

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Optimalizace metody MALDI pro analýzu buněčných stěn sinic

Bakalářská práce

Barbora Cahová

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Petr Hašler, Ph.D.

Olomouc 2016

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. RNDr. Petra Hašlera, Ph.D. a jen s použitím uvedené literatury.

V Olomouci dne 29.4.2016

.....

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce Doc. RNDr. Petru Hašlerovi, Ph.D., za vedení a cenné podněty k celé práci. Také bych ráda poděkovala prof. Mgr. Marku Šebelovi, Dr., za umožnění práce v laboratoři a pomoc při měření dat. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu při psaní této práce.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Barbora Cahová

Název práce: Optimalizace metody MALDI pro analýzu buněčných stěn sinic

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra botaniky

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Petr Hašler, Ph.D.

Rok obhajoby: 2016

Abstrakt: Sinice patří mezi nejstarší fotosyntetizující organismy na Zemi. Řadíme je mezi gramnegativní bakterie, které mají pevnou a vícevrstevnou buněčnou stěnu. Základní složkou buněčné stěny gramnegativních bakterií je biopolymer murein. V této bakalářské práci byla k analýze buněčných stěn sinic využita hmotnostní spektrometrická metoda MALDI-TOF MS (matrix – assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry). Metoda MALDI-TOF MS se využívá především pro identifikaci mikroorganismů. V dnešní době se tato metoda velmi rychle rozvíjí a začíná nahrazovat tradičnější metody používané v mikrobiologických laboratořích. Pomocí této metody je identifikace mikroorganismů rychlá, spolehlivá a ekonomicky efektivní. Experimentální část práce zahrnovala optimalizaci metody MALDI-TOF MS, neboli vytvoření vhodných podmínek pro přípravu vzorku a následnou analýzu, za účelem zisku co nejvíce kvalitního spektra. K narušení buněčných stěn sinic, byl použit enzym celulasa, který měl na vzhled spekter pouze malý vliv. Dále byl testován vliv koncentrace rozpouštědla matrice na vzhled proteinových profilů sinic. Jako rozpouštědlo byla použita kyselina trifluorooctová (TFA) v koncentracích 0,1%, 2% a 5%. Jako nejvíce výhodné se ukázalo použití 2% TFA.

Klíčová slova: sinice, MALDI-TOF MS, buněčná stěna, identifikace mikroorganismů

Počet stran: 50

Počet příloh: 6

Jazyk: Čeština

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

First name and surname of the author: Barbora Cahová

Name of the thesis: Optimisation of MALDI technique for cyanobacterial cell wall analysis

Type of thesis: Bachelor

Workplace: Botany department

Thesis supervisor: Doc. RNDr. Petr Hašler, Ph.D.

Year of defence: 2016

Abstract: Cyanobacteria are among the oldest photosynthetic organisms on the Earth. They belong to Gram-negative bacteria which have fixed and multi-layered cell wall. The basic component of the cell wall of Gram negative bacteria is a biopolymer murein. In my thesis, I analyze the cell walls of algae by mass spectrometric method MALDI-TOF MS (matrix - assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometry). The MALDI-TOF MS method is particularly used for the identification of microorganisms. Nowadays, this method is developing rapidly and is starting to replace traditional methods used in microbiological laboratories. With this method, the identification of microorganisms is fast, reliable and cost-effective. The experimental part of the work included the optimization of MALDI-TOF MS method to create appropriate conditions for the sample preparation and subsequent analysis, in order to get the most quality spectrum. The disruption of the cell walls of cyanobacteria was done by the enzyme cellulase, which had minimum impact on the appearance of spectra. The impact of different concentrations of solvent on the appearance of protein profiles of cyanobacteria was also examined. Was used trifluoroacetic acid (TFA) as solvent in concentrations of 0.1%, 2% and 5%. The best results were achieved with 2% TFA.

Keywords: cyanobacteria, MALDI-TOF MS, cell wall, identification of microorganisms

Number of pages: 50

Number of appendices: 6

Language: Czech

OBSAH

1. Cíle práce	8
2. Úvod.....	9
3. Teoretická část	10
3.1 Hmotnostní spektrometrie.....	10
3.2 MALDI-TOF MS.....	11
3.3 Princip MALDI-TOF MS.....	11
3.3.1 Průletový analyzátor (TOF)	12
3.3.2 Matrice	12
3.3.3 MALDI destička	12
3.3.4 Hmotnostní spektrum.....	13
3.4 Využití metody MALDI - TOF MS.....	13
3.4.1 MALDI - TOF MS v bakteriologii	14
3.4.2 MALDI - TOF MS ve virologii	15
3.4.3 MALDI - TOF MS v mykologii	15
3.5 Obecná charakteristika bakterií.....	16
3.6 Obecná charakteristika sinic	17
3.7 Bakteriální buněčná stěna	19
3.7.1 Buněčná stěna grampozitivních bakterií.....	19
3.7.2 Buněčná stěna gramnegativních bakterií	20
4. Experimentální část.....	21
4.1 Biologický materiál.....	21
4.2 Chemikálie	22
4.3 Přístrojová technika	22
4.4 Příprava vzorku pro MALDI-TOF MS.....	23
4.5 Hmotnostní analýza MALDI-TOF MS.....	24
4.6 Použití TFA a enzymů	24
5. Výsledky	25
5.1 Optimalizace metody MALDI-TOF MS	25
5.1.1 Vliv koncentrace TFA na vzhled proteinových profilů	25
5.1.2 Vliv celulasy na buněčnou stěnu sinic	32

5.1.3 Hmotnostní spektra získaná bez přidání TFA a celulasy	37
6. Diskuze	39
7. Závěr	41
Seznam použité literatury	42
Seznam příloh	47

1. Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše na téma principu a využití metody MALDI v biologii
2. Analýza izolovaných kmenů sinic
3. Srovnání získaných spekter s dosud známými údaji

2. Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá analýzou buněčných stěn sinic pomocí hmotnostní spektrometrické metody MALDI-TOF MS (matrix – assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry). Metoda MALDI-TOF MS je citlivá a rychlá metoda, která je v dnešní době běžně využívána pro identifikaci mikroorganismů (Liu et al. 2007). Tato metoda se také využívá např. v epidemiologických studiích, k detekci antibiotické rezistence, v potravinářském průmyslu, v zemědělství, ve farmaceutickém průmyslu či v bioinženýrství (Singhal et al. 2015, Chalupová et al. 2012).

Sinice jsou gramnegativní bakterie, což znamená, že jejich buněčná stěna je pevná a vícevrstevná. Základní složkou buněčné stěny je biopolymer murein. Složení buněčné stěny gramnegativních bakterií, znemožňuje její obarvení dle Gramma (1884), pomocí krystalové violeťi (Kalina & Váňa 2005).

Teoretická část práce se věnuje popisu a principu metody MALDI-TOF MS a jejímu využití v biologii. Dále se zabývá podrobným popisem bakterií a strukturou bakteriálních buněčných stěn. Na teoretickou část navazuje experimentální část, která zahrnuje analýzu izolovaných kmenů sinic a obsahuje získaná spektra sinic metodou MALDI-TOF MS.

3. Teoretická část

3.1 Hmotnostní spektrometrie

Už desítky let se hmotnostní spektrometrie používá pro identifikaci látek. Dříve se užívala především pro studium nízkomolekulárních látek, kde se měřily jejich hmotnosti nebo hmotnosti jejich fragmentů. Technika, která převádí velké molekuly do plynné fáze bez fragmentace, byla nalezena v polovině 80. let (Karas et al. 1987).

V minulosti existovalo několik technik, sloužících k identifikaci mikroorganismů. Jednou z těchto metod je například metoda API (Analytical profile index). Dnes se s touto metodou můžeme v praxi ještě setkat, ale její výsledky jsou většinou nepřesné a stanovení je velmi pomalé. Nevýhody dříve používaných technik byly překonány s objevem molekulárních metod ve 20. století. Tyto metody už byly velmi přesné. Jednou z těchto metod je například analýza 16S rRNA genů. I tato metoda má své nevýhody. Stanovení je pomalé a ekonomicky stále ještě nákladné. Poté se začaly používat nové postupy jako je například hmotnostní spektrometrie. Konkrétně pomocí metody MALDI-TOF se v roce 1994 podařilo zjistit, že můžeme identifikovat celé spektrum proteinů z předem dezintegrovaných buněk. O několik let později se tato metoda využila k identifikaci mikroorganismů (Štursa et al. 2010).

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda, kde ionizací vznikají nabitě molekuly. Měří se hmotnost těchto nabitých molekul vzhledem k jejich náboji (m/z) (Singhal et al., 2015). Tato technologie je nezbytná pro rychlou detekci a charakteristiku mikroorganismů (Shah & Garbia 2010). Hmotnostní spektrometrie je také velmi užitečná pro analýzu komplexních biologických systémů, a bylo několikrát dokázáno, že nabízí vynikající potenciál pro chemotaxonomii organismů (Vaidyanathan et al. 2001).

Historie této metody je velmi rozmanitá a v průběhu let bylo uskutečněno mnoho technologických inovací. Za zakladatele hmotnostní spektrometrie se považuje Sir Joseph J. Thomson (1856 – 1940), který díky své práci zaměřené na analýzu nabitých částic v parabolickém hmotnostním spektrografu předpověděl, že je možné využít tuto novou techniku v chemické analýze (Friedecký & Lemr 2012). V 80. letech 20. století byly objeveny měkké ionizační techniky, díky kterým hmotnostní spektrometrie získala velký význam. Tyto techniky umožňují přesnou a rychlou identifikaci biomolekul (Fenn et al. 1989). V roce 2002 získali Nobelovu cenu

za objev měkkých ionizačních metod John Fenn (elektrosprej) a Koishi Tanaka (technika MALDI) (Mirsaleh-Kohan et al. 2008).

Hmotnostní spektrometr je složen ze tří částí. Ionizaci vzorku umožňuje iontový zdroj, další částí je hmotnostní analyzátor, který základě poměru m/z rozdělí ionty a třetí částí je detektor, který určuje jednotlivé ionty po rozdělení těchto iontů hmotnostním analyzátozem (Liebler 2002).

3.2 MALDI-TOF MS

Díky objevu šetrnějších měkkých ionizačních metod je možné analyzovat i teplotně labilní a netěkavé molekuly (např. peptidy, proteiny). Mezi tyto měkké techniky ionizace patří metody MALDI (matricí asistovaná laserová desorpce) a ESI (elektrosprejová ionizace). Metoda MALDI je v dnešní době velmi užitečnou a používanou metodou hlavně díky své jednoduchosti a citlivosti (Shah & Garbia 2010). Metoda MALDI je šetrná ionizační technika, při které dochází k desorpci a ionizaci za účasti matrice. V roce 1988 byla metoda MALDI popsána Hillenkampem a Karasem (Karas & Hillenkamp 1988).

Metoda MALDI-TOF MS (matrix – assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) využívá k detekci mikroorganismů hmotnostní průletový analyzátor TOF a v dnešní době začíná nahrazovat běžně používané klinické diagnostické postupy, především v mikrobiologických laboratořích (van Belkum et al. 2015). Výhodou techniky MALDI-TOF MS je její rychlost, spolehlivost a ekonomická efektivita. Více tradiční metody používané k určení identity mikroorganismů nejsou tak rychlé a určení může trvat několik hodin nebo i dnů, zatímco metodou MALDI-TOF MS můžeme určit identitu mikroorganismu z kultury během několika minut (Randell 2014).

Identifikace mikroorganismů díky této metodě je nepostradatelná a široce využívána například ve zdravotnictví, zemědělství, potravinářském průmyslu, forenzních vědách či k detekci bioteroristických hrozeb (Liu et al. 2007, Chalupová et al. 2012).

3.3 Princip MALDI – TOF MS

Biologický vzorek se na speciální destičce smísí s organickou sloučeninou tzv. matricí, kde je usušen (vykrytalizován) a poté je destička vložena do hmotnostního spektrometru, kde se

vytvoří vakuum a vzorek je ozářen laserem. Molekuly v tomto vzorku se ionizují a dochází k přeměně molekul analytu z pevné do plynné fáze (Shah & Garbia 2010). K detekci těchto vzniklých plynných iontů se používají různé typy hmotnostních analyzátorů. Často používané jsou např. Kvadrupólový analyzátor, průletový analyzátor (TOF) nebo iontové pasti. V současnosti se pro mikrobiologickou analýzu používají hlavně průletové analyzátory (Singhal et al. 2015).

3.3.1 Průletový analyzátor (TOF)

Jedním z nejjednodušších hmotnostních analyzátorů, které jsou v dnešní době k dispozici, je průletový analyzátor (Graham et al. 2007). V tomto analyzátoru jsou ionty separovány a detekovány podle jejich molekulové hmotnosti a náboje. Ionty jsou při ionizaci urychleny elektrickým potenciálem a získají přibližně stejnou energii (Shah & Garbia 2010). Ze získaných informací z tohoto analyzátoru se poté pro analyt ve vzorku vytvoří charakteristické hmotnostní spektrum. (Graham et al. 2007).

3.3.2 Matrice

Důležitým faktorem analýzy je zvolení správné matrice. Matrice je látka, díky které je ionizační energie laseru přenášena na molekuly vzorku a tímto zabrání jejich štěpení (Havliš 1999). Pro UV lasery se používají aromatické karboxylové kyseliny nebo například deriváty kyseliny benzoové rozpuštěné ve vodě a ve vhodném rozpouštědle (Krader & Emerson 2004). Vhodné kyseliny pro použití jako matrice jsou 3,5-dimetoxi-4-hydroxyskořicová (sinapová, SA), 4-hydroxy-3-metoxyskořicová (ferulová, FA), α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA) a 2,5-dihydroxybenzoová (gentisová, DHB) (Evason 2001).

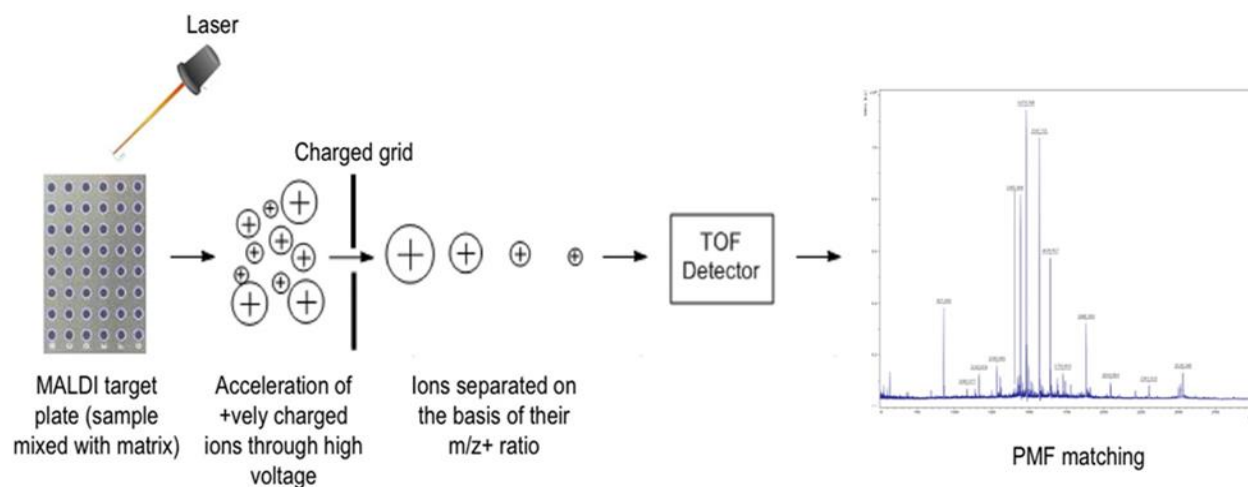
3.3.3 MALDI destička

Na destičku, která je vyráběna s vysokou citlivostí se nanáší analyzovaný vzorek, matrice a standardy. Častým materiálem, z kterého se destičky vyrábí je hliník nebo nerezová ocel. Hliník i ocel jsou k matrici inertní a nezpůsobují kationizaci analytu. Jelikož destičky musí být snadno

čistitelné do hladkého povrchu, musí se před analýzou destička důkladně zbavit nečistot a prachu (Shah & Garbia 2010).

3.3.4 Hmotnostní spektrum

Hmotnostní spektrum nám zobrazuje závislost intenzity detekovaných iontů na jejich poměru hmotnosti k jejich náboji (m/z). Osa x nám zobrazuje hodnotu m/z a osa y ukazuje intenzitu detekovaných iontů. Iontu s nejvyšší naměřenou intenzitou přísluší hodnota 100% a je podle něho normalizovaná intenzita iontů. Kvalita zobrazeného spektra závisí na několika faktorech, jako jsou například krystalizace vzorku a ionizační vlastnosti vzorku. Podle stupně ionizace se projevuje intenzita neboli výška píku. Proteiny celých buněk i izolované proteiny mají velmi charakteristický profil. Stejně kmeny organismů produkují spektra, která si jsou velice podobná. Srovnáním analyzovaných proteinových spekter s referenčními spektry můžeme identifikovat mikroorganismus (Shah & Garbia 2010, Lay 2001).



Obr. 1 Schéma znázorňující postup metody MALDI-TOF MS (Singhal et al. 2015).

