layer volume sample preparation technique for analysis of colored conidia spores of *Fusarium* by MALDI linear TOF mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 1373–1383.
- Edwards-Jones, V., Claydon, M.A., Evason, D.J., Walker, J., Fox, A.J., Gordon, D.B., 2000. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J. Med. Microbiol.* **49**, 295–300.
- El-Bebany, A.F., Rampitsch, C., Daayf, F., 2010. Proteomic analysis of the phytopathogenic soilborne fungus *Verticillium dahliae* reveals differential protein expression in isolates that differ in aggressiveness. *Proteomics* **10**, 289–303.
- Elhanany, E., Barak, R., Fisher, M., Kobiler, D., Altboum, Z., 2001. Detection of specific *Bacillus anthracis* spore biomarkers by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 2110–2116.



- Ellis, J.G., Lagudah, E.S., Spielmeyer, W., Dodds, P.N., 2014. The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Front. Plant Sci.* **5**.
- Evason, D.J., Claydon, M.A., Gordon, D.B., 2001. Exploring the limits of bacterial identification by intact cell-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 49–54.
- Fedele, L., Seraglia, R., Battistotti, B., Pinelli, C., Traldi, P., 1999. Qualitative characterization of bacterial strains employed in the production of yogurt by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **34**, 1385–1388.
- Fenselau, C., Demirev, P.A., 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **20**, 157–171.
- Fernández-Acero, F.J., Jorge, I., Calvo, E., Vallejo, I., Carbú, M., Camafeita, E., Garrido, C., López, J.A., Jorrin, J., Cantoral, J.M., 2007. Proteomic analysis of phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* as a potential tool for identifying pathogenicity factors, therapeutic targets and for basic research. *Arch. Microbiol.* **187**, 207–215.
- Fernández-Acero, F.J., Jorge, I., Calvo, E., Vallejo, I., Carbú, M., Camafeita, E., López, J.A., Cantoral, J.M., Jorrin, J., 2006. Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Proteomics* **6 Suppl 1**, S88–96.
- González-Fernández, R., Aloria, K., Valero-Galvan, J., Redondo, I., Arizmendi, J.M., Jorrin-Novo, J.V., 2014. Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains. *J. Proteomics* **97**, 195–221.
- González-Fernández, R., Jorrin-Novo, J.V., 2012. Contribution of Proteomics to the Study of Plant Pathogenic Fungi. *J. Proteome Res.* **11**, 3–16.
- González-Fernández, R., Prats, E., Jorrin-Novo, J.V., 2010. Proteomics of Plant Pathogenic Fungi. *BioMed Res. Int.* **2010**, e932527.
- Goodacre, R., Heald, J.K., Kell, D.B., 1999. Characterisation of intact microorganisms using electrospray ionisation mass spectrometry. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**, 17–24.
- Haag, A.M., Taylor, S.N., Johnston, K.H., Cole, R.B., 1998. Rapid identification and speciation of *Haemophilus* bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **33**, 750–756.
- Hanzalová, A., 2008. Možnosti snížení ztrát působených rzemi na pšenici. Výzkumný ústav rostlinné výroby.
- Hanzalová, A., Sumíková, T., Huszár, J., Bartoš, P., 2012. Physiologic Specialization of Wheat Leaf Rust (*Puccinia triticina* Eriks.) in the Slovak Republic in 2009-2011. *Czech J. Genet. Plant Breed.* **48**, 101–107.
- Havlíček, V., Lemr, K., Schug, K.A., 2013. Current Trends in Microbial Diagnostics Based on Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **85**, 790–797.
- Heller, D.N., Cotter, R.J., Fenselau, C., Uy, O.M., 1987a. Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal. Chem.* **59**, 2806–2809.
- Heller, D.N., Fenselau, C., Cotter, R.J., Demirev, P., Olthoff, J.K., Honovich, J., Uy, M., Tanaka, T., Kishimoto, Y., 1987b. Mass spectral analysis of complex lipids desorbed directly from lyophilized membranes and cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**, 194–199.

