

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Degradace DQH povrchového proteinu kančích spermií
během in vitro kapacity**

Diplomová práce

Havlíková Kateřina

Reprodukční biotechnologie

prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Degradace DQH povrchového proteinu kančích spermií během in vitro kapacity" 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 12.4.2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za vedení mé práce, odborné rady a vedení během mého studia.

Velice děkuji RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za vedení během mé práce, pomoc ve chvílích, kdy jsem byla v koncích a nezměrnou trpělivost při konzultacích mé diplomové práce.

Děkuji všem ostatním, kteří se podíleli na vzniku mé diplomové práce, především při laboratorní práci.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodičům za podporu během studia, bez které bych studium nedokončila.

Degradace DQH povrchového proteinu kančích spermii během in vitro kapacitace

Souhrn

Spermie na své cestě k vajíčku musí projít kapacitačními změnami, aby jej byla schopna oplodnit. Během kapacitace dochází k dramatickým změnám nejen uvnitř spermatické buňky, ale především na jejím povrchu. Prvním krokem kapacitace je odstranění proteinového obalu, který spermie získává během svého vývoje v samčím pohlavním traktu. Mezi proteiny, které jsou vázány na povrch kančí spermie během ejakulace, patří i DQH protein, jakožto protein semenné plazmy. Tyto proteiny slouží jako dekapacitační faktory a většina z nich během kapacitace mizí z povrchu spermie. Cílem práce bylo zjistit, zda je DQH protein během kapacitace degradován a zda do jeho degradace je zapojen ubiquitin-proteasomový systém.

Byla provedena detekce DQH proteinu v extraktech spermii po in vitro kapacitaci v nemodifikovaném médiu a v médiu s přidavkem inhibitoru proteasomu (MG-132) a inhibitoru enzymu aktivujícího ubiquitin (Pyr-41). Densitometrické hodnocení ukázalo výrazný úbytek proteinu po kapacitaci, přičemž nebyl nalezen signifikantní rozdíl v množství DQH proteinu ve spermii kapacitovaných v nemodifikované i modifikovaném médiu. Pomocí imunofluorescenční mikroskopie byla zjištěna přítomnost DQH proteinu po celé hlavičce ejakulované spermie a ztráta proteinu během in vitro kapacitace. Po kapacitaci nebyl nalezen rozdíl v detekci DQH proteinu u spermii kapacitovaných v médiu s inhibitory a kapacitovanými v nemodifikovaném médiu. Z našich výsledků vyplývá, že se ubiquitin-proteasomový systém pravděpodobně nepodílí na degradaci DQH proteinu během kapacitace kančích spermii, ale že je protein z povrchu spermie odstraňován jiným způsobem.

Došli jsem k závěru, že je protein DQH vyvazován z povrchu spermie v oviduktu samice za pomoci glykosaminyglykanů.

Klíčová slova: spermie, kapacitace, imunolokalizace, Western blot

Degradation of boar DQH sperm surface protein during in vitro capacitation

Summary

The sperm on its way to the egg must undergo a capacitation changes to fertilize it. During capacitation, dramatic changes occur not only within the sperm cell but mainly on its surface. The first step in capacitation is to remove the protein coating that sperm acquires during its development in the male reproductive tract. Proteins bound to the surface of boar spermatozoa during ejaculation include the DQH protein as a seminal plasma protein. These proteins serve as decapacitation factors and most of them disappear from the sperm surface during capacitation. The aim of the study was to determine whether DQH protein is degraded during sperm capacitation and ubiquitin-proteasome system is involved in its degradation. Detection of DQH protein in sperm extracts after in vitro capacitation in unmodified medium and in medium supplemented with a proteasome inhibitor (MG-132) and inhibitor of ubiquitin-activating enzyme (PVR-41) was performed. The densitometric evaluation showed significant protein loss after capacitation, with no significant difference in the amount of DQH protein in spermatozoa capacitated in both unmodified and modified media. By immunofluorescent microscopy, the presence of the DQH protein was found at the entire of ejaculated sperm head and the loss of protein during in vitro capacitation. After capacitation, no difference was found in the detection of DQH protein in capacitated spermatozoa with inhibitors and capacitated in the unmodified medium. Our results suggest that the ubiquitin-proteasome system is not likely to be involved in the degradation of the DQH protein during boar sperm capacitation but is removed from the sperm surface in the different way. We conclude that the DQH protein is bound from the sperm surface by oviducts the female reservoir with glycosaminoglycans.