3.4 Využití metody MALDI-TOF MS

Během posledních let se metoda MALDI-TOF MS stala nepostradatelnou v mikrobiologických laboratořích a nahradila několik dříve používaných tradičních metod k identifikaci mikroorganismů. V dnešní době se vědci stále snaží zlepšovat MALDI-TOF MS a

pracují na rozšíření užitečnosti této metody. Je snaha například o rozšíření počtu mikroorganismů, které by mohly být identifikovány, dále se zkoumá využití této metody pro detekci antibiotické rezistence nebo využití metody v epidemiologii (Randell 2014). Zjistilo se, že lze tuto metodu použít například i pro sekvenování DNA a screening mutací (Marvin et al. 2003).

3.4.1 MALDI-TOF MS v bakteriologii

Využití MALDI-TOF MS pro identifikaci bakterií je v dnešních výzkumných laboratořích velmi časté a pro spoustu vědeckých pracovníků i nepostradatelné. Tato metoda může identifikovat bakterie například z krve, ze vzorku moči či stolice nebo z mozkomíšní tekutiny. Jedna z nejzávažnějších nemocí způsobená bakteriální infekcí je bakteriální meningitida. Včasné objevení této nemoci u pacientů je velmi důležité. Pomocí techniky MALDI-TOF se zjistilo, že může z mozkomíšního moku přímo detekovat bakterie způsobující tuto nebezpečnou nemoc (Segawa et al. 2014). V několika studiích zaměřených na identifikaci bakterií se porovnávala metoda MALDI-TOF s konvenčními metodami například pro identifikaci patogenů v močových cestách a technika MALDI - TOF byla vždy posouzena jako nejvýhodnější, už jen proto, že na rozdíl od více tradičních metod MALDI-TOF je mnohem rychlejší, snadnější na provedení a náklady nejsou tak vysoké (Singhal et al. 2015).

Užitečnost této metody se ukázala například i při detekci bakterií způsobující kontaminaci pitné vody. Typickým příkladem bakterií, které tohle mohou způsobit je rod *Aeromonas*. Tento rod zahrnuje 17 druhů, z nichž 7 druhů může silně kontaminovat pitnou vodu (Donohue et al. 2007). Dále MALDI-TOF našlo uplatnění v potravinářství například při klasifikaci bakterií mléčného kvašení ve fermentovaných potravinách nebo při detekci bakterií podílejících se na zkažení mléka a vepřového masa (Nguyen et al. 2013, Nicolaou et al. 2012).

Metoda MALDI-TOF má své zastoupení i v environmentální bakteriologii při rozlišení bakteriálních druhů čeledi *Rhizobiaceae* (Ferreira et al. 2011).

Odolnost gramnegativních organismů vůči antibiotikům je dnes čím dál tím větším problémem. Týká se to zejména čeledi *Enterobacteriaceae* a rodů *Pseudomonas* sp. a *Acinetobacter* sp. Tyto bakterie mohou velmi zkomplikovat vývoj v oblasti medicíny. MALDI-TOF má obrovský potenciál a může být využita ke studiu odolnosti bakterií vůči antibiotikům. Díky této metodě můžeme lépe pochopit antibiotickou rezistenci a chování mikrobů v organismu

během infekčního onemocnění a v neposlední řadě nám pomůže vylepšit účinnost antibiotik. (Marvin et al. 2003, Hrabák et al. 2011).

3.4.2 MALDI-TOF MS ve virologii

Využití MALDI-TOF ve virologii není tak běžné jako v bakteriologii či mykologii. Pravděpodobně je to kvůli nízkému obsahu proteinů ve virech a jejich vysoké molekulové hmotnosti, která přesahuje 20 000 Da. I přesto, ale existují studie kde se metoda MALDI-TOF v identifikaci virů úspěšně uplatnila. Například pro detekci různých infekčních virů jako jsou chřipkové viry, herpetické viry nebo hepatitické viry (Cobo 2013, Singhal et al. 2015). Ve většině studiích týkajících se virologie je nejdříve genetický materiál amplifikován pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce) a poté analyzován metodou MALDI (Sjöholm et al. 2008).

Metoda MALDI-TOF se uplatnila i v poskytnutí epidemiologických údajů o virové infekci, což je velmi důležité pro pochopení virových onemocnění a zastavení jejich propuknutí. Diagnostické virologické metody jsou složité a často musí nemocnice posílat vzorky do jiných laboratoří, což je časově nevýhodné. Proto je výhodnější použití metody MALDI-TOF, která může poskytnout přesné a rychlé epidemiologické výsledky (Cobo 2013).

O použití MALDI-TOF pro detekci lékové rezistence proti některým antivirotikům toho zatím víme málo. Úspěšné bylo použití metody pro detekci rezistence gancicloviru (Cobo 2013).

3.4.3 MALDI-TOF MS v mykologii

Identifikace hub pomocí MALDI-TOF MS je v dnešní době také hojně využívána, i přesto že se rozvíjela pomaleji než identifikace bakterií. Uplatnění našla například v klinických diagnostických laboratořích nebo i v zemědělství, kde je nezbytná pro identifikaci houbových fytopatogenních mikroorganismů (Bader 2013, Santos et al. 2010, Chalupová et al. 2012).

Amiri-Elias and Fenselau (2001) poprvé pomocí techniky MALDI-TOF MS identifikovali a charakterizovali ve své studii jednobuněčnou houbu *Saccharomyces cerevisiae* (Kvasinka pивní). Někteří vědci se pokoušeli použít MALDI-TOF MS i pro detekci lidských houbových patogenů, jako jsou například *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. nebo *Lichtheimia* sp. (Dong et al. 2009, Kemptner et al. 2009, Chen & Chen 2005, Schrodل et al. 2012). Výzkumy v identifikaci a

charakterizaci odolnosti hub vůči antimykotikům nejsou tak pokročilé jako studie týkající se odolnosti bakterií. U některých druhů hub (*Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*), byla zjištěna odolnost vůči azolovým antimykotikům a echinokandinům (Bader 2013).

3.5 Obecná charakteristika bakterií

Bakterie jsou všudypřítomné jednobuněčné organismy, které vznikly už před zhruba 3 miliardami let. Velikost bakterií je různorodá, ale nejčastěji se pohybuje v rozmezí 0,1 – 40 μm . Jednou z největších bakterií světa je *Epulopiscium fishelsoni*, která může dosahovat velikosti až 0,7 mm. Prokaryotické organismy jsou jednodušší než eukaryotické a netvoří funkčně a tvarově diferencované tkáně. Bakterie mohou být jak heterotrofní tak i autotrofní. Heterotrofní bakterie mají jako zdroj uhlíku organické látky a autotrofní bakterie si dovedou organické látky syntetizovat z oxidu uhličitého (Jelínek 1995, Babula 2009). I přesto, že jsou bakterie ve srovnání s eukaryotickými organismy mnohem menší, jejich buněčné morfologie jsou velmi rozmanité. Bakterie mohou být kulatého tvaru, tyčinkovitého, rozvětveného, plochého až po různé typy šroubovic. Morfologie každého bakteriálního druhu je přizpůsobená prostředí, ve kterém bakterie žijí (Cabeen & Jacobs-Wagner 2007).

Prvkovým a molekulárním složením se bakteriální buňka shoduje s eukaryotní buňkou. Základní makromolekulární látky, z kterých se bakteriální buňka skládá, jsou proteiny, polysacharidy, lipidy, fosfolipidy a nukleové kyseliny. Struktura buňky bakterií je oproti eukaryotickým organismům zjednodušená. Základními strukturami jsou cytoplazma, nukleoid, ribozomy, cytoplazmatická membrána a buněčná stěna. Jádro a cytoskelet bakteriím chybí (Jelínek 1995, Babula 2009).

Cytoplazma vyplňuje celý vnitřní prostor buňky bakterií. Je to koncentrovaný a silně viskózní roztok různě velkých molekul. Cytoplazma je velmi důležitá struktura bakterií, jelikož se v ní odehrává většina metabolických reakcí (Jelínek 1995, Němec & Matoulková 2015).

Nukleoid představuje bakteriální jádro, které není od cytoplazmy odděleno membránou. Je to do kruhu stočená dvoušroubovice molekuly DNA a tvoří zhruba 10% objemu buňky (Rosypal

et al. 1981). DNA je v buňce poskládána do asi 50 smyček, které jsou svázány molekulami RNA do struktury vyššího řádu. Tento komplex může obsahovat i bílkoviny (Němec & Matoulková 2015).

V buněčných tělíscích ribosomech se uskutečňuje syntéza proteinů. V bakteriální buňce jejich počet kolísá, v závislosti na fyziologickém stavu buňky. Většinou se jejich počet pohybuje mezi 15 000 – 30 000. Ribozom je komplex, který má sedimentační konstantu 70S. Skládá z velké (50S) a malé podjednotky (30S). Tyto podjednotky jsou tvořeny ribozomální RNA (rRNA) a bílkoviny (Rosypal et al. 1981).

Cytoplazmatická membrána odděluje cytoplazmu od vnějšího prostředí. Tvoří ji z 60% proteiny a z 40% fosfolipidy. Chemickou strukturou se velmi podobá membránám eukaryotických organismů. Mezi její základní vlastnosti patří selektivní propustnost, biosyntéza některých látek, uvolňování energie, transport látek a přenos signálů (Babula 2009). Vchlíčováním membrány dovnitř vrstvy se můžou vytvářet zvláštní měchýřkovité struktury tzv. tylakoidy, které se nacházejí v cytoplazmatických membránách fototrofních bakterií. Jejich funkce je analogická k chloroplastům rostlinných buněk. Podobně se mohou vytvářet i tzv. mesozómy, nacházející se v cytoplazmatické membráně grampozitivních bakterií. Mesozómy se pravděpodobně účastní aerobního dýchání a také ovlivňují průběh dělení buňky a tvorbu dělicí přepážky (Rosypal et al. 1981).

Bakteriální buněčná stěna se nachází nad cytoplazmatickou membránou. Jejím základním úkolem je buňku chránit před vlivy vnějšího prostředí a určovat její tvar (Jelínek 1995, Němec & Matoulková 2015). Podrobnějšímu popisu buněčné stěny bakterií se věnuje kapitola 3.7.

3.6 Obecná charakteristika sinic

Sinice představují výjimečnou skupinu gramnegativních bakterií. Pravděpodobně patří k nejstarším fotosyntetizujícím organismům a jejich vývoj je spojen s vytvářením kyslíkaté atmosféry na Zemi. Tyto prokaryotické organismy mají buď jednobuněčnou, nebo vláknitou stélku a žijí jednotlivě, nebo i v koloniích (Němec & Matoulková 2015, Kalina & Váňa 2005). Buněčná stavba sinic je velmi jednoduchá. Sinice nemají mitochondrie ani plastidy. Dále chybí buněčné jádro, golgiho aparát a vakuoly. Sinicím také chybí bičíky a cytoskelet (Babula 2009). Jelikož jsou sinice gramnegativní bakterie, mají pevnou mnohvrstevnou buněčnou stěnu, jejímž

základem je peptidoglykanový biopolymer murein (Rosypal et al. 1981). Proteosyntézu zajišťují ribozomy se sedimentační konstantou 70S. Stejně jako u ostatních bakterií nukleoid není oddělen od cytoplazmy biologickou membránou (Babula 2009, Němec & Matoulková 2015). Sinice obsahují několik asimilačních barviv. Kombinací těchto barviv vznikají nejrozličnější zbarvení sinic, typicky modrozelené, žlutozelené, hnědočervené až červené zbarvení. Typickým barvivem pro sinice je chlorofyl-a obsažen v tylakoidech, které se nachází v cytoplazmě. Tylakoidy jsou útvary vzniklé odškrcením od cytoplazmatické membrány. Dalšími významnými barvivy jsou fykobiliproteiny, které se nachází v tzv. fykobilizomech. Fykobilizomy se vyskytují na povrchu tylakoidů. Z fykobilinů sinice obsahují obvykle barviva fykocyan, zbarvený modře a červený fykoeritrin. Hlavní zásobní látkou sinic je polysacharid sinicový škrob. (Jelínek 1995, Němec & Matoulková 2015).

Jednobuněčné sinice se rozmnožují nepohlavně pomocí dělení, vláknité sinice využívají k rozmnožování tzv. hormogonie. Hormogonie jsou různě dlouhá a aktivně se pohybující mnohobuněčná vlákna, dorůstající v nové vlákno, poté co se oddělí od mateřského vlákna (Jelínek 1995). Některé vláknité sinice mohou také vytvářet klidové spory tzv. akinety, které vznikají z jedné nebo více vegetativních buněk a obsahují velké množství zásobních látek, které umožní sinicím přežít i velmi dlouhá období klidu nebo nepříznivých podmínek. (Němec & Matoulková 2015). Dalšími specializovanými buňkami sinic jsou heterocyty, ve kterých probíhá fixace vzdušného dusíku. Heterocyty mají silnou buněčnou stěnu a jejich životnost je celkem krátká (Kalina & Váňa 2005).

Sinice jsou velmi rozšířené organismy a vyskytují se téměř ve všech biotopech. Nalezneme je jak ve vodním prostředí, v půdě tak i na stanovištích s extrémními podmínkami. V letním období mohou sinice způsobovat hygienické problémy na koupalištích nebo přehradách. Sinice po svém přemnožení zbarvují hladinu vody a způsobí tzv. vodní květ. Děje se to především ve vodách bohatých na dusíkaté a fosforečné živiny. Vodní květ nejčastěji tvoří společenstva sinic rodu *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix* a *Aphanizomenon* (Jelínek 1995, Kalina & Váňa 2005).

Sinice také mohou produkovat tzv. cyanotoxiny, produkty sekundárního metabolismu. Jsou to toxické látky a kromě toho mohou fungovat i jako alergen a spouštět určitou alergickou reakci (Babula 2009).

3.7 Bakteriální buněčná stěna

Buněčná stěna, která je jednou z nejdůležitějších struktur bakteriální buňky, se nachází na povrchu bakterií nad cytoplazmatickou membránou. Vyznačuje se pevností, elasticitou a propustností pro ionty a nízkomolekulární sloučeniny. Jejími základními úkoly jsou ochrana vnitřního protoplastu buňky před vlivy vnějšího prostředí, dále dává buňce tvar, je součástí buněčného skeletu a také kompenzuje osmotický přetlak uvnitř buňky. Bakterie mají různě složitou a rozmanitou strukturu buněčné stěny. Základní stavební složkou je lineární polysacharid murein. (Němec & Matoulková 2015, Rosypal et al. 1981).

Murein tvoří dva cukerné zbytky, které se pravidelně střídají. Jsou to N-acetylglukozamin a kyselina N-acetylmuramová. N-acetylglukozamin se váže na kyselinu N-acetylmuramovou pomocí 1,4- glykozidické vazby (Baker et al. 2011). Na kyselinu muramovou jsou přes peptidickou vazbu navázány tetrapeptidy, které jsou tvořeny čtyřmi aminokyselinami. Mezi tyto aminokyseliny patří L-alanin, kyselina D-glutamová, D-alanin a L-diaminokyselina. Peptidoglykan je důležitý jako opěrná kostra buněčné stěny a také podmiňuje její rigiditu (Ghuysen & Hakenbeck 1994).

Bakterie se dělí podle stavby buněčné stěny na základě barvení podle Gramma (1884) na grampozitivní a gramnegativní. Bakterie od sebe rozeznáme na základě obarvení pomocí krystalové violeti. Grampozitivní bakterie zůstanou obarveny i po promývání v etanolu, zatímco gramnegativní bakterie se po omytí etanolem odbarví. Toto je způsobeno odlišnou stavbou buněčné stěny těchto dvou skupin bakterií (Kalina & Váňa 2005).

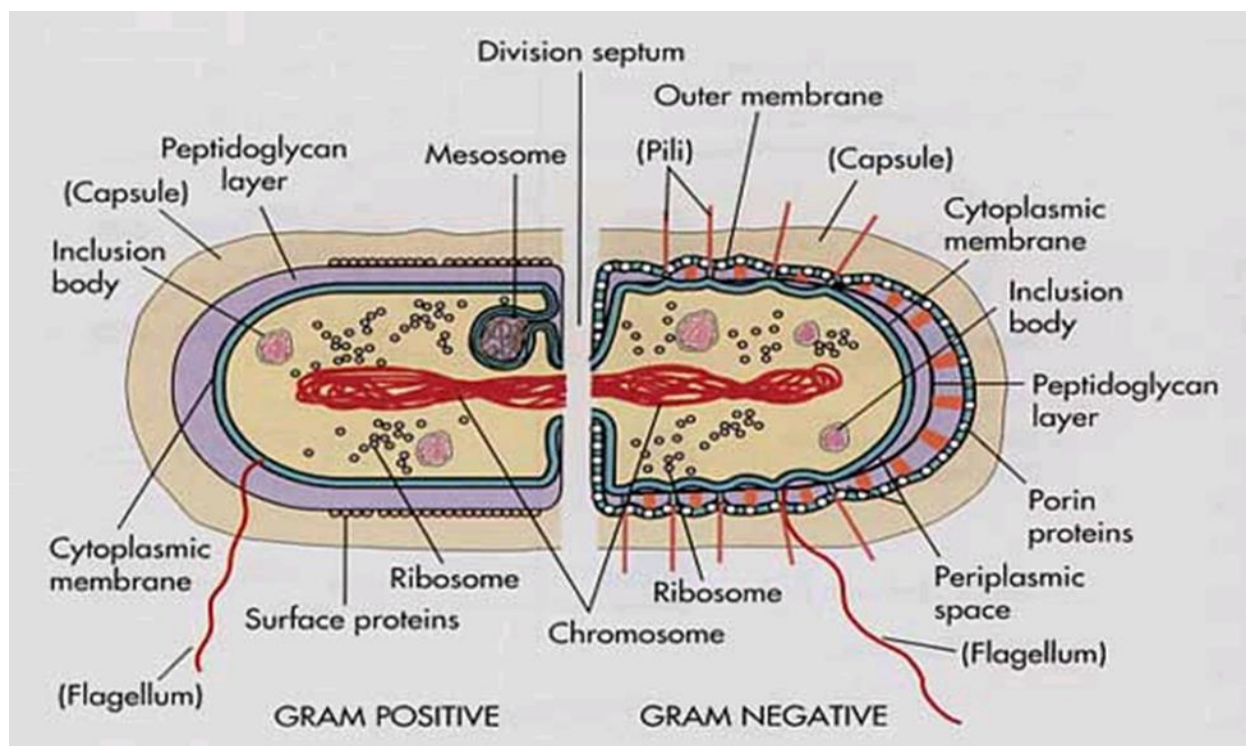
3.7.1 Buněčná stěna grampozitivních bakterií

Grampozitivní bakterie mají na povrchu jednu plazmatickou membránu a poměrně silnou buněčnou stěnu, tlustou asi 20 nm. Buněčná stěna obsahuje jak murein, tak i další nezbytné látky. Typická pro grampozitivní bakterie je přítomnost řetězců teikoových kyselin, které prostupují vrstvami mureinu (Kalina & Váňa 2005, Němec & Matoulková 2015). Kyselina teikoová je lineární polymer, který se skládá z pravidelně se střídajících podjednotek glycerolfosfátu nebo ribitolfosfátu. Dále jsou v buněčné stěně zastoupeny polysacharidy, teikuronové kyseliny a bílkoviny, lipidy přítomny nejsou (Rosypal et al. 1981).

