

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Studium povrchových proteinů spermií se *zona pellucida*
vázající aktivitou**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Eliška Kaufmanová

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Studium povrchových proteinů spermií se *zona pellucida* vázající aktivitou" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za pomoc při práci v laboratoři, za vstřícnost, trpělivost, a především za konstruktivní kritiku, bez které by tato práce nemohla vzniknout. Velké poděkování patří také mé rodině a blízkým za podporu při studiu.

Studium povrchových proteinů spermií se *zona pellucida* vzájemnou aktivitou

Souhrn

Primární a sekundární vazba spermií na *zona pellucida* (ZP) oocyty jsou nezbytnými kroky k úspěšnému oplození, a proto je studium a identifikace receptorů, které se interakce gamet účastní, předmětem neustálého zkoumání. Na kančích spermiích bylo doposud popsáno a charakterizováno několik receptorových proteinových molekul s vazebnou aktivitou k ZP. Předkládané diplomová práce vychází ze studie, ve které byl připraven panel monoklonálních protilátek proti povrchovým proteinům kančí spermií se schopností interakce s glykoproteiny prasečí ZP.

Zabývali jsme se lokalizací a detekcí proteinů značených monoklonálními protilátkami 1E3 a 2E1 s cílem určit jejich možný původ v souvislosti s jejich případnou funkcí ve spermiích. K detekci proteinů rozpoznávaných protilátkami 1E3 a 2E1 ve spermiích v různých fázích jejich funkčního vývoje, v tkáních a tekutinách reprodukčního traktu bylo využito imunodetekce a nepřímé fluorescenční mikroskopie za účelem jejich lokalizace.

Protein značený pomocí 1E3 byl detekován v extraktu z ejakulovaných a kapacitovaných spermií, ze spermií s indukovanou akrosomální reakcí a v extraktu tkání varlete a nadvarlete jako protein o molekulové hmotnosti 45 kDa. Dále byla jeho detekce úspěšná i v epididymální tekutině (57 kDa) a semenné plasmě (59 kDa). Bylo zjištěno, že tento protein je lokalizován v akrosomální oblasti hlavičky. V případě ejakulovaných a kapacitovaných spermií byl navíc zaznamenán silnější signál protilátky v apikální oblasti. Výsledky také ukázaly fluorescenční signál v akrosomální oblasti po akrosomální reakci.

Detekce proteinu značeného protilátkou 2E1 byla provedena v extraktu proteinů z ejakulovaných spermií, kde byl přítomen v několika formách (54, 220, >300 a >500 kDa). Lokalizován byl v akrosomové oblasti u ejakulovaných a kapacitovaných spermií. Po akrosomální reakci nebyl protein detekován.

Klíčová slova: povrchové proteiny, protilátka, Western blot, imunofluorescence

Study of sperm surface proteins with *zona pellucida* binding activity

Summary

Primary and secondary binding of sperm to oocyte *zona pellucida* (ZP) are the fundamental steps to successful fertilization and therefore the studying and identification of receptors, which are involved in the gamete interaction, is the subject of continuous research. So far several receptor molecules with ZP-binding activity have been described and characterised on boar sperm. The submitted diploma thesis is based on a study where a panel of monoclonal antibodies against proteins from the sperm surface capable of interaction with boar ZP glycoproteins was prepared.

We searched out the localization and detection of proteins recognised by monoclonal 1E3 and 2E1 antibodies to determine their origin with their possible function in sperm. Immunodetection was used for the detection of those proteins in sperm in different phases of their functional development, in tissue and fluids of reproductive tract and an indirect immunofluorescent technique was used for their localization.

Protein recognised by 1E3 antibody was detected in the protein extract from ejaculated, capacitated sperm, sperm after induced acrosomal reaction and from tissue extract as protein with approximate molecular weight of 45 kDa. Its detection was successful also in epididymal fluid (57 kDa) and seminal plasma (59 kDa). It was found out that this protein is localised in the acrosome region of the sperm head. In the case of ejaculated and capacitated sperm the signal was also present in the apical region. Our results also showed fluorescent signal in the acrosome region after acrosomal reaction.

Protein recognised by 2E1 antibody was detected in the protein extract from ejaculated sperm and was present in a few forms (54, 220, >300 and >500 kDa). It was localised in the acrosomal region of ejaculated and capacitated sperm. It was not detected after acrosomal reaction.

Keywords: surface proteins, antibody, Western blot, immunofluorescence

Obsah

1	Úvod	1
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Morfologie spermie	3
3.2	Post-testikulární maturace spermií	4
3.2.1	Kapacitace spermií	4
3.3	Oplození	5
3.3.1	Primární vazba	5
3.3.2	Sekundární vazba a akrosomální reakce.....	6
3.4	Zona pellucida	7
3.5	Proteom	8
3.5.1	Proteiny se ZP-vázající aktivitou	9
3.5.2	Receptory pro primární a sekundární vazbu spermií na ZP u prasat	10
3.6	Studium proteinů spermie	12
3.6.1	Charakterizace protilátek rozpoznávající povrchové proteiny spermií	13
4	Metodika	14
4.1	Příprava spermií	14
4.1.1	Ejakulované spermie	14
4.1.2	Kapacitované spermie	14
4.1.3	Indukce akrosomové reakce	15
4.1.4	Izolace spermií z epididymu.....	15
4.2	Příprava proteinových extraktů	16
4.2.1	Extrakce proteinů spermií.....	16
4.2.2	Izolace povrchových proteinů spermie.....	16
4.2.3	Proteinové extrakty tkání	17
4.2.4	Izolace proteinů ze semenné plazmy a epididymální tekutiny	17
4.2.5	Imunoprecipitace	17
4.3	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)	18
4.4	Western blot	19
4.5	Imunodetekce proteinů na membráně	19
4.6	Nepřímá fluorescenční mikroskopie	19
5	Výsledky	22
5.1	Detekce proteinu značeného protilátkou 1E3 v extraktech spermií	22
5.2	Detekce proteinu značeného protilátkou 1E3 v extraktech tkání, epididymální tekutiny a semenné plazmy	23

5.3	Imunoprecipitace a detekce proteinu rozpoznávaného protilátkou 1E3 v extraktu z povrchových proteinů spermie.....	24
5.4	Lokalizace proteinu značeného protilátkou 1E3 ve spermích.....	25
5.5	Lokalizace proteinu značeného protilátkou 1E3 ve tkáních varlete a nadvarlete	33
5.6	Detekce proteinu značeného protilátkou 2E1 v extraktu ejakulovaných spermíí	34
5.7	Lokalizace proteinu značeného protilátkou 2E1 ve spermích	35
6	Diskuze.....	39
7	Závěr	44
8	Literatura.....	45

1 Úvod

Mnoho molekulárních mechanismů, které jsou nezbytné pro proces oplození, zůstává neobjasněných. Jedná se především o ty mechanismy, které jsou zapojené do interakce mezi spermii a oocytem (Mao & Yang 2013). Předtím, než je spermie připravená na rozpoznání a vazbu na oocyt, musí být plně maturovaná a projít změnami ve složení své plazmatické membrány. Teprve pak je spermie schopná se navázat na ZP, projít akrosomovou reakcí a zfúzovat se samicí gametou. Ve vazbě na ZP hrají svoji nezastupitelnou roli receptorové molekuly na spermiu, které se komplementárně váží na glykoproteiny ZP (Redgrove *et al.* 2012).

Na kančích spermii bylo doposud popsáno a charakterizováno několik takových receptorových molekul. Jedná se například o zonadnesin, lactadherin, proacrosin/acrosin a spermadheziny (Tumova *et al.* 2021). Jejich studium ale zdaleka není u konce a v současnosti probíhá objevování nových potenciálních receptorů. Zigo *et al.* (2015) využili k identifikaci receptorů panel monoklonálních protilátek. Mezi nimi byly i dvě protilátky 1E3 a 2E1, vážící se k dosud neidentifikovaným proteinům s možnou ZP vážící aktivitou.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Práce se opírala o hypotézu, že se proteiny značené protilátkami 1E3 a 2E1 nachází na povrchu hlavičky spermie, což by naznačovalo, že se účastní vazby spermie na ZP.

Tato diplomová práce si kladla tři cíle:

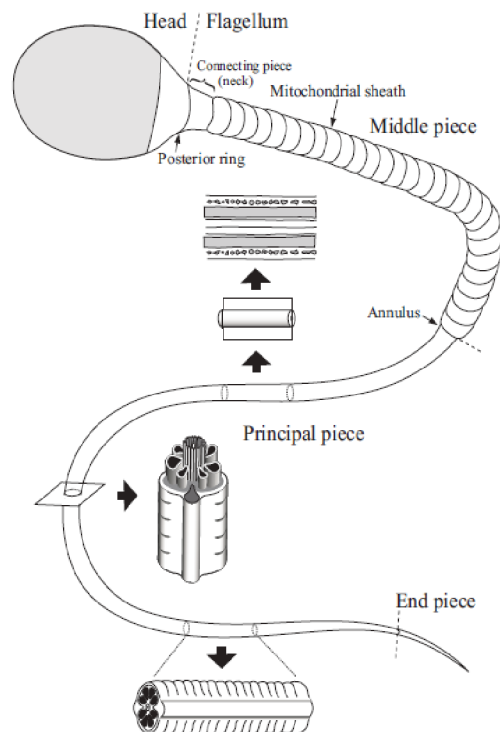
1. Detekce proteinu značeného protilátkou 1E3 v extraktech spermií, tkání, semenné plasmy a epididymální tekutiny
2. Lokalizace proteinu značeného protilátkou 1E3 pomocí nepřímé fluorescenční mikroskopie
3. Detekce proteinu značeného protilátkou 2E1 v extraktu spermií a jeho lokalizace pomocí nepřímé fluorescenční mikroskopie

3 Literární rešerše

3.1 Morfologie spermie

Spermie jsou konečně diferencované buňky vznikající během spermatogeneze. Jedná se o obzvláště komplexní proces, ke kterému dochází v semenotvorných kanálcích varlete (Reid *et al.* 2010). Spermaticy podstoupí morfologickou transformaci z buněk kulatého tvaru na prodlouženou buňku opatřenou bičíkem (Reid *et al.* 2010). Dojde k vytvoření akrosomu, kondenzaci jádra a odvržení části cytoplazmy. Spermie mají tedy malé množství cytoplazmy a jsou ochuzeny o většinu organel typických pro somatické buňky (Toshimori & Eddy 2015).

Hlavními částmi spermie jsou hlavička a bičík spojené pomocí krčku (viz obrázek 1). Ve velikosti a tvaru hlavičky a v délce bičíku nacházíme druhové rozdíly. V hlavičce se nachází jádro anteriorně ohraničené akrosomem a malé množství cytoplazmy, ve které jsou organizovány cytoskeletální struktury. Jádro obsahuje vysoce kondenzovaný chromatin. Akrosom je váček vzniklý přeměnou Golgiho aparátu a obsahuje specifické enzymy a molekuly nezbytné pro penetraci vajíčka. Bičík se rozděluje na střední, hlavní a koncovou část. Je tvořen centrálním komplexem mikrotubulů tvořících axonemu, a ty jsou poté ohraničeny vnějšími hustými vlákny. Součástí střední části je navíc i hustá šroubovice mitochondrií, která slouží jako zdroj energie a generuje motilitu nutnou k tomu, aby se spermie dostala k oocytu (Toshimori & Eddy 2015).



Obrázek 1: Struktura spermie (Toshimori & Eddy 2015)

3.2 Post-testikulární maturace spermií

Architektura povrchu se během života spermií mění, neboť procházejí během průchodu samčími a samičími pohlavními cestami řadou strukturálních a biochemických změn (Petrunkina *et al.* 2003). Tato dramatická metamorfóza je zásadně důležitá, protože spermie uvolněné z testis jsou nevyzrálé a transkripčně i translačně umlčené. Maturací získávají fertilizační schopnost a pohyblivost (Toshimori & Eddy, 2015).

K prvním změnám dochází během průchodu skrz epididymis. Epididymis je párový orgán, který se anatomicky rozlišuje do tří částí: *caput* (hlava), která navazuje na varle, *corpus* (tělo) a *cauda* (ocas) ústící do *vas deferens* (Reid *et al.* 2010). Tyto změny se nazývají epididymální maturace spermií a jsou charakterizovány remodelací povrchu spermie. Dochází ke změnám v obsahu exogenních lipidů a proteinů a dalších integrálních komponent plazmatické membrány (Cooper 1992; Petrunkina *et al.* 2003), a to jako odpověď na změnu složení tekutiny epididymu (Gatti *et al.* 1999).

Při ejakulaci se spermie dostávají do kontaktu se semennou plazmou, která je tvořena sekrety přídatných pohlavních žláz (prostata, semenné vajíčky, bulbouretrální žlázy), sekretem chámovodu a epididymu. Kromě ovlivnění fyziologie spermie, poskytuje také vhodné prostředí k přežití a k průchodu samčím i samičím reprodukčním traktem (Druart *et al.* 2013). Semenná plazma obsahuje významnou proteinovou složku. Druart *et al.* (2013) zjistili celkem 302 proteinů u vybraných savčích druhů (skot, kuň, ovce, prase, koza, velbloud a alpaka), z nichž pouze 3 proteiny se vyskytovaly u všech jmenovaných druhů. To poukazuje na skutečnost, že v reprodukci existuje mezi zvířaty velká variabilita. Důležité je zmínit, že o některé proteiny semenné plazmy se povrch spermie během ejakulace obohatí (Töpfer-Peterson *et al.* 1990; Petrunkina *et al.* 2003). Funkcí těchto povrchových proteinů je chránit membránu od rychlé destabilizace, která iniciuje řadu funkčních změn vedoucích ke kapacitaci (Petrunkina *et al.* 2003). Mnoho z nich také remodeluje proteinové domény membrány spermie, a tím ovlivňuje funkčnost spermií (Pérez-Patino *et al.* 2019).

3.2.1 Kapacitace spermií

Kapacitace je charakterizována jako proces kaskády biochemických a biofyzikálních změn (Nixon *et al.* 2009), během něhož získává spermie oplozovací schopnost (Chang 1984; Khalil *et al.* 2006; Tanphaichitr *et al.* 2015). Tyto změny zahrnují odstranění proteinů semenné plazmy a dekapacitačních faktorů, reorganizaci plazmatické membrány a aktivaci vnitrobuněčných kaskád (Florman & Fissore, 2015).

Jednou z prvních událostí, která nastává během kapacitace, je uvolnění proteinového obalu pocházejícího z epididymální tekutiny a semenné plazmy z povrchu spermie, neboť dokáže inhibovat vazbu na zonu pellucidu (ZP) (Shur & Hall 1982). Dále je navozeno zvýšení fluidity membrány pomocí zvyšující se koncentrace vnitrobuněčného HCO_3^- , efluxu cholesterolu a aktivace druhých posílů, včetně adenylátcyklasy a zvýšení koncentrace vnitrobuněčného Ca^{2+} (Gadella *et al.* 2008). Toto zvýšení fluidity membrány připravuje kapacitovanou spermii na události fúze membrán, které jsou nezbytné pro oplození (Tanphaichitr *et al.* 2015).

Vtok hydrogenuhličitanu je umožněn $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ iontovou pumpou (Demarco *et al.* 2003) a jeho hladina je nízká v nadvarleti a vysoká v semenné plazmě a ve vejcovodu. Je to tak proto, aby došlo k potlačení kapacitace již v nadvarleti (Naz & Rajesh 2004). Aktivace adenylátcyklasy a produkce cAMP vede k odčerpání cholesterolu z plazmatické membrány skrz akceptor cholesterolu, kterým je například albumin (Leemans *et al.* 2019). Po tomto procesu následují funkční změny membrány, kdy se lipidové mikrodomény začínají shromažďovat na apikálním hřebenu hlavičky spermie (van Gestel *et al.* 2005). Navíc signální kaskáda zahrnující aktivaci adenylátcyklasy a následná produkce cAMP vede ke stimulaci proteinkinasy A (PKA), která je zodpovědná za fosforylaci tyrosinových zbytků proteinů (Visconti *et al.* 1999b, Osheroff *et al.* 1999). Právě tato cAMP-dependentní proteinová tyrosinová fosforylace je spojována s hyperaktivací motility (Leemans *et al.* 2019).

Bičik spermie, u které došlo k hyperaktivaci motility, sebou mrská v hlubokých ohybech a její pohyb je tak méně symetrický (Leemans *et al.* 2019). Díky tomu se může spermie odtrhnout od epiteliálních buněk vejcovodu, opustit ovidukální rezervoár (Suarez 1998), pohybovat se skrz viskózní lumen vejcovodu (Suarez & Dai 1992) a proniknout skrz matrix kumulárních buněk a ZP zralého oocyty (Stauss *et al.* 1995).

Během kapacitace dochází k přemísťování a selektivní agregaci proteinů plazmatické membrány, které jsou důležité pro rozpoznání spermie a ZP (Reid *et al.* 2010). Některé z nich se také účastní primární vazby a připravují tak spermii k akrosomové reakci (Wassarman 2009; Tanphaichitr *et al.* 2015). To by vysvětlovalo, proč se nekapacitovaná savčí spermie není schopná navázat na ZP (Wassarman 2009).

3.3 Oplození

Vzájemná interakce gamet vedoucí k oplození je několikastupňový proces (Tumova *et al.* 2021). Prvním krokem je proniknutí skrz kumulární buňky obklopující ovulované vajíčko (Florman & Fissore 2015). Dále musí dojít k navázání spermie na ZP savčích oocytů skrze specifické receptory (Larson & Miller 1997). Tato vazba začíná primární vazbou spermie (Tanphaichitr *et al.* 2007) a pokračuje sekundární vazbou a ztrátou akrosomu během jejího průchodu ZP (Baibakov *et al.* 2007; Zigo *et al.* 2015). Jakmile se spermie dostane do perivitellinního prostoru, začíná fúze s vajíčkem skrz membránu na posteriorním ekvatoriálním segmentu (Baibakov *et al.* 2007). Následuje aktivace vápníkové signální dráhy, která nastartuje exocytózu kortikálních granulí (Sun 2003). Po vylití jejich obsahu dojde k neprostupnosti ZP, a tím k bloku polyspermie (Florman & Fissore 2015).

Můžeme pozorovat rozdíly mezi ZP a spermii v počtu molekul účastnících se primární vazby, kdy na jedné straně se na této vazbě podílí pouze několik sulfoglykoproteinů ZP, na straně druhé velké množství povrchových molekul spermie má afinitu k ZP (Tanphaichitr *et al.* 2007).

3.3.1 Primární vazba

Důkazy naznačují, že se při této vazbě receptoru a ligandu nejedná o jednoduchý princip zámku a klíče, ale naopak, že se této interakce účastní několik receptorových molekul (Reid *et al.* 2010). Molekuly spermie, které se účastní primární vazby, musí být lokalizovány

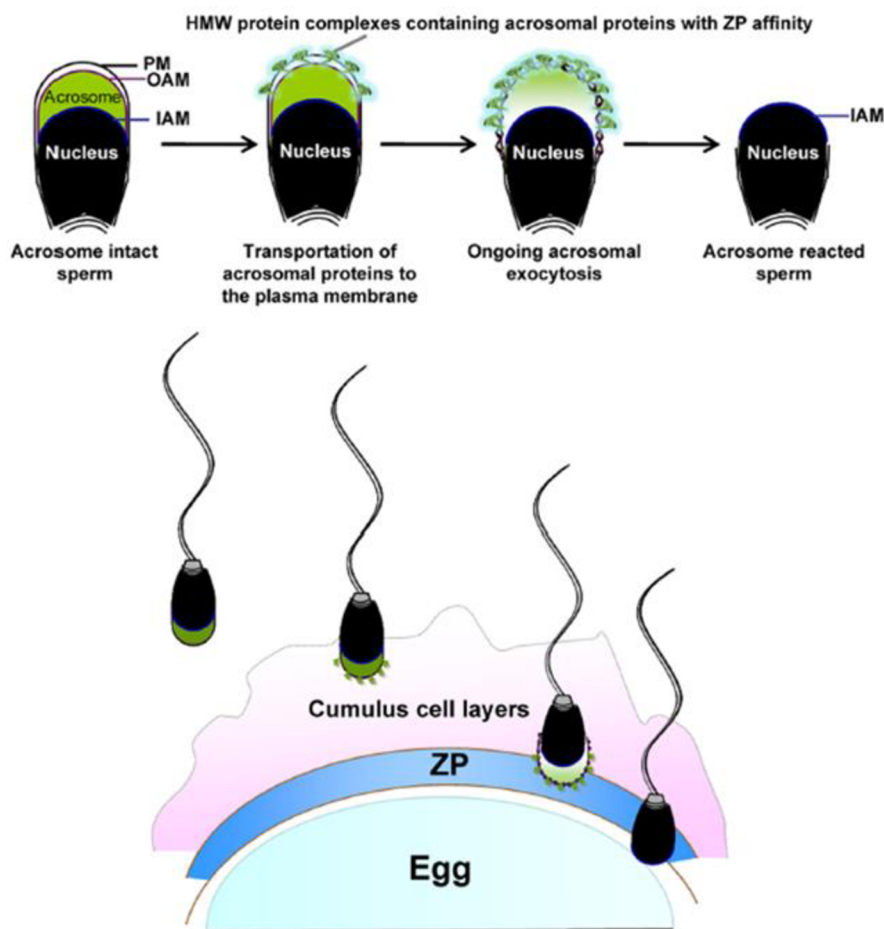
v akrosomální oblasti na povrchu hlavičky (Tanphaichitr *et al.* 2007; van Gestel *et al.* 2007; Zigo *et al.* 2015). Mnoho z nich je syntetizováno ve spermatogenních buňkách, jako např. galaktosyltransferasa (GALT), manosidasa, basigin, P26h a sulfogalaktosylglycerolipid (SGG), a jiné pocházejí ze semenné plazmy. Poté se zabudovávají do apikální oblasti anteriorní části akrosomu na hlavičce spermie (Tanphaichitr *et al.* 2007). Některé povrchové molekuly, které se účastní primární vazby na ZP, jsou druhově nebo rodově specifické, aby se zajistilo, že se spermie nenaváže k vajíčku z jiného druhu (Tanphaichitr *et al.* 2007).

