

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Identifikace rostlinných patogenů pomocí hmotnostní  
spektrometrie**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Michaela Šmoldasová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Filip Dyčka, Ph.D.</b>
Rok:	2016

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

.....

## **Poděkování**

Velmi děkuji svému školiteli Mgr. Filipu Dyčkovi, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení a čas strávený nad mojí diplomovou prací. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Dmitry Loginovovi, Ph.D. za rady a připomínky při řešení experimentální části práce a za poskytnutí konidií z houby *Botrytis fabae*. Mé díky patří také Mgr. Ivu Chamrádovi, Ph.D. a Mgr. Renému Lenobelovi, Ph.D. za analýzu výsledků prostřednictvím ESI MS a doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za pomoc při kultivaci hub. Poděkování patří také kolektivu pracovníků Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum za ochotu pomoci a vlídný přístup. Také bych touto cestou chtěla poděkovat rodině a příteli za podporu během mého studia.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Michaela Šmoldasová
Název práce	Identifikace rostlinných patogenů pomocí hmotnostní spektrometrie
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centrum regionu Haná
Vedoucí práce	Mgr. Filip Dyčka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

### Abstrakt

Fytopatogenní houby jsou příčinou velké řady onemocnění rostlin. Do této skupiny patří také houby rodu *Botrytis*, které na napadených rostlinách způsobují převážně plísně, vadnutí a hnilobu. Hlavním cílem této diplomové práce bylo studium proteinového profilu u *Botrytis cinerea* a *Botrytis tulipae*, se zaměřením se na struktury pomáhající houbě šíření infekce a přežití nepříznivých podmínek jako jsou konidie a sklerocie. Ke studiu byly zvoleny dva různé přístupy. Prvním byla rychlá identifikace mikroorganismů měřením intaktních buněk a proteinů prostřednictvím hmotnostní spektrometrie s ionizací za účasti matrice. Jako nejvhodnější matrice pro měření intaktních konidií a jejich proteinů u rodu *Botrytis* byla vybrána směs kyseliny ferulové a sinapové. Srovnáním hmotnostních spekter dvou druhů hub, *Botrytis cinerea* a *Botrytis fabae*, bylo možné tyto organismy stejného rodu rychle odlišit. Dalším využitým přístupem byla celková analýza proteomu konidií a sklerocií hub. Po sběru biologického materiálu a následné extrakci proteinů, bylo využito metod gelové elektroforézy, kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie pro identifikaci a charakterizaci proteinů. Pomocí bioinformatických nástrojů pro predikci funkce proteinů bylo zjištěno, že značná část nalezených proteinů je zapojená do metabolických procesů organismu.

Klíčová slova	<i>Botrytis</i> , fytopatogenní houby, hmotnostní spektrometrie, proteomika
Počet stran	65
Počet příloh	1
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Michaela Šmoldasová
Title	Identification of phytopathogens by mass spectrometry
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry Department of protein biochemistry and proteomics, Centre of the Region Haná
Supervisor	Mgr. Filip Dyčka, Ph.D.
The year of presentation	2016

### Abstract

Phytopathogenic fungi cause a wide range of plant diseases. The fungus *Botrytis* is widespread phytopathogen, which is responsible for mold, wilt and rot on infected plants. The main aim of this thesis was to study the protein profile of *Botrytis cinerea* and *Botrytis tulipae* with focus on konidia and sclerotia, structures playing a role in a spread of infection and survive in adverse conditions. Two different approaches were selected for study of *Botrytis* proteome. The first was the rapid identification of microorganisms by measurement of intact konidia and proteins by matrix assisted laser ionization mass spectrometry. The mixture of ferulic and sinapinic acid were selected as the most suitable matrix for the measurement of intact cells and their proteins of *Botrytis*. The rapid distinction between two fungal species of the same genus, *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*, were done by comparison of the mass spectra. Another approach used in the thesis was the shotgun proteome analysis of fungal konidia and sclerotia. After harvesting the biological material and the subsequent extraction of the proteins, the gel electrophoresis, liquid chromatography and mass spectrometry methods were used for identification and characterization of proteins. With bioinformatics tools to predict the function of proteins was found that the most proteins are involved in the metabolic processes of the organism.

Keywords	<i>Botrytis</i> , mass spectrometry, phytopathogenic fungi, proteomics
Number of pages	65
Number of appendices	1
Language	Czech

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b>	<b>2</b>
2.1 Fytopatogenní houby	2
2.2 Houby rodu <i>Botrytis</i>	4
2.2.2 Ochrana rostlin	7
2.2.3 Zástupci rodu <i>Botrytis</i>	7
2.3 Proteomika	8
2.3.1 Metody extrakce a precipitace proteinů	8
2.3.2 Separační techniky v proteomice	9
2.3.2.1 Elektforetické metody	9
2.3.2.2 Kapalinová chromatografie	10
2.3.3 Štěpení proteinů	11
2.3.4 Hmotnostní spektrometrie	11
2.4 Proteomické studium hub a kvasinek	14
2.4.1 Analýza intaktních buněk a proteinů pomocí MS	15
2.4.1.1 Příprava vzorku pro analýzu	15
2.4.1.2 Typ matrice a metody nanášení vzorku	16
2.4.1.3 Identifikace a charakterizace hub	17
2.4.2 Studium proteomu	18
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>20</b>
3.1 Materiál a přístroje	20
3.1.1 Chemikálie	20
3.1.2 Biologický materiál	20
3.1.3 Přístroje	20
3.2 Přehled použitých metod	21
3.3 Pěstování hub <i>Botrytis cinerea</i> a <i>Botrytis tulipae</i>	23
3.4 Měření intaktních buněk a proteinů pomocí MALDI MS	23
3.5 Proteomické studium konidií a sklerocií hub rodu <i>Botrytis</i>	24
3.5.1 Extrakce proteinů z buněčných struktur	24
3.5.2 Měření koncentrace proteinů	25
3.5.3 Jednorozměrná gelová elektroforéza	25
3.5.4 Štěpení proteinů v gelu	26

3.5.5 Štěpení proteinů v roztoku	27
3.5.6 Purifikace a separace peptidů	27
3.5.7 Identifikace proteinů pomocí MALDI MS	30
3.5.8 Identifikace proteinů pomocí nanoLC-ESI MS	30
3.5.9 Zpracování a analýza dat	32
<b>4 VÝSLEDKY</b>	<b>34</b>
4.1 Pěstování biologického materiálu	34
4.2 Detekce intaktních konidií a proteinů ve směsi s matricí	35
4.3 Studium proteomu hub rodu <i>Botrytis</i>	39
4.3.1 Separace proteinů jednorozměrnou gelovou elektroforézou	39
4.3.2 Identifikace proteinů prostřednictvím MALDI-TOF MS	41
4.3.3 Identifikace proteinů prostřednictvím nanoLC-ESI MS	43
4.3.4 Predikce funkce identifikovaných proteinů	45
<b>5 DISKUSE</b>	<b>49</b>
<b>6 ZÁVĚR</b>	<b>52</b>
<b>7 LITERATURA</b>	<b>53</b>
<b>8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b>	<b>60</b>
<b>9 PŘÍLOHY</b>	<b>61</b>

## Cíle práce

- Vypracování literární rešerše pojednávající o fytopatogenních houbách
- Vypracování literární rešerše na téma proteomické studium mikroorganismů
- Pěstování hub rodu *Botrytis* za podmínek efektivního růstu struktur pro přežití, konidií a sklerocií
- Měření intaktních konidií *Botrytis cinerea* pomocí hmotnostní spektrometrie
- Extrakce proteinů z konidií a sklerocií
- Studium proteinového profilu *Botrytis cinerea* a *Botrytis tulipae*



# 1 ÚVOD

Fytopatogenní houby jsou příčinou velké řady rostlinných chorob a již po mnoho let představují velkou hrozbu v zemědělství. Během napadení hostitele využívají rozmanité způsoby překonání obranných systémů rostlin. Tyto infekční mechanismy hub jsou podrobovány komplexním studiím.

Za velmi důležité pro patogenezí jsou považovány houbové konidie, jelikož jejich klíčení je jedním z prvních kroků při infekci hostitele (Gonzalez-Fernandez a Jorriin-Novo, 2012). Tyto struktury jsou zajímavé pro proteomické studium vzhledem k přítomnosti proteinů podílejících se na životaschopnosti a patogenezí vláknitých hub.

V současné době je věnováno více pozornosti analýze mycelia a sekretomu u hub než sktrukturám podílejících se na přežití, mezi které patří konidie a při nehostinných podmínkách i klidová forma sklerocie. Pravděpodobně je to dáno obtížným získáním dostatečného množství materiálu pro spolehlivou analýzu. Jako nepostradatelná pro identifikaci proteinů je využívána hmotnostní spektrometrie (Han *et al.*, 2008). Vzhledem k jejímu vývoji, v podobě zvýšení citlivosti a rozlišení, dochází k možnosti překonání omezení v nedostatku materiálu (Loginov a Šebela, 2016).

Tato práce se zabývá proteomickým studiem struktur důležitých k přežití u fytopatogenních hub rodu *Botrytis*. Byly zvoleny dva přístupy analýzy konidií a sklerocií. Prvním z nich je měření intaktních konidií za účelem rychlé identifikace patogenu. Získaná hmotnostní spektra proteinových profilů z povrchu buněk jsou srovnávána a patogen je detekován podle charakteristických iontů. Druhým přístupem je studium proteomu konidií a sklerocií za využití postupné extrakce proteinů. Tento výzkum je důležitý pro lepší pochopení vývoje patogenních hub a mechanismu infekce (Šulc *et al.*, 2009).

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Fytopatogenní houby

Houby představují velkou skupinu eukaryotických organismů dříve řazenou k rostlinám, ale nyní již tvoří samostatnou říši. Živí se dvěma odlišnými způsoby, a to saprofytický, kdy živiny získávají rozkladem odumřelých těl rostlin a živočichů, nebo paraziticky. Podle typu parazitismu a postupu infekce rozlišujeme houby na nekrotrofní, biotrofní a hemibiotrofní. Nekrotrofní parazité narušují buněčnou stěnu rostlin pomocí enzymů nebo toxinů, čímž způsobují odumírání tkáně. Metabolity rostlinných buněk poté využívají pro svoji výživu. Biotrofní parazité potřebné živiny získávají také z rostlinných buněk, které ale pouze oslabují. Většina zástupců této skupiny jsou hemibiotrofní parazité, což je kombinovaná forma, kdy v první fázi dochází k zisku živin z živých buněk, poté ale nastává jejich poškození a odumírání. Z téměř 100 tisíc popsaných druhů hub se pouze 10 tisíc živí parazitismem (Prell a Day, 2001). Patogenní houby v dnešní době přitahují řadu výzkumných skupin, což dokazuje rostoucí počet publikací v databázi PubMed, kdy od roku 2007 bylo publikováno více než 2000 studií ročně s touto tematikou (Loginov a Šebela, 2016).

Fytopatogenní houby parazitují na rostlinách a způsobují velkou řadu rozmanitých symptomů na různých částech těla hostitele. Některé napadají a kolonizují všechny tkáně, zatímco jiné se specializují jen na určité orgány. Přibližně 10 % všech druhů hub může způsobit onemocnění rostlin (Horbach *et al.*, 2011). Tyto patogeny našly prostředek jak překonat obranné mechanismy a dovedou jim zcela přizpůsobit svoji infekční strategii. Mechanismů infekce je velká řada a již bylo provedeno mnoho komplexních výzkumů na toto téma. Studium bylo usnadněno rozvojem „omických“ věd, především proteomika hraje velmi důležitou roli (Loginov a Šebela, 2016). Prvním obranným mechanismem rostlin je jejich buněčná stěna, která se skládá z polysacharidů, proteinů a aromatických polymerů. K překonání této bariéry jsou patogeny schopny produkovat enzymy (Kubicek *et al.*, 2014), které degradují složky buněčné stěny, například kutinasa a lipasa degradují kutin. Bez jejich přítomnosti houbové spory selhávají v průniku do buňky, kvůli tomu je přítomnost enzymů vyžadována minimálně v prvních stádiích hostitelské infekce (Agrios, 2005). Při poranění buňky dochází také k uvolnění sacharidů potřebných pro růst a rozmnožování parazitů (Gibson *et al.*, 2011). Kromě enzymů mohou patogeny

produkovat také rozmanité efekty (Giraldo a Valent, 2013) a toxiny (Colmenares *et al.*, 2002).

Pro patogenezi jsou velmi důležité houbové konidie (Gonzalez-Fernandez a Jorri-  
Novo, 2012), jelikož po uchycení na rostlině je začátek jejich klíčení prvním krokem  
k hostitelské infekci. Tyto struktury byly zkoumány již mnoha způsoby, ale základní  
princip zůstává stále stejný. Jedná se o kultivaci houby a sklizeň vyšetřovaných  
struktur, jejich narušení, extrakci a separaci proteinů, následované analýzou pomocí  
hmotnostní spektrometrie (MS; Barros *et al.*, 2010; Suh *et al.*, 2012;  
El-Akhal *et al.*, 2013). Nejčastěji se ke kultivaci využívá tuhých agarových médií,  
ale jsou známé i jiné metody, například rod *Blumeria graminis* byl pěstován přímo  
na hostitelských rostlinách (Noir *et al.*, 2009) a rod *Nomuraea rileyi* dokonce  
na povrchu mrtvého bource morušového (Qin *et al.*, 2009). Znalost struktury konidií  
a procesu jejich formování a klíčení vede k efektivnější ochraně před tímto patogenem.  
Přestože struktura spor v klidové i klíčící fázi již byla studována, pro lepší pochopení  
průběhu infekce je potřeba dalšího studia (Šulc *et al.*, 2009).

Již po mnoho let jsou rostlinné patogenní houby poměrně velkou hrozbou  
v zemědělství, jelikož plísňová onemocnění způsobují značné ekonomické ztráty.  
Z tohoto důvodu je na rozvoj fungicidů každoročně vynakládáno mnoho finančních  
prostředků (Yoon *et al.*, 2013). Vývoj efektivní ochrany rostlin ale zahrnuje dobré  
znalosti patogenního cyklu a faktorů virulence. Dříve hojně používané syntetické  
fungicidy účinně kontrolovaly působení patogenních hub. Jejich opakované použití má  
ale za následek jak vyvinutí rezistence, tak negativní ovlivnění biologických systémů  
včetně nežádoucích účinků na necílové organismy a lidské zdraví. Ve snaze snížit  
četnost jejich aplikace došlo k rozvoji přírodních produktů, které nejsou škodlivé  
pro člověka ani pro životní prostředí (Yoon *et al.*, 2013). Mezi ekologicky šetrné  
biopesticidy využívané pro vývoj fungicidů patří například cinnamaldehyd  
(Wang *et al.*, 2005) a laminarin (Hu *et al.*, 2011).

Velká pozornost je také věnována biologické ochraně rostlin prostřednictvím  
mykoparazitických hub, které jsou přirozenými nepřáteli fytopatogenních hub.  
Při tomto způsobu parazitismu dochází k výživové závislosti jednoho druhu  
na druhém. K mykoparazitické degradaci v půdě dochází díky lytickým enzymům,  
které rozpouštějí buněčnou stěnu mycelií a klidových struktur (Ondráčková, 2014).  
Mezi významné antagonisty fytopatogenů můžeme zařadit houby rodu *Trichoderma*  
*spp.* (Harman *et al.*, 2004), *Coniothyrium minitans* (Gerlagh *et al.*, 1996), *Pythium*

*oligandrum* (Lewis *et al.*, 1989) a *Clonostrachys rosea* (Schroers *et al.*, 1999), která rozkládá sklerocie, chlamydospory a oospory u druhů jako *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Bipolaris sorokiniana*, *Colletotrichum spp* a další.

## **2.2 Houby rodu *Botrytis***

Houby rodu *Botrytis* byly objeveny již v roce 1729. Od té doby se staly obecně známé pro jejich destruktivní význam v zemědělství. Mezi vzniklé ztráty patří jak před i po sklizňové škody na kvalitě a množství, tak i náklady vynaložené na ochranu rostlin. Všechny známé druhy jsou důležité rostlinné patogeny vyskytující se převážně v mírném podnebném pásu. Výskyt v tropickém či mrazivém prostředí je poměrně vzácný. Nejlépe se houba šíří za deštivého a chladného počasí okolo 15 °C (Coley-Smith *et al.*, 1980).

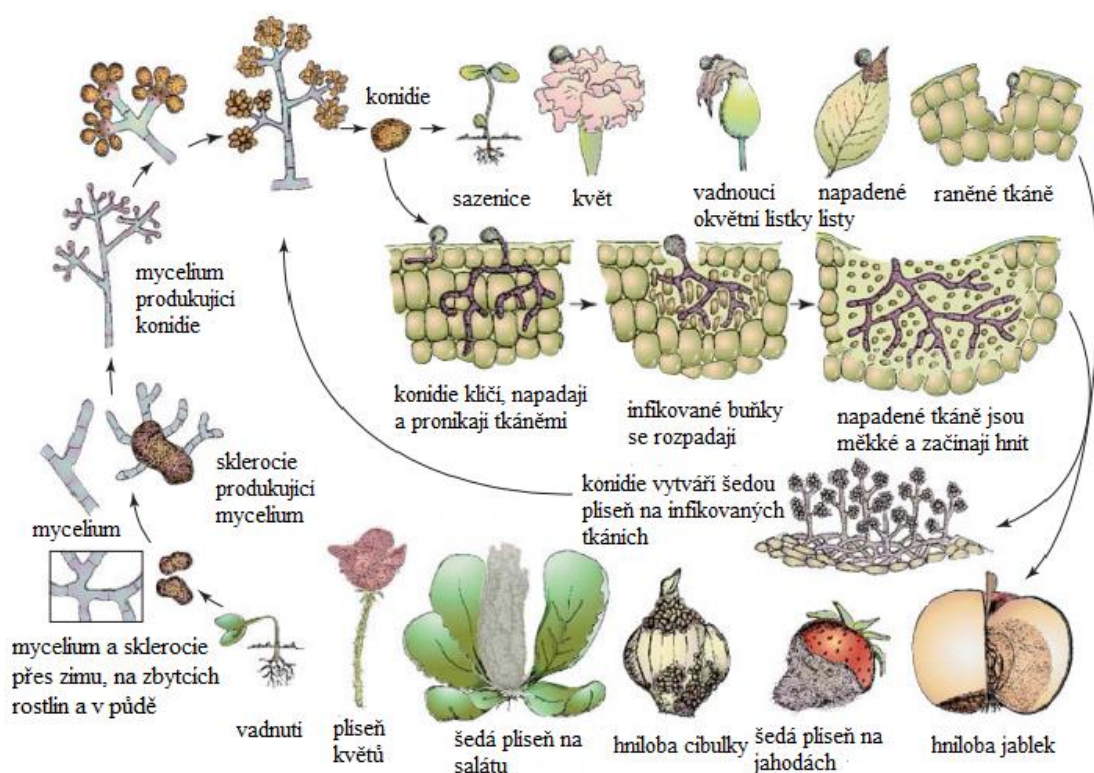
Infekce způsobené kmeny *Botrytis* jsou pravděpodobně ty nejběžnější a nejrozšířenější nemoci zeleniny, ovoce, okrasných květin a polních plodin na světě. Napadení patogenem se nejčastěji projevuje jako plíseň květů, vadnutí, trouchnivění ovoce, hniloba stonku či plodů a skvrny na listech (Obr. 1). Tyto houby jsou nekrotrofní parazité, které způsobují rozpad hostitelské tkáně a její odumírání (Staats *et al.*, 2005). Z nejvážnějších nemocí způsobených patogenem můžeme zmínit šedou plíseň jahod, hroznů a další zeleniny, hnilobu jablek, ale také například plíseň okrasných květin. *Botrytis* způsobuje mimo jiné i sekundární hnilobu ovoce a zeleniny při její přepravě, skladování a na pultech obchodů (Agrios, 2005).



Obr. 1 Příznaky napadení patogenem *Botrytis* u rostlin. (A) hniloba na jablku, (B) šedá plíseň na jahodách, (C) infikované květy pelargonie (D) hniloba a smršťování bobulí u hroznového vína (převzato z Agrios, 2005).

*Botrytis* přezimuje v půdě jako mycelium na hnilých zbytcích rostlin, či ve formě sklerocií, což jsou jedny z hlavních struktur zapojených do přežití hub. Jedná se o zaoblené hyfy se zesílenými buněčnými stěnami a sníženou metabolickou aktivitou. Během vývoje prochází třemi stádii a to iniciací, rozvojem a zráním. Během první fáze dochází ke spojování hyf, následuje růst struktury a posledním krokem je tvorba vnitřních struktur sklerocie (Liang *et al.*, 2010). Jakmile nastanou příznivé okolní podmínky, dochází k růstu, sporulaci, uvolnění konidií, jejich klíčení a průniku do tkání, což způsobí infekci. Během první fáze napadení hostitele dochází k tvorbě hustého mycelia, které v chladném a vlhkém počasí produkuje velké množství konidií, jež poté způsobují další infekci. Rozrůstající se mycelium pokrývá zasažené tkáně

nápadným povlakem šedé plísně. Houba se postupně přesouvá z okvětních lístků do plodů, kde způsobuje hnilobu a může dojít až k destrukci tkání. Napadené plody a stonky jsou měkké, vodnaté a mají světle hnědou barvu. V pozdější fázi napadení se infikované tkáně stávají houbovitými a mají velmi nízkou hmotnost. Infekce podzemních částí rostlin jako jsou cibule, hlízy a kořeny se může začít projevovat, když jsou tyto orgány ještě stále v zemi (Obr. 2; Agrios, 2005).



Obr. 2 Životní cyklus hub rodu *Botrytis* (převzato z Agrios, 2005).

### 2.2.2 Ochrana rostlin

Jedním z kontrolních procesů jak zabránit šíření *Botrytis* je likvidace infikovaných zbytků ze zamořených polí a skladovacích prostor. Stejně tak důležité je vytvoření podmínek pro správné větrání a rychlé sušení rostlin a rostlinných produktů. Při skladování zeleniny, jako je například cibule, je ochrana před patogenem umožněna zvýšenou teplotou až na 50 °C po dobu 2 až 4 dnů, aby se odstranila přebytečná vlhkost. Poté už se zelenina skladuje při nižších teplotách v suchém prostředí. Biologická kontrola fytopatogenu v podobě antagonistů není zatím v praxi příliš využívána. Chemické postřiky rostlin jsou úspěšné jen částečně, a to zejména v chladném a vlhkém prostředí (Agrios, 2005).