- Helmel, M., Marchetti-Deschmann, M., Allmaier, G., 2014. Improved sample preparation for intact cell mass spectrometry (biotyping) of mycelium samples taken from a batch fermentation process of *Penicillium chrysogenum*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **28**, 957–964.
- Holland, R.D., Rafii, F., Heinze, T.M., Sutherland, J.B., Voorhees, K.J., Lay, J.O., 2000. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric detection of bacterial biomarker proteins isolated from contaminated water, lettuce and cotton cloth. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 911–917.
- Holland, R.D., Wilkes, J.G., Rafii, F., Sutherland, J.B., Persons, C.C., Voorhees, K.J., Lay, J.O., 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1227–1232.
- Horneffer, V., Haverkamp, J., Janssen, H.-G., Notz, R., 2004. MALDI-TOF-MS analysis of bacterial spores: Wet heat-treatment as a new releasing technique for biomarkers and the influence of different experimental parameters and microbiological handling. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 1444–1454.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., Nakai, K., 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* **35**, W585–587.
- Ho, Y.-P., Reddy, P.M., 2011. Advances in mass spectrometry for the identification of pathogens. *Mass Spectrom. Rev.* **30**, 1203–1224.
- Chalupová, J., Raus, M., Sedlářová, M., Šebela, M., 2014. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnol. Adv.* **32**, 230–241.
- Chalupová, J., Sedlářová, M., Helmel, M., Rehulka, P., Marchetti-Deschmann, M., Allmaier, G., Šebela, M., 2012. MALDI-based intact spore mass spectrometry of downy and powdery mildews. *J. Mass Spectrom.* **47**, 978–986.
- Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P., Schrenzel, J., 2010. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1169–1175.
- Chen, H., Marino, G., Maier, C., Cundell, A., Siegel, M. 2000. Rapid identification of USP objectionable microorganisms in pharmaceutical ingredients by MALDI-TOF mass spectrometry. *Proceedings of the 48th Annual Conference of the American Society for Mass Spectrometry, Long Beach, June 2000*, p 1205–1206.
- James, P., 1997. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q. Rev. Biophys.* **30**, 279–331.
- Jones, J.J., Stump, M.J., Fleming, R.C., Lay, J.O., Wilkins, C.L., 2003. Investigation of MALDI-TOF and FT-MS techniques for analysis of *Escherichia coli* whole cells. *Anal. Chem.* **75**, 1340–1347.
- Jorrín-Novo, J.V., Maldonado, A.M., Echevarría-Zomeño, S., Valledor, L., Castillejo, M.A., Curto, M., Valero, J., Sghaier, B., Donoso, G., Redondo, I., 2009. Plant proteomics update (2007-2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *J. Proteomics* **72**, 285–314.