3.3.2 Sekundární vazba a akrosomální reakce

K tomu, aby mohla proběhnout sekundární vazba, je nutné, aby spermie prošla akrosomální reakcí, která je nastartována kapacitačními podmínkami a zrychluje se po kontaktu gamet (Kim & Gerton 2003). To naznačuje, že i když ZP tuto reakci ovlivňuje, není jejím jediným stimulem (Tumova *et al.* 2021). Jedná se o nevratný proces zásadně ovlivněný influxem Ca^{2+} , při kterém dochází k fúzi mezi plazmatickou membránou a vnější akrosomální membránou spermie (Tsai *et al.* 2010). Výsledkem je vznik váčků obsahujících látky z obou těchto membrán. Silný účinek hydrolytických akrosomálních enzymů v místě vazby spolu s mrskavým pohybem hyperaktivované spermie umožní proniknutí skrz glykoproteinový obal oocyty (Leemans *et al.* 2019).

Díky akrosomové reakci se zpřístupní vnitřní akrosomální membrána, která nese proteinové receptory pro sekundární vazbu spermie se ZP. Proteiny sekundární vazby se ale také mohou vyskytovat na vnější akrosomální membráně nebo jako součást akrosomové matrix. Tyto molekuly jsou také syntetizovány ve spermatogenních buňkách a kromě PH-20 jsou přímo cíleny do akrosomu (Tanphaichitr *et al.* 2007). Roli v sekundární vazbě by mohli hrát proteiny proacrosin, zonadhesin a ACRBP (van Gestel *et al.* 2007).

Když v reakci na připojení spermie na povrch ZP nastane akrosomová reakce, adheze musí být zachována, i když jsou membrány a obsah akrosomu, dříve pokrývající většinu hlavičky spermie, odloučeny z buňky. Bez této adhezivní vlastnosti akrosomální matrix by se mohla spermie, procházející akrosomovou reakcí, odtrhnout od povrchu ZP a nemohlo by tak dojít k oplození. Jakmile začíná hlavička spermie penetrovat do ZP, adheze zbytku akrosomální čepičky není nadále pro úspěšnou fertilizaci potřeba (Bi *et al.* 2003).



Obrázek 2: Navrhnutý model zapojení akrosomálních proteinů do interakce mezi spermií a vajíčkem (Kongmanas *et al.* 2015)

3.4 Zona pellucida

ZP je specializovaný pórovitý extracelulární matrix plnící celou řadu funkcí (Redgrove *et al.* 2012; Albertini 2015). Hlavní rolí je vytváření ochranného pláště okolo vajíčka ve folikulu a následně po jeho uvolnění během ovulace (Albertini 2015). Představuje hlavní bariéru mezi spermií a plazmatickou membránou vajíčka (Bianchi & Wright 2020). Přestože jsou v ní uzavřena všechna savčí vajíčka, její tloušťka a obsah proteinů se liší napříč různými druhy (Redgrove *et al.* 2012). U savců je složena ze tří až čtyř glykoproteinů, nejčastěji označovaných jako ZP1-ZP4. Tyto glykoproteiny jsou produkty tří genů ZPA, ZPB a ZPC (Harris *et al.* 1994). Prasečí ZP je tvořena třemi glykoproteiny ZP2-ZP4 o molekulových hmotnostech 90 kDa (ZP2) a 55 kDa (ZP3 a ZP4) (Hedrick & Wardrip 1987). ZP1 je u prasete pseudogen, a proto není exprimován (Goudet *et al.* 2008).

Trojrozměrná struktura ZP pravděpodobně hraje důležitou roli v utváření místa vazby. (Baibakov *et al.* 2007). Vazba spermie na ZP je vysoce selektivní a pečlivě regulovaný proces, který slouží jako mezidruhová bariéra fertilizace díky zabránění adheze nehomologních spermií k vajíčku (Hardy & Gerbers 1994). Dalším z faktorů, který zajišťuje druhově-specifickou vazbu spermie, je rozdílná glykosylace ZP (Töpfer-Petersen 1999). Když

jsou proteiny přesouvány skrz buňku, dochází k jejich posttranslační modifikaci, především glykosylaci serinových/threoninových (O-glykosylace) a asparaginových (N-glykosylace) zbytků (Nagdas *et al.* 1994; Yonezawa 2014). Výsledný vedlejší sacharidový řetězec tvoří přibližně polovinu hmotnosti každého glykoproteinu (Nagdas *et al.* 1994).

3.5 Proteom

Znalost proteomu maturované spermie je základem pro pochopení funkcí spermie a mechanismu oplození (Nowicka-Bauer & Kurpisz 2013). Tato buňka má širokou škálu rozličných proteinů, které jsou ve shodě s její vysoce specializovanou biologickou funkcí (Holland & Ohlendieck, 2014). Tyto proteiny mohou být specificky lokalizovány v akrosomu, na hlavičce nebo na bičíku spermie, jiné ve více oblastech najednou (Baker 2013). Pro bičík je typický nadbytek metabolických enzymů, naopak v hlavičce jsou bohatě zastoupeny proteasomové podjednotky, které pravděpodobně rozeznávají ubiquitinované glykoproteiny ZP (Baker 2013). Proteomické profilování tedy vylepšilo naše znalosti různých domén spermií (Holland & Ohlendieck 2014). Zajímavostí je, že prasečí spermie, které jsou součástí přesně definovaných frakcí ejakulátu, se liší v jejich funkčnosti, což by mohlo souviset s různým složením proteinů spermie (Pérez-Patino *et al.* 2019).

Určit celkové množství proteinů, které spermatická buňka obsahuje, není jednoduchý úkol, protože konečné číslo se může lišit podle toho, jaká metoda byla použita. Například pomocí separace proteinů kapalinovou chromatografií spřaženou s tandemovou hmotnostní spektrometrií (iTRAQ-based LC-MS/MS) byl u prasečí spermie zjištěn celkový počet 1723 proteinů (1602 z nich bylo úspěšně kvantifikováno) (Pérez-Patino *et al.* 2019). Feugang *et al.* (2018) identifikovali pomocí hmotnostní spektrometrie s využitím „shotgun“ technologie až 2728 proteinů prasečích spermií.

Není překvapivé, že jedny z nejvíce hojných skupin identifikovaných proteinů jsou molekuly tvořící cytoskeleton spermie, včetně bičíku (Nowicka-Bauer & Kurpisz 2013). Bičík obsahuje několik typů proteinů pro generaci a regulaci motility (Inaba 2011). Typickými proteiny axonemy jsou tubulin, tvořící strukturu mikrotubulů 9 + 2, dynein a aktin (Inaba 2003). Axonema je obklopená přídatnými cytoskeletálními strukturami jako jsou jemná vlákna tvořící pochvu (fibrous sheath, FS) a vnější hustá vlákna (outer dense fibers, ODF) (Inaba 2011). ODF obsahuje tři hlavní proteiny, a to „leucin zipper protein“ ODF1 (Morales *et al.* 1994), „ODF-interacting leucine zipper protein“ ODF2 (Brohmann *et al.* 1997) a protein ODF3 (Egydio de Carvalho *et al.* 2002). FS slouží jako lešení pro enzymy glykolýzy a komponenty signálních kaskád (Eddy *et al.* 2003). Mezi glykolytické enzymy asociované s FS patří například glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (Westhoff & Kamp 1997), hexokináza I (Mori *et al.* 1998) nebo adeninnukleotidtranslokáza 4 (Kim *et al.* 2007). Signální proteiny identifikovanými ve FS jsou například ropporin (Fujita *et al.* 2000) nebo AKAP4, který ukotvuje další protein AKAP3 (Brown *et al.* 2003). AKAP3 je syntetizován v kulatých spermatidách a je zapojen do organizace základní struktury FS. Oproti tomu AKAP4 je syntetizován v pozdějším vývoji spermatid a jeho zabudování do FS je důležitým krokem při dokončení tvorby FS (Brown *et al.* 2003). Tyto AKAP proteiny ukotvují protein kinasu A

závislou na cAMP, která je zapojená do tyrosinové fosforylace proteinů v bičíku, čímž ovlivňuje motilitu spermií (Inaba 2003).

Proteiny akrosomu jsou buď enzymové, nebo neenzymové povahy a mohou být zabudovány do vnitřní a vnější akrosomální membrány nebo mohou být součástí akrosomální matrix. Mezi proteiny enzymové se řadí acrosin, hyaluronidasy SPAM1/PH-20 (sperm adhesion molecule 1) a Hyal5 (hyaluronoglucosaminidasa 5), β -galactosidasa, arylsulfatasa, fosfolipasa C a další. ZPBP (Zona pellucida binding protein/Sp38/IAM38), ZAN (zonadhesin) a Izumo1 jsou zástupci proteinů neenzymových (Toshimory & Eddy 2015).

Nejhojnějšími proteiny jádra spermie jsou protaminy. Jedná se o malé, pozitivně nabitě proteiny s mnoha disulfidickými můstky, které hrají roli ve stabilizaci chromatinu (Nowicka-Bauer & Karpicz 2013). Jsou nezbytné pro kondenzaci chromatinu a pro ochranu samčího genomu (Lewis *et al.* 2003). Rozlišujeme dva typy. Protamin P1, který je syntetizován jako zralý protein a protamin P2 jako prekurzor (Gusse *et al.* 1986). Zatímco P1 je typický pro všechny savce, P2 se nachází ve spermiích myši, křečka, hřebce, některých primátů a člověka (Steger 1999). U prasat je jeho absence vysvětlována mutací v P2 genu (Maier *et al.* 1990).

Povrch spermie obsahuje množství proteinů s rozdílnými funkcemi, které hrají významnou roli v procesu oplození (Zigo *et al.* 2013). U několika těchto proteinů bylo dokázáno, že disponují afinitou k ZP (Ikawa *et al.* 2010, Kongmanas *et al.* 2015). Těmto proteinům budou věnovány následující kapitoly.

3.5.1 Proteiny se ZP-vázající aktivitou

Všechno nasvědčuje tomu, že ZP-vázající proteiny jsou nejbohatší skupinou proteinů spermie (Kongmanas *et al.* 2015), ale představují minoritní část celkových buněčných extraktů (Zigo *et al.* 2013). Otázkou však zůstává, jaký je pro tolik různých proteinů důvod, a které z nich jsou nezbytné pro interakci mezi spermií a ZP. Protože oplození je proces nezbytný pro zachování druhu, je důležité zajistit, aby proběhl správně. Právě větší množství různých proteinů může zajistit jejich vzájemné zastoupení. Dokonce v případě chybějící jedné specifické molekuly nedojde k narušení procesu vazby spermie, a to i přes skutečnost, že mohou pracovat v synergickém nebo následném vztahu (Tanphaichitr *et al.* 2007; Redgrove *et al.* 2012; Tanphaichitr *et al.* 2015). To by naznačovalo, že jsou tyto molekuly ve svojí těsné blízkosti, přičemž tuto hypotézu potvrzuje jejich zvýšené množství v izolovaných lipidových raftech (Tanphaichitr *et al.* 2007).

Lipidové rafty jsou vysoce dynamické, submikroskopické domény, které jsou těsněji sbaleny než zbytek membrány a fungují jako místa buněčné adheze a signálních molekul (Rajendran & Simons 2005). Kromě funkčních ZP-vázajících proteinových komplexů obsahují také SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) proteiny (Tsai *et al.* 2010). Jedná se o rodinu proteinů, které hrají klíčovou roli při fúzi membrán a jsou tedy zapojeny do procesu akrosomové reakce (Santos *et al.* 2000). Vzhledem k tomu, že interakce spermie a vajíčka zahrnuje jak adhezi buněk, tak signální procesy, výzkumy se zaměřují právě na studium lipidových raftů (Tanphaichitr *et al.* 2015). Integrovanou součástí lipidových raftů je sulfogalaktosylglycerolipid (SGG, seminolipid), který nejenže hraje roli v jejich formaci, ale je jednou z dalších povrchových molekul spermie,

kteřá má afinitu k ZP a je zapojená do vazby spermie k ZP (Tanphaichitr *et al.* 2015). Dalšími molekulami, které se podílí na utváření míst pro vazbu spermie a ZP, jsou chaperony z rodiny proteinů teplotního šoku (Tanphaichitr *et al.* 2015). Jejich funkcí je transport ZP-vázajících proteinů do těchto mikrodomén (Redgrove *et al.* 2011).

To znamená, že nejen proteiny, ale i jiné povrchové molekuly mohou fungovat jako receptory pro primární vazbu (Tumova *et al.* 2021). Navíc část některých akrosomálních proteinů (Zan, ACRO, ACRBP) s afinitou k ZP, se během kapacitace může přemisťovat a prezentuje na povrchu spermie, a tak pravděpodobně přispívá ke schopnosti kapacitované spermie navázat se na ZP během počáteční fáze interakce gamet. To znamená, že schopnost těchto proteinů fungovat co nejvíce při vazbě na ZP musí být získána během jejich reorganizace a relokalizace během kapacitace. Ty stejné proteiny, které zůstávají v akrosomu, pak hrají roli v udržování adheze spermie s reagujícím akrosomem k ZP oocytu (Kongmanas *et al.* 2015). Některé proteiny s afinitou k ZP jsou společné pro více druhů (β -1,4-galaktosyltransferasa, proacrosin/acrosin, zonadhesin, arylsulfatasa A, lactadherin), jiné byly popsány jen u některých druhů (Tumova *et al.* 2021).

3.5.2 Receptory pro primární a sekundární vazbu spermií na ZP u prasat

Doteď bylo identifikováno několik ZP receptorů u prasat (Zigo *et al.* 2013). Jedním z nich je β -1,4-galaktosyltransferasa (GalT). Jedná se o transmembránový protein, lokalizovaný na anteriorní části hlavičky (Larson & Miller 1997). Patří do glykosyltransferázové enzymové skupiny, přenáší tedy glykosylový zbytek na koncový cukr v sacharidovém řetězci (Tumova *et al.* 2021). Váže se na terminální N-acetylglukosaminové (GlcNAc) zbytky oligosacharidů ZP3 (Shur & Hall 1982). Bylo ovšem zjištěno, že není pro vazbu na ZP nezbytná, neboť odstranění GlcNAc pomocí N-acetylglucosaminidasy zbytků z prasečí ZP, neovlivnilo schopnost spermie se na ZP navázat (Rebeiz & Miller 1999).

Zonadhesin (ZAN), transmembránový protein s krátkou intracelulární oblastí, je exprimován během spermatogeneze v časných spermatidách, následně je posttranslačně modifikován, čímž mění svou ZP-vázající aktivitu (Gao & Garbers 1997; Bi *et al.* 2003). Jedná se o multidoménový mosaikový protein. Toto uspořádání je typické pro adhezní molekuly (Gao & Garbers 1997). Jeho schopnost vázat se na ZP také podporuje to, že je lokalizován na apikální části hlavičky (Hickox *et al.* 2001).

Arylsulfatasa A (ARSA/AS-A) se od výše zmíněných liší tím, že neobsahuje transmembránovou doménu (Carmona *et al.* 2002). Nachází se jak na povrchu hlavičky spermie, tak v akrosomu. Akrosomální forma má původ ve varleti (Carmona *et al.* 2002; Weerachatanukul *et al.* 2003). Na povrch spermie se adsorbuje během jejího průchodu epididymem, a to díky afinitě k SGG, který se do plasmatické membrány spermii zabudovává už v testis (Carmona *et al.* 2002). ARSA a SGG mohou společně interagovat se ZP3 glykoproteinem přes vazbu na sulfatované cukerné zbytky glykanů ZP (Carmona *et al.* 2002; Weerachatanukul *et al.* 2003).

Proacrosin/acrosin je serinová proteináza s lektinovou aktivitou, která je schopná vázat fukosu (Töpfer-Petersen *et al.* 1985). Nejprve je syntetizován jako zymogen z proacrosinu a přeměněn na svoji aktivní formu během kapacitace (Baba *et al.* 1989). Původně byl popsán jako receptor zprostředkovávající sekundární vazbu, neboť je hojný

v akrosomální matrix, ale jeho přítomnost na povrchu akrosomu lidských a prasečích spermií naznačuje, že by se mohl také účastnit primární vazby (Kongmanas *et al.* 2015; Zigo *et al.* 2015). Navíc díky jeho proteolytické aktivitě je schopný aktivovat a urychlovat uvolnění akrosomálních komponent během akrosomové reakce (Mao & Yan 2013).

Na konverzi proacrosinu se podílí ACRBP (Baba *et al.* 1994), který je součástí fosfoproteinového komplexu p32. Role a regulace tohoto komplexu je prozatím neznámá (Kato *et al.* 2021). Bylo zjištěno, že u prasat je tento protein hlavním proteinem, který je během kapacitace fosforylován na tyrosinu (Dube *et al.* 2005). Tyrosinová fosforylace na proteinech na povrchu hlavičky spermií umožňuje proteinovou translokaci do míst vázající ZP (Asquith *et al.* 2004; Dube *et al.* 2005). Je spekulováno, že ACRBP a tyrosinová fosforylace může urychlovat navázání spermie ke specifickým strukturám ZP. ACRBP navíc umožňuje akrosomální reakci tím, že interaguje s Ca^{2+} iontovými kanály (Katu *et al.* 2021). Mimo jiné má také doménu pro sekundární vazbu na ZP (van Gestel *et al.* 2007).

Lactadherin (p47, SED1) je periferní membránový mozaikový protein, který je exprimován i v nereprodukčních orgánech v těle jako je například mléčná žláza nebo ledvina (Ensslin *et al.* 1998). Petrunkina *et al.* (2003) zjistili, že exprese a lokalizace lactadherinu se mění v průběhu post-testikulární maturace spermií a kapacitace. Imunocytochemicky bylo zjištěno, že se vyskytuje v apikální části hlavičky testikulární, epididymální a ejakulované spermie. Během kapacitace je poté odhalen díky uvolnění dekapacitačních faktorů a přemístěn z apikální oblasti akrosomu do celé akrosomální oblasti (Petrunkina *et al.* 2003).

Nicméně k nejdůležitějším ZP-vázajícím molekulám u prasete patří spermadheziny AQN a AWN (Zigo *et al.* 2013). Jedná se o glykoproteiny o nízké molekulové hmotnosti, které jsou sekretovány především semennými váčky a mají multifunkční vlastnosti (Dostalova *et al.* 1994). Jonakova *et al.* (2000) navrhli, že se tyto proteiny váží na povrch spermie spíše v komplexech nežli samostatně. Tito autoři vyzdvihli proteinový komplex, který zahrnuje pět spermadhezínů identifikovaných v semenné plazmě prasete (PSPI, PSPII, AWN, AQN1 a AQN3) společně s pB1/DQH proteinem patřící do BSP rodiny (Binder Sperm Protein). Když se tyto proteiny naváží na plazmatickou membránu, zapojují se do regulace důležitých atributů spermie, jako je motilita, schopnost kapacitace, AR a vazba na ZP. Ovšem pokud jsou exprimovány v nadměrném množství, mohou funkce spermie ovlivnit i negativně (Pérez-Patino *et al.* 2019). Většina spermadhezínů pokrývající povrch ejakulované spermie se uvolňuje během kapacitace, v případě AQN až 75 % a u AWN až 90 % (Dostalova *et al.* 1994). Je tedy možné, že mohou působit jako dekapacitační faktory (Zigo *et al.* 2019). Na jejich deagregaci a uvolnění z povrchu se podílí ubiquitin-proteazomální systém, který ovlivňuje remodelaci vnější akrosomální membrány (Zigo *et al.* 2019).

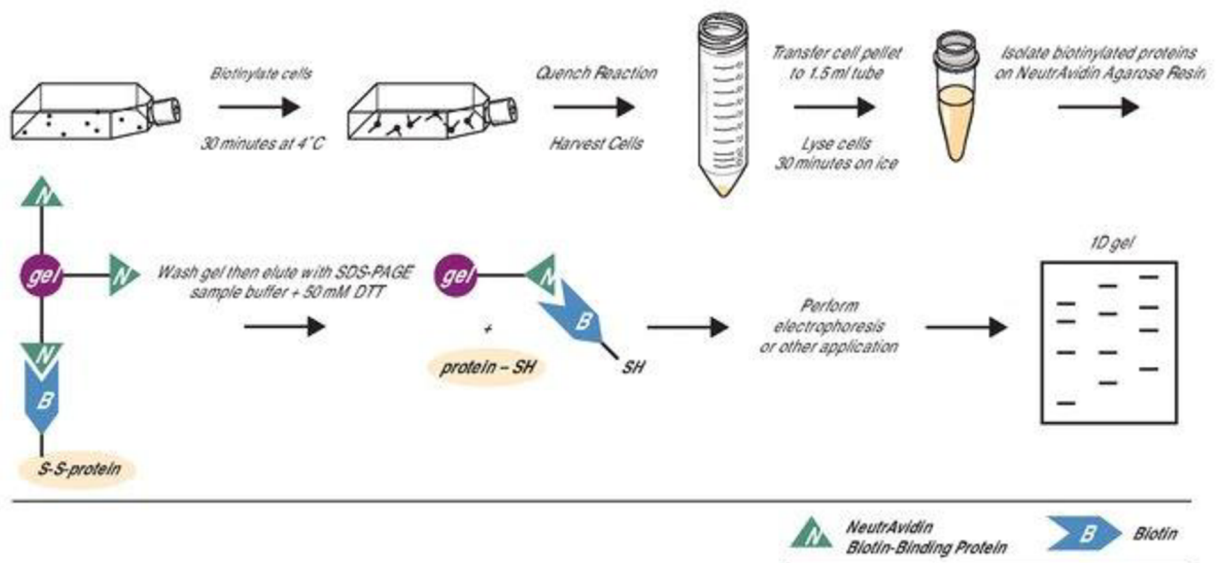
O DQH proteinu, homologu pB1, je toho známo více (Bezouška *et al.* 1999). I on je sekretovaný semennými váčky (Calvete *et al.* 1997). Po navázání se na povrch hraje důležitou roli ve schopnosti spermií navázat se na ZP (Maňásková-Postlerová *et al.* 2007). DQH vykazuje velmi podobné vazebné schopnosti, jako mají spermadheziny, a to i přesto, že jsou strukturálně odlišné (Maňásková-Postlerová *et al.* 2007). Kromě toho má DQH protein schopnost interagovat s epiteliálními buňkami oviduktu (Maňásková-Postlerová *et al.* 2007), což by mohlo poukazovat na to, že se může spolupodílet na tvorbě oviduktálního rezervoáru (Liberda *et al.* 2006).

Dalšími kandidáty na receptory primární vazby prasečích spermií na ZP jsou RAB-2A protein (Zigo *et al.* 2015), adhesion protein Z (APz) (Zayaz-Pérez *et al.* 2009), fertilin β /ADAM2, peroxiredoxin 5/PRDX5 a karbonylreduktáza/DCXR (van Gestel *et al.* 2007).

