

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Sledování změny fosforylace proteinů kančích spermíí
během in vitro kapacity**

Diplomová práce

**Autor: Bc. Petra Svobodová
Reprodukční biotechnologie**

**Vedoucí: MVDr. Romana Krejčířová, Ph.D.
Konzultant: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.**

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Sledování změny foforylace proteinů kančích spermii během in vitro kapacitace" 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 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucí mé práce MVDr. Romaně Krejčířové, Ph.D. a své konzultance RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí cenných rad a materiálů a za jejich nesmírnou trpělivost a obrovskou podporu. Také bych chtěla poděkovat svému příteli za veškerou pomoc. Zvláštní poděkování patří mé rodině za psychickou podporu.

Sledování změny fosforylace proteinů kančích spermii během *in vitro* kapacitace

Souhrn

Kapacitace a akrozomální reakce (AR) spermie jsou procesy, které představují velmi dynamické děje nezbytné pro oplození oocyty *in vivo* nebo *in vitro*. Během kapacitace dochází k fyziologickým změnám souvisejícím s hyperaktivací pohybu spermie a přípravě spermie na fúzi s vajíčkem. Změny ve spermii jsou řízeny aktivací intracelulárních signálních drah, jejichž výsledkem je fosforylace na určitých proteinech. Fosforylace patří k posttranslačním modifikacím proteinů a fosforylace na tyrozinu je považována za jednu z nejdůležitějších modifikací spojenou právě s kapacitací spermii, která vede k interakci spermii se ZP, indukci akrozomální reakce a membránové fúzi. Její hodnocení a objasnění všech mechanismů, s kterými je spojená, může tedy velmi významně pomoci při pochopení podstaty fertilizace.

Cílem práce bylo popsat změny ve fosforylaci proteinů kančích spermii před *in vitro* kapacitací, během kapacitace a po akrozomální reakci. Hypotéza práce vycházela z předpokladu, že budou detekovány rozdíly v lokalizaci a míře fosforylace proteinů v ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermii a spermii po akrozomální reakci z nativního ejakulátu a inseminační dávky.

V této diplomové práci byla hodnocena tyrozinová fosforylace pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie u kančích spermii byl prokázán rozdíl v podílu fosforylačních vzorů ve spermii z nativního ejakulátu a inseminační dávky. U *in vitro* kapacitovaných spermii převládal fosforylační vzor v oblasti akrozomu, a to především u spermii z inseminační dávky. V žádném z našich experimentů nebyl fosforylován bičík. U části spermii po AR byla zaznamenána fosforylace v přední části hlavičky.

Dále byla provedena detekce fosfotyrozinu v proteinových extraktech pomocí metody Western blot u kančích spermii a byly zjištěny výrazně fosforylované proteiny o molekulové hmotnosti 28 kDa, 35 kDa a 41 kDa. V průběhu kapacitace jsme zaznamenali nárůst fosforylace během prvních dvou hodin, poté se množství fosforylovaných proteinů snižovalo. Zajímavé bylo zvyšování míry fosforylace proteinu o molekulové hmotnosti 28 kDa zejména v pozdější fázi kapacitace. U kapacitovaných spermii a spermii po AR byly navíc detekovány fosforylované proteiny, které v extraktu ejakulovaných spermii nebyly nalezeny. Jelikož však bylo při naší práci možné provést jen omezený počet opakování, je pro zjištění přesnějších dat nutné některé experimenty zopakovat.

Z celkových výsledků je zřejmé, že kapacitace je úzce spojena s tyrozinovou fosforylací na proteinech spermii. Nicméně je důležité zjistit, kde se přesně tyto proteiny ve spermii nachází a odhalit tak jejich další možnou funkci během následných kroků vedoucí k fúzi gamet.

Klíčová slova: kapacitace, fosfotyrozin, tubulin, Western blot, imunofluorescence, akrozomální reakce

Monitoring the change in phosphorylation of boar sperm proteins during *in vitro* capacitation

Summary

Sperm capacitation and acrosomal reaction (AR) are processes that represent very dynamic processes necessary for oocyte fertilization *in vivo* or *in vitro*. During the capacitation, physiological changes occur associated with hyperactivation of sperm movement and preparation of sperm for fusion with an egg. Changes in sperm are controlled by activation of intracellular signaling pathways, which result in phosphorylation on central proteins. The phosphorylation is one of the posttranslational modifications of proteins and phosphorylation on tyrosine is considered to be one of the most important modifications associated with sperm capacitation, which leads to sperm interaction with ZP, induction of acrosomal reaction and membrane fusion. A evaluation and elucidation of all the mechanisms to which it is associated can therefore very significantly help in understanding of fertilization.

The aim of the study was to describe changes in the phosphorylation of boar sperm proteins before *in vitro* capacitation, during capacitation and after the acrosomal reaction. The hypothesis was based on the assumption that differences in the localization and degree of protein phosphorylation in ejaculated and *in vitro* capacitated sperm and sperm after acrosomal reaction from native ejaculate and insemination dose will be detected.

In this diploma thesis, tyrosine phosphorylation was evaluated by indirect immunofluorescence microscopy in boar sperm, a difference in the proportion of phosphorylation patterns in sperm from native ejaculated and insemination dose was demonstrated. *In vitro* capacitated sperm, the phosphorylation pattern in the acrosome reaction, especially in sperm from the insemination dose. No flag was phosphorylated in any of our experiments. Phosphorylation in the front of the head was noted in part of the sperm after AR.

Furthermore, phosphotyrosine was detected in protein extracts by Western blot in boar sperm and markedly phosphorylated proteins with molecular weights of 28 kDa, 35 kDa and 41. kDa were detected. During the capacitation, we observed an increase in phosphorylation during the first two hours, after which the amount of phosphorylated proteins decreased. It was interesting to increase the rate of phosphorylation of a protein with a molecular weight of 28 kDa, especially in the later phase of capacitation. In addition, phosphorylated proteins were detected in capacitated sperm and sperm after AR., which not found in the ejaculated sperm extract. However, since it was possible to perform only a limited number of repetitions in our study, it is necessary to repeat some experiments to obtain more accurate data.

It is clear from the overall results that capacitation is closely related to tyrosine phosphorylation on sperm proteins. However, it is important to find out exactly where these proteins are located in the sperm and to reveal their further possible function during the subsequent steps leading to gamete fusion.

Keywords: capacitation, phosphotyrosine, tubulin, Western blot, immunofluorescence, acrosome reaction

Obsah

1 Úvod	10
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	11
3 Literární přehled	12
3.1 Vývoj spermíí	12
3.1.1 Morfologie spermie	12
3.1.1.1 Hlavička spermie	13
3.1.1.2 Bičík spermie	13
3.1.2 Epididymální maturace spermíí	14
3.1.3 Kapacitace spermíí	15
3.1.3.1 Kapacitace <i>in vivo</i>	16
3.1.3.2 Kapacitace <i>in vitro</i>	16
3.1.3.3 Hyperaktivace motility spermíí	17
3.1.4 Fertilizace	17
3.2 Fosforylace proteinů	18
3.2.1 Fosforylace ve spermíích	19
3.2.2 Fosforylace během maturace spermíí v nadvarleti	20
3.2.3 Fosforylace během fertilizace	20
3.2.4 Serinová a threoninová fosforylace	20
3.2.5 Tyrozinová fosforylace	21
3.3 Faktory ovlivňující tyrozinovou fosforylaci během kapacitace spermíí	21
3.3.1 Tyrozinová fosforylace během kapacitace spermíí	22
3.3.2 Detekce fosforylace na tyrozinu	23
4 Materiál a metodika	24
4.1 Spermie	24
4.1.1 Zpracování spermíí	24
4.1.2 Určení koncentrace spermíí v suspenzi	24
4.1.3 Kapacitace ejakulovaných spermíí <i>in vitro</i>	24
4.1.4 Indukce akrozomální reakce spermíí kapacitovaných <i>in vitro</i>	25
4.2 Metoda nepřímé imunofluorescence	25
4.2.1 Fixace spermíí	25
4.2.2 Fixace 2 % formaldehydem ve vodě s 2 % BSA	25
4.2.3 Detekce fosforylovaných proteinů pomocí protilátky proti fosfotyrozinu	25
4.3 Western blot analýza	26
4.3.1 Příprava proteinového extraktu ze spermíí pro SDS elektroforézu	26

4.3.2	SDS elektroforéza.....	26
4.3.3	Elektropřenos proteinů separovaných SDS elektroforézou na nitrocelulózovou (NC) membránu.....	27
4.3.4	Vizualizace proteinů na NC-membráně prostřednictvím barvení Ponceau 27	
4.3.5	Imunodetekce na NC-membráně	28
5	Výsledky	29
5.1	Lokalizace fosforylovaných proteinů v kančích spermích	29
5.2	Detekce fosforylovaných proteinů v extraktech z kančích spermí.....	37
6	Diskuze	45
7	Závěr	50
8	Literatura.....	51
9	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	57

1 Úvod

Savčí spermie, které opouští varlata, nejsou schopny navázání na *zona pellucida* (ZP) a oplodnění oocytu, i přes to, že jsou zcela zralé a motilní. Musí proto projít mnoha maturačními procesy a jejich proteiny postranlačními modifikacemi v epididymu, a poté také v reprodukčním traktu samice v procesu nazvaném kapacitace. Během kapacitace dochází k fyziologickým změnám souvisejícím s hyperaktivací pohybu spermie, následné uvolnění spermií z oviduktálního rezervoáru a přípravě spermie na fúzi s vajíčkem (Yanagimachi 1994).

Jednou z modifikací proteinů, které jsou řízeny aktivací intracelulárních signalizačních drah, je fosforylace. Fosforylace je zapojena do mnoha procesů nutných pro fertilizaci oocytu. Je jednou z postranlačních modifikací v eukaryotických buňkách a reguluje aktivitu protein-proteinové interakce (Naz & Rajesh 2004).

Ve spermiích k fosforylaci dochází na serinových, threoninových a tyrozinových zbytcích proteinů. Za nejdůležitější, z hlediska fertilizace oocytu, je považována fosforylace proteinů na tyrozinových zbytcích. Je dokonce považována za hlavní marker přenosu signálu v buňce. Tyrozinová fosforylace je velmi důležitá při kapacitaci spermií, v hyperaktivaci motility, interakci se *zona pellucida*, akrozomální reakci a membránové fúzi (Naz & Rajesh 2004).

Ke kapacitaci dochází v oviduktu samičího ústrojí, je možné ji navodit také *in vitro* podmínkách. Jedná se o určitý sled událostí, důsledkem kterých je spermie schopna navázání na ZP oocytu. Spermie během kapacitace prochází mnoha změnami. Mění se uspořádání proteinů a lipidů v plazmatické membráně, zvyšuje se její hyperpolarizace a dochází k cholesterolovému efluxu, následkem čehož se zvyšuje fluidita plazmatické membrány spermie. Mezi změny probíhající během kapacitace patří aktivace specifických iontových kanálů a influx vápníku, který vede ke zvýšené aktivitě adenylyl cyklázy, následně roste koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu cAMP. Ten aktivuje proteinkinázu A (PKA), která fosforyluje proteiny na tyrozinových zbytcích (Yanagimachi 1994; Tardif 2001).

Fosforylace v bičíku je pravděpodobně spojena s hyperkativací motility spermií po jejich uvolnění z oviduktálního rezervoáru. U kapacitovaných spermií se zvýšená fosforylace objevuje v akrozomu a v ekvatoriálním segmentu, což je pravděpodobně spojeno se změnami ve spermiích umožňujícími fúzi s oocytem (Nassar et al. 1999; Petrunkina et al. 2003).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

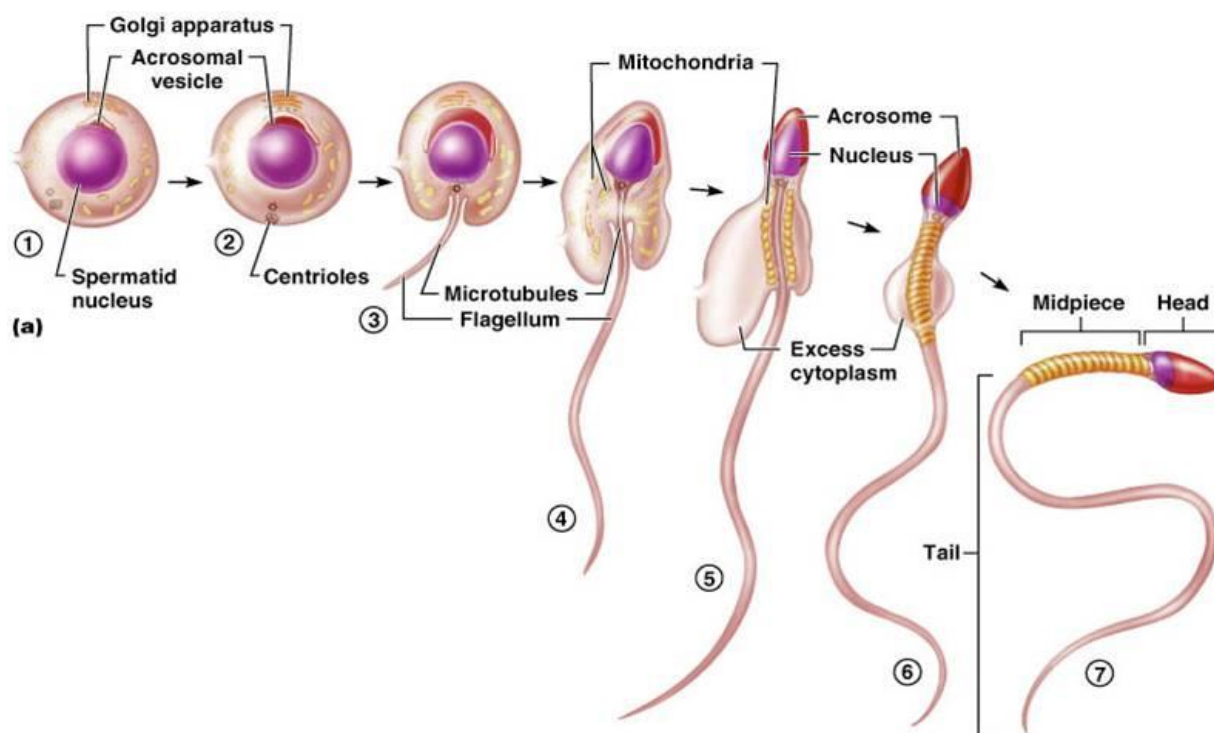
Cílem práce je popsat změny fosforylace vybraných proteinů kančích spermií před *in vitro* kapacitací a po kapacitaci.

Hypotéza práce vychází z předpokladu, že bude detekována rozdílná míra lokalizace fosforylovaných proteinů v ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermiích.

3 Literární přehled

3.1 Vývoj spermii

Spermie jsou samčí pohlavní buňky vznikající v semenotvorných stočených kanálcích varlete. Spermatogenní epitel, který kanálky vystýlá, je tvořen zárodečnými a podpůrnými Sertoliho buňkami. Zárodečné buňky představují stádia vývoje spermii počínaje spermatogoniemi A a B, které se mitoticky dělí, až po jejich vývojové stádium zvané spermatidy, uvolňované do lumen kanálku. Tímto okamžikem je zakončena fáze spermatogeneze. Ze spermatid se v následném procesu spermiogeneze vyvíjejí spermie (Gilbert 2006). Během vývoje spermii (obrázek 1) postupně dochází ke kondenzaci jádra, vytvoření bičíku a ztrátě cytoplazmy včetně některých organel (Parihar 2019). Z buněk s diploidním počtem chromozomů vznikají buňky s poloviční chromozomální výbavou. Nezralé spermie se přes odvodné kanálky varlete dostávají do nadvarlete, kde dozrávají (Gilbert 2006).



Obrázek 1: Vývoj spermie během spermiogeneze (Parihar 2019)

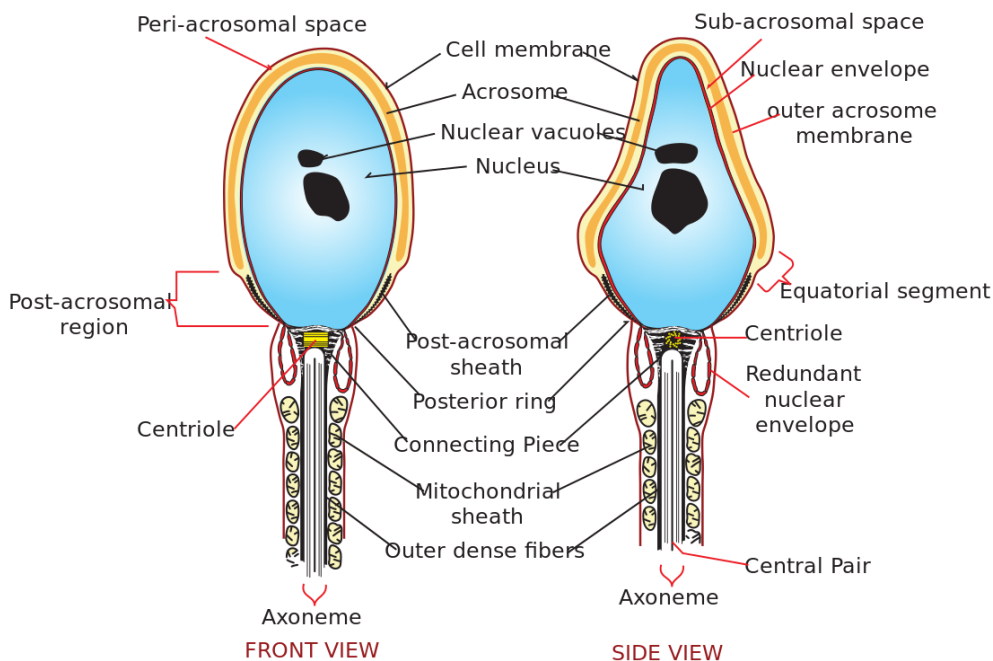
3.1.1 Morfologie spermie

Spermie jsou funkčně i stavebně vysoce specializované buňky. Sestávají ze dvou hlavních částí, a to z hlavičky obsahující jádro a akrozom bičíku, který zajišťuje motilitu spermie. Spermie jsou tvarem i velikostí druhově rozdílné (Gilbert 2000).

3.1.1.1 Hlavička spermie

Hlavička spermie obsahuje oválné ploché jádro s vysoce kondenzovaným chromatinem, který je tvořen DNA (deoxyribonukleovou kyselinou) (Gilbert 2000). V přední části hlavičky se nachází akrozom, buněčná organela podílející se na vazbě spermie na ZP oocyty. Akrozom pokrývá přední 2/3 hlavičky spermie. Má podobu vakuu obklopeného membránou topologicky rozlišenou na vnější a vnitřní akrozomální membránu, která překrývá přední úsek vnější jaderné membrány (Toshimori & Ito 2003).

V akrozomu se vyskytuje velké množství enzymů, z nichž některé se uplatňují při štěpení zony pellucidy (ZP) a tím napomáhají průniku spermie do vajíčka (Buffone et al. 2008). Jádro s akrozomem je obklopeno cytoskeletem a cytoplazmou. Hlavičku savčí spermie pokrývá plazmatická membrána rozdělená na oblast akrozomální se segmenty apikálním a ekvatoriálním a oblast postakrozomální (obrázek 2) (Brener et al. 2003). Ekvatoriální segment je specializovaná oblast plazmatické membrány hlavičky savčích spermií, která má druhově specifickou velikost a tvar (Yanagimachi 1994). Konečný tvar hlavičky vzniká během období pozdní spermiogeneze, kdy jsou oblé spematidy transformovány v prodloužené spermie. V maturované spermii byly objeveny strukturální vlastnosti ekvatoriálního segmentu, které se odlišují od plazmatické membrány překrývající přední akrozomální a postakrozomální oblasti (Kierszenbaum et al. 2003).