3.7.2 Buněčná stěna gramnegativních bakterií

Gramnegativní bakterie mají všeobecně tenčí buněčnou stěnu (asi 10 nm), která se nachází mezi dvěma plazmatickými membránami. Stavba buněčné stěny těchto bakterií je složitější než u grampozitivních druhů (Baker et al. 2011). Skládá se z tenké vrstvy mureinu, nad kterou se nachází tzv. vnější membrána, která se svojí strukturou velmi podobá biologickým membránám. S vrstvou mureinu se vnější vrstva pojí pomocí molekul lipoproteinu. Vnější membrána je tvořena dvojvrstvou fosfolipidů a bílkovinami a na jejím povrchu se nachází molekuly lipopolysacharidů. Tuto lipopolysacharidovou vrstvu stabilizují ionty Ca^{2+} . Buňka gramnegativních bakterií má antigenní vlastnosti, díky lipopolysacharidům navázaným na povrchu vnější membrány (Ghuysen & Hakenbeck 1994).

Silné antibakteriální účinky má enzym lysozym, který je schopen narušit bakteriální buněčnou stěnu, hydrolyzací glykozidické vazby mureinu. U gramnegativních bakterií je lysozym schopen narušit buněčnou stěnu až po odstranění nebo poškození vnější membrány (Baker et al. 2011).



Obr. 2 Rozdíly ve stavbě buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií (<http://micro.digitalproteus.com/pics/grambacterium.jpg>).

4. Experimentální část

4.1 Biologický materiál

Vzorky sinic použité pro měření byly získány na katedře botaniky Univerzity Palackého v Olomouci od Doc. RNDr. Petra Hašlera, Ph.D.

Tab. 1: Seznam použitých organismů

Název	Říše	Oddělení	Řád	Čeleď
<i>Asterocapsa divina</i> (viz příloha 1)	Bacteria	Cyanobacteria	<i>Chroococcales</i>	<i>Chroococcaceae</i>
<i>Geminocystis</i> sp. (viz příloha 4)			<i>Chroococcales</i>	<i>Chroococcaceae</i>
<i>Gloeocapsa aeruginosa</i>			<i>Chroococcales</i>	<i>Microcystaceae</i>
<i>Gloeocapsa atrata</i>			<i>Chroococcales</i>	<i>Microcystaceae</i>
<i>Gloeocapsa</i> sp. (viz příloha 5)			<i>Chroococcales</i>	<i>Microcystaceae</i>
<i>Chamaesiphon</i> sp. (viz příloha 2)			<i>Chroococcales</i>	<i>Chamaesiphonaceae</i>
<i>Chroococcidiopsis cubana</i> (viz příloha 3)			<i>Chroococcidiops idales</i>	<i>Chroococcidiopsidaceae</i>
<i>Merismopedia</i> sp. (viz příloha 6)			<i>Synechococcales</i>	<i>Merismopediaceae</i>
<i>Synechococcus</i> sp.			<i>Synechococcales</i>	<i>Synechococcaceae</i>

4.2 Chemikálie

- aceton (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- methanol (Biosolve B. v., Valkenswaard, Nizozemsko)
- kyselina trifluoroctová (TFA, Merck, Darmstadt, Germany)
- matrice: Kyselina sinapová (SA), kyselina ferulová (FA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- inzulin, cytochrom c, apomyoglobin - „ProteoMass™ Peptide & Protein MALDI-MS Calibration Kit“ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- peptidové standarty: „Peptide Calibration Standard II“ (Bruker Daltonik, Bremen, Německo): bradykinin 1-7, angiotensin II, angiotensin I, substance P, bombesin, renin substrate, ACTH clip 1-17, ACTH clip 18-39, somatostatin 28
- enzymy: celulasa (EC 3.2.1.4) z *Trichoderma viride* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

4.3 Přístrojová technika

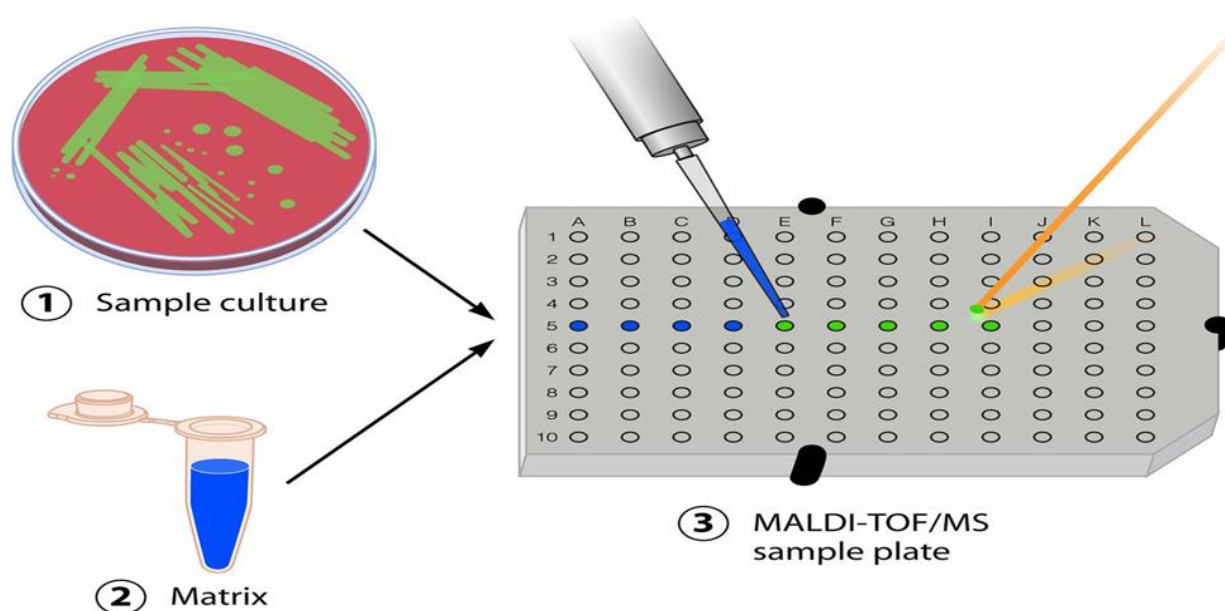
- analytické váhy (Sartorius, Gottingen, Německo)
- mikrocentrifuga Mini Spin Plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- sada automatických pipet (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- MALDI destička AnchorChip™ 600/96 (Bruker Daltonik, Bremen, Německo)
- MALDI-TOF hmotnostní spektrometr Microflex LRF20 (Bruker Daltonik, Bremen, Německo)
- vortex mixer SA8 (Stuart, Velká Británie)
- thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Německo)

4.4 Příprava vzorku pro MALDI-TOF MS

Získané vzorky sinic byly zcentrifugovány při 15 000 g po dobu sedmi minut. Poté byl odpipetován vzniklý supernatant a k usazenině na dně mikrozkušavky bylo přidáno 100 μ l MALDI-MS quality water. Vzorky byly opět zcentrifugovány.

Jako matrice byl použit roztok kyseliny ferulové (FA) a sinapové (SA). Tyto kyseliny byly použity v poměru FA:SA 10:30 mg a 5:15 mg.

MALDI destička značky AnchorChip™ 600/96 byla omyta acetonem, vodou a methanolem a otřena jemnými ubrousky. Poté se na ni mohly nanášet vzorky, matrice a standardy. K nanášení na destičku byla použita metoda „dried-droplet“ neboli metoda vysušené kapky (Thomas et al. 2004). Jako první byl nanesen 1 μ l vzorku sinice a poté ihned zakápnut matricí v množství 1 μ l. Mezi tyto vzorky byly nanесeny peptidové a proteinové standardy. Po zaschnutí vzorků byla destička nachystaná k měření a vložena do hmotnostního spektrometru.



Obr. 3 Schéma nanášení vzorku a matrice na MALDI destičku (Clark et al. 2013).

4.5 Hmotnostní analýza MALDI-TOF MS

Pro měření hmotnostních spekter byl použit hmotnostní spektrometr Microflex LRF20. Spektra byla zpracována v programu mMass verze 5.5.0.

4.6 Použití TFA a enzymů

U některých vzorků sinic byla použita jako rozpouštědlo kyselina trifluoroctová (TFA), za účelem zvýšení intenzity signálů a zlepšení kvality hmotnostních spekter. Matrice FA:SA byla rozpuštěna v 0,1%, 2% a 5% TFA. Také byl použit enzym celulasa z *Trichoderma viride* pro narušení pevné buněčné stěny sinic a zlepšení intenzity signálů. Po přidání enzymu byly sinice inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu asi 15 hod.

5. Výsledky

5.1 Optimalizace metody MALDI-TOF MS

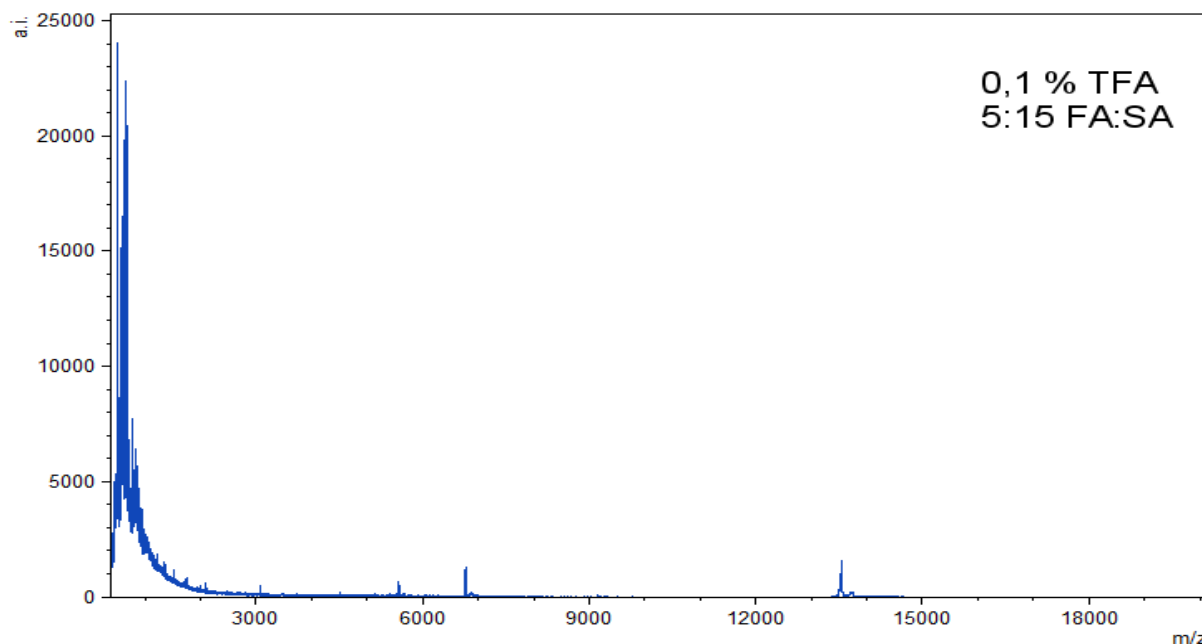
Optimalizace metody znamená vytvoření vhodných podmínek pro přípravu vzorku a následnou analýzu. Cílem je získat co nejvíce kvalitního hmotnostního spektra. Optimalizace zahrnuje zvolení vhodné matrice a zvolení vhodného rozpouštědla matrice. Dále je důležité množství vzorku a matrice nanášené na MALDI destičku a zvolení správné techniky nanášení vzorku (Fenselau & Demirev, 2001).

5.1.1 Vliv koncentrace TFA na vzhled proteinových profilů

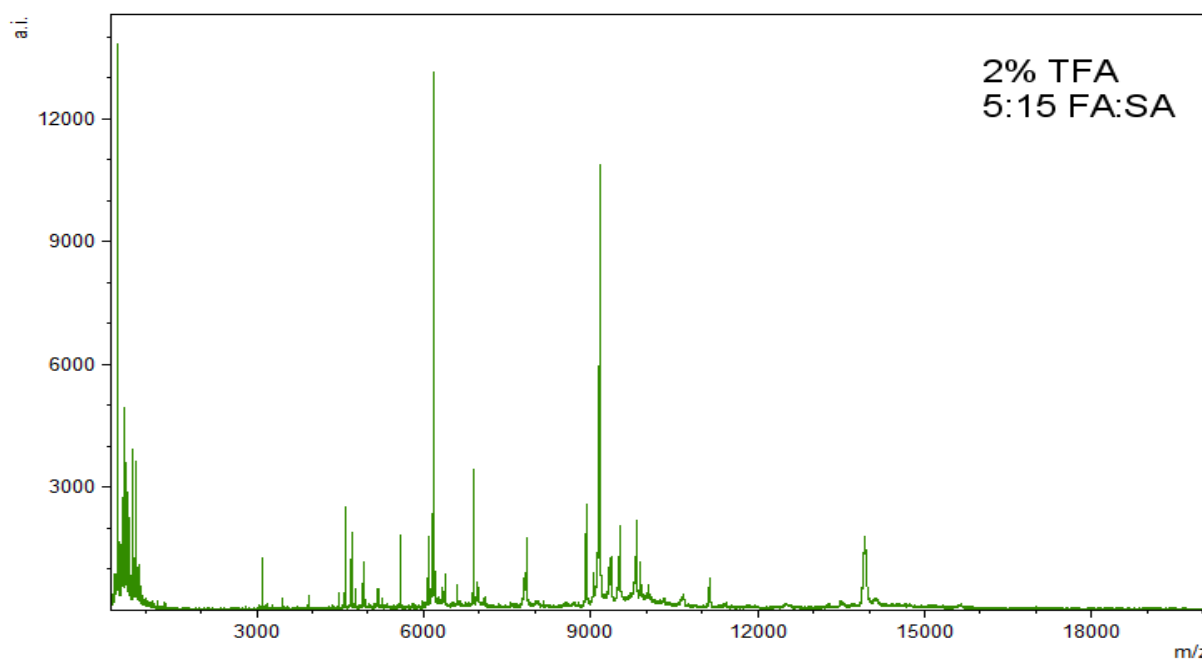
Jedním z důležitých faktorů, který má vliv na kvalitu hmotnostních spekter je přítomnost rozpouštědla matrice. V této analýze buněčných stěn sinic byla použita jako rozpouštědlo kyselina trifluoroctová (TFA). TFA byla použita o koncentraci 0,1%, 2% a 5%. Měření s různou koncentrací TFA bylo také kombinováno s rozdílnými poměry matrice FA:SA. Byly použity poměry 5:15 mg a 10:30 mg FA:SA.

Na obrázcích 4 - 9 je znázorněno porovnání všech koncentrací TFA a poměrů matric pro sinici *Chroococcidiopsis cubana*. Hmotnostní spektra s matricí 5:15 mg (obr. 4) a 10:30 mg (obr. 7) FA:SA v 0,1% TFA nezobrazují téměř žádné signály. 2% TFA už poskytovala lepší proteinové profily, jak u poměru matric 5:15 mg tak i 10:30 mg (obr. 5 a 8). Spektra byla naměřena se signály o vyšší molekulové hmotnosti ($m/z > 10000$). Obr. 6 znázorňuje spektrum s použitou matricí 5:15 mg FA:SA v 5% TFA. Spektrum má signály o něco méně intenzivní než při použití 2% TFA. Použití matrice 10:30 mg FA:SA v 5% TFA (obr. 9) bylo ve srovnání s matricí 5:15 mg FA:SA v 5% TFA úspěšnější. Spektrum poskytuje kvalitní proteinový profil.