3.6 Studium proteinů spermie

Původně byla proteomika používána k identifikaci hlavního repertoáru proteinů zdravé spermie a na základě těchto znalostí byly prováděny různé komparativní studie ke zjištění změn v proteomu spermie během vývojových a patologických procesů. Velké množství proteomických studií lidských a zvířecích spermií vyústilo v katalogizaci většiny proteinů asociovaných se spermií a jejich plazmatickou membránou (Hooland & Ohlendieck 2014). Vzhledem k tomu, že mnoho proteinů hrajících klíčovou roli v procesu fertilizace je lokalizováno na povrchu spermie, bylo velké množství studií zaměřeno na identifikaci membránových integrálních proteinů (Nowicka-Bauer & Kurpisz 2013). V poslední době se pro to využívají vysokokapacitní proteomické přístupy, jako je například „shotgun“ metoda (Belleannee *et al.* 2011). Jedná se o hmotnostní spektrometrii (MS) spojenou s kapalinovou chromatografií, která je založená na identifikaci vzorku peptidovým sekvenováním a kvantifikací peptidů (Procházková 2019).

Alternativou se staly dvojdimenzionální elektroforéza a MS techniky, které ale dokáží identifikovat pouze ty nejhojněji se vyskytující proteiny v buňce (Belleannee *et al.* 2011). To znamená, že izolace membránových proteinů je problematickým krokem těchto přístupů (Nowicka-Bauer 2014), neboť představují jen malou část celkového proteomu (Belleannee *et al.* 2011). Klasické metody sloužící k purifikaci membrány, jako je narušení buňky nebo denzitní centrifugace, vedly k tomu, že část plazmatické membrány zůstala přichycená k cytoskeletonu, což vedlo ke ztrátě části membránových proteinů, například těch postakrosomálních, které jsou důležité v rozpoznání gamet (Belleannee *et al.* 2011). Tento nedostatek byl překonán díky značení povrchových proteinů sulfo-NHS-SS-biotinem, které jsou následně separovány pomocí elektroforézy a identifikovány díky MS (viz obrázek 3) (Zhao *et al.* 2004; Belleannee *et al.* 2011; Zigo *et al.* 2013). Nejčastěji se k extrakci membránových proteinů využívá detergentů, které vytváří kolem membránových proteinů hydrofilní obal, vytrhnou proteiny z membrány a rozpouští je (Orwick-Rydmark *et al.* 2016, Zigo *et al.* 2011). Mezi takové detergenty patří například Triton-X-100 nebo dodecylsírán sodný (SDS) (Zigo *et al.* 2011). Přesná lokalizace proteinů v buňce by měla být dále určena použitím dodatečných imunocytochemických studií, včetně elektronové mikroskopie (Nowicka-Bauer & Kurpisz 2013).



Obrázek 3: Schéma značení sulfo-NHS-SS-biotinem a extrakce povrchových proteinů spermie (Thermo Fischer Scientifici, USA)

3.6.1 Charakterizace protilátek rozpoznávající povrchové proteiny spermií

Zigo *et al.* (2015) prezentovali alternativní nástroj pro monitorování a identifikaci receptorů vázajících ZP, a to panel monoklonálních protilátek proti povrchovým proteinům spermie. Ty protilátky, které značily povrchové proteiny na hlavičce prasečí spermie v oblasti akrosomu a byly detekovány pomocí Western blot analýzy, byly dále studovány imunolokalizací v tkáních a tekutinách reprodukčního traktu. Zkoumala se také jejich vazba na izolované glykoproteiny ZP prasečího oocytu. Ze 17 připravených protilátek bylo 8 z nich lokalizováno v oblasti akrosomu spermie. Mezi tyto protilátky se řadí i protilátky 1E3 a 2E1, kterým je v této práci věnována pozornost. Pouze 3 protilátky rozpoznávaly proteiny, které se podařilo identifikovat pomocí MS, a korespondovaly s proteiny vázající ZP. Tyto protilátky byly použity pro imunoprecipitaci a následná analýza imunoprecipitátu odhalila, že tyto protilátky rozpoznávají acrosinový prekurzor, RAB-2A protein a lactadherin P47. Acrosin byl již dříve detekován na povrchu ejakulované i kapacitované spermie a jeho afinita je dobře popsána (Zigo *et al.* 2013). Také lactadherin P47 byl již dříve v souvislosti s vazbou k ZP charakterizován a jeho další možné fyziologické funkce v reprodukci byly navrhovány (Petrunkina *et al.* 2003). Nicméně poprvé byl v souvislosti s vazebnou aktivitou k ZP identifikován protein RAB-2A spolu s jeho lokalizací na povrchu prasečí spermie (Zigo *et al.* 2015).

4 Metodika

4.1 Příprava spermií

Kančí ejakulát byl získán z inseminační stanice Skršín (NATURAL, spol. s.r.o.) v podobě inseminačních dávek, případně čerstvého ejakulátu plemene Duroc. Čerstvý ejakulát byl okamžitě zpracován, inseminační dávky byly uchovávány v chladicím termoboxu při 17 °C a zpracovány druhý den po odběru. Epididymální spermie byly izolovány ze zmraženého epididymis odebraného *post mortem*.

4.1.1 Ejakulované spermie

Koncentrace spermií v inseminačních dávkách (ID) se pohybovala v rozmezí $5-8 \times 10^7$ buněk /ml. Bylo odebráno 5 ml ID do zkumavek, které byly stočeny v centrifuze (LC-8 5000, Benchmark Scientific Inc., USA) při 20 °C 10 minut při 300 x g. V případě čerstvého ejakulátu bylo napipetováno do zkumavky 1 ml vzorku a k němu bylo přidáno 5 ml PBS. Zkumavky byly také centrifugovány při 20 °C 10 minut při 300 x g. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a vzniklá peleta byla poté resuspendována v 5 ml promývacího roztoku PBS (Phosphate-buffered saline; 0,01 M fosfátový pufr, 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA). Tento postup byl zopakován ještě dvakrát. K peletě bylo opět přidáno 5 ml PBS, peleta byla resuspendována a takto vzniklý vzorek byl rozpipetován do mikrozkušavek po 1 ml. Tyto mikrozkušavky byly poté stočeny na centrifuze (Mikro 22R Hettich Zentrifugen, DJB Labcare, UK) 10 minut při 300 x g a 20 °C. Takto vzniklá peleta spermií byla použita pro přípravu proteinových extraktů na SDS elektroforézu a Western blot analýzu.

4.1.2 Kapacitované spermie

Postup pro přípravu kapacitovaných spermií vycházel z předchozí přípravy ejakulovaných spermií. Při posledním promytí bylo k peletě přidáno vytemperované kapacitační médium v základní formě (Basic TL-Hepes) a byla provedena centrifugace. Po odstranění supernatantu bylo k peletě spermií (5×10^8 buněk) přidáno 10 ml kapacitačního média Hepes a peleta byla jemně resuspendována. Takto připravená zkumavka byla vložena do termostatu a spermie byly ponechány kapacitovat při 38 °C a 5% CO₂ 1,5 hodiny, v případě čerstvého ejakulátu 3,5 hodiny.

Příprava Basic TL-Hepes:

- 6,6634 g NaCl
- 0,2386 g KCl
- 0,0408 g NaH₂PO₄
- 1,4 ml laktátu sodného
- 0,1018 g MgCl₂ x 6H₂O
- 2,383 g Hepes
- 0,0220 g pyruvátu sodného
- 2,186 g sorbitolu

- 0,025 g gentamicinu
- 0,065 g penicilinu
- 0,1 g PVA (Polyvinyl alkohol)
- 1 litr destilované vody

Příprava kapacitačního média Hepes:

- 50 ml basic TL-Hepes
- 0,099 g 11 mM glukózy
- 0,0275 g 5 mM pyruvátu sodného
- 1,00 g 2% BSA (bovinní sérový albumin),
- 0,0084 g NaHCO₃
- 0,0147 g 2 mM CaCl₂ x 2H₂O

Po kapacitaci byla suspenze stočena při 300 x g po dobu 10 minut a supernatant byl odsát. K peletě bylo přidáno 5 ml PBS a nechala se dvakrát promýt a odstředit. Po posledním přidání 5 ml PBS byl vzorek rozpipetován do mikrozkušavek po 1 ml a stočen na centrifuze při 300 x g 10 minut. Takto vzniklá peleta spermií byla následně použita pro přípravu proteinových extraktů na SDS elektroforézu a Western blot analýzu.

4.1.3 Indukce akrosomové reakce

K 10 ml suspenze spermií po ukončené kapacitaci bylo přidáno 10 µl (50 µl nebo 100 µl) calcium ionoforu (A23187; Sigma-Aldrich, USA). Následovala inkubace v termostatu při podmínkách 38,5 °C a 5% CO₂ po dobu 1 hodiny. Poté byl vzorek odstředěn v centrifuze při 300 x g a 20 °C po 10 minut. Supernatant byl odstraněn a bylo přidáno 5 ml PBS k peletě. Toto promývání bylo provedeno dvakrát. Nakonec bylo přidáno 5 ml PBS a suspenze byla rozpipetována do pěti mikrozkušavek po 1 ml. Tyto mikrozkušavky byly stočeny v centrifuze při 300 x g a 20 °C 10 minut a supernatant byl odpipetován. Takto vzniklé pelety spermií byly následně použity pro přípravu proteinových extraktů na SDS elektroforézu a Western blot analýzu.

4.1.4 Izolace spermií z epididymu

Pro izolaci prasečích epididymálních spermií byl použit rozmražený epididymis, který byl rozdělen na jednotlivé části (*cauda*, *corpus* a *caput*). Manuálně se obnažily kanálky obsahující spermie a poté byly tyto kanálky rozstříhány na malé kousky a vloženy do zkumavky s roztokem PBS. Zkumavky byly uloženy do termostatu a zde inkubovány 30 minut při 37 °C, aby došlo k vyplavení spermií do roztoku. Po inkubaci byl vzorek přefiltrován přes gázu, aby došlo k odstranění tkáňových buněk. Supernatant byl poté stočen při 300 x g 20 minut a 2 x promyt v roztoku PBS a centrifugován po dobu 10 minut při 300 x g.

4.2 Příprava proteinových extraktů

4.2.1 Extrakce proteinů spermií

Extrakce proteinů ze vzorků spermií byla provedena lyzací v neredukujícím vzorkovém pufru (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 – Bio-Rad, USA; glycerol; 2% SDS; 0,05% bromfenolová modř – Sigma-Aldrich, USA). K peletě spermií (5×10^7 buněk) bylo přidáno 150 μ l vzorkového pufru. Dále byly vzorky ponechány po dobu 30 minut na ledu za občasného promíchání na vortexu, aby se zaručila správná lýza buněk. Poté byly vzorky povařeny po dobu 5 minut při 100 °C. Následně proběhla centrifugace 2 minuty při 10 000 x g a 4 °C za účelem odstředění zbytků buněk. Takto vzniklý supernatant byl poté použit na SDS elektroforézu a Western blot analýzu.

4.2.2 Izolace povrchových proteinů spermie

Povrchové proteiny spermie byly izolovány z ejakulovaných spermií pomocí soupravy Pierce® Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Prvním krokem bylo rozpuštění obsahu jedné lahvičky Sulfo-NHS-SS-biotinu v 48ml PBS. K peletce spermií bylo následně přidáno 10 ml tohoto biotinylačního roztoku a vzorky byly inkubovány 30 minut v lednici při 4 °C. Zkumavky byly poté centrifugovány při 500 x g 3 minuty, supernatant byl odstraněn a ke každému vzorku bylo přidáno 10 ml TBS (Tris buffered saline; 25mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,8). Byla provedena centrifugace a dále se vzorky ještě jednou promyly a centrifugovaly. K peletkám bylo přidáno 250 μ l lyzačního pufru a takto byly inkubovány na ledu po dobu 30 minut. Během této inkubace byly vzorky promíchávány na vortexu. Dalším krokem byla centrifugace suspenze při 10000 x g a 4 °C 2 minuty a takto připravený buněčný lyzát byl nanesen na kolonku s imobilizovaným NeutrAvidinem na agarózových kuličkách. Tyto kolonky byly připraveny tím způsobem, že byly složeny a do vrchní části bylo přidáno 500 μ l avidinu imobilizovaného na gelových kuličkách. Následovala centrifugace při 1000 x g po dobu 1 minuty a dvojí promytí v 500 μ l promývacího pufru (Wash Buffer). Buněčný lyzát byl na kolonce inkubován 60 minut na rotační třepačce při pokojové teplotě. Poté byla provedena centrifugace při 1000 x g po dobu 1 minuty. Následně byly agarózové kuličky s navázanými povrchovými proteiny třikrát promyty v 500 μ l promývacího roztoku s přísadkou proteázových inhibitorů (Complete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Švýcarsko). Byl připraven vzorkový pufr s DTT (dithiotreitol). K obsahu lahvičky s DTT z kitu bylo přidáno 50 μ l destilované vody. 12 μ l tohoto roztoku bylo smícháno s 225 μ l vzorkového pufru pro SDS elektroforézu (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 – Bio-Rad, USA; glycerol; 2% SDS; 0,05% bromfenolová modř – Sigma-Aldrich, US). Ke každému vzorku bylo následně přidáno 240 μ l vzorkového pufru s DTT a takto byly vzorky inkubovány při pokojové teplotě 60 minut. Nakonec se kolonka centrifigovala 2 minuty při 1000 x g. Supernatant byl odpipetován a mohl být použit pro SDS elektroforézu a Western blot.

4.2.3 Proteinové extrakty tkání

K částem tkání varlat a nadvarlat o hmotnosti 100 mg bylo přidáno 500 μ l pufru 1% Tritonu X-100 v Tris-HCL (pH 7,8). Za použití homogenizátoru IKA T10 basic (IKA Werke, Německo) byla tkáň homogenizována a ukládána do ledu, aby došlo k lýze. Takto připravený vzorek byl stočen na centrifuze při 4 °C a 10 000 x g po dobu 10 minut. Ze získaného supernatantu bylo odebráno 100 μ l a bylo k němu přidáno 600 μ l vymraženého acetonu. Následně byl vzorek promíchán na vortexu a uložen do mrazáku, kde byl ponechán po dobu jedné hodiny při -20 °C. Poté byl stočen na centrifuze 5 minut při 5000 x g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a k peletě bylo přidáno 100-150 μ l neredukujícího vzorkového pufru. Pomocí pipety byl vzorek resuspendován a pak povařen po dobu 5 minut. Nakonec byl stočen na centrifuze 2 minuty při 10 000 x g a 4 °C. Supernatant byl napipetován do zkumavek eppendorf a připraven k dalšímu použití.

4.2.4 Izolace proteinů ze semenné plazmy a epididymální tekutiny

Vzorek kančího ejakulátu byl stočen na centrifuze po dobu 10 minut při 300 x g a 20 °C. Supernatant byl odsát a následně prošel dalšími dvěma centrifugacemi. První probíhala 10 minut při 4 °C a 2000 x g a druhá 10 minut při 4 °C a 10 000 x g. Tímto způsobem byly získány vzorky semenné plazmy. Epididymální tekutina se spermiemi byla zpracována za stejných podmínek jako ejakulát.

Ze vzorků semenné plazmy i epididymální tekutiny bylo odebráno 100 μ l a přidáno k nim 600 μ l vymraženého acetonu. Následně došlo k jejich promíchání na vortexu a uložení do -20 °C na 1 hodinu. Za účelem vytvoření peletek byly zkumavky následně centrifugovány 5 minut při 5 000 x g a 4 °C. K peletě s vysráženými proteiny bylo přidáno 100-150 μ l neredukujícího vzorkového pufru a poté byly vzorky resuspendovány a 5 minut povařeny. Nakonec byly zkumavky stočeny na centrifuze 2 minuty při 10 000 x g a 4 °C. Takto připravené vzorky mohly být použity pro SDS elektroforézu a Western blot analýzu.

4.2.5 Imunoprecipitace

Do pelety ejakulovaných spermií bylo přidáno 500 μ l lyzačního pufru s inhibitory proteáz. Následně byly spermie lyzovány 30 minut na ledu, přičemž byly každých 5 minut vortexovány. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 2 minut při 10 000 x g a 4 °C. Supernatant byl odsán a rozdělen do dvou mikrozkušavek po 100 μ l. K jednomu vzorku bylo přidáno 50 μ l protilátky 1E3 a nechal se inkubovat přes noc. Ke druhému vzorku protilátka přidána nebyla, a tak sloužil jako negativní kontrola. Následující den bylo nejprve 20 μ l agarózového konjugátu v PBS pufru dvakrát centrifugováno při 1000 x g a 4 °C po dobu 5 minut a supernatant byl odstraněn. Poté byly agarózové kuličky s konjugovaným proteinem A/G (Santa Cruz Biotechnology) dvakrát promyty v 50 μ l IP pufru (Santa Cruz Biotechnology) a centrifugovány. Poté byly k agarózovému konjugátu přidány vzorky s protilátkou a negativní kontrola, resuspendovány a inkubovány 1,5 hodiny. Imunoprecipitát byl poté centrifugován při 1000 x g a 4 °C 5 minut a supernatant byl odstraněn. Peletka byla následně čtyřikrát promyta ve 100 μ l IP pufru a pokaždé centrifugována. Po posledním

promytí byla peleta resuspendována ve 40 μ l neredukujícího vzorkového pufru. Takto připravený vzorek mohl být použit pro SDS elektroforézu a Western blot.

4.3 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Pro elektroforetické rozdělení proteinů byla použita aparatura pro vertikální elektroforézu (Mini-PROTEAN Tetra, Bio-Rad, USA). Nejprve byl připraven 10% separační gel, který se nalil mezi dvě skla. Následně byl převrstven vodou a ponechán se minimálně 30 minut polymerovat.

Příprava 10% separačního gelu:

- 4,16 ml destilované vody
- 2,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8; Bio-Rad, USA)
- 3,33 ml 30% roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (Bio-Rad, USA)
- 100 μ l 10% SDS (Bio-Rad, USA)

Těsně před aplikací:

- 4,5 μ l TEMEDu (Pharmacia Biotech, Švédsko)
- 70 μ l 10% APS (Amersham Biosciences, Švédsko)

Po proběhlé polymeraci byla odsáta voda a nanesena vrstva zaostřovacího gelu, do kterého byl zasunut hřeben pro tvorbu jamek. Gel byl takto ponechán 15 minut, aby došlo k polymeraci.

Příprava 4% zaostřovacího gelu:

- 1,52 ml destilované H₂O
- 0,625 ml Stacking gel buffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; Bio-Rad, USA)
- 0,325 ml 30% roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (Bio-Rad, USA)
- 0,025 ml 10% SDS (Bio-Rad, USA)

Těsně před aplikací:

- 3,8 μ l TEMEDu (Pharmacia Biotech, Švédsko)
- 50 μ l 10% APS (Amersham Biosciences, Švédsko)

Byla sestavena aparatura pro elektroforézu a následně byla vana a do ní vložené gely zality elektrodovým pufrem (Tris 15 g, glycin 72 g, SDS 5 g, dest. H₂O 1 l; ředěno 1:4 s dest. H₂O). Hřeben byl vyndán tak, aby se neporušily vytvořené jamky, do kterých byly poté napipetovány pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky vzorky v objemu 8 μ l, 10 μ l nebo 15 μ l (podle typu vzorku). K porovnání molekulární hmotnosti separovaných proteinů byly využity molekulární proteinové standardy (Precision Plus Protein™ WesternC™ Blotting Standards; Bio-Rad, USA) nanášené v objemu 3 μ l. Elektroforéza probíhala prvních 30 minut při napětí 80 V, během nichž naše vzorky prošly zaostřovacím gelem, a následně 1 hodinu při zvýšeném napětí 150 V. Vzorky pro elektroforézu byly připraveny pomocí redukujícího (3,8 ml H₂O, 1 ml 0,5M Tris-HCl pH 6,8, 0,8 ml glycerol, 1,6 ml 10%SDS, 0,4 ml 0,05% bromfenolová modř, 0,4 ml merkaptoethanol) nebo neredukujícího pufru (3,8 ml H₂O, 1 ml 0,5M Tris-HCl pH 6,8, 0,8 ml glycerol, 1,6 ml 10%SDS, 0,4 ml 0,05% bromfenolová modř).

4.4 Western blot

Pro elektropřenos proteinů rozdělených pomocí SDS-PAGE se využívá metody Western blotu. PVDF membrána byla nejprve aktivována po dobu 1 minuty v metanolu a následně byla spolu s ostatními součástmi (2 houbičky a 4 výstřižky chromatografického papíru Whatman) inkubována 10 minut v blotovacím pufru (3,03 g Tris, 14,4 g glycin, 200 ml metanol, 800 ml H₂O). Poté byly všechny komponenty v požadovaném pořadí vloženy do kazety, která byla vložena do blotovacího rámu. Rám byl poté zavěšen do vaničky a byl zalit blotovacím pufrem. Celá aparatura byla v průběhu ochlazována ledovou tříští. Elektropřenos probíhal 70 minut při 500 mA. Po uplynutí této doby byla aparatura rozebrána a membrána se zachycenými proteiny byla použita pro imunodetekci.

4.5 Imunodetekce proteinů na membráně

Nejprve byla nanáška proteinů zkontrolována pomocí barvení proteinů barvou Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA), která byla poté odmyta pomocí dest. H₂O a PBS. K deaktivaci volných míst na membráně, kde nejsou separované proteiny, bylo použito 5% sušené mléko (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad, USA) rozpuštěné v PBS. Membrána byla v mléce inkubována při pokojové teplotě na třepačce po dobu 1 hodiny a poté promývána v roztoku PBS s 0,1% Tweenem 20 pro odstranění nespecifických interakcí. Jako specifická protilátka byla použita monoklonální protilátka 1E3 a 2E1, která byla připravená proti proteinu z povrchu kančích ejakulovaných spermii (Zigo et al. 2015). Byla ředěna v poměru 1:10 v PBS. S touto primární protilátkou byla membrána inkubována v kapse z parafilmu přes noc v lednici. Negativní kontroly byly inkubovány bez primární protilátky pouze v PBS. Druhý den byla membrána s navázanou primární protilátkou promývána 4 x 5 minut v PBS s 0,1% Tweenem 20 a inkubována 1 hodinu na třepačce se sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům značenou křenovou peroxidázou (Goat Anti-Mouse IgG (L+H), Horseradish Peroxidase-Linked; Bio-Rad, USA). Tato sekundární protilátka byla ředěna v poměru 1:3000. Poté byla membrána promývána 6 x 5 minut v PBS s 0,1% Tweenem 20.