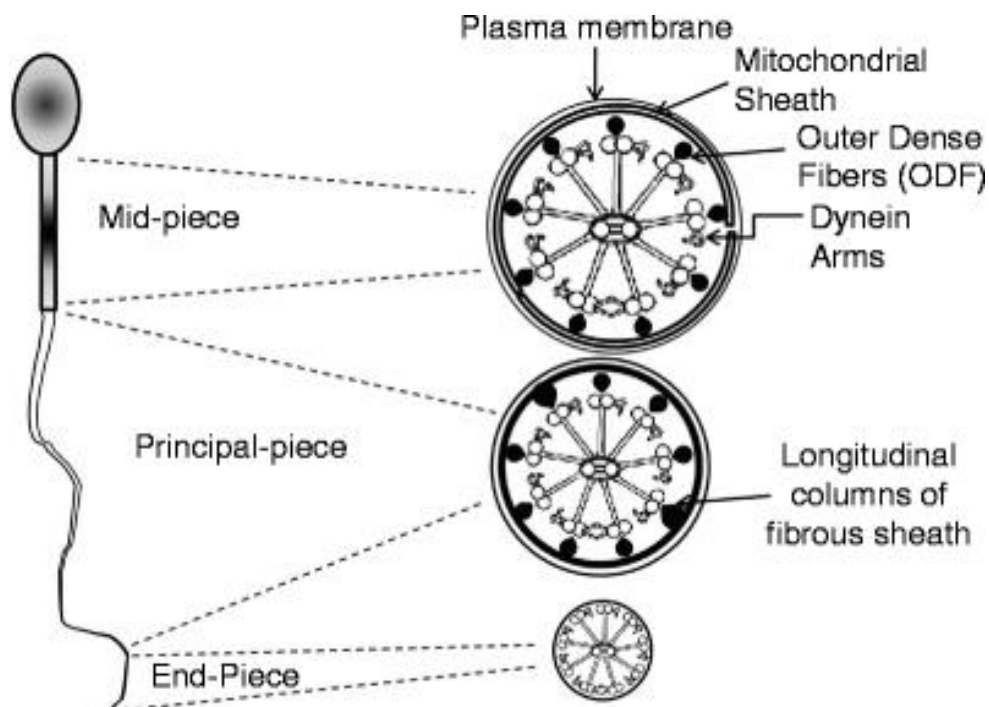


Obrázek 2: Hlavička spermie (Kamiseti 2016)

3.1.1.2 Bičik spermie

Bičik spermie je část buňky umožňující její transport samičím reprodukčním traktem směrem k vajíčku do místa oplodnění. Lze ho rozdělit na čtyři základní segmenty tvořené krčkem spojujícím hlavičku se zbývajícím úsekem bičíku, střední částí s mitochondriemi, hlavní částí a koncovou částí (obrázek 3). Bičíkem probíhá osové vlákno axonema, které je

tvořeno kruhově uspořádanými dvojicemi mikrotubulů a dvěma mikrotubuly centrálními. Dvojice mikrotubulů v kruhu jsou propojeny dyneinem, jehož spoje jsou děleny na vnější a vnitřní řadu dyneinových ramen. Ta slouží k přenosu energie potřebné k pohybu bičíku (Yanagimachi 1994).



Obrázek 3: Bičík spermie rozdělený na segmenty (Misro et al. 2012)

3.1.2 Epididymální maturace spermií

Savčí spermie opouštějící stočené kanálky varlat ještě nejsou schopné rozpoznat a oplodnit vajíčko. Tyto schopnosti získávají až při průchodem nadvarletem (Eddy & O'Brien 1984). Nadvarle (*epididymis*) je na varle navazující úsek vývodných pohlavních cest samce. Z anatomického hlediska se dělí na 3 části: hlavu (*caput*), tělo (*corpus*) a ocas (*cauda*). Při průchodu nadvarletem spermie získávají schopnost aktivního pohybu a také postupně funkčně dozrávají (Eddy et al. 1994).

Testikulární spermie v nadvarletí podstupují maturační proces, který zahrnuje komplex biochemických a fyziologických změn. V ocasu nadvarlete je maturace spermií dokončena, v této části nadvarlete se shromažďují až do doby ejakulace (Eddy et al. 1994).

Epididymální maturací je označována fáze vývoje spermií, kdy se stávají funkčně zralými, jsou schopny se aktivně pohybovat a podstoupit kapacitaci (Yanagimachi 1994). Během maturace spermií v nadvarletí dochází ke změnám v lipidovém a proteinovém složení plazmatické membrány. Membrána je obohacena o cholesterol a některé proteiny. Dochází k její stabilizaci, zabránění předčasné akrozomální reakci a postupně se vyvíjí receptory umožňující vazbu k ZP (Yanagimachi 1994).

3.1.3 Kapacitace spermíí

Ačkoli jsou ejakulované spermie pohyblivé a morfologicky kompletní, nejsou schopné oplodnit vajíčko. K dosažení fertilizační schopnosti musí spermie podstoupit mnoho biochemických a fyziologických změn, ke kterým dochází v samičím reprodukčním traktu. Tento proces se nazývá kapacitace (Eddy & O'Brien 1994; Yanagimachi 1994).

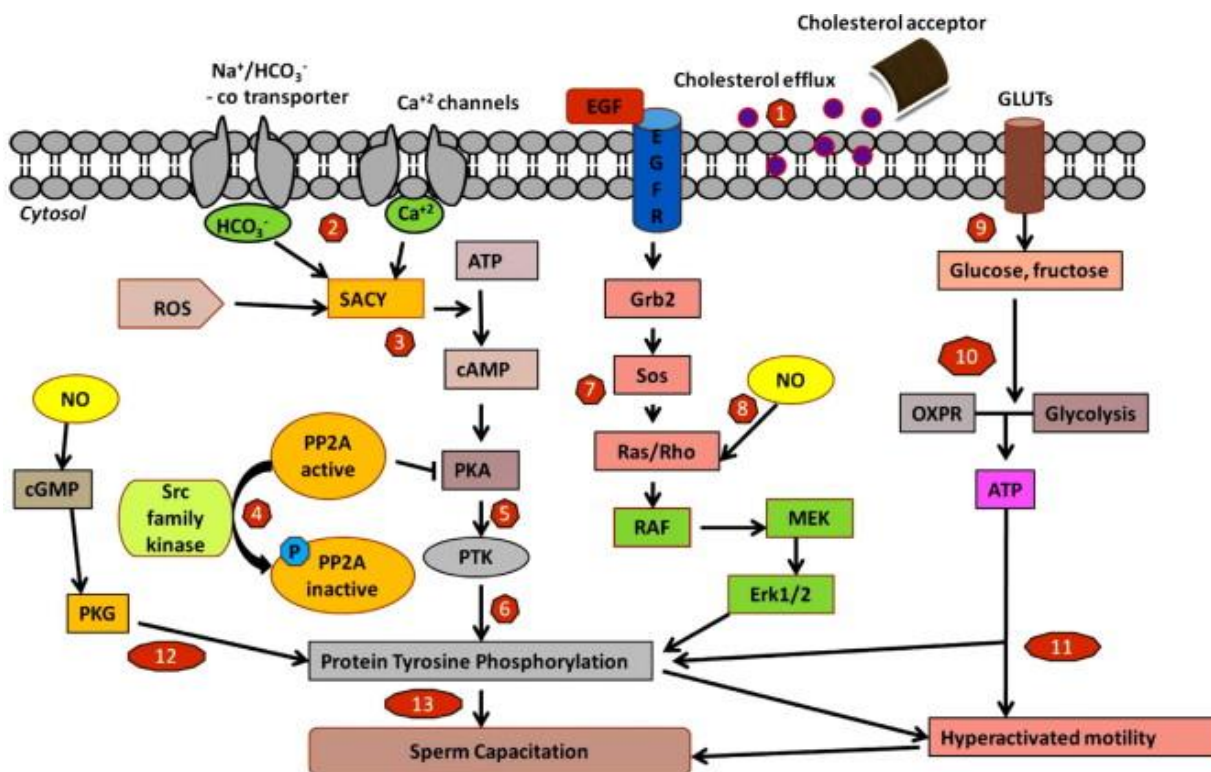
Kapacitace představuje finální fázi maturace spermíí, která propůjčuje savcím spermíím schopnost získat hyperaktivovanou motilitu a komunikovat se ZP oocyty, podstoupit akrozomovou reakci (AR), zahájit fúzi s plazmatickou membránou a oplodnit oocyt (Yanagimachi 1994; Tardif et al. 2001).

Po ejakulaci se do samičího reprodukčního traktu dostává velké množství spermíí, ale jen některé z nich procházejí úspěšně jednotlivými úseky pohlavního ústrojí a připojí se k epiteliálním buňkám vejcovodu v isthmické části. Tato interakce je mechanismem, který umožní selekci optimální populace spermíí (Hunter 2007). Kontakt spermíí s epiteliemi vejcovodu je zprostředkován molekulami obsaženými v apikální části povrchu spermie a sacharidy lokalizovanými v plazmatické membráně buněk oviduktu (Tardif et al. 2001).

Plazmatická membrána v souvislosti s kapacitací spermie podstupuje mnoho úprav včetně strukturálních změn uspořádání proteinů a lipidů a zvýšení její fluidity (Gadella & Harrison 2000). Dalšími ději souvisejícími s kapacitací jsou cholesterolový eflux, aktivace iontových kanálů (Fraser 1990; Naz 2004; Matás 2011) a influx vápníku, generování cAMP a produkce reaktivních forem kyslíku s následnou aktivací proteinkinázy A (PKA) (Awda & Buhr 2010).

Hydrogenuhlíčanovými ionty (HCO_3^-) indukovaná cAMP-PKA signální dráha iniciuje v plazmatické membráně několik klíčových procesů. Nejdříve dojde k destabilizaci plazmatické membrány translokací fosfolipidů, což je zprostředkováno aktivací PAK. Zvýšení fluidity membrány a její permeability je předpokladem pro redistribuci lipidů, zejména cholesterolu, k apikální oblasti hlavičky spermie (Flesch et al. 2001). Cholesterol je z plazmatické membrány aktivně transportován, což je proces nezbytný pro fertilizaci (Flesch et al. 2001). Eflux cholesterolu z apikální plazmatické membrány napomáhá formování lipidových raftů, jejichž součástí jsou proteiny nezbytné pro vazbu se ZP a pro indukci AR (Asquith et al. 2004).

Na obrázku 4 jsou znázorněny jednotlivé procesy vedoucí ke kapacitaci spermíí, kdy je nejprve z plazmatické membrány odstraněn cholesterol, dále jsou do procesu zapojeny HCO_3^- a Ca^{2+} . Zvýšením koncentrace cAMP je aktivována PKA, která fosforyluje určité proteiny na tyrozinových zbytcích, což vede k hyperaktivaci motility a kapacitaci spermíí.



Obrázek 4: Model regulace fosforylačních drah při kapacitaci spermií savců (Naresh et al. 2015)

3.1.3.1 Kapacitace *in vivo*

Pouze malá část spermií, které se dostávají do pohlavního systému samice, se uplatní v dalších etapách. Jen jejich poměrně malý počet postupuje do děložního krčku, kde se na diferenciaci morfologicky odpovídajících spermií podílí i přítomný hlen bohatý na glykoproteiny. Spermie postupují směrem k děloze a dále do vejcovodů (Yanagimachi 1994). Spermie zůstávají ve vejcovodech v podmínkách, které jim zabraňují v pohybu a prodlužují jejich fertilizační schopnost. Připojí se k oviduktálnímu řasinkovému epitelu. Jedná se o interakci molekul proteinů na povrchu spermie sacharidových řetězců s epiteliálními buňkami vejcovodu (Liberda et al., 2006). V oviduktálním rezervoáru spermie „čekají“ na ovulaci oocyty. Jen tak může být indukována kapacitace. Během této fáze dochází k selekci méněschopných spermií. Spermie navázané na oviduktální epitel se postupně uvolňují v závislosti na fázi jejich připravenosti na fertilizaci a na ovulaci oocyty. S tím souvisí tzv. hyperaktivace motility spermií. Kapacitaci uvolněných spermií urychluje rovněž působení oviduktální tekutiny (Yanagimachi 1994).

3.1.3.2 Kapacitace *in vitro*

Za normálních podmínek dochází ke kapacitaci v prostředí samičího ústrojí. Kapacitaci však lze navodit i v *in vitro* podmínkách při použití médií, která tento proces podporují. Většina informací, které jsou dosud o kapacitaci známy, byla získána právě v *in vitro* podmínkách.

Téměř všechna kapacitační média obsahují HCO_3^- , Ca^{2+} a sérový albumin (BSA), který je nutný u mnoha druhů jako akceptor cholesterolu (Carerra et al. 1996; Naz & Rajesh 2004).

Ačkoli existují nevelké odchylky ve složení kapacitačních médií, většina z nich se svým složením zásadně neliší (Naz 2004). Odlišná je situace u kanců, kdy je pro kapacitaci spermií *in vitro* nezbytná přítomnost HCO_3^- a zejména vápníku, ale ne BSA (Suzuki 1994; Wang 1995; Tardif 2002). S kapacitací spermií různých savčích druhů včetně prasete je spojena tyrosinová fosforylace různých proteinů (Galantino et al. 1997; Flesch et al. 1999). Tardif et al. (2001) uvádějí, že pro kapacitaci kančích spermií je pravděpodobně specifická tyrosinová fosforylace proteinu p32 a aktivace tyrosin kinázy. Na tyrozinu fosforylovaný protein p32 je zřejmě po kapacitaci přítomen v cytosolu i v plazmatické membráně spermie. Nepřímou imunofluorescencí byla během kapacitace prokázána jeho redistribuce do akrozomu, což odpovídá lokalizaci proteinu zapojeného do fáze získání fertilizační schopnosti spermie (Tardif et al. 2001). Protein p32 byl určen jako na tyrosinu fosforylovaná forma proteinu vázajícího akrozomální enzym proakrozin/akrozin (Dube et al. 2005). Bravo et al. (2005) poukázali na souvislost mezi úrovní tyrosinové fosforylace proteinu p32 a procentem kapacitovaných kančích spermií. Protein p32 by tudíž mohl sloužit jako marker kapacitace spermií u kanců.

3.1.3.3 Hyperaktivace motility spermií

V průběhu kapacitace spermie z důvodu ztráty některých povrchových proteinů pozbývají schopnost vázat se na epitel oviduktu. S tím souvisí i hyperaktivace pohybu spermií. Jedná se o výrazné zvýšení frekvence kmitání bičíku a s tím související změna charakteru pohybu spermie. Bičík hyperkativovaných spermií se více ohýbá a jeho vlnění není symetrické. Spermie se tak velmi často pohybují v kruzích a mnohem rychleji. Hnací pohyb bičíku je rozhodující pro uvolnění spermií z oviduktálních buněk istmického rezervoáru a penetraci ZP (Yanagimachi 1994)).

Na hyperaktivaci motility spermie mají v blízkosti místa fertilizace oocyty vliv efektorové molekuly jako je například progesteron produkovaný kumulárními buňkami oocyty (Yanagimachi 1994, Suarez & Dai 1995). Hyperaktivace souvisí se vstupem vápníku přes specifické kanály, známé jako CatSper, které jsou lokalizované v hlavní části bičíku (Qi et al. 2007).

3.1.4 Fertilizace

Fertilizací je označováno období, kdy spermie prochází kumulárním matrix oocyty, váže se na ZP a prodělává akrozomální reakci. Dochází k průniku ZP a k fúzi gamet (Wassarman et al. 1999; Florman & Ducibella 2006).

Po kontaktu spermie s oocytem nastává interakce proteinů plazmatické membrány spermie se sacharidovou složkou ZP. Během této tzv. primární vazby dochází ke kontaktu mezi oocytárním glykoproteinem ZP3, který je pokládán za přirozený spouštěč akrozomální reakce (Wassarman et al. 2001) a receptory na plazmatické membráně v oblasti akrozomální čepičky akrozom-intaktní spermie a je indukována akrozomální reakce (AR) (Yanagimachi 1994).

Po dokončení AR mezi spermií a ZP vajíčka dojde k sekundární vazbě. Ta je zprostředkována glykoproteinem ZP2 a receptory lokalizovanými na vnitřní akrozomální membráně spermie (Bleil et al. 1980). Po akrozomální reakci zůstává na hlavičce spermie jen vnitřní akrozomální membrána a ekvatoriální segment (Wassarman et al. 2001). Vnitřní akrozomální membrána je nazývána jako postnukleární čepička. Místo, kde se překrývá s akrozomem, je oblastí ekvatoriálního segmentu. Ekvatoriální segment spermie se akrozomální reakce neúčastní, ale má význam při vazbě a fúzi plazmatických membrán spermie a vajíčka (Wassarman 2001; Patrat et al. 2012).

Po kontaktu spermie se ZP oocyty je stimulována akrozomální reakce. Dojde k fúzi mezi vnější akrozomální a plazmatickou membránou spermie (Yanagimachi 1994; Visconti et al. 2002). Ve vnější membráně akrozomu vzniknou póry a obsah akrozomálního vakuolu s hydrolytickými enzymy se vylíje. Uvolněné enzymy napomáhají v degradaci ZP a odhalení nových membránových domén. Následujícím krokem je interakce s oolemou vajíčka a fúze vedoucí jeho fertilizaci (Bernecic et al. 2019). Do kumulárních buněk oocyty jsou schopné vstoupit jen kapacitované spermie s neporušeným akrozomem. K fúzi vnější akrozomální a plazmatické membrány spermie během AR dochází po předchozí depolymeraci aktinových sítí cytoskeletu v hlavičce spermie během kapacitace (Brener et al. 2003).

Po proniknutí spermie přes ZP vajíčka do jeho perivitellinního prostoru dojde ke splynutí oblasti ekvatoriálního segmentu plazmatické membrány spermie s plazmatickou membránou vajíčka (Yanagimachi 1994). Fúze gamet navodí exocytózu kortikálních granulí oocyty obsahujících enzymy, které změní uspořádání glykoproteinů ZP. Tím je zabráněno polyspermií oplodnění (Yanagimachi 1994; Wassarman et al. 2001; Patrat et al. 2012).

3.2 Fosforylace proteinů

Fosforylace proteinů je posttranslační modifikace řídící aktivitu proteinů v eukaryotických buňkách (Pawson 1995). V eukaryotických buňkách je běžným mechanismem pro řízení proteinové aktivity přidáním nebo naopak odstraněním fosfátových skupin serinových, threoninových nebo tyrozinových zbytků. Adice nebo odstranění fosfátových skupin může indukovat alosterické modifikace, což má za následek konformační změny proteinů a jejich aktivaci nebo naopak inaktivaci (Naz & Rajesh 2004).

V eukaryotických buňkách může být fosforylována až polovina proteinů, a to důsledkem přísně regulovaných protein kinázových a fosfatázových aktivit (Witze et al. 2007). Téměř všechny proteiny jsou v buňce fosforylovány na jednom nebo více místech. Fosforylace v buňkách je důležitá pro mnoho procesů, jako je buněčný cyklus, růst buněk, jejich diferenciaci, dělení buněk a také při mechanismu a transportu. Všechny tyto děje jsou pro buňky zcela zásadní. Je tedy zřejmé, že jakékoli chyby nebo nevhodná interpretace a šíření signálu způsobí degradaci pro celou buňku a velmi vážné následky pro celý organismus (Hunter 2007).

Fosforylace je velmi úzce svázána s aktivitou a funkcí proteinů, jelikož přímo ovlivňuje jejich konformační změnu. Tato změna působí na proteiny dvěma způsoby, ty mohou být aktivovány nebo inaktivovány (Hunter 2007).

3.2.1 Fosforylace ve spermích

Maturované spermie jsou vysoce specializované, transkripčně a translačně neaktivní buňky, a tedy neschopné syntetizovat nové proteiny (Hafez & Hafez 2000). Důležitost fosforylace či defosforylace proteinů jako prostředku ke změně jejich funkce je tedy vyšší než u mnoha jiných typů buněk (Urner & Sakkas 2003). Funkce spermií tak může být prostřednictvím posttranslační modifikace proteinů, jako je právě fosforylace, regulována (Wang et al. 2014; Yuan 2014). Fosforylace proteinů hraje klíčovou roli ve funkci spermií a řídí procesy jako je kapacitace, hyperaktivace motility a AR (Wera & Hemmings 1995).

Fosforylace ve spermích může probíhat na serinových, threoninových a tyrozinových zbytcích proteinů. Ačkoli o serin/threoninové fosforylaci doposud je jen málo informací, zdá se, že existuje na čase závislé zvýšení serinové nebo threoninové fosforylace během kapacitace spermií u druhů jako je člověk (O'Flaherty et al. 2004), kanec (Harayama 2003), křeček (Jha & Shivaji 2002) a myš (Jha et al. 2006). Ve spermii probíhají všechny uvedené typy, ale tyrozinová fosforylace je z nich nejdůležitější a je považována za výhradní ukazatel přenosu signálu v buňce (Manning et al. 2002; Urner & Sakkas 2003; Naz & Rajesh 2004).

Vazbou k epitelu oviduktu bylo zjištěno, že dochází u kančích spermií (Petrunkina et al. 2001) a spermií psa (Petrunkina et al. 2003) k potlačení tyrozinové fosforylace proteinů, a tím opoždění kapacitace, což napomáhá synchronizaci funkcí spermie s časem ovulace oocyty.

U mnoha savčích druhů je kapacitace spermií spojena se vzestupem na tyrozinu fosforylovaných (P-Tyr) proteinů (Visconti et al. 1995; Tardif et al. 2001). Primární oblastí ve spermii, kde probíhá tyrozinová fosforylace, je bičík, zejména jeho střední část s mitochondriemi. To naznačuje souvislost se změnami v parametrech motility, a tedy hyperaktivaci pohybu bičíku (Nassar et al. 1999; Petrunkina et al. 2003). Tardif et al. (2001) však uvádí, že fosforylace proteinů během kapacitace kančích spermií se změnami motility zřejmě zcela nespojuje, naopak Chamberland (2001) u spermií býka naopak přímou souvislost mezi fosforylací a změnami motility spermie zjistil. Při kapacitaci navíc dochází k redistribuci P-Tyr proteinů lokalizovaných v akrozomální oblasti hlavičky spermie (Flesch et al. 1999). Tyto proteiny se patrně účastní rozpoznání ZP a penetrace oocyty (Dubé et al. 2005). Ekvatoriální segment hlavičky je řídicím centrem zapojeným do fúze gamet savčí spermie a je oblastí s vyšší přítomností P-Tyr proteinů (Jones et al. 2008).