Keywords: sperm, capacitation, immunolocalization, Western blot

Obsah

1	Úvod	4
2	Vědecká hypotéza a cíl práce	5
3	Literární rešerše	6
3.1	Samčí pohlavní soustava	6
3.2	Spermatogeneze a zrání spermie	6
3.3	Stavba spermie	8
3.4	Epididymální maturace	10
3.5	Ejakulace	10
3.6	Semenná plazma	10
3.6.1	Proteiny semenné plazmy, jejich interakce se spermii	11
3.6.2	Proteiny semenné plazmy u jednotlivých druhů zvířat	12
3.6.3	Protein DQH	15
3.7	Vejcovod a ovidukální rezervoár spermí	16
3.8	Kapacitace	16
3.9	Degradace proteinů v buňkách	19
3.10	Proteasom a jeho role při fertilizaci	19
4	Materiál a metodika	22
4.1	Materiál	22
4.2	Metodika	22
4.2.1	Příprava semene pro další pokusy	22
4.2.2	Kapacitace spermí	23
4.2.3	Příprava mikroskopických preparátů	24
4.2.4	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	25
5	Výsledky	29
5.1	Detekce DQH proteinu v extraktech spermí	29
5.2	Lokalizace DQH proteinu ve spermích	31
6	Diskuse	36
7	Závěr	39
8	Zdroje	40

1 Úvod

Spermie, jakožto samčí gameta, vzniká během spermatogeneze. Po spermatogenezi jsou spermie uchovávány v hlavě nadvarlete, kde získávají progresivní pohyb vpřed za hlavičkou a dozrávají. Během ejakulace se spermie dostávají do samičího pohlavního traktu, kde musí podstoupit kapacitaci, která je nezbytná pro oplození vajíčka. Proteiny semenné plazmy, které se při ejakulaci vážají na povrch spermie, jsou důležité pro ochranu a zajištění přežitelnosti spermií v samičím reprodukčním traktu.

DQH protein na kančích spermiích tvoří spolu s ostatními proteiny semenné plazmy ochrannou vrstvu na spermii a díky svým vazebným schopnostem se může účastnit dalších dějů vedoucích k oplození vajíčka. Plazmatická membrána spermií spolu s proteiny prochází v průběhu kapacitace významnými změnami, které vedou k fertilizační schopnosti spermie. Zapojení ubiquitin-proteasomového systému (UPS) do remodelace povrchu kančích spermií není ještě zcela objasněn a úloha UPS v degradaci proteinů pocházejících ze semenné plazmy, jakož i DQH proteinu během kapacitace, je stále předmětem zkoumání.

Proteasom je složitý komplex hydrolytických enzymů, ve kterém dochází ke štěpení označeného proteinu ubiquitinem. DQH protein byl nalezen ve skupině proteinů asociovanými s proteasomem kančích spermií (Miles et al. 2013), proto můžeme předpokládat, že proteasom napomáhá jeho degradaci během kapacitace.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

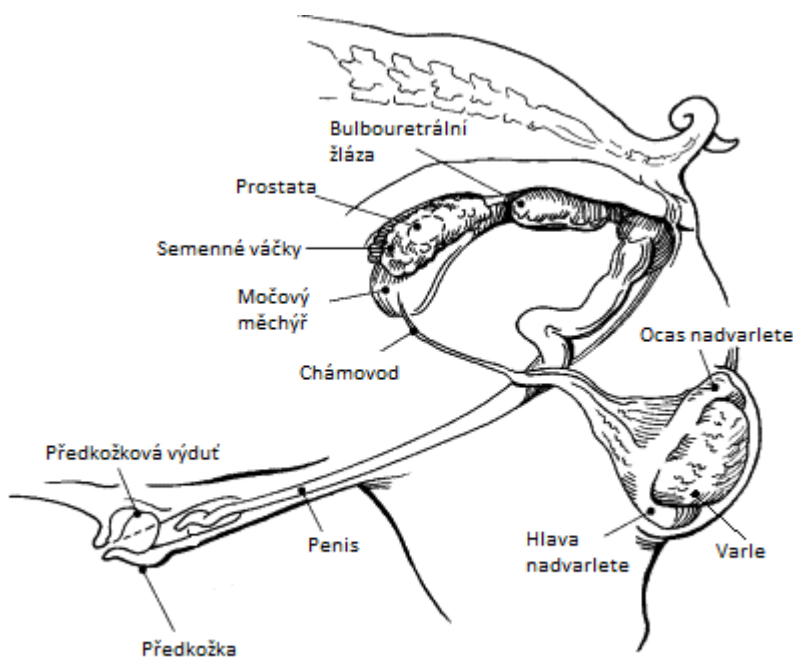
Cíle práce vychází z hypotézy, že je ubiquitin-proteasomový systém zapojen do degradace DQH proteinu u kančích spermií během kapacitace.

Cílem práce byla lokalizace a detekce DQH proteinu v kančích spermiích před a po kapacitaci v nemodifikovaném a modifikovaném kapacitačním médiu s přídatkem inhibitorů ubiquitin-proteasomového systému.