### 2.2.3 Zástupci rodu *Botrytis*

V dnešní době je známo 22 druhů hub rodu *Botrytis* (Yohalem *et al.*, 2003). Za nejvýznamnějšího zástupce je považována *Botrytis cinerea*, která má široký rozsah hostitelů. Infikuje více než 240 druhů rostlin (Hahn, 2014), zatímco ostatní *Botrytis* jsou převážně specializované na jeden určitý druh. Například *Botrytis tulipae* infikuje tulipány, *Botrytis fabae* bob obecný a *Botrytis elliptica* lilie (van Baarlen *et al.*, 2007). Jedním z klíčových mechanismů pro rozlišení jednotlivých druhů je jejich schopnost specificky zabít hostitelské buňky (Mansfield a Hutson, 1980; van Baarlen *et al.*, 2004). Další specifitou je účinné překonání toxicity fytoalexinů, které slouží k obraně rostlin. Například bob obecný produkuje skupinu těchto látek, které jsou toxické pro všechny druhy *Botrytis* kromě *B. fabae* (Rossall *et al.*, 1980). Stejně tak cibule tulipánů jsou odolné vůči většině *Botrytis* s výjimkou *B. tulipae* (Bergman *et al.*, 1967).

Ve vlhkém prostředí způsobuje *B. cinerea* šedou plíseň na ovoci, zelenině a okrasných květinách. Ve vinařství je známá ale také jako ušlechtilá plíseň, která vzniká za suchých podmínek. Dochází k odstranění vody z jednotlivých hroznů a ztrátě hmotnosti až o 40 %. Enzymy produkované *B. cinereou* vedou ke změně složení bobulí, zvyšuje se obsah sacharidů a minerálů. Takzvaná botrytizovaná vína mají odlišnou barvu, chuť a vůni, což ocení mnoho spotřebitelů (Li *et al.*, 2008; Lorenzini *et al.*, 2015). Houba *B. tulipae* infikuje tulipány, u nichž dochází k vývoji nemoci známé jako požár tulipánů. Na květech a listech napadených hostitelů se objevují světle hnědé skvrny.

## 2.3 Proteomika

Proteomika je vědní obor zabývající se celkovou analýzou proteinů, kam spadá například studium jejich role při metabolických procesech či určení jejich struktury a vlastností (Blackstock a Weir, 1999). Název proteomika vznikl v roce 1997 odvozením z proteomu (James, 1997), což je soubor všech proteinů nacházejících se v organismu, které jsou exprimovány na základě informace kódované v genomu (Wilkins *et al.*, 1996). Množství proteinů je větší než množství genů, což je způsobeno převážně posttranslačními modifikacemi a alternativním sestřihem genů (Graves a Haystead, 2002). Na rozdíl od genomu je proteom dynamický útvar, jehož složení se neustále mění. Expresí proteinů je ovlivněna také lokací v organismu, stádiem životního cyklu a podmínkami okolního prostředí.

Tento obor má široké uplatnění ve velké řadě odvětví. V medicíně proteomika napomáhá analyzovat příčiny a mechanismy chorob. Díky studiu proteinů a genů bude možné také identifikovat nové potenciální léky pro léčbu řady onemocnění (Vaidyanathan, 2012). V potravinářství sleduje kvalitu a bezpečnost potravin a napomáhá k vývoji nových výrobních procesů. A v neposlední řada má proteomika svoji funkci v průmyslu, zemědělství a ochraně životního prostředí (Chmelík, 2005).

### 2.3.1 Metody extrakce a precipitace proteinů

Proteiny jsou v buňce lokalizovány v různých buněčných strukturách, například membránách a organelách, což ovlivňuje jejich rozpustnost a obtížnost extrakce. Z tohoto důvodu musí vždy docházet k optimalizaci jednotlivých kroků extrakce.

Po sběru biologického materiálu a promytí vzorku vodou za účelem zbavit se zbytků kultivačního média a chemických látek využívaných pro sběr materiálu je prováděna extrakce podle typu vzorku. Při extrakci proteinů prostřednictvím fyzikálních procesů dochází k rozrušení buněčné stěny pomocí například french pressu, sonifikace buněk, homogenizace skleněnými kuličkami (Sun *et al.*, 2006) či homogenizace v třecí misce s tekutým dusíkem. Při poslední zmiňované metodě bývají často při zpracování tkání se silnými buněčnými stěnami použita také abraziva, například písek nebo skleněný prach.

Další způsob extrakce proteinů může být proveden s pomocí extrakčního pufru. Tento pufr ve většině případů obsahuje detergent, například dodecylsírán sodný (SDS), amfoterní pufr a jiné látky, které napomáhají uvolnění proteinů z buněčných membrán



a organel. Velmi častým přídatkem v extrakčních pufrch jsou také soli, například močovina, která podporuje lepší rozpustnost proteinů. Pro extrakci proteinů se využívá velká řada různých pufrů a odlišných postupů. Jako jeden z příkladů může být uveden SDS lyzační pufr, který kromě 2% SDS obsahuje také 40 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl, 10% glycerol a 50 mmol·l<sup>-1</sup> dithiotreitol (DTT; Hurkman a Tanaka, 2007).

S extrakční procedurou je úzce spojena precipitace, která se využívá pro purifikaci proteinů a odstranění sekundárních metabolitů. Metody srážení proteinů ale také slouží k zakoncentrování vzorku před analýzou. Velmi časté je použití kyseliny trifluoroctové (TFA) ve směsi s acetonitrilem (ACN), kdy řada autorů různě modifikuje tuto metodu. Pro precipitaci proteinů se také velmi využívá kyselina trichloroctová (TCA) ve směsi s acetonem (Damerval *et al.*, 1986; Watson *et al.*, 2003), kdy jsou vytvořeny kyselé a hydrofóbní podmínky, které napomáhají zakoncentrování proteinů a odstranění nečistot. Kombinace těchto dvou chemických látek má větší účinnost než použití každé látky samostatně. Nicméně tato metoda má i nevýhody, výsledný pelet je velmi obtížné následně rozpustit a v některých případech může docházet k hydrolyze proteinů v důsledku použití TCA (Chen a Harmon, 2006). Další alternativní metodou je fenolická extrakce, kdy po extrakci fenolem jsou proteiny vysráženy octanem amonným ve směsi s methanolem (Isaacson *et al.*, 2006; Faurobert *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2014). U této metody stejně jako u předchozích metod také dochází k odstranění neproteinových složek ze vzorku, například polysaridů nebo lipidů.

## **2.3.2 Separační techniky v proteomice**

Vzhledem k velké složitosti a dynamičnosti proteomu je vhodné využít několik analytických technik pro jeho komplexní vizualizaci. Mezi základní separační techniky v proteomice patří elektroforetické metody či separace kapalinovou chromatografií (Chen a Harmon, 2006).

### **2.3.2.1 Elektroforetické metody**

Již několik desítek let je jednorozměrná gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (1D PAGE) využívána jako standardní technika pro separaci komplexní směsi proteinů. Extrahované proteiny jsou rozděleny podle mobility v elektrickém poli v gelové matici. Velmi často se využívá 1D SDS-PAGE, kdy detergent SDS vytváří

s proteiny komplexy, čímž způsobuje jejich denaturaci a dává jim uniformní náboj (Laemmli, 1970).

Pro vyšší separační účinek se využívá dvourozměrná (2D) SDS-PAGE, která byla zavedena již v sedmdesátých letech. Při této metodě dochází k separaci bílkovin ve dvou směrech. Proteiny patří mezi amfoterní látky, jejichž náboj závisí na okolním pH. Toho se využívá při isoelektrické fokusaci (IEF), kdy dochází k separaci bílkovin na základě jejich rozdílných isoelektrických bodů (pI). Druhý rozměr poté probíhá na stejném principu jako 1D SDS-PAGE (O'Farrell, 1975; Rabilloud *et al.*, 2009). Tato metoda má velmi dobré rozlišení, reprodukovatelnost a stává se poměrně snadnou, především díky dostupnosti stripů s imobilizovaným pH gradientem o různých délkách a rozmezích pH, jež se využívají na IEF (Chen a Harmon, 2006). K nevýhodám ale patří obtížná detekce proteinů o nízké koncentraci a špatná separace proteinů o vysoké molekulové hmotnosti a vysokém pI (Gygi *et al.*, 2000; Nägele *et al.*, 2004).

### **2.3.2.2 Kapalinová chromatografie**

Kapalinová chromatografie (LC) se běžně využívá jako finální metoda pro separaci a přečištění vzorku před samotnou analýzou na hmotnostním spektrometru. Dělení látek, které jsou rozpuštěny v roztoku, je založeno na principu interakce částic s pevnou stacionární fází nebo kapalnou fází přichycenou na pevném nosiči.

Hydrofóbní interakční chromatografie (HILIC) je technika ve které analyty interagují s hydrofilní stacionární fází. Jejich eluce se provádí hydrofóbní dvousložkovou mobilní fází. Mezi výhody metody HILIC patří zejména dobrá retence pro polární látky. Chromatografie na reverzní fází se využívá pro dělení polárních látek. Stacionární fáze s nepolárním charakterem obahuje dlouhé uhlíkaté řetězce, které jsou navázány na nosič. Zvyšující se délka alkylového řetězce zvětšuje míru retence analytu. Dle počtu uhlíků je sorbent v koloně označován například jako C4, C8 a C18. Další metodou pro dělení látek je iontově výměnná chromatografie (IEC), která je založena na elektrostatických interakcích mezi stacionární fází a opačně nabitými ionty v roztoku. Analyt je z kolony vymýván zvyšující se koncentrací iontů v mobilní fází (Nováková *et al.*, 2013).

### 2.3.3 Štěpení proteinů

Důležitým krokem při analýze proteomu je štěpení proteinů na peptidy pomocí specifických enzymů či reakcí proteinu s chemickými látkami. Nejběžnější metodou je štěpení proteolytickými enzymy, kam patří například trypsin (EC 3.4.21.4), chymotrypsin (EC 3.4.21.1), pepsin (EC 3.4.23.15) nebo elastasa (EC 3.4.21.37). Jedním z nejvyužívanějších enzymů v proteomice je trypsin, který štěpí proteiny od C-konce aminokyselin za lysinem či argininem, nenásleduje-li prolin (Olsen *et al.*, 2004). Tyto aminokyseliny jsou v proteinech poměrně dobře zastoupeny a výsledné peptidy dosahují průměrně délky 14 aminokyselin, což je vhodná velikost pro MS analýzu. Další výhodou tohoto enzymu je vznik dvou pozitivních nábojů, jak na N-konci tak na C-konci peptidu (Burkhart *et al.*, 2012).

Trypsin je řazen mezi serinové proteasy a byl objeven v trávicím systému mnoha obratlovců. Jeho molekulová hmotnost se může lišit v závislosti na organismu, ze kterého byl izolován, jedná se o hmotnost okolo 20 kDa. Teplotní optimum pro správnou funkci štěpení proteinů je 37 °C a rozmezí pH 8 až 8,5 (Olsen *et al.*, 2004).

Alternativou k enzymatickému štěpení proteinů je štěpení chemikáliemi. Bromkyan štěpí proteiny od C-konce za methioninem, 2-nitro-5-thiokyanobenzoová kyselina od N-konce za cysteinem a kyselina mravenčí je schopna rozštěpit peptidovou vazbu mezi prolinem a kyselinou asparagovou. Tyto metody nejsou často používány, jelikož aminokyseliny, které jsou zapojené do štěpení, se v sekvencích proteinů vyskytují s nízkou intenzitou a vzniklé peptidy jsou poměrně dlouhé pro MS analýzu (Li *et al.*, 2001).

### 2.3.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie patří mezi moderní analytické metody, pomocí které se měří přesná molekulová hmotnost, nebo přesněji poměr hmotnosti k náboji ( $m/z$ ). Charakterizace proteinů podle jejich jedinečné molekulové hmotnosti je velmi obtížná v případě měření celých proteinů, jelikož hmotnostní rozdíly mezi různými proteiny podobného složení jsou velmi malé. Z tohoto důvodu se provádí měření peptidů vzniklých enzymatickým štěpením proteinů (McLafferty *et al.*, 2007).

Během analýzy se využívá elektromagnetického pole ve vakuu, molekuly proto musí být ionizovány a převedeny do plynného stavu. Ionizace analytu může probíhat

několika způsoby, například chemická ionizace či ionizace elektronovým paprskem, ale mezi nejvyužívanější způsoby v proteomice patří ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI; Obr. 3) a ionizace elektrosprejem (ESI; Obr. 4; Whitehouse *et al.*, 1985; Karas a Hillenkamp, 1988; Fenn *et al.*, 1989; Walther a Mann, 2010). V roce 2002 dostali John Fenn a Koichi Tanaka Nobelovu cenu za chemii za vývoj posledních dvou zmiňovaných ionizačních technik. Tyto techniky byly pro MS průlomové vzhledem k možnosti ionizace a odpařování bez nežádoucí fragmentace i relativně velkých netěkavých biomolekul, jako jsou proteiny a peptidy (Parker *et al.*, 2010).

Způsob ionizace analytu pomocí MALDI patří mezi měkké ionizační techniky. Během měření je analyt smíchán s matricí, což je malá organická molekula pohlcující většinou UV záření. Po krystalizaci směsi analytu a matrice dojde k ionizaci a odpaření vzorku pomocí laserového paprsku o určité vlnové délce (Hillenkamp *et al.*, 1991; Parker *et al.*, 2010).

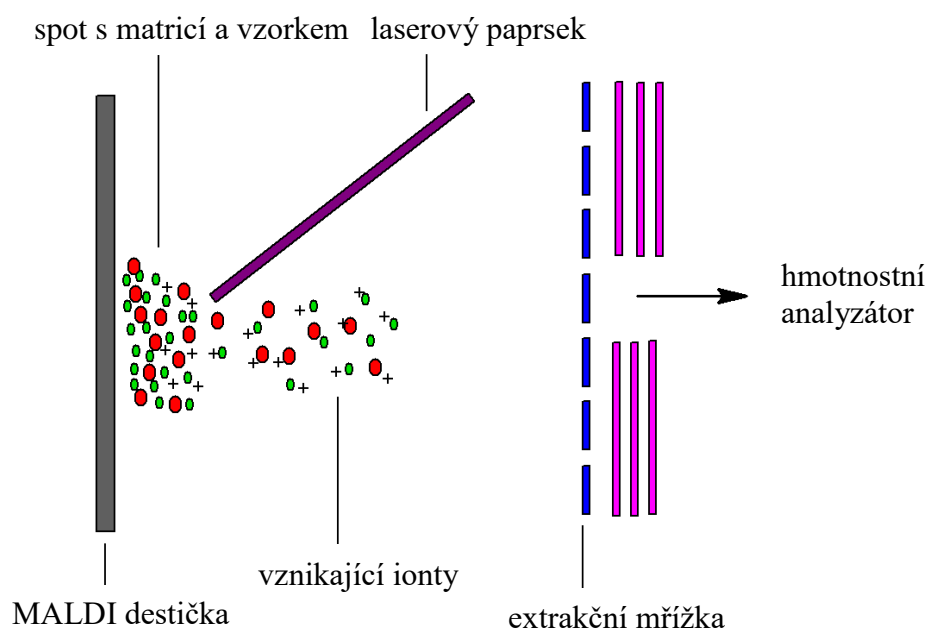
Optimální způsob ionizace pro široké spektrum převážně polárních biomolekul je ESI. Principem této metody je rozprašování malých nabitých kapek analytu na konci kapiláry. Prostřednictvím vysokého napětí v ionizátoru dochází k protonizaci vznikajících kapek vzorku, které se následně postupně vypařují za vzniku velmi malých nabitých molekul (Fenn *et al.*, 1989; Parker *et al.*, 2010).

Vzniklé směsi iontů jsou poté rozděleny v hmotnostním analyzátoru a zaznamenány pomocí detektoru. Mezi nejběžnější analyzátory patří analyzátor doby letu (TOF), kdy jsou ionty pomocí napětí ve zdroji urychleny a výsledný  $m/z$  je úměrný době letu iontu trubicí do detektoru (Hillenkamp *et al.*, 1991). Z ostatních typů analyzátorů můžeme zmínit kvadrupólový analyzátor (Q), kdy dochází k oscilaci iontu mezi čtyřmi kovovými tyčemi, na kterých je napětí. Kmitání je ustálené pouze pro iont s určitým  $m/z$ , který projde analyzátozem až k detektoru. Zatímco ostatní ionty jsou pohlceny tyčemi kvadrupólu (Kuksis a Myher, 1995). Dalším hmotnostním analyzátozem je iontová past (IT), která je složena z kruhové a dvou koncových elektrod mezi které jsou přiváděny ionty. Postupnými změnami napětí jsou ionty podle jejich  $m/z$  vypouštěny na detektor (McLucky *et al.*, 1991, 1994).

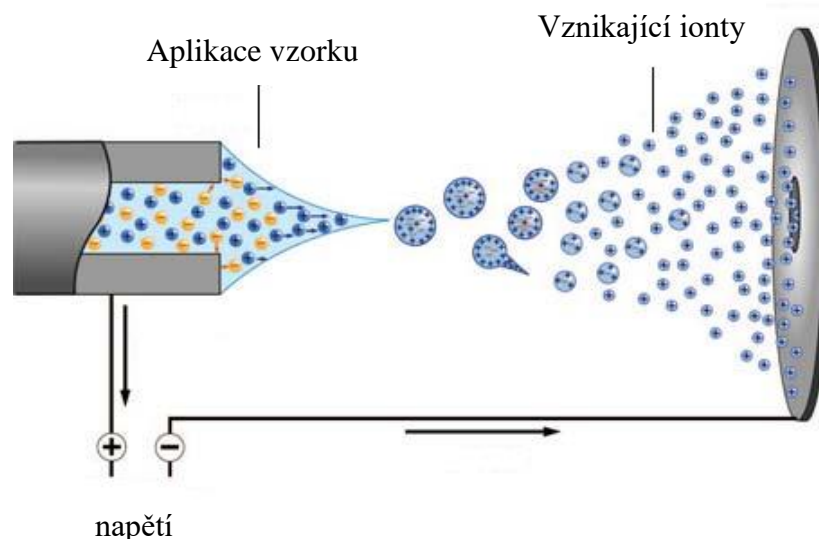
Informaci o sekvenci jednotlivých aminokyselin v proteinu nám poskytuje tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Podle hodnot  $m/z$  jsou prekurzorové ionty měřené pomocí MS izolovány a fragmentovány. Vzniklé fragmenty jsou dále

analyzovány za opětovného využití hmotnostního spektrometru (Yates, 2004). Příkladem mohou být dva analyzátoři doby letu (TOF/TOF) či kvadrupól spojený s analyzátořem doby letu (Q/TOF).

Detekované proteiny, peptidy či sekvence aminokyselin jsou poté identifikovány na základě srovnávání naměřených dat s databází (Walther a Mann, 2010). Mezi nejvyužívanější programy pro vyhledávání peptidů patří program Mascot (Perkins *et al.*, 1999) a program Sequest (Eng *et al.*, 1994). Metody MS jsou velice citlivé, všestranné a velmi často využívané. Hmotnostní spektrometrie má široké uplatnění jak při analýze proteinů a proteinových profilů v biologii a medicíně, tak i při stanovení izotopického složení jednotlivých prvků.



Obr. 3 Princip ionizace metodou MALDI (upraveno podle <http://www.chm.bris.ac.uk>).



Obr. 4 Princip ionizace vzorku metodou ESI (upraveno dle <http://www.waters.com>).

## 2.4 Proteomické studium hub a kvasinek

V posledních letech došlo k velkému rozvoji různých technik, které se řadí do takzvaných „omik“ technik. Jednu z hlavních rolí zde hraje proteomika, díky níž máme k dispozici celou řadu metod sloužících k analýze proteomu. Na molekulární úrovni je proteomika jedním ze základních přístupů k charakterizaci struktury a funkce živých organismů. Vývoj měření mikroorganismů pomocí MS probíhal současně se zdokonalováním této analytické metody (Meuzelaar a Kistemaker, 1973). Vzhledem k pozitivním výsledkům při měření bakterií se začaly pomocí MS stanovovat i houby. Muselo ale dojít k optimalizaci přípravy vzorků, způsobu extrakce, výběru matrice, techniky nanášení a další, kvůli větší velikosti buněk u hub a tužší buněčné stěně oproti bakteriím (Chalupová *et al.*, 2014). Zkoumání proteomu hub bylo také usnadněno přibývajícím výsledky ze sekvenování jejich genomu. Mnoho druhů vláknitých hub jako například *Aspergillus* (Kim *et al.*, 2007) či *Trichoderma* (Grinyer *et al.*, 2004) bylo podrobena proteomickému zkoumání. Většina těchto studií se věnovala převážně houbovému myceliu, nicméně během posledních 10 let se pozornost obrací i na výzkum konidií, které jsou považovány za hlavní zdroj šíření plísňové infekce (Gonzalez-Fernandez a Jorin-Novo, 2012; Loginov a Šebela, 2016). Mezi běžně používané metody studia hub MS patří například rychlá identifikace pomocí profilování povrchových proteinů či studium proteomu po postupné extrakci proteinů z buněk.

### 2.4.1 Analýza intaktních buněk a proteinů pomocí MS

Od objevení MS byla popsána řada metod vhodných pro identifikaci mikroorganismů pomocí profilování povrchových proteinů. Jedním ze způsobů jejich charakterizace je přímé měření neporušených intaktních buněk a konidií získaných například z infikovaných rostlin. Nebo také extrakce proteinů kyselými rozpouštědly (Welham *et al.*, 2000) či rozbití buněk před samotnou analýzou (Hettick *et al.*, 2008), kdy je následně stanovován výsledný extrakt. Rychlým, reprodukovatelným, přesným a efektivním prostředkem pro identifikaci a klasifikaci mikroorganismů je MALDI-TOF MS. Tento způsob identifikace byl využit u mnoha druhů hub jako například *Aspergillus* a *Penicillium* (Li *et al.*, 2000; Welham *et al.*, 2000) a stal se silným konkurentem pro mikroskopické a molekulární metody. V dnešní době jsou MALDI systémy přístupné již jak pro výzkumné laboratoře, tak pro aplikace v biotechnologiích, průmyslu a diagnostice v klinických laboratořích. Využití vyžaduje obecný přístup procesu charakterizace, aby bylo možné vzájemné porovnání v rámci různých laboratoří. Zatím ale tento postup nebyl popsán a pro každý druh je nutná samostatná optimalizace metody (Chalupová *et al.*, 2014).

Před provedením samotného měření mikroorganismů pomocí MS je vyžadována příprava vzorku. Patří sem například metoda sběru, typ a koncentrace matrice a organického rozpouštědla, způsob nanášení vzorku a další. Vše je velmi důležité pro optimalizaci citlivosti, reprodukovatelnosti a přesnosti metody (Fenselau a Demirev, 2001).

#### 2.4.1.1 Příprava vzorku pro analýzu

Mezi často využívané metody pro sběr mikroorganismů patří odběr kolonií rostoucích na agaru na Petriho misce a následné umístění přímo na MALDI destičku, kdy je přidáno definované množství matrice. Tato metoda se využívá převážně kvůli dobré reprodukovatelnosti (Fenselau a Demirev, 2001).