- Kallow, W., Erhard, M., Shah, H.N., Raptakis, E., Welker, M., 2010. MALDI-TOF MS for Microbial Identification: Years of Experimental Development to an Established Protocol, in: Shah, H.N., Gharbia, S.E. (Ed.), *Mass Spectrometry for Microbial Proteomics*. John Wiley & Sons, Ltd, s. 255–276.
- Karty, J.A., Lato, S., Reilly, J.P., 1998. Detection of the bacteriological sex factor in *E. coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 625–629.
- Kemptner, J., Marchetti-Deschmann, M., Kubicek, C.P., Allmaier, G., 2009a. Mixed volume sample preparation method for intact cell mass spectrometry of *Fusarium* spores. *J. Mass Spectrom.* **44**, 1622–1624.
- Kemptner, J., Marchetti-Deschmann, M., Mach, R., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Allmaier, G., 2009b. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) preparation techniques for surface characterization of intact *Fusarium* spores by MALDI linear time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 877–884.
- Keys, C.J., Dare, D.J., Sutton, H., Wells, G., Lunt, M., McKenna, T., McDowall, M., Shah, H.N., 2004. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **4**, 221–242.
- Khan, M.S.A., Ahmad, I., Aqil, F., Owais, M., Shahid, M., Musarrat, J., 2010. Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*, in: Ahmad, I., Owais, M., Shahid, M., Aqil, F. (Ed.), *Combating Fungal Infections*. Springer Berlin Heidelberg, s. 21–45.
- Kiss, L., Cook, R.T.A., Saenz, G.S., Cunnington, J.H., Takamatsu, S., Pascoe, I., Bardin, M., Nicot, P.C., Sato, Y., Rossman, A.Y., 2001. Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolycopersici* sp. nov. and *O. lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world. *Mycol. Res.* **105**, 684–697.
- Klenová-Jiráková, H., Leišová-Svobodová, L., Hanzalová, A., Kučera, L., 2010. Diversity of oat crown rust (*Puccinia coronata* f.sp. *avenae*) isolates detected by virulence and AFLP analyses. *Plant Prot. Sci.* **46**, 98–106.
- Krishnamurthy, T., Ross, P.L., Rajamani, U., 1996. Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 883–888.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Laiko, V.V., Burlingame, A.L. (The Regents of the University of California, Oakland, California, USA): *Atmospheric pressure matrix assisted laser desorption*. US 5965884A, 12. 10. 1999, 7 stran.
- Laiko, V.V., Baldwin, M.A., Burlingame, A.L., 2000. Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **72**, 652–657.
- Lange, O., Erhard, M., Teutsch, C., Sander, J. 2008. MIROB: automatic rapid identification of micro-organisms in high through-put. *Ind. Robot Int. J.* **35**, 311–315.
- Latijnhouwers, M., de Wit, P.J.G.M., Govers, F., 2003. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends Microbiol.* **11**, 462–469.

- Lay Jr., J.O., 2000. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. *TrAC Trends Anal. Chem.* **19**, 507–516.
- Lebeda, A., Sedlářová, M., Petřivalský, M., Prokopová, J., 2008. Diversity of defence mechanisms in plant–oomycete interactions: a case study of *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae*, in: Lebeda, A., Spencer-Phillips, P.T.N., Cooke, B.M. (Ed.), *The Downy Mildews - Genetics, Molecular Biology and Control*. Springer Netherlands, s. 71–89.
- Li, T.Y., Liu, B.H., Chen, Y.C., 2000. Characterization of *Aspergillus* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 2393–2400.
- Lu, X., Ning, B., He, D., Huang, L., Yue, X., Zhang, Q., Huang, H., Liu, Y., He, L., Ouyang, J., 2014. High throughput screening of high-affinity ligands for proteins with anion-binding sites using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **25**, 454–463.
- Lynn, E.C., Chung, M.-C., Tsai, W.-C., Han, C.-C., 1999. Identification of Enterobacteriaceae bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 2022–2027.
- Madonna, A.J., Basile, F., Ferrer, I., Meetani, M.A., Rees, J.C., Voorhees, K.J., 2000. On-probe sample pretreatment for the detection of proteins above 15 KDa from whole cell bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 2220–2229.
- Madonna, A.J., Voorhees, K.J., Taranenko, N.I., Laiko, V.V., Doroshenko, V.M., 2003. Detection of Cyclic Lipopeptide Biomarkers from *Bacillus* Species Using Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 1628–1637.
- Meetani, M.A., Shin, Y.-S., Zhang, S., Mayer, R., Basile, F., 2007. Desorption electrospray ionization mass spectrometry of intact bacteria. *J. Mass Spectrom.* **42**, 1186–1193.
- Meetani, M.A., Voorhees, K.J., 2005. MALDI mass spectrometry analysis of high molecular weight proteins from whole bacterial cells: pretreatment of samples with surfactants. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 1422–1426.
- Mitchell, A., Chang, H.-Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., McAnulla, C., McMenamin, C., Nuka, G., Pesseat, S., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Rato, C., Yong, S.-Y., Bateman, A., Punta, M., Attwood, T.K., Sigrist, C.J.A., Radaschi, N., Rivoire, C., Xenarios, I., Kahn, D., Guyot, D., Bork, P., Letunic, I., Gough, J., Oates, M., Haft, D., Huang, H., Natale, D.A., Wu, C.H., Orengo, C., Sillitoe, I., Mi, H., Thomas, P.D., Finn, R.D., 2015. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res.* **43**, D213–221.
- Moura, H., Woolfitt, A.R., Carvalho, M.G., Pavlopoulos, A., Teixeira, L.M., Satten, G.A., Barr, J.R., 2008. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* isolates. *Fems Immunol. Med. Microbiol.* **53**, 333–342.
- Nilsson, C.L., 1999. Fingerprinting of *Helicobacter pylori* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 1067–1071.
- Ochoa, M.L., Harrington, P.B., 2005. Immunomagnetic isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef and identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and database searches. *Anal. Chem.* **77**, 5258–5267.