Flesch et al. (1999) uvádějí, že u spermií kance dochází při kapacitaci k tyrozinové fosforylaci proteinů plazmatické membrány. Tyto proteiny se uplatňují při vazbě spermie k ZP vajíčka a při indukci akrozomální reakce. Ačkoliv je tyrozinová fosforylace proteinů hlavním rysem procesu kapacitace, není stále zřejmé, jak přesně se tato fosforylace proteinů účastní rozpoznání a interakce se ZP a exocytózy akrozomu (Naz & Rajesh 2004).

V souvislosti s kapacitací spermií byla sledována tyrozinová fosforylace u některých konkrétních proteinů. Zvýšená koncentrace fosforylovaných proteinů byla zjištěna u 30 různých proteinů v kapacitovaných myších spermiích a u 6 proteinů u kapacitovaných spermií potkana (Salicioni et al. 2007). V lidské spermii to byly proteiny AKAP3 a AKAP4 (Wang et al. 2015).

3.2.2 Fosforylace během maturace spermií v nadvarleti

Míra fosforylace v proteinech spermií se během epididymální maturace mění. Jones et al. (2008) sledovali tyrozinovou fosforylací proteinů během epididymální maturace u několika savčích druhů. U kančích, býčích a beraních spermií zjistili zvýšenou intenzitu fosforylace zejména v subekvatoriálním segmentu a v přední části akrozomu, avšak s určitými mezidruhovými rozdíly a rozdíly týkajícími se fixace spermií. Obdobné výsledky publikovali i Jankovičová et al. (2018), kteří fosforylované proteiny na tyrozinu detekovali výlučně v ekvatoriálním segmentu a akrozomu u 95 % býčích spermií. Největší intenzita fosforylace byla zaznamenána u spermií v ocasu nadvarelete.

3.2.3 Fosforylace během fertilizace

Fertilizační funkce spermií je spjatá s aktivací intracelulárních signalizačních systémů a drah (Urner & Sakkas 2003). Ačkoliv je fosforylace proteinů spermií klíčovým znakem kapacitace, není jasné, jak je fosforylace proteinů zapojena do rozpoznávání a interakce ZP a akrozomální exocytózy (Naz et al. 2004). Fosforylace proteinů ve spermiích je naprosto zásadní pro oplodnění oocyty (Urner & Sakkas 2003). I v oocytech byla detekována (P-Tyr) proteinů. U spermií navázaných na oolemu oocyty byla u většiny druhů detekována fosforylace v hlavní části bičíku a také v jeho mitochondriální části (Carreara et al. 1996; Leclerc et al. 1997; Urner et al. 2001; Petrunkina et al. 2003). U kančích spermií bylo nejvíce proteinů fosforylovaných na plazmatické membráně hlavičky v oblasti akrozomu, který je zapojen do interakce se ZP a do dějů spojených s fúzí (Naz et al. 1991; Dube et al. 2005).

Nicméně v nedávné studii však zkoumali vztah mezi fosforylací proteinů a schopností myších spermií interagovat se ZP. Byly identifikovány dva chaperonové proteiny, konkrétně endoplazmin (ERp99/HSP90) a protein tepelného šoku 60 (HSP60), exprimované na povrchu myších spermií. Oba proteiny jsou fosforylovány na tyrozinu a jsou lokalizovány na plazmatické membráně hlavičky spermie, tedy oblasti, která se účastní vazby na ZP. Je tedy možné, že „aktivace“ těchto proteinů fosforylací na tyrozinu během kapacitace by mohla vyvolat konformační změny usnadňující tvorbu funkčního komplexu receptorů pro vazbu na ZP na povrchu hlavičky spermie (Asquith et al. 2004).

3.2.4 Serinová a threoninová fosforylace

Naz (1999) jako jeden z mála autorů popsal fosforylací na serinových a threoninových zbytecích proteinů, a to u lidských spermií. Byly určeny 4 skupiny proteinů (43-55 kDa, 94 kDa, 110 kDa a 190 kDa) fosforylovaných na serinu. Fosforylace na threoninu byla popsána u stejných skupin proteinů. Serinová i threoninová fosforylace na proteinech spermií se

zvyšovala během kapacitace nebo těsně po ní a rovněž ke zvýšení došlo i po vazbě k ZP (Naz 1999). Bylo zjištěno, že u kapacitovaných lidských spermií je fosforylace závislá na době inkubace. Dalším poznatkem bylo, že fosforylace na serinu a threoninu probíhá rychleji než fosforylace na tyrozinu (Beddu-Addo et al. 2005).

U kančích spermií bylo během kapacitace zjištěno velké množství proteinů fosforylovaných na serinových nebo treoninových zbytcích (Harayama & Nakamura 2008). Nekapacitované kančí spermie obsahují Ser/Thr fosforylované proteiny v postakrozomální oblasti. S postupující dobou kapacitace se Ser/Thr fosforylace v postakrozomální oblasti snižovala a naopak stoupala v oblasti bičíku (Harayama 2003).

3.2.5 Tyrozinová fosforylace

Tyrozinová fosforylace je považována za výlučný indikátor signální transdukční dráhy v kapacitaci spermií (Naz & Rajesh 2004). Její zvýšení je následkem aktivaci specifických enzymů tyrozinkináz. Tyto kinázy jsou aktivovány buď přímo nebo nepřímo PKA (Tardif et al. 2001).

Tyrozinová fosforylace byla detekována u spermií mnoha savčích druhů včetně člověka, potkana, králíka a myši (Naz 1991). Bylo zjištěno, že odlišné oblasti lidské spermie podstupují specifický sled fosforylací během kapacitace a při vazbě na ZP (Urner & Sakkas 2003). Aby bylo možné určit spojitost mezi odlišnými fosforylovanými proteiny a specifickými funkcemi spermie, je nutné lokalizovat tyrozin fosforylované (P-Tyr) proteiny v odlišných oblastech spermií. Bylo zjištěno, že P-Tyr proteinů ve spermiích během kapacitace roste u druhů jako je křeček (Visconti et al. 1999; Kulanand & Shivaji 2001), kocour (Pukazhenthii et al. 1998), kanec (Kalab et al. 1998), býk (Galantino et al. 1997; Galantino et al. 2004), hřebeček (Pommer et al. 2003) a člověk (Leclerc et al. 1996; Osheroff et al. 1999).

Bičík je považován za hlavní oblast spermie, která podstupuje tyrozinovou fosforylací. Je to zřejmě způsobeno hyperaktivací motility spermie. Bylo popsáno, že fosforylace na bičíku probíhá u většiny druhů včetně člověka (Naz et al. 1991; Carreara et al. 1996; Leclerc et al. 1997), opice (Mahony & Gwathmey 1999), křečka (Si & Okuno 1999), potkana (Lewis & Aitken 2001) a myši (Urner et al. 2001) s výjimkou kanců (Petrunkina et al. 2001).

U lidských spermií bylo zjištěno, že kapacitační podmínky a vystavení spermie ZP oocyty zvyšuje stupeň tyrozinové fosforylace ve spermiích jakož i počet fosforylovaných spermií, a to zejména v akrozomální oblasti hlavičky spermie (Naz et al. 1991). Byl zaznamenán posun signálu P-Tyr z oblasti bičíku nekapacitované spermie do akrozomální oblasti u spermie kapacitované. Protože akrozomální oblast spermie je zapojena do interakce se ZP, zvýšení P-Tyr se jeví jako předpokládaný krok (Naz 1991).

3.3 Faktory ovlivňující tyrozinovou fosforylací během kapacitace spermií

Během kapacitace dochází ve spermiích mnoha savčích druhů k vzestupu koncentrace vápníkových iontů (Suarez 1993). Bylo zjištěno, že se během kapacitace požadavky na koncentraci Ca^{2+} u různých druhů liší (Bravo et al. 2005). Na úlohu extracelulárního Ca^{2+} při tyrozinové fosforylací neexistují shodné pohledy. Podle některých názorů vzestup koncentrace

Ca²⁺ stupeň tyrozinové fosforylace u myších (Visconti 1995) a lidských (Leclerc 1998) spermií zvyšuje, jiné zdroje uvádějí opačný vliv (Carrera 1995; Luconi 1996), kdy Ca²⁺ ovlivňuje tyrozinovou fosforylaci negativně. Baker et al. (2004) udávají, že extracelulární Ca²⁺ tyrozinovou fosforylaci u lidské a myši spermie potlačuje snížením dostupnosti intracelulárního ATP.

Koncentrace hydrogenuhličitanu (HCO₃⁻) se v prostředí oviduktu v období ovulace zvyšuje. To aktivuje adenylátcyklázu, která je odpovědná za produkci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). cAMP je důležitý druhý posel v mnoha buněčných procesech a má přímý účinek na aktivitu protein kinázy A (PKA). Tento enzym hraje důležitou úlohu ve fosforylaci proteinů se serinovými nebo threoninovými zbytky. Posttransalční modifikace reguluje funkci proteinů a spermiím umožňuje reagovat na jejich okolní prostředí během kapacitace. Přesný mechanismus, kterým HCO₃⁻ řídí kapacitaci, je však dosud neznámý. Přísun HCO₃⁻ během kapacitace je spojen s vzestupem intracelulárního pH ve spermii (Vredenburgh 1995), s regulací cAMP hladin, reversibilní změnou ve stavbě lipidů plazmatické membrány spermie a s její hyperpolarizací. HCO₃⁻ indukuje rychlé změny v lipidovém složení plazmatické membrány a zvyšuje její fluiditu prostřednictvím cAMP/PAK dependentních drah ve spermiích (Gadella & Harrison 2000).

3.3.1 Tyrozinová fosforylace během kapacitace spermií

U kančích spermií indukuje kapacitace tyrozinovou fosforylaci proteinů plazmatické membrány, které zřejmě iniciují vazbu k ZP a navozují AR (Flesch et al. 1999). Jedná se o tyrozinovou fosforylaci 3 hlavních (27, 37, 40 kDa) a 3 vedlejších (34, 47, 55 kDa) proteinů plazmatické membrány (Flesch et al. 1999). Jak bylo zjištěno později, 2 proteiny (35 a 46 kDa) plazmatické membrány izolované z kapacitovaných kančích spermií ukázaly vysokou vazebnou afinitu se ZP (Flesch et al. 2001). Je zajímavé, že interakce mezi spermiemi a oviduktálními epitelem *in vitro* ovlivňuje tyrosinovou fosforylaci ve spermii a její kapacitaci. Selektivní vazba spermií k epitelu oviduktu (Petrunkina et al. 2001; Naz 2004) u kance potlačuje tyrozinovou fosforylaci proteinů spermie (Petrunkina et al. 2001) a u psa (Petrunkina et al. 2003) zpožďuje kapacitaci. Tato oviduktální regulace tyrozinové fosforylace a tedy také kapacitace může napomáhat synchronizaci funkce spermií s časem ovulace. Zdá se tedy, že stupeň tyrosinové fosforylace souvisí s úrovní kapacitace spermie. Visconti et al. 1995 (v Naz 2004) zkoumali souvislost mezi stupněm kapacitace a tyrosinové fosforylace u myších spermií. Zjistili časovou závislost vzestupu fosforylace některých specifických proteinů v rozmezí 40 – 120 kDa, které souvisejí se stavem kapacitace spermií (Visconti et al. 1995; Naz 1999; Naz & Rajesh 2004).

Je zajímavé, že interakce epiteliálních buněk vejcovodu modifikuje tyrozinovou fosforylaci a kapacitaci spermií *in vitro*. Selektivní vazba spermií na epitelie oviduktu potlačuje tyrozinovou fosforylaci proteinů kančích spermií (Petrukina et al. 2001). Tato modulace tyrosinové fosforylace a tím i kapacitace může pomoci synchronizovat funkci spermií s dobou ovulace (Petrukina et al. 2011).

Tyrozínová fosforylace během kapacitace spermií byla ale také pozorována u spermií nedomestikovaných zvířat, a to například u makaka jávského (Mahonny et al. 1999), u klokana dama a u kusua liščího (Sidhu et al. 2004). A také u lidských spermií (Leclerc et al. 1996; Osheroff et al. 2004). Fosforylace proteinu tyrozinu je tedy důležitou regulační cestou v modulaci událostí spojených s kapacitací (Naz & Rajesh 2004).

3.3.2 Detekce fosforylace na tyrozinu

Na tyrozinu fosforylované proteiny se přemísťují během kapacitace do oblasti akrozomu, což dokazuje, že fosforylace pravděpodobně souvisí se změnami v akrozomu vedoucí k indukci AR. U nekapacitovaných kančích spermií dochází pouze k fosforylaci ve středu hlavičky, v oblasti ekvatoriálního segmentu (Tardif et al. 2001). Fosforylované tyrozínové proteiny jsou obsaženy i v bičíku u myších a lidských spermií, což naznačuje, že mohou být zapojeny do hyperaktivace motility (Jha et al. 2006), která také souvisí s procesem kapacitace. Naproti tomu u kančích spermií na tyrozinu fosforylované proteiny v bičíku detekovány byly pouze v některých novějších studiích (Tradif et al. 2001).

Luño et al. (2013) se zabývali tyrozínovou fosforylací proteinů v kančích spermiích za přítomnosti oviduktálního epitelu, a to v podmínkách *in vitro*, kdy byly spermie inkubovány v kultuře epiteliálních buněk vejcovodu, *ex vivo*, ve vejcovodech poražených zvířat a také a *in vivo* v izolovaných vejcovodech po inseminaci prasnic. Pomocí nepřímé imunofluorescence byla porovnána distribuce na tyrozinu fosforylovaných proteinů u spermií navázaných i nenavázaných na epitel oviduktu. Bylo zjištěno, že u spermií nenavázaných k oviduktálnímu epitelu je vyšší množství na tyrozinu fosforylovaných proteinů oproti spermiím navázaným. To naznačuje, že vazba spermií k epitelu vejcovodů je mechanismem, který prodlužuje jejich přežívání do doby ovulace vajíčka (Luno et al. 2013).

4 Materiál a metodika

4.1 Spermie

Pro experimenty byly používány ejakulované spermie kanců. Jednalo se o nativní ejakulát a inseminační dávky spermií z inseminační stanice LIPRA PORK, a. s. Skršín. Nativní ejakulát byl přepravován v odběrové plastové nádobě v polystyrenovém boxu a zpracován byl ihned po doručení do laboratoře KVD ČZU. Konzervované dávky vyrobené ihned po odběru byly ve stejný den dopraveny do laboratoře. Byly převáženy a v laboratoři uchovávány v temperovaném boxu při 17 °C, zpracovány byly následující den. Epididymální spermie byly izolovány z ocasu nadvarlete *post mortem* pomocí injekční stříkačky.

4.1.1 Zpracování spermií

Z nativních i inseminačních dávek spermií byly vyrobeny vzorky pro laboratorní metody. Kvalita vzorků byla ověřena mikroskopicky; byla zkontrolována viabilita spermií prostřednictvím stolního mikroskopu Nikon Eclipse E200 (Nikon, Japonsko) při zvětšení 100x. Následujícím krokem zpracování ejakulátu a epididymálních spermií bylo oddělení semenné plazmy/epididymální tekutiny a spermií na centrifúze (NF 400R, Merci, ČR) při 250 x g po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Odstředěním byla získána peleta spermií, která byla třikrát promyta PBS (Phosphate-buffered saline, Sigma-Aldrich, USA) a vždy centrifugována při 250 x g po 10 minut při laboratorní teplotě.

4.1.2 Určení koncentrace spermií v suspenzi

Ke stanovení počtu spermií byla použita Bürkerova komůrka sestávající z podložního skla, na jehož jedné straně jsou zářezy tvořící mřížku a krycího sklíčka, pod které bylo aplikováno 20 µl suspenze spermií naředěných v destilované vodě (10 µl zpracovaného ejakulátu a 990 µl destilované vody). Pod mikroskopem s výhřevnou destičkou temperovanou na 37 °C byly počítány jednotlivé buňky ve 40 velkých čtvercích. Počet buněk v 1 ml suspenze byl vypočten podle vzorce: počet spermií ve 40 velkých čtvercích násobený faktorem konverze (1000) / plocha pole (0,04 mm²) x počet čtverců (40) x 0,1 (hloubka komůrky v mm) x použité ředění suspenze (1/100).

4.1.3 Kapacitace ejakulovaných spermií *in vitro*

Suspenze ejakulovaných spermií po odstranění semenné plazmy byla 2 x promyta v PBS a odstředěna při 300 x g po dobu 10 minut při laboratorní teplotě na odstředivce NF 400R (Merci, ČR). Po odstředění byl vždy odstraněn supernatant. Po opakovaném promytí a odstředění byla získána peleta. Ta byla resuspendována v 10 ml kapacitačního média HEPES (pro přípravu 1 litru bylo použito: 2,383 g Hepes; 6,6634 g NaCl; 0,2386 g KCl; 0,0408 g NaH₂PO₄; 1,4 ml laktát sodný; 0,10018 g MgCl₂*6H₂O; 0,0220 g pyruvát sodný; 2,186 g sorbitol; 0,025 ml gentamicin; 0,065 g penicilin; 0,1 g PVA Poly (vinylalkohol), do 50 ml bylo přidáno 0,099 g glukózy; 0,0275 g pyruvátu sodného; 1 g BSA; 0,0084 g NaHCO₃; 0,0147 g CaCl₂*2H₂O.

Kapacitace probíhala v termostatu s 5 % CO₂ při 38,5 °C po dobu 3 hodin v případě nativních spermií, 1,5 hodiny u spermií z inseminační dávky. Po kapacitaci byly spermie odstředěny při 300 g po dobu 10 minut při laboratorní teplotě a získané peletky byly opakovaně promyty v PBS.

4.1.4 Indukce akrozomální reakce spermií kapacitovaných *in vitro*

K suspenzi kapacitovaných spermií o objemu 500 µl bylo pro indukci akrozomální reakce přidáno 10 µl ionoforu (100 µM Calcium Ionophore, Sigma Aldrich, USA). Akrozomální reakce *in vitro* probíhala v termostatu v prostředí s 5 % CO₂ a při 38,5 °C po dobu 1 hodiny.

4.2 Metoda nepřímé imunofluorescence

4.2.1 Fixace spermií

Pro posuzování fosforylace proteinů u ejakulovaných, *in vitro* kapacitovaných a akrozomově zreagovaných spermií byla zvolena fixace 2 % formaldehydem ve vodě s 2 % BSA, která byla vyhodnocena jako vyhovující v rámci diplomové práce Fixační metody pro sledování fosforylovaných proteinů v kančích spermiích pomocí imunofluorescenční mikroskopie Bc. P. Černé v roce 2019.

4.2.2 Fixace 2 % formaldehydem ve vodě s 2 % BSA

Suspenze ejakulovaných nebo kapacitovaných spermií v PBS (asi 10⁷ buněk v 1 ml) byla v objemu 20 µl napipetována do kroužku nakresleného parafínovou tužkou (Liquid Blocker, PAP – pen for immunostaining, Sigma-Aldrich, USA) na podložním mikroskopickém skle. Do kapky spermií bylo přidáno 50 µl 2 % formaldehydu s 2 % BSA. Po inkubaci po 30 minut při laboratorní teplotě byla skla lehce opláchnuta v PBS a při laboratorní teplotě osušena. Takto zhotovené vzorky byly ihned dále zpracovány nebo byly uchovány v lednici pro pozdější použití.

4.2.3 Detekce fosforylovaných proteinů pomocí protilátky proti fosfotyrozinu

Pro detekci fosforylovaných proteinů byla použita připravená skla se spermiiemi fixovanými 2 % formaldehydem ve vodě s 2 % BSA. Skla se vzorky spermií byla omyta PBS a osušena při laboratorní teplotě. Poté bylo na vzorky v napipetováno 150 µl blokačního činidla SuperBlock (Thermo Scientific, USA). Inkubace probíhala po 30 minut ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Poté byly preparáty omyty PBS a osušeny. Následovalo nanesení primární monoklonální myší protilátky proti fosfotyrozinu (klon 4G10; EMD Millipore, USA), v ředění 1 : 300 v PBS v množství 100 µl do jednoho ze dvou kroužků na podložním skle. Druhý kroužek byl určen pro negativní kontrolu, napipetováno bylo 100 µl PBS. Následovala inkubace ve vlhké komůrce při 4 °C přes noc. Druhý den byla skla se vzorky opakovaně promyta v PBS a osušena. Do obou kroužků byla nanesena sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor TM 488 (Invitrogen, USA) ředěná 1 : 300 v PBS

v množství 100 μ l. Po inkubaci 30 minut ve tmě ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě byla skla opláchnuta v PBS a osušena. Do obou kroužků byl poté nanesen PNA lektin značený rhodaminem (Vector Laboratories, USA) ředěný 1 : 1000 v PBS v množství 100 μ l. Následovala inkubace 30 minut ve vlhké komůrce ve tmě při laboratorní teplotě. Po opakovaném omytí skel PBS a destilované vodě byla skla osušena a zamontována prostřednictvím média Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, USA). Zamontováním bylo dosaženo prodloužení doby imunofluorescence vzorku a DAPI byla označena jaderná DNA. K vyhodnocení byl použit imunofluorescenční mikroskop Nikon Eclipse E600. Preparáty byly snímány kamerou (Nikon Digital Sight DS-Fi1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

4.3 Western blot analýza

4.3.1 Příprava proteinového extraktu ze spermií pro SDS elektroforézu

Vytvořené a zmražené pelety spermií o objemu přibližně 50 μ l byly nejdříve při laboratorní teplotě povoleny. Poté bylo k peletě přidáno 150 μ l neredukujícího vzorkového pufru (0,5 M Tris HCl pH 6,8; glycerol; 2 % SDS; 0,05 % bromfenolová modř). Vzniklá suspenze byla opakovaně, celkem po dobu 30 minut, střídavě roztřepávána a chlazena na ledu. Následovalo povaření 5 minut v termobloku CH-100, Heating/Cooling Dry Block (Biosan, Litva) a stočení na odstředivce při 10 000 g po dobu 2 minut. K odebranému supernatantu o objemu 100 μ l bylo přidáno 5 μ l merkptoetanolu a vzorek byl opět povařen. Získaný lyzát byl použit pro SDS elektroforézu.