Pro vizualizaci specifické detekce proteinu protilátkou byla použita chemiluminiscenční metoda. Na membránu byl nanesen chemiluminiscenční substrát (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific, USA) a k detekci signálu byl použit přístroj Azure c300 Gel Imaging System (Azure Biosystems, USA). Na základě hmotnostního standardu byla sestrojena kalibrační křivka v programu Microsoft Excel, pomocí nichž byly vypočítány hmotnosti detekovaných proteinů. Densitometrická analýza detekovaných proteinů byla provedena v programu Imige Studio Digits (LI-COR Biosciences, USA).

4.6 Nepřímá fluorescenční mikroskopie

Pro nepřímou fluorescenční mikroskopii byly použity vzorky ejakulovaných, kapacitovaných spermii, spermii po indukci akrosomální reakce, epididymálních spermii z hlavy, těla i ocasu a z řezů tkání varlat a nadvarlat, jejichž zpracování bylo popsáno výše.

Na podložní sklička byla nejprve nakreslena dvě kolečka hydrofobní fixou PAN Pen liquid rocker (Sigma-Aldrich, USA), do kterých byly poté pipetovány vzorky spermii a

fixovány. Bylo použito více metod fixace a přípravy vzorků pro detekci proteinů pomocí vybraných protilátek.

1. Fixace formaldehydem v suspenzi

K peletce spermií bylo přidáno 100 μ l 2% formaldehydu a s občasným protřepáním byl vzorek inkubován při pokojové teplotě 20 minut. Následně byly zkumavky stočeny na centrifuze při 300 x g a 20 °C po dobu 5 minut. Peletky byly následně 2x promyty ve 200 μ l PBS a poté byl vzorek naředěn na požadovanou koncentraci vhodnou pro nátěr na sklo. Do kroužků na skla bylo napipetováno 20 μ l suspenze a ponechány zasušení volně na vzduchu při laboratorní teplotě.

2. Vlhká fixace acetonem

Do vyznačeného kolečka bylo napipetováno 20 μ l suspenze spermií a přidáno 50 μ l vymraženého roztoku acetonu a metanolu, který byl připraven v poměru 1:1. Po 5 minutách byl preparát opláchnut PBS a ponechán k zasušení.

3. Inkubace s protilátkou v suspenzi

Po promytí bylo k jedné peletě ejakulovaných spermií přidáno 150 μ l PBS s monoklonální myší protilátkou 1E3 nebo 2E1 (v poměru 1:2) a k druhé 150 μ l PBS bez protilátky. Ta nám potom sloužila jako negativní kontrola. Mikrozkumavky byly poté nechány se zahřívát a třepat na suché lázni (TS-100 BioSan, Litva) 1 hodinu při teplotě 37 °C. Po zahřátí byly vzorky stočeny na centrifuze při 300 x g a při pokojové teplotě po dobu 7 minut a dvakrát promyty ve 200 μ l PBS. Nakonec bylo k peletě přidáno 100 μ l PBS a po 20 μ l byly vzorky nanесeny na sklíčka, kde byly zafixovány vlhkou fixací pomocí roztoku acetonu s metanolem.

Zafixované vzorky mohly být použity rovnou nebo uloženy do lednice při 4 °C. Do každého kolečka s fixovaným preparátem spermií na skle bylo přidáno 150 μ l blokovacího média SuperBlock (Blocking Buffer in PBS; Thermo Fisher Scientific, USA) na 15-20 minut. Následně byla sklíčka opláchnuta PBS a osušena. Na každé kolečko určené pro negativní kontrolu bylo poté nanесeno 100 μ l PBS a do druhého 100 μ l PBS s monoklonální myší protilátkou 1E3 nebo 2E1. Protilátky byly ředěny v poměrech 1:1, 1:2, 1:8 a 1:10. Takto připravená skla byla inkubována přes noc ve vlhké komůrce v lednici. Následující den byly vzorky opláchnuty pomocí PBS, osušeny a inkubovány se sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům anti-mouse Alexa FluorTM 488 (Invitrogen, USA), která byla naředěna v PBS v poměru 1:300. Inkubace probíhala při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce 45 minut. Poté byla sklíčka opět opláchnuta PBS a osušena. Následně byl naředěn PNA lektin konjugovaný s rhodaminem (Rhodamin Peanut aglutinin; Vector Laboratories, USA) v PBS v poměru 1:1000 a po 100 μ l nanесen na vzorky. Sklíčka byly opět inkubovány při laboratorní teplotě a ve tmě po dobu 30 minut a po této době byly promyty v PBS a následně opláchnuty v dest. H₂O. Po osušení bylo na preparát přidáno 5 μ l montovacího média s DAPI (Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI; Vector Laboratories, USA) ke kontrastnímu barvení jader. Preparáty byly poté přiklopeny krycím sklíčkem a inkubovány ve vlhké komůrce. Vzorky byly poté hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E 600 (Nikon; Japonsko) a snímky byly pořizovány pomocí programu NIS Elements (Laboratory Imaging, Česká Republika).

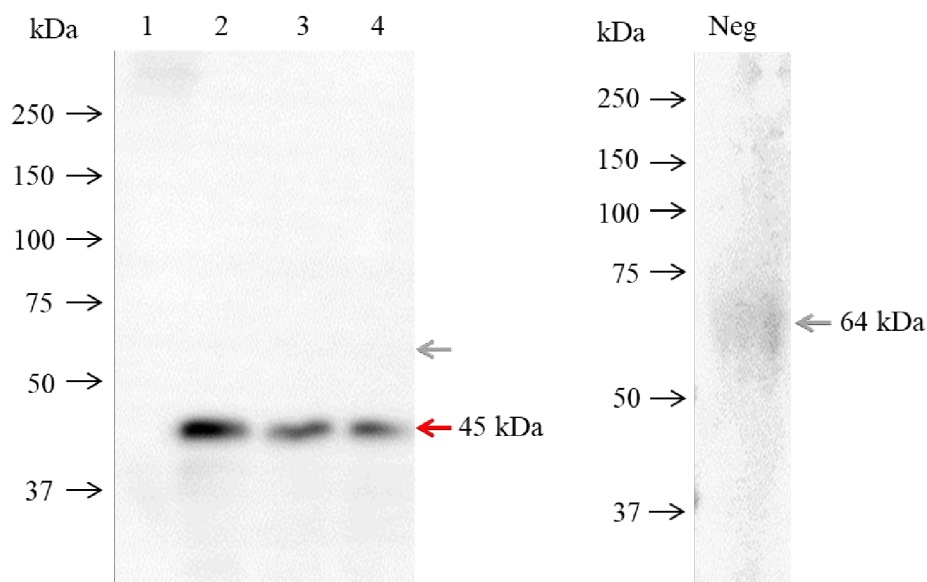
Kryořezy byly připraveny z tkání varlat a nadvarlat kance. Nejprve byly tyto tkáně nakrájeny na kostky o velikosti 1 cm³ a následně byly ve formičkách zality přípravkem TissueTek (OCT Compound for Cryostat Sectioning, Austrálie). Takto připravené tkáňové bločky byly zamrazeny v tekutého dusíku a uchovány při -80 °C. Samotné kryořezy o tloušťce od 6 do 8 μm byly připraveny na přístroji Cryo-cut (Leica, Biocev, Vestec, ČR).

Jednotlivé kryořezy tkání po fixaci acetonem byly ohraničeny hydrofobní fixou PAN Pen liquid rocker (Sigma-Aldrich, USA) a následně bylo na každý kryořez nanášeno na 15-20 minut 150 μl blokovacího média SuperBlock. Poté byla sklíčka opláchnuta PBS a osušena. Na každé kolečko určené pro negativní kontrolu bylo poté nanášeno 100 μl PBS a do druhého 100 μl PBS s protilátkou 1E3 v poměru 1:1. Takto připravená skla byla inkubována přes noc ve vlhké komůrce v lednici. Následující den byly vzorky opláchnuty pomocí PBS, osušeny a inkubovány se sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům GAM Cy5 (Invitrogen, USA), která byla naředěna v PBS v poměru 1:300. Inkubace probíhala při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce 45 minut. Poté byla sklíčka opláchnuta v PBS a dest. H₂O. Po osušení bylo na preparát přidáno 5 μl montovacího média s DAPI. Preparáty byly poté přiklopeny krycím sklíčkem a inkubovány ve vlhké komůrce. Vzorky byly poté hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu s kamerou (Nikon Eclipse E600, Japonsko) a snímky byly pořizovány pomocí programu NIS Elements (Laboratory Imaging, Česká Republika).

5 Výsledky

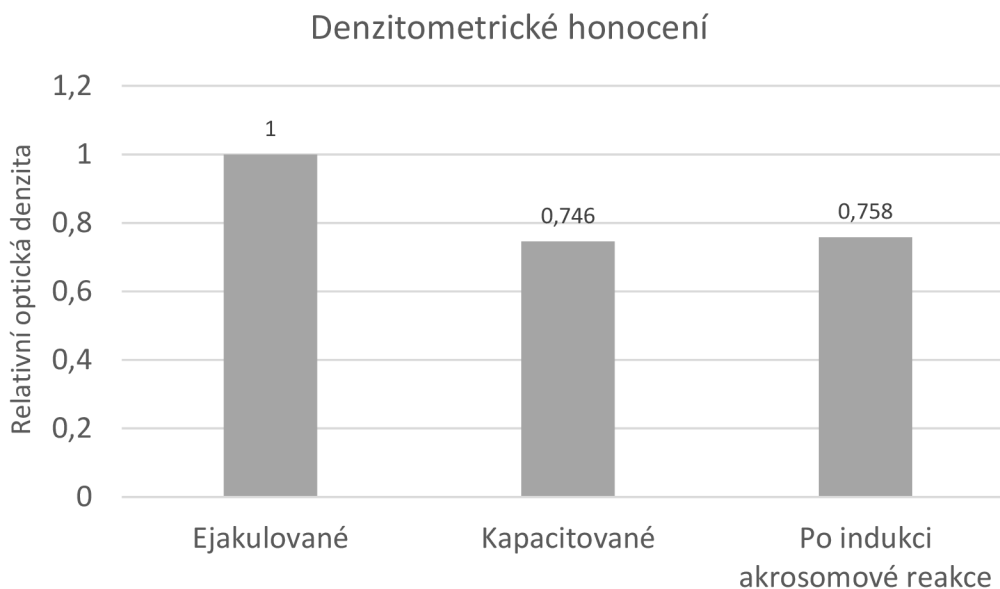
5.1 Detekce proteinu značeného protilátkou 1E3 v extraktech spermií

Detekce proteinu značeného protilátkou 1E3 byla provedena v extraktech proteinů z epididymálních, ejakulovaných, kapacitovaných spermiích a ve spermiích s indukovanou akrosomální reakcí (AR) (kap. 4.2.1.). Vzorky byly připraveny v neredukujících podmínkách. Membrána s nanesenými proteiny a negativní kontrola jsou zobrazeny na obrázku 4. Pomocí protilátky 1E3 byl patrný proužek odpovídající přibližné molekulové hmotnosti 45 kDa u extraktů pocházejících z ejakulovaných (dráha 2), kapacitovaných spermií (dráha 3) a spermií po indukci AR (dráha 4). Pro epididymální spermie (dráha 1) byla detekce negativní. Při negativní kontrole bylo detekováno nespecifické značení v oblasti o přibližné molekulové hmotnosti 64 kDa.



Obrázek 4: Imunodetekce proteinu značeného protilátkou 1E3 v epididymálních, ejakulovaných, kapacitovaných spermiích a ve spermiích s indukovanou akrosomální reakcí. 1 – epididymální (ocas nadvarlete), 2 – ejakulované spermie, 3 – kapacitované spermie, 4 – spermie po indukci akrosomální reakce, Neg – negativní kontrola bez primární protilátky.

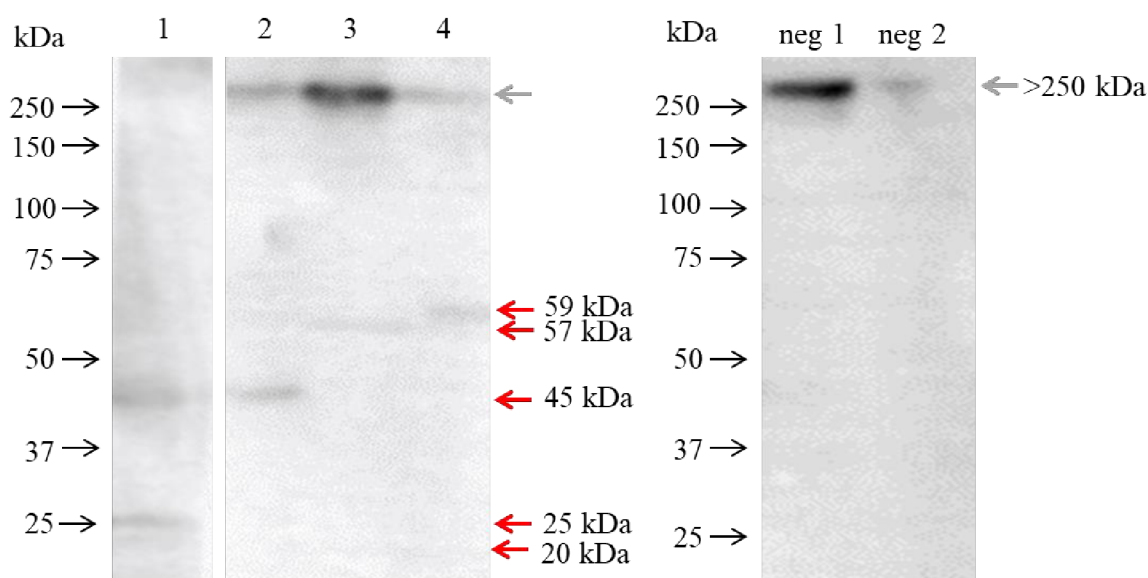
Pro vyhodnocení zastoupení proteinu značeného protilátkou 1E3 v ejakulovaných, kapacitovaných a AR spermích byla provedena denzitometrická analýza, jejíž výsledky jsou znázorněny v grafu 1. Došlo k snížení množství proteinu u kapacitovaných spermí a spermí po indukci AR oproti ejakulovaným. Výsledek ovšem nebyl statisticky vyhodnocen, neboť byla denzita měřena pouze u jednoho experimentu.



Graf 1: Denzitometrické hodnocení signálu reakce protilátky 1E3 u ejakulovaných, kapacitovaných spermí a spermí po indukci AR.

5.2 Detekce proteinu značeného protilátkou 1E3 v extraktech tkání, epididymální tekutiny a semenné plasmy

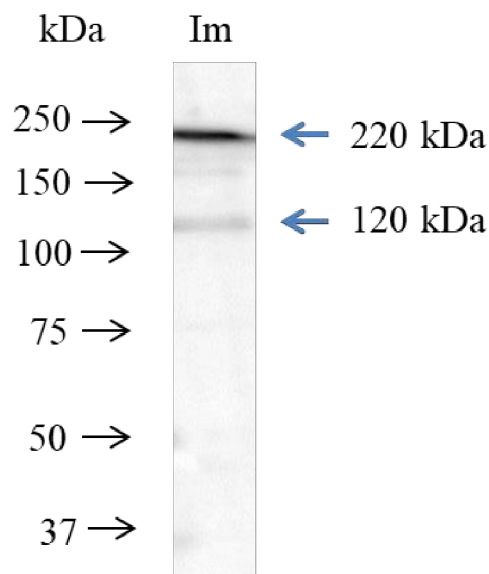
Detekce proteinu značeného protilátkou 1E3 byla provedena v extraktech tkání varlat a nadvarlat (kap. 4.2.3.), epididymální tekutiny a semenné plasmy (kap. 4.2.4.). Membrána s detekovanými proteiny a negativní kontrola jsou zobrazeny na obrázku 5. Ve vzorku extraktu z tkáně varlat (dráha 1) byly detekovány tři proteiny (45 kDa, 25 kDa a 20 kDa) a v tkáni nadvarlat (dráha 2) dva proteiny, a to jeden o přibližné molekulové hmotnosti 45 kDa a druhý o molekulové hmotnosti vyšší než 250 kDa, který ale odpovídal proužku zaznamenaného v negativní kontrole. Tento stejný proužek se také objevil u vzorku epididymální tekutiny (dráha 3) a semenné plasmy (dráha 4). Kromě toho byly patrné detekované proužky o přibližné molekulové hmotnosti 57 kDa u proteinů epididymální tekutiny a 59 kDa u semenné plasmy.



Obrázek 5: Imunodetekce proteinu značeného protilátkou 1E3 v extraktech z tkání varlete a ocasu nadvarlete, v extraktech epididymální tekutiny a semenné plasmy. 1 – tkáň varlete, 2 – tkáň ocas nadvarlete, 3 – epididymální tekutina, 4 – semenná plasma, neg – negativní kontrola pro extrakt z tkání varlete (neg 1) a ocasu nadvarlete (neg 2).

5.3 Imunoprecipitace a detekce proteinu rozpoznávaného protilátkou 1E3 v extraktu z povrchových proteinů spermie

Na závěr byla za účelem identifikace proteinu provedena imunoprecipitace pomocí 1E3 protilátkou z extraktu ejakulovaných kančích spermií (kap. 4.2.5.), která se bohužel nezdařila. Byly detekovány proteinové proužky, které neodpovídaly námi detekovanému proteinu o mol. hm. 45 kDa v extraktu spermií (obrázek 6). Zaznamenali jsme pouze detekci u proteinů o 220 a 120 kDa, které by mohly odpovídat reakci sekundární protilátky s imunoglobuliny z použité 1E3 protilátky pro imunoprecipitaci. Vzhledem k neredukujícím podmínkám, které byly využity při přípravě imunoprecipitátu, se protilátka 1E3 zcela nerozpadla na lehký a těžký imunoglobulinový řetězec. Byla také provedena izolace povrchových proteinů (kap. 4.2.2.), nicméně s negativním výsledkem.

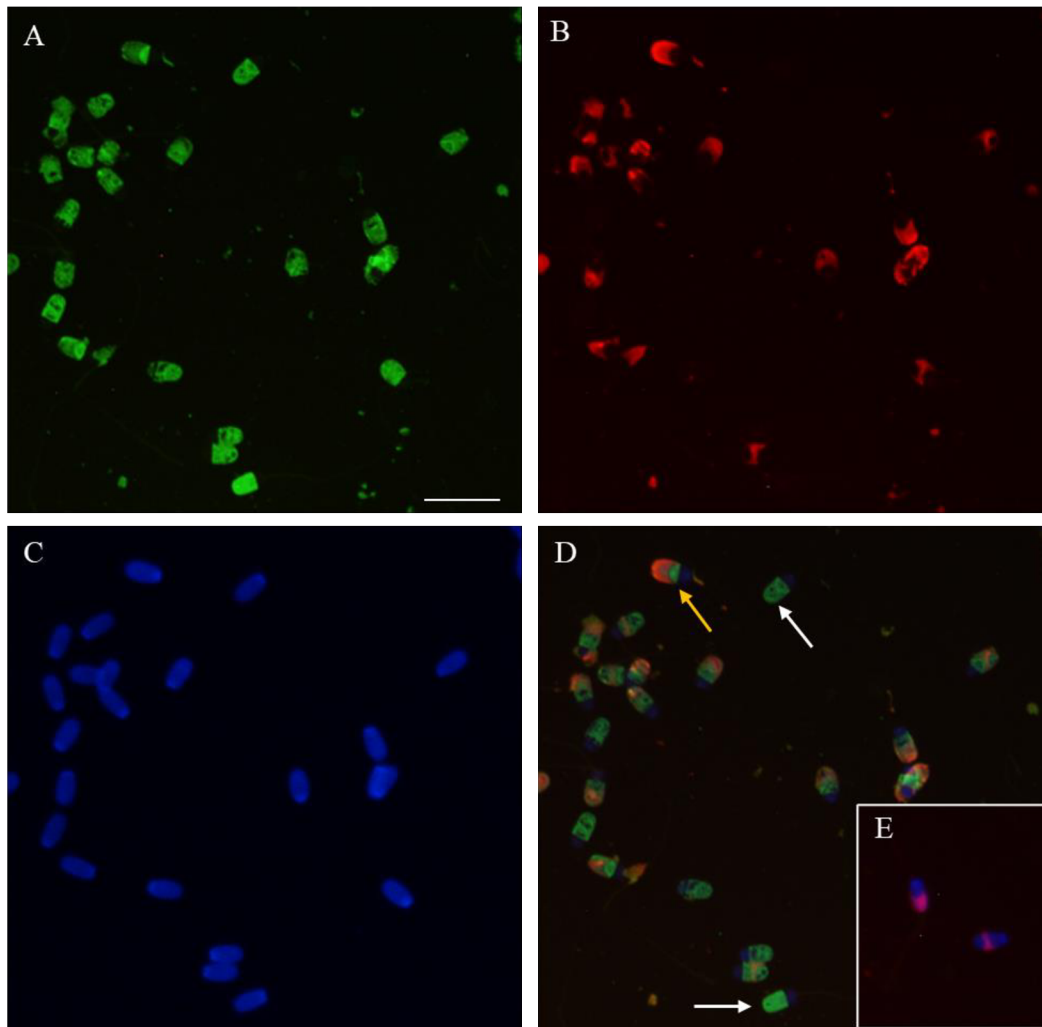


Obrázek 6: Imunoprecipitace proteinu značeného protilátkou 1E3 z lyzátu ejakulovaných kančích spermíí, Im – imunoprecipitát.