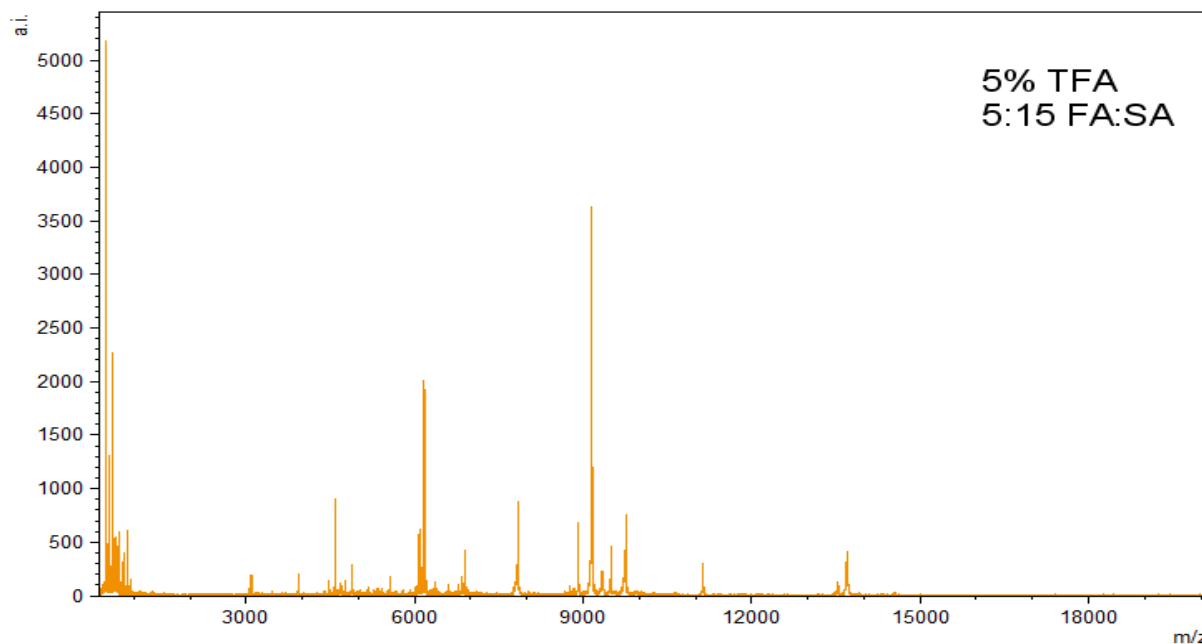
Hmotnostní spektra obsahující signály pouze okolo 600 Da, zobrazují ionty, které jsou výsledkem ionizace vlastní matrice.



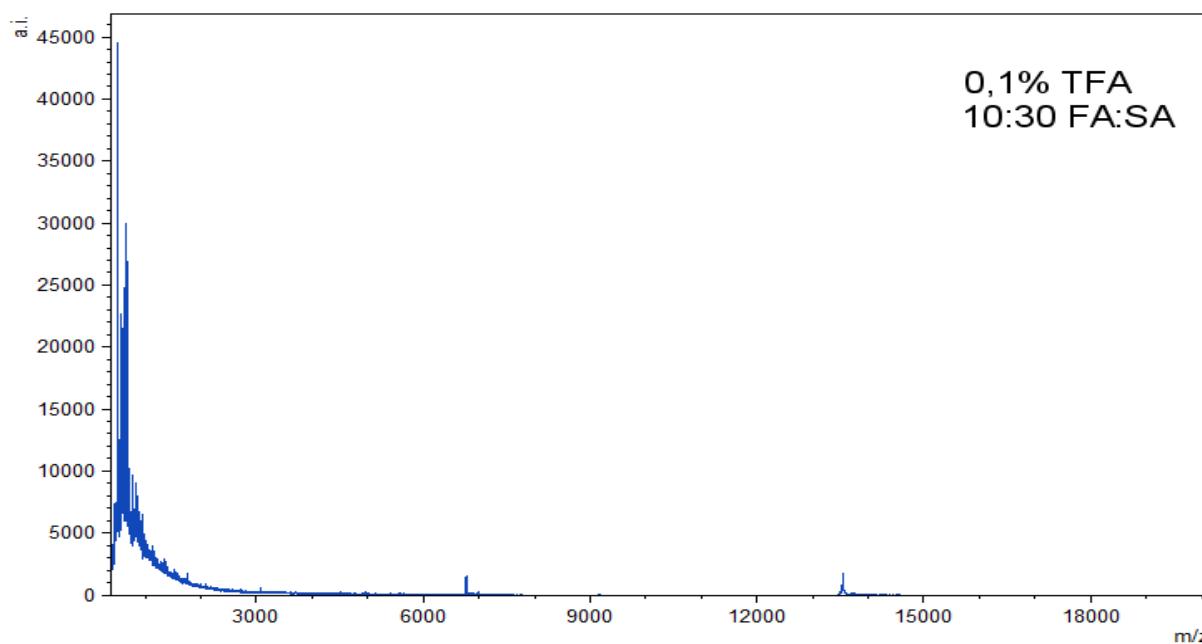
Obr. 4 MALDI-TOF hmotnostní spektrum sinice *Chroococcidiopsis cubana*. Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l. Matrice FA:SA v poměru 5:15 mg, rozpuštěná v 0,1% TFA.



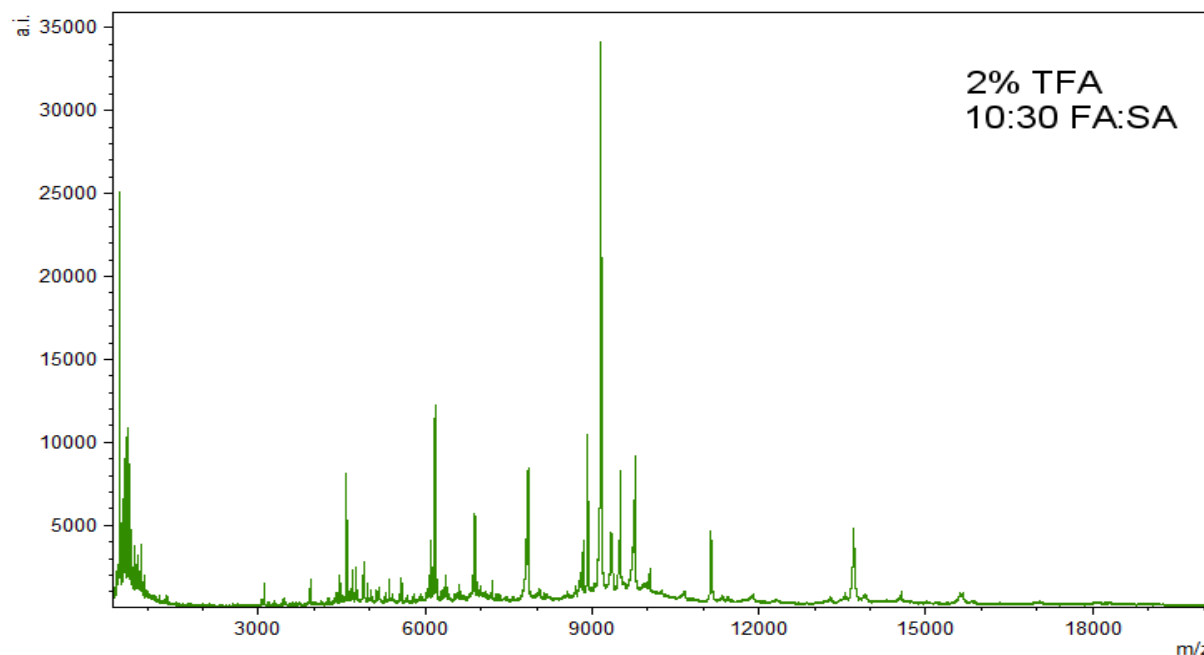
Obr. 5 MALDI-TOF hmotnostní spektrum sinice *Chroococcidiopsis cubana*. Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l. Matrice FA:SA v poměru 5:15 mg, rozpuštěná v 2% TFA.



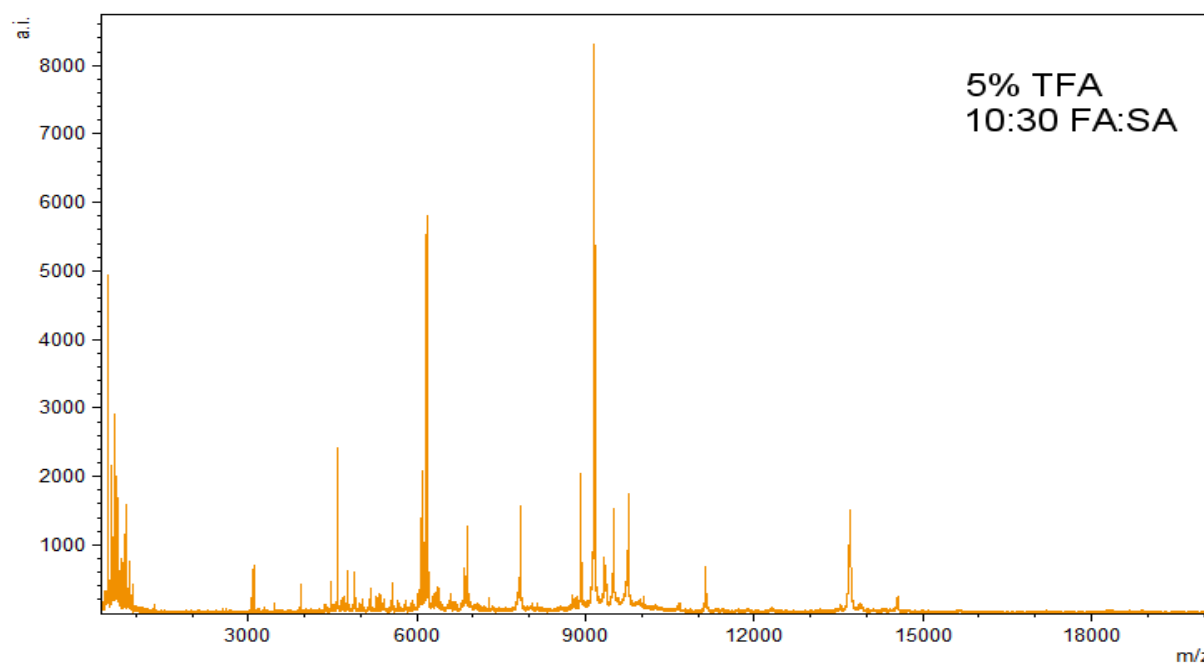
Obr. 6 MALDI-TOF hmotnostní spektrum sinice *Chroococcidiopsis cubana*. Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l. Matrice FA:SA v poměru 5:15 mg, rozpuštěná v 5% TFA.



Obr. 7 MALDI-TOF hmotnostní spektrum sinice *Chroococcidiopsis cubana*. Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l. Matrice FA:SA v poměru 10:30 mg, rozpuštěná v 0,1% TFA.

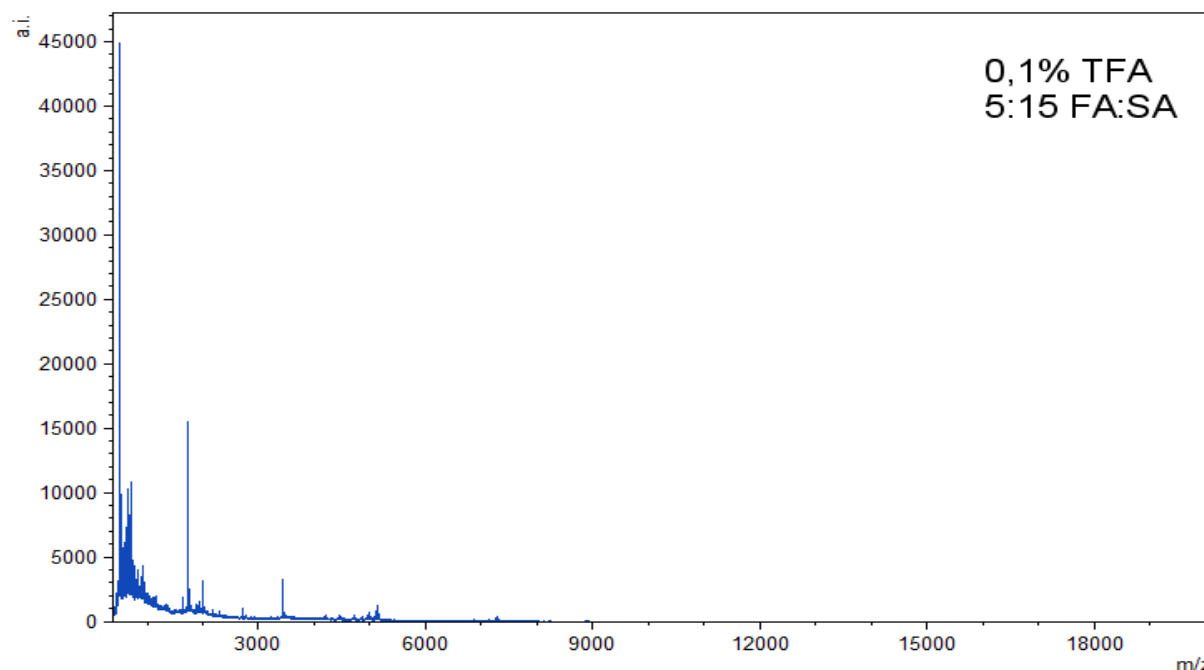


Obr. 8 MALDI-TOF hmotnostní spektrum sinice *Chroococcidiopsis cubana*. Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l. Matrice FA:SA v poměru 10:30 mg, rozpuštěná v 2% TFA.

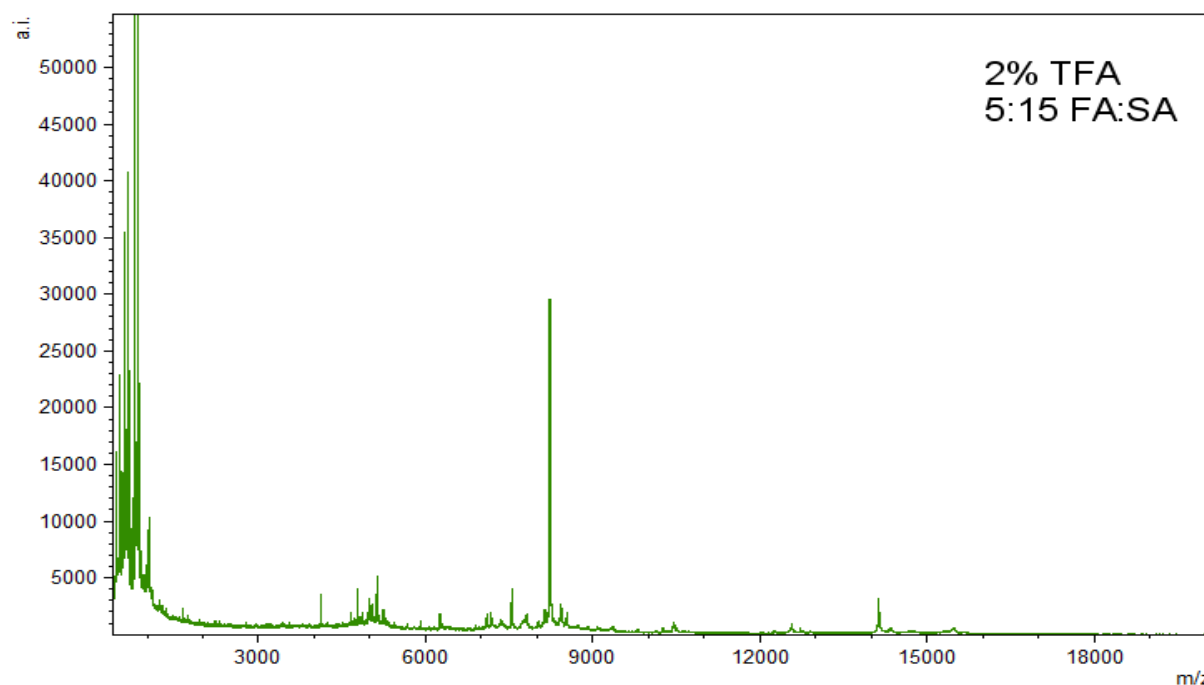


Obr. 9 MALDI-TOF hmotnostní spektrum sinice *Chroococcidiopsis cubana*. Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l. Matrice FA:SA v poměru 10:30 mg, rozpuštěná v 5% TFA.