Při charakterizaci intaktních buněk a proteinů pomocí MALDI MS může docházet k narušení buněčné stěny po odběru vzorků a před samotnou analýzou (Fenselau a Demirev, 2001). Narušení stěny se provádí pomocí silných organických kyselin jako kyselina octová (Thomas *et al.*, 1998), TFA (Ryzhov *et al.*, 2000) nebo mravenčí (Wang *et al.*, 1998). Také bylo zjištěno, že přidavek methanolu (Wang *et al.*, 1998; Winkler *et al.*, 1999) či ethanolu (Madonna *et al.*, 2000) zvyšuje intenzitu signálu

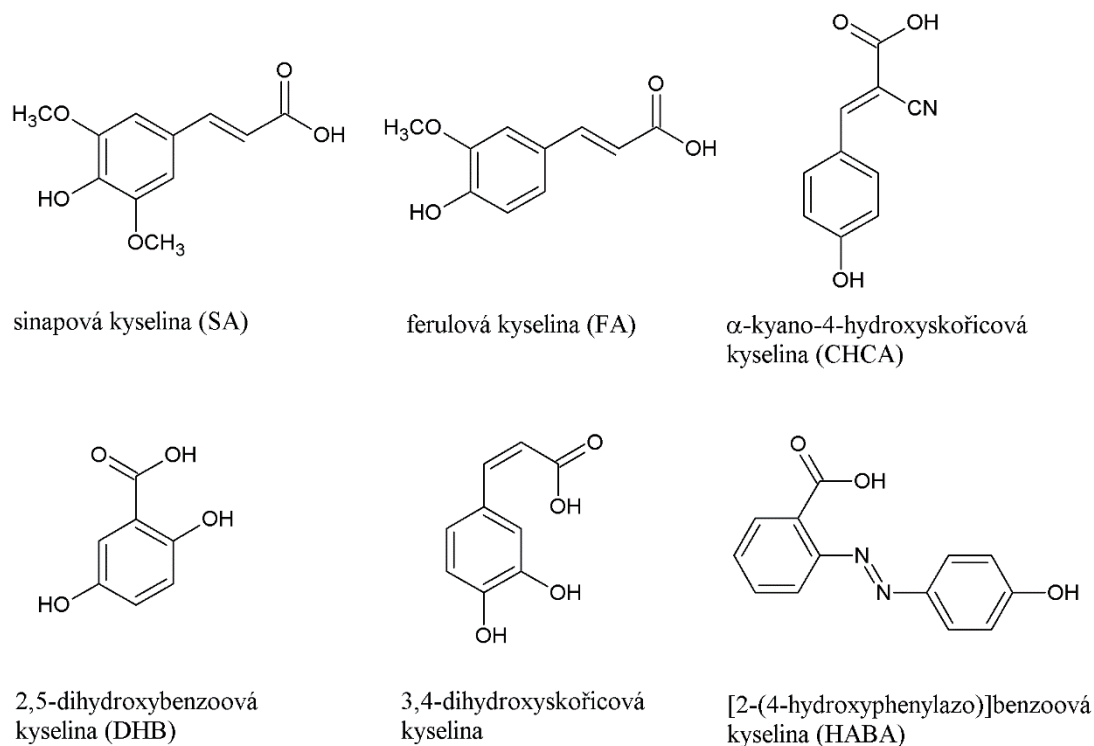
u vyšších hmot (nad 15 kDa) a stabilizuje vzorek před analýzou na MALDI MS (Winkler *et al.*, 1999). Například u buněk *E. coli* ošetřených ethanolem ve směsi s kyselinou ferulovou (FA) jako matricí byla pozorována mnohem větší homogenita vzorku ve srovnání s neošetřenými buňkami (Madonna *et al.*, 2000).

#### **2.4.1.2 Typ matrice a metody nanášení vzorku**

Povaha identifikovaných proteinů je ovlivněna nejen přípravou vzorku, ale také výběrem vhodné matrice. Mezi matrice využívané pro detekci proteinů patří kyselina 4-hydroxy- $\alpha$ -kyanoskořicová (CHCA; Holland *et al.*, 1996; Karty *et al.*, 1998), kyselina sinapová (SA; Haag *et al.*, 1998; Winkler *et al.*, 1999), FA (Saenz *et al.*, 1999), kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB), kyselina kávová (CA), kyselina 3,4-dihydroxyskořicová a kyselina [2-(4-hydroxyphenylazo)] benzoová (Obr. 5; Welham *et al.*, 2000). Před použitím jsou kyseliny nejčastěji rozpouštěny ve směsi ACN s 0,1% TFA či 2,5% TFA v různých objemových poměrech. Matrice je poté se vzorkem smíchávána v poměru 1:1. Kvalita výsledného spektra při použití různých druhů matric je odlišná pro jednotlivé kmeny zkoumaných hub. Například při analýze rodu *Aspergillus* byly jako nejlepší matrice vyhodnoceny CHCA, SA a CA (Li *et al.*, 2000). Naopak při charakterizaci fytopatogenů z kmene *Bremia* se jako matrice osvědčil mix kyseliny sinapové a ferulové (Chalupová *et al.*, 2012). Během identifikace hub kmene *Fusarium* byla z hlediska intenzity signálu jako nejlepší vyhodnocena FA o koncentraci 10 mg·ml<sup>-1</sup> (Kemptner *et al.*, 2009).

Během měření intaktních buněk a proteinů byly také testovány různé metody nanášení vzorku a matrice na desku. Patří sem například smíchání vzorku s matricí ještě před nanášením na MALDI destičku, přidání matrice ke vzorku až na destičce nebo vícevrstevný sendvičový způsob nanášení matrice, kdy je nanášena na destičku nejprve matrice, poté vzorek a ve finálním kroku opět matrice (Fenselau a Demirev, 2001; Chalupová *et al.*, 2012; Kemptner *et al.*, 2009). Po nanášení vzorku ve směsi s matricí na desku dochází k identifikaci pomocí MALDI-TOF MS, což je v současné době nejrozšířenější ionizační technika pro analýzu mikroorganismů (Demirev a Fenselau, 2008).





Obr. 5 Chemické struktury vybraných matric využívaných při měření intaktních proteinů pomocí MS.

### 2.4.1.3 Identifikace a charakterizace hub

Závěrečná identifikace je prováděna na základě srovnávání jedinečných proteinových profilů z povrchu buněk jednotlivých vláknitých hub (Fenselau a Demirev, 2001). Tato technologie představuje rychlý, jednoduchý a levný způsob identifikace, ovšem za předpokladu, že je tento druh správně zastoupen v referenční knihovně. Nejnovější knihovny obsahují 152 (Lau *et al.*, 2013), 58 (Ranque *et al.*, 2014) a 472 (Becker *et al.*, 2014) různých druhů hub. Jako příklad softwaru pro vyhodnocení výsledných spekter můžeme uvést software Biospean, který detekuje píky na základě intenzity signálu v dané oblasti  $m/z$  (Raus *et al.*, nepublikovaná data).

Hmotnostní spektra intaktních buněk a proteinů mohou být využity nejen pro rychlou identifikaci řady rostlinných patogenů, ale také k diagnostickým účelům porovnáním proteinového profilu napadených a zdravých organismů (Chalupová *et al.*, 2014).

## 2.4.2 Studium proteomu

Hmotnostní spektrometrii lze u mikroorganismů využít také pro charakterizaci proteomu. Vzhledem k tuhosti buněčné stěny hub je při tomto přístupu nutné před samotnou analýzou proteiny z buněk extrahovat chemickými či mechanickými postupy (kap 2.3.1; Marklein *et al.*, 2009). Následné zpracování vzorku probíhá pomocí metod běžně využívaných v proteomice, jako precipitace (kap 2.3.1), separace (kap 2.3.2) a štěpení proteinů (kap 2.3.3). Postupné využití těchto metod je užitečné pro získání vyššího množství charakteristických proteinů nebo peptidů, avšak souběžně s tím dochází k nárůstu časové náročnosti celého postupu (Chalupová *et al.*, 2014).

Extrakční kroky jsou při analýze velmi důležité pro dosažení přesných a správných výsledků. Velmi často jsou prováděny pomocí fyzikálních sil, vodného rozpouštědla nebo srážením. Mezi vhodné metody patří například sonifikace buněk, která má podíl na detekci vysokomolekulárních proteinů u *Escherichia coli* (Easterling *et al.*, 1998). Naopak u *Bacillus anthracis* došlo k extrakci většího množství nízkomolekulárních proteinů oproti chemickému narušení buněk (Krishnamurthy *et al.*, 1996). Při použití metody tepelného štěpení buněčné stěny, kdy je suspenze buněk zahřívána ve vodní nebo glycerolové lázni. Studium bakterií rodu *Bacillus* vedlo po zahřívání spor na 120 °C po dobu 20 min a následné analýze pomocí MS k reprodukovatelným spektrům (Horneffer *et al.*, 2004).

Řada houbových organismů již byla podrobena proteomickému studiu. Většina z nich je zaměřena na analýzu houbového sekretomu či mycelia. Mezi běžně využívané metody patří 2D elektroforéza s následnou identifikací pomocí MS. Například při studiu mycelia vláknité houby *Aspergillus fumigatus*, která způsobuje vážnou infekci u jedinců se sníženou imunitou, byla po extrakci močovinným a SDS pufrem (Kniemeyer *et al.*, 2006) vytvořena pomocí 2D elektroforézy referenční mapa proteinů. Za využití MALDI-TOF MS bylo identifikováno 334 proteinů, z čehož nejčastěji se objevovaly proteiny podílející se na některém z metabolických procesů (Vödisch *et al.*, 2009). Při analýze vláknité houby *Trichoderma reesei* byla pro separaci využita také 2D elektroforéza, ovšem extrakce proteinů z mycelia byla provedena pufrem s obsahem sorbitolu a k detekci byl použit ESI-TOF MS. Identifikováno bylo celkem 32 proteinů (Lim *et al.*, 2001). Mezi první proteomické studie *B. cinerea* se řadí analýza proteinů extrahovaných z houbového mycelia za využití 2D elektroforézy. Pomocí MALDI-TOF MS bylo identifikováno 22 proteinů

(Fernández-Acero *et al.*, 2006). V dalších studiích mycelia u *B. cinerea* byly srovnávány dva kmeny za využití kombinace 2D elektroforézy a LC MS, kdy bylo detekováno 129 shodných proteinů pro oba kmeny (Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2013).

Studiem sekretomu se zabývaly u houby *Phanerochaete chrysosporium*, kdy byly proteiny z buněk extrahovány pufrem s obsahem NaCl. Po separaci 2D elektroforézou byly proteiny detekovány prostřednictvím LC MS/MS. Objeveny byly především enzymy podílející se na degradaci celulosy, hemicelulosy a ligninu (Sato *et al.*, 2007).

V posledních letech se ale pozornost začíná obracet ke studiu houbových konidií, kvůli jejich zapojení v šíření infekce (Gonzalez-Fernandez a Jorin-Novo, 2012). Mezi jedny z nejčastěji využívaných metod patří 2D elektroforéza v kombinaci s MALDI TOF/TOF MS. U *Colletotrichum acutatum*, způsobující nemoci ovocných plodin, bylo tímto způsobem identifikováno 277 proteinů, kdy největší skupinu z nich tvořily proteiny s vazebnou funkcí, následované proteiny s enzymovou aktivitou (El-Akhal *et al.*, 2013). Při studiu *Blumeria graminis* výše popsaným způsobem bylo detekováno 123 proteinů, z nichž převažovaly ty, co se podílejí na metabolických procesech (Noir *et al.*, 2009). Při studiu konidií *B. cinerea* bylo při využití octanového pufru pro extrakci a 1D SDS-PAGE detekováno 89 proteinů, z čehož 60 bylo pomocí softwaru SignalP určeno jako extracelulární (Shah *et al.*, 2009).

V oblasti studia mikroorganismů dochází v průběhu let ke stále většímu rozvoji proteomiky. Důvodem je postupné osekvenování genomu u stále většího počtu organismů, ale také zdokonalování metod pro zpracování vzorků a zvýšení citlivosti, přesnosti a rozlišení hmotnostních spektrometrů.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál a přístroje

#### 3.1.1 Chemikálie

Bio-Rad, USA: Coomassie Brilliant Blue R-250, dithiotreitol, Laemmliho pufr, Tween 20

Bruker Daltonik, Německo: kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová, kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, peptidový kalibrační standard II

Fluka, Švýcarsko: persíran amonný, formaldehyd, kyselina ferulová, kyselina sinapová, kyselina trichloroctová, sacharosa, trypsin, uhličitán amonný

HiMedia, Indie: bramborovo dextrósový agar

Lachema, ČR: pentahydrát síranu měďnatého

La:chner, ČR: dusičnan stříbrný, chlorid sodný

Merck Millipore, Německo: acetonitril, aceton, ethanol, methanol

Serva, Německo: dodecylsulfát sodný

Sigma Aldrich, Německo: agar,  $\beta$ -merkптоethanol, ethylendiamintetraacetát sodný, fenol, glycin, jodoacetamid, kyselina mravenčí, kyselina octová, kyselina trifluoroctová, močovina, octan amonný, tetramethylendiamin, pentahydrát thiosíranu sodného

#### 3.1.2 Biologický materiál

*Botrytis cinerea* MA 2723 (poskytnu to z University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna)

*Botrytis tulipae* MA 3332 (poskytnu to z University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna)

*Botrytis fabae* MA 2722 (poskytnuto z Masarykovy Univerzity, Brno)

Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum*)

Mrkev obecná (*Daucus carota*)

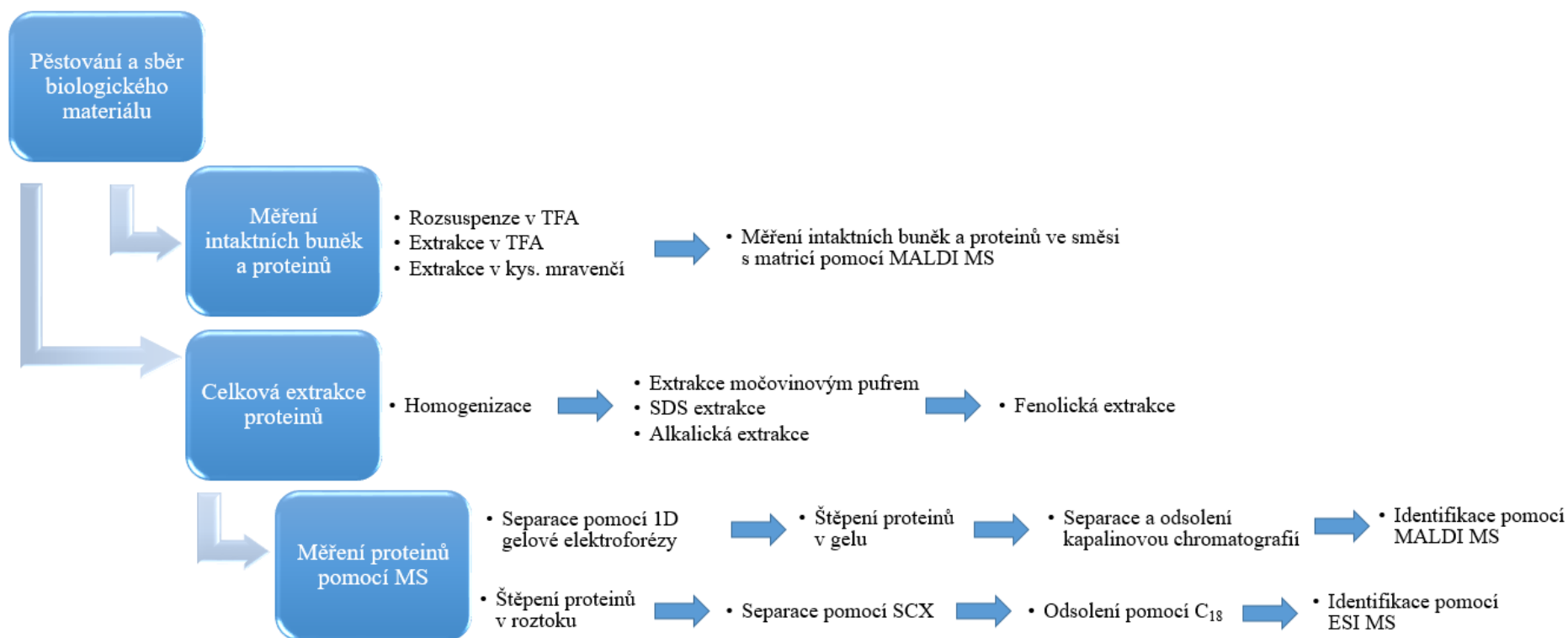
#### 3.1.3 Přístroje

Analytické váhy (Sartorius, Německo), autokláv (Tuttnauer, USA), elektromagnetická míchačka IKA (Labortechnik, Německo), flowbox (Faster, Itálie), french press

(Thermo, USA), hmotnostní spektrometr amaZon speed ETD (Bruker Daltonik, Německo), hmotnostní spektrometr Microflex MALDI-TOF LRF20 (Bruker Daltonik, Německo), hmotnostní spektrometr ultrafleXtreme MALDI TOF-TOF (Bruker Daltonik, Německo), chlazená centrifuga (Sigma, Německo), kapalinový chromatograf dionex Ultimate 3 000 (Thermo, USA), kultivační komora Schoeller (Sanyo, Japonsko), skener Umax (Amersham Bioscience Corp, USA), spektrofotometr WPA (Biochrom, Velká Británie), termoblok Drybath Incubator (Major Science, USA), termostatová třepačka (IKA, Německo), ultrazvukový homogenizátor (BioLogics, USA), ultrazvuková lázeň (Kraintek, Slovensko), zdroj pro IEF (Pharmacia, Švédsko), zdroj pro SDS-PAGE (Biorad, USA)

### **3.2 Přehled použitých metod**

Během experimentů bylo využito několik přístupů. Po vypěstování a sběru testovaného biologického materiálu bylo buď provedeno měření intaktních buněk a proteinů ve směsi s matricí pomocí MALDI-TOF MS, nebo extrakce proteinů z buněk a jejich identifikace prostřednictvím MS. Přehled všech použitých metod je znázorněn na Obr. 6.



Obr. 6 Schéma celkového postupu experimentální části.

### 3.3 Pěstování hub *Botrytis cinerea* a *Botrytis tulipae*

Na pěstování *B. cinerea* byl jako růstové médium použit bramborovo-mrkvový agar (Sinski *et al.*, 1981). Médium bylo připraveno z 20 g brambor a 20 g mrkve nastrouhaných na malé kousky. Tato směs byla přivedena k varu v jednom litru vody a následně vařena po dobu 60 min. Poté bylo přidáno 15 g agaru, který byl rozpuštěn zahříváním za stálého míchání. Médium bylo autoklávováno 20 min při teplotě 120 °C a rozlito do Petriho misek.

Na kultivaci *B. tulipae* byl použit bramborovo-dextrosový agar (Beuchat, 1992). K jednomu litru vody bylo přidáno 39 g bramborovo-dextrosového agaru, který byl rozpuštěn zahříváním za stálého míchání. Médium bylo autoklávováno po dobu 20 min při teplotě 120 °C a rozlito do Petriho misek.

Houby byly pěstovány na růstovém médiu v kultivační komoře (25 °C, přirozené denní světlo). Růst byl ukončen po začátku sporulace či růstu sklerocií (3-4 týdny). Konidie z *B. cinerea* byly sesbírány pomocí vody nebo 0,05 % Tweenu 20. Sklerocie z *B. tulipae* byly sesbírány manuálně pomocí pinzety. Následně byl biologický materiál přefiltrován na fritě s filtrační membránou o velikosti pórů 0,45 µm a vysušen do sucha.

Pro pěstování konidií *B. tulipae*, poskytnutých Mgr. Dmitry Loginovem, Ph.D. byla použita stejná metodika jako pro *B. cinerea*.

### 3.4 Měření intaktních buněk a proteinů pomocí MALDI MS

K měření intaktních buněk a proteinů byly použity tři různé přístupy přípravy vzorků. V prvním bylo 10 mg konidií rozpuštěno v 50 µl ACN/2,5% TFA v objemovém poměru 7:3 (Chalupová *et al.*, 2012; Kemptner *et al.*, 2009). V druhém bylo 10 mg konidií inkubováno (60 min, 600 rpm, 22 °C) v 50 µl ACN/2,5% TFA v objemovém poměru 7:3. Ve třetím přístupu bylo 10 mg konidií rozsuspendováno v 50 µl 70% kyselině mraveční (Sauer *et al.*, 2008) a proteiny byly ponechány extrakci (20 min, 600 rpm, 22 °C). Následně bylo přidáno 50 µl ACN a opět došlo k extrakci proteinů (20 min, 600 rpm, 22 °C). Poté byl odstraněn pelet ze vzorků po jednotlivých extrakcích pomocí centrifugace (5 min, 5000 RCF, 22 °C).

Z připravených vzorků bylo 0,5 µl naneseno na MALDI terčík MSP Anchorchip 600/96 (Bruker Daltonik) a bylo přidáno 0,5 µl matrice, rozpuštěné v ACN/2,5% TFA v objemovém poměru 7:3. Při analýze byly použity následující matrice CHCA

(10 mg/ml), FA (10 mg/ml), SA (30 mg/ml) a DHB (10 mg/ml). Po zaschnutí byly u vzorků změřeny MS spektra na hmotnostním spektrometru Bruker Microflex v módu s reflektorem s urychlovacím napětím 20 kV a rozsahem detekce iontů od 1000-20 000  $m/z$ . Spektra byla získána za použití laseru s 800 pulzy. Při měření byl využit program flexControl 3.4. Pro kalibraci měřených spekter byla jako standard použita směs proteinů (adrenokortikotropní hormon, insulin, insulin s oxidovaným  $\beta$  řetězcem, ubiquitin 1, cytochrom c, myoglobin).

### **3.5 Proteomické studium konidií a sklerocií hub rodu *Botrytis***

#### **3.5.1 Extrakce proteinů z buněčných struktur**

Homogenizace biologického materiálu byla provedena pomocí třecí misky s tloučkem, sonifikací nebo french pressem. V prvním případě bylo 150 mg konidií či sklerocií rozdrceno v třecí misce s tloučkem v tekutém dusíku. Dalším způsobem homogenizace vzorku byla sonifikace, kdy bylo 150 mg materiálu rozsuspendováno ve 2 ml vody a sonifikováno (5 min, 15 s puls, 45 s off, 4 °C). V posledním přístupu bylo 150 mg vzorku rozsuspendováno v 8 ml destilované vody a homogenizováno french pressem (25 kpsi). Z důvodu velké velikosti sklerocií bylo nutné vzorek rozdrtit v třecí misce s tloučkem i před sonifikací a homogenizací french pressem.