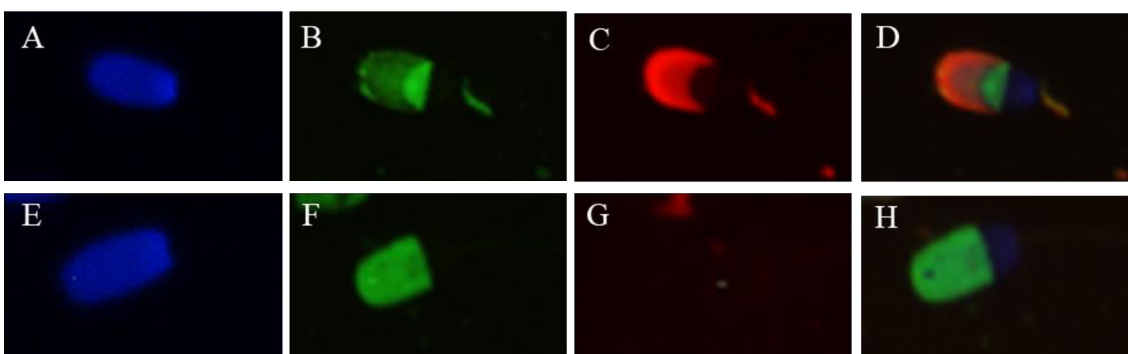
5.4 Lokalizace proteinu značeného protilátkou 1E3 ve spermích

Pro lokalizaci proteinu značeného protilátkou 1E3 na epididymálních, ejakulovaných, kapacitovaných spermích, spermích s indukovanou AR byla použita metoda nepřímé fluorescenční mikroskopie (kap. 4.6.). Pro fixaci byla využita metoda vlhké fixace roztokem acetonu a metanolu. Pro detekci proteinu na povrchu spermie byly také použity metody fixace formaldehydem v suspenzi a inkubace protilátkou v suspenzi, bohužel tyto metody nebyly úspěšné. Pomocí ředící řady byla zjištěna optimální koncentrace primární protilátky, které bylo dosaženo při ředění 1:2. Pro vizualizaci detekce proteinu byla použita sekundární protilátka konjugovaná s Alexa 488 (zelená fluorescence), jádro bylo značeno DAPI (modrá fluorescence) a akrosom zviditelněn lektinem PNA (červená fluorescence). U negativní kontroly byly vzorky inkubovány pouze se sekundární protilátkou konjugovanou s Alexa 488.

Na obrázku 7 je zobrazena detekce protilátky v kančích epididymálních spermích z hlavy nadvarlete. Protilátka 1E3 značila v akrosomové oblasti hlavičky spermie. Obrázek 8 ukazuje, že značení protilátkou 1E3 je viditelné jak u spermíí s akrosomem (obrázek 8A-D), tak u spermíí bez akrosomu (obrázek 8E-H). V případě spermie, u které akrosom nebyl přítomen, bylo navíc značení výraznější (Obrázek 8F). U spermie s akrosomem, byl silněji značen ekvatoriální segment (obrázek 8B).

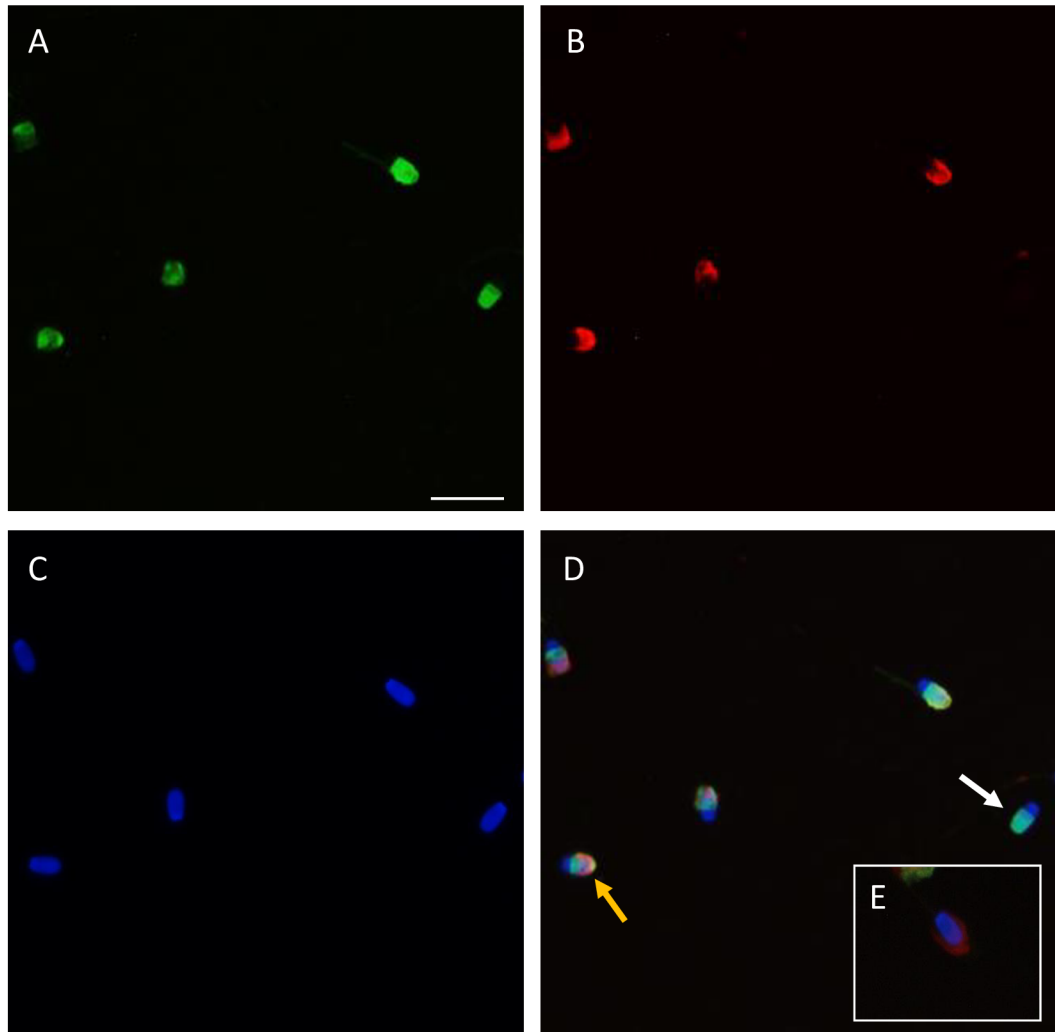


Obrázek 7: Imunolokalizace protilátky 1E3 v epididymálních spermích z hlavy nadvarlete: A – reakce s protilátkou, B – akrosom značený PNA, C – jádro značené DAPI, D – složený obrázek, E – negativní kontrola; žlutá šipka ukazuje spermii s akrosomem, bílá šipka ukazuje spermii bez akrosomu, zvětšení 400x, měřítko 10 μm .

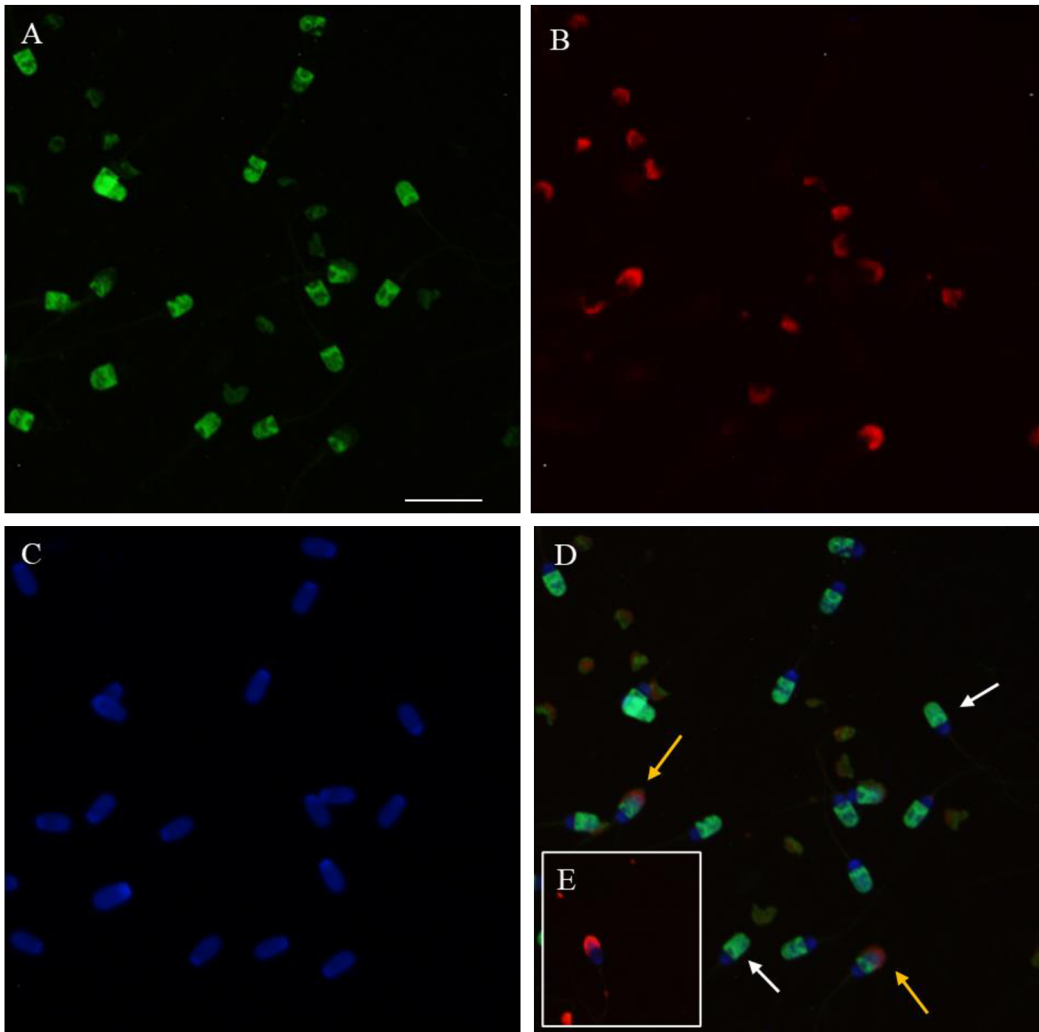


Obrázek 8: Imunolokalizace protilátky 1E3 v epididymálních spermích z hlavy nadvarlete: A,E – reakce s protilátkou, B,F – akrosom značený PNA, C,G – jádro značené DAPI, D,H – složený obrázek; A-D: spermie s akrosomem, E-H: spermie bez akrosomu.

Na obrázku 9 je zobrazeno značení protilátky 1E3 na epididymálních spermii z těla nadvarlete a na obrázku 10 značení na epididymálních spermii z ocasu nadvarlete. Protílátka 1E3 značila v obou případech akrosomové oblasti hlavičky spermie. Stejně jako u spermii z hlavy nadvarlete, i zde je značení protilátkou 1E3 viditelné jak u spermii s akrosomem (žlutá šipka), tak u spermii bez akrosomu (bílá šipka). Nicméně rozdíl v intenzitě značení u spermii s nebo bez akrosomu není tak patrný jako u spermii z hlavy nadvarlete.

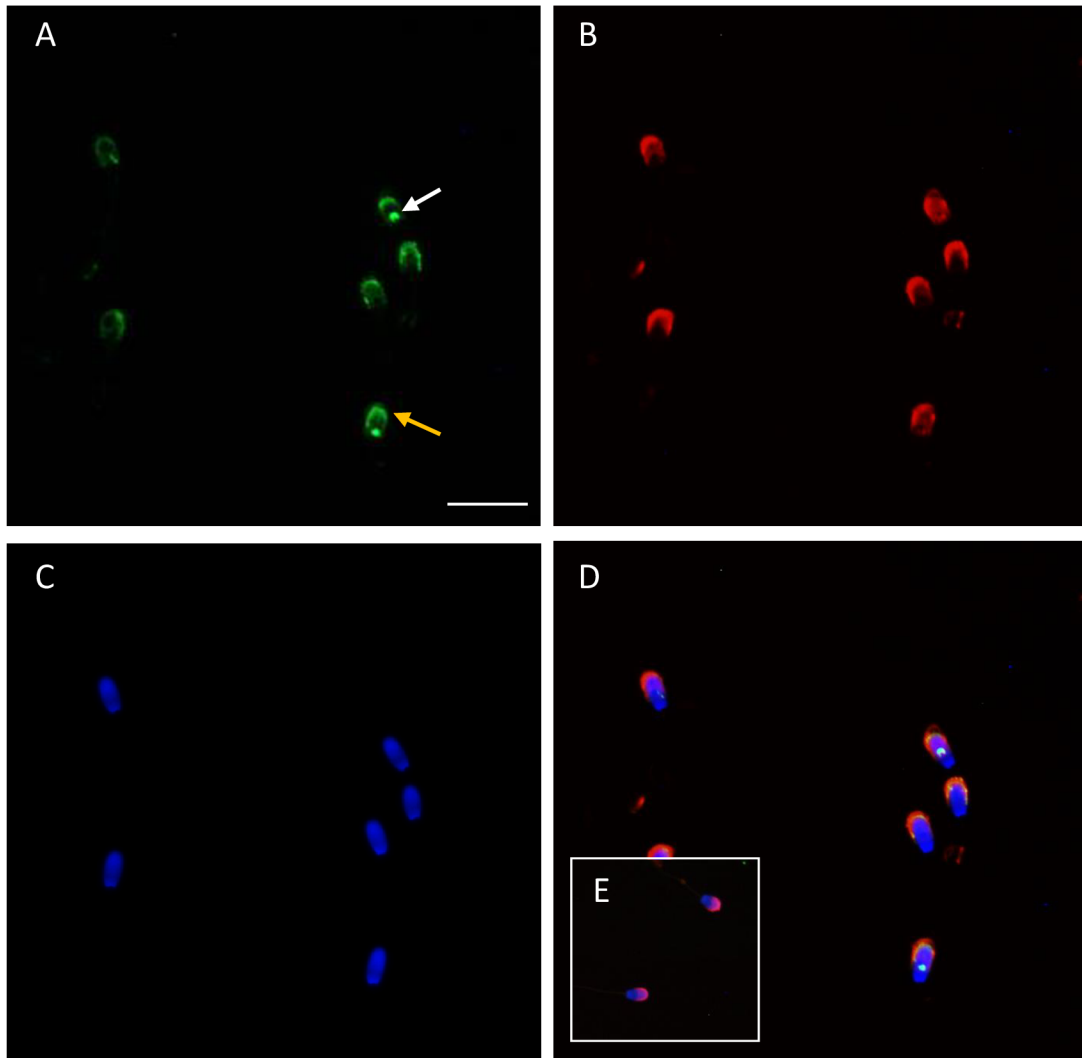


Obrázek 9: Imunolokalizace protilátky 1E3 v epididymálních spermii z těla nadvarlete: A – reakce s protilátkou, B – akrosom značený PNA, C – jádro značené DAPI, D – složený obrázek, E – negativní kontrola, žlutá šipka ukazuje spermii s akrosomem, bílá šipka ukazuje spermii bez akrosomu, zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.

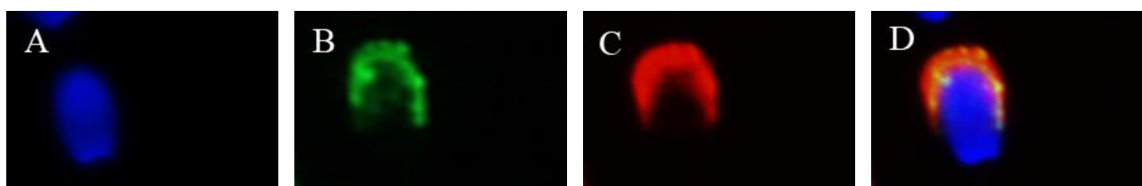


Obrázek 10: Imunolokalizace protilátky 1E3 v epididymálních spermích z ocasu nadvarlete: A – reakce s protilátkou, B – akrosom značený PNA, C – jádro značené DAPI, D – složený obrázek, E – negativní kontrola; žlutá šipka ukazuje spermii s akrosomem, bílá šipka ukazuje spermii bez akrosomu, zvětšení 400x, měřítko 10 μm .

Na obrázku 11 je zobrazena lokalizace proteinu rozpoznávaného protilátkou 1E3 na kančích ejakulovaných spermii. Protilátka 1E3 značila v apikální oblasti akrosomu spermie (žlutá šipka), ale také u velmi malého procenta spermii v subekvatoriálním segmentu (bílá šipka). U těchto spermii se zdá, že značení souvisí s částečně narušeným akrosomem. Obrázek 12 ukazuje značení v apikální oblasti akrosomu.

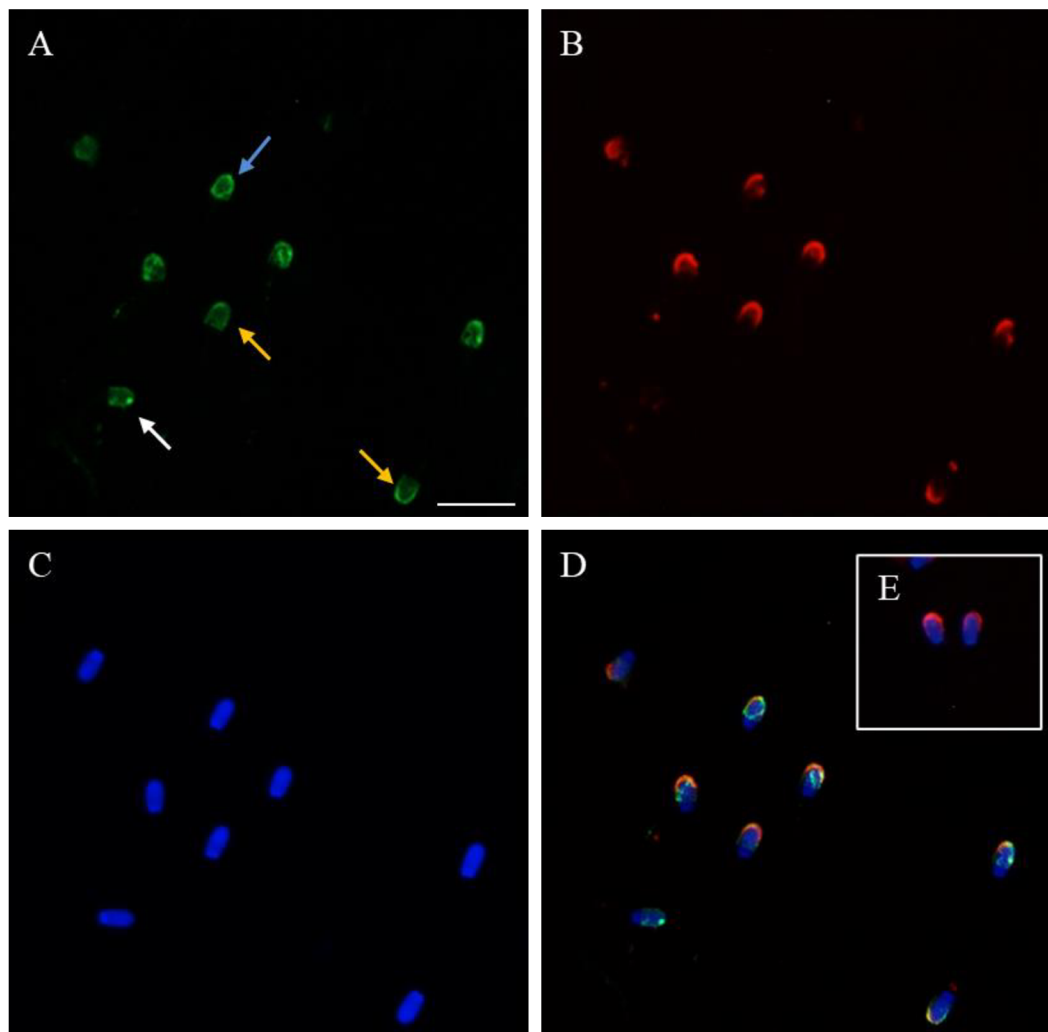


Obrázek 11: Imunolokalizace protilátky 1E3 v ejakulovaných spermii: A – reakce s protilátkou, B – akrosom značený PNA, C – jádro značené DAPI, D – složený obrázek, E – negativní kontrola; žlutá šipka ukazuje lokalizaci v akrosomu, bílá šipka ukazuje lokalizaci v subekvatoriálním segmentu, zvětšení 400x, měřítko 10 μm .

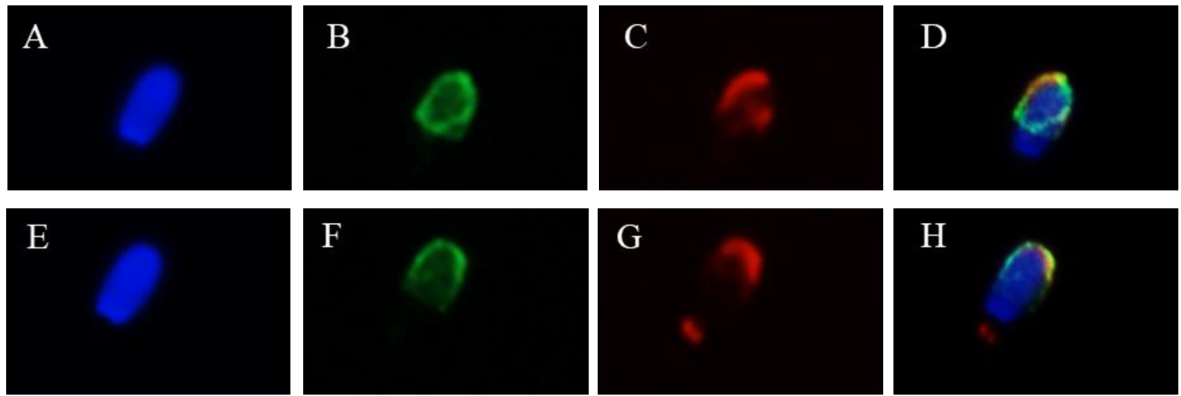


Obrázek 12: Imunolokalizace protilátky 1E3 v ejakulovaných spermii: A – reakce s protilátkou, B – akrosom značený PNA, C – jádro značené DAPI, D – složený obrázek.

Na obrázku 13 je zobrazena imunolokalizace pomocí protilátky 1E3 na kančích *in vitro* kapacitovaných spermích. Protilátka 1E3 značila v akrosomové oblasti hlavičky spermie. U spermie s počínající akrosomovou reakcí (označeno modrou šipkou, obrázek 14A-D) je vidět, že dochází k odhalování vnitřní akrosomální membrány a nepatrné změně značení protilátkou. U spermii s neporušeným akrosomem je značení výraznější v apikální části hlavičky spermie (označeno žlutou šipkou, obrázek 14E-H).