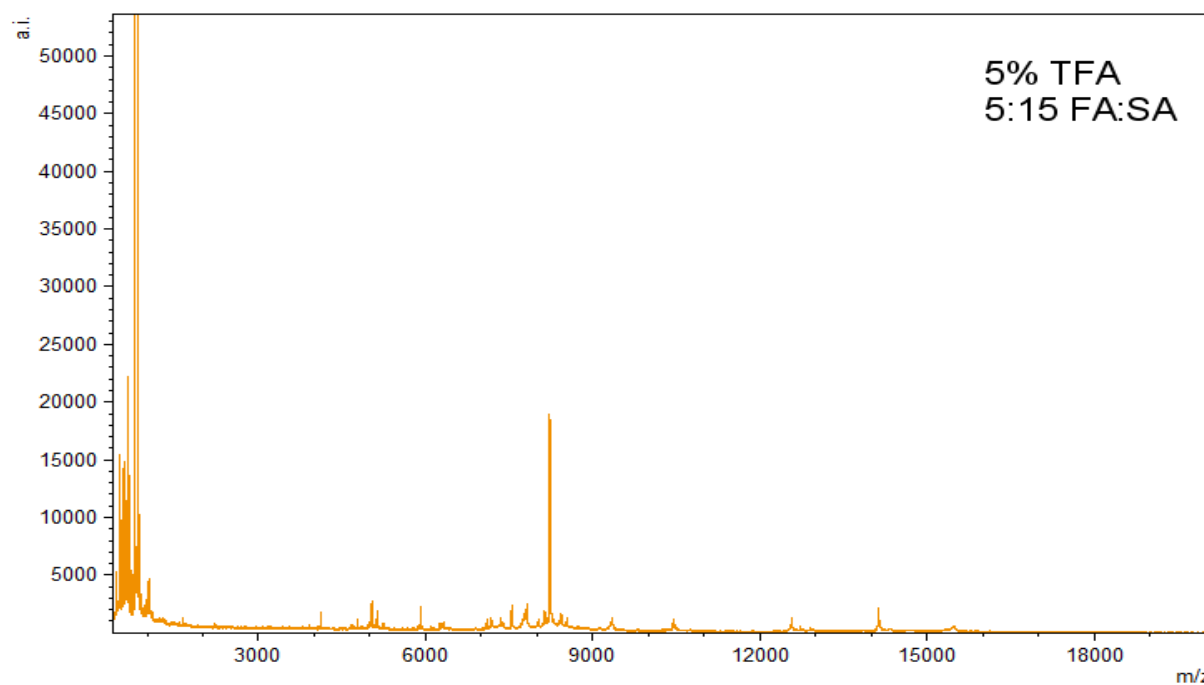
Obrázky 10 - 15 znázorňují porovnání všech koncentrací TFA a poměrů matric pro sinici rodu *Merismopedia*. Podobně jako u sinice *Chroococcidiopsis cubana* má 0,1% TFA (obr. 10 a 13) neuspokojivé výsledky. Spektra obsahují signály o menší molekulové hmotnosti ($m/z < 6000$). Kvalitativnější výsledky byly zaznamenány v případě použití 2% TFA (obr. 11 a 14). Spektra už obsahují více signálů a signály jsou i o vyšší molekulové hmotnosti ($m/z > 10000$). Srovnatelná spektra s 2% TFA měla i 5% TFA (obr. 12 a 15).



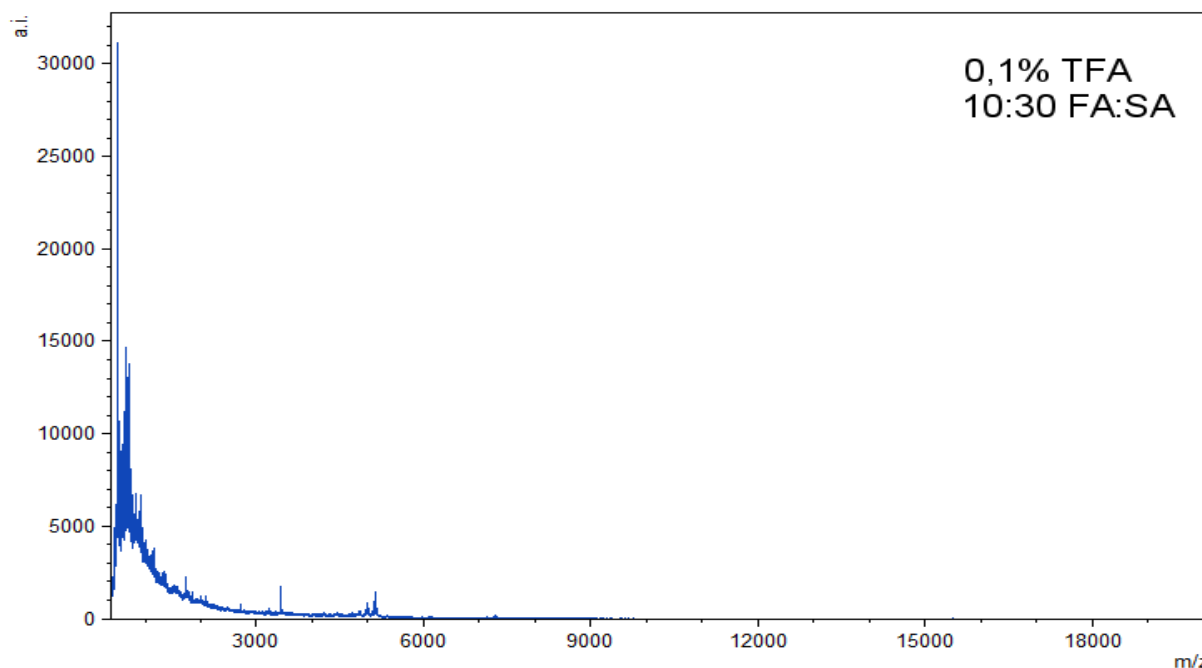
Obr. 10 MALDI-TOF hmotnostní spektrum sinice rodu *Merismopedia*. Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l. Matrice FA:SA v poměru 5:15 mg, rozpuštěná v 0,1% TFA.



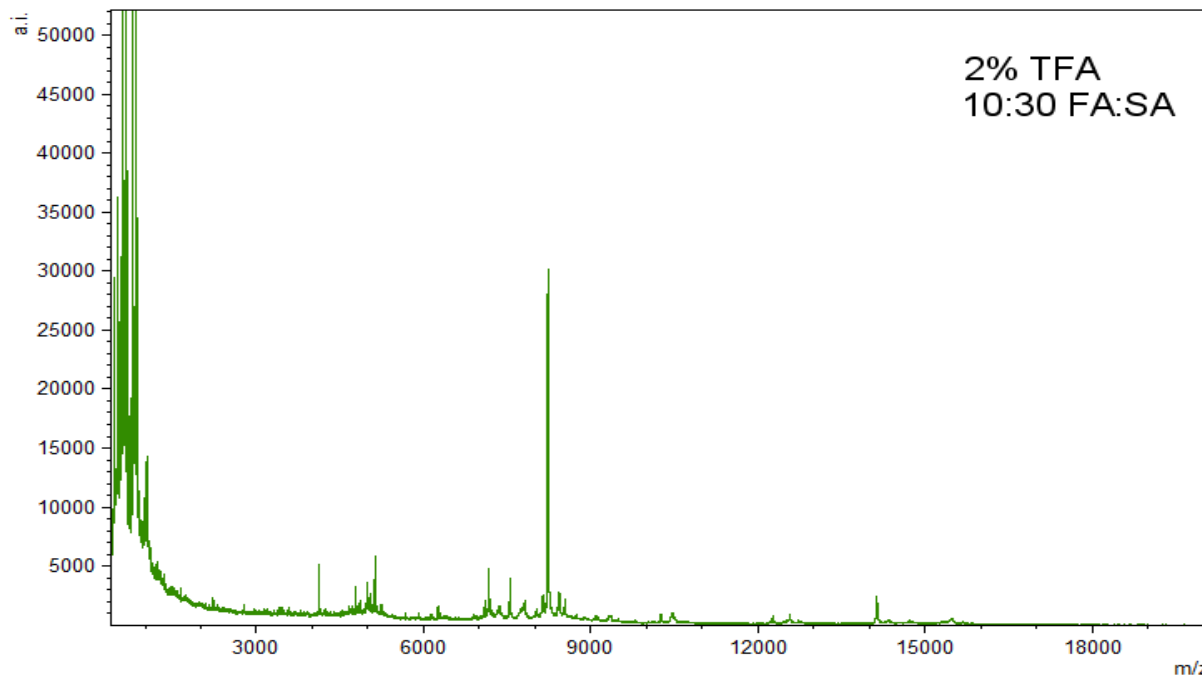
Obr. 11 MALDI-TOF hmotnostní spektrum sinice rodu *Merismopedia*. Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l. Matrice FA:SA v poměru 5:15 mg, rozpuštěná v 2% TFA.



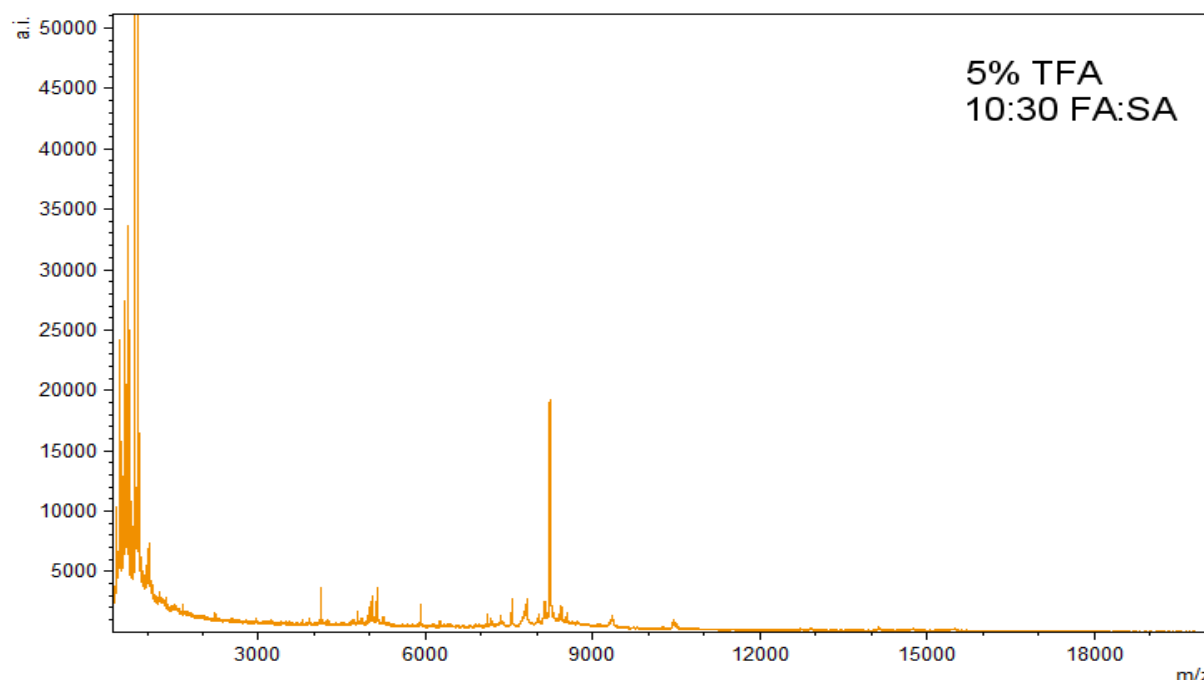
Obr. 12 MALDI-TOF hmotnostní spektrum sinice rodu *Merismopedia*. Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l. Matrice FA:SA v poměru 5:15 mg, rozpuštěná v 5% TFA.



Obr. 13 MALDI-TOF hmotnostní spektrum sinice rodu *Merismopedia*. Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l. Matrice FA:SA v poměru 10:30 mg, rozpuštěná v 0,1% TFA.



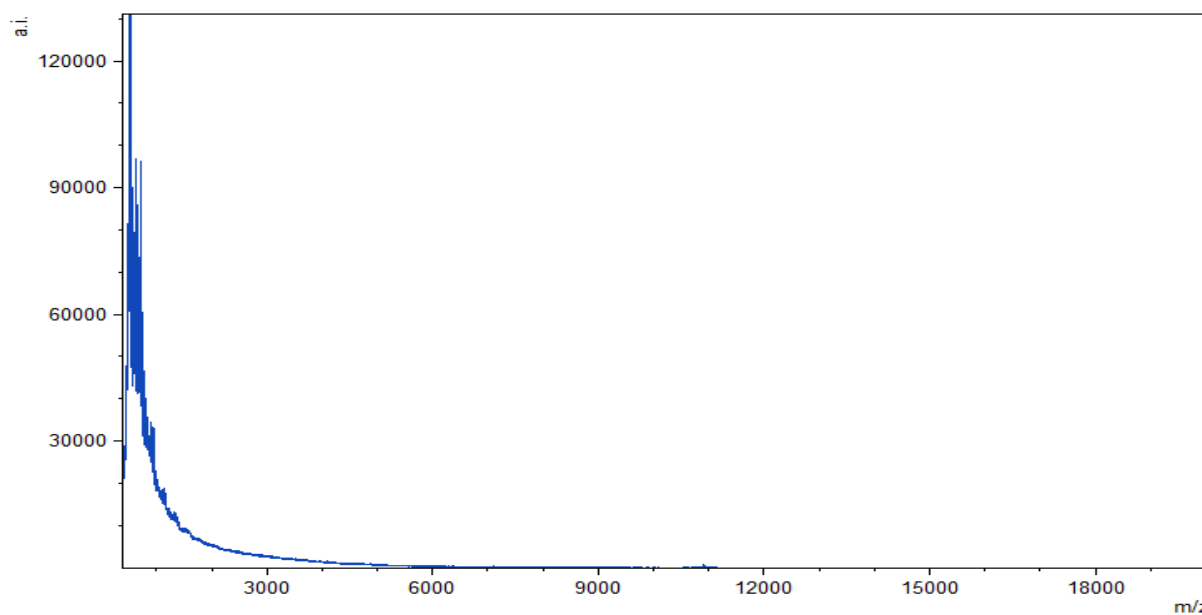
Obr. 14 MALDI-TOF hmotnostní spektrum sinice rodu *Merismopedia*. Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l. Matrice FA:SA v poměru 10:30 mg, rozpuštěná v 2% TFA.



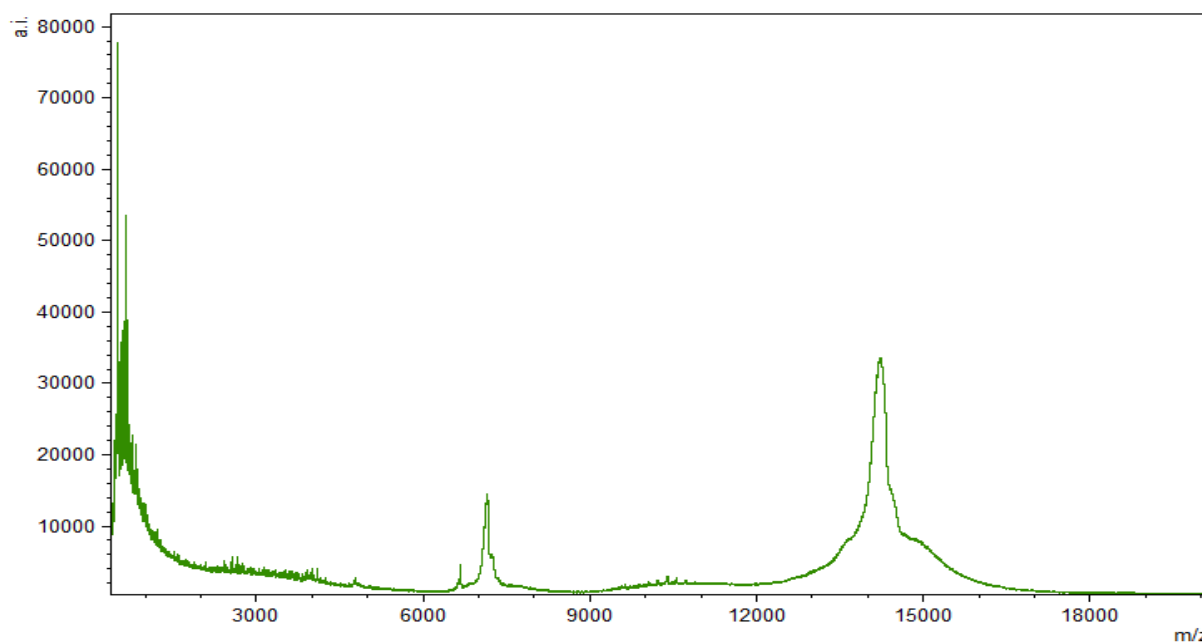
Obr. 15 MALDI-TOF hmotnostní spektrum sinice rodu *Merismopedia*. Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l. Matrice FA:SA v poměru 10:30 mg, rozpuštěná v 5% TFA.

5.1.2 Vliv celulasy na buněčnou stěnu sinic

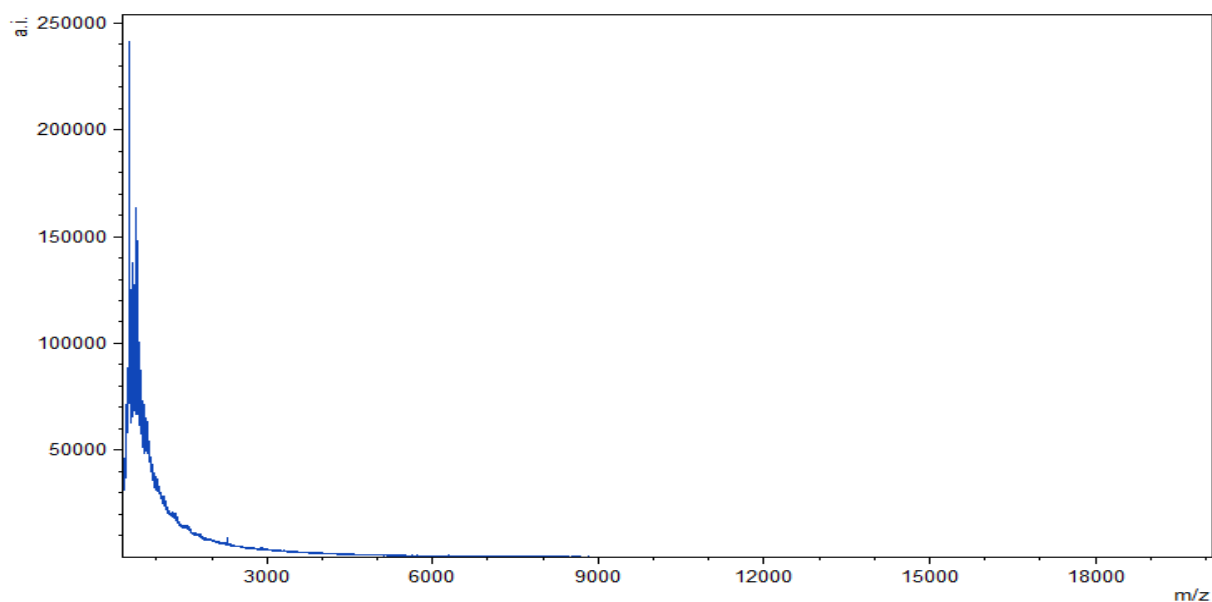
K narušení buněčných stěn sinic a zlepšení jejich proteinových profilů byla použita celulasa z *Trichoderma viride*. Na obr. 16, 18, 20 a 22 jsou spektra sinic, kde nebyla použita celulasa a spektra nevykazovala žádné signály. Na hmotnostních spektrech na obrázcích 17, 19, 21 a 23 jde vidět vliv celulasy. I přesto, ale byla spektra nedostačující. Zejména u sinic *Asterocapsa divina* (Obr. 21) a *Gleocapsa aeruginosa* (Obr. 23) byly signály po použití celulasy téměř zanedbatelné.