Vzorky po homogenizaci byly centrifugovány (10 min, 6 000 RCF, 4 °C) a pelet byl rozsuspendován v močovinovém extrakčním pufru (8  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  močovina, 2  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ethylendiamintetraacetát sodný (NaEDTA), 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl o pH 7,4). Poté byly vzorky centrifugovány (5 min, 5 000 RCF, 4 °C). Následně byl pelet třikrát promyt opět močovinovým pufrům (15 min, 600 rpm, 4 °C), vždy s centrifugací (5 min, 5 000 RCF, 4 °C). V závěrečném kroku se pelet třikrát promyl vodou, s centrifugací (5 min, 5 000 RCF, 4 °C) po každém promytí.

Pelet po extrakci proteinů močovinovým pufrům byl rozsuspendován v SDS extrakčním pufru (150  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl, 2% SDS, 40  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\beta$ -merkaptoethanol, 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaEDTA, 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl o pH 7,9) a nechán 10 min při 100 °C. Poté byl vzorek centrifugován (5 min, 5 000 RCF, 22 °C). Celá extrakce byla dvakrát opakována. Následně byl pelet třikrát promyt vodou s centrifugací (5 min, 5 000 RCF, 22 °C; Pitarch *et al.*, 2008).



Pelet po SDS extrakci byl rozsuspendován v  $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaOH a ponechán 12 h při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Poté byla provedena neutralizace kyselinou octovou a centrifugace (5 min, 5 000 RCF,  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Následně byl pelet třikrát promyt vodou s centrifugací (5 min, 5 000 RCF,  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Pitarch *et al.*, 2008).

Proteiny obsažené v supernatantech po extrakci močovinovým a SDS pufrem a po alkalické extrakci byly precipitovány acetonem s 13,3% kyselinou trichloroctovou a 0,07%  $\beta$ -merkptoethanolem. Vzorek byl smíchán s precipitačním roztokem v objemovém poměru 1:3 a ponechán 12 h při  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Aceton byl odstraněn centrifugací (10 min, 10 000 RCF,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Poté byl pelet třikrát promyt acetonem s 0,07%  $\beta$ -merkptoethanolem, centrifugace (10 min, 10 000 RCF,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Precipitované proteiny byly vysušeny.

Precipitované proteiny byly rozpuštěny v sacharosovém pufru (30% sacharosa, 2% SDS, 5%  $\beta$ -merkptoethanol,  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-HCl o pH 8). Ke vzorkům byl přidán fenol (pH 6,7, během skladování převrstvem 10 mM Tris-HCl pH 8) v objemovém poměru 1:1 a byly třepány (10 min, 600 rpm,  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Poté byla provedena centrifugace (10 min, 5 500 RCF,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Byla odebrána vrchní fenolická fáze, ke které byl přidán  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  acetát amonný v metanolu v objemovém poměru 1:5. Následovala precipitace po dobu 12 h při  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Precipitační roztok byl odstraněn centrifugací (10 min, 5 500 RCF,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Proteiny byly promyty acetonem, centrifugace (10 min, 5 500 RCF,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a vysušeny.

### 3.5.2 Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů v roztoku byla měřena metodou s kyselinou bicinholinovou (Smith *et al.*, 1985). Ke 2 ml pracovního roztoku, připraveného smícháním činidla pro měření koncentrace proteinů (Sigma) se  $160 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  pentahydrátem síranu měďnatého v poměru 50:1, byl přidán vzorek (1-10  $\mu\text{l}$ ). Směs byla inkubována po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Absorbance byla měřena při 562 nm. Jako proteinový standard byl použit hovězí sérový albumin ( $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Slepý vzorek obsahoval pouze pracovní roztok.

### 3.5.3 Jednorozměrná gelová elektroforéza

Gelová SDS-PAGE byla provedena dle Laemmliho (1970) s modifikacemi. Precipitované proteiny byly rozpuštěny v Laemmliho pufru. Pro redukci vzorků byl

přidán DTT rozpuštěný v 50 mmol·l<sup>-1</sup> uhličitanu amonném, aby výsledná koncentrace DTT byla 10 mmol·l<sup>-1</sup>. Vzorky byly umístěny na třepačku (45 min, 400 rpm, 56 °C). Alkylace byla provedena přidáním jodoacetamidu (IAM) rozpuštěného v 50 mmol·l<sup>-1</sup> uhličitanu amonném o výsledné koncentraci 40 mmol·l<sup>-1</sup> a směs byla inkubována 20 min v temnu při laboratorní teplotě. Pro ukončení alkylace bylo přidáno 40 mM DTT.

Pro separaci proteinů byl použit separační gel s 12% obsahem akrylamidu a 4% zaostřovací gel. Separační gel byl připraven ze 4 ml 30% akrylamidu s 0,8% bisakrylamidem smísením s 2,5 ml 1,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl o pH 8,8 s 3,2 ml vody, 100 µl 10% SDS, 10 µl tetrametyletylendiamin a 50 µl 10% persíranu amonného. Zaostřovací gel byl připraven z 0,65 ml 30% akrylamidu s 0,8% bisakrylamidem smísením s 1,25 ml 0,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl o pH 6,8 s 2,95 ml H<sub>2</sub>O, 100 µl 10% SDS, 10 µl tetrametyletylendiamin a 60 µl 10% persíranu amonného. Rozměry separačního gelu byly 5,5 x 9 cm o tloušťce 1 mm. Elektrodový pufr obsahoval 0,1% SDS, 192 mmol·l<sup>-1</sup> glycina a 25 mM Tris o pH 8,3. Do jamek bylo nanášeno 20 µl vzorku, což odpovídalo zhruba 15 µg proteinů. Separace probíhala 15 min při napětí 85 V a následně 90 min při napětí 120 V. Jako standard byl použit Blue Protein Ladder (Biosystems).

Po provedení SDS-PAGE byly gely barveny pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 přes noc (Bennett a Scott, 1971). Barvicí roztok obsahoval 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol a 10% kyseliny octovou. Pro odbarvení byl použit roztok 7% kyseliny octové a 10% methanolu. Poté byly gely hydratovány v destilované vodě.

### 3.5.4 Štěpení proteinů v gelu

Proteinové spoty byly vyřezány z gelu skalpelem či pipetovou špičkou. Kousky gelu byly dvakrát promyty vodou a dvakrát 50% ACN, vždy po dobu 15 min. Poté byl ke vzorkům přidán 100% ACN, aby došlo k odstranění vody z gelu. K vysušeným kouskům gelu byl přidán trypsin modifikovaný rafinosou (Šebela *et al.*, 2006) v 50 mmol·l<sup>-1</sup> uhličitanu amonném v poměru 1:50 (trypsin:protein). Následovalo enzymatické štěpení přes noc při 37 °C.

Z kousků gelu byly naštěpené peptidy extrahovány 5% kyselou mravenčí s ACN v poměru 1:1 a třepány (15 min, 700 rpm, 24 °C). Celý proces byl dvakrát opakován. Vzorky byly vysušeny na vakuové centrifuze (30 min, 5 000 RCF, 45 °C) a dále zpracovávány.

### 3.5.5 Štěpení proteinů v roztoku

Precipitované proteiny byly rozpuštěny v 50 mmol·l<sup>-1</sup> uhličitanu amonném s 10 mmol·l<sup>-1</sup> DTT a redukovány za stálého třepání (45 min, 400 rpm, 56 °C). Poté byl přidán 40 mmol·l<sup>-1</sup> IAM v 50 mmol·l<sup>-1</sup> uhličitanu amonném a směs byla inkubována 20 min v temnu při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 40 mmol·l<sup>-1</sup> DTT pro ukončení alkylace. Proteiny byly štěpeny trypsinem modifikovaným rafinosou (Šebela *et al.*, 2006), rozpuštěným v 50 mmol·l<sup>-1</sup> uhličitanu amonném, v poměru 1:50 (trypsin:protein). Po nočním štípání při 37 °C byly vzorky vysušeny a dále zpracovávány.

### 3.5.6 Purifikace a separace peptidů

Purifikace peptidů pro vzorky měřené pomocí ESI MS byla provedena pomocí kationtově výměnné chromatografie (SCX). Na přípravu kolonky byla použita pipetovací špička s rozsahem 10-200 µl naplněná dvěma vyříznutými kousky SCX extrakčních disků (3M Empore<sup>TM</sup>). Kolonka byla upevněna do mikrozkušavky a navlhčena 40 µl ACN s následnou centrifugací (2,5 min, 2 000 RCF, 24 °C). Krok navlhčení náplně byl opakován. Pro ekvilibraci byla kolonka dvakrát promyta 40 µl 1% TFA, centrifugace (2,5 min, 2 000 RCF, 24 °C). Do pěti 1,5ml mikrozkušavek bylo napipetováno 20 µl 25% kyseliny mravenčí. Kolonka byla upevněna do první mikrozkušavky, byl nanesen vzorek rozpuštěný v 50 µl 1% TFA a byla provedena centrifugace (5 min, 1 000 RCF, 24 °C). Následovala postupné vymývání peptidů z kolonky do připravených mikrozkušavek s kyselinou mravenčí. Po napipetování 40 µl elučního roztoku (Tab. 1) byla provedena centrifugace (5 min, 1 000 RCF, 24 °C). Všechny eluční kroky byly dvakrát opakovány.

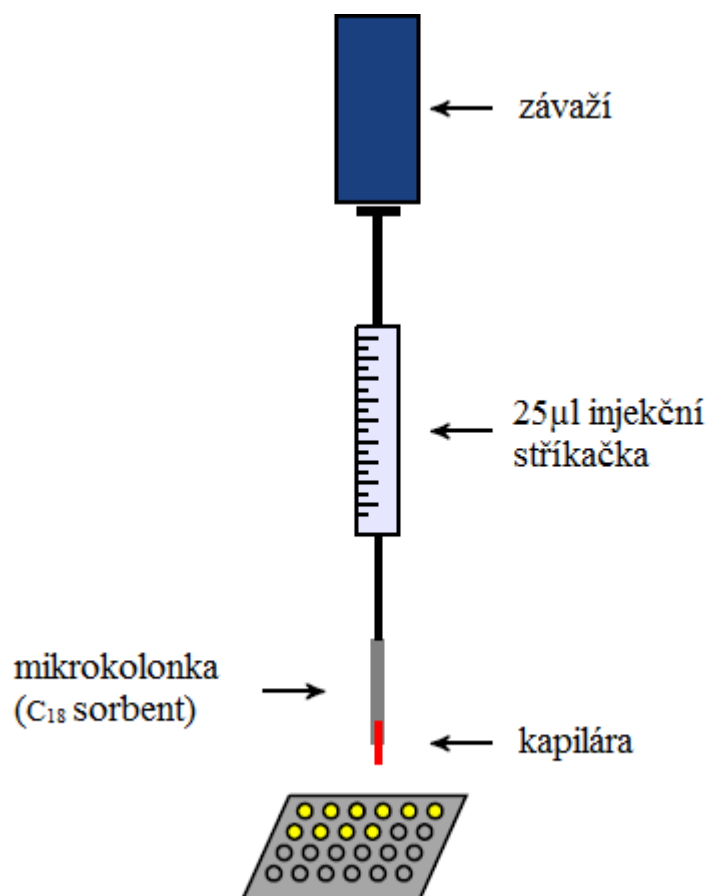
Tab. 1 Eluční roztoky pro purifikaci peptidů pomocí SCX disků.

Eluční roztok 1	50 mmol·l <sup>-1</sup> octan amonný 20% ACN 0,5% kyselina mravenčí
Eluční roztok 2	150 mmol·l <sup>-1</sup> octan amonný 20% ACN 0,5% kyselina mravenčí
Eluční roztok 3	300 mmol·l <sup>-1</sup> octan amonný 20% ACN 0,5% kyselina mravenčí
Eluční roztok 4	5% NH <sub>4</sub> OH 80% ACN

Přečištění peptidů kapalinovou chromatografií bylo provedeno přes C<sub>18</sub> sorbent dvěma způsoby. Směs peptidů určena pro analýzu na ESI-MS byla odsolena pomocí kolonky, připravené z pipetovací špičky s rozsahem 10-200 µl a dvou vyžiznutých kousků extrakčního disku C<sub>18</sub> (3M Empore<sup>TM</sup>). Po upevnění kolonky do mikrozkuhavky byly disky navlhčeny 50 µl isopropanolu, který byl odstraněn centrifugací (2 min, 4 000 RCF, 24 °C). Navlhčení kolonky iso-propanolem bylo opakováno ještě jednou. Kolonka byla dvakrát promyta 50 µl 5% kyseliny mravenčí, centrifugace (2 min, 2 000 RCF, 24 °C). Poté byl nanesen vzorek rozpuštěný v 5% kyselině mravenčí, centrifugace (5 min, 1 000 RCF, 24 °C). Dvojitá promytí kolonky bylo provedeno 50 µl 5% kyseliny mravenčí, centrifugace (2 min, 2 000 RCF, 24 °C). Peptidy byly vymyty z kolonky do čisté zkuhavky 50 µl směsi 50% methanolu s 2,5% kyselinou mravenčí, centrifugace (5 min, 4 000 RCF, 24 °C). Vymývací krok byl opakován. Vzorky byly vysušeny na vakuové odparce.

Peptidy určené pro analýzu na MALDI-MS byly přečištěny pomocí ručně vyrobeného systému (Obr. 7) (Moravcová *et al.*, 2009; Franc *et al.*, 2012, 2013). Kolonka naplněná sorbentem C<sub>18</sub> (3 µm částice, Reprosil Gold, Dr. Maisch) byla ekvilibrována 6 µl 0,1% TFA. Poté bylo nanášeno 5 µl vzorku rozpuštěného v 0,1% TFA a promyto 5 µl 0,1% TFA. Následovalo vymytí peptidů z kolonky zvyšujícím se poměrem ACN ve směsi s 0,1% TFA (2%, 8%, 16%, 24%, 32%, 40% a 80% ACN) vždy v objemu 2 µl.

Separované peptidy byly přímo nanášeny po 0,5  $\mu$ l na MALDI destičku, první a poslední mikrolitr byly vypuštěny mimo MALDI terčik a nebyly analyzovány.



Obr. 7 Schéma ručně vyrobeného systému pro odsolování vzorků. Po ekvilibraci je do injekční stříkačky nasát vzorek, poté se na konec jehly nasadí mikrokolonka s  $C_{18}$  sorbentem. Závaží vytváří tlak na stříkačku a vzorek je aplikován přímo na MALDI terčik (upraveno dle Franc *et al.*, 2013).

### 3.5.7 Identifikace proteinů pomocí MALDI MS

K 0,5  $\mu\text{l}$  vzorku na MALDI destičce Anchorchip 800-384 (Bruker Daltonik) bylo přidáno 0,5  $\mu\text{l}$  matrice, která byla připravena smísením 748  $\mu\text{l}$  95% ACN s 0,1% TFA, 36  $\mu\text{l}$  nasyceného roztoku CHCA v 90% ACN s 0,1% TFA, 8  $\mu\text{l}$  10% TFA a 8  $\mu\text{l}$  100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ . Pro kalibraci byl připraven roztok 748  $\mu\text{l}$  85% ACN s 0,1% TFA, 36  $\mu\text{l}$  nasyceného roztoku CHCA v 90% ACN s 0,1% TFA, 8  $\mu\text{l}$  10% TFA a 8  $\mu\text{l}$  100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , ze kterého se odebralo 300  $\mu\text{l}$  a smísilo se 2  $\mu\text{l}$  kalibračního peptidového standardu II (Bruker Daltonik) rozpuštěného v 0,1% TFA. Směs matrice a standardu byla nanášena na MALDI terčik po 0,5  $\mu\text{l}$ .

Měření bylo provedeno na hmotnostním spektrometru ultrafleXtreme MALDI TOF-TOF. Spektra byla získána za použití pozitivního módu s reflektorem z 3 000 laserových střel pro MS a 4 000 laserových střel pro MS/MS. Urychlovací napětí v iontovém zdroji bylo 25 kV u MS a 7,5 kV u MS/MS analýzy. Pro měření MS/MS spekter bylo vybráno prostřednictvím softwaru WarpLC 1.3 (Bruker Daltonik) maximálně 10 prekurzorů v každém spotu s minimálním vypočteným poměrem signálu a šumu 10. Rozsah detekce iontů byl 600-3 500  $m/z$ . Při analýze byl používán software flexControl 3.4 a software WarpLC 1.3.

### 3.5.8 Identifikace proteinů pomocí nanoLC-ESI MS

Při měření byl využit systém složený z nanoLC Dionex UltiMate 3 000 a hmotnostního spektrometru s vysokokapacitní iontovou pastí (HCT) jako analyzátozem, a to ESI-HCT amaZon speed ETD. Odsolené vzorky byly rozpuštěny v 5% kyselině mravenčí. Pro analýzu bylo injektováno 5  $\mu\text{l}$  vzorku na předkolonu (75  $\mu\text{m} \times 30 \text{ mm}$ , 5  $\mu\text{m}$  C18 Reprosil GOLD 300; Dr. Maisch), která byla promyta 15  $\mu\text{l}$  0,1% TFA. Vymývání bylo prováděno vícestupňovým gradientem (Tab. 2) s průtokem 300  $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$  přes analytickou kolonu (75  $\mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$ , 3  $\mu\text{m}$  C18 Reprosil GOLD, Dr. Maisch). Mobilní fáze A byla 4% kyselina mravenčí, mobilní fáze B obsahovala 0,04% kyselinu mravenčí, 70% metanol a 20% isopropanol. Pro MS/MS bylo použito ESI-HCT. Měření bylo prováděno v pozitivním módu s rozsahem  $m/z$  400-1 400. Další nastavení bylo následující: napětí na zdroji 1 300 V, vysoušecí plyn 2,9 psi, vysoušecí teplota 150  $^{\circ}\text{C}$ . Při analýze byl použit software Compass 1.7 (Bruker Daltonik). Tato analýza byla

provedena Mgr. Ivem Chamrádem, Ph.D. a Mgr. Reném Lenobelem, Ph.D. z Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Centra regionu Haná.

Tab. 2 Složení mobilní fáze během analýzy na nanoLC-ESI MS.

<b>Čas analýzy (min)</b>	<b>Procentuální zastoupení mobilní fáze B</b>
0	2 %
3	8 %
50	18 %
79	28 %
85	32 %
93	45 %
99	65 %
100	95 %
105	95 %
108	2 %

### 3.5.9 Zpracování a analýza dat

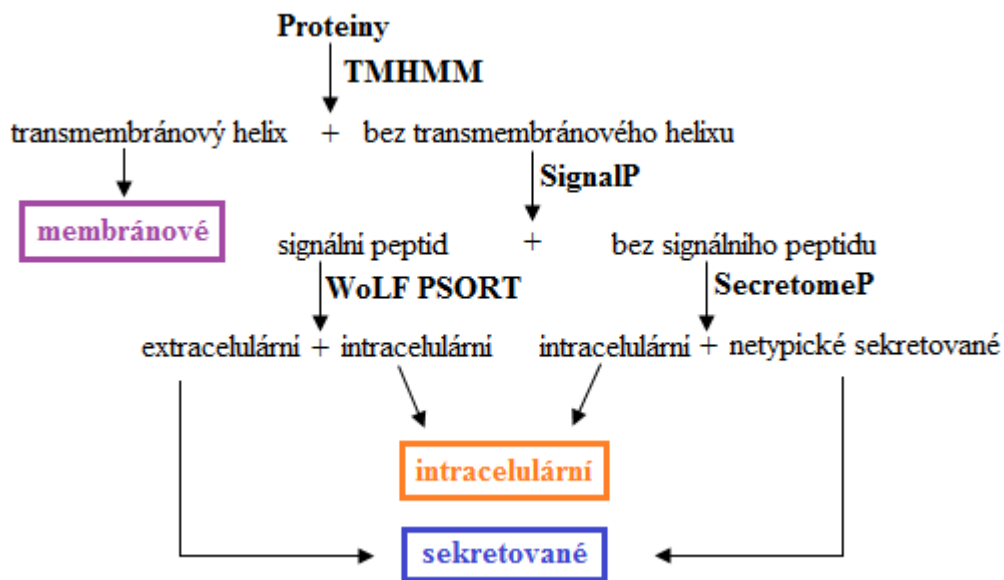
Změřená data po MS analýze byla zpracována pomocí programu ProteinScape 3.1 (Bruker Daltonik) a vyhledávacího nástroje Mascot Server 2.4 ([http://www.matrix-science.com/mascot\\_support\\_v2\\_4.html](http://www.matrix-science.com/mascot_support_v2_4.html)). Proteiny byly prohledány vůči databázi stažené z Uniprot (<http://www.uniprot.org>) s omezením pouze na houby rodu *Botrytis* a rodu *Sclerotinia*, jako příbuzného organismu. Dále byly do databáze zahrnuty i běžné kontaminanty (<http://www.thegpm.org/crap/index.html>), jako například trypsin a keratin. TrypChymo bylo zadáno jako použitá proteasa, karbamidometylace cysteinu byla nastavena jako pevná modifikace, acetylace N-konce a oxidace methioninu pak jako možná modifikace. Pro maximální počet vynechaných míst při štěpení proteasou byla zvolena hodnota 3 v případě měření pomocí MALDI a 5 pro ESI MS. Pro identifikaci proteinů pomocí MALDI-TOF byla pro vyhledávání prekurzorů zvolena tolerance hmotnosti iontů 30 ppm, a pro fragmenty 0,5 Da, zatímco pro ESI MS bylo nastaveno 100 ppm pro prekurzory a 0,6 Da pro fragmenty. Náboj peptidů byl nastaven na +1 u MALDI MS analýzy, informace o náboji u ESI MS byla vždy uvedena u jednotlivých iontů v textovém souboru předávaného programu Mascot. Tento textový soubor byl automaticky vygenerován během měření v programu Compass 1.7.

Detekované proteiny byly poté vyhodnoceny podle lokalizace, molekulární funkce a role v biologických procesech. Pro predikci lokalizace proteinů byl využit program WoLF PSORT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>). Přítomnost signálního peptidu v sekvenci proteinu byla stanovena online programem SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>; Petersen *et al.*, 2011). Jako program pro predikci transmembránového helixu byl použit TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk-services/TMHMM>; Krogh *et al.*, 2001). A pomocí programu SecretomeP 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP-1.0>; Bendtsen *et al.*, 2004) bylo zjištěno, zda jsou proteiny zapojeny do netypických sekrečních mechanismů. Klíč pro vyhodnocení je znázorněn na Obr. 8. Molekulární funkce a role v biologických procesech byla charakterizována programy na serveru AgBase (McCarthy *et al.*, 2006), a to GoRetriever (<http://www.agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/goretriever-select.pl>) a GoSlim-Viewer (<http://www.agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/goslimviewer-select.pl>).