- Park, R., Fetch, T., Hodson, D., Jin, Y., Nazari, K., Prashar, M., Pretorius, Z., 2011. International surveillance of wheat rust pathogens: progress and challenges. *Euphytica* **179**, 109–117.
- Pierce, C.Y., Barr, J.R., Cody, R.B., Massung, R.F., Woolfitt, A.R., Moura, H., Thompson, H.A., Fernández, F.M., 2007. Ambient generation of fatty acid methyl ester ions from bacterial whole cells by direct analysis in real time (DART) mass spectrometry. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 807–809.
- Pineda, F.J., Antoine, M.D., Demirev, P.A., Feldman, A.B., Jackman, J., Longenecker, M., Lin, J.S., 2003. Microorganism Identification by Matrix-Assisted Laser/Desorption Ionization Mass Spectrometry and Model-Derived Ribosomal Protein Biomarkers. *Anal. Chem.* **75**, 3817–3822.
- Posteraro, B., De Carolis, E., Vella, A., Sanguinetti, M., 2013. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Rev. Proteomics* **10**, 151–164.
- Ramirez, J., Fenselau, C., 2001. Factors contributing to peak broadening and mass accuracy in the characterization of intact spores using matrix-assisted laser desorption/ionization coupled with time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **36**, 929–936.
- Rampitsch, C., Bykova, N.V., McCallum, B., Beimcik, E., Ens, W., 2006. Analysis of the wheat and *Puccinia triticina* (leaf rust) proteomes during a susceptible host-pathogen interaction. *Proteomics* **6**, 1897–1907.
- Raus, M., Šebela, M., 2013. BIOSPEAN: A Freeware Tool for Processing Spectra from MALDI Intact Cell/Spore Mass Spectrometry. *J. Proteomics Bioinform.* **2013**, 283–287.
- Ruelle, V., El Moulaj, B., Zorzi, W., Ledent, P., Pauw, E.D., 2004. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 2013–2019.
- Ryzhov, V., Fenselau, C., 2001. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Anal. Chem.* **73**, 746–750.
- Ryzhov, V., Hathout, Y., Fenselau, C., 2000. Rapid Characterization of Spores of *Bacillus cereus* Group Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3828–3834.
- Santos, C., Paterson, R.R.M., Venâncio, A., Lima, N., 2010. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 375–385.
- Šebela, M., Štosová, T., Havliš, J., Wielsch, N., Thomas, H., Zdráhal, Z., Shevchenko, A., 2006. Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* **6**, 2959–2963.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.-E., Rolain, J.M., Raoult, D., 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **49**, 543–551.
- Shaw, E.I., Moura, H., Woolfitt, A.R., Ospina, M., Thompson, H.A., Barr, J.R., 2004. Identification of biomarkers of whole *Coxiella burnetii* phase I by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* **76**, 4017–4022.