4.3.2 SDS elektroforéza

SDS (dodecylsírán sodný) je detergent, který uděluje proteinům záporný náboj, a proto je možné proteiny od sebe separovat v polyakrylamidovém gelu podle molekulové hmotnosti. Pro elektroforézu byla použita aparatura Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad, USA).

Extrahované proteiny byly separovány pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Byl použit 12 % separační gel a 4 % zaostřovací gel.

Příprava 12 % separačního gelu:

2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) (Bio-Rad, USA)

4,0 ml 30 % akrylamid/bis-akrylamid (Bio-Rad, USA)

3,5 ml destilovaná voda

100 μ l 10 % SDS (P-Lab, ČR)

4,5 μ l TEMED (tetramethylethan-1,2-diamin; GE Healthcare, Švédsko)

70 μ l APS (10 % persíran amonný; Merci, ČR)

Roztok separačního gelu byl nalit mezi skla aparatury a byl převrstven destilovanou vodou. Po asi 30 minutách, kdy došlo k polymeraci gelu, byla destilovaná voda odstraněna a na separační gel byl nalit 4 % roztok zaostřovacího gelu.

Příprava 4 % zaostřovacího gelu:

1,52 ml destilovaná voda
625 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) (Bio-Rad, USA)
325 µl 30 % akrylamid/bis-akrylamid
25 µl 10 % SDS
3,8 µl TEMED
35 µl 10 % APS

Po nalití roztoku zaostřovacího gelu byl mezi skla vložen 10jamkový hřeben. Po asi 30 minutách polymerace gelu byla sestava skel vložena do nádoby aparatury naplněné elektrodoým pufrem (Tris 3 g, glycin 14,4 g, SDS 1 g v 1 l destilované vody, pracovní roztok ředěn 1:4). Po vyjmutí hřebenů byly do jamek pomocí Hamiltonovy stříkačky naneseny vzorky proteinů spermií v redukujícím vzorkovém pufru v množství 15 µl. Pro určení přibližné molekulové hmotnosti byl do některých jamek nanesen předbarvený molekulový standard Standard Dual Xtra Standards (Bio-Rad, USA). Elektroforéza probíhala nejdříve přibližně 30 minut při napětí 80 V, kdy vzorky procházely přes vrstvu zaostřovacího gelu, poté asi 1 hodinu při napětí 140 V.

4.3.3 Elektropřenos proteinů separovaných SDS elektroforézou na nitrocelulózovou (NC) membránu

Po elektroforéze byl gel vyjmut ze skel aparatury a propláchnut destilovanou vodou. Gel byl přenesen na NC-membránu (GE Healthcare Amersham Hybond-ECL, USA) a pomocí chromatografických papírů Whatman, porézních houbiček a perforované kazety byl vytvořen sendvič, který byl vložen do blotovací aparatury (Bio-Rad, USA). Sendvič byl vložen tak, aby proteiny se záporným nábojem z gelu přecházely k NC membráně. Nádoba aparatury byla naplněna blotovacím pufrem (10 x TG Buffer, Bio-Rad, USA) ředěným 1 : 10 s 20 % metanolem. Elektropřenos proteinů probíhal při konstantním elektrickém proudu 0.5 A po dobu přibližně 1 hodiny. Po ukončení elektropřenosu byla kazeta z aparatury vyjmuta a membrány se separovanými proteiny poté použity pro imunodetekci proteinů za použití specifické protilátky.

4.3.4 Vizualizace proteinů na NC-membráně prostřednictvím barvení Ponceau

Účinnost přenosu proteinů na NC-membránu a jejich dostatečná koncentrace ve všech vzorcích byla zjištěna pomocí barvení Ponceau S red (0,1 % Ponceau S v 5 % kyselině octové; Sigma Aldrich, USA) po 1 minutu. Odbarvení před provedením imunodetekce bylo provedeno promytím destilovanou vodou a poté roztokem PBS (Sigma-Aldrich, USA).

4.3.5 Imunodetekce na NC-membráně

Nitrocelulózová membrána byla po elektropřenosu opláchnuta destilovanou vodou a následně PBS. Dalším krokem byla deaktivace vazebných míst na membráně pomocí 5 % sušeného mléka (Blocking agent, Bio-rad, USA) v PBS 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byla membrána vždy po dobu asi 5 minut 2 x promyta v PBS s 0,05 % Tweenem 20 (PBS-T) pro odstranění nescifických vazeb. Poté byla na membránu nanášena primární myší monoklonální protilátka proti fosfotyrozinu (klon 4G10; EMD Millipore, USA), ředěná v PBS 1 : 1000 a inkubována přes noc při 4 °C. Po opakovaném promytí membrány v PBS-T byla nanášena sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (Bio-Rad, USA) v ředění 1 : 3000 v PBS. Inkubace probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byla membrána opakovaně promyta v PBS-T a v PBS. Následovala detekce proteinů (vizualizace) metodou chemiluminiscence se substrátem SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fischer Scientific, USA) na přístroji Azure c300 Gel Imaging System (Azure Biosystems, USA). Pro vzájemné srovnání jednotlivých nanášek vzorků a kontrolu koncentrace proteinů v nanáškách byla použita detekce α -tubulinu za použití myší monoklonální protilátky α -tubulinu (DM1A; Sigma-Aldrich, USA) v koncentraci 1 : 5000 v PBS. Jako sekundární protilátka byla použita protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (Bio-Rad, USA) v ředění 1 : 3000 v PBS. Výsledky detekce byly vyhodnoceny denzitometrickou analýzou v programu C-Digit Studio (LICOR, USA) a zhodnoceny v programu Microsoft Excel a GraphPad.

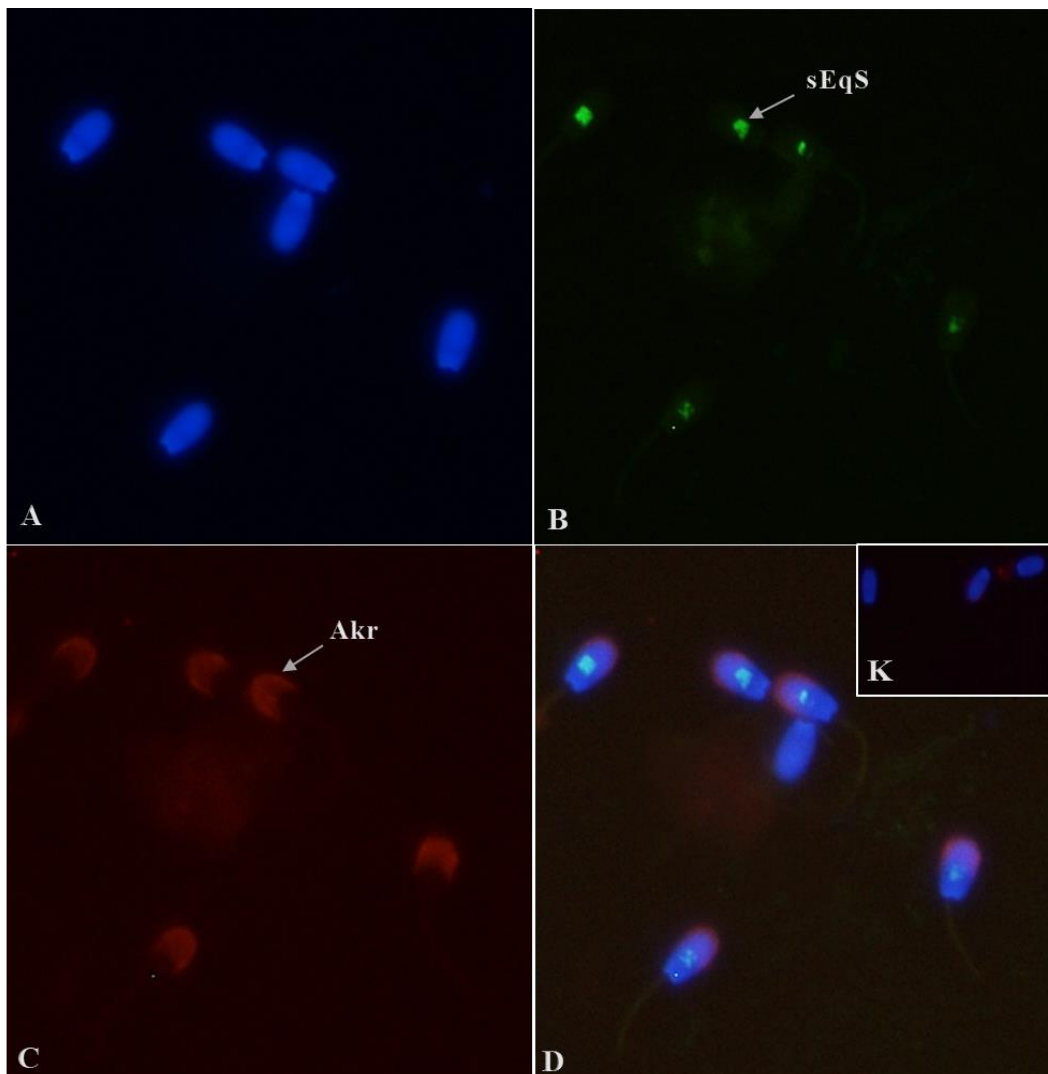
5 Výsledky

5.1 Lokalizace fosforylovaných proteinů v kančích spermích

Byla provedena lokalizace na tyrozinu fosforylovaných (P-Tyr) proteinů u nekapacitovaných a *in vitro* kapacitovaných kančích spermíí (kap. 3.1.3) a spermíí po indukci akrozomální reakce (kap. 4.1.4). Pro detekci proteinů ve spermích byla zvolena imunofluorescenční mikroskopie s použitím zafixovaných spermíí pomocí 2 % formaldehydu (kap. 4.3.).

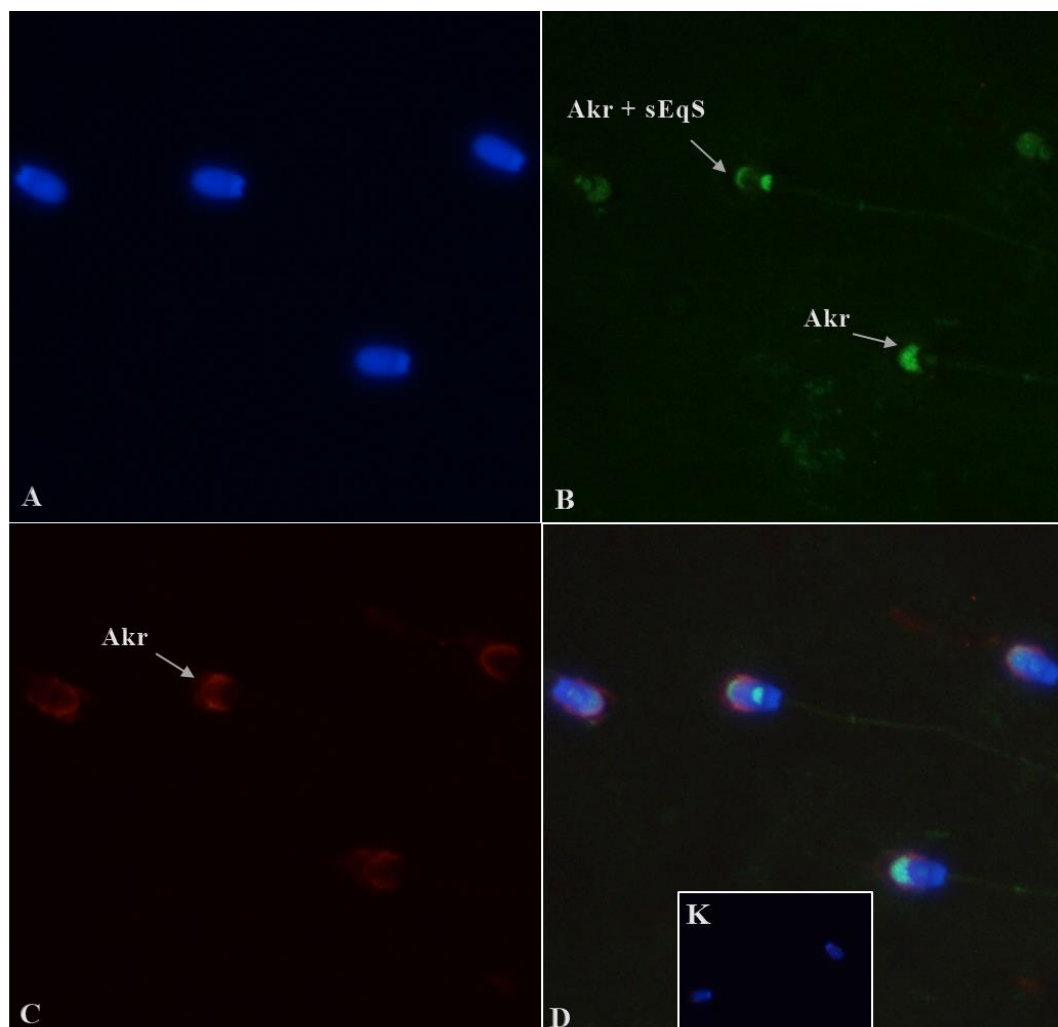
Výsledky detekce fosforylovaných proteinů pomocí protilátky proti fosfotyrozinu v kančích spermích jsou uvedeny níže na následující sérii snímků z imunofluorescenčního mikroskopu. Pro lepší přehlednost byl každý snímek rozdělen na čtyři části dle fluochromů. Na prvním snímku lze pozorovat imunofluorescenci v hlavičkách spermíí se značeným jádrem fluochromem DAPI (modrá). Druhý snímek je s fluochromem označující reakci s protilátkou proti P-Tyr (zelená), třetí pak s označenými akrozomy pomocí PNA lektinu (červená) a na posledním snímku jsou všechny tři sloučeny dohromady. U všech fixovaných aparátů nebyla negativní kontrola inkubována s primární protilátkou a nebyla zaznamenána žádná imunofluorescence sekundární protilátky.

V následující sekvenci snímků (obrázek 5) je zobrazena detekce fosforylace proteinů u ejakulovaných spermíí z čerstvého (nativního) ejakulátu. Fosforylované proteiny jsou viditelně lokalizovány u většiny spermíí v subekvatoriálním segmentu (obrázek 5B a 5D), u některých spermíí nebyla fosforylace detekována. Pomocí šipek jsou znázorněny fosforylované části v subekvatoriálním segmentu (sEqS) spermie a označen neporušený akrozom pomocí lektinu PNA (Akr, obrázek 5C).



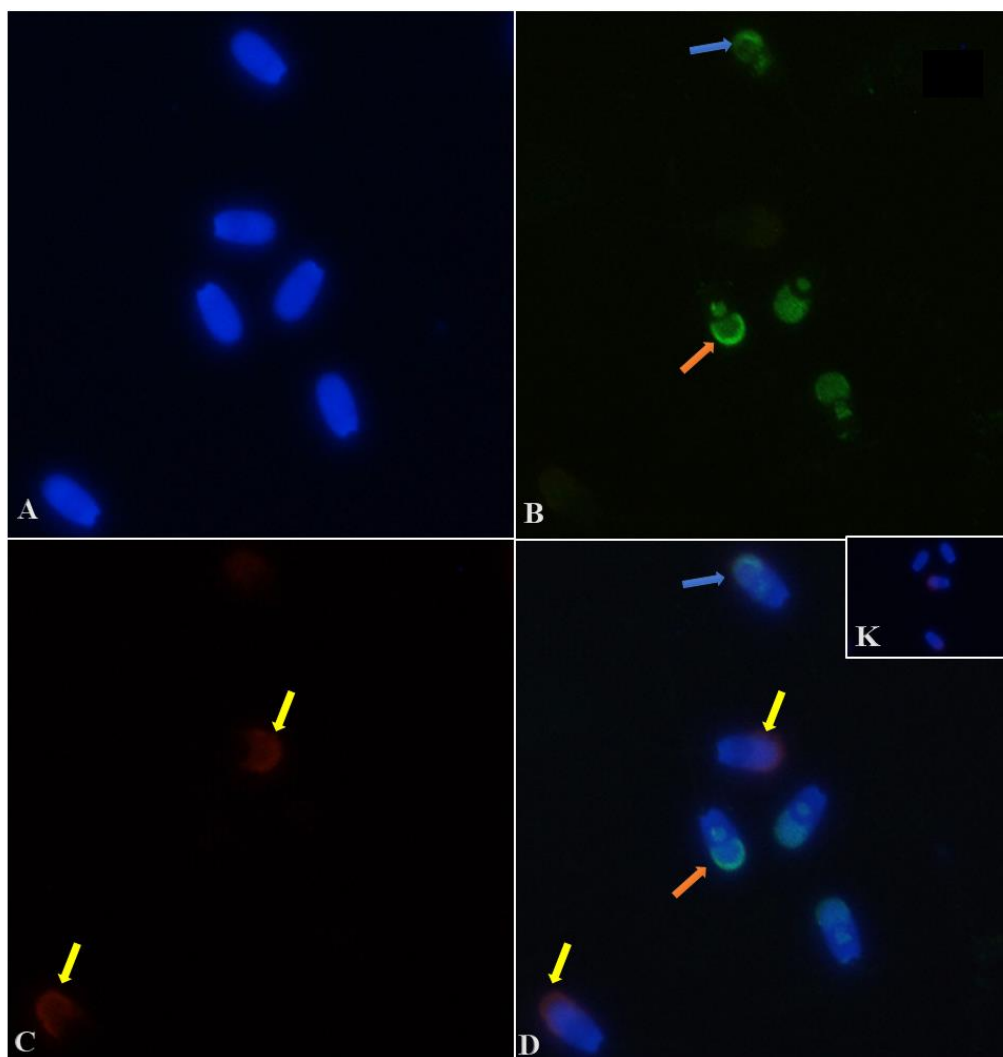
Obrázek 5: Lokalizace fosforylovaných proteinů v ejakulovaných spermích z nativního ejakulátu: (A) označená jádra spermíí pomocí DAPI (modře); (B) reakce s protilátkou proti fosfotyrozinu (zeleně), šipka značí pozitivní reakci s protilátkou v subekvatoriálním segmentu (*sEqS*); (C) viditelné akrozomy spermíí značené pomocí PNA lektinu (červeně); (D) sloučený snímek; *Akr* akrozom, *sEqS* subekvatoriální segment; (K) negativní kontrola, zvětšení 400x.

V následující sekvenci snímků je zobrazena detekce fosforylace proteinů na tyrozinu u *in vitro* kapacitovaných spermií z čerstvého (nativního) ejakulátu. Fosforylace byla detekována u části spermií pouze v subekvatoriálním segmentu (sEqS), v některých spermiích byla fosforylace navíc nalezena i v akrozomu (obrázek 6B a 6D). Na tyto spermie je poukázáno šipkou (Akr + sEqS). U vazby s PNA lektinem šipka ukazuje na přítomnost akrozomu (obrázek 6C).



Obrázek 6: Lokalizace fosforylovaných proteinů v *in vitro* kapacitovaných spermiích z nativního ejakulátu: (A) označená jádra spermií pomocí DAPI (modře); (B) reakce s protilátkou proti fosfotyrozinu (zeleně), šipky značí pozitivní reakci s protilátkou v subekvatoriálním segmentu a akrozomu; (C) viditelné akrozomy spermií značené pomocí PNA lektinu (červeně); (D) složený snímek; Akr akrozom, sEqS subekvatoriální segment; (K) negativní kontrola, zvětšení 400x.

Na následujících snímcích je zobrazena detekce fosforylace proteinů na tyrozinu u spermií, které prošly akrozomální reakcí z čerstvého (nativního) ejakulátu. Většina spermií prošla akrozomální reakcí a nejsou u nich již viditelné akrozomy (obrázek 7C a 7D). Fosforylované proteiny byly u většiny spermií detekovány slabě v přední části hlavičky po proběhlé AR a zároveň v subekvatoriálním segmentu (obrázek 7B a 7D). U některých spermií byla viditelná silnější detekce v přední části hlavičky (oranžová šipka), některé spermie nebyly značeny ani v subekvatoriálním segmentu (modrá šipka). U spermií, které neprošly akrozomální reakcí, nebyla zaznamenána žádná fosforylace (žlutá šipka).