Ke zpracování a zobrazení dat získaných po identifikaci proteinů a měřených spekter intaktních proteinů či buněk bylo použito volně dostupných open source programů Phyton 3.4.3 (<https://www.python.org>) a R project 3.2.2 (<https://www.r-project.org>)



spolu s balíčky a knihovny Biopython 1.65 (Cock *et al.*, 2009), MALDIquant 1.14 (Gibb a Strimmer, 2012), matplotlib 1.3.1 (Hunter, 2007) s matplotlib-venn 0.11.3, numpy 1.10.0 (<http://www.numpy.org>) a pandas 0.17.0 (<http://pandas.pydata.org>).



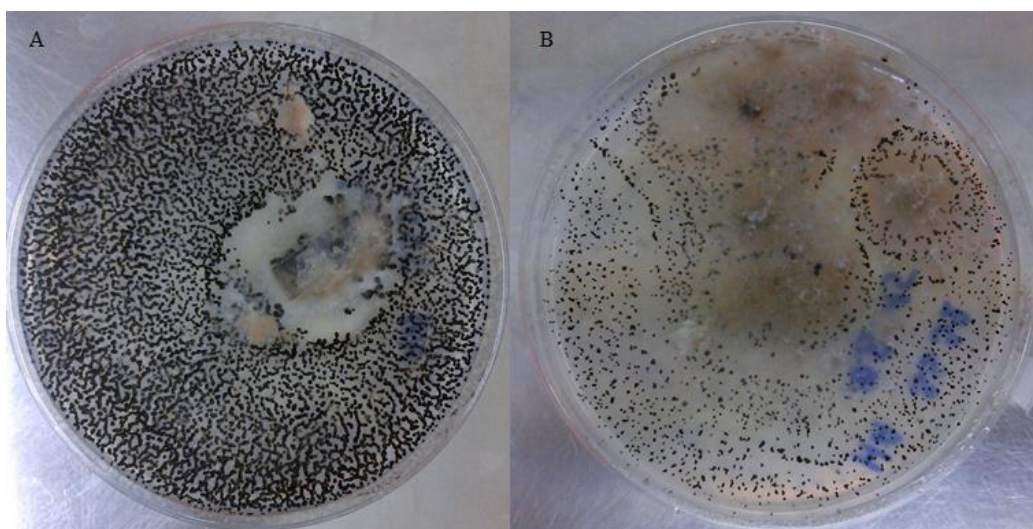
Obr. 8 Průběh vyhodnocení detekovaných proteinů pro predikci jejich lokalizace.

## 4 VÝSLEDKY

Experimenty v rámci této diplomové práce byly založeny na studiu fytopatogenních hub rodu *Botrytis*. Jedním ze záměrů bylo změřit hmotnostní spektra povrchových proteinů z konidií *B. cinerea*, která mohou sloužit pro rychlou identifikaci patogenu v praxi (Chalupová *et al.*, 2014). Druhá část práce byla zaměřena na identifikaci proteinů extrahovaných z konidií u *B. cinerea* a sklerocií u *B. tulipae*.

### 4.1 Pěstování biologického materiálu

V úvodních experimentech byly houby pěstovány na bramborovo-mrkvovém agaru a bramborovo-dextrosovém agaru v kultivační komoře. Růst byl ukončen po 4-5 týdnech, kdy u *B. cinerea* docházelo ke sporulaci. U houby *B. tulipae* se sporulace v tomto časovém období neobjevila, ale docházelo k tvorbě sklerocií, jako dalších útvarů důležitých pro přežití houby. Právě tyto struktury, konidie u *B. cinerea* a sklerocie u *B. tulipae*, byly využity pro následnou analýzu proteomu těchto rostlinných patogenů. Zatímco *B. cinerea* rostla rychleji na bramborovo-mrkvovém agaru, kde vytvářela větší množství konidií než na agaru dextrosovém, u *B. tulipae* byl pozorován značný nárůst jak počtu, tak i hustoty a velikosti sklerocií na bramborovo-dextrosovém agaru (Obr. 9). Pro další experimenty bylo proto vždy voleno optimální médium pro růst žádoucích struktur.



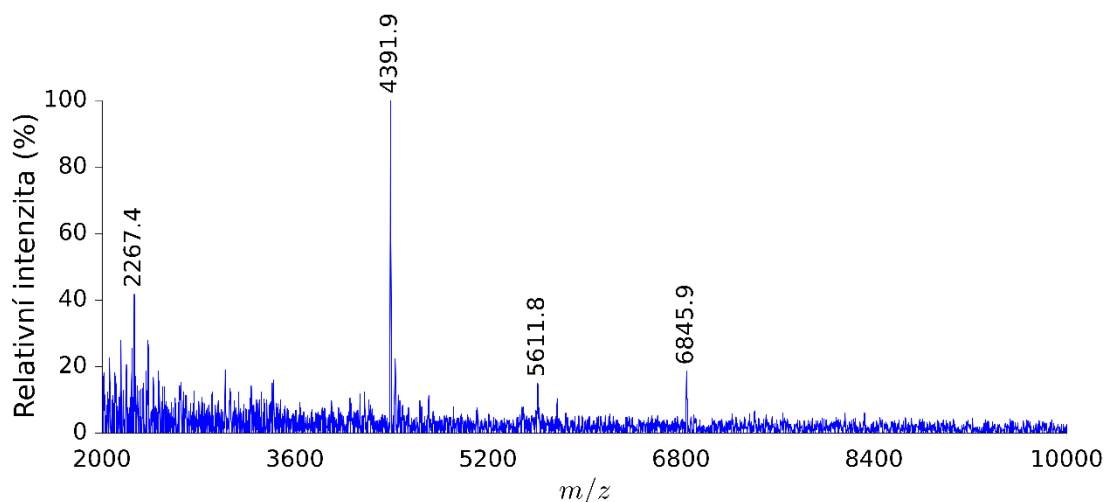
Obr. 9 Houby *B. tulipae* rostoucí po dobu 3 týdnů na odlišných typech růstových médií. (A) bramborovo-dextrosový agar, (B) bramborovo-mrkvový agar.

Pro sběr konidií byla nejprve použita voda. Vzhledem k vysoké hydrofobicitě konidií byl sběr obtížný, většina konidií zůstávala na Petriho misce. Ani v případě použití 50% methanolu či ACN nedošlo k výraznému zlepšení procedury sbírání. Pro lepší efektivitu sběru bylo proto nutné použít neionogenní detergent Tween 20. Sklerocie byly sesbírány manuálně pomocí pinzety. Po promytí vodou a přefiltrování byly všechny struktury použity pro další proteomické experimenty.

## 4.2 Detekce intaktních konidií a proteinů ve směsi s matricí

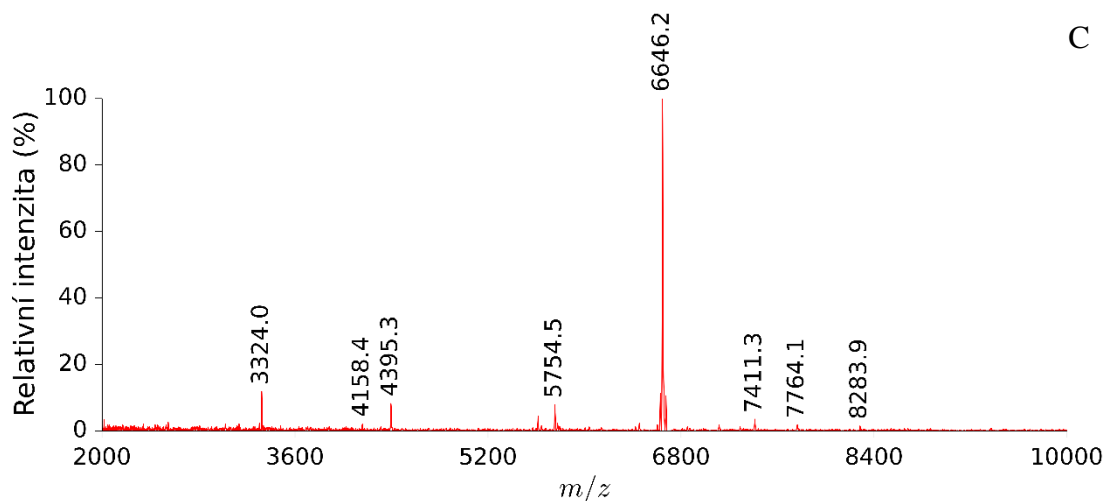
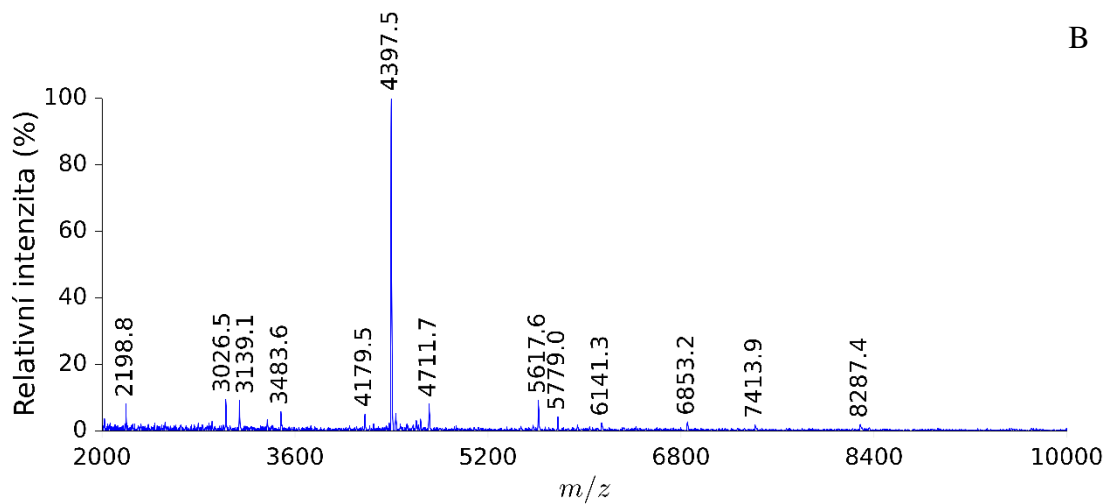
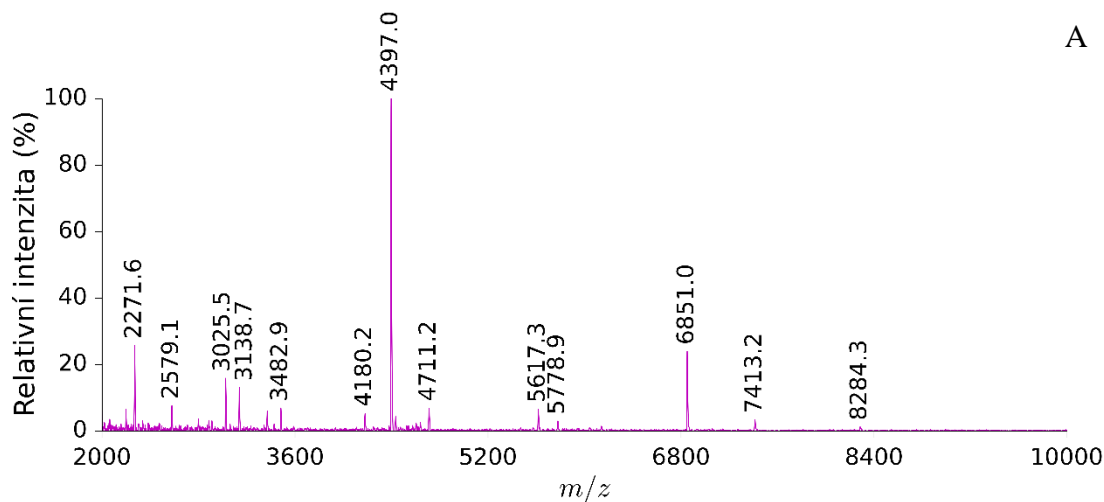
Pro měření hmotnostních spekter povrchových proteinů byly využity tři různé přístupy. Ve všech prováděných experimentech byly analyzovány konidie *B. cinerea* a pro porovnání i konidie *B. fabae*, které byly poskytnuty Mgr. Dmitry Loginovem, Ph.D. U prvního přístupu byly konidie rozsuspendovány ve směsi ACN a 2,5% TFA, u druhého byly extrahovány proteiny ve směsi ACN a 2,5% TFA a u třetího došlo k extrakci proteinů v 70% kyselině mravenčí a ACN. Vzorky byly měřeny na hmotnostním spektrometru Microflex MALDI-TOF ve směsi s matricí, která byla nanášena až ke vzorkům na destičce metodou „bottom-layer“. Při analýze byly použity různé druhy matric, které byly následně srovnávány podle výsledných hmotnostních spekter. Parametry pro srovnání kvality spekter bylo množství a intenzita pozorovaných odezev iontových proudů odpovídajících  $m/z$  jednotlivých proteinů, popř. jiných biologických molekul konidií.

Nejprve byly připraveny matrice běžně užívané pro měření proteinů. Konkrétně se jednalo o matrice CHCA, DHB, FA a SA. Výsledná spektra však nedosahovala stanovených požadavků (Obr. 10). Pro měření byly proto zkoušeny i směsi dvou a více různých matric, a to mix FA a SA v objemových poměrech 1:1, 1:3, 2:3, 3:2, 3:1 a směs CHCA, FA a SA v poměru 1:1:1. Ve většině případů nebylo možné dosáhnout výsledků požadujících kvalit, zvláště u druhu *B. cinerea*, Avšak v případě nanášení vzorku se směsí matric FA a SA byl pozorován výrazný nárůst množství i intenzity jednotlivých iontů pozorovaných v hmotnostním spektru (Obr. 11B). Při využití jakéhokoliv testovaného poměru matric FA a SA měla výsledná spektra dobré sledované vlastnosti. Podle provedených měření ale nejlepších požadavků dosahovala spektra při použití směsi FA a SA v objemovém poměru matric 2:3.



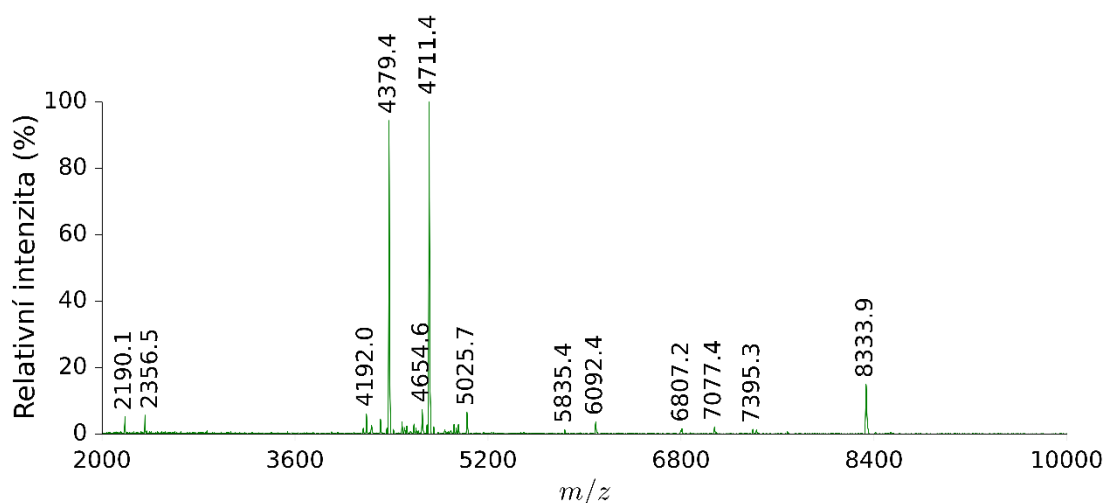
Obr. 10 Hmotnostní spektrum extrahovaných proteinů z konidií *B. cinerea* ve směsi ACN a 2,5% TFA měřené na MALDI-TOF MS. Jako matrice byla použita CHCA rozpuštěná ve směsi ACN a 2,5% TFA.

Dalším objektem zájmu bylo srovnání jednotlivých přístupů přípravy vzorků konidií *B. cinerea*. Porovnání výsledných spekter získaných po použití různých metod extrakce měřených s matricí tvořenou směsí FA a SA v poměru 2:3 je ilustrováno na Obr. 11. Při rozsuspendování konidií ve směsi ACN a 2,5% TFA a při extrakci proteinů z konidií ACN a 2,5% TFA byla výsledná spektra srovnatelná. Detekováno bylo velké množství iontů o  $m/z$  menším než 5 000, které při extrakci kyselinou mravenčí a ACN pozorovány nebyly. Ve všech prováděných extrakcích byly detekovány jak stejné ionty, které se v některých případech lišily v intenzitě ve výsledném hmotnostní spektru, tak ionty unikátní pouze pro daný typ extrakce. Například iont o  $m/z$  4397 (ve spektru po extrakci v kyselině mravenčí a ACN pozorován jako 4395) dosahoval při rozsuspendování a extrakci ve směsi ACN a 2,5% TFA mnohem vyšší intenzity než u extrakce v kyselině mravenčí a ACN. Naopak iont o  $m/z$  7413 (respektive 7411) byl pozorován ve všech srovnávaných hmotnostních spektrech s přibližně stejnou intenzitou. U extrakce kyselinou mravenčí a ACN dosahoval iont o  $m/z$  6646 velmi vysoké intenzity, ale u ostatních srovnávaných spekter nebyl vůbec pozorován. Rozdílnost v detekovaných iontech může být způsobena použitím různých kyseliny o rozdílných koncentracích (2,5% TFA v porovnání se 70% kyselinou mravenčí), což může mít vliv jak na množství a typ proteinů extrahovaných z buňky (různá úroveň narušení povrchu buňky, extrakce a uvolnění proteinů z povrchu), tak také na kvalitu tvorby krystalů matrice a ionizace v hmotnostním spektrometru.



Obr. 11 Hmotnostní spektrum MALDI-TOF konidií *B. cinerea* získané (A) rozsuspendováním konidií ve směsi ACN a 2,5% TFA, extrakcí proteinů (B) ve směsi ACN a 2,5% TFA a (C) v 70% kyselině mravenčí a ACN. Použitá matrice byla směs FA a SA v poměru 2:3 rozpuštěná ve směsi ACN a 2,5% TFA.

Během porovnání hmotnostních spekter povrchových proteinů *B. cinerea* a *B. fabae* byly detekovány ionty odlišných proteinů, například u *B. cinerea* iont s hodnotou  $m/z$  4397. Některé ionty se naopak u obou druhů překrývají, např.  $m/z$  4379 (Obr. 11A a 12). Přítomnost některých charakteristických proteinů na povrchu společných pro oba druhy může souviset s jejich příslušností ke stejnému rodu *Botrytis*.



Obr. 12 Hmotnostní spektrum konidií z *B. fabae* rozsuspendováno ve směsi ACN a 2,5% TFA, smíchaných s matricí a měřených pomocí MALDI-TOF MS. Jako matrice byla použita směs FA a SA v poměru 2:3.

### 4.3 Studium proteomu hub rodu *Botrytis*

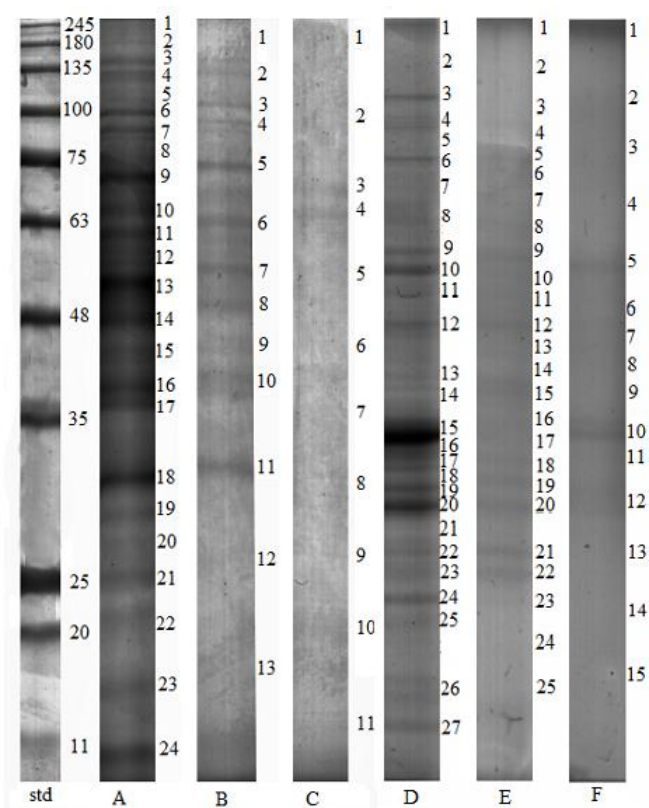
Analýza proteomu byla provedena u konidií *B. cinerea* a sklerocií *B. tulipae*. Po vypěstování biologického materiálu na příslušném růstovém médiu a jeho sběru byly studované struktury homogenizovány. Pro výběr vhodné metody homogenizace byly testovány tři možnosti, homegenizace v třecí misce s tlučkem, sonifikace a french press. Vzhledem k výsledkům získaných po měření koncentrace extrahovaných proteinů a pozorovaných na 1D SDS-PAGE a zároveň jednoduchosti metody byla pro finální experimenty použita sonifikace. Následně byla provedena postupná tříkroková extrakce proteinů z buněčných struktur. Nejprve byl použit močovinový pufr, u peletu byla provedena SDS extrakce a postup byl dokončen alkalickou extrakcí. U proteinů odebraných po každém typu extrakce byla provedena fenolická extrakce. Další zpracování vzorků probíhalo dvěma různými způsoby. V prvním došlo k separaci proteinů pomocí 1D SDS-PAGE a jejich štěpení v gelu. Následně byly peptidy přečištěny a separovány pomocí mikrokolonky s C<sub>18</sub> sorbentem a analyzovány prostřednictvím MALDI-TOF MS. Druhým způsobem zpracování vzorků bylo štěpení proteinů v roztoku. Kvůli velké obsáhlosti vzniklé směsi peptidů musely být vzorky separovány pomocí SCX extrakčních disků. Odsolení probíhalo přes C<sub>18</sub> disky. Vzorky byly měřeny prostřednictvím nanoLC-ESI MS. Vyhodnocení získaných dat probíhalo pro oba způsoby zpracování vzorků stejně. Pro identifikaci proteinů byl použit program Mascot a databáze Uniprot. Pro další vyhodnocení byly ponechány pouze proteiny, jejichž minimální skóre vypočtené Mascotem bylo 60 a u kterých byly nalezeny alespoň dva unikátní peptidy po měření MS/MS spekter. V závěrečném kroku byly identifikované proteiny rozděleny podle predikce lokalizace, molekulární funkce a role v biologických procesech. U predikce lokalizace byly proteiny zařazeny do tří skupin, a to intracelulární, membránové a sekretované. Mezi sekretované byly zařazeny i netypické sekretované proteiny, které neobsahují N-terminální signální peptid a jsou zapojeny do netypických sekrečních drah. Jedná se především o fibroblastové růstové faktory, interleukiny a galektiny (Bendtsen *et al.*, 2004).