- Shevchenko, A., Tomas, H., Havliš, J., Olsen, J.V., Mann, M., 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856–2860.
- Schägger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368–379.
- Scholl, P.F., Leonardo, M.A., Rule, A.M., Carlson, M.A., Antoine, M.D., Buckley, T.J., 1999. The development of matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-Flight mass spectrometry for the detection of biological warfare agent aerosols. *Johns Hopkins Apl Tech. Dig.* **20**, 343–351.
- Siuzdak, G., Bothner, B., Yeager, M., Brugidou, C., Fauquet, C.M., Hoey, K., Change, C.-M., 1996. Mass spectrometry and viral analysis. *Chem. Biol.* **3**, 45–48.
- Song, Y., Talaty, N., Datsenko, K., Wanner, B.L., Cooks, R.G., 2009. In vivo recognition of *Bacillus subtilis* by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). *The Analyst* **134**, 838–841.
- Sporns, P., Wang, J., 1998. Exploring new frontiers in food analysis using MALDI-MS. *Food Res. Int.* **31**, 181–189.
- Staats, M., Baarlen, P. van, Kan, J.A.L. van, 2005. Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 333–346.
- Šulc, M., Pešlová, K., Žabka, M., Hajdúch, M., Havlíček, V., 2009. Biomarkers of *Aspergillus* spores: Strain typing and protein identification. *Int. J. Mass Spectrom., Ion-molecule and ion-surface interactions: A special issue honoring Zdenek Herman on the occasion of his 75th birthday* **280**, 162–168.
- Šedo, O., Sedláček, I., Zdráhal, Z., 2011. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. *Mass Spectrom. Rev.* **30**, 417–434.
- Takáts, Z., Wiseman, J.M., Gologan, B., Cooks, R.G., 2004. Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. *Science* **306**, 471–473.
- Tavares, S., Ramos, A.P., Pires, A.S., Azinheira, H.G., Caldeirinha, P., Link, T., Abranches, R., Silva, M. do C., Voegelé, R.T., Loureiro, J., Talhinas, P., 2014. Genome size analyses of Pucciniales reveal the largest fungal genomes. *Front. Plant Sci.* **5**, 422.
- Thara, V.K., Fellers, J.P., Zhou, J.-M., 2003. In planta induced genes of *Puccinia triticina*. *Mol. Plant Pathol.* **4**, 51–56.
- Thomas, J.J., Falk, B., Fenselau, C., Jackman, J., Ezzell, J., 1998. Viral characterization by direct analysis of capsid proteins. *Anal. Chem.* **70**, 3863–3867.
- Vaidyanathan, S., Rowland, J.J., Kell, D.B., Goodacre, R., 2001. Discrimination of Aerobic Endospore-forming Bacteria via Electrospray-Ionization Mass Spectrometry of Whole Cell Suspensions. *Anal. Chem.* **73**, 4134–4144.
- Vaidyanathan, S., Winder, C.L., Wade, S.C., Kell, D.B., Goodacre, R., 2002. Sample preparation in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of whole bacterial cells and the detection of high mass (>20 kDa) proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 1276–1286.
- van Veen, S.Q., Claas, E.C.J., Kuijper, E.J., 2010. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 900–907.

- Vargha, M., Takáts, Z., Konopka, A., Nakatsu, C.H., 2006. Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *J. Microbiol. Methods* **66**, 399–409.
- Wang, Z., Russon, L., Li, L., Roser, D.C., Long, S.R., 1998. Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 456–464.
- Webster, J., Weber, R., 2007. Introduction to Fungi, 3 edition. ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK ; New York.
- Welham, K.J., Domin, M.A., Johnson, K., Jones, L., Ashton, D.S., 2000. Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 307–310.
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., Schubert, S., 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 965–974.
- Williams, T.L., Andrzejewski, D., Lay Jr., J.O., Musser, S.M., 2003. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI-TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 342–351.
- Winkler, M.A., Uher, J., Cepa, S., 1999. Direct Analysis and Identification of *Helicobacter* and *Campylobacter* Species by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **71**, 3416–3419.
- Xu, S., Chen, J., Liu, L., Wang, X., Huang, X., Zhai, Y., 2007. Proteomics Associated with Virulence Differentiation of *Curvularia lunata* in Maize in China. *J. Integr. Plant Biol.* **49**, 487–496.
- Yamashita, M., Fenn, J.B., 1984. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **88**, 4451–4459.
- Zhang, F., Zhong, H., Han, X., Guo, Z., Yang, W., Liu, Y., Yang, K., Zhuang, Z., Wang, S., 2003. Proteomic profile of *Aspergillus flavus* in response to water activity. *Fungal Biol.* **119**, 114–124.