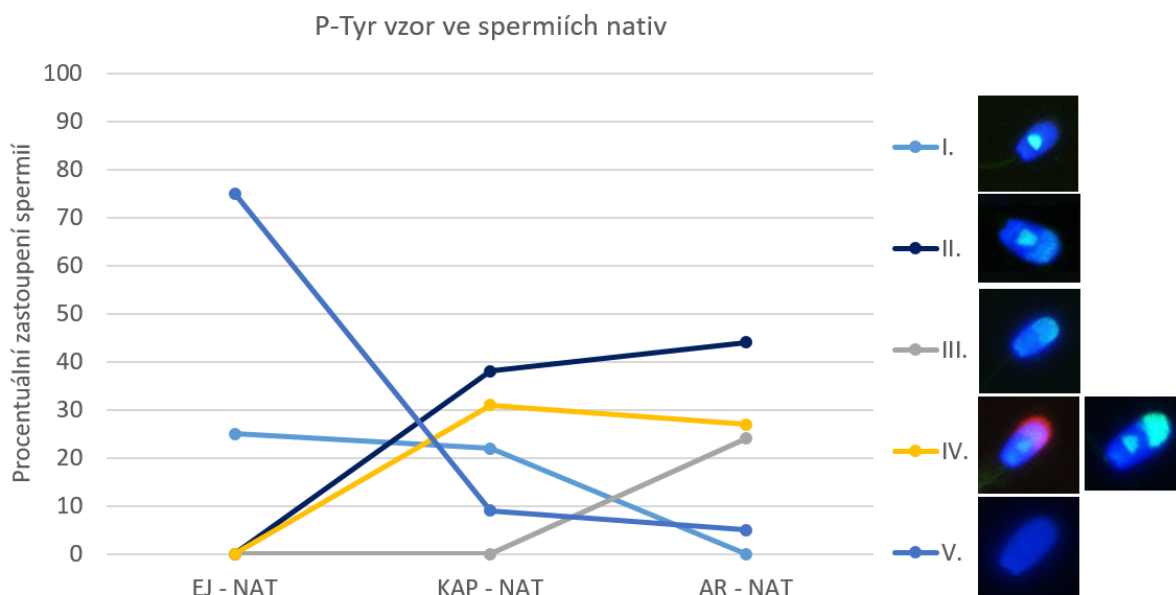


Obrázek 7: Lokalizace fosforylovaných proteinů ve spermiích z nativního ejakulátu po akrozomální reakci (AR): (A) označená jádra spermií pomocí DAPI (modře); (B) reakce s protilátkou proti fosfotyrozinu (zeleně); (C) značený akrozom spermií pomocí PNA lektinu (červeně); (D) složený snímek; oranžovou šipkou je poukázáno na detekci v přední části hlavičky spermie; modrá šipka ukazuje slabou reakci pouze v přední části hlavičky spermie bez akrozomu; žlutá šipka ukazuje spermie, u kterých neproběhla AR; Akr akrozom, sEqS subekvatoriální segment; (K) negativní kontrola, zvětšení 400x.

V grafu 1 je porovnání zastoupení jednotlivých fosforylačních vzorů (I. – IV.) u spermií ejakulovaných, po *in vitro* kapacitaci a AR z nativního ejakulátu. Bylo určeno procentuální zastoupení v každé skupině spermií vždy ze 100 buněk. U ejakulovaných spermií z čerstvého ejakulátu byla nalezena fosforylace v subekvatoriálním segmentu (sEqS) pouze u 25 % spermií (vzor I.), zbylé spermie nebyly označeny protilátkou proti fosfotyrozinu (vzor V.).

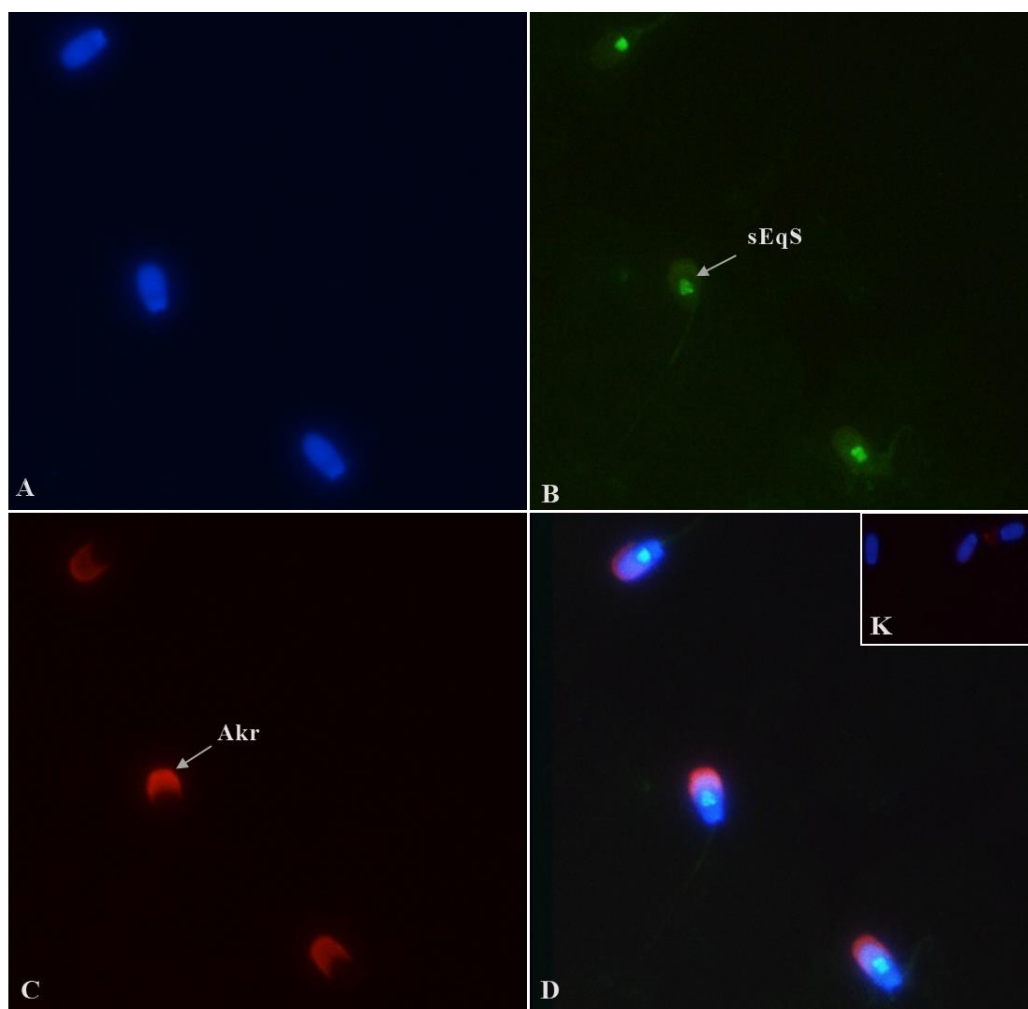
U *in vitro* kapacitovaných spermií z nativního ejakulátu byla zaznamenána fosforylace u 31 % v sEqS a zároveň v akrozomu (vzor IV.). U 22 % spermií proběhla fosforylace pouze v sEqS (vzor I.). U 38 % spermií byla nalezena fosforylace pouze slabě v akrozomu a zároveň silněji v sEqS (vzor II.). A u 9 % spermií neproběhla fosforylace vůbec (vzor V.).

U nativních spermií prošlých AR proběhla fosforylace v přední části hlavičky nebo akrozomu a zároveň v sEqS u 27 % spermií (vzor IV.). U 24 % spermií byla fosforylace nalezena pouze slabě v přední části hlavičky spermie (vzor III.). A u 44 % spermií po AR byla fosforylace detekována pouze slabě v přední části hlavičky spermie a také v sEqS (vzor II.).



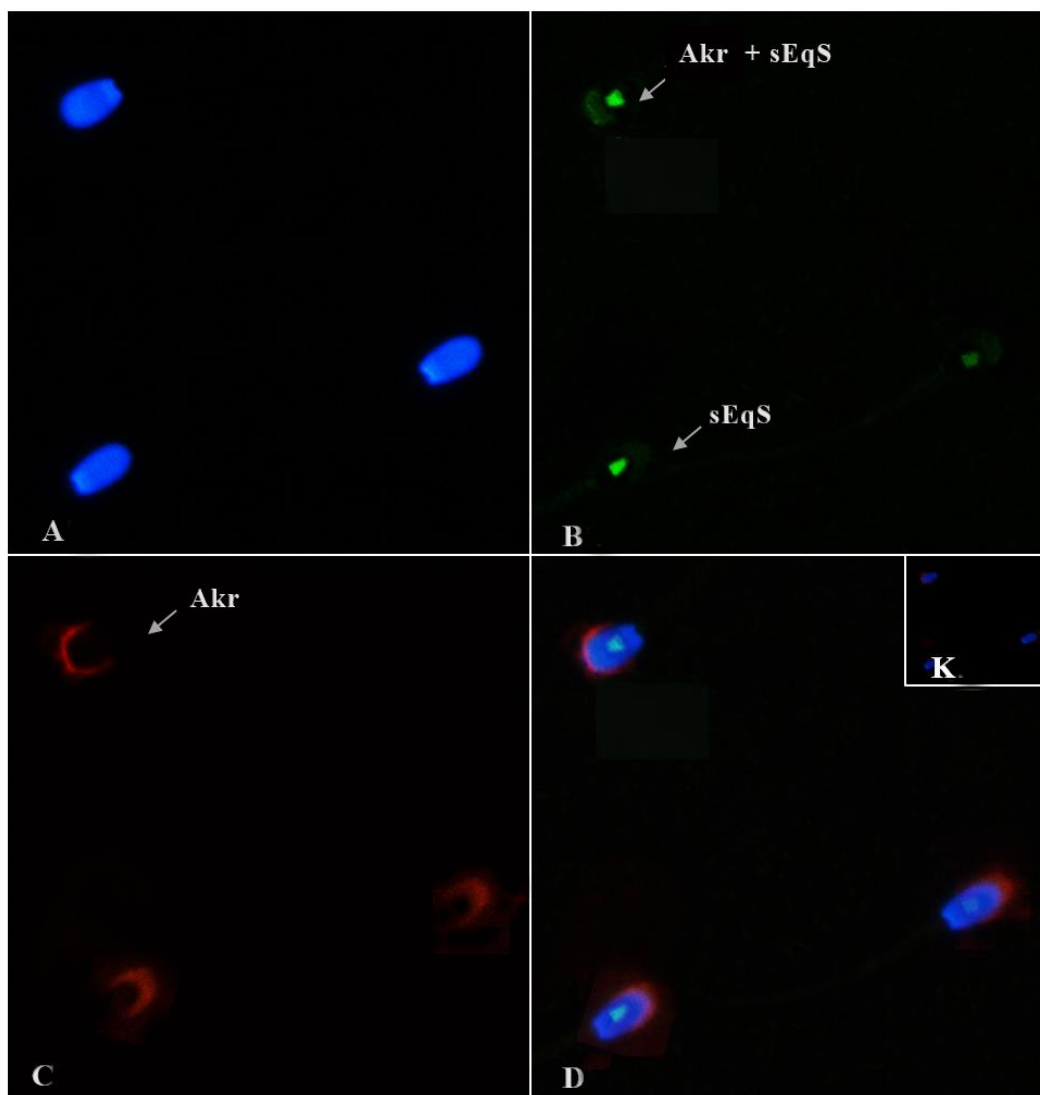
Graf 1: Zastoupení jednotlivých fosforylačních vzorů detekovaných v ejakulovaných, *in vitro* kapacitovaných a akrozomově zreagovaných (AR) spermiích v nativním ejakulátu (NAT). Skupiny: I. – pouze subekvatoriální segment (sEqS), II. – částečně slabě oblast akrozomu/přední části hlavičky (Akr) + sEqS, III. – pouze Akr, IV. – Akr + sEqS (jak u spermií s akrozomem značeným PNA lektinem, tak u spermií po AR), V. – bez detekce fosforylace.

V následující sekvenci snímků je zobrazena detekce fosforylace proteinů na tyrozinu u ejakulovaných spermií z inseminační dávky (ID) kančího ejakulátu. Fosforylace je viditelně detekována u většiny spermií v subekvatoriálním segmentu (obrázek 8B a 8D), u části spermií nebyla zaznamenána reakce s protilátkou proti fosfotyrozinu. Pomocí šipky je znázorněna fosforylovaná část spermie (sEqS) a u PNA šipky poukazují na přítomnost akrozomu (Akr).



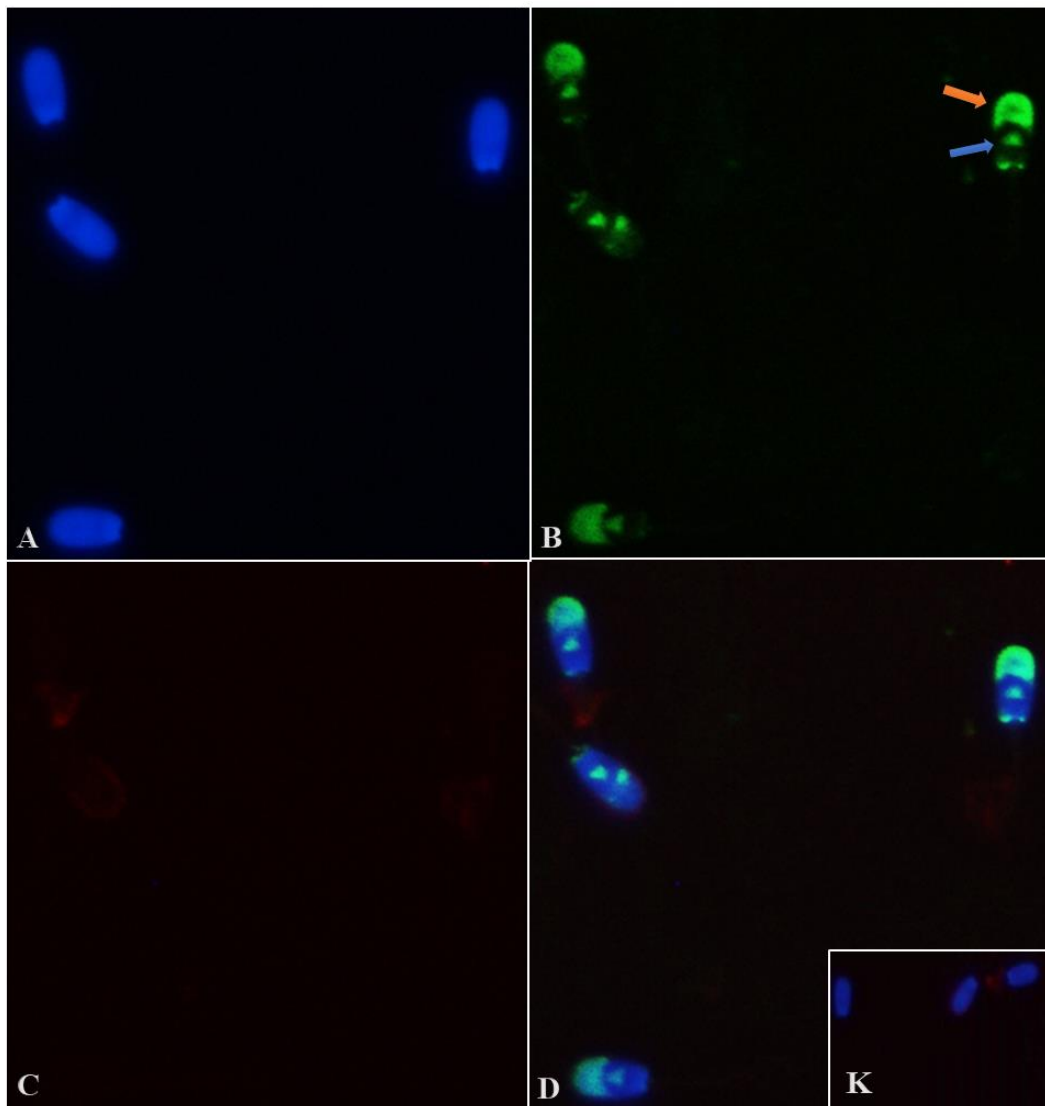
Obrázek 8: Lokalizace fosforylovaných proteinů v ejakulovaných spermích z inseminační dávky (ID): (A) označená jádra spermií pomocí DAPI (modře); (B) reakce s protilátkou proti fosfotyrozinu (zeleně), šipka značí pozitivní reakci s protilátkou v subekvatoriálním segmentu (sEqS); (C) viditelné akrozomy spermií značené pomocí PNA lektinu (červeně); (D) sloučený snímek; Akr akrozom, sEqS subekvatoriální segment; (K) negativní kontrola, zvětšení 400x.

Na následujících snímcích je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů u *in vitro* kapacitovaných spermí z inseminační dávky. Fosforylace byla detekována u většiny spermí, jak v subekvatoriálním segmentu, tak v akrozomu (obrázek 9B a 9D). Na tyto spermie je poukázáno šipkou (Akr + sEqS). V některých spermích byla fosforylace nalezena pouze slabě v akrozomu nebo jen v sEqS. U vazby s PNA lektinem šipka ukazuje na přítomnost akrozomu (obrázek 6C).



Obrázek 9: Lokalizace fosforylovaných proteinů v *in vitro* kapacitovaných spermích z inseminační dávky (ID): (A) označená jádra spermí pomocí DAPI (modře); (B) reakce s protilátkou proti fosfotyrozinu (zeleně), šipky značí pozitivní reakci s protilátkou v subekvatoriálním segmentu a akrozomu; (C) viditelné akrozomy spermí značené pomocí PNA lektinu (červeně); (D) složený snímek; Akr akrozom, sEqS subekvatoriální segment; (K) negativní kontrola, zvětšení 400x.

V následující sekvenci snímků je zobrazena detekce fosforylace proteinů u spermií, které prošly akrozomální reakcí z inseminační dávky ejakulátu. Fosforylace byla detekována u většiny spermií v subekvatoriálním segmentu (modrá šipka) a téměř u všech spermií slaběji nebo silně také v přední části hlavičky v oblasti, kde byl dříve akrozom (oranžová šipka; obrázek 10B a 10D). Viditelně u všech těchto spermií proběhla AR, nepřítomnost akrozomu jasně ukazuje obrázek 10C.

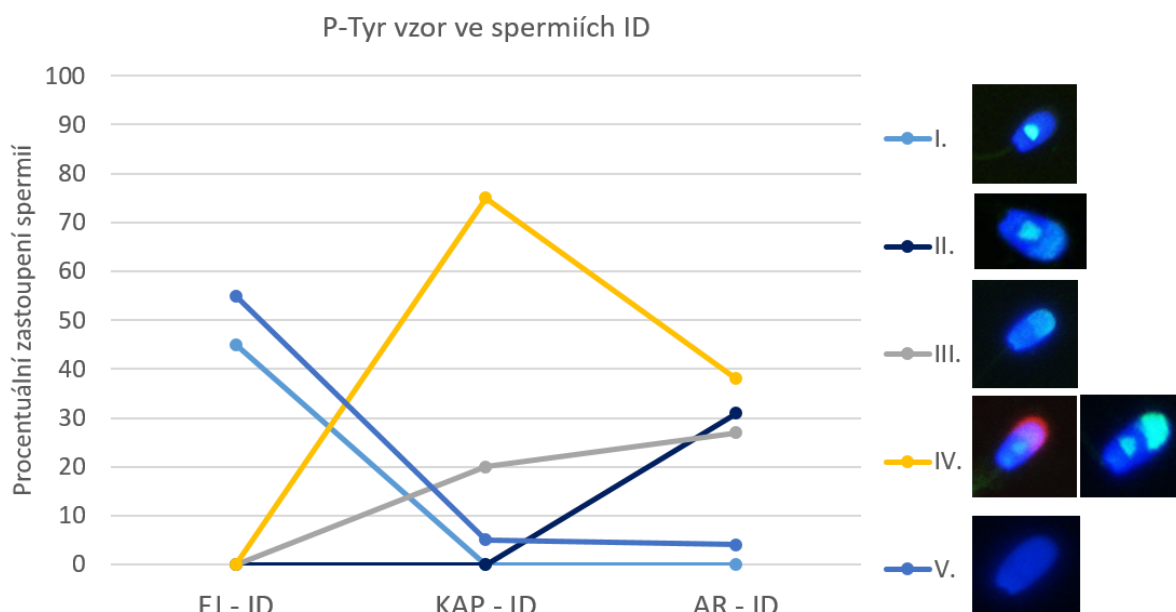


Obrázek 10: Lokalizace fosforylovaných proteinů ve spermiích z inseminační dávky (ID) po akrozomální reakci (AR): (A) označená jádra spermií pomocí DAPI (modře); (B) reakce s protilátkou proti fosfotyrozinu (zeleně); (C) značený akrozom spermií pomocí PNA lektinu (červeně); (D) složený snímek; oranžovou šipkou je poukázáno na detekci v akrozomu; modrá šipka ukazuje reakci pouze v subekvatoriálním segmentu; (K) negativní kontrola, zvětšení 400x.