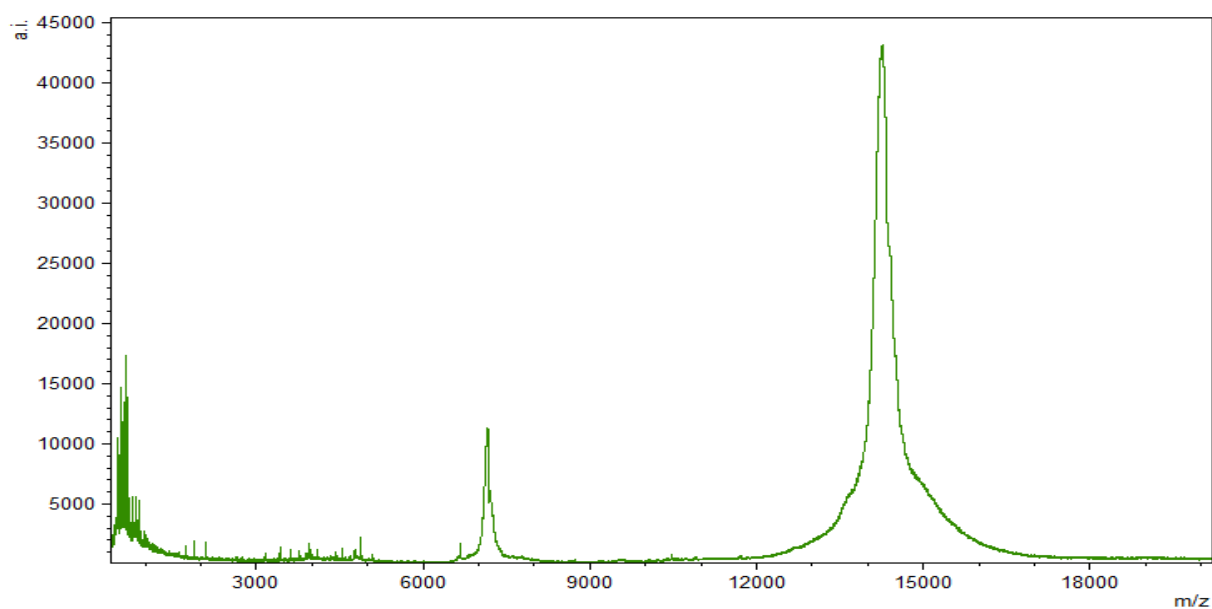
Obr. 16 Proteinový profil sinice *Geminocystis* sp. bez přidavku celulasy. Matrice FA:SA (1:3).
Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l.



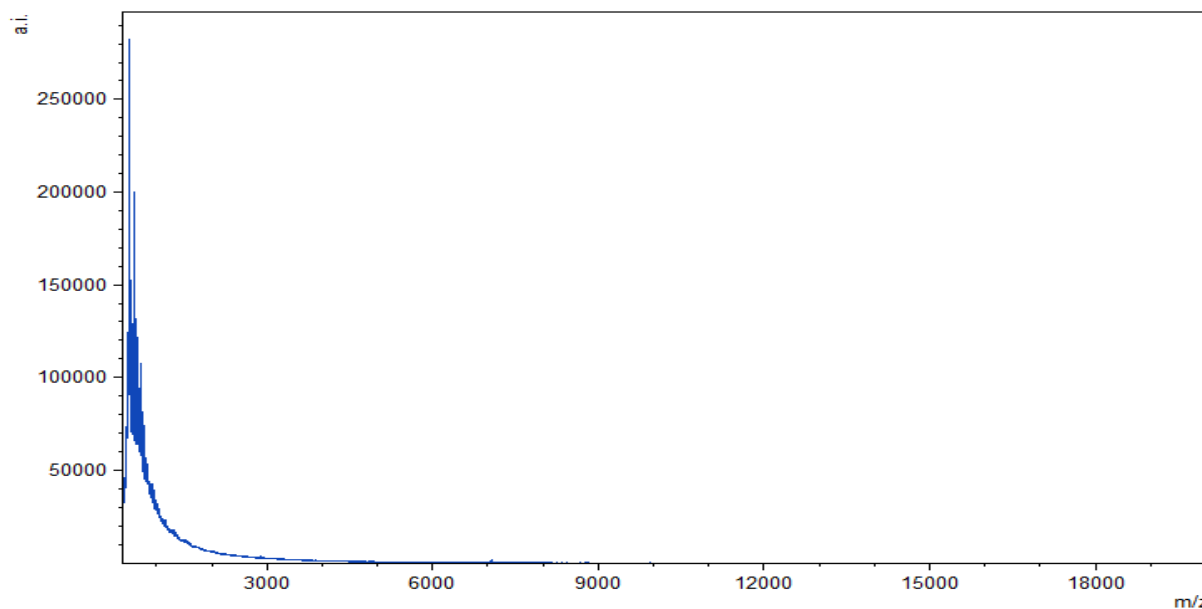
Obr. 17 Proteinový profil sinice *Geminocystis* sp. po působení celulasy z *Trichoderma viride*.
Matrice FA:SA (1:3). Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l.



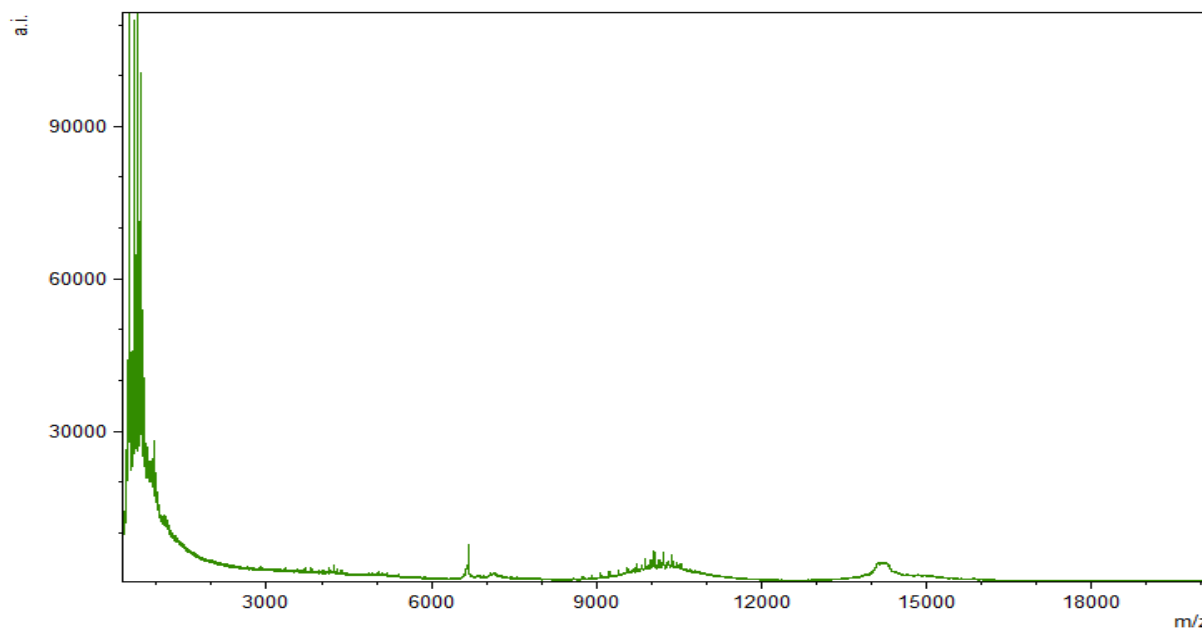
Obr. 18 Proteinový profil sinice *Gleocapsa* sp. bez přidavku celulasy. Matrice FA:SA (1:3). Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l.



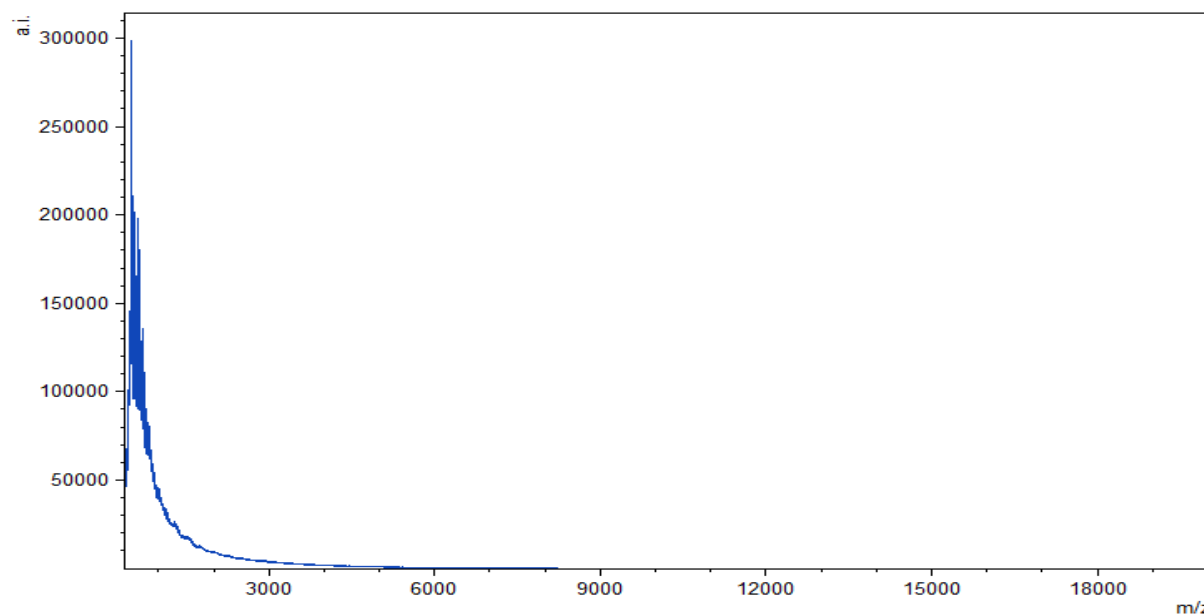
Obr. 19 Proteinový profil sinice *Gleocapsa* sp. po působení celulasy z *Trichoderma viride*. Matrice FA:SA (1:3). Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l.



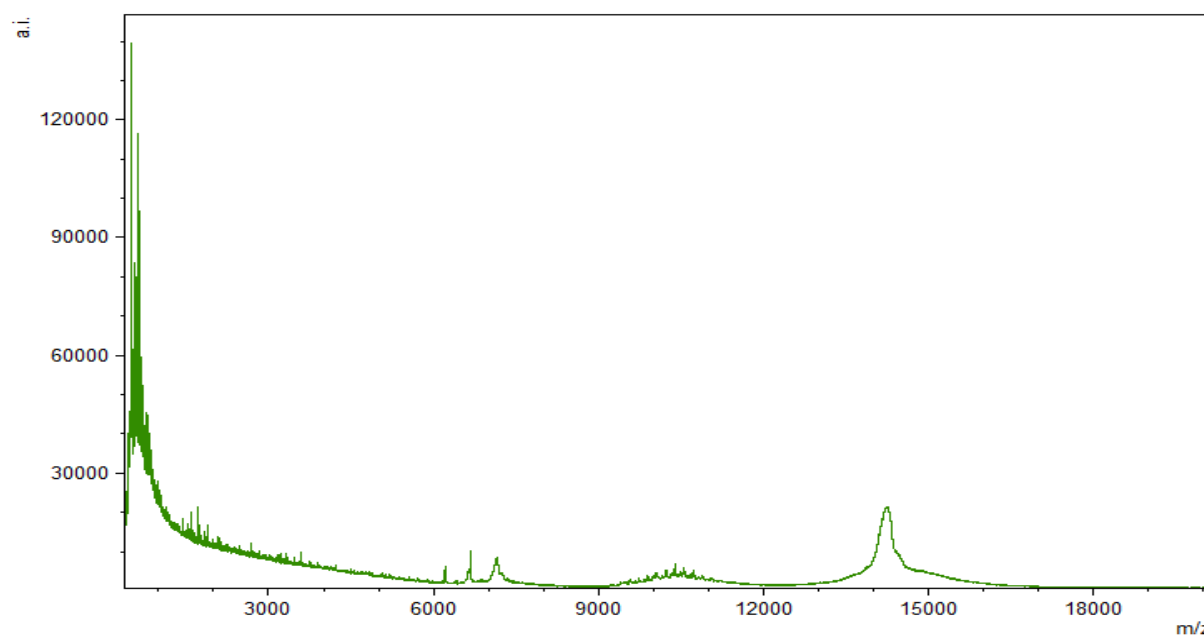
Obr. 20 Proteinový profil sinice *Asterocapsa divina* bez přídavku celulasy. Matrice FA:SA (1:3).
Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l.



Obr. 21 Proteinový profil sinice *Asterocapsa divina* po působení celulasy z *Trichoderma viride*.
Matrice FA:SA (1:3). Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l.



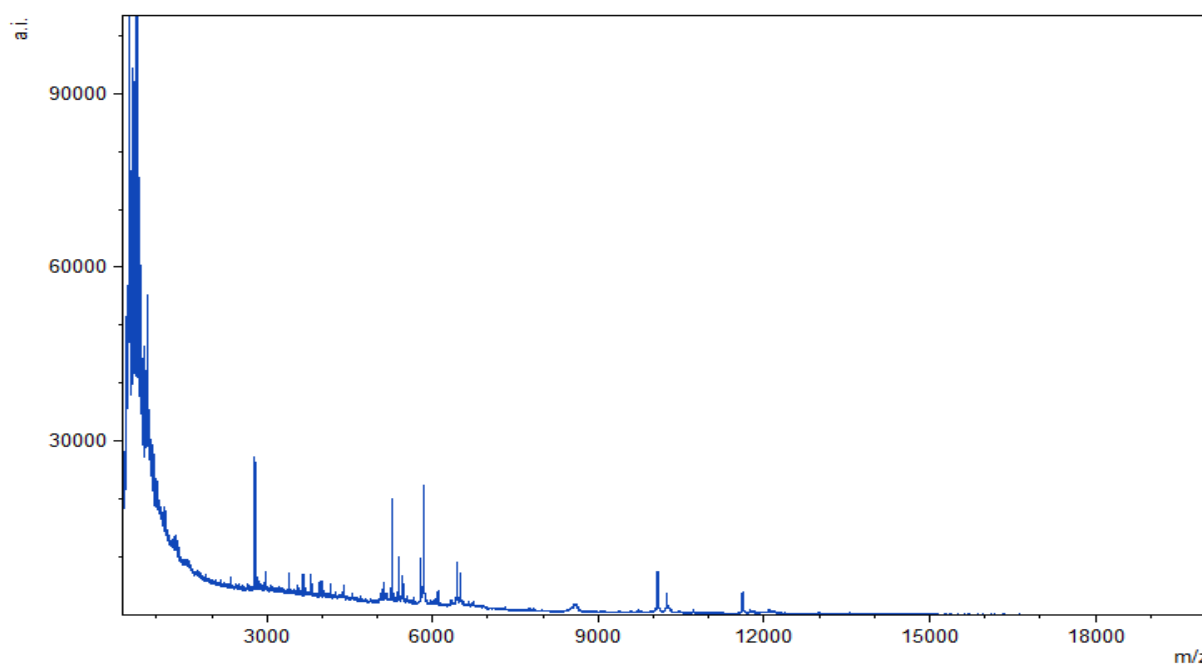
Obr. 22 Proteinový profil sinice *Gleocapsa aeruginosa* bez přidavku celulasy. Matrice FA:SA (1:3). Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l.