#### 4.3.1 Separace proteinů jednorozměrnou gelovou elektroforézou

Při separaci proteinů z konidií *B. cinerea* prostřednictvím 1D SDS-PAGE bylo z gelu pro další analýzu a zpracování vyřezáno u extrakce močovinovým pufrem 24 pásů, u SDS pufru 13 pásů a u alkalického pufru 11 pásů (Obr. 13). Pozorovaná intenzita

obarvených pásů na gelu odpovídajících jednotlivým proteinům či jejich směsi byla výrazně vyšší pro vzorek po extrakci močovinovým pufrem, než po extrakci SDS či alkalickým pufrem. Zvláště v posledním případě vykazovaly výsledné pásy velmi nízkou intenzitu.

Během separace proteinů ze sklerocií *B. tulipae* prostřednictvím 1D SDS-PAGE bylo z gelu vyřezáno 27 pásů po extrakci močovinovým pufrem, 25 pásů po SDS extrakci a 15 pásů po alkalické extrakci (Obr. 13). Byl zde pozorován stejný trend jako u *B. cinerea*, kde docházelo k postupnému snižování intenzity obarvených pásů na gelu podle typu extrakce.



Obr. 13 Separace proteinů pomocí 1D SDS-PAGE. Barveno pomocí Coomassie Brilliant Blue. Standard je udáván v kDa. Proteiny z *B. cinerea* byly nejprve extrahovány (A) v močovinovém pufre, pak (B) v SDS pufre a nakonec byla provedena (C) alkalická extrakce. Podobně u *B. tulipae* došlo k extrakci (D) v močovinovém, (E) v SDS a (F) alkalickém pufre.



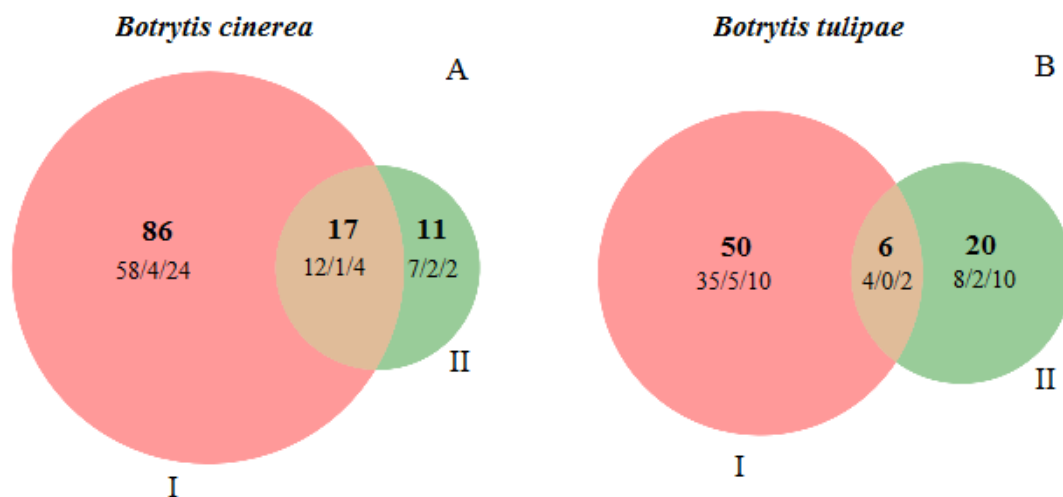
### 4.3.2 Identifikace proteinů prostřednictvím MALDI-TOF MS a predikce jejich lokalizace

Při měření proteinů separovaných v SDS-PAGE bylo u *B. cinerea* identifikováno celkem 114 proteinů pomocí MALDI-TOF MS. Z tohoto počtu bylo 86 unikátních pouze pro extrakci močovinným pufrům a 11 unikátních pro SDS pufr. Zbylých 17 proteinů bylo identifikováno u obou způsobů extrakce (Obr. 14A). U vzorků po použití alkalického pufru nebyl detekován žádný protein, což bylo způsobeno nízkou intenzitou pásů stanovených proteinů na gelu.

Po rozdělení proteinů do skupin podle jejich lokalizace v buňce pomocí programů pro predikci bylo zjištěno, že největší část identifikovaných proteinů tvoří intracelulární proteiny. V obou typech extrakce byl jejich celkový počet 77, což je téměř 88 % všech detekovaných proteinů. Do skupiny sekretovaných proteinů jich bylo zařazeno 30 a z toho 24 bylo unikátních pro extrakci močovinným pufrům. Nejméně z jejich celkového počtu bylo detekováno membránových proteinů, a to 7 (Obr. 14A).

Při stanovení proteomu sklerocií *B. tulipae* pomocí MALDI-TOF MS bylo identifikováno celkem 76 proteinů štěpených trypsinem v gelu. Unikátních pro extrakci močovinným pufrům bylo 50, pro SDS extrakci 20 a 6 proteinů bylo společných u obou typů zpracování vzorku (Obr. 14B). U alkalické extrakce nebyl podle zadaných kritérií identifikován žádný protein.

U predikce lokalizace bylo u *B. tulipae* možné pozorovat podobný trend jako u *B. cinerea*, kdy nejvíce bylo intracelulárních proteinů a nejméně membránových. Ze všech proteinů bylo 47 intracelulární, 22 sekretovaných a 7 membránových (Obr. 14B).



Obr. 14 Počet proteinů identifikovaných pomocí MALDI-TOF MS. Proteiny byly extrahovány v (I) močovinovém a (II) SDS pufru, separovány pomocí 1D SDS-PAGE a štěpeny trypsinem v gelu. Před analýzou na hmotnostním spektrometru byly vzniklé peptidy separovány na mikrokolonce. Tučným písmem je znázorněn celkový počet proteinů v dané skupině. Ostatní čísla určují predikci lokalizace proteinů v pořadí intacelulární/membránové/sekretované.

### 4.3.3 Identifikace proteinů prostřednictvím nanoLC-ESI MS a predikce jejich lokalizace

Prostřednictvím analýzy pomocí nanoLC-ESI MS bylo ve vzorcích proteinů extrahovaných ze sklerocií *B. cinerea* a štěpených trypsinem v roztoku identifikováno celkem 766 proteinů. Počty u jednotlivých typů extrakce byly srovnatelné. U močovinového pufru bylo nalezeno 226 unikátních proteinů, u SDS 194 unikátních a u alkalické extrakce 221 unikátních (Obr. 15A). Dalších 104 proteinů bylo společných pro dva typy extrakce a 21 proteinů bylo detekováno u všech typů extrakce.

Při predikci lokalizace bylo 538 proteinů určeno jako intracelulární, 148 membránové a 80 sekretované (Obr. 15A). Počty intracelulárních unikátních proteinů byly vyrovnané u všech testovaných extrakčních pufrů. Sekretovaných proteinů unikátních pro močovinový pufr bylo 50, zatímco u SDS pufru 11 a u alkalické extrakce 8. Počet unikátních membránových proteinů byl u SDS a alkalické extrakce srovnatelný (49 a 50), zatímco u močovinového pufru byl tento počet poloviční (24).

Obdobnou analýzou, jaká byla provedena u konidií *B. cinerea*, bylo ve vzorcích sklerocií *B. tulipae* detekováno celkem 478 proteinů (Obr. 15B). S postupnou extrakcí docházelo ke snižování jejich počtu. Při využití močovinového pufru bylo nalezeno 215 unikátních proteinů, u SDS 164 unikátních a u alkalické extrakce 53 unikátních. Zbylé proteiny byly pozorovány ve více typech extrakce zároveň. Přičemž 32 proteinů bylo shodných pro močovinový a SDS pufr a 13 bylo nalezeno zároveň u extrakce močovinovým pufrem a alkalické extrakce. Při porovnání SDS a alkalické extrakce bylo nalezeno 17 shodných proteinů. U všech tří typů bylo detekováno 8 totožných proteinů.

Během testování predikce lokalizace se většina proteinů zařadila do skupiny intracelulárních. Z celkového počtu jich do této skupiny patří 372. Dále bylo detekováno 85 membránových proteinů, kdy 24 je unikátních pro extrakci močovinovým pufrem, 36 pro SDS a 17 pro alkalickou extrakci. Do skupiny sekretovaných bylo přiřazeno 21 proteinů (Obr. 15B).

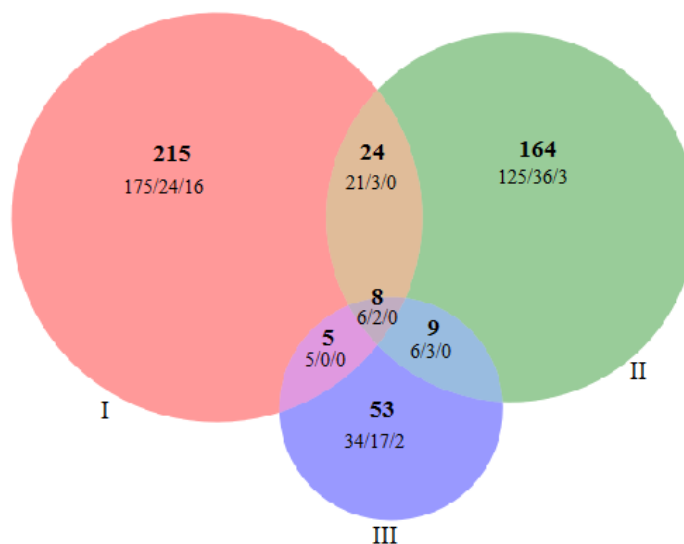
*Botrytis cinerea*

A



*Botrytis tulipae*

B



Obr. 15 Počet identifikovaných proteinů analyzovaných pomocí nanoLC-ESI MS. Před jejich charakterizací metodami MS byly proteiny extrahovány (I) močovinným, (II) SDS puřrem, pomocí (III) alkalické extrakce a následně řtěny trypsinem v roztoku. Tučným pısmem je znázorněn celkový počet proteinů v dané skupině. Ostatní čısla určují predikci lokalizace proteinů v pořadí intacelulární/membránové/sekretované.

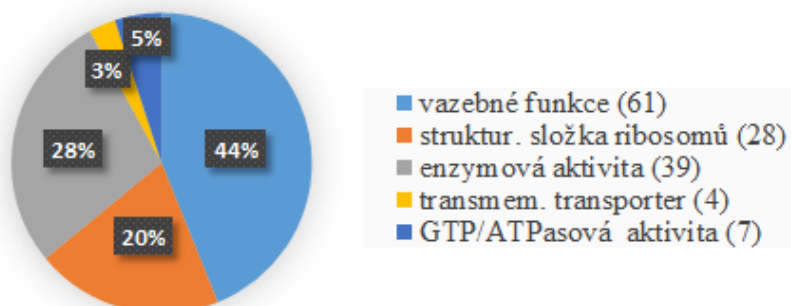
#### 4.3.4 Predikce funkce identifikovaných proteinů

Identifikované proteiny byly prostřednictvím online programů GoRetriever a GoSlimViewer rozděleny do skupin podle jejich molekulární funkce a role v biologických procesech. Při vyhodnocení molekulární funkce byly ve všech studovaných případech nejvíce zastoupeny proteiny s vazebnou funkcí. U měření pomocí MALDI MS tvořili u patogenu *B. cinerea* 44 % (Obr. 16A) a u *B. tulipae* 49 % (Obr. 16B). Při analýze vzorků prostřednictvím ESI MS bylo detekováno 45 % vazebných proteinů u *B. cinerea* (Obr. 16C) a 49 % u *B. tulipae* (Obr. 16D). Poměrně častý výskyt byl zaznamenán i u proteinů s enzymovou aktivitou, u *B. cinerea* 28 % na MALDI MS a 41 % na ESI MS, u *B. tulipae* 38 % na MALDI MS a 33 % na ESI MS. Dále bylo u konidií měřených pomocí MALDI MS nalezeno 20 % proteinů, které se podílí na struktuře ribosomů. Ostatní vyhodnocované molekulární funkce se pohybovaly do 10 %.

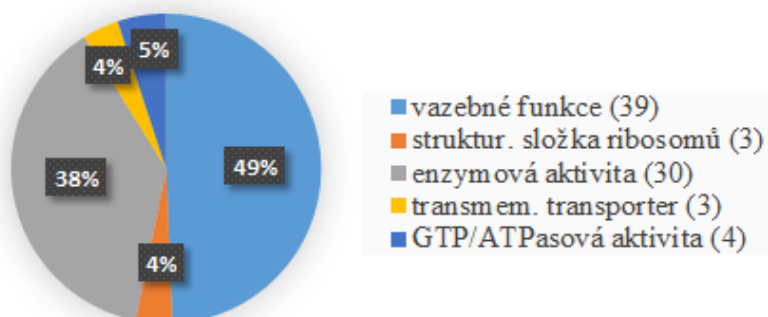
Při stanovení role v biologických procesech tvořily ve všech vyhodnocovaných vzorcích největší procento proteiny podílející se na metabolismu. U vzorku z konidií *B. cinerea* měřených pomocí MALDI MS představovala tato skupina až 47 % všech identifikovaných proteinů. Dále zde bylo detekováno 21 % proteinů zapojených do translace a 10 % hraje roli v biosyntetických procesech (Obr. 17A). U proteinů z *B. tulipae* identifikovaných pomocí MALDI MS jich bylo 40 % zapojených do metabolických procesů a 10 % do biosyntetických procesů (Obr. 17B). Při vyhodnocení proteinů identifikovaných prostřednictvím ESI MS se 31 % podílí na metabolických procesech jak u *B. cinerea* (Obr. 18A), tak u *B. tulipae* (Obr. 18B). Na transportu se podílí 20 % proteinů u *B. cinerea* a 15 % u *B. tulipae*. V biosyntetických procesech je zapojeno shodně 13 % u obou studovaných druhů. Do skupiny „ostatní“ byly zařazeny role proteinů se zastoupením pod 10 %, například role při buněčném dělení, při odpovědi na stres či organizaci cytoskeletu.

## Molekulární funkce

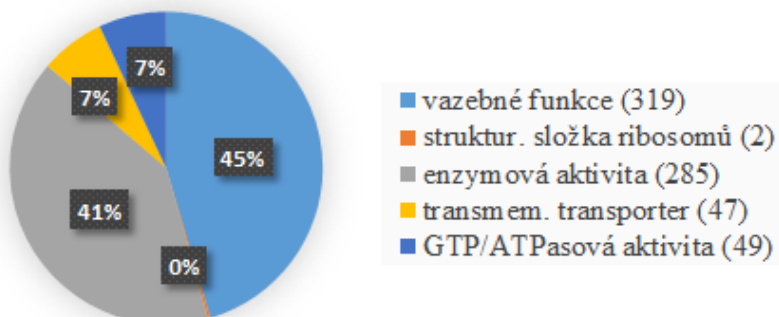
*B. cinerea* (MALDI MS) A



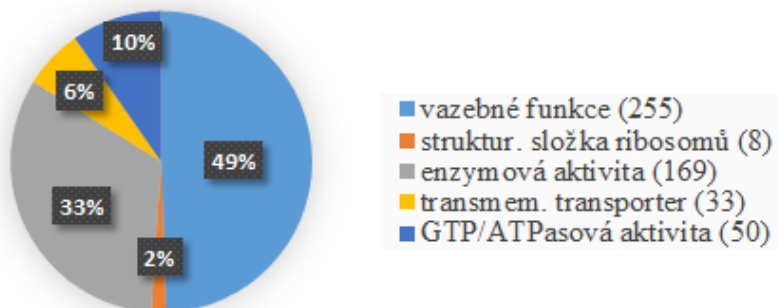
*B. tulipae* (MALDI MS) B



*B. cinerea* (ESI MS) C



*B. tulipae* (ESI MS) D

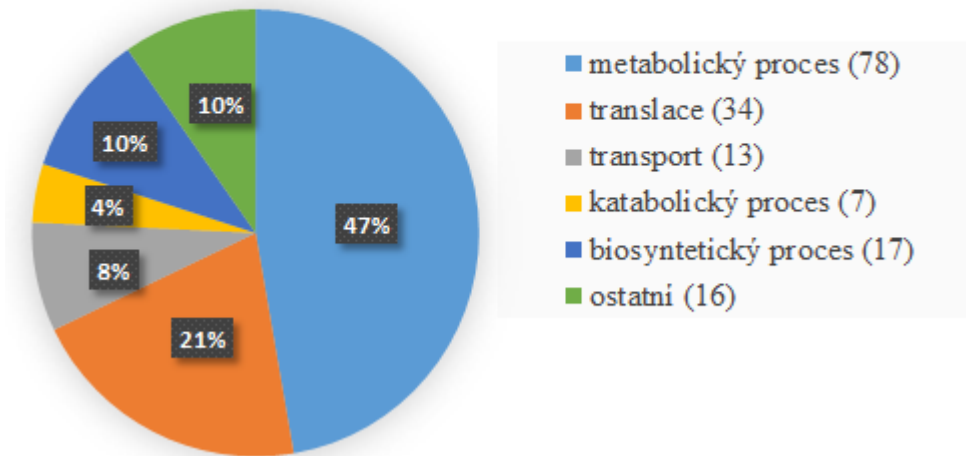


Obr. 16 Rozdělení identifikovaných proteinů z (A, C) konidií *B. cinerea* a (B, D) sklerocií *B. tulipae* do skupin podle jejich molekulární funkce, po jejich extrakci a charakterizaci pomocí (A, B) MALDI MS a (C, D) nanoLC-ESI-HCT MS. Číslo v závorce představuje počet proteinů.

## Role v biologických procesech

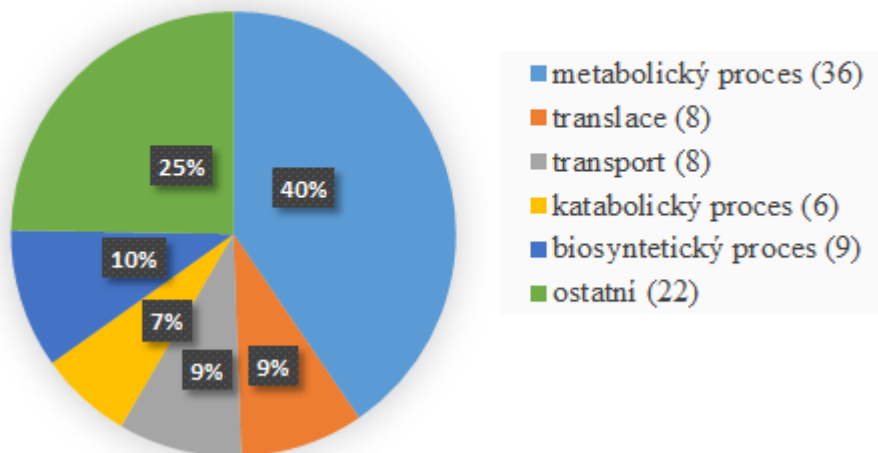
*B. cinerea* (MALDI MS)

A



*B. tulipae* (MALDI MS)

B

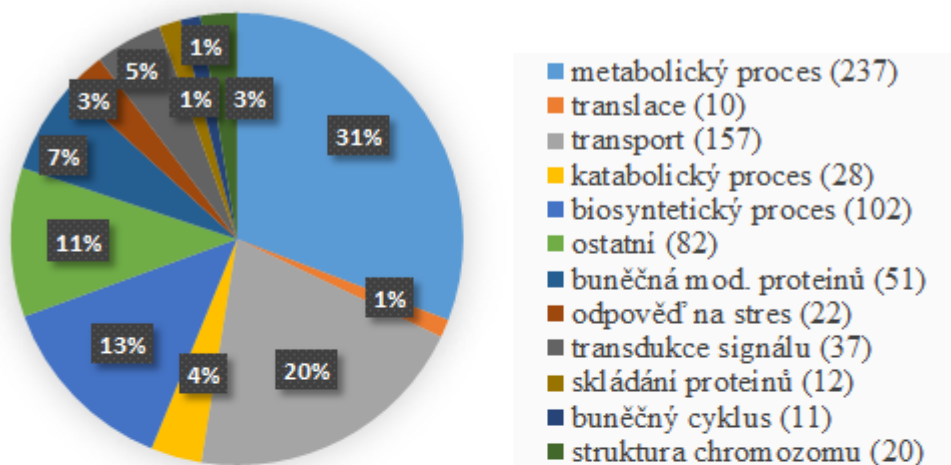


Obr. 17 Rozdělení identifikovaných proteinů z (A) konidií *B. cinerea* a (B) sklerocií *B. tulipae* do skupin podle jejich role v biologických procesech, po jejich extrakci, separaci 1D SDS-PAGE a charakterizaci pomocí MALDI MS. Číslo v závorce představuje počet proteinů.

## Role v biologických procesech

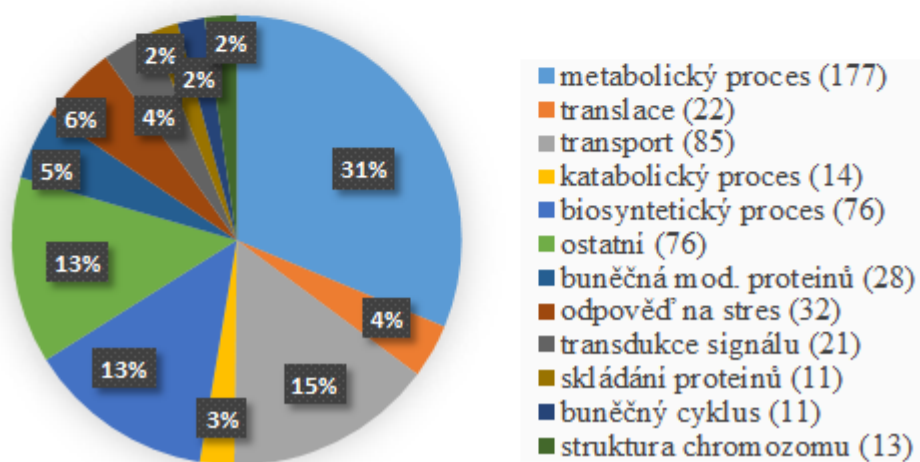
*B. cinerea* (ESI MS)

A



*B. tulipae* (ESI MS)

B



Obr. 18 Rozdělení identifikovaných proteinů z (A) konidií *B. cinerea* a (B) sklerocií *B. tulipae* do skupin podle jejich role v biologických procesech, po jejich extrakci a charakterizaci pomocí nanoLC-ESI-HCT MS. Číslo v závorce představuje počet proteinů.