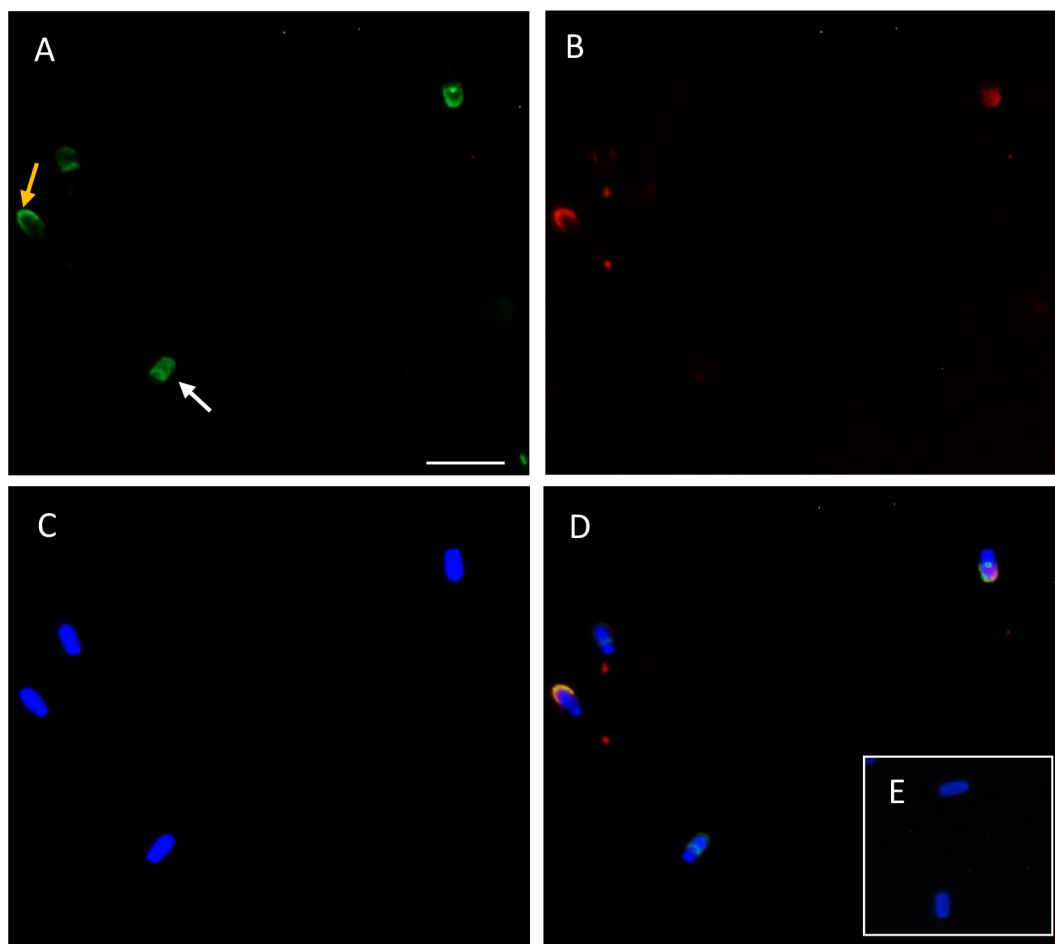


Obrázek 13: Imunolokalizace protilátky 1E3 v kapacitovaných spermích: A – reakce s protilátkou, B – akrosom značený PNA, C – jádro značené DAPI, D – složený obrázek, E – negativní kontrola; žlutá šipka ukazuje lokalizaci ve spermii s akrosomem, bílá šipka ukazuje lokalizaci u spermie bez akrosomu, modrá šipka ukazuje na spermii v počátku akrosomové reakce zvětšení 400x, měřítko 10 μm .

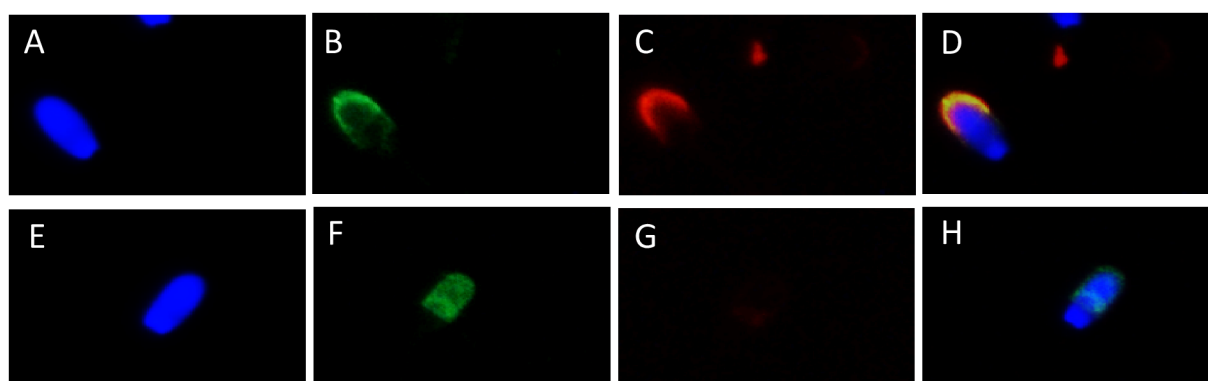


Obrázek 14: Imunolokalizace protilátky 1E3 v kapacitovaných spermích: A, E – jádro značené DAPI; B, F – reakce s protilátkou; C, G – akrosom značený PNA; D,H – složený obrázek, A-D je spermie v počínající akrosomové reakci, E-F lokalizace v apikální oblasti.

Na obrázku 15 je zobrazeno značení protilátky 1E3 na spermích s indukovanou AR. Protilátka 1E3 značila v apikální části hlavičky spermie (žlutá šipka), nebo akrosomové oblasti (bílá šipka) u spermii bez akrosomu. Obrázek 16 ukazuje, že rozdílné značení protilátkou 1E3 viditelné jak u spermii s akrosomem (obrázek 16A-D), tak u spermii bez akrosomu (obrázek 16E-H). Pokud byl u spermie přítomen akrosom, bylo značení výraznější v apikální oblasti (obrázek 16B). Po indukci akrosomové reakce byl protein lokalizován po celé oblasti akrosomu (obrázek 16F).



Obrázek 15: Imunolokalizace protilátky 1E3 ve spermiích po indukci akrosomální reakce: A – reakce s protilátkou, B – akrosom značený PNA, C – jádro značené DAPI, D – složený obrázek, E – negativní kontrola; žlutá šipka ukazuje lokalizaci v apikální oblasti ve spermii s akrosomem, bílá šipka ukazuje lokalizaci u spermie bez akrosomu, zvětšení 400x, měřítko 10 μm .

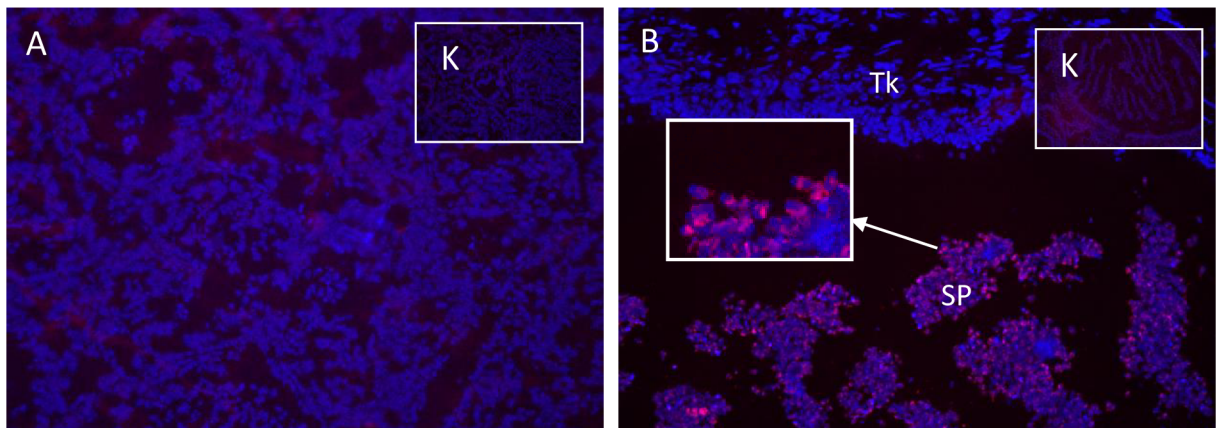


Obrázek 16: Imunolokalizace protilátky 1E3 ve spermiích po indukci akrosomální reakce: A, E – jádro značené DAPI; B, F – reakce s protilátkou; C, G – akrosom značený PNA; D, H – složený obrázek, A-D je spermie s akrosomem, E-F spermie bez akrosomu.

5.5 Lokalizace proteinu značeného protilátkou 1E3 ve tkáních varlete a nadvarlete

Pomocí nepřímé fluorescenční mikroskopie byla provedena lokalizace proteinu značeného protilátkou 1E3 v kryořezech varlete a v ocasu nadvarlete (kap. 4.6.) Pro vizualizaci byla použita sekundární protilátka konjugovaná se Cy5 (červená fluorescence) a jádro bylo označeno DAPI (modrá fluorescence), PNA v tomto případě nebylo použito.

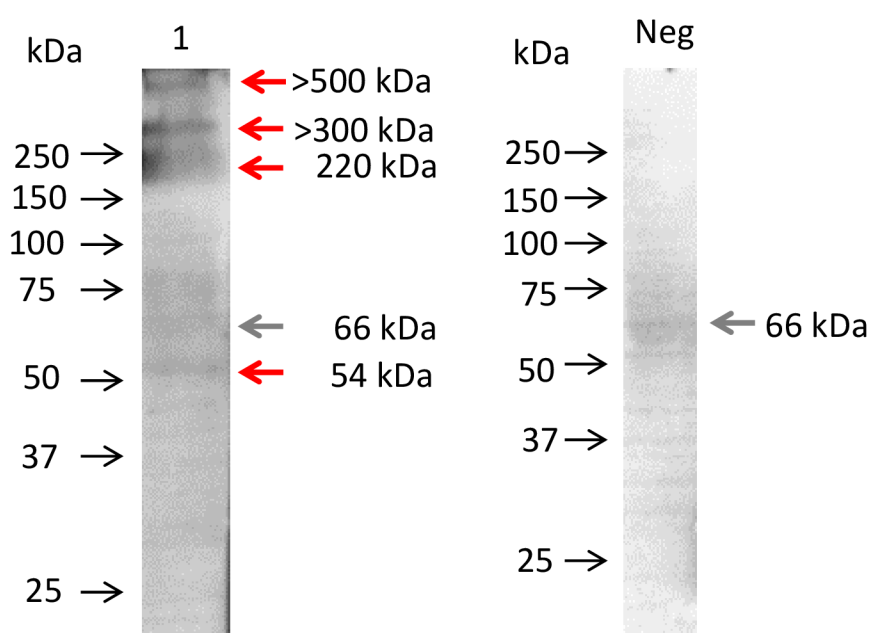
Na obrázku 17 je vidět, že na kryořezu varlete nebyl detekován signál ani ve spermatických buňkách, ani v epitelu. V ocasu nadvarlete byl signál detekován pouze ve spermiích, tkáň byla negativní.



Obrázek 17: Imunolokalizace detekce protilátky 1E3 ve tkáních varlete a ocasu nadvarlete: A – kryořez varle zvětšení 100x, B – kryořez ocas nadvarlete, zvětšení 200x, Tk – tkáň, Sp – spermie, K – negativní kontrola bez primární protilátky.

5.6 Detekce proteinu značeného protilátkou 2E1 v extraktu ejakulovaných spermií

Detekce proteinu značeného protilátkou 2E1 byla provedena v extraktech proteinů z ejakulovaných spermií (kap. 4.2.1.). Vzorky byly připraveny v neredukujících podmínkách. Membrána s nanesenými proteiny a negativní kontrola jsou zobrazeny na obrázku 18. Byly detekovány 4 proteinové proužky odpovídající přibližné molekulové hmotnosti 54 kDa, 220 kDa, nad 300 kDa a nad 500 kDa u extraktů proteinů pocházejících z ejakulovaných spermií. Při negativní kontrole byl detekován proužek o přibližné molekulové hmotnosti 66 kDa, který je viditelný také při samotné detekci a označen jako nespecifická reakce se sekundární protilátkou.

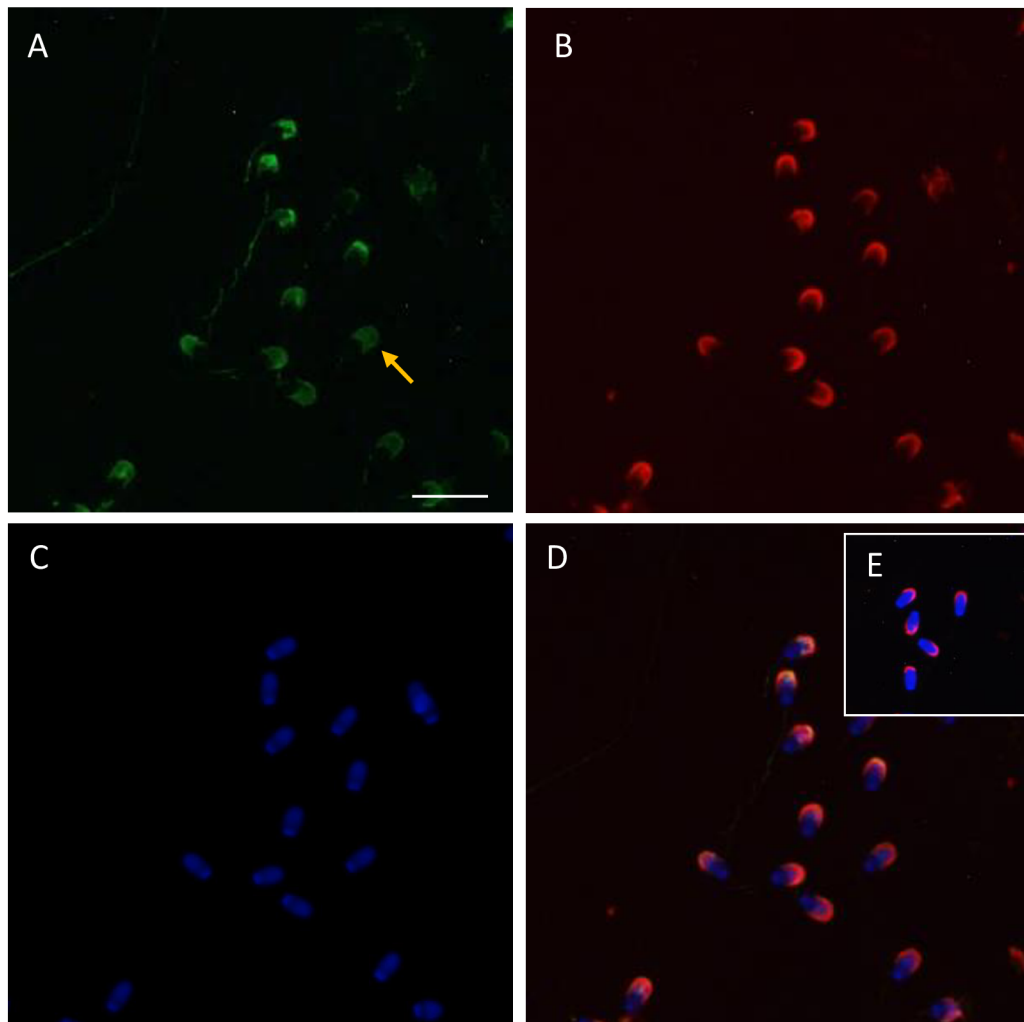


Obrázek 18: Imunodetekce proteinu značeného protilátkou 2E1 ejakulovaných spermiích. 1 – ejakulované spermie, Neg – negativní kontrola.

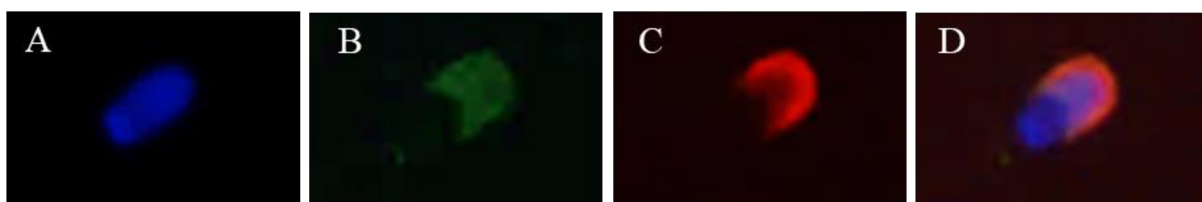
5.7 Lokalizace proteinu značeného protilátkou 2E1 ve spermích

Pro lokalizaci proteinu značeného protilátkou 2E1 v ejakulovaných, kapacitovaných spermích a spermích s indukovanou AR byla použita metoda nepřímé fluorescenční mikroskopie (kap 4.6.). Pro vizualizaci detekce proteinu byla použita sekundární protilátka konjugovaná s Alexa 488 (zelená fluorescence), jádro bylo značeno DAPI (modrá fluorescence) a akrosom obarven lektinem PNA (červená fluorescence). U negativní kontroly byly vzorky inkubovány pouze se sekundární protilátkou konjugovanou s Alexa 488.

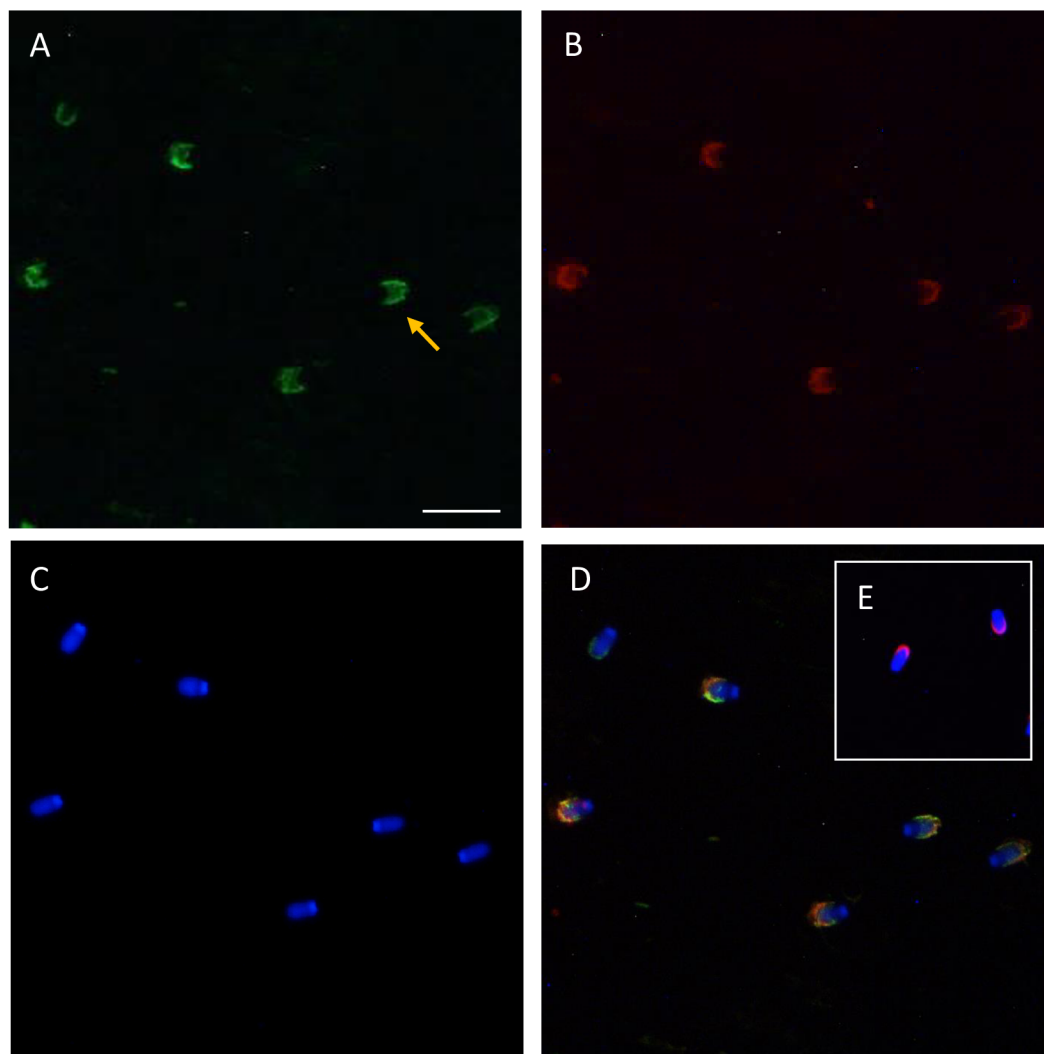
Na obrázku 19 je zobrazena detekce protilátky v kančích ejakulovaných spermích a na obrázku 21 v kapacitovaných spermích. Detail značení protilátky 2E1 na ejakulované a kapacitované spermii je na obrázcích 20 a 22. Protilátka 2E1 značila v obou případech v akrosomové oblasti hlavičky spermie. Nicméně u kapacitovaných spermii je patrné výraznější značení v apikální části hlavičky spermie (obrázek 22B).



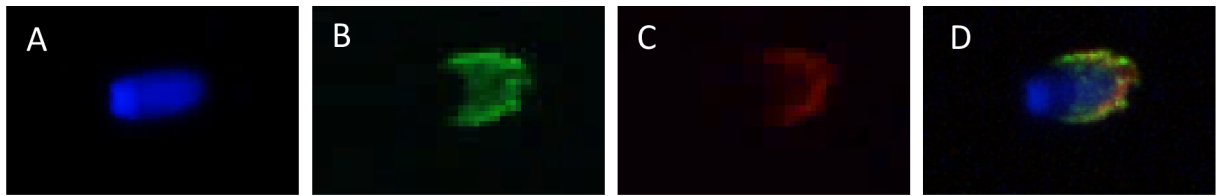
Obrázek 19: Imunolokalizace protilátky 2E1 v ejakulovaných spermích: A – reakce s protilátkou, B – akrosom značený PNA, C – jádro značené DAPI, D – složený obrázek, E – negativní kontrola; žlutá šipka ukazuje lokalizaci v akrosomu, zvětšení 400x, měřítko 10 μ m



Obrázek 20: Imunolokalizace protilátky 2E1 v ejakulovaných spermích: A – reakce s protilátkou, B – akrosom značený PNA, C – jádro značené DAPI, D – složený obrázek.