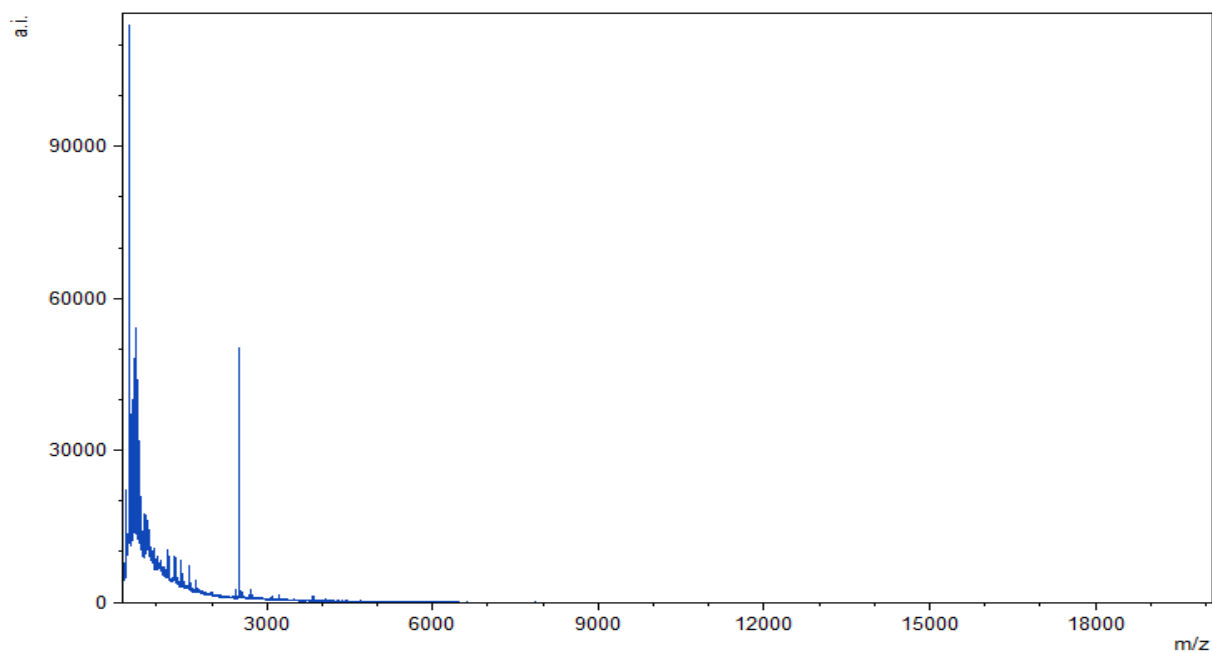
Obr. 23 Proteinový profil sinice *Gleocapsa aeruginosa* po působení celulasy z *Trichoderma viride*. Matrice FA:SA (1:3). Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l.

5.1.3 Hmotnostní spektra získaná bez přidání TFA a celulasy

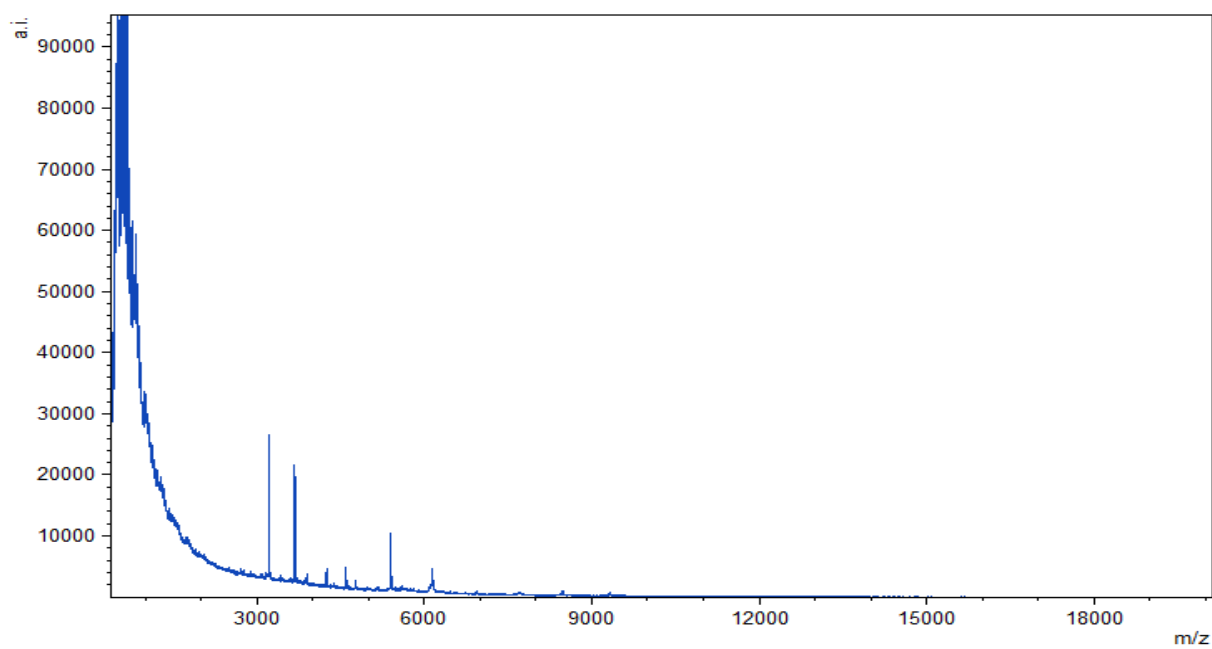
Na obrázcích 24, 25 a 26 jsou hmotnostní spektra bez přidání kyseliny trifluoroctové a celulasy. Nejvíce signálů poskytovala sinice *Synechococcus* sp. (Obr. 24). Hmotnostní spektra sinic *Gleocapsa atrata* (Obr. 25) a *Chamaesiphon* sp. (Obr. 26) poskytovaly velmi málo signálů a jen menší molekulové hmotnosti.



Obr. 24 Proteinový profil sinice *Synechococcus* sp. Matrice FA:SA (1:3). Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l.



Obr. 25 Proteinový profil sinice *Gleocapsa atrata*. Matrice FA:SA (1:3). Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l.



Obr. 26 Proteinový profil sinice *Chamaesiphon* sp. Matrice FA:SA (1:3). Poměr vzorek:matrice 1 μ l:1 μ l.

6. Diskuze

Cílem této práce bylo nalezení vhodných podmínek přípravy vzorku pro analýzu buněčných stěn sinic, pomocí hmotnostní spektrometrické metody MALDI-TOF MS. K měření metodou MALDI-TOF MS bylo použito 9 druhů sinic. U všech vzorků sinic byla jako matrice použita směs kyselin ferulové (FA) a sinapové (SA). Matrice FA:SA byla použita buď v poměru 5:15 mg nebo 10:30 mg. Vzorky a standardy byly na MALDI destičku nanášené metodou vysušené kapky (Thomas et al. 2004).

Jako první bylo testováno, jak ovlivní kvalitu hmotnostního spektra koncentrace rozpouštědla matrice. Jako rozpouštědlo matrice byla použita kyselina trifluoroctová (TFA), v koncentracích 0,1%, 2% a 5%. Obrázky 4,7,10 a 13 ukazují, že nejméně vhodná pro analýzu byla 0,1% TFA, kde spektra nezobrazovaly téměř žádné signály. Proteinové profily sinice *Chroococcidiopsis cubana*, kde byla použita 2% TFA (Obr. 5 a 8) poskytovaly kvalitnější výsledky než 0,1% TFA. Hmotnostní spektra byla naměřena se signály o vyšší molekulové hmotnosti ($m/z > 10000$). Použití 5% (Obr. 6 a 9) TFA pro sinici *Chroococcidiopsis cubana* bylo srovnatelné s 2% TFA. Z výsledků konstatují, že pro analýzu buněčných stěn sinic byla jako rozpouštědlo vhodná 2% a 5% TFA. Použití 2% TFA oproti 5% bylo úspěšnější v případě sinice rodu *Merismopedia* (Obr. 11,12, 14 a 15). Pro sinici *Chroococcidiopsis cubana* bylo použití 2% a 5% TFA srovnatelné.

Měření s různou koncentrací TFA bylo také kombinováno s rozdílnými poměry matrice FA:SA (5:15 mg a 10:30 mg FA:SA). Použití poměru matric 5:15 mg a 10:30 mg FA:SA bylo na podobné úrovni.

Dále bylo testováno, zda je charakter hmotnostního spektra ovlivněn přidáním enzymu celulasy. K tomuto účelu byla použita celulasa z *Trichoderma viridis*. Celulasa byla použita u vzorků sinic, jejichž hmotnostní spektra nevykazovala žádné signály (Obr. 16, 18, 20 a 22). Výsledky po použití celulasy zobrazují obrázky 17, 19, 21 a 23. Celulasa sice mírně narušila buněčnou stěnu sinic, ale i přesto byla spektra nedostačující. Zejména u sinic *Asterocapsa divina* *Gleocapsa aeruginosa* byly signály téměř zanedbatelné.

Proteinové profily sinic *Synechococcus* sp., *Gleocapsa atrata* a *Chamaesiphon* sp. u kterých nebyla použita TFA ani celulasa ukazují obrázky 24, 25 a 26. Spektra poskytovaly málo signálů a menší molekulové hmotnosti.

V dnešní době se kromě hmotnostní spektrometrie používají k identifikaci mikroorganismů i molekulárně založené metody. Například Lee et al. (2014) identifikoval druhy sinic z různých sladkovodních lokalit v Austrálii, pomocí molekulárních metod. Ve srovnání s mými výsledky a výsledky Lee et al. (2014), jsou molekulární metody pro identifikaci sinic, více vhodnější, než hmotnostní spektrometrie. I přesto, že je identifikace mikroorganismů na základě sekvenování DNA pomalejší a ekonomicky nákladnější než pomocí hmotnostní spektrometrie, jsou v dnešní době molekulární metody nejspolehlivější volbou pro identifikaci sinic. Je to způsobeno tím, že metoda MALDI-TOF MS pro identifikaci sinic je ještě málo prozkoumána a neví se o ní doposud tolik jako o molekulárních metodách (Lee et al. 2014, Štursa et al. 2010).

Metoda MALDI-TOF je nejvíce využívána pro identifikaci bakterií, zejména těch patogenních. Správná identifikace je nezbytná v případech bakteriální infekce, kdy je potřeba zajistit vhodnou léčbu. Identifikace je důležitá i při zjišťování kontaminace vody, půdy či potravin. Štursa et al. (2010) využívá metodu MALDI-TOF k identifikaci patogenních bakterií z potravinářských surovin a k detekci bakterií z kontaminovaných zemin.

Metoda MALDI-TOF je také nezbytná pro identifikaci rostlinných patogenů v zemědělství. Chalupová et al. (2012) identifikovala fytopatogeny kulturních rostlin pomocí techniky MALDI-TOF MS. Hmotnostní spektra hub v této studii jsou bohatá na signály a jsou vhodná pro identifikaci, na rozdíl od mých výsledků, kde hmotnostní spektra sinic získaná metodou MALDI-TOF MS jsou ve většině případů nedostačující.

Metoda MALDI-TOF MS není ještě tak běžná pro identifikaci sinic jako například pro jiné druhy bakterií, řasy či houby. Z výsledků lze usoudit, že techniku MALDI-TOF MS je možné pro sinice použít. Výsledky, ale ještě nejsou dostačující. Jelikož sinice mají pevnou buněčnou stěnu, je identifikace touto metodou komplikovanější. V budoucnu by proto bylo vhodné tuto metodu pro sinice více rozvinout a přijít na způsob jak vylepšit jejich proteinové profily.

7. Závěr

V této bakalářské práci jsem se zabývala optimalizací metody MALDI-TOF MS pro analýzu buněčných stěn sinic. V teoretické části práce jsem se věnovala podrobnému principu metody MALDI-TOF MS a jejímu využití v biologii. Na teoretickou část práce navazovala experimentální část, kde jsem analyzovala kmeny získaných sinic pomocí spektrometrické metody MALDI-TOF MS. Tato metoda sloužící především k identifikaci mikroorganismů se v současné době velmi rychle rozvíjí. Analýza buněčných stěn sinic pomocí této metody není ještě tak běžná jako například pro jiné druhy bakterií nebo hub. Proto bylo cílem práce zjistit, zda je metoda vhodná i pro sinice. I po použití rozpouštědla matrice či enzymu celulasy pro narušení pevných buněčných stěn sinic, nebyla většina spekter sinic dostačující. Přes výše uvedený problém tato práce umožnila nový pohled v diagnostice sinic, a proto by bylo vhodné v budoucnu tuto metodu pro sinice více rozvinout a pokusit se o jiné přístupy.

Seznam použité literatury

Amiri-Eliasi, B. J. & Fenselau, C. (2001) Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells. *Analytical Chemistry*, 73, 5228-5231.

Babula, P. (2009) Archebakterie, bakterie, houby, protista. 139 pp., Farmaceutická fakulta, Brno.

Bader, O. (2013) MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*, 13, 788-799.

Baker, S., Griffiths, C., Nicklin, J. (2011) Microbiology. 352 pp., Garland science, New York, London.

van Belkum, A., Chatellier, S., Girard, V., Pincus, D., Deol, P. & Dunne, W. M. (2015) Progress in proteomics for clinical microbiology: MALDI-TOF MS for microbial species identification and more. *Expert Review of Proteomics*, 12, 595-605.

Cabeen, M. T. & Jacobs-Wagner, C. (2007) Skin and bones: the bacterial cytoskeleton, cell wall, and cell morphogenesis. *Journal of Cell Biology*, 179, 381-387.

Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A. & Wolk, D. M. (2013) Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 547-603.

Cobo, F. (2013) Application of maldi-tof mass spectrometry in clinical virology: a review. *The open virology journal*, 7, 84-90.

Dong, H. J., Kemptner, J., Marchetti-Deschmann, M., Kubicek, C. P. & Allmaier, G. (2009) Development of a MALDI two-layer volume sample preparation technique for analysis of colored conidia spores of *Fusarium* by MALDI linear TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 1373-1383.

Donohue, M. J., Best, J. M., Smallwood, A. W., Kostich, M., Rodgers, M. & Shoemaker, J. A. (2007) Differentiation of *Aeromonas* isolated from drinking water distribution systems using matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 79, 1939-1946.

Evason, D. J., Claydon, M. A. & Gordon, D. B. (2001) Exploring the limits of bacterial identification by intact cell-mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12, 49-54.

Fenn, J., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246, 64.

Fenselau, C., Demirev, P. A. (2001) Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, 20, 157-171.

Ferreira, L., Sanchez-Juanes, F., Garcia-Fraile, P., Rivas, R., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E., Gonzalez-Buitrago, J. M. & Velazquez, E. (2011) MALDI-TOF Mass Spectrometry Is a Fast and Reliable Platform for Identification and Ecological Studies of Species from Family Rhizobiaceae. *Plos One*, 6, 15.

Friedecký, D., & Lemr, K. (2012). Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab*, 20 (41), 152-157.

Ghuysen, M.J. & Hakenbeck, R. (1994) Bacterial cell wall (vol. 27). 581 pp., Elsevier, Amsterdam.

Graham, R. L., Graham, C. & McMullan, G. (2007) Microbial proteomics: a mass spectrometry primer for biologists. *Microbial Cell Factories*, 6.

Havliš, J. (1999) Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. *Vesmír*, 78, 448.

Hrabak, J., Walkova, R., Studentova, V., Chudackova, E. & Bergerova, T. (2011) Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 3222-3227.

Chalupova, J., Sedlarova, M., Helmelt, M., Rehulka, P., Marchetti-Deschmann, M., Allmaier, G. & Sebel, M. (2012) MALDI-based intact spore mass spectrometry of downy and powdery mildews. *Journal of Mass Spectrometry*, 47, 978-986.

Chen, H. Y. & Chen, Y. C. (2005) Characterization of intact *Penicillium* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 3564-3568.

Jelínek, J. (1995) Biologie prokaryot, nižších a vyšších rostlin, hub. 230 pp., Nakladatelství a vydavatelství Fin, Olomouc.

Kalina, T. & Váňa, J. (2005) Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. 606 pp., Karolinu, Praha.

Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F. (1987) Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Journal of Mass Spectrometry*, 78, 53-68.

Karas, M.; Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.*, 60, 2299-2301.

Kemptner, 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.

Krader, P. & Emerson, D. (2004) Identification of archaea and some extremophilic bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Extremophiles*, 8, 259-268.

Lay, J.O. Jr. (2001) MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom. Rev.*, 20, 172–194.

Lee, E., Ryan, U. M., Monis, P., McGregor, G. B., Bath, A., Gordon, C. & Paparini, A. (2014) Polyphasic identification of cyanobacterial isolates from Australia. *Water Research*, 59, 248-261.

Lieber, D. C. (2002) Introduction to proteomics. Tools for the new biology. 9 pp., Humana Press, Totowa, NJ, USA.

Liu, H. H., Du, Z. M., Wang, J. & Yang, R. F. (2007) Universal sample preparation method for characterization of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1899-1907.

Marvin, L. F., Roberts, M. A. & Fay, L. B. (2003) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 337, 11-21.

Mirsaleh-Kohan, N., Robertson, W. D. & Compton, R. N. (2008) Electron ionization time-of-flight mass spectrometry: Historical review and current applications. *Mass Spectrometry Reviews*, 27, 237-285.

Němec, M. & Matoulková, D. (2015) Základy obecné mikrobiologie. 255 pp., Masarykova univerzita, Brno.

Nguyen, D. T. L., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., Thanh, L. B. & Vandamme, P. (2013) A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*, 163, 19-27.

Nicolaou, N., Xu, Y. & Goodacre, R. (2012) Detection and Quantification of Bacterial Spoilage in Milk and Pork Meat Using MALDI-TOF-MS and Multivariate Analysis. *Analytical Chemistry*, 84, 5951-5958.

Randell, P. (2014) It's a MALDI but it's a goodie: MALDI-TOF mass spectrometry for microbial identification. *Thorax*, 69, 776-778.

Rosypal, S., Hoďák, K., Martinec, T., Kocur, M. (1981) *Obecná bakteriologie*. 664 pp., Státní pedagogické nakladatelství, Praha.

Santos, C., Paterson, R. R. M., Venancio, A. & Lima, N. (2010) Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 375-385.

Segawa, S., Sawai, S., Murata, S., Nishimura, M., Beppu, M., Sogawa, K., Watanabe, M., Satoh, M., Matsutani, T., Kobayashi, M., Iwadate, Y., Kuwabara, S., Saeki, N. & Nomura, F. (2014) Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. *Clinica Chimica Acta*, 435, 59-61.