## 5 DISKUSE

V dnešní době se rychlá, snadná a spolehlivá identifikace mikroorganismů stala nepostradatelnou pro řadu odvětví, jako je například zemědělství, kde se jedná především o studium houbových patogenů. Je nutné disponovat vhodnými technikami finální analýzy, které nabízejí vysokou citlivost a reprodukovatelnost. Ačkoliv již bylo zavedeno několik protokolů pro analýzu řady hub, existuje ještě velká řada houbových organismů, u kterých tento postup dosud nebyl popsán. Tato měření ale mohou být ovlivněna řadou faktorů jako je například množství konidií v suspenzi, typ a koncentrace matrice či rozpouštědlo, které ovlivňují uvolňování proteinů z buněčných stěn. V naší práci byla použita extrakce organickými kyselinami, kyselina mravenčí (Fenselau a Demirev, 2001) a TFA (Kemptner *et al.*, 2009), jejíž použití je často nutné pro získání kvalitního hmotnostního spektra. V předchozích studiích bylo zjištěno, že rostoucí koncentrace TFA zvyšuje intenzitu signálu iontů, zároveň je ale poškození buněčné stěny u 0,1% a 2,5% TFA srovnatelné, což bylo potvrzeno prostřednictvím mikroskopických technik (Chalupová *et al.*, 2012). Z tohoto důvodu byla identifikace fytopatogenních hub rodu *Botrytis* v této práci provedena rozsuspendování v ACN s 2,5% TFA, extrakcí v ACN s 2,5% TFA po dobu 60 min a pro srovnání i extrakcí v 70% kyselině mravenčí a ACN po dobu 20 min a konečným měřením pomocí MALDI-TOF MS. Z pozorování výsledných spekter vyplývá, že při použití vyšší koncentrace organické kyseliny docházelo k větší intenzitě iontů u extrahovaných proteinů pro vyšší *m/z*.

Při studiu intaktních proteinů u patogeních hub rodu *Fusarium* byly mezi využitými maticemi i CHCA a DHB. Informací získaných z výsledných spekter bylo velmi málo, detekováno bylo pouze několik iontů o nízké intenzitě píků. Naopak hmotnostní spektra při využití FA jako matrice poskytovaly nejvíce detekovaných píků (Kemptner *et al.*, 2009). Při měření intaktních buněk u *Bremia lactucae* pomocí MALDI-TOF MS poskytovaly použité matrice CHCA, FA, SA a DHB srovnatelně kvalitní spektra. Nejlepší spektra ale byla pozorována u mixu FA a SA v objemovém poměru 1:2 a 1:3 (Chalupová *et al.*, 2012). Při měření fytopatogenních hub *B. cinerea* a *B. fabae* za využití různých typů matic došlo v souladu s poznatky z předchozích studií k získání nedostatečně kvalitních výsledných spekter u matic CHCA, DHB, FA a SA. Naopak nejvíce detekovaných píků s vysokou intenzitou bylo nalezeno u směsi FA a SA v poměru 2:3. Z pozorování a srovnání s předchozími studiemi povrchových proteinů

vyplývá, že pro každý mikroorganismus je nutná samostatná optimalizace pracovního postupu (Kemptner *et al.*, 2009; Chalupová *et al.*, 2012, 2014).

Při srovnání hmotnostních spekter povrchových proteinů *B. cinerea* a *B. fabae* byly detekovány ionty odlišných proteinů. Tyto specifické signály iontů mohou sloužit pro rychlou identifikaci daného patogenu, jelikož měření intaktních proteinů pomocí MALDI-TOF MS poskytuje diagnostický nástroj pro identifikaci mikroorganismů na základě unikátních proteinů hmotnostního spektra analyzovaného druhu (Šulc *et al.*, 2009). Zároveň byly pozorovány i shodné ionty, což může souviset se zařazením obou studovaných hub do stejného rodu. Získaná hmotnostní spektra mají velmi dobrou reprodukovatelnost a v budoucnu by se daly využít jako součást knihovny pro identifikaci mikroorganismů.

Druhá část diplomové práce byla zaměřena na studium proteomu fytopatogenních hub rodu *Botrytis*. Konkrétně byly studovány struktury, které jsou houbami využívány pro přežití. Důvodem je jejich významný podíl ve virulenci daného patogenu (Olaya-Abril *et al.*, 2014). U patogenu *B. cinerea* byly měřeny proteiny extrahované z konidií u *B. tulipae* proteiny extrahované ze sklerocií. Jedná se o dosud velmi málo popsanou problematiku, jelikož zatím se studie týkaly převážně houbového mycelia (Loginov a Šebela, 2016). V současnosti je výzkum *Botrytis* usnadněn pokroky v sekvenování genomů, např. u *B. cinerea* kmen B05.10 (van Kan *et al.*, 2016).

V naší práci jsme pro zvýšení počtu identifikovaných proteinů využili postupnou extrakci z buněčných struktur. Ze všech tří vyhodnocovaných postupů jich bylo detekováno při stanovení pomocí MALDI MS 114 a 76 a při ESI MS 776 a 478. Přehled vybraných identifikovaných proteinů je v příloze v Tab. P1. Vzhledem k homogenizaci buněk tvořily největší skupinu intarcelulární proteiny. Sekretované byly ve všech případech zastoupeny maximálně do 30 % a membránové do 20 %. Odlišné množství detekovaných proteinů u MALDI MS a ESI MS lze vysvětlit rozdílným postupem při přípravě vzorků. Jedná se o odlišný způsob štěpení proteinů, kdy u vzorků měřených pomocí MALDI MS bylo použito štěpení v gelu až po separaci proteinů a u vzorků stanovovaných pomocí ESI bylo provedeno štěpení v roztoku celé směsi proteinů. Dalším rozdílem bylo provedení kapalinové chromatografie. Zatímco u ESI MS byla použita nanoLC, u MALDI MS byly vzorky separovány manuálně sestrojenou kolonkou s krátkou kapilárou. Vzhledem k charakteru systému není možné dosáhnout separační účinnosti nanoLC.

Při zařazení proteinů do skupin podle role v biologických procesech převažovaly ty s metabolickou funkcí, vždy téměř 50 %. Vzhledem k jejich dobré rozpustnosti jsou obecně hojně zastoupeny v proteomických studiích (Noir *et al.*, 2009). Tento jev se objevil mimo jiné také při analýze houbového proteomu *Uromyces appendiculatus*, kdy dosahovaly 66 % z celkového počtu proteinů (Cooper *et al.*, 2006), nebo 65 % u *Candida albicans* (Hernandez *et al.*, 2004). Mezi námi identifikovanými proteiny jsou například ty, které se podílejí na metabolismu sacharidů jako fosfoenolpyruvát karboxykinasa (EC 4.1.1.31), pyruvát dehydrogenasa kinasa (EC 2.7.11.2) a glycerinaldehyd 3-fofátdehydrogenasa (EC 1.2.1.12). Nebo enzymy podílející se na produkci energie jako citrát synthasa (EC 2.3.3.1) a malát dehydrogenasa (EC 1.1.1.37). Vzhledem k našim výsledkům a poznatkům z již publikovaných článků je patrné, že houbové struktury k přežití obsahují velké množství proteinů s metabolickou aktivitou, které zajišťují zisk potřebné energie pro následné zahájení růstu.

I přestože je Botrytis dobře studovaný organismus, stále je nedostatek údajů týkajících se konidií a sklerocií. Jejich studium může umožnit charakterizaci faktorů virulence, jako jsou například glykosigasy, proteasy a lipasy (Kubicek *et al.*, 2014). Získané údaje mohou pomoci při charakterizaci proteinů podílejících se na infekci a při stanovování enzymů vhodných do fungicidů.

## 6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá analýzou houbových fytopatogenů rodu *Botrytis*. Úvod praktické části je věnován kultivaci hub a s tím spojený výběr vhodného růstového média a metody pro sběr biologického materiálu. Námi studované struktury, konidie a sklerocie, byly poté analyzovány proteomickými metodami.

Součástí práce bylo měření hmotnostních spekter u intaktních buněk a proteinů ve směsi s matricí prostřednictvím MALDI-TOF MS. V první řadě byla úspěšně provedena optimalizace výběru vhodné matrice. Kromě toho byly porovnány tři odlišné způsoby přípravy vzorku pro analýzu, měření intaktních buněk a dvě různě provedené extrakce proteinů. Zatímco sada detekovaných iontů byla u jednotlivých metod přípravy vzorku z části shodná, celkový profil pozorovaných hmot ve spektru, stejně jako samotná kvalita spekter, byl závislý na typu a koncentraci použité kyseliny pro suspenzi buněk nebo extrakci proteinů. Dále byly zkoumány rozdíly v hmotnostních spektrech u konidií z *B. cinerea* a *B. tulipae*. Přes určité shodné ionty byla naměřená spektra u těchto dvou druhů hub výrazně odlišná, což je důležité pro následnou rychlou detekci patogenů rostlin v praxi.

V rámci diplomové práce byl analyzován celkový proteom konidií a sklerocií houbových patogenů rodu *Botrytis*. Třístupňová extrakce proteinů z buněčných struktur byla následována buď SDS-PAGE a štěpením proteinů v gelu, nebo štěpením proteinů v roztoku. V prvním případě byla charakterizace proteinů provedena prostřednictvím MALDI MS, kdy u *B. cinerea* bylo identifikováno 114 proteinů a u *B. tulipae* 76 proteinů. V případě druhém, štěpení v roztoku, byla charakterizace provedena prostřednictvím ESI MS, kdy u *B. cinerea* bylo identifikováno 776 proteinů a u *B. tulipae* 478 proteinů. U identifikovaných proteinů byla dále predikována lokalizace, kdy ve všech studovaných vzorcích převládaly intracelulární proteiny. Při predikci molekulární funkce byly nejčastěji detekovány proteiny s vazebnou funkcí a u role v biologických procesech převládaly metabolické procesy.

## 7 LITERATURA

- Agrios G. N. (2005): *Plant pathology*. 5.vydání, Elsevier Academic Press, Waltham, Spojení státy americké, 969 stran.
- Agbase-Goslim home page: <http://www.agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/goslimviewer-select.pl> (10. 4. 2016).
- Agbase-Goretriever home page: <http://www.agbase.msstate.edu/cgi-bin/tools/goretriever-select.pl> (10. 4. 2016).
- Barros B. H. R., da Silva S. H., dos Reis Marques E. D. R., Rosa J. C., Yatsuda A. P., Roberts D. W., Braga G. U. L. (2010): A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. *Fungal Biology* **114**, 572–579.
- Becker P. T., de Bel A., Martiny D., Ranque S., Piarroux R., Cassagne C., Detandt M., Hendrickx M. (2014): Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Medical Mycology* **52**, 826–834.
- Bendtsen J. D., Jensen L. J., Blom N., Von Heijne G., Brunak S. (2004): Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein engineering, design & selection* **17**, 349–356.
- Bennett J., Scott K. J. (1971): Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Analytical Biochemistry* **43**, 173–182.
- Bergman B., Beijersb J., Overeem J., Sijpeste A. (1967): Isolation and identification of alpha-methylene-butyrolactone a fungitoxic substance from tulips. *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas* **86**, 709–713.
- Beuchat L. R. (1992): Media for detecting and enumerating yeasts and moulds. *International Journal of Food Microbiology* **17**, 145–158.
- Blackstock W. P., Weir M. P. (1999): Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology* **17**, 121–127.
- Burkhart J. M., Schumbrutzki C., Wortelkamp S., Sickmann A., Zahedi R. P. (2012): Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. *Journal of Proteomics* **75**, 1454–1462.
- Cock P. J. A., Antao T., Chang J. T., Chapman B. A., Cox C. J., Dalke A., Friedberg I., Hamelryck T., Kauff F., Wilczynski B., de Hoon M. J. L. (2009): Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics* **25**, 1422–1423.
- Coely-Smith J. R., Verhoeff K., Jarvis W. R. (1980): *The biology of Botrytis*. 1. vydání, Academia Press, Gent, Belgie, 318 stran.
- Colmenares A. J., Aleu J., Durán-Patrón R., Collado I. G., Hernández-Galán R. (2002): The Putative Role of Botrydial and Related Metabolites in the Infection Mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology* **28**, 997–1005.
- Cooper B., Garrett W. M., Campbell K. B. (2006): Shotgun identification of proteins from uredospores of the bean rust *Uromyces appendiculatus*. *Proteomics* **6**, 2477–2484.
- Damerval C., De Vienne D., Zivy M., Thiellement H. (1986): Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* **7**, 52–54.
- Demirev P. A., Fenselau C. (2008): Mass spectrometry for rapid characterization of microorganisms. *Annual Review of Analytical Chemistry* **1**, 71–93.
- Easterling M. L., Colangelo C. M., Scott R. A., Amster I. J. (1998): Monitoring protein expression in whole bacterial cells with MALDI time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **70**, 2704–2709.
- El-Akhal M. R., Colby T., Cantoral J. M., Harzen A., Schmidt J., Fernández-Acero F. J. (2013): Proteomic analysis of conidia germination in *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology* **195**, 227–246.

- Eng J. K., McCormack A. L., Yates J. R. (1994): An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **5**, 976–989.
- Faurobert M., Pelpoir E., Chaïb J. (2007): Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods in Molecular Biology* **355**, 9–14.
- Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M. (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64–71.
- Fenselau C., Demirev P. A. (2001): Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **20**, 157–171.
- Fernández-Acero F. J., Jorge I., Calvo E., Vallejo I., Carbú M., Camafeita E., López J. A., Cantoral J. M., Jorrín J. (2006): Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Proteomics* **6**, 88–96.
- Franc V., Řehulka P., Medda R., Padiglia A., Floris G., Šebela M. (2013): Analysis of the glycosylation pattern of plant copper amine oxidases by MALDI-TOF/TOF MS coupled to a manual chromatographic separation of glycans and glycopeptides. *Electrophoresis* **34**, 2357–2367.
- Franc V., Šebela M., Řehulka P., Končítíková R., Lenobel R., Madzak C., Kopečný D. (2012): Analysis of N-glycosylation in maize cytokinin oxidase/dehydrogenase 1 using a manual microgradient chromatographic separation coupled offline to MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Journal of Proteomics* **75**, 4027–4037.
- Gerlagh M., Whipps J. M., Budge S. P., Geijn H. M. G. (1996): Efficiency of isolates of *Coniothyrium minitans* as mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum* and *Botrytis cinerea* on tomato stem pieces. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 787–793.
- Gibb S., Strimmer K. (2012): MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. *Bioinformatics* **28**, 2270–2271.
- Gibson D. M., King B. C., Hayes M. L., Bergstrom G. C. (2011): Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. *Current Opinion in Microbiology* **14**, 264–270.
- Giraldo M. C., Valent B. (2013): Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 800–814.
- Gonzalez-Fernandez R., Aloria K., Arizmendi J. M., Jorrin-Novo J. V. (2013): Application of Label-Free Shotgun nUPLC–MSE and 2-DE approaches in the study of *Botrytis cinerea* mycelium. *Journal of Proteome Research* **12**, 3042–3056.
- Gonzalez-Fernandez R., Jorrin-Novo J. V. (2012): Contribution of proteomics to the study of plant pathogenic fungi. *Journal of Proteome Research* **11**, 3–16.
- Graves P. R., Haystead T. A. J. (2002): Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and molecular biology review* **66**, 39–63.
- Grinyer J., McKay M., Nevalainen H., Herbert B. R. (2004): Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics* **45**, 163–169.
- Gygi S. P., Corthals G. L., Zhang Y., Rochon Y., Aebersold R. (2000): Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 9390–9395.
- 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. *Journal of Mass Spectrometry* **33**, 750–756.
- Hahn M. (2014): The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology* **7**, 133–141.
- Han X., Aslanian A., Yates J. R. (2008): Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* **12**, 483–490.
- Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. (2004): *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 43–56.
- Hernandez R., Nombela C., Diez-Orejas R., Gil C. (2004): Two-dimensional reference map of *Candida albicans* hyphal forms. *Proteomics* **4**, 374–382.

- Hettick J. M., Green B. J., Buskirk A. D., Kashon M. L., Slaven J. E., Janotka E., Blachere F. M., Schmechel D., Beezhold D. H. (2008): Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Analytical Biochemistry* **380**, 276–281.
- Hillenkamp F., Karas M., Beavis R. C., Chait B. T. (1991): Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical Chemistry* **63**, 1193A–1203A.
- 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 Communications in Mass Spectrometry* **10**, 1227–1232.
- Horbach R., Navarro-Quesada A. R., Knogge W., Deising H. B. (2011): When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* **168**, 51–62.
- Horneffer V., Haverkamp J., Janssen H.-G., ter Steeg P. F., 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. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **15**, 1444–1454.
- Hu L. B., Li H. B., Sun J. L., Zeng J. (2011): Effect of laminarin on *Aspergillus Flavus* growth and aflatoxin production. *Advanced Materials Research* **343**, 1168–1171.
- Hunter J. D. (2007): Matplotlib: A 2D graphics environment. *Computing in Science Engineering* **9**, 90–95.
- Hurkman W. J., Tanaka C. K. (2007): Extraction of wheat endosperm proteins for proteome analysis. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **849**, 344–350.
- Chalupová J., Raus M., Sedlářová M., Šebela M. (2014): Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances* **32**, 230–241.
- 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. *Journal of mass spectrometry* **47**, 978–986.
- Chen S., Harmon A. C. (2006): Advances in plant proteomics. *Proteomics* **6**, 5504–5516.
- Chmelík J. (2005): *Proteomický průvodce*. *Chemické listy* **99**, 883–885.
- Isaacson T., Damasceno C. M. B., Saravanan R. S., He Y., Catalá C., Saladié M., Rose J. K. C. (2006): Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nature Protocols* **1**, 769–774.
- James P. (1997): Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly Reviews of Biophysics* **30**, 279–331.
- Karas M., Hillenkamp F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* **60**, 2299–2301.
- 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 Communications in Mass Spectrometry* **12**, 625–629.
- Kemptoner J., Marchetti-Deschmann M., Mach R., Druzhinina I. S., Kubicek C. P., Allmaier G. (2009): 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 communications in mass spectrometry* **23**, 877–884.
- Kim Y., Nandakumar M. P., Marten M. R. (2007): Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation. *Fungal genetics and biology* **44**, 886–895.
- Kniemeyer O., Lessing F., Scheibner O., Hertweck C., Brakhage A. A. (2006): Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Current Genetics* **49**, 178–189.

- 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 communications in mass spectrometry* **10**, 883–888.
- Krogh A., Larsson B., von Heijne G., Sonnhammer E. L. (2001): Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* **305**, 567–580.
- Kubicek C. P., Starr T. L., Glass N. L. (2014): Plant cell wall–degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **52**, 427–451.
- Kuksis A., Myher J. J. (1995): Application of tandem mass spectrometry for the analysis of long-chain carboxylic acids. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Applications* **671**, 35–70.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lau A. F., Drake S. K., Calhoun L. B., Henderson C. M., Zelazny A. M. (2013): Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* **51**, 828–834.
- Lewis K., Whipps J. M., Cooke R. C. (1989): *Biotechnology of Fungi for Improving Plant*. 1. vydání, Cambridge University Press, London, Velká Británie, 191 stran.
- Liang Y., Rahman M. H., Strelkov S. E., Kav N. N. V. (2010): Developmentally induced changes in the sclerotial proteome of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology* **114**, 619–627.
- Li A., Sowder R. C., Henderson L. E., Moore S. P., Garfinkel D. J., Fisher R. J. (2001): Chemical cleavage at aspartyl residues for protein identification. *Analytical Chemistry* **73**, 5395–5402.
- Li H., Guo A., Wang H. (2008): Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry* **108**, 1–13.
- 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 Communications in Mass Spectrometry* **14**, 2393–2400.
- Lim D., Hains P., Walsh B., Bergquist P., Nevalainen H. (2001): Proteins associated with the cell envelope of *Trichoderma reesei*: a proteomic approach. *Proteomics* **1**, 899–909.
- Loginov D., Šebela M. (2016): Proteomics of survival structures of fungal pathogens. *New Biotechnology*. DOI:10.1016/j.nbt.2015.12.011.
- Lorenzini M., Million R., Franchin C., Zapparoli G., Arrigoni G., Simonato B. (2015): Identification of potential protein markers of noble rot infected grapes. *Food Chemistry* **179**, 170–174.
- 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 Communications in Mass Spectrometry* **14**, 2220–2229.
- Mansfield J., Hutson R. (1980): Microscopical studies on fungal development and host responses in broad bean and tulip leaves inoculated with 5 species of *Botrytis*. *Physiological Plant Pathology* **17**, 131–138.
- Marklein G., Josten M., Klanke U., Müller E., Horr  R., Maier T., Wenzel T., Kostrzewa M., Bierbaum G., Hoerauf A., Sahl H. G. (2009): Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **47**, 2912–2917.
- Matrix Science home page: [http://www.matrix-science.com/mascot\\_support\\_v2\\_4.html](http://www.matrix-science.com/mascot_support_v2_4.html) (30. 3. 2016).
- McCarthy F. M., Wang N., Magee G. B., Nanduri B., Lawrence M. L., Camon E. B., Barrell D. G., Hill D. P., Dolan M. E., Williams W. P., Luthe D. S., Bridges S. M., Burgess S. C. (2006): AgBase: a functional genomics resource for agriculture. *BMC Genomics* **7**, 229.