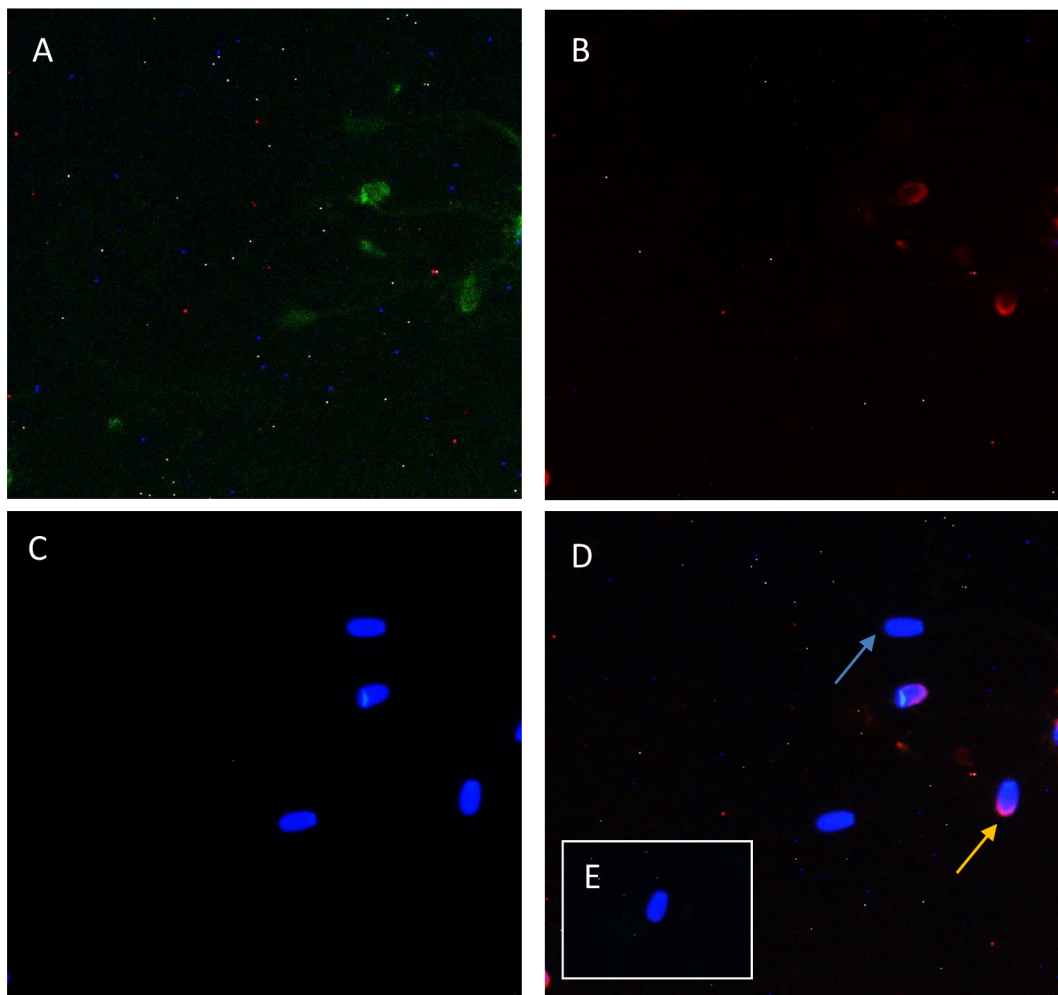


Obrázek 21: Imunolokalizace detekce protilátky 2E1 v kapacitovaných spermích: A – reakce s protilátkou, B – akrosom značený PNA, C – jádro značené DAPI, D – složený obrázek, E – negativní kontrola, žlutá šipka ukazuje lokalizaci v akrosomu, zvětšení 400x, měřítko 10 μm

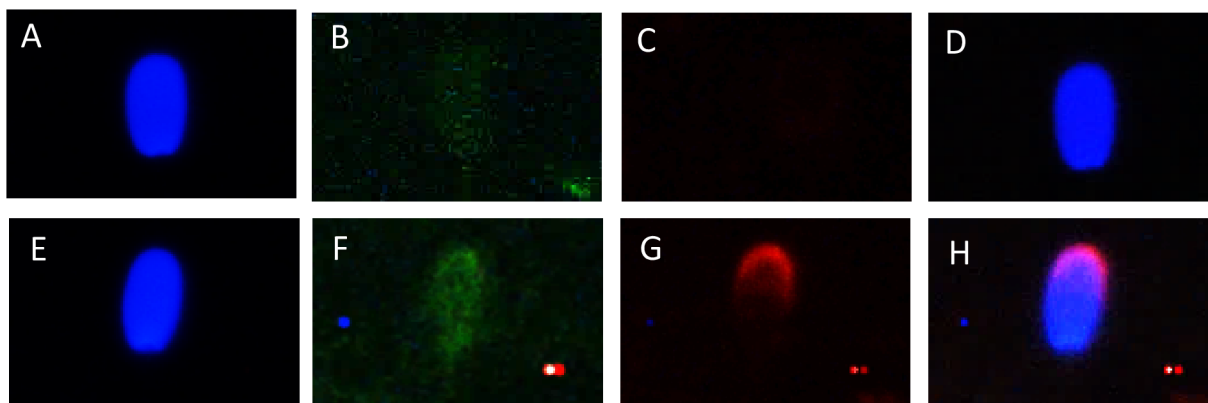


Obrázek 22: Imunolokalizace protilátky 2E1 v kapacitovaných spermích: A – reakce s protilátkou, B – akrosom značený PNA, C – jádro značené DAPI, D – složený obrázek.

Na obrázcích 23 a 24 je zobrazena imunolokalizace pomocí protilátky 2E1 ve spermích po indukci AR. Po proběhlé AR nebyl zaznamenán žádný signál v hlavičce spermii (modrá šipka, obrázek 24B). Pokud zůstal akrosom na spermii stále přítomný, byl protein lokalizován v oblasti akrosomu se slabým difúzním značením protilátkou po celé hlavičce spermie (žlutá šipka, obrázek 24F).



Obrázek 23: Imunolokalizace protilátky 2E1 ve spermích po indukci akrosomové reakce: A – reakce s protilátkou, B – akrosom značený PNA, C – jádro značené DAPI, D – složený obrázek, E – negativní kontrola; žlutá šipka ukazuje lokalizaci proteinu, pokud je přítomný akrosom, modrá šipka ukazuje spermii bez akrosomu, zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.



Obrázek 24: Imunolokalizace protilátky 2E1 ve spermích po indukci akrosomální reakce: A, E – jádro značené DAPI; B, F – reakce s protilátkou; C, G – akrosom značený PNA; D,H – složený obrázek, A-D je spermie bez akrosomu, E-F spermie s akrosomem.

6 Diskuze

Proteiny spermií plní různé funkce. Některé se podílí na cytoskeletárním složení buňky (Nowicka-Bauer & Karpisz 2013), jiné jsou zapojené do metabolických procesů (Baker 2013), a pak máme také speciální skupinu proteinů, které jsou zodpovědné za primární a sekundární vazbu spermie na ZP (Kongmanas *et al.* 2015). Byla charakterizována celá řada proteinů s afinitou k ZP, ale jejich studium zdaleka není u konce. Pomocí panelu monoklonálních protilátek bylo rozeznáno několik povrchových proteinů spermie, které by mohli afinitou k ZP disponovat (Zigo *et al.* 2015).

Tato práce byla zaměřená na dvě monoklonální protilátky, 1E3 a okrajově 2E1, které značily povrchové proteiny na hlavičce kančích spermií (Zigo *et al.* 2015). K detekci proteinů značených těmito protilátkami bylo využito metod SDS-elektroforézy (kap. 4.3.) s následnou Western blot analýzou (kap. 4.4.). Lokalizace byla provedena po fixaci vzorků spermií acetonem pomocí nepřímé fluorescenční mikroskopie (kap. 4.6.). Dalšími použitými metodami byla fixace formaldehydem v suspenzi a inkubace s protilátkou v suspenzi (kap. 4.6.). U takto připravených vzorků nebyl pozorován žádný fluorescenční signál. Důvodem, proč jsme pomocí těchto metod náš protein nedetkovali, může být fakt, že došlo k zesíťování proteinů pomocí formaldehydu a epitop se tak stal nepřístupným. Dalším možným vysvětlením je, že protilátka nebyla schopná rozpoznat epitop v nativním stavu v případě vazby protilátky na spermie v suspenzi.

Nejprve jsme věnovali pozornost protilátce 1E3. Na PVDF membráně protilátka detekovala oblast se stejnou molekulovou hmotností (45 kDa) v extraktech spermií ejakulovaných, kapacitovaných, a po indukci AR. O stejné velikosti byl detekován i protein v extraktech tkání varlat a ocasu nadvarlete. V tkáni varlete byly také nalezeny další formy proteinu o hmotnostech 20 kDa a 25 kDa, přičemž by se mohlo jednat o zkrácenou nebo jinak upravenou formu proteinu. Detekce proteinu rozpoznávaného protilátkou 1E3 ve tkáni varlete naznačuje, že je protein exprimován ve spermatické buňce již během spermatogeneze, ovšem fluorescenční mikroskopie na kryořezu varlete neukázala žádný signál ani ve spermiích, ani v samotné tkáni. V nadvarletí byla situace trochu jiná. Fluorescenční signál byl patrný na spermiích ze všech tří epididymálních oblastí a přítomnost tohoto proteinu na spermiích izolovaných z ocasu nadvarlete následně potvrdil i vzorek kryořezu tkáně, kde protilátka značila spermie v lumen kanálku. Western blot analýza detekovala protein o 45 kDa ve tkáni epididymu, u extraktu z epididymálních spermií byl výsledek negativní. Nicméně se domníváme, že neúspěšná detekce v proteinech izolovaných z epididymálních spermiích mohla být způsobena nedostatečnou extrakcí tohoto proteinu, protože jak již bylo diskutováno, protilátka 1E3 protein na epididymálních spermiích značila.

Naše výsledky imunodetekce jsou rozdílné oproti výsledkům publikovaným v Zigo *et al.* (2015), kde protilátka 1E3 rozpoznávala proteiny o molekulových hmotnostech 32, 35 a 38 kDa v extraktech ejakulovaných a kapacitovaných spermií, což naznačuje, že má protein několik forem. Detekce proteinu v semenné plasmě byla v této studii popsána jako negativní a v epididymální tekutině byl protein rozpoznávaný protilátkou 1E3 značen jako protein o vyšší molekulové hmotnosti (70 kDa) (Zigo *et al.* 2015). Podle Zigo *et al.* (2015) by se mohlo jednat o nezpracované proteiny. Naopak v našich experimentech byl tento protein detekován i v semenné plasmě (59 kDa) a v epididymální tekutině jako protein o molekulové váze 57

kDa. Je velmi diskutabilní, proč jsme detekovali protein s vyšší molekulovou vahou v tekutině epididymu, když v extraktu z tkáně byla nalezena forma nižší. Je dost pravděpodobné, že protilátka v těchto dvou reprodukčních tekutinách rozpoznává nespecificky nějaký velmi podobný protein, který není přítomný na spermii. Proto byla za účelem identifikace proteinu, který je rozpoznáván protilátkou 1E3, provedena imunoprecipitace z lyzátu kančích ejakulovaných spermií, která bohužel nebyla úspěšná.

Rozdíl ve velikosti proteinu detekovaného ve spermiích během našich experimentů a v práci Zigo *et al.* (2015) může být dán rozdílným odhadem molekulových hmotnosti po separaci v polyakrylamidovém gelu s odlišnou hustotou, kdy jsme oproti zmíněné studii využili gel o menší hustotě (12%). Je také možné, že účinnost extrakce proteinů ze spermií byla odlišná, případně mohlo v případě zmíněné studie dojít ke štěpení forem proteinu během manipulace se vzorkem spermií, a proto bylo nalezeno několik nižších forem (32, 35 a 38 kDa) (Zigo *et al.* 2015).

Pokud bychom se zaměřili na již identifikované proteiny spermií o molekulové hmotnosti 45 kDa, tak jsou možnými antigeny pro 1E3 protilátku proteiny lactadherin (P47) a proacrosin/acrosin. Lactadherin P47 byl ve spermii nalezen jako 47kDa protein (Ensslin *et al.* 1998). Zigo *et al.* (2013) navíc identifikovali pomocí hmotnostní spektrometrie protein značený protilátkou 1H9 o molekulové váze 45 kDa právě jako lactadherin. Je tedy možné, že obě protilátky (1E3 a 1H9) detekují stejný protein, ale skrze jiný epitop. Lactadherin P47 protein je exprimován v pozdních zárodečných buňkách, takže spermie uvolněné do lumen epididymu si s sebou tento protein již nesou na svém povrchu epididymem (Petrunkina *et al.* 2003). Podobně jako u proteinu značeného 1E3 byl při Western blot analýze v extraktu epididymální tkáně detekován jasný proužek, ale s drobným rozdílem v molekulové váze (47 kDa). U vzorku testikulární tkáně buď chyběl, nebo byl velmi slabý. Byla vyslovena hypotéza, že je lactadherin P47 asociován s periakrosomální plasmatickou membránou, ale je maskován testikulárními proteiny. Zvýšení signálu při průchodu epididymem by mohlo být způsobeno odhalením proteinu nebo interakcí s proteiny sekretovanými epididymem (Petrunkina *et al.* 2003). Byla navržena jeho možná funkce ve vazbě na ZP, neboť byla zjištěna jeho přítomnost na povrchu spermie i po proběhlé kapacitaci (Zigo *et al.* 2015) a navíc již v dřívější studii byla popsána jeho vazebná aktivita na sacharidové struktury ZP oocyty (Ensslin *et al.* 1998).

Proacrosin/acrosin je syntetizován jako enzymaticky neaktivní zymogen, který poté prochází proteolýzou. V neredukujících podmínkách tvoří na membráně proužky o molekulové váze 46, 43, 41 a 34 kDa (Baba *et al.* 1989). Vzhledem ke své lokalizaci v akrosomální matrix, na vnitřní akrosomální membráně i na povrchu akrosomu by mohl být zapojený nejen do primární, ale také do sekundární vazby (Johnson *et al.* 1983, Töpfer-Petersen *et al.* 2008, Zigo *et al.* 2015). Podobně jako u lactadherinu, i acrosinový prekurzor byl detekován jako protein o molekulové hmotnosti 45 kDa pomocí protilátky 4C7 ve studii Zigo *et al.* (2015).

Naše výsledky denzitometrického měření ukázaly mírný pokles množství proteinu rozpoznávaného protilátkou 1E3 od spermií ejakulovaných ke spermiím kapacitovaným a spermiím po indukci AR. Tento zdánlivý úbytek by mohl ukazovat na to, že určité množství proteinu se skutečně během kapacitace a AR uvolňuje, a tedy naznačuje, že by tento protein mohl být také lokalizován na plasmatické membráně. Abychom tuto skutečnost potvrdili, tak

jsme se pokusili cíleně izolovat povrchové proteiny z ejakulovaných kančích spermií. Bohužel se nám nepodařilo povrchové proteiny vyizolovat v dostatečném množství pro úspěšnou detekci proteinu 1E3 protilátkou.

Při sledování lokalizace proteinu rozpoznávaného 1E3 protilátkou jsme v kančích spermiích byly pozorovány tři fluorescenční vzory.

- 1) signál pokrývající celou akrosomální oblast
- 2) signál v apikální oblasti akrosomu
- 3) signál v subekvatoriálním segmentu

U epididymálních spermií z hlavy nadvarlete značila protilátka 1E3 celou akrosomální oblast hlavičky bez ohledu na přítomnost akrosomu. Rozdíl byl ovšem v intenzitě, kdy výrazněji byla akrosomální oblast značena u spermií bez akrosomu, a naopak u spermií s akrosomem bylo možné pozorovat výraznější značení v ekvatoriálním segmentu. Stejně fluorescenční vzory byly pozorovány i u spermií izolovaných z těla a ocasu nadvarlete, ale rozdíly mezi spermiemi s nebo bez akrosomu nebyly tak výrazné. Zigo *et al.* (2015) oproti tomu žádný signál u epididymálních spermií nezaznamenali. Tento rozdílný výsledek by mohl být způsobem rozdílem v přípravě vzorků. V případě výsledků studie Zigo *et al.* (2015) byly buněčné suspenze epididymálních spermií ponechány k zasoušení na vzduchu bez fixace. Tato metoda mohla vést pouze k mírnému narušení plasmatické membrány a lokalizace pomocí protilátky ve vnitřních strukturách spermie nemusela být dostatečná.

U ejakulovaných spermií docházelo ke změně ve fluorescenčním značení. Nejsilněji byl protein značen v apikální oblasti akrosomu. Dále se objevilo značení v subekvatoriálním segmentu, přičemž tyto spermie měly výrazně poškozen akrosom. Toto značení se však objevilo na velmi malém počtu spermií a není možné z něj vyvozovat obecnější závěry. Po kapacitaci byl protein značen protilátkou 1E3 na celé akrosomové oblasti s tím, že u spermií s nepoškozeným akrosomem je značení, podobně jako u ejakulovaných, výraznější v apikální oblasti. Lokalizace v apikální oblasti je typická pro proteiny se schopností vazby na ZP. Vazebná studie proteinu značeného protilátkou 1E3 _detekovala slabou vazbu na glykoproteiny ZP v oblasti 32, 35 a 38 kDa (Zigo *et al.* 2015). V oblasti 45 kDa, ve které byl protein označen protilátkou 1E3 v zmíněné práci, byla vazba se ZP jasně viditelná. Již při počínající AR můžeme sledovat nepatrnou změnu ve značení protilátkou. Po prodělané AR a odhalení vnitřní akrosomální membrány značila protilátka v oblasti celého akrosomu. Akrosomální značení i po prodělané AR by poukazovalo na to, že určité množství proteinu je vázáno na vnitřní akrosomální membránu. K potvrzení přesné lokalizace proteinu by bylo vhodné provést frakcionalizaci membrán spermií k získání proteinů z plasmatické, vnější akrosomální nebo vnitřní akrosomální membrány (Páleníková *et al.* 2021). Zároveň se ztratil signál z apikální oblasti, což by odpovídalo tomu, že molekuly značeného proteinu z povrchu spermie odchází spolu s fúzujícími membránami. Tomu by také odpovídaly výsledky denzitometrického měření. I ve fluorescenčním značení nacházíme rozdíly oproti možné lokalizaci lactadherinu naší protilátkou 1E3. Ten byl ve studii Petrunkina *et al.* (2003) lokalizován v apikální oblasti hlavičky ejakulovaných spermií a po kapacitaci se zvyšovalo procento spermií, které vykazovaly fluorescenční signál po celé akrosomové oblasti. Ovšem po AR byly spermie bez signálu (Petrunkina *et al.* 2003). V rozporu s tímto zjištěním byla studie (DP Hrabovská 2021), která ukázala přítomnost lactadherinu rozpoznávaného zmíněnou protilátkou 1H9 i na spermiích po proběhlé AR, a na základě toho předpokládala

lokalizaci i na vnitřní akrosomální membráně, což odpovídá i našemu značení protilátkou 1E3.

Doposud nepublikované výsledky testování zkřížené reaktivity protilátky 1E3 na býčích spermii ukázaly značení akrosomové části hlavičky spermii epididymálních, ejakulovaných i kapacitovaných spermii (Postlerová, osobní sdělení). Lactadherin byl v minulosti v býčích epididymálních spermii nalezen v komplexu proteinů vnější akrosomální membrány a detekován jako proteinový proužek také shodné velikosti s námi detekovaným proteinem, a to 45 kDa. Imunolokalizace ukázala jeho přítomnost v oblasti akrosomové čepičky býčích spermii (Nagdas *et al.* 2016).

Protilátka 2E1 na membráně značila v extraktu z ejakulovaných spermii v neredukujících podmínkách proteiny o molekulových hmotnostech 54 kDa, 220 kDa, v oblasti nad 300 kDa a nad 500 kDa. I zde byla odchylka v molekulové váze oproti původní studii Zigo *et al.* (2015), která tento protein detekovala v oblasti 200 kDa, a to jak u vzorku ejakulovaných, tak u vzorku kapacitovaných spermii. V extraktech tkání varlat a nadvarlat a tekutinách reprodukčního traktu byla detekce provedena s negativním výsledkem (Zigo *et al.* 2015). Z nedostatku času jsme se bohužel k detekci proteinu rozpoznávaného protilátkou 2E1 v tkáních a tekutinách reprodukčního traktu nedostali.

V oblastech s takto vysokou molekulovou hmotností se z dosud popsaných prasečích proteinů spermie nachází zonadhesin. Ten byl popsán jako polypeptid o molekulové váze 300 kDa (Hickox *et al.* 2001). Dále byly rozeznány jeho další formy o nižších molekulových vahách (40-65 kDa). V neredukujících podmínkách pak tvoří zonadhesin komplexy o molekulové hmotnosti 350 kDa a nad 900 kDa. Váhy 220 kDa se poté dosáhlo při maximální O-deglykosylaci zonadhesinu (o 300 kDa), z čehož vyplynulo, že se jedná o glykoprotein (Bi *et al.* 2003). Protein o této velikosti byl detekován i námi zvolenou protilátkou 2E1. Podle studie Bi *et al.* (2003) vznikají po proteolytickém štěpení zonadhesinového prekurzoru 4 polypeptidy. K modifikaci polypeptidu O-vázanými oligosacharidy dochází v testes za vzniku 300kDa glykoproteinu. Zbývající polypeptidy jsou pak N-glykosylovány a představují „zralý“ zonadhesin o nižších molekulových vahách (Bi *et al.* 2003). Je tedy možné, že v případě proteinu značeného protilátkou 2E1 se může jednat o formy proteinu, které jsou glykosylované nebo neprošly glykosylací, případně mohlo dojít k proteolytickému procesu a zkrácení polypeptidového řetězce. V případě námi detekovaných proteinů v oblasti vyšších molekulových hmotností (> 500 kDa) by se mohlo jednat o dimery zonadhesinu.

Nepřímá fluorescenční mikroskopie lokalizovala signál protilátky 2E1 v ejakulovaných spermii v akrosomální oblasti hlavičky. Stejný výsledek uvedli i Zigo *et al.* (2015). Podobné značení bylo zaznamenáno i u kapacitovaných spermii s tím rozdílem, že v tomto případě byla výrazněji značena apikální oblast. Tento výsledek je odlišný od článku Zigo *et al.* (2015), kde bylo pozorováno pouze zvýšení signálu u kapacitovaných spermii oproti ejakulovaným a nedošlo ke změně fluorescenčního vzoru. Po proběhlé AR jsme u spermii protein nedetkovali. Se stále přítomným akrosomem se pojilo slabé značení protilátkou.