## **ŽIVOTOPIS**

Jméno a příjmení  
Rodné příjmení

**JANA BEINHAUER  
CHALUPOVÁ**

Pohlaví

žena

Národnost

česká

Datum narození

15. 9. 1985

Místo narození

Nový Jičín

Adresa

Horní Bašta 281, 742 66 Štramberk

Telefon

+420 605 083 958

E-mail

jana.beinhauer@upol.cz

### **Pracovní zkušenosti**

1. 10. 2011 – dosud

UP v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie,  
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc  
akademický vědecký pracovník /Ph.D. student  
(úvazek 0,5; od 1. 9. 2015 úvazek 1,0)

### **Vzdělání**

26. 8. 2011 – dosud

UP v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie,  
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc  
prezenční Ph.D. studium oboru Biochemie

31. 8. 2009 – 25. 5. 2011

UP v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie,  
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc navazující magisterské studium  
oboru Biochemie, studium ukončeno SZZ

24. 8. 2006 – 8. 6. 2009

UP v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie,  
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc  
bakalářské studium oboru Biochemie, studium ukončeno SZZ

31. 8. 2005 – 27. 10. 2006

OU v Ostravě, Filozofická fakulta, Reální 5, 701 03 Ostrava  
bakalářské studium oboru Francouzština ve sféře podnikání  
(studium přerušeno)

2001 - 2005

Gymnázium v Novém Jičíně, Palackého 50, 741 01 Nový Jičín  
všeobecné gymnázium, studium ukončeno maturitní zkouškou

### **Odborná praxe**

18. 8. - 5. 9. 2008

Klinické laboratoře Onkologického centra J. G. Mendela v  
Novém Jičíně  
P&R LAB a.s., Máchova 2129/32, 741 01 Nový Jičín



**Praktické zkušenosti** znalost biochemických metod: elektromigrační, chromatografické a hmotnostně-spektrometrické metody

**Publikace a rukopisy v přípravě, jež jsou součástí disertační práce:**

1. Chalupová J., Raus M., Sedlářová M., Šebela M. (2014) Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances* 32: 230-241. **IF 9,015**
2. Beinbauer J., Lenobel R., Loginov D., Chamrád I., Řehulka P., Sedlářová M., Marchetti-Deschmann M., Allmaier G., Šebela M. (rukopis článku v přípravě) Identification of *Bremia lactucae* and *Oidium neolycopersici* proteins extracted for intact spore MALDI mass spectrometry biotyping.
3. Beinbauer J., Raus M., Hanzalová A., Horčíčka P., Šebela M. (rukopis článku v přípravě) Intact spore MALDI-TOF mass spectrometry and proteomic analysis of *Puccinia* pathogenic fungi.

**Publikace, jež nejsou součástí disertační práce:**

1. Řehulková H., **Chalupová J.**, Šebela M., Řehulka P. (2010) A convenient purification and preconcentration of peptides with  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix crystals in a pipette tip for matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry *J. Mass Spectrom.* 45, 104-11. **IF 2,379**
2. **Chalupová J.**, Sedlářová M, Helmel M, Řehulka P, Marchetti-Deschmann M, Allmaier G, Šebela M. (2012) MALDI-based intact spore mass spectrometry of downy and powdery mildews. *J. Mass Spectrom.* 47, 978-986. **IF 2,379 (výsledky mé diplomové práce)**
3. **Beinbauer J.**, Liangqiao B., Fan H., Šebela M., Schug K. A. Bulk derivatization and cation exchange restricted access media-based trap-and-elute liquid chromatography-mass spectrometry method for trace determination of estrogens in serum. *Anal Chim Acta* 858, 74-81. **IF 4,513 (výsledky ze stáže na Texaské Univerzitě v Arlingtonu, Texas, USA)**