- McLafferty F. W., Breuker K., Jin M., Han X., Infusini G., Jiang H., Kong X., Begley T. P. (2007): Top-down MS, a powerful complement to the high capabilities of proteolysis proteomics. *The FEBS journal* **274**, 6256–6268.
- McLuckey S. A., Glish G. L., Van Berkel G. J. (1991): Charge determination of product ions formed from collision-induced dissociation of multiply protonated molecules via ion/molecule reactions. *Analytical Chemistry* **63**, 1971–1978.
- McLuckey S. A., Van Berkel G. J., Goeringer D. E., Glish G. L. (1994): Ion trap mass spectrometry. Using high-pressure ionization. *Analytical Chemistry* **66**, 737A–743A.
- Meuzelaar H. L. C., Kistemaker P. G. (1973): Technique for fast and reproducible fingerprinting of bacteria by pyrolysis mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **45**, 587–590.
- Moravcová D., Kahle V., Rehulková H., Chmelík J., Rehulka P. (2009): Short monolithic columns for purification and fractionation of peptide samples for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry analysis in proteomics. *Journal of Chromatography* **1216**, 3629–3636.
- Nägele E., Vollmer M., Hörth P., Vad C. (2004): 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Expert Review of Proteomics* **1**, 37–46.
- Noir S., Colby T., Harzen A., Schmidt J., Panstruga R. (2009): A proteomic analysis of powdery mildew (*Blumeria graminis f.sp. hordei*) conidiospores. *Molecular Plant Pathology* **10**, 223–236.
- Nováková L., Douša M. (2013): *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vydání, Europrint, Praha, Česká republika, 299 stran.
- Numpy home page: <http://www.numpy.org> (11. 4. 2016).
- O'Farrell P. H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **250**, 4007–4021.
- Olaya-Abril A., Jiménez-Munguía I., Gómez-Gascón L., Rodríguez-Ortega M. J. (2014): Surfomics: shaving live organisms for a fast proteomic identification of surface proteins. *Journal of Proteomics* **97**, 164–176.
- Olsen J. V., Ong S. E., Mann M. (2004): Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & cellular proteomics* **3**, 608–614.
- Ondráčková E. (2014): Metodika biologické ochrany rostlin s využitím hub rodu *Clonostachys*: certifikovaná metodika. 1. vydání, Agritec, Šumperk, Česká republika, 23 stran.
- Pandas home page: <http://pandas.pydata.org> (11. 4. 2016).
- Parker C. E., Warren M. R., Mocanu V. (2010): *Neuroproteomics*. 1. vydání, CRC Press, Boca Raton, Spojené státy americké, 354 stran.
- Perkins D. N., Pappin D. J., Creasy D. M., Cottrell J. S. (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551–3567.
- Petersen T. N., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. (2011): SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* **8**, 785–786.
- Pitarch A., Nombela C., Gil C. (2008): Cell wall fractionation for yeast and fungal proteomics. *Methods in Molecular Biology* **425**, 217–239.
- Prell H. H., Day P. R. (2001): *Plant-Fungal Pathogen Interaction, a classical and molecular view*. 1. vydání, Springer-Verlag, Berlín, Německo, 214 stran.
- Python home page: <https://www.python.org> (1. 4. 2016).
- Qin L., Liu X., Li J., Chen H., Yao Q., Yang Z., Wang L., Chen K. (2009): Protein Profile of *Nomuraea rileyi* Spore Isolated from Infected Silkworm. *Current Microbiology* **58**, 578–585.
- Rabilloud T., Vaezzadeh A. R., Potier N., Lelong C., Leize-Wagner E., Chevallet M. (2009): Power and limitations of electrophoretic separations in proteomics strategies. *Mass Spectrometry Reviews* **28**, 816–843.
- Ranque S., Normand A. C., Cassagne C., Murat J.-B., Bourgeois N., Dalle F., Gari-Toussaint M., Fourquet P., Hendrickx M., Piarroux R. (2014): MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. *Mycoses* **57**, 135–140.
- R project home page: <https://www.r-project.org> (11. 4. 2016).

- Rossall S., Mansfield J., Hutson R. (1980): Death of *Botrytis-cinerea* and *Botrytis-fabae* following exposure to wyerone derivatives invitro and during infection development in broad bean-leaves. *Physiological Plant Pathology* **16**, 135–146.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3828–3834.
- Saenz A. J., Petersen C. E., Valentine N. B., Gantt S. L., Jarman K. H., Kingsley M. T., Wahl K. L. (1999): Reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **13**, 1580–1585.
- Sato S., Liu F., Koc H., Tien M. (2007): Expression analysis of extracellular proteins from *Phanerochaete chrysosporium* grown on different liquid and solid substrates. *Microbiology* **153**, 3023–3033.
- Sauer S., Freiwald A., Maier T., Kube M., Reinhardt R., Kostrzewa M., Geider K. (2008): Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *Plos one* **3**, e2843.
- SecretomeP home page: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP-1.0> (10. 4. 2016).
- Shah P., Atwood J. A., Orlando R., El Mubarek H., Podila G. K., Davis M. R. (2009): Comparative proteomic analysis of *Botrytis cinerea* secretome. *Journal of Proteome Research* **8**, 1123–1130.
- Schroers H. J., Samuels G. J., Seifert K. A., Gams W. (1999): Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia* **91**, 365–385.
- SignalP 4.1 server home page: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> (10. 4. 2016).
- Sinski J. T., Avermaete D. V., Kelley L. M. (1981): Analysis of tests used to differentiate *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Clinical Microbiology* **13**, 62–65.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76–85.
- Staats M., van Baarlen P., van Kan J. A. L. (2005): Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* **22**, 333–346.
- Suh M. J., Fedorova N. D., Cagas S. E., Hastings S., Fleischmann R. D., Peterson S. N., Perlin D. S., Nierman W. C., Pieper R., Momany M. (2012): Development stage-specific proteomic profiling uncovers small, lineage specific proteins most abundant in the *Aspergillus fumigatus* conidial proteome. *Proteome Science* **10**, e30.
- Sun L., Teramoto K., Sato H., Torimura M., Tao H., Shintani T. (2006): Characterization of ribosomal proteins as biomarkers for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectral identification of *Lactobacillus plantarum*. *Rapid communications in mass spectrometry* **20**, 3789–3798.
- 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.
- Šulc M., Peslová K., Žabka M., Hajduch M., Havlíček V. (2009): Biomarkers of *Aspergillus* spores: Strain typing and protein identification. *International Journal of Mass Spectrometry* **280**, 162–168.
- The global proteome machine home page: <http://www.thegpm.org/crap/index.html> (4. 4. 2016).
- Thomas J. J., Falk B., Fenselau C., Jackman J., Ezzell J. (1998): Viral characterization by direct analysis of capsid proteins. *Analytical Chemistry* **70**, 3863–3867.
- TMHMM home page: <http://www.cbs.dtu.dk/services/-TMHMM> (10. 4. 2016).
- University of Bristol home page: <http://www.chm.bris.ac.uk> (12. 1. 2016).
- Uniprot home page: <http://www.uniprot.org> (1. 4. 2016).

- Vaidyanathan G. (2012): Redefining clinical trials: The age of personalized medicine. *Cell* **148**, 1079–1080.
- van Baarlen P., Staats M., Van Kan J. a. L. (2004): Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Molecular Plant Pathology* **5**, 559–574.
- van Baarlen P., Woltering E. J., Staats M., Van Kan J. a. L. (2007): Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. *Molecular Plant Pathology* **8**, 41–54.
- van Kan J. A. L., Stassen J. H. M., Mosbach A., van der Lee T. A. J., Faino L., Farmer A. D., Papanastasiou D., Zhou S., Seidl M. F., Cottam E., Edel D., Hahn M., Schwartz D. C., Dietrich R. A., Widdison S., Scalliet G. (2016): A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*. DOI: 10.1111/mpp.12384.
- Vödtsch M., Albrecht D., Lessing F., Schmidt A. D., Winkler R., Guthke R., Brakhage A. A., Kniemeyer O. (2009): Two-dimensional proteome reference maps for the human pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Proteomics* **9**, 1407–1415.
- Walther T. C., Mann M. (2010): Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *The Journal of Cell Biology* **190**, 491–500.
- Wang S. Y., Chen P. F., Chang S.-T. (2005): Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology* **96**, 813–818.
- Wang Z. P., 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 spectroscopy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **12**, 456–464.
- Waters home page: <http://www.waters.com> (15. 12. 2015).
- Watson B. S., Asirvatham V. S., Wang L., Sumner L. W. (2003): Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiology* **131**, 1104–1123.
- 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 Communications in Mass Spectrometry* **14**, 307–310.
- Whitehouse C. M., Dreyer R. N., Yamashita M., Fenn J. B. (1985): Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical Chemistry* **57**, 675–679.
- Wilkins M. R., Pasquali C., Appel R. D., Ou K., Golaz O., Sanchez J. C., Yan J. X., Gooley A. A., Hughes G., Humphery-Smith I., Williams K. L., Hochstrasser D. F. (1996): From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Nature Biotechnology* **14**, 61–65.
- Winkler M. A., Uher J., Cepa S. (1999): Direct analysis and identification of *Helicobacter* and *Campylobacter* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **71**, 3416–3419.
- Wolf psort home page: <http://www.genscript.com/wolf-psort.html> (10. 4. 2016).
- Wu X., Gong F., Wang W. (2014): Protein extraction from plant tissues for 2DE and its application in proteomic analysis. *Proteomics* **14**, 645–658.
- Yates J. R. (2004): Mass spectral analysis in proteomics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **33**, 297–316.
- Yohalem D. S., Nielsen K., Nicolaisen M. (2003): Taxonomic and nomenclatural clarification of the onion neck rotting *Botrytis* species. *Mycotaxon* **85**, 175–182.
- Yoon M. Y., Cha B., Kim J. C. (2013): Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. *The Plant Pathology Journal* **29**, 1–9.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

<b>1D</b>	jednorozměrná
<b>2D</b>	dvourozměrná
<b>ACN</b>	acetonitril
<b>CA</b>	kyselina kávová
<b>CHCA</b>	kyselina 4-hydroxy- $\alpha$ -kyanoskořicová
<b>DHB</b>	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
<b>DTT</b>	dithiotreitol
<b>ESI</b>	ionizace elektrosprejem
<b>FA</b>	kyselina ferulová
<b>HCT</b>	iontová past s vysokou kapacitou
<b>HILIC</b>	hydrofóbní interakční chromatografie
<b>IAM</b>	jodoacetamid
<b>IEC</b>	iontově výměnná chromatografie
<b>IEF</b>	isoelektrická fokusace
<b>IT</b>	iontová past
<b>LC</b>	kapalinová chromatografie
<b>MALDI</b>	ionizace laserem za přítomnosti matrice
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie
<b>MS/MS</b>	tandemová hmotnostní spektrometrie
<b>MW</b>	molekulová hmotnost
<b>NaEDTA</b>	ethylendiamintetraacetát sodný
<b>PAGE</b>	gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
<b>pI</b>	isoelektrický bod
<b>Q</b>	kvadrupól
<b>SA</b>	kyselina sinapová
<b>SCX</b>	kationtově výměnná chromatografie
<b>SDS</b>	dodecylsírán sodný
<b>TCA</b>	kyselina trichloroctová
<b>TFA</b>	kyselina trifluoroctová
<b>TOF</b>	analyzátor doby letu

## 9 PŘÍLOHY

Tab. P1: Přehled vybraných identifikovaných proteinů.

<b>identifikační zkratka proteinu</b>	<b>název proteinu</b>	<b>MW [Da]</b>	<b>predikce lokalizace</b>	<b>max. prot. skóre</b>
G2YBF1_BOTF4	1,3-beta-glucanosyltransferase	57350.0	sekretované	89.0
A7EL21_SCLS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase	130334.17	membránové	74.0
W9CSM3_9HELO	3-isopropylmalate dehydratase	179901.15	membránové	98.0
G2YIB7_BOTF4	40S ribosomal protein S1	29342.08	sekretované	155.0
G2XN36_BOTF4	60S ribosomal protein L36	11763.69	sekretované	168.0
G2Y0Z5_BOTF4	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	55017.62	intracelulární	178.0
W9C1S5_9HELO	A, B, C transporter	88313.17	membránové	66.0
W9C0L4_9HELO	Acetyl-CoA carboxylase	255220.63	intracelulární	186.0
G2XVJ3_BOTF4	Acetyl-coenzyme A synthetase	74262.8	intracelulární	82.0
A7F8Z3_SCLS1	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	48599.85	sekretované	202.0
M7TP93_BOTF1	Aconitate hydratase, mitochondrial	85435.01	intracelulární	303.0
ACT_BOTFU	Actin	41840.99	intracelulární	166.0
W9CJI7_9HELO	Acyl-CoA ligase	208754.86	intracelulární	88.0
Q9P880_BOTFU	Adenylate cyclase	236748.51	intracelulární	103.0
W9CH82_9HELO	ADP, ATP carrier protein	33925.52	membránové	411.0
G2Y3B5_BOTF4	Alpha-1, 4 glucan phosphorylase	99936.17	intracelulární	99.0
A7EVI0_SCLS1	Alpha-1, 2-Mannosidase	68054.04	membránové	64.0
G2XWI9_BOTF4	Alpha-galactosidase	54662.12	sekretované	89.0
G2YT07_BOTF4	Alpha-mannosidase	123026.36	intracelulární	619.0
W9CLB2_9HELO	Aspartyl proteinase	43469.54	sekretované	85.0
G2Y4C1_BOTF4	ATP synthase subunit alpha	59927.46	intracelulární	377.0
G2Y3Z0_BOTF4	ATP synthase subunit beta	54569.36	sekretované	478.0
G2YLL6_BOTF4	Beta-glucosidase	91280.94	sekretované	295.0

Tab. P1: Přehled vybraných identifikovaných proteinů (*pokračování*).

<b>identifikační zkratka proteinu</b>	<b>název proteinu</b>	<b>MW [Da]</b>	<b>predikce lokalizace</b>	<b>max. prot. skóre</b>
G2YMJ5_BOTF4	Beta-hexosaminidase	69880.87	sekretované	86.0
W9CNZ0_9HELO	Calcium permease	171158.74	membránové	79.0
G2Y804_BOTF4	Carboxylic ester hydrolase	66114.12	sekretované	87.0
G2YGS4_BOTF4	Carboxypeptidase	61439.94	sekretované	110.0
G2XU47_BOTF4	Catalase	57504.4	intracelulární	351.0
A7E4H9_SCLS1	Cation-transporting ATPase	183423.53	membránové	94.0
G2Y7P9_BOTF4	Citrate synthase	52066.87	intracelulární	488.0
G2YS16_BOTF4	CND16, similar to ATP citrate lyase subunit	52841.69	intracelulární	176.0
G2YS14_BOTF4	CND6, similar to ATP-citrate synthase subunit	71798.87	intracelulární	119.0
G2XNG8_BOTF4	Cyanate hydratase	18079.27	intracelulární	120.0
C5HG81_BOTFU	Developmental-specific protein Ssp1	35565.32	intracelulární	362.0
G2XRX2_BOTF4	DNA helicase	105647.47	intracelulární	71.0
MSH3_BOTFB	DNA mismatch repair protein msh3	125669.63	intracelulární	101.0
M7TD70_BOTF1	DNA polymerase	255480.44	intracelulární	89.0
G2XSR8_BOTF4	DNA-directed RNA polymerase	193630.15	intracelulární	72.0
G2Y5A0_BOTF4	Elongation factor 1-alpha	50294.23	intracelulární	175.0
W9CPE7_9HELO	Elongation factor 2	93813.81	intracelulární	136.0
W9CEM2_9HELO	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit	79142.78	intracelulární	84.0
G2Y0C8_BOTF4	Eukaryotic translation initiation factor 5A	17983.81	intracelulární	108.0
A7EUN0_SCLS1	Formate dehydrogenase	48163.2	intracelulární	148.0
W9CNE9_9HELO	Glucan synthase	222592.72	membránové	84.0
M7UKQ4_BOTF1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	58918.12	intracelulární	102.0
W9CBC0_9HELO	Glucose-6-phosphate isomerase	60879.86	intracelulární	69.0
W9C8D0_9HELO	Glutamate synthase	238433.45	intracelulární	85.0
G2Y3Y5_BOTF4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	44960.92	intracelulární	317.0
G2Y259_BOTF4	Glycoside hydrolase family 13 protein	276505.26	membránové	125.0

Tab. P1: Přehled vybraných identifikovaných proteinů (*pokračování*).

<b>identifikační zkratka proteinu</b>	<b>název proteinu</b>	<b>MW [Da]</b>	<b>predikce lokalizace</b>	<b>max. prot. skóre</b>
W9CRV5_9HELO	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase	62919.3	intracelulární	60.0
A7E4B2_SCLS1	Heat shock 70 kDa protein	68661.31	intracelulární	382.0
W9CLL4_9HELO	HECT-domain-containing protein	205338.67	intracelulární	119.0
G2YXL1_BOTF4	HHK1, histidine kinase-group X protein	285696.02	intracelulární	108.0
G2YW49_BOTF4	Histone H2B	14932.04	intracelulární	340.0
G2Y2M3_BOTF4	Histone H3	15366.51	sekretované	122.0
G2Y2M2_BOTF4	Histone H4	11349.37	intracelulární	83.0
W9C2Y6_9HELO	Chaperonin GroL	61312.23	intracelulární	243.0
W9C236_9HELO	Chitin synthase	207961.39	membránové	68.0
G2YBP8_BOTF4	Kinesin-like protein	204849.17	intracelulární	85.0
G2Y367_BOTF4	Lysophospholipase	69967.4	sekretované	74.0
G2YMF9_BOTF4	Malate dehydrogenase	35645.94	intracelulární	834.0
A7F894_SCLS1	Malate dehydrogenase	35707.98	sekretované	84.0
M7U2Q3_BOTF1	Midasin	556553.8	intracelulární	101.0
W9CN62_9HELO	Mitochondrial presequence protease	114294.32	intracelulární	65.0
G2YSC4_BOTF4	Mitochondrial Rho GTPase	70733.93	membránové	61.0
W9CDJ8_9HELO	Mitotic control protein dis3	112873.77	intracelulární	61.0
W9CLQ2_9HELO	Molecular chaperone and allergen Mod-E/Hsp90/Hsp1	79679.56	intracelulární	285.0
W9CHJ5_9HELO	Myosin type II heavy chain	275065.85	membránové	104.0
W9C7R6_9HELO	NAD(P) transhydrogenase	114889.85	membránové	77.0
NACB_SCLS1	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta	17586.83	intracelulární	235.0
G2YEA5_BOTF4	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta	18984.59	intracelulární	171.0
W9CC57_9HELO	NFX1-type zinc finger-containing protein 1	312012.38	intracelulární	103.0
W9C657_9HELO	Non-ribosomal peptide synthetase	377290.23	intracelulární	155.0
A7E8Q1_SCLS1	Nucleoside diphosphate kinase	16857.51	intracelulární	210.0
G2YGF1_BOTF4	O-acyltransferase	63491.22	membránové	61.0

Tab. P1: Přehled vybraných identifikovaných proteinů (*pokračování*).

<b>identifikační zkratka proteinu</b>	<b>název proteinu</b>	<b>MW [Da]</b>	<b>predikce lokalizace</b>	<b>max. prot. skóre</b>
W9BY35_9HELO	Pentafunctional AROM polypeptide	171645.22	membránové	83.0
W9CP77_9HELO	Peptidase M16 inactive domain-containing protein	129416.05	intracelulární	61.0
G2YP99_BOTF4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	24267.21	sekretované	482.0
W9CW81_9HELO	Phosphatidylinositol 3	217906.43	intracelulární	105.0
A7EAE9_SCLS1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	68159.79	intracelulární	115.0
G2Y1U2_BOTF4	Phosphoinositide phospholipase C	126327.27	intracelulární	79.0
G2Y5G8_BOTF4	Phospholipid-transporting ATPase	168489.16	membránové	65.0
G2Y9A1_BOTF4	PHY3, histidine kinase-group VIII protein	136111.18	intracelulární	89.0
M7UT26_BOTF1	Plasma membránové ATPase	103148.52	membránové	191.0
Q6RKJ6_BOTFU	Polyketide synthase	274255.4	sekretované	101.0
G2YUL8_BOTF4	Proteasome subunit alpha type	26998.44	intracelulární	71.0
G2YZD4_BOTF4	Protein disulfide-isomerase	57850.0	intracelulární	138.0
W9CSY0_9HELO	Protein kinase C	131232.88	intracelulární	80.0
G2XS80_BOTF4	Protein related to plant expansins	14129.86	sekretované	255.0
M7U5P3_BOTF1	Putative elongation factor 1-beta protein	25422.45	intracelulární	173.0
M7UUV6_BOTF1	Putative ion transporter protein	242883.66	membránové	81.0
M7TMC3_BOTF1	Putative non-ribosomal peptide synthetase protein	148683.83	membránové	77.0
W9CJE7_9HELO	Putative oxidoreductase, FAD-binding	87731.24	sekretované	72.0
M7U9G1_BOTF1	Putative phosphoribosyl transferase domain protein	128653.32	intracelulární	74.0
S4WT04_9VIRU	Putative polyprotein	396609.45	intracelulární	80.0
M7V1Q9_BOTF1	Putative transcription factor protein	67411.01	intracelulární	272.0
M7U556_BOTF1	Putative translation regulator protein	124960.53	intracelulární	68.0
M7TMG9_BOTF1	Putative tripeptidyl peptidase protein	68928.26	sekretované	99.0
M7U066_BOTF1	Putative ubiquitin-protein ligase protein	469737.08	intracelulární	67.0
G2XQQ6_BOTF4	Pyruvate carboxylase	131242.1	intracelulární	126.0
W9CLG0_9HELO	Pyruvate dehydrogenase kinase	55718.07	intracelulární	70.0



Tab. P1: Přehled vybraných identifikovaných proteinů (*pokračování*).

<b>identifikační zkratka proteinu</b>	<b>název proteinu</b>	<b>MW [Da]</b>	<b>predikce lokalizace</b>	<b>max. prot. skóre</b>
G2YHH4_BOTF4	Serine hydroxymethyltransferase	57293.44	sekretované	144.0
G2XZS5_BOTF4	Serine/threonine-protein kinase	133409.47	intracelulární	64.0
G2YUC1_BOTF4	Similar to acetyl-CoA carboxylase	254332.69	intracelulární	222.0
G2Y3G4_BOTF4	Similar to actin binding protein	86816.6	intracelulární	270.0
G2XQ79_BOTF4	Similar to amino acid transporter	59128.5	membránové	64.0
G2YD53_BOTF4	Similar to fatty acid oxygenase	129545.39	intracelulární	402.0
G2YYH8_BOTF4	Similar to mitochondrial acetolactate synthase small subunit	35585.59	sekretované	88.0
G2YGA3_BOTF4	Similar to vacuolar protease A (Secreted protein)	43124.4	sekretované	90.0
G2XNN3_BOTF4	Similar to zinc transporter	43084.42	membránové	65.0
NST1_SCLS1	Stress response protein nst1	130415.46	intracelulární	70.0
G2YGL0_BOTF4	Structural maintenance of chromosomes protein	139612.28	intracelulární	74.0
G2YHA8_BOTF4	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	16032.76	intracelulární	325.0
M7TZV6_BOTF1	Thioredoxin	11550.9	intracelulární	82.0
G2YHB1_BOTF4	Transaldolase	35551.47	intracelulární	160.0
G2XNN8_BOTF4	Triosephosphate isomerase	27223.12	intracelulární	334.0
G2XZI9_BOTF4	TubA, tubulin beta chain	50222.06	intracelulární	118.0
G2XXN4_BOTF4	U3 small nucleolar RNA-associated protein 25	82112.61	intracelulární	68.0
W9CDM3_9HELO	Ubiquitin-activating enzyme E1 1	115779.24	intracelulární	61.0
G2XSX2_BOTF4	Urease	89749.25	intracelulární	371.0
W9CVC3_9HELO	Urease accessory protein ureG	28790.49	intracelulární	183.0
A7EEP7_SCLS1	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	66996.75	intracelulární	154.0

Identifikační zkratka proteinu je kód v databázi UniProt, (MW) molekulová hmotnost, skóre je míra pravděpodobnosti přiřazení peptidů k dané sekvenci vypočtené programem Mascot. Jestliže byl protein identifikován u více vzorků, uvedeno je nejvyšší dosažené skóre.