V grafu 2 je porovnání zastoupení jednotlivých fosforylačních vzorů (I. – IV.) v ejakulovaných, kapacitovaných a AR spermích z inseminační dávky (ID). Výsledky byly spočítány ze 100 spermích v každé skupině a zaneseny do grafu. U ejakulovaných spermích z ID byla nalezena fosforylace pouze na subekvatoriálním segmentu u 45 % spermích a u 55 % byla navíc slabá reakce s protilátkou i v akrozomu (vzor II.).

U kapacitovaných spermích z ID proběhla fosforylace v subekvatoriálním segmentu a zároveň také v akrozomu u 75 % (vzor IV.). U 20 % spermích byla viditelná fosforylace v akrozomu jen částečně (vzor III.). A u 5 % spermích fosforylace neproběhla vůbec (vzor V.).

U spermích z ID, které prošly AR, proběhla fosforylace v přední části hlavičky v oblasti, kde se nacházel dříve akrozom a zároveň v sEqS u 38 % spermích (vzor IV.). Slabá reakce s protilátkou proti fosfotyrozínu byla nalezena u 31 % spermích bez akrozomu v oblasti přední části hlavičky a sEqS (vzor II.). A fosforylace pouze v přední části hlavičky proběhla u 27 % spermích (vzor III.). U 4 % spermích neproběhla fosforylace vůbec (vzor V.).



Graf 2: Zastoupení jednotlivých fosforylačních vzorů detekovaných v ejakulovaných, in vitro kapacitovaných a akrozomově zreagovaných (AR) spermích z inseminační dávky (ID). Skupiny: I. – pouze subekvatoriální segment (sEqS), II. – částečně slabě v oblasti akrozomu/přední části hlavičky (Akr) + sEqS, III. – pouze Akr, IV. – Akr + sEqS (jak u spermích s akrozomem značeným PNA lektinem, tak u spermích po AR), V. – bez detekce fosforylace.

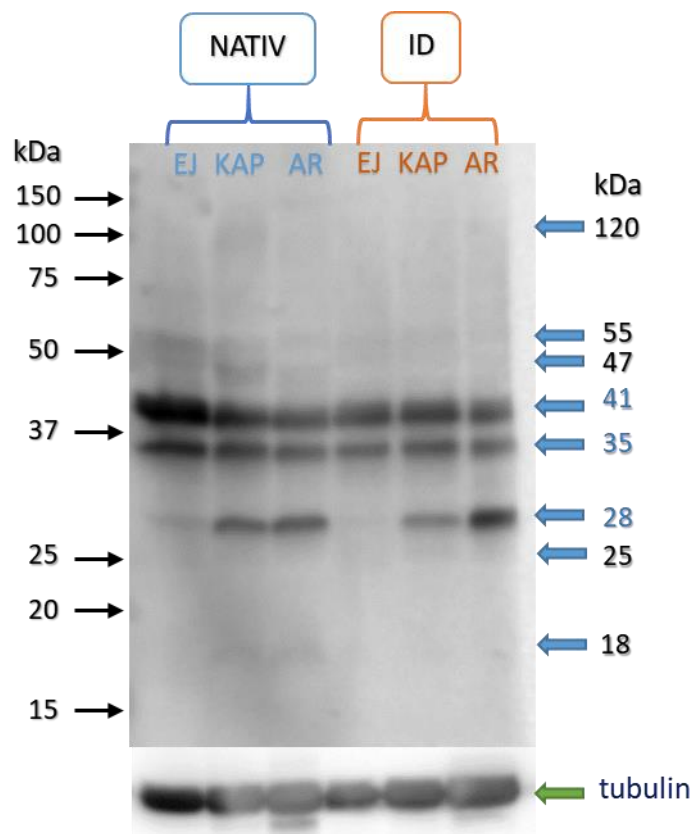
5.2 Detekce fosforylovaných proteinů v extraktech z kančích spermích

Výsledky fosforylace získané z imunofluorescenčního mikroskopu pomocí imunofluorescenčního barvení byly podpořeny ještě analýzou proteinových extraktů metodou Western blot. Zde byla použita stejná anti-fosfotyrosinová protilátka (klon 4G10) jako u předchozích lokalizací. Fosforylované proteiny byly detekovány v extraktu z ejakulovaných

a *in vitro* kapacitovaných spermíí a také spermíí, které prošly akrozomální reakcí (kap. 4.1.3 a 4.1.4). Po extrakci byly proteiny separovány SDS elektroforézou a hodnoceny po Western blot imunodetekci (kap. 4.3). Normalizace jednotlivých vzorků pro denzitometrickou analýzu byla provedena ve vztahu k množství tubulinu.

Na obrázku 11 je zobrazena membrána po detekci fosforylovaných proteinů na tyrozinu v extraktu spermíí z nativní dávky ejakulátu (NATIV) a z inseminační dávky (ID). V extraktech z kančích spermíí byla po vizualizaci prokázána fosforylace na tyrozinu u několika proteinů v celé škále molekulových vah. Přibližné molekulové hmotnosti byly vypočítány použitím kalibrační křivky dle molekulových proteinových standardů.

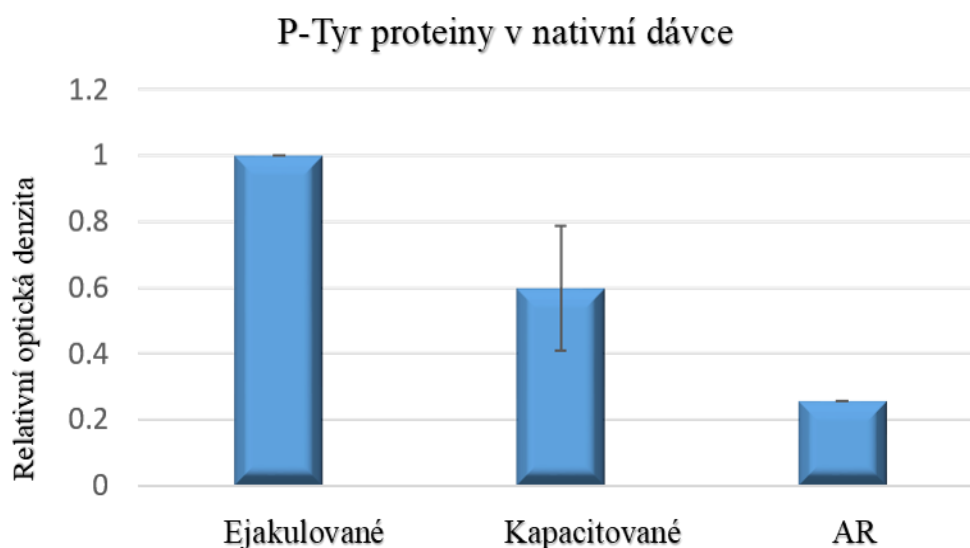
V molekulových vahách detekovaných proteinů nebyly nalezeny zásadní rozdíly mezi vzorky ejakulovaných, *in vitro* kapacitovaných spermíí a spermíí prošlých AR. Nejsilnější reakce s protilátkou byla zaznamenána u proteinů s mol. hm. 28, 35 a 41 kDa. Slabší detekce byla nalezena u proteinů 18, 25, 47, 55 a 120 kDa. Celková míra fosforylace ve vzorcích spermíí byla vyhodnocena denzitometricky a výsledek je zaznamenán v grafu 3 pro nativní ejakulát a grafu 4 pro ID.



Obrázek 11: Detekce P-Tyr pomocí monoklonální myší protilátky klon 4G10 na NC-membráně v proteinových extraktech z kančích spermíí: EJ – ejakulované spermie, KAP – kapacitované spermie, AR – spermie, které prošly akrozomální reakcí; NATIV – nativní ejakulát, ID – inseminační dávka; modré šipky označují specifické protilátkové označení proteinu, černé šipky označují molekulovou hmotnost proteinových standardů v kDa; kontrola proteinové nanášky ve vzorcích byla provedena pomocí detekce s myší monoklonální protilátkou proti α -tubulinu (zelená šipka).

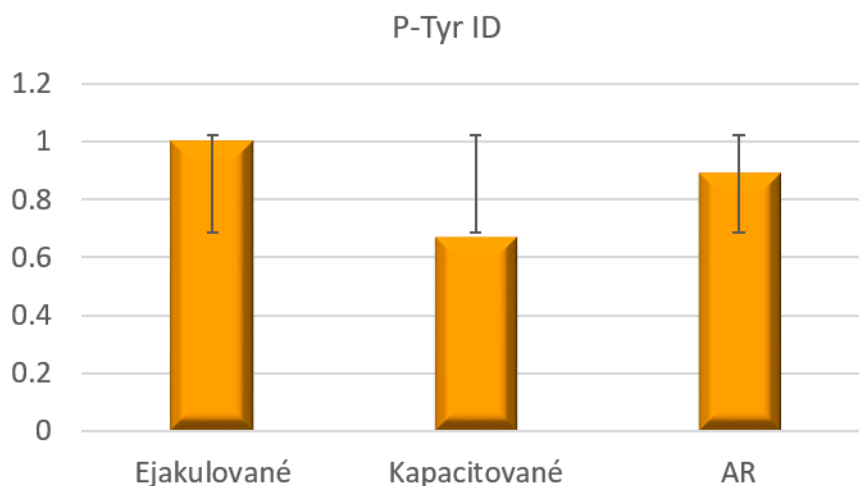
Největší míru fosforylace vykazovaly v extraktu ejakulovaných spermií protein o velikosti 41 kDa. Tento protein se vyskytoval i u *in vitro* kapacitovaných spermií a AR, jen s nižší intenzitou detekované fosforylace. U ejakulovaných spermií se vyskytovaly ještě fosforylované proteiny o velikostech 58 kDa, 47 kDa, 35 kDa a 28 kDa. Tyto proteiny byly taktéž detekovány u *in vitro* kapacitovaných spermií a AR, ale protein o velikosti 28 kDa s podstatně vyšší intenzitou fosforylace než u ejakulovaných spermií. Ve vzorcích spermií z nativního ejakulátu byly s větší intenzitou detekovány fosforylované proteiny 58 kDa a 47 kDa na rozdíl vzorků z ID. Dále byl u *in vitro* kapacitovaných spermií a AR nalezen protein o velikosti 18 kDa, který se u ejakulovaných spermií nevyskytoval. Jeho detekce byla viditelná spíše ve vzorcích spermií z nativního ejakulátu. U *in vitro* kapacitovaných spermií z nativního ejakulátu byl ještě lokalizován protein o velikosti 120 kDa.

V grafu 3 je porovnání míry fosforylace nativních spermií z první membrány. Ejakulované spermie vykazovaly nejvyšší míru fosforylace oproti *in vitro* kapacitovaným spermiím a AR. Spermie prošlé AR vykazovaly celkově nejnižší míru fosforylace. Detekční analýza byla provedena ve čtyřech opakováních u vzorků ejakulovaných a kapacitovaných spermií, kde relativní optická denzita byla vztažena k 1 pro vzorek ejakulovaných spermií. Rozdíl mezi mírou fosforylace u ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií z nativního ejakulátu nebyl statisticky významný. Detekce fosforylace ve vzorku spermií po AR byla provedena pouze jednou.



Graf 3: Vyhodnocení denzitometrická analýzy detekce fosforylovaných proteinů ve spermiích z nativního ejakulátu vztažená k množství α -tubulinu ve vzorcích.

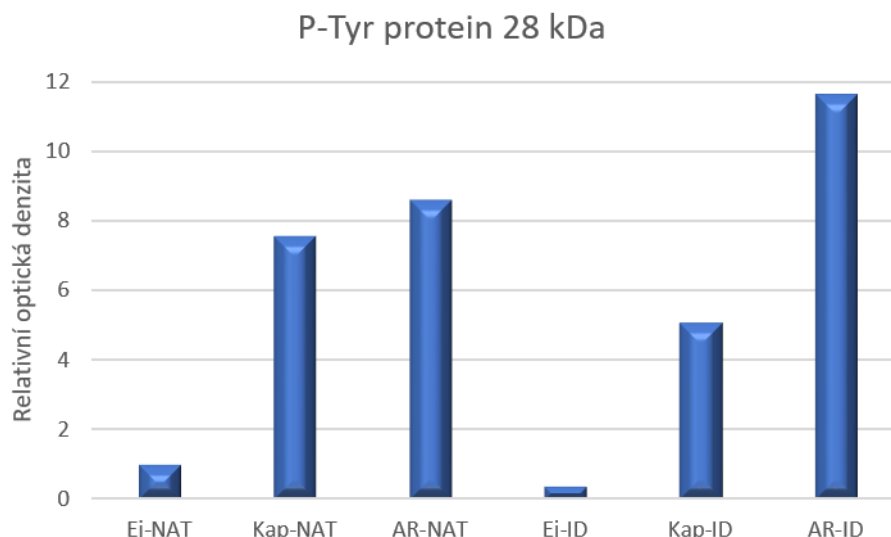
V grafu 4 je porovnání míry fosforylace spermií z membrány (obrázek 11). Ejakulované spermie vykazovaly nejvyšší míru fosforylace oproti *in vitro* kapacitovaným spermím a spermím po AR. Spermie z inseminační dávky po indukci AR vykazovaly vyšší míru fosforylace než spermie po kapacitaci, nicméně detekční analýza byla u tohoto vzorku provedena pouze jednou. U vzorků spermií ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných byla denzitometrická analýza provedena ze čtyř opakování a rozdíl v míře fosforylace u těchto vzorků nebyl statisticky významný.



Graf 4: Vyhodnocení denzitometrická analýzy detekce proteinů fosforylovaných spermií z inseminační dávky (ID) vztahovaná k množství α -tubulinu ve vzorcích.

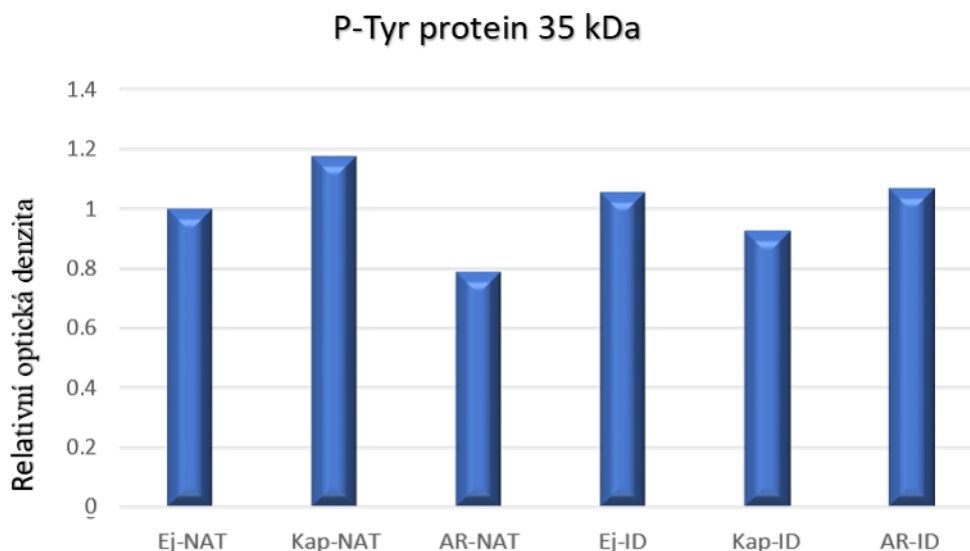
Na následujících grafech (5 – 7) jsou znázorněna míra fosforylace u 3 vybraných proteinů dle relativní optické denzity o molekulových velikostech 28 kDa, 35 kDa a 41 kDa (obrázek 11). U těchto proteinů byla pozorována rozdílná míra fosforylace v jednotlivých vzorcích spermií.

V grafu 5 je znázorněna míra fosforylace proteinu o velikosti 28 kDa. Jak je z grafu patrné, nejnižší míru fosforylace vykazovaly ejakulované spermie, a to jak z nativní dávky, tak z dávky inseminační (ID). Hodnoty relativní optické denzity dosahují až 10násobku míry fosforylace dalších dvou proteinů (35 a 41 kDa; graf 6 a 7), což značí, že tento protein je nejsilněji fosforylován ze všech detekovaných fosfoproteinů ve vzorcích spermií po *in vitro* kapacitaci a AR. V porovnání s ID je tento protein více fosforylován u *in vitro* kapacitovaných spermií z nativního ejakulátu a naopak jeho fosforylace je výrazně vyšší u spermií z ID, které prošly akrozomální reakcí.



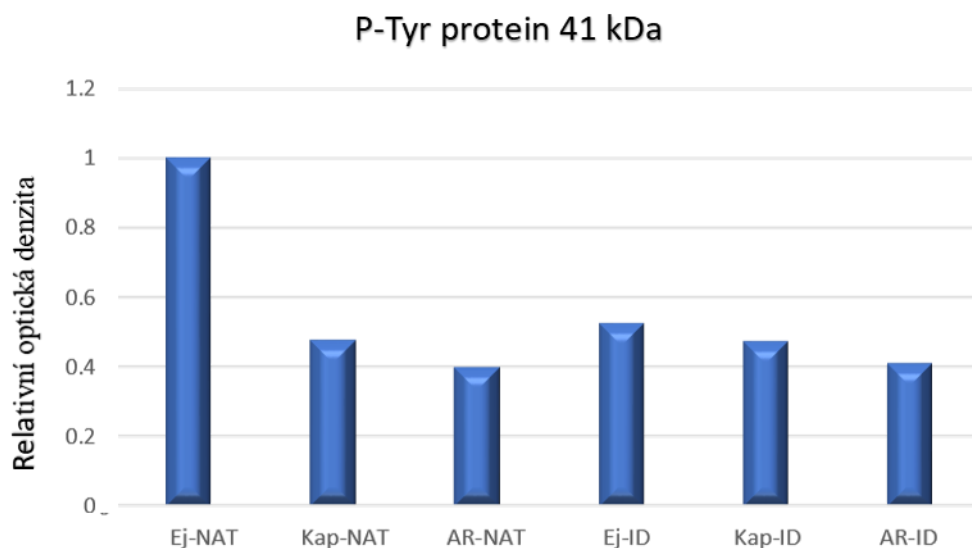
Graf 5: Denzitometrická analýza míry fosforylace na 28kDa proteinu vztažená k množství α tubulinu ve vzorcích spermii z nativního ejakulátu (NAT) a inseminační dávky (ID); Ej ejakulované spermie, Kap *in vitro* kapacitované spermie, AR spermie, které prošly akrozomální reakcí.

V grafu 6 je znázorněna míra fosforylace detekovaná na proteinu o molekulové hmotnosti 35 kDa. Z grafu je patrné, že míra fosforylace tohoto proteinu je relativně vyrovnaná a příliš se neliší v rámci všech vzorků spermii jak z nativní, tak z inseminační dávky. Na tomto proteinu ale byla detekována relativně nejsilnější fosforylace u *in vitro* kapacitovaných spermii z nativní dávky ejakulátu. Nejnižší míra fosforylace byla zaznamenána u spermii po AR z nativní dávky.



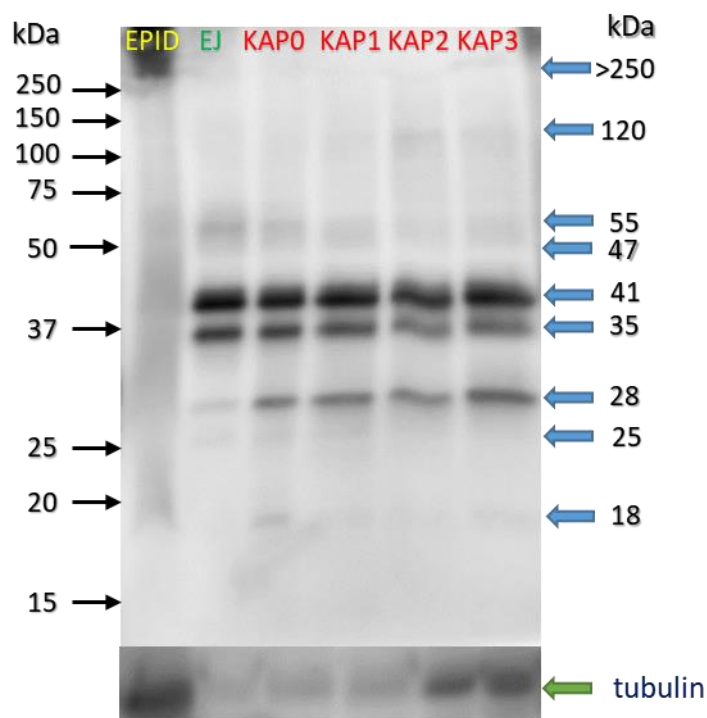
Graf 6: Denzitometrická analýza míry fosforylace na 35Da proteinu vztažená k množství α tubulinu ve vzorcích spermii z nativního ejakulátu (NAT) a inseminační dávky (ID); Ej ejakulované spermie, Kap *in vitro* kapacitované spermie, AR spermie, které prošly akrozomální reakcí.