Zigo *et al.* (2015) zjistili pomocí cílené izolace proteinů z povrchu spermie, že se jedná skutečně o povrchový protein, přičemž silnější signál byl detekován na povrchu kapacitovaných spermii oproti ejakulovaným. Ovšem výše zmíněný zonadhesin se nachází na vnější akrosomální membráně a akrosomální matrix. Po AR dochází k jeho uvolnění ze spermie (Bi *et al.* 2003).

V oblasti 200 kDa byla pozorována velmi slabá interakce s glykoproteiny ZP (Zigo *et al.* 2015). Vysvětlením může být fakt, že protein značený pomocí protilátky 2E1 se vyskytuje ve spermii pouze v malém množství. Pro další vazebné studie by bylo nezbytné pracovat s dostatečně velkým množstvím izolovaných proteinů z povrchu spermií.

Na základě zjištěných molekulových hmotností a imunolokalizace proteinů, které jsou značené monoklonálními protilátkami 1E3 a 2E1, lze spekulovat o podobnosti s již charakterizovanými proteiny kančích spermií, ovšem k přesnému určení by bylo nezbytné provést znovu imunoprecipitaci s následnou identifikací proteinu. Námi stanovená hypotéza, že se v obou případech jedná o povrchové proteiny, se zcela nepotvrdila, i když výsledky imunofluorescenční analýzy to naznačují. Pro potvrzení či vyvrácení hypotézy by bylo potřeba provést úspěšnou izolaci povrchových proteinů nebo využít metodu frakcionace membrán spermií. Navíc by bylo vhodné využít pro lokalizaci proteinů mikroskopické techniky s vyšší rozlišovací schopností, případně i elektronovou mikroskopií. Do budoucna by také bylo dobré provést blokaci vazby pomocí těchto protilátek přímo na oocyt se ZP pro sledování vazebné aktivity proteinů, které jsou protilátkami rozpoznávané.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce byla detekce proteinů značených protilátkami 1E3 a 2E1 a jejich lokalizace pomocí nepřímé fluorescenční mikroskopie v kančích spermích. Vycházeli jsme z předpokladu, že se jedná o povrchové proteiny se schopností vázat ZP.

Protein značený 1E3 byl detekován v ejakulovaných, kapacitovaných spermích a ve spermích po indukci akrosomální reakce, a to jako proužek o molekulové hmotnosti 45 kDa. Přítomnost tohoto proteinového proužku byla také nalezena v extraktech tkání varlat a nadvarlat. Protilátka 1E3 lokalizovala protein v akrosomální oblasti hlavičky ve všech funkčních stádiích spermí. U epididymálních spermí byl signál výraznější, pokud nebyl přítomen akrosom. U spermí ejakulovaných a kapacitovaných byl protein lokalizován spíše v apikální oblasti akrosomu, u spermí po akrosomální reakci byl signál detekován v celé oblasti akrosomu, tedy na vnitřní akrosomální membráně. Dále se protein podařilo detekovat ve spermích na kryožezu tkáně nadvarlat. Izolace povrchových proteinů a imunoprecipitace se nezdařila a měla by tak být předmětem dalších studií.

Protein značený protilátkou 2E1 byl detekován u ejakulovaných spermí ve čtyřech formách o molekulových hmotnostech 54 kDa, 220 kDa, >300 kDa a >500 kDa. Byl lokalizován v akrosomové oblasti hlavičky. Protein byl přítomný na spermích ejakulovaných a kapacitovaných, ale po proběhlé akrosomové reakci nebyl signál zaznamenán.

Z výsledků vyplývá, že protein značený pomocí 2E1 by mohl být skutečně povrchový protein, který by se vzhledem ke své lokalizaci mohl účastnit primární vazby spermie na ZP. V případě proteinu značeného 1E3 je situace komplikovanější. Jeho přítomnost na hlavičce spermie i po akrosomální reakci by mohla značit, že se jedná o protein, který je zapojen do sekundární vazby spermie na ZP. Zda je tato hypotéza správná by se muselo ověřit dalšími experimenty.

8 Literatura

- Albertini DF. 2015. The Mammalian Oocyte. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, 2015, 59-97. ISBN 9780123971753
- Asquith KL, Baleato RM, Mclaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ. 2004. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *Journal of Cell Science*. **117**(16), 3645-3657. ISSN 1477-9137.
- Baba T, Kashiwabara S-ichi, Watanabe K, Itoh H, Michikawa Y, Kimura K, Takada M, Fukamizu A, Arai Y. 1989. Activation and Maturation Mechanisms of Boar Acrosin Zymogen Based on the Deduced Primary Structure. *The Journal of Biological Chemistry* **264**:11920-11927.
- Baba T, Niida Y, Michikawa Y, Kashiwabara S, Kodaira K, Takenaka M, Kohno N, Gerton GL, Arai Y. 1994. An acrosomal protein, sp32, in mammalian sperm is a binding protein specific for two proacrosins and an acrosin intermediate. *Journal of Biological Chemistry*. **269**:10133-10140.
- Baibakov B, Gauthier L, Talbot P, Rankin TL, Dean J. 2007. Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development* **134**:933-943.
- Baker MA, Naumovski N, Hetherington L, Weinberg A, Velkov T, Aitken RJ. 2013. Head and flagella subcompartmental proteomic analysis of human spermatozoa. *PROTEOMICS* **13**:61-74.
- Belleannee C, Belghazi M, Labas V, Teixeira-Gomes A-P, Gatti JL, Dacheux J-L, Dacheux F. 2011. Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. *PROTEOMICS* **11**:1952-1964.
- Bezouška K, Sklenář J, Novák P, Halada P, Havlíček V, Kraus M, Tichá M, Jonáková V. 1999. Determination of the complete covalent structure of the major glycoform of DQH sperm surface protein, a novel trypsin-resistant boar seminal plasma O-glycoprotein related to pB1 protein. *Protein Science*:1551-1556.
- Bi M, Hickox JR, Winfrey VP, Olson GE, Hardy DM. 2003. Processing, localization and binding activity of zonadhesin suggest a function in sperm adhesion to the zona pellucida during exocytosis of the acrosome. *Biochemical Journal* **375**:477-488.
- Bianchi E, Wright GJ. 2020. Find and fuse: Unsolved mysteries in sperm–egg recognition. *PLOS Biology* **18**.
- Brohmann H, Pinnecke S, Hoyer-Fender S. 1997. Identification and Characterization of New cDNAs Encoding Outer Dense Fiber Proteins of Rat Sperm. *Journal of Biological Chemistry* **272**:10327-10332.

- Brown PR, Miki K, Harper DB, Eddy EM. 2003. A-Kinase Anchoring Protein 4 Binding Proteins in the Fibrous Sheath of the Sperm Flagellum. *Biology of Reproduction* **68**:2241-2248.
- Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1997. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Letters* **407**:201-206.
- Carmona E, Weerachayanukul W, Soboloff T, Fluharty AL, White D, Promdee L, Ekker M, Berger T, Buhr M, Tanphaichitr N. 2002. Arylsulfatase A Is Present on the Pig Sperm Surface and Is Involved in Sperm–Zona Pellucida Binding. *Developmental Biology* **247**:182-196.
- Chang MC. 1984. The Meaning of Sperm Capacitation: A Historical Perspective. *J Androl* **5**:45-50.
- Cooper TG. 1992. Epididymal Proteins and Sperm Maturation. *Spermatogenesis — Fertilization — Contraception*:285-318. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, de la Vega-Beltrán JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE. 2003. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ Cotransporter in Mouse Sperm Capacitation. *Journal of Biological Chemistry* **278**:7001-7009.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1994. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *BBA - General Subjects* **1200**:48–54.
- Druart X, Rickard JP, Mactier S. 2013. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Journal of Proteomics*. **91**, 13-22. ISSN 18743919.
- Dube C, Leclerc P, Baba T, Reyes-Moreno C, Bailey JL. 2005. The Proacrosin Binding Protein, sp32, Is Tyrosine Phosphorylated During Capacitation of Pig Sperm. *Journal of Andrology* **26**:519-528.
- Egydio de Carvalho C, Tanaka H, Iguchi N, Ventelä S, Nojima H, Nishimune Y. 2002. Molecular Cloning and Characterization of a Complementary DNA Encoding Sperm Tail Protein SHIPPO 11. *Biology of Reproduction* **66**:785-795
- Ensslin M, Vogel T, Calvete JJ, Thole HH, Schmidtke J, Matsuda T, Töpfer-Petersen E. 1998. Molecular Cloning and Characterization of P47, a Novel Boar Sperm-Associated Zona Pellucida-Binding Protein Homologous to a Family of Mammalian Secretory Proteins. *Biology of Reproduction* **58**(4): 1057–1064.

- Feugang JM, Liao SF, Willard ST, Ryan PL. 2018. In-depth proteomic analysis of boar spermatozoa through shotgun and gel-based methods. *BMC Genomics* **19**:
- Florman HM, Fissore RA. 2015. Fertilization in Mammals. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*:149-196. Elsevier.
- Fujita A, Nakamura K, Kato T, Watanabe N, Ishizaki T, Kimura K, Mizoguchi A, Narumiya S. 2000. Ropporin, a sperm-specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella. *J Cell Sci* **113**:103–112.
- Gadella BM, Tsai P-shiue, Boerke A, Brewis IA. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *The International Journal of Developmental Biology* **52**:473-480.
- Gao Z, Garbers DL. 1998. Species Diversity in the Structure of Zonadhesin, a Sperm-specific Membrane Protein Containing Multiple Cell Adhesion Molecule Domains. *The Journal of Biological Chemistry* **273**:3415-3421.
- Gatti J-L, Druart X, Guérin Y, Dacheux F, Dacheux J-L. 1999. A 105- to 94-Kilodalton Protein in the Epididymal Fluids of Domestic Mammals Is Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE); Evidence That Sperm Are the Source of This ACE. *Biology of Reproduction* **60**:937-945.
- Goudet G, Mugnier S, Callebaut I, Monget P. 2008. Phylogenetic Analysis and Identification of Pseudogenes Reveal a Progressive Loss of Zona Pellucida Genes During Evolution of Vertebrates. *Biology of Reproduction* **78**:796-806.
- Gusse M, Sautière P, Bélaïche D, Martinage A, Roux C, Dadoune JP, Chevillier P. 1986. Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **884**(1): 124-134.
- Hardy DM, Garbers DL. 1994. Species-specific Binding of Sperm Proteins to the Extracellular Matrix (Zona Pellucida) of the Egg. *The Journal of Biological Chemistry* **269**:19000-19004.
- Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG. 1994. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: The ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Sequence* **4**:361-393.
- Hedrick JL, Wardrip NJ. 1987. On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Developmental Biology* **121**:478-488.
- Hickox JR, Bi M, Hardy DM. 2001. Heterogeneous Processing and Zona Pellucida Binding Activity of Pig Zonadhesin. *Journal of Biological Chemistry* **276**:41502-41509.

- Holland A, Ohlendieck K. 2015. Comparative profiling of the sperm proteome. *PROTEOMICS* **15** (4):632-648
- Hrabovská L. 2021. Studium vazby spermií na zona pellucida oocytu. Diplomová práce. v Praze.
- Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M. 2010. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *Journal of Clinical Investigation* **120**:984-994.
- Inaba K. 2003. Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. *Zoological Science* **20**:1043-1056.
- Jonáková V, Maňásková P, Kraus M, Liberda J, Tichá M. 2000. Sperm Surface Proteins in Mammalian Fertilization. *Molecular reproduction and development* **56**:275-277.
- Johnson LA, Garner DL, Truitt-Gilbert AJ, Lessley BA. 1983. Immunocytochemical Localization of Acrosin on Both Acrosomal Membranes and in the Acrosomal Matrix of Porcine Spermatozoa. *J. Andrology* **4**:222-229.
- Kato Y, Kumar S, Lessard C, Bailey JL, Drevet JR. 2021. ACRBP (Sp32) is involved in priming sperm for the acrosome reaction and the binding of sperm to the zona pellucida in a porcine model. *PLOS ONE* **16**.
- Khalil MB et al. 2006. Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylglycerolipid. *Developmental Biology* **290**:220-235.
- Kim K-S, Gerton GL. 2003. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Developmental Biology* **264**:141-152.
- Kim Y-H, Haidl G, Schaefer M, Egner U, Mandal A, Herr JC. 2007. Compartmentalization of a unique ADP/ATP carrier protein SFEC (Sperm Flagellar Energy Carrier, AAC4) with glycolytic enzymes in the fibrous sheath of the human sperm flagellar principal piece. *Developmental Biology* **302**:463-476.
- Kongmanas K et al. 2015. Proteomic Characterization of Pig Sperm Anterior Head Plasma Membrane Reveals Roles of Acrosomal Proteins in ZP3 Binding. *Journal of Cellular Physiology* **230**:449-463.
- Larson JL, Miller DJ. 1997. Sperm from a Variety of Mammalian Species β 1,4-Galactosyltransferase to Their Surface. *Biology of Reproduction* **57**:442-453.

- Leemans B, Stout TAE, De Schauwer C, Heras S, Nelis H, Hoogewijs M, Van Soom A, Gadella BM. 2019. Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species? *Reproduction* **157**:R181-R197.
- Lewis JD, Song Y, de Jong ME, Bagha SM, Ausió J. 2003. A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* **111**:473-482.
- Liberda J, Maňásková P, Prelovská L, Tichá M, Jonáková V. 2006. Saccharide-mediated interactions of boar sperm surface proteins with components of the porcine oviduct. *Journal of Reproductive Immunology* **71**:112-125.
- Nagdas SK, Araki Y, Chayko CA, Orgebin-Crist MC, Tulsiani DR. 1994. O-Linked Trisaccharide and N-Linked Poly-N-Acetylglucosaminyl Glycans are Present on Mouse ZP2 and ZP31. *Biology of Reproduction* **51**:262-272.
- Nagdas SK, Smith L, Medina-Ortiz I, Hernandez-Encarnacion L, Raychoudhury S. 2016. Identification of bovine sperm acrosomal proteins that interact with a 32-kDa acrosomal matrix protein. *Molecular and Cellular Biochemistry* **414**:153-169.
- Naz RK, Rajesh PB. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol* **2**, 75 (2004).
- Nixon B, Bielanowicz A, Mclaughlin EA, Tanphaichitr N, Ensslin MA, Aitken RJ. 2009. Composition and significance of detergent resistant membranes in mouse spermatozoa. *Journal of Cellular Physiology* **218**:122-134
- Nowicka-Bauer K, Kurpisz M. 2014. Current knowledge of the human sperm proteome. *Expert Review of Proteomics* **10**:591-605.
- Maier WM, Nussbaum G, Domenjoud L, Klemm U, Engel W. 1990. The lack of protamine 2 (P2) in boar and bull spermatozoa is due to mutations within the P2 gene. *Nucleic Acids Res* **18**:1249-1254
- Maňásková P, Pěkníková J, Elzeinová F, Tichá M, Jonáková V. 2007. Origin, localization and binding abilities of boar DQH sperm surface protein tested by specific monoclonal antibodies. *Journal of Reproductive Immunology* **74**:103-113.
- Mao H-T, Yang W-X. 2013. Modes of acrosin functioning during fertilization. *Gene* **526**:75-79.
- Morales CR, Oko R, Clermont Y. 1994. Molecular cloning and developmental expression of an mRNA encoding the 27 kDa outer dense fiber protein of rat spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **37**:229-240.

- Mori C, Nakamura N, Welch JE, Gotoh H, Goulding EH, Fujioka M, Eddy EM. 1998. Mouse spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase (mHk1-s) transcripts are expressed by alternative splicing from the mHk1 gene and the HK1-S protein is localized mainly in the sperm tail. *Mol Reprod Dev* **49**:374–385.
- Orwick-Rydmark M, Arnold T, Linke D. 2016. The Use of Detergents to Purify Membrane Proteins. *Current Protocols in Protein Science* **84**.
- Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis AJ, Alvarez J, Kopf GS. 1999. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation, *Molecular Human Reproduction* **5** (11): 1017–1026
- Petrunkina AM, Läkamp A, Gentzel M, Ekhlesi-Hundrieser M, Töpfer-Petersen E. 2003. Fate of lactadherin P47 during post-testicular maturation and capacitation of boar spermatozoa. *Reproduction* **125**:377-387.
- Pérez-Patiño C, Parrilla I, Li J, Barranco I, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J. 2019. The Proteome of Pig Spermatozoa Is Remodeled During Ejaculation. **18**:41-50.
- Procházková I. 2019. *Studium molekulárních mechanismů pomoci proteomických technik*. Brno. Dizertační práce. Masarykova univerzita.
- Ramalho-Santos J, Moreno RD, Sutovsky P, Chan AW-S, Hewitson L, Wessel GM, Simerly CR, Schatten G. 2000. SNAREs in Mammalian Sperm: Possible Implications for Fertilization. *Developmental Biology* **223**:54-69
- Raymond AS, Shur BD. 2009. A novel role for SED1 (MFG-E8) in maintaining the integrity of the epididymal epithelium. *Journal of Cell Science* **122**:849-858.
- Shur BD, Hall NG. 1982. Sperm Surface Galactosyltransferase Activities during In Vitro Capacitation. *The Journal of Cell Biology* **95**:567-573.
- Suarez SS, Xiaobing D. 1992 Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biology of Reproduction* **46** 686–691.
- Suarez SS. 1998. The Oviductal Sperm Reservoir in Mammals: mechanism of Formation. *Biology of Reproduction*. **58**, 1105-1107.
- Sun QY. 2003. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microscopy Research and Technique*. **61**(4), 342-348. ISSN 1059-910X.

- Stauss Carmen R, Votta Timothy J, Suarez Susan S 1995 Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biology of Reproduction* **53** 1280–1285
- Steger K. 1999. Transcriptional and translational regulation of gene expressions in haploid spermatids. *Anat Embryol* **199**: 471-478.
- Tanphaichitr N, Carmona E, Khalil MB, Xu H, Berger T, Gerton GL. 2007. New insights into sperm-zona pellucida interaction: involvement of sperm lipid rafts. *Frontier in Bioscience* **12**:1748-1766.
- Tanphaichitr N et al. 2015. Remodeling of the plasma membrane in preparation for sperm-egg recognition: roles of acrosomal proteins. *Asian Journal of Andrology* **17**:574-582.
- Töpfer-Petersen E, Friess AE, Nguyen H, Schill WB. 1985. Evidence for a fucose-binding protein in boar spermatozoa. *Histochemistry* **83**:139-145.
- Töpfer-Petersen E. 1999. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Human Reproduction Update* **5**:314-329.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Tsoлова M. 2008. Glycobiology of fertilization in the pig. *The International Journal of Developmental Biology* **52**:717-736.
- Toshimori K, Eddy EM. 2015. The Spermatozoon. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, 2015, 99-148. ISBN 9780123971753.
- Tsai P-S, Garcia-Gil N, van Haeften T, Gadella BM, Delprato AM. 2010. How Pig Sperm Prepares to Fertilize: Stable Acrosome Docking to the Plasma Membrane. *PLoS ONE* **5**. Available at <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0011204>.
- Tumova L, Zigo M, Sutovsky P, Sedmikova M, Postlerova P. 2021. Ligands and Receptors Involved in the Sperm-Zona Pellucida Interactions in Mammals. *Cells* **10**. Available at <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/1/133>.
- Rajendran L, Simons K. 2005. Lipid rafts and membrane dynamics. *Journal of Cell Science* **118**:1099-1102.
- Rebeiz M, Miller DJ. 1999. Porcine Sperm Surface β 1,4Galaktosyltransferase Binds to the Zona Pellucida but Is Not Necessary or Sufficient to Mediate Sperm-Zona Pellucida Binding. *Molecular reproduction and development* **54**:379-387.
- Redgrove KA, Anderson AL, Dun MD, McLaughlin EA, O'Bryan MK, Aitken RJ, Nixon B. 2011. Involvement of multimeric protein complexes in mediating the capacitation-dependent binding of human spermatozoa to homologous zonae pellucidae. *Developmental Biology* **356**:460-474.

- Redgrove KA, Aitken RJ, Nixon B. 2012. More Than a Simple Lock and Key Mechanism: Unraveling the Intricacies of Sperm-Zona Pellucida Binding. 73-122. In Abdelmohsen K, editor. *Binding Protein*. InTech, Rijeka.
- Reid AT, Redgrove K, Aitken RJ, Nixon B. 2010. Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian Journal of Andrology* **13**:88-96.
- van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Helms JB, Brouwers JF, Gadella BM. 2005. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *MHR: Basic science of reproductive medicine* **11**:583-590.
- van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Brouwers JF, Gadella BM. 2007. Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *MHR: Basic science of reproductive medicine* **13**:445-454.
- Wassarman PM. 2009. Mammalian fertilization: the strange case of sperm protein 56. *BioEssays* **31**:153-158.
- Weerachatanukul W, Xu H, Anupriwan A, Carmona E, Wade M, Hermo L, da Silva SM, Rippstein P, Sobhon P, Sretarugsa P, Tanphaichitr N. 2003. Acquisition of Arylsulfatase A onto the Mouse Sperm Surface During Epididymal Transit. *Biology of Reproduction* **69**:1183-1192.
- Westhoff D, Kamp G. 1997. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *J Cell Sci* **110**:1821-1829
- Yonezawa N. 2014. *Posttranslational Modifications of Zona Pellucida Proteins. Posttranslational Protein Modifications in the Reproductive System*:111-140. Springer New York, New York, NY.
- Zayas-Pérez H, Casas E, Bonilla E, Betancourt M. 2009. INHIBITION OF SPERM-ZONA PELLUCIDA BINDING BY A 55 kDa PIG SPERM PROTEIN IN VITRO. *Archives of Andrology* **51**:195-206.
- Zigo M, Jonáková V, Maňásková-Postlerová P. 2011. Electrophoretic and zymographic characterization of proteins isolated by various extraction methods from ejaculated and capacitated boar sperms. *ELECTROPHORESIS* **32**:1309-1318.
- Zigo M, Jonáková V, Šulc M, Maňásková-Postlerová P. 2013. Characterization of sperm surface protein patterns of ejaculated and capacitated boar sperm, with the detection of ZP binding candidates. *International Journal of Biological Macromolecules* **61**:322-328.
- Zigo M, Dorosh A, Pohlová A, Jonáková V, Šulc M, Maňásková-Postlerová P. 2015. Panel of monoclonal antibodies to sperm surface proteins as a tool for monitoring localization

and identification of sperm–zona pellucida receptors. *Cell and Tissue Research* **359**:895-908.

Zhao Y, Zhang W, Kho Y, Zhao Y. 2004. Proteomic Analysis of Integral Plasma Membrane Proteins. *Analytical Chemistry* **76**:1817-1823.