**Ocenění**

- Cena ředitele Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum za vědeckou publikaci (2014)

**Projekty:**

- 1) NPU I, LO1204, Udržitelný rozvoj výzkumu Centrum regionu Haná, (2014-2018)
- 2) CZ.1.05./2.1.00/01.0007, OpVaVpI projekt Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
- 3) 14-28443S, Temná hmota jádra rostlinné buňky - charakterizace jaderných proteinů; GAČR

- 4) 7AMB12AT018, Biotypizace fytopatogenů kulturních rostlin pomocí hmotnostní spektrometrie a identifikace proteinových markerů infekce, projekt česko-rakouské vědecké spolupráce; MŠMT ČR/OeAD – Rakousko
- 5) CZ.1.07/2.2.00/28.0184, OpVK projekt Biotrend (Inovace vzdělávání v chemii a biologii s ohledem na aktuální trendy v biomedicinálním výzkumu); MŠMT/EU
- 6) KONTAKT MEB061003, Identifikace a biotypizace fytopatogenů kulturních rostlin pomocí hmotnostní spektrometrie; Projekt spolupráce Česká Republika- Rakousko
- 7) CZ.1.07/2.4.00/31.0130, OpVK projekt ChemPharmNet („Rozvoj a posílení vzájemné spolupráce mezi akademickými i soukromými subjekty se zaměřením na chemický a farmaceutický výzkum“) – vykonání 6měsíční stáže v USA

### Stáže

11. 10. – 11. 12. 2010	Ústav chemických technologií a analytiky
1. 3. – 31. 3. 2011	Technické univerzity ve Vídni, Institut chemických
18. 11. – 11. 12. 2012	technologií a analytiky Technické univerzity ve Vídni
18. 2. – 18. 3. 2013	
19. 6. – 15. 12. 2013	Oddělení chemie a biochemie, Texaská Univerzita v Arlingtonu, Texas, USA.

### Příspěvky na konferencích

1. Šebela M., **Chalupová J.**, Sedlářová M., Řehulka P., Helmél M., Marchetti-Deschmann M., Allmaier G.: Identification and biotyping of phytopathogens using intact cell MALDI-TOF mass spectrometry. *MassSpec-Forum-Vienna-2011, 22<sup>nd</sup> Mass Spectrometric Discussion Meeting*, Vídeň 2011, Book of abstracts, pp. 12, prezentace formou přednášky M. Šebely
2. **Chalupová J.**, Sedlářová M., Šebela M., Řehulka P., Helmél M., Marchetti-Deschmann M., Allmaier G. Identification and biotyping of phytopathogens using MALDI-TOF mass spectrometry. 5<sup>th</sup> Central and Eastern European Proteomic Conference, 19. – 22. 9. 2011, Praha, prezentace formou přednášky M. Šebely
3. **Chalupová J.**, Sedlářová M., Helmél M., Řehulka P., Marchetti-Deschmann M., Allmaier G., Šebela M. Identification of downy and powdery mildews using intact spore MALDI-TOF mass spectrometry. 30<sup>th</sup> Informal Meeting on Mass Spectrometry, 29. 4. – 3. 5. 2012, Olomouc, poster P69, **prezentace formou plakátového sdělení J. Chalupové**
4. Helmél M; **Chalupová J.**; Sedlářová M; Řehulka P; Šebela M; Hofer J; Balika W; Koranda M; Marchetti-Deschmann M; Allmaier G. Differentiation and biotyping of downy and powdery mildews using intact cell MALDI mass spectrometry on disposable polymer targets, 60<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 20. – 24. 5. 2012, Vancouver, Canada, poster WP219, prezentace formou plakátového sdělení M. Helmél