V grafu 7 je porovnání míry fosforylace proteinu o molekulové hmotnosti 41 kDa. U tohoto proteinu nejvyšší míry fosforylace dosahují ejakulované spermie z nativního ejakulátu. Co je ale zajímavé, že 41kDa protein je v ejakulovaných spermii z ID o mnoho méně fosforylovaný než ve spermii z nativního ejakulátu. Tento protein v *in vitro* kapacitovaných spermii a AR nejeví relativně žádné významné rozdíly v míře fosforylace.



Graf 7: Denzitometrická analýza míry fosforylace na 41Da proteinu vztážená k množství α -tubulinu ve vzorcích spermii z nativního ejakulátu (NAT) a inseminační dávky (ID); Ej ejakulované spermie, Kap *in vitro* kapacitované spermie, AR spermie, které prošly akrozomální reakcí.

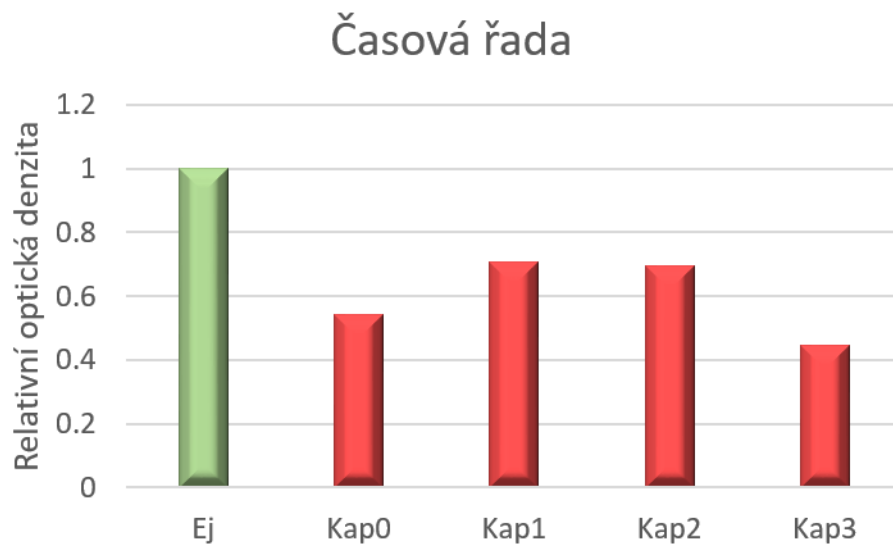
Kromě porovnání míry fosforylace u proteinů ve vzorcích spermii z nativní a inseminační dávky, byla provedena detekce fosforylovaných proteinů v extraktu epididymálních spermii a spermii během kapacitace (obrázek 12). Protilátka proti fosfotyrozinu odhalila velmi slabou fosforylacii v extraktu spermii izolovaných z ocasu nadvarlete (EPID) především u proteinů, u kterých byla velmi silná reakce s protilátkou ve spermii ejakulovaných (EJ) a *in vitro* kapacitovaných (KAP), tzn. u proteinů s mol. hm. 28, 35 a 41 kDa. Podobná reakce v EPID jako ve vzorcích spermii EJ a KAP se jevila u proteinů 47 a 55 kDa. Velmi silná reakce s fosfotyrozinovou protilátkou v extraktu EPID spermii byla nalezena u vysokomolekulárního proteinu nad 250 kDa. U EJ spermii není viditelná fosforylace na proteinu 18 a 120 kDa. Proteiny 47 a 55 kDa vykazují sníženou míru fosforylace během kapacitace, stejně tak je tomu u proteinu s mol. hm. 25 kDa. Naopak u proteinu 120 kDa se zdá, že jeho fosforylace s dobou kapacitace narůstá.



Obrázek 12: Detekce P-Tyr pomocí monoklonální myší protilátky klon 4G10 na NC-membráně v proteinových extraktech z kančích spermií. EPID – epididymální spermie z ocasu nadvarlete, EJ – ejakulované spermie, KAPO – kapacitované spermie v čase 0 (ejakulované spermie v kapacitačním médiu), KAP1 – kapacitované spermie po jedné hodině, KAP2 – kapacitované spermie po dvou hodinách, KAP3 – kapacitované spermie po třech hodinách; modré šipky označují specifické protilátkové označení proteinu, černé šipky označují molekulovou hmotnost proteinových standardů v kDa; kontrola proteinové nanášky ve vzorcích pomocí detekce s myší monoklonální protilátkou proti α -tubulinu (zelená šipka).

V grafu 8 je znázorněna celková míra fosforylace dle relativní optické denzity ve vzorcích spermií během *in vitro* kapacitace spermií z nativního ejakulátu odebíraných v čase kapacitace 0 hodin (Kap0; ejakulované spermie v kapacitačním médiu), dále pak v čase kapacitace 1 hodina (Kap1), v čase kapacitace 2 hodiny (Kap2) a v čase kapacitace 3 hodiny (Kap3). V grafu je zanesena i míra fosforylace ve spermiích ejakulovaných.

Z grafu vyplývá, že míra fosforylace se během kapacitace relativně mění. Ejakulované spermie vykazují vysokou míru fosforylace, zatímco u spermií přidávaných do kapacitačního média v čase kapacitace 0 je překvapivě míra fosforylace v porovnání s ejakulovanými spermiemi nižší. Když byly spermie kapacitovány 1 hodinu, fosforylace vzrostla. Míra fosforylace se příliš nezměnila po 2 hodinách, ale po 3 hodinách už fosforylace mírně klesla. Tento experiment byl zopakován pouze jednou.



Graf 8: Denzitometrická analýza míry fosforylace vztážená k množství α -tubulinu ve vzorcích spermií z nativního ejakulátu v průběhu kapacitace in vitro; Ej ejakulované spermie, Kap0 ejakulované spermie v kapacitačním médiu v čase 0h; Kap1 in vitro kapacitované spermie po 1 hodině, Kap2 in vitro kapacitované spermie po 2 hodinách; Kap3 in vitro kapacitované spermie po 3 hodinách.

6 Diskuze

Ejakulované spermie nejsou schopny oplodnit oocyt i přes to, že jsou zcela zralé a motilní. Ejakulované spermie nejsou schopny oplodnit oocyt i přes to, že jsou zcela zralé a motilní. Musí projít procesem kapacitace, jehož výsledkem jsou spermie s hyperaktivovanou motilitou a receptory pro vazbu se *zona pellucida* (ZP) vystavenými na povrchu plazmatické membrány. Změny ve spermii, které se dějí v průběhu celé kapacitace, mají za následek různé postranlační modifikace proteinů. Jednou z takových modifikací je fosforylace na tyrozinu, která je považována za jednu z nejdůležitějších postranlačních modifikací a pravděpodobně i klíčovou. Mezi procesy, ve kterých byla tyrozinová fosforylace nalezena jako klíčová, se řadí kapacitace, hyperaktivace a akrozomální reakce spermie (Yanagimachi 1994).

Kapacitace za normálních podmínek probíhá v reprodukčním traktu samice, a to v oviduktu. Může ale probíhat i v *in vitro* podmínkách v určitých definovaných médiích (Tardif et al. 2001). Je nutné, aby se kapacitační média co nejvíce podobala složení oviduktní tekutiny (Yanagimachi 1994). Tyrozinová fosforylace má v kapacitaci spermií velmi důležitou úlohu, protože je spojena s hyperaktivací motility, interakcí se ZP, indukci akrozomální reakce a membránovou fúzí. Jedná se tedy o velmi zásadní fosforylaci ve spermii a její hodnocení tak může pomoci při pochopení mechanismů fertilizace.

V této diplomové práci jsme se zabývali sledováním změn ve fosforylaci pomocí protilátky proti fosfotyrozinu v kančích spermii před a po proběhlé *in vitro* kapacitaci a po akrozomální reakci (AR), a to jak ve spermii u čerstvého ejakulátu, tak z inseminační dávky (ID).

Typ fixace je zásadní pro zachování struktur spermií a v závislosti na druhu použité fixační látky může docházet k částečné nebo úplné permeabilizaci plazmatické membrány, a tím je ovlivněna její prostupnost pro použité protilátky. Pro detekci tyrozinové fosforylace ve spermii jsme zvolili fixaci 2 % formaldehydem s 2 % BSA, kterou ve své studii použili Tardif et al. (2001), která jasně odlišovala fosforylaci v různých částech hlavičky spermie před a po *in vitro* kapacitaci.

Naše výsledky ukazují, že lze najít dokonce několik fosforylačních vzorů ve spermii nekapacitovaných i kapacitovaných. Navíc jsme našli rozdíly v podílu těchto vzorů ve spermii z nativního ejakulátu a ID. U většiny nekapacitovaných spermií v nativní dávce, až v 75 %, nebyla pozorována žádná fosforylace pomocí protilátky proti fosfotyrozinu a u 25 % spermií byla fosforylace detekována pouze v části subekvatoriálního segmentu (sEqS). U ID byl tento poměr počtu spermií s fosforylačním vzorem v sEqS a bez fosforylace mnohem vyrovnanější, a to 45 % ku 55 %. Po kapacitaci u spermií z nativního ejakulátu převládaly dva fosforylační vzory se slabým a silným signálem v akrozomální oblasti spolu s detekovanou fosforylací v sEqS. Celkem bylo takto označeno téměř 70 % spermií. Zbylé spermie měly buď signál pouze v sEqS nebo u nich nebyla fosforylace na tyrozinu vůbec detekována. Oproti tomu až 75 % *in vitro* kapacitovaných spermií z ID mělo silný fosforylační signál v oblasti akrozomu a sEqS. U spermií, které prošly AR jak z ID, tak z nativního ejakulátu bylo procentuální zastoupení fosforylačních vzorů téměř shodné. V obou případech se jednalo o srovnatelný podíl spermií se slabší nebo silnou fosforylací v přední části hlavičky spolu s detekcí P-Tyr v sEqS

nebo pouze se slabou fosforylací v oblasti, kde byl dříve akrozom. Ve všech těchto případech se jednalo o spermie bez přítomnosti akrozomu a nelze přesně určit, zda byla fosforylace detekována na vnitřní akrozomální membráně nebo v prostoru mezi touto membránou a jádrem.

V akrozomu a ekvatoriálním či subekvatoriálním segmentu je zvýšená fosforylace po proběhlé kapacitaci součástí organizačního centra multimolekulárních komplexů, jako zprostředkovatelů fúze, ke které dochází během akrozomální reakce spermie (Jones 2008). Detekce tyrozinové fosforylace spermatických proteinů byla u savčích spermií pozorována také v různých částech bičíku. Fosforylace v bičíku je pravděpodobně spojena s hyperaktivací motility spermií, která se spouští v průběhu kapacitace (Naz et al. 1991). V našich experimentech jsme však v bičíku nedetkovali fosforylaci na tyrozinu u žádné spermie ve všech námi zkoumaných vzorcích. Toto zjištění je v souladu s pracemi Tardif et al. (2001) a Jones et al. (2008), kde tyto studie také nepopisují detekci P-Tyr v oblasti bičíku kančích spermií. Nicméně novější studie uvádějí silnou fosforylaci na tyrozinu nejen v oblasti hlavičky, ale také v bičíku *in vitro* kapacitovaných kančích spermií (Luno et al. 2013; Zhen et al. 2016; Wang et al. 2017). Rozdíl ve schopnosti P-Tyr detekovat v bičíku by mohl být dán zvolením jiné fixace spermií, a to pomocí 4 % paraformaldehydu a následné permeabilizace plazmatické membrány 0,1 % roztokem Tritonu X-100, případně delší dobou fixace ve 2 % formaldehydu, jak uvádí Luno et al. (2013) a Zhen et al. (2016).

Nicméně jak již bylo řečeno, tak tyrozinová fosforylace nebyla detekována v žádném z našich experimentů na jakékoli části bičíku. Je tedy vhodné podotknout, že fosforylace na bičíku není zřejmě u kančích spermií zcela zásadní pro jejich kapacitaci a není výlučným faktorem pro její detekci. Naše tvrzení podporuje i studie Petrunkina et al. (2001) kde uvádí, že bičík je považován za hlavní oblast spermie, která podstupuje tyrozinovou fosforylaci u většiny druhů včetně člověka s výjimkou kanců. Navíc by bylo vhodné kapacitaci u spermií také prověřit jiným způsobem, například pomocí CTC (chlortetracyklin) nebo změnou v detekci akrozomálního proteinu akrozinu, jak je souhrnně uvedeno ve studii Děd et al. (2019).

Z našich výsledků detekce P-Tyr u spermií, které prošly akrozomální reakcí je zřejmé, že po odstranění akrozomu jsou v hlavičce spermie stále detekovány proteiny, které jsou fosforylovány na stejném místě, na kterém byl předtím lokalizován akrozom. V tomto ohledu nebylo publikováno mnoho studií, které by uváděly fosforylaci ve spermiích po AR. Děd et al. (2019) popisuje, že naopak fosforylovaná místa v hlavičce kančí spermie po AR nejsou detekovatelná. V této práci byl však využit jiný typ fixace spermií než v našich experimentech, a to fixace pomocí acetonu. Je možné, že pro detekci fosforylace v akrozomově zreagovaných spermiích je námi zvolená fixace buněk pomocí formaldehydu zásadní pro lokalizaci fosforylovaných proteinů, které mohou být, jak již bylo zmíněno, na vnitřní akrozomální membráně nebo v prostoru pod ní. Tardif et al (2001) objevili při *in vitro* kapacitaci protein 32, který byl detekován až po delší době kapacitace (4,5 hodiny). Tento protein byl později určen jako fosforylovaná forma proteinu vázajícího akrozomální enzym akrozin (Dube et al. 2005) a je spjat s určitou úrovní fosforylace na tyrozinu kapacitovaných spermií (Bravo et al. 2005). Je tedy možné, že v části hlavičky, kde dříve býval akrozom, mohou být později detekovatelné proteiny, které hrají určitou roli v navázání spermie na ZP, jako je tomu v případě právě zmíněného p32.

V porovnání nativních a inseminačních dávek v našich pokusech byla významně silnější fosforylace v oblasti akrozomu po *in vitro* kapacitaci nalezena u spermií z ID. Je možné, že s nativním ejakulátem nebylo zacházeno v souladu potřebami spermií. Při manipulaci se vzorkem nativního ejakulátu po odběru je nutné udržovat stálou teplotu médií určených pro manipulaci s ejakulátem. Je tedy možné, že čerstvý ejakulát nebyl zcela kvalitní a spermie tak nekapacitovaly minimálně v takovém počtu jako spermie z ID. Nicméně bychom mohli předpokládat spíše negativní vliv ředidla v ID na urychlení kapacitace jako tomu bývá v případě kryokonzervace u spermií býků (Bailey et al. 2003). Například ve studii, která byla zaměřena na lidské spermie, bylo prokázáno, že zmrazení spermií má za následek rozdíl v expresi dvaceti sedmi proteinů ve srovnání s čerstvými ejakulovanými spermii. Z toho vyplývá, že kryokonzervace může indukovat dysfunkce spermií, jejichž důsledkem je pak degradace či fosforylace některých proteinů (Wang et al. 2014). Proto je nanejvýš důležité zjistit a detekovat soubor různých exprimovaných proteinů spojených s kapacitací i dalším funkčním stavem spermií (Kwon 2014). Naopak Luno et al. (2013) ve studii prokázali, že obsah proteinů semenné plazmy v čerstvém ejakulátu je klíčový pro stabilizaci buněk a zabránění kapacitace. To by mohlo mít za následek horší výsledky fosforylace na proteinech po proběhlé *in vitro* kapacitaci. Tyto výsledky se tedy naopak shodují s našim porovnáním nativního ejakulátu a ID, kdy ID vykazovala fosforylaci na větším počtu spermií po proběhlé *in vitro* kapacitaci.

Na závěr je nutno říct, že vzhledem k velké četnosti fosforylačních vzorů není možné usoudit, který fosforylační vzor je tím výlučným markerem pro kapacitaci kančích spermií. Můžeme jen předpokládat, že na základě našich výsledků a výsledků dalších zde zmíněných studií se bude jednat u kančích spermií o fosforylaci v akrozomu.

Naše výsledky lokalizace fosforylovaných proteinů v kančích spermii byly podpořeny metodou Western blot, tedy analýzou proteinových extraktů spermií před a po kapacitaci a také po AR. Zde jsme detekovali fosforylaci v proteinech kančích spermií na tyrozinu pomocí stejné protilátky.

Nejvyšší fosforylaci jsme zaznamenali u proteinů s molekulovou hmotností 28, 35 a 41 kDa. Naše výsledky detekovaných proteinů se shodují s výsledky Flesch et al. (1999), kteří se zabývali rovněž tyrozinovou fosforylací v *in vitro* kapacitovaných kančích spermii. V této studii byla popsána tyrozinová fosforylace na 3 hlavních (27, 37, 40 kDa) a 3 vedlejších (34, 47, 55 kDa) proteinech izolovaných z plazmatické membrány (Flesch et al. 1999). Jak bylo zjištěno později, 2 proteiny (35 a 46 kDa) plazmatické membrány izolované z kapacitovaných kančích spermií ukázaly vysokou vazebnou afinitu k ZP, což by mohlo být spojeno s navozením AR po interakci těchto proteinů se ZP (Flesch et al. 2001).

Dále jsme u *in vitro* kapacitovaných spermií a po AR z ID našli protein o velikosti 18 kDa, který u ejakulovaných spermií nebyl zaznamenán. Tento protein byl ve větší míře fosforylován u ejakulovaných spermií z nativního ejakulátu. U *in vitro* kapacitovaných spermií z nativního ejakulátu byl navíc detekován protein o velikosti 120 kDa, který viditelně fosforylován u spermií z ID nebyl.

Ve studii Tardif et al. (2001) se zabývali proteinem o molekulové hmotnosti 32 kDa, u kterého se viditelně navyšovala fosforylace během kapacitace. V našich experimentech byl během kapacitace takto silně fosforylován protein s mol. hm. 28 kDa, je možné, že se jednalo

o stejný protein, jen odhad jeho velikosti mohl být odlišný. Podobně v novější publikaci (Kwon et al. 2014) jsou popsány trochu jiné mol. hm. fosforylovaných proteinů kančích spermíí, a to 26, 34 a 36 kDa. Námi detekovaný protein jako 28 kDa byl ze 3 hlavních fosforylovaných proteinů kančích spermíí jediný, jehož fosforylace se významně navýšila po dobu kapacitace. U ostatních dvou proteinů (35 a 41 kDa) nebyla změna ve fosforylaci tak patrná. Navíc se zdálo, že dochází k poklesu míry fosforylace po kapacitaci *in vitro* jak u spermíí z ID, tak nativního ejakulátu. Tyto překvapivé výsledky byly vyhodnoceny z několika opakování, u kterých byl velký rozptyl v relativní optické densitě měřených fosforylovaných proteinů, proto nemůžeme s jistotou říci, že tomu tak skutečně bylo a do budoucna je potřeba více opakování tohoto experimentu. V různých studiích jsou navíc používána různá složení kapacitačních médií, a je proto zásadní porovnat také detekci fosforylovaných proteinů spermíí kapacitovaných *in vitro* v jiných médiích než jsme zvolili v této práci. Je nutné se také zmínit, že mohlo dojít k nedokonalé izolaci fosforylovaných proteinů, my jsme zvolili extrakci proteinů spermíí v neredukujícím vzorkovém pufru po dobu 30 minut a teprve poté jsme redukovali disulfidové můstky v proteinech. Nicméně v některých zmíněných studiích využívali k extrakci rovnou redukujícího vzorkového pufru (Kwon et al. 2014; Wang et al. 2017) a mohlo tedy dojít k lepší izolaci určitých proteinů, které byly detekovány jako fosforylované.

V našich experimentech jsme se navíc zaměřili také na detekci fosforylovaných proteinů spermíí po AR, podobná publikovaná práce od autorů Bravo et al. (2005) neukazuje na změnu ve fosforylaci v kančích spermíích po kapacitaci a po indukci AR. Naše výsledky byly bohužel jen z jednoho opakování s rozporuplným výsledkem u spermíí z ID a nativního ejakulátu, kde byla nalezena značně snížená fosforylace u proteinů spermíí po AR. Do budoucna by bylo jistě zajímavé se více na tuto problematiku zaměřit a s ohledem na lokalizaci fosforylovaných proteinů v oblasti vnitřní akrozomální membrány nebo prostoru mezi jadernou a touto membránou, kde se nachází např. také perinukleární théka, se zabývat cílenou izolací proteinů z těchto struktur.

V naší práci jsme taktéž zabývali mírou fosforylace proteinů v průběhu *in vitro* kapacitace u spermíí z nativního ejakulátu a odebírali jsme spermie z kapacitačního média vždy po 1 hodině. Z našich výsledků vyplývá, že nejvhodnější doba pro kapacitaci spermíí kance v *in vitro* podmínkách je zřejmě jedna až dvě hodiny, kdy byl viditelný nárůst fosforylace proteinů. Po třech hodinách došlo již k mírnému poklesu míry fosforylace v proteinech spermíí. Nicméně podobné výsledky nárůstu a poté poklesu fosforylace proteinů byly popsány během kapacitace lidských spermíí (Wang et al. 2015). Po vyhodnocení našeho experimentu navíc bylo zjištěno, že u spermíí přidaných do kapacitačního média byla detekována snížená fosforylace oproti ejakulovaným spermíím. Nicméně tento experiment byl zopakován pouze jednou, tudíž nelze s jistotou říci, proč tento rozdíl v míře fosforylace u spermíí ejakulovaných a pouze přidaných do kapacitačního média nastal.