Shah, N.H. & Garbia, E.S. (2010) *Mass spectrometry for microbial proteomics*. 534 pp., John Wiley and Sons Ltd, London.

Schrodl, W., Heydel, T., Schwartze, V. U., Hoffmann, K., Grosse-Herrenthey, A., Walther, G., Alastruey-Izquierdo, A., Rodriguez-Tudela, J. L., Olias, P., Jacobsen, I. D., de Hoog, G. S. & Voigt, K. (2012) Direct Analysis and Identification of Pathogenic *Lichtheimia* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Analyzer-Mediated Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 419-427.

Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. & Viridi, J. S. (2015) MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 16.

Sjoholm, M. I. L., Dillner, J. & Carlson, J. (2008) Multiplex detection of human herpesviruses from archival specimens by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 540-545.

Štursa, P., Junková, P., Strejček, M., Macek, T., Macková, M. (2010) MALDI-TOF MS snadný a rychlý způsob pro identifikaci bakterií izolovaných ze životního prostředí. *Listy cukrovarnické a řepářské*, 11, 412-413.

Thomas, H., Havlis, J., Peychl, J. & Shevchenko, A. (2004) Dried-droplet probe preparation on AnchorChip (TM) targets for navigating the acquisition of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight spectra by fluorescence of matrix/analyte crystals. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18, 923-930.

Vaidyanathan, S., Rowland, J. J., Kell, D. B. & Goodacre, R. (2001) Discrimination of aerobic endospore-forming bacteria via electrospray-ionization mass spectrometry of whole cell suspensions. *Analytical Chemistry*, 73, 4134-4144.

Seznam příloh

Příloha 1. *Asterocapsa divina*

Příloha 2. Rod *Chamaesiphon*

Příloha 3. *Chroococidiopsis cubana*

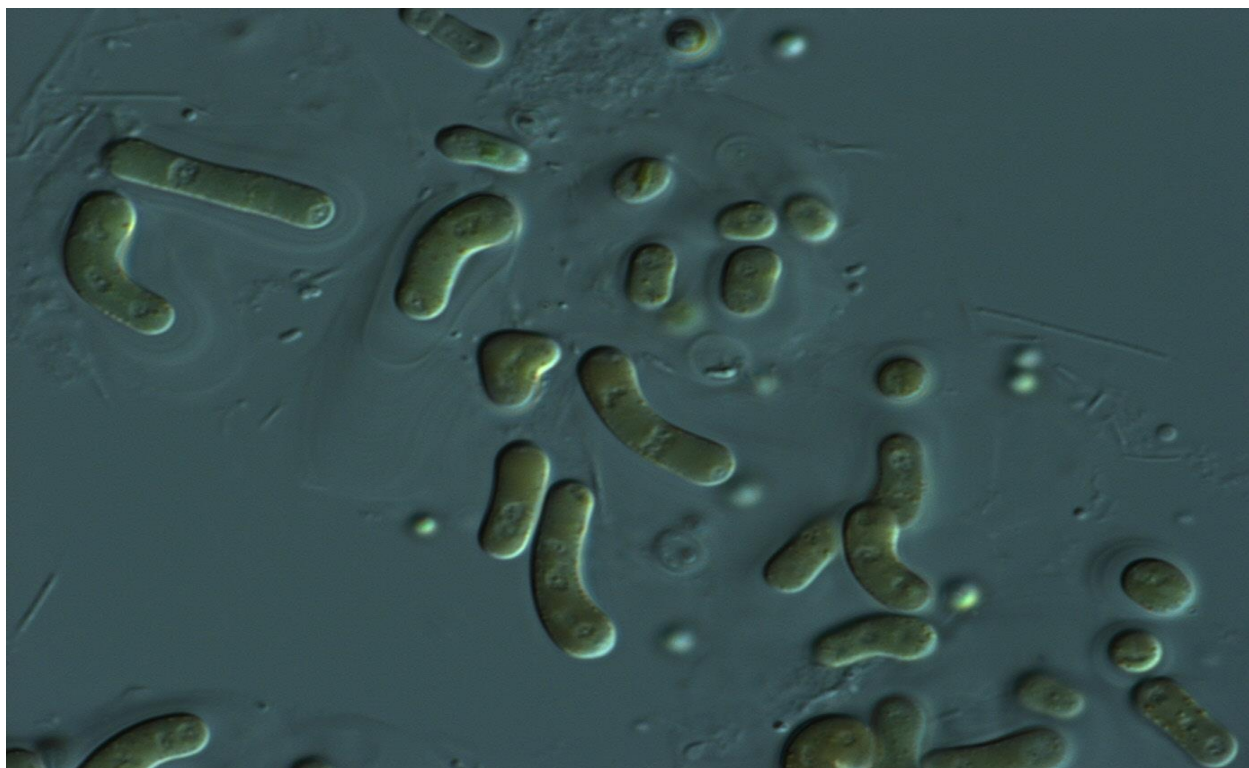
Příloha 4. Rod *Geminocystis*

Příloha 5. Rod *Gloeocapsa*

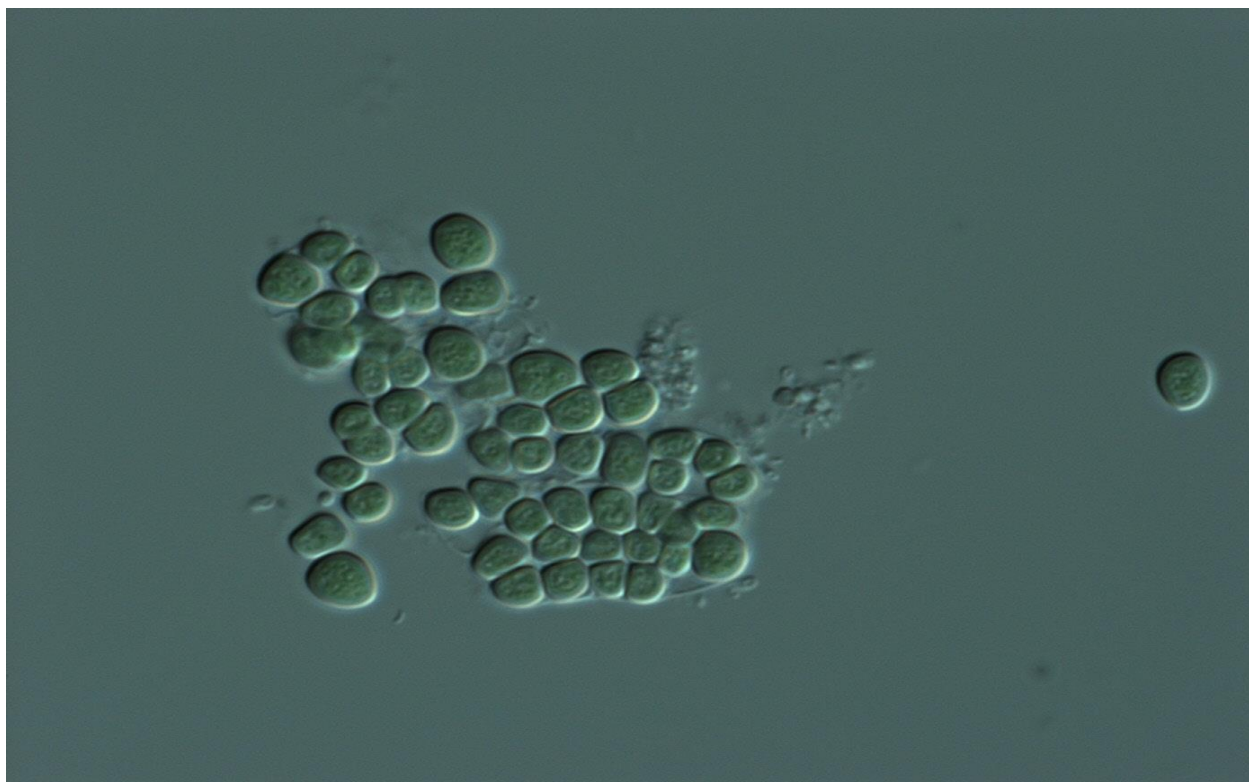
Příloha 6. Rod *Merismopedia*



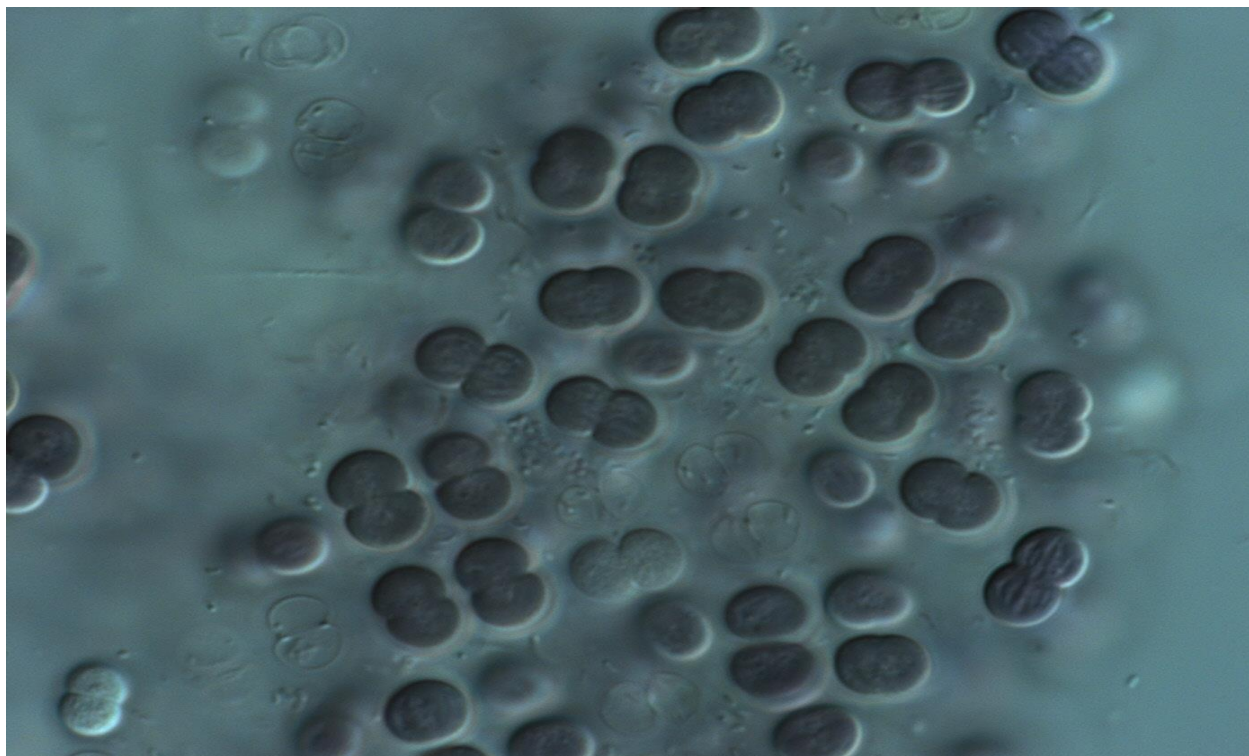
Příloha 1. *Asterocapsa divina*



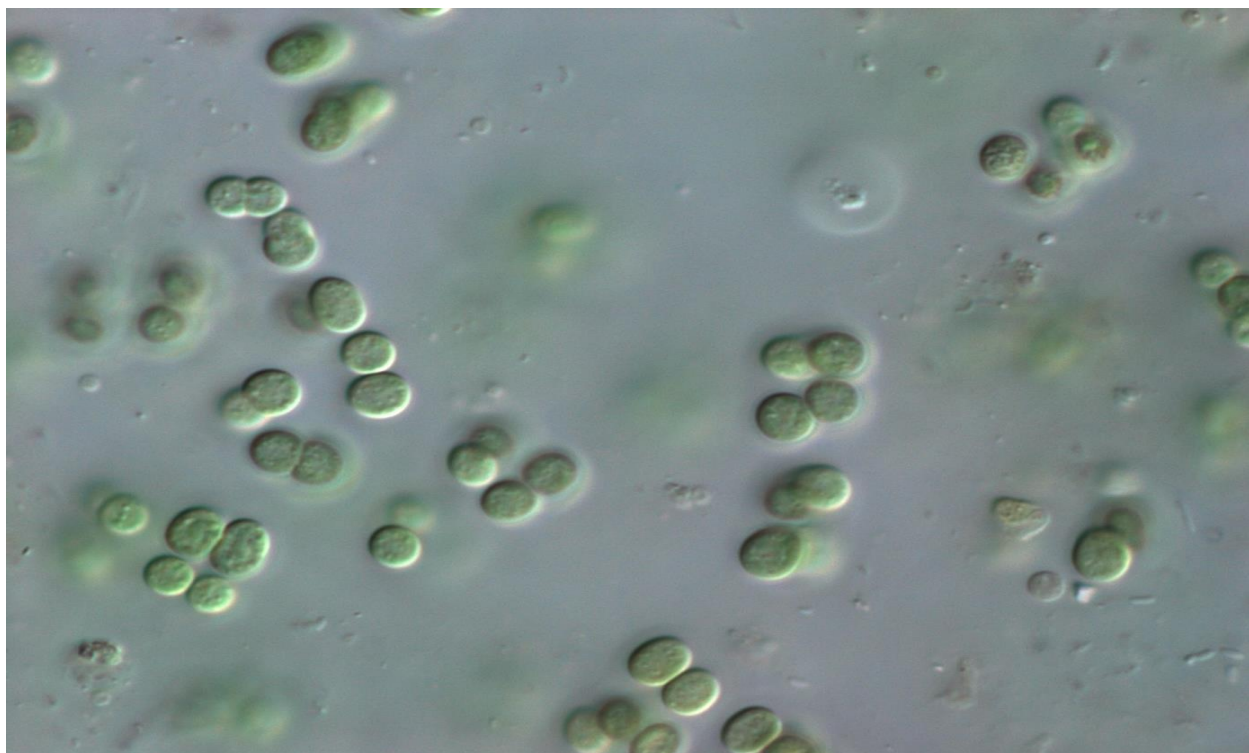
Příloha 2. Rod *Chamaesiphon*



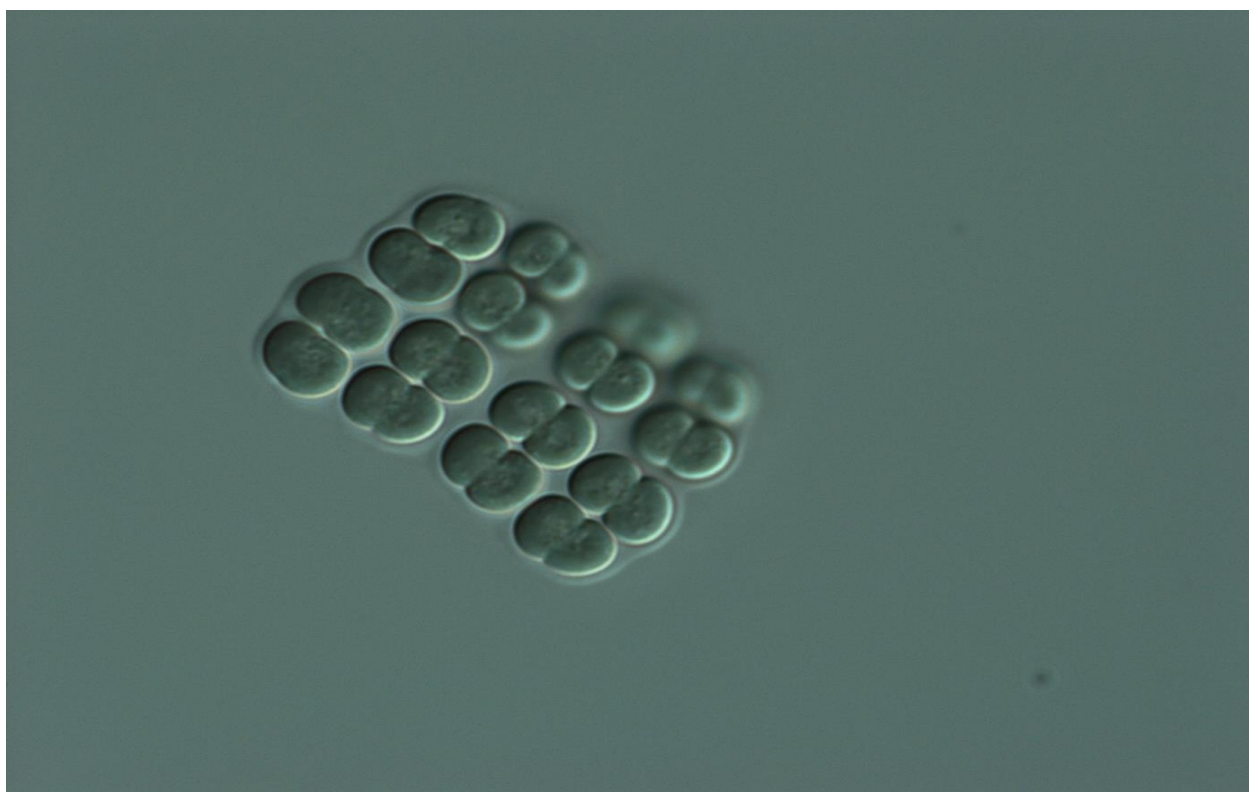
Příloha 3. *Chroococcidiopsis cubana*



Příloha 4. Rod *Geminocystis*



Příloha 5. Rod *Gloeocapsa*



Příloha 6. Rod *Merismopedia*