5. **Chalupová J.**, Chamrád I, Helmel M, Řehulka P, Sedlářová M, Marchetti-Deschmann M, Allmaier G, Šebela M. Development of a methodology for the identification of marker proteins from the spore surface structures of phytopathogens. 31<sup>th</sup> Informal Meeting on Mass Spectrometry, 5. 5. – 8. 5. 2013, Palermo, poster P25, **prezentace formou plakátového sdělení J. Chalupové**
6. **Chalupová J.**, Liangqiao B., Fan H., Šebela M., Schug K. A. (2013) Bulk derivatization and cation exchange restricted access media-based trap-and-elute liquid chromatography-mass spectrometry method for trace determination of estrogens in mouse male serum. 69<sup>th</sup> Southwestern Regional Meeting of the American Chemical Society, 16. – 20. 11. 2013, Waco, Texas, USA, poster 508, **prezentace formou plakátového sdělení J. Chalupové**
7. **Chalupová J.**, Liangqiao B., Fan H., Šebela M., Kukula M., Barrera J., Schug K. A. (2014) Validated method for quantification of ultra-trace estrogens in serum by bulk derivatization and direct cation exchange trap-and-elute LC-MS/MS. 32<sup>nd</sup> Informal Meeting on Mass Spectrometry, 11. 5. – 14. 5. 2014, Balatonszazsó, Maďarsko, poster MoPo10, **prezentace formou plakátového sdělení J. Chalupové**
8. Liangqiao B., **Chalupová J.**, Fan H., Šebela M., Kukula M., Barrera J., Schug K. A. (2014) On-Line Pre-Treatment and Quantification of Trace Estrogens in Serum by Bulk Derivatization and Direct Cation Exchange Trap-and-Elute LC/MS/MS. 62<sup>nd</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 15. – 19. 6. 2014, Baltimore, Maryland, USA, poster TP 490, prezentace formou plakátového sdělení Liangqiao B.
9. D. S. Loginov., **J. Chalupová**, R. Lenobel, M. Šebela. (2014) A proteomic study on the oomycete *Bremia lactucae*. „8<sup>th</sup> Central and Eastern European Proteomics Conference (CEEPC) meets 2<sup>nd</sup> International Metabolomics Austria (InMetA)”, 30. 6. – 4. 7. 2014, Viděň, Rakousko, **prezentace formou plakátového sdělení J. Chalupové**
10. **J. Beinhauer**, A. Hanzalová, P. Horčíčka, M. Šebela (2015) Intact spore MALDI-TOF mass spectrometry of Puccinia pathogenic fungi. 33<sup>rd</sup> Informal Meeting on Mass Spectrometry, 10. 5. – 13. 5. 2015, Szczyrk, Polsko, poster TuPo14, **prezentace formou plakátového sdělení J. Beinhauer**
11. **J. Beinhauer**, A. Hanzalová, P. Horčíčka, M. Šebela (2015) Intact spore MALDI-TOF mass spectrometry of Puccinia pathogenic fungi. *Plant biotechnology: Green for Good III*, 15. 6. – 18. 6. 2015, Olomouc, Česká republika, poster 45, **prezentace formou plakátového sdělení J. Beinhauer**

#### **Pedagogická činnost**

- výuka předmětu Praktická cvičení z biochemie (KBC/BCHC)
- výuka předmětu Experimentální metody biochemie (KBC/EMB)

**Příloha 1: Chalupová J., Raus M., Sedlářová M., Šebela M. (2014) Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances* 32: 230-241.**

**Příloha 2: Beinbauer J., Lenobel R., Loginov D., Chamrád I., Řehulka P., Sedlářová M., Marchetti-Deschmann M., Allmaier G., Šebela M. (rukopis článku v přípravě) Identification of *Bremia lactucae* and *Oidium neolycopersici* proteins extracted for intact spore MALDI mass spectrometry biotyping**

**Příloha 3: Beinhauer J., Raus M., Hanzalová A., Horčíčka P., Šebela M. (rukopis článku v přípravě) Intact spore MALDI-TOF mass spectrometry and proteomic analysis of *Puccinia* pathogenic fungi**