Dále jsme prováděli experiment na epididymálních spermíích izolovaných z ocasu nadvarlete. Míra fosforylace u třech hlavních proteinů spermíí fosforylovaných u ejakulovaných a kapacitovaných spermíí byla velmi nízká, nicméně byla nalezena silná fosforylace na proteinu >250 kDa, který se v extraktech ejakulovaných a kapacitovaných spermíí prakticky nevyskytoval. My jsme se pokusili také lokalizovat fosforylované proteiny ve spermíích izolovaných z ocasu nadvarlete, ale s negativním výsledkem, proto nebyla tato

data do diplomové práce zařazena. Nicméně, Jones et al. (2008) se zabývali detekcí P-Tyr u spermií izolovaných také z této části nadvarlete a výsledky porovnávali s mírou a lokalizací fosforylovaných proteinů u testikulárních spermií. U kanců našli sníženou P-Tyr v oblasti subekvatoriálního segmentu ve spermiích po epididymální maturaci. Tento fakt je opačný oproti zjištěním u jiných druhů, jako jsou spermie beranů nebo býků, kdy docházelo k nárůstu fosforylace během jejich maturace v nadvarleti, konkrétně v sEqS hlavičky spermií (Jones et al. 2008). Toto zjištění koresponduje také s novější studií Jankovičové et al. (2018), která popisuje zvýšení fosforylace u býčích spermií během epididymální maturace, a to i v oblasti akrozomu. Intenzita fosforylace proteinů ve spermiích se postupně zvyšovala při přechodu z hlavy nadvarelete do ocasu nadvarelete.

Je zajímavé, že interakce mezi spermii a oviduktálním epitelem *in vitro* ovlivňuje tyrozinovou fosforylací ve spermii a její kapacitaci. Selektivní vazba spermií k epitelu oviduktu u kance potlačuje tyrozinovou fosforylací proteinů spermie (Petrunkina et al. 2001) a u psa zpožďuje kapacitaci (Petrunkina et al. 2003). Tato oviduktální regulace tyrozinové fosforylace, a tedy také kapacitace, může napomáhat synchronizaci funkce spermií s časem ovulace. Zdá se tedy, že stupeň tyrozinové fosforylace souvisí s úrovní kapacitace spermie. Visconti et al. 1995 zkoumali souvislost mezi stupněm kapacitace a tyrozinové fosforylace u myších spermií. Zjistili časovou závislost vzestupu fosforylace některých specifických proteinů v rozmezí 40 – 120 kDa, které souvisejí se stavem kapacitace spermií (Visconti et al. 1995; Naz et al. 1999; Naz et al. 2004). Podobná studie byla publikována u kančích spermií, kdy byla sledována tyrozinová fosforylace proteinů v kančích spermiích za přítomnosti oviduktálního epitelu (Luno et al. 2013).

Nicméně se zdá, že vyšší míra fosforylace nutně neznamená kapacitaci. Míra fosforylace se zjevně musí zvýšit na proteinech určitých molekulových vah. Tyto proteiny jsou poté pro oplodnění oocyty zásadní. Naz et al (1991) sledovali tyrozinovou fosforylací ve spermiích mnoha savčích druhů včetně člověka, potkana, králíka a myši. Určili v lidských spermiích 4 sady na tyrosinu fosforylovaných proteinů o molekulové hmotnosti v rozsahu okolo 95 kDa, 46 kDa, 25 kDa a 12 kDa. Protein cca 94 kDa byl prokázán také v myších spermiích, avšak nebyl určen ve spermiích potkana a králíka (Leyton & Saling 1989).

Úspěšné oplodnění závisí na tom, aby byly spermie správně kapacitovány jak v podmínkách *in vivo*, tak i *in vitro*. Proto hodnocení podílu spermií, které jsou schopné kapacitace, by mohlo být velice dobré kritérium pro hodnocení kvality spermatu. Literatura ukázala, že predikce plodnosti samců stále záleží na konvenční analýze spermatu, jako je motilita spermií a morfologie. Proto přesné a použitelné metody mohou zlepšit plodnost u samců (Kwon 2014).

Na závěr, dle našich výsledků, kdy bylo detekováno zvýšení fosforylace na tyrozinových zbytcích, lze potvrdit, že tyrozinová fosforylace je majoritním markerem kapacitace. Můžeme také potvrdit, že inseminační dávka vykazuje větší počet *in vitro* kapacitovaných spermií než nativní ejakulát, což může značit připravenost spermií pro okamžitou inseminaci, ale také je nutné mít na zřeteli, že dlouhodobější uchovávání v ředidle může snížit životnost spermií a tedy i jejich fertilizační schopnosti.

7 Závěr

Během kapacitace ve spermiích probíhají různé posttranslační modifikace proteinů, které souvisejí se změnami funkce spermií s konečným cílem oplodnit vajíčko. Za klíčovou je z tohoto hlediska považována fosforylace na tyrozinu, která se zdá být prvořadým markerem kapacitace.

Při hodnocení tyrozinové fosforylace pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie u kančích spermií byl prokázán rozdíl ve fosforylačních vzorech u ejakulovaných, *in vitro* kapacitovaných spermií a spermií, které prošly akrozomální reakcí. Byly nalezeny rozdíly v podílu fosforylačních vzorů ve spermiích z nativního ejakulátu a inseminační dávky. U *in vitro* kapacitovaných spermií převládal fosforylační vzor v oblasti akrozomu. Významně vyšší fosforylace na akrozomu dosahovaly spermie z inseminační dávky. Tyrozinová fosforylace naopak nebyla zaznamenána na bičíku kančích spermií z žádné námi zkoumané skupiny. U většiny savčích druhů je potvrzená tyrozinová fosforylace v bičíku spojována s hyperaktivací pohybu spermie po jejím uvolnění z oviduktu, avšak u prasete existují různé často velmi odlišné informace. Je proto možné z hlediska kapacitace uvažovat o nižším významu fosforylace v této oblasti kančí spermie. Otázkou rovněž zůstává rozdílnost ve zvolených postupech experimentů, ve složení kapacitačních médií, v typu použité fixace a dalších rozdílů ve zpracování vzorků spermií.

U kapacitovaných spermií jsme detekovali na tyrozinu fosforylované proteiny o molekulové hmotnosti 28 kDa, 35 kDa a 41 kDa. Tyto zjištěné hodnoty se shodují s některými výsledky uváděnými v odborné literatuře. V průběhu kapacitace jsme zaznamenali nárůst fosforylace během prvních dvou hodin, poté se množství fosforylovaných proteinů snižovalo. Z těchto výsledků by bylo možné uvažovat o tom, že fosforylace u déle kapacitovaných spermií klesá patrně v důsledku snížené viability spermií a snižuje se tedy také úspěšnost fertilizace oocyty. Zajímavé bylo zvyšování míry fosforylace proteinu o molekulové hmotnosti 28 kDa zejména v pozdější fázi kapacitace, což by mohlo potvrzovat údaje některých jiných autorů o zapojení proteinu přibližně stejné molekulové hmotnosti (nejčastěji je uváděn protein p32) v souvislosti s navázáním spermie k ZP oocyty. Jelikož však bylo při naší práci možné provést jen omezený počet opakování, je pro zjištění přesnějších dat nutné v tomto zkoumání ještě pokračovat. Rovněž při detekci na tyrozinu fosforylovaných proteinů se, jak lze zjistit z odborné literatury, metodické přístupy různých výzkumných skupin liší, proto je nutné zjištěné rozdíly hodnotit i z tohoto hlediska.

Do budoucna by bylo vhodné se zaměřit na určení nejvhodnější doby pro kapacitaci kančích spermií v *in vitro* podmínkách, a to v případě nativního ejakulátu i inseminačních dávek. Velmi zajímavé by mohlo být sledování průběhu kapacitace spermií z hlediska použitých ředidel inseminačních dávek, kdy nevhodné ředidlo kvalitu spermií pro použití k inseminaci snižuje. Dalším předmětem zkoumání by u kryokonzervovaných spermií mohla být závislost indukce určité jejich dysfunkce spojená s degradací a fosforylací některých proteinů. Otázkou také zůstává fosforylace na serinových a threoninových zbytcích proteinů spermií, které dosud příliš prostudovány nebyly, a zjištění souvislostí s tyrozinovou fosforylací. Rovněž by bylo zajímavé sestavení souboru proteinů spojených s kapacitací kančích spermií a jejich funkčním stavem.

8 Literatura

Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ. 2004. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *Journal of cell science*. 117:3645–3657.

Awda BJ & Buhr MM. 2010. Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) pathway and reactive oxygen species regulate tyrosine phosphorylation in capacitating boar spermatozoa. *Biology of reproduction*. 83: 750-758.

Baldi E, Luconi M., Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. 2000. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Frontiers in bioscience*. 5: E110-23.

Bailey J, Morrier A, Cormier N. 2003. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Centra de recherche en biologie de la reproduction, Department des sciences animales, Université Laval. Québec. Canada.*

Baker MA, Hetherington L, Ecroyd H, Roman SD, Aitken RJ. 2004. Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *Journal of cell science*. 117 (2):211-222.

Bedu-Addo K, Lefievre I, Moseley FLC, Barratt CLR, Publicover SJ. 2005. Bicarbonate and bovine serum albumin reversibly switch'capacitation-induced events in human spermatozoa. *Molecular of human reproduction*. 11:683-691.

Bernecic NC, Gadella BM, Leahy T, Graaf de SP. 2019. Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa. *Therigenology*. 137:56-66. DOI: 10.1016.

Bleil JD & Wassarman PM 1980. Structure and function of the zona pellucida - identification and characterization of the proteins of the mouse oocytes zona pellucida. *Developmental biology* 76, 185-202.

Bravo MM, Aparicio IM, Gacia-Herreros M., Gil MC, Peña FJ, Garcia-Marin L. 2005. Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. *Molecular of reproduction*. 71 (1): 88-96.

Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J, Breitbart H. 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of reproduction*. 68(3): 837-45.

Buffone MG, Foster JA, Gerton GL. 2008. The role of the acrosomal matrix in fertilization. *International journal of developmental biology*. 52(5-6): 511-22.

Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, Moss SB. 1996. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: Identification of a kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Journal of developmental biology*. 180. 1:284-296.

Ded L, Dostalova P, Zatecka E, Dorosh A, Komrskova K., Peknicova J. 2019. Fluorescent analysis of boar sperm capacitation proces in vitro. *Reproductive of biology and endocrinology*. 17:109.

Dube C, Leclerc P, Baba T, Reyes-Moreno C, Bailey JL. 2005. The proacrosin binfing protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm. *Journal of andrology*. 26:519-28.

Eddy EM, O'Brien DA, Neill JD, Challis JRG, Pfaff DW, Plant TM, Kretser DM, Richards JS, Wassarman PM, editors. Knobil and Neill's 1994. *The spermatozoon. Psyhiology of reproduction*. Elsevier Academic Press, San Diego.189-232.

Flesch FM, Colenbrader B., LMG van Golde, Gadella BM. 1999. Capacitation Induces tyrosine Phosphorylation of Proteins in the Boar Sperm Plasma Membrane. *Biochemical and biophysical research communications*. 262. 3: 787-792.

Flesch FM, Wijnand E, Van de Lest CHA, Colenbrander B, Van Golde LMG, Gadella BM. 2001. Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. *Molecular of reproduction and development: Incorporating gamete research* 60: 107-115.

Florman HM & Ducibella T. (2006). Fertilization in mammals. In *The Physiology of reproduction* (Neill, J.D., ed.) Elsevier Press, San Diego, Canada. 1: 55-112.

Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. 1997. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphatedependent pathway. *Biology of Reproduction*. 56:707-719.

Gilbert SF. 2000. *Development biology* 6 th, Sinauer Associates Internacional.

Gilbert SF. 2006. *Developmental biology*. 8th ed. Sunderland (MA), Sinauer Associates, Internacional

Gadella BM, Harrison RA. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Developmental biology* 127: 2407-2420.

Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th edition. Lippincott Williams& Wilkins, USA.

Harayama H. 2003. Viability and protein phosphorylation patterns of boar spermatozoa agglutinated by treatment with a cell-permeable cyclic adenosine 3'5'-monophosphate analog. 24:831-842.

Hunter T. 2007. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Molecular cell biology* 28: 730-738.

Chamberland A, Fournier V, Tardif S, Sirad MA, Sullivan R, Bailey JL. 2001. The effect of heparin onmotility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology*. 55:823-835.

- Jha KN & Shivaji S. 2002. Identification of the major tyrosine phosphorylated protein of capacitated hamster spermatozoa as a homologue of mammalian sperm kinase anchoring protein. *Biology of reproduction* 61:258-270.
- Jha KN, Salicioni AM, Arcelay E, Chertihin O, Kumari S, Herr JC, Visconti PE. 2006. Evidence for the involvement of proline-directed serine/threonine phosphorylation in sperm capacitation. *Biology of reproduction* 12:781-789.
- Jones R, James PS, Oxley D, Coadwell J, Suzuki-Toyota F, Howes EA. 2008. The equatorial subsegment in mammalian spermatozoa is enriched in tyrosine phosphorylated proteins. *Biology of reproduction* 79: 421-431.
- Kalab P, Peknicova J, Geussova G, Moos J. 1998. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Molecular reproduction and development*. 51:304–314.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. 2003. Acroplaxome, an F-actin–keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Molecular biology of cell* 14: 4628-4640.
- Kulanand J & Shivaji S. 2001. Capacitation-associated changes in protein tyrosine phosphorylation, hyperactivation and acrosome reaction in hamster spermatozoa. *Andrologia*. 33:95-104.
- Kwon WS, Rahman S, Lee JS, Kim J, Yoon SJ, Park YJ, You YA, Hwang S, Pang MG (2014). A comprehensive proteomic approach to identifying capacitation related proteins in boar spermatozoa. *BMC genomic*.15:897.
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. 1996. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biology of reproduction*. 55:684–692
- Leclerc P., Lamirande de E., Gagnon C. 1997. Regulation of Protein-Tyrosine Phosphorylation and Human Sperm Capacitation by Reactive Oxygen Derivatives. *Free radical biology and medicine*. 22. 4:643-656.
- Lewis B & Aitken RJ. 2001. Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. *Biology of reproduction* 64: 1545-1556.
- Leyton L & Saling P. 1989 95 kDa sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Biology of cell*. 57 1123-1130.
- Luconi M, Krausz C, Forti G, Baldi E. 1996. Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biology of reproduction*. 5: 207-216.
- Luno V, Ubeda RL, Vazquez FAG, Gil L, Matás C. 2013. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/ acrosome reaction. *Reproductive biology and endocrinology*. 2:75.

- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934.
- Mahony MC, Gwathmey T. 1999. Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biology of reproduction*. 60: 1239-1243.
- Naresh S, Atreja SK. 2015. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology*. 70 (3): 211-216.
- Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S. 1999 Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertility and sterility*. 71: 919-923.
- Naz RK 1999. Involvement of protein serine and threonine phosphorylation in human sperm capacitation. *Biology of reproduction* 60: 1402-1409.
- Naz RK & Rajesh PB 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reproduction of biology and endocrinology*. 2: 75.
- O'Flaherty S, Coffey A, Edwards R, Meaney W, Fitzgerald GF, Ross RP. 2004. Genome of styphylcoccal phage. *186:2862-2871*.
- 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 of human reproduction*. 5:1017-1026.
- Patrat C, Serres C, Jouannet P. 2012. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of Cell*. 92: 255-266.
- Petrunkina AM, Friedrich J, Drommer W, Bicker G, Waberski D, Topfer-Petersen E 2001 Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca²⁺ concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. *Biology of reproduction* 122: 469-480.
- Petrunkina A, Gelhaar R, Drommer W, Waberski D, Topfer-Petersen E. 2001. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Biology medicine of reproduction*. 121 (6): 889-96.
- Petrunkina AM, Simon K, Gunzel-Apel AR, Topfer-Petersen E 2003 Regulation of capacitation of canine spermatozoa during co-culture with heterologous oviductal epithelial cells. *Reproduction of domestical animal*. 38: 455-463.
- Pommer AC, Rutlant J, Meyers SA. 2003 Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biology of reproduction* 68:1208-1214.

- Pukazhenthil BS, Wildt DE, Ottinger MA, Howard J. 1998. Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors. *Molecular reproduction and developmental*. 49:48-57.
- Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Qill TA, Clapham DE. 2007. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings National Academy Science USA*. 104 (4):1219-1223.
- Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelya E, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Society of reproduction and fertility supplement*. 65:245-260.
- Si Y & Okuno M. 1999. Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biology of reproduction*. 61 (1): 240-6.
- Sidhu KS, Mate KE, Gunasekera T, Veal D, Hetherington L, Baker MA, Aitken RJ, Rodger JC. 2004. A flow cytometric assay for global estimation of tyrosine phosphorylation associated with capacitation of spermatozoa from two marsupial species, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) and the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Biology of reproduction*. 127:95-103.
- Suarez SS & Dai XB. 1995. Intracellular calcium reaches different levels of elevation in hyperactivated and acrosome-reacted hamster sperm. *Molecular reproduction and development* 42:325-333.
- Suarez SS & Ho HC. 2003. Hyperactivation of mammalian sperm. *Molecular biology of cell (Noisy-le-grand)*. 49(3): 351-6.
- Suzuki K, Mori T, Shimizu H. 1994. In vitro fertilization of porcine oocytes in chemically defined medium. *Theriogenology*. 42:1357-1368.
- Tardif S, Dubé C, Chevalier S, Bailey JL. 2001. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biology of reproduction*. 65: 784-792.
- Toshimori K & Ito C. 2003. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Archives of histology and cytology* 66: 383-396.
- Urner F, Leppens-Luisier G, Sakkas D. 2001. Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. *Biology of reproduction*. 64(5): 1350-7.
- Urner F & Sakkas D. 2003. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Biology of reproduction* 125: 17-26.
- Visconti P. E., Moore G. D., Bailey J. L., Leclerc P., Connors S. A., Pan D., Olds-Clarke P., Kopf G. S. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Molecular reproduction and development*. 121(4): 1139-50.

Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Molecular reproduction and development*. 121:1129-1137.

Visconti PE, Steward-Savage J, Blasco A, Battaglia L, Mirands P, Kopf GS, Tezon JG. 1999. Roles of bicarbonate, cAMP, and Protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biology of reproduction*. 61. 1:76-84.

Visconti PE., Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS. 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *Journal biology of chemistry*. 274(5): 3235-42.

Vredenburg WL. & Parrish JJ. 1995. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Biology of reproduction*. Volume 40. 4:490-502.

Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K. 1994. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozenthawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *Journal reproduction, fertility and development*. 104:305–313.

Wang S, Wang W, Xu Y, Tang M, Fang J, Sun H, Sun Y, Gu M, Liu Z, Zhang Z, Lin F, Wu T, Song N, Wang Z, Zhang W, Yin C 2014. Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation. *Proteomics* 14:298–310.

Wang Y, Qi L, Huang S, Zhou T, Guo Y, Wang G, Guo X, Zhou Z, Sha J. 2015. Quantitative phosphoproteomics analysis reveals a key role of insulin growth factor 1 receptor (IGF1R) tyrosine kinase in human sperm capatition. *The American society for biochemistry and molecular biology*. 14 (4): 1104-12. DOI: 10.1074

Wang Y, Gu Q, Gao H, Shao J, Pang W, Dong W. 2018. Exploring boar sperm sialylation during capacitation using boronic acid-functionalized beads. *Biology of reproduction* 155:25-36.

Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature cell biology* 3: 59-64.

Witze ES, Old WM, Resing KA, Ahn NG. 2007. Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nature methods* 4: 798-806.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil E., Neill J. D. (eds.): *The Physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 189-317.

Zhen L, Wang L, Fu J, Li Y, Li X. 2016. Hexavalent chromium affects spúerm motility by influencing protein tyrosine phosphorylation in the midpiece of boar spermatozoa. *Reproductive toxicology*. Shangai key Lab of veterinary biotechnology. China

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

Akr	akrozom
Akr α	celý akrozom
Akr β	část akrozomu
AMK	aminokyselina
APS	persíran amonný
AR	akrozomální reakce
ATP	adenosin trifosfát
BSA	bovinní sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EJ	ejakulované spermie
K	negativní kontrola
KAP	kapacitované spermie
NC	nitrocelulozová membrána
PBS	phosphate-buffered saline (fosfátový pufr)
PKA	proteinkináza A
PNA	peanut agglutinin
PTK	protein tyrosinkináza
P-Tyr	fosforylace na tyrozinu
RNA	ribonukleová kyselina
SACY	rozpustná denylcykláza
SDS	dodecylsulfát sodný

sEqS	subekvatoriální segment
Ser	serin
Thr	treonin
Tyr	tyrozin
ZP	zona pellucida