3 Literární rešerše

3.1 Samčí pohlavní soustava

Samčí pohlavní soustava se skládá z varlat, jež jsou párovým orgánem tvořícím spermie a pohlavní hormony. Varlata spolu s nadvarletem jsou uložena v šourku. V nadvarleti jsou spermie skladovány a dochází v něm k epididymálnímu zrání spermií, jehož výsledkem je získání progresivního pohybu spermie vpřed a schopnost vázat se na zona pellucida. Vývod z nadvarlete navazuje na chámovod, do něhož ústí přídatné pohlavní žlázy. Mezi ně patří prostata, semenné vajíčky a bulbo-uretrální žlázy. Tyto žlázy produkují sekret, který společně se spermiemi při ejakulaci tvoří ejakulát (viz obrázek 1) (Reece 1998, Dylevský 2009).



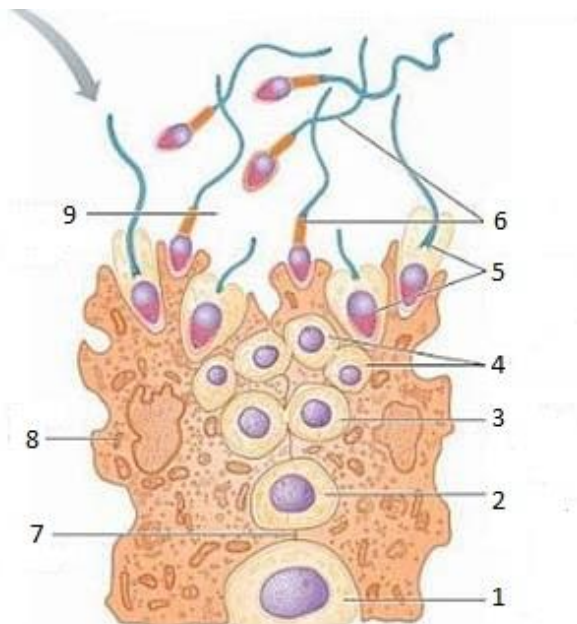
Obrázek 1: Anatomická pohlavní soustava kance (Kuster a Althouse 2006)

3.2 Spermatogeneze a zrání spermie

Tvorba samčích gamet je výsledkem rozsáhlé buněčné diferenciaci, kdy dochází k transformaci kruhové spermatidy na vysoce polarizovanou a plně pohyblivou buňku. Většina těchto velmi složitých a komplexních událostí probíhá ve varlatech během spermatogeneze. Tento proces je zásadní pro oplození. Na transformaci se podílí dva typy dělení. První je mitóza a následně meióza. Mitóza je dělení buněk, při němž dochází k rozdělení na buňky se stálým počtem chromozomů, jako buňka původní. Následuje meióza, při níž se buňky rozdělí

na buňky s haploidním počtem chromozomů (Reece 1998, Kittnar 2011, Lullmann-Rauch 2012).

Kmenové buňky neboli spermatogonie, jsou neustálým zdrojem buněk pro budoucí vývoj spermií. Tyto buňky se nacházejí u bazální membrány. Spermatogonie podléhají mitotickému dělení, kdy se vydělí dvě buňky, z toho jen jedna zůstává součástí populace kmenových buněk a druhá migruje dále mezi Sertoliho buňky. Takto vzniklý primární spermatocyt podléhá prvnímu meiotickému dělení. Dokončení prvního meiotického dělení probíhá až v pubertě, když dojde ke zvýšení hladiny testosteronu. Vzniklý sekundární spermatocyt prochází dále druhým meiotickým dělením a v tuto chvíli je počet jejich chromozomů haploidní. Vzniklé buňky se nazývají spermatidy (Reece 1998, Kittnar 2011, Lullmann-Rauch 2012). Celý proces je popsán viz obrázek 2.



Obrázek 2: Spermatogeneze (1- kmenová buňka; 2-primární spermatocyt; 3-sekundární spermatocyt, 4 – spermatida, 5 – spermatida měnící se na spermii, 6- spermie 7- těsný spoj, 8- Sertoliho buňka, 9 - lumen semenotvorného kanálku (Sherwood 2010)

Po dokončení meiózy začíná spermiogeneze, kdy ze spermatidy vznikne spermie. Během tohoto procesu dochází ke kondenzaci jádra, k tvorbě akrosomu a bičíku. Nejdříve se syntetizuje RNA, poté následuje začátek kondenzace nukleárního chromatinu. Jádro se pohybuje z centrální polohy směrem k okraji buňky v okamžiku, kdy se rozvíjí akrozom. Dále se jádro kondenzuje a prodlužuje. Značně se tím zmenší jeho velikost a to až na 10 % původní velikosti. Obsah akrosomu je souběžně produkován ve vezikulech Golgiho komplexu a je kondenzován nad jadernou membránou, kde překrývá bazální pól jádra. Vnitřní membrána

akrosomu je zakotvena do jaderné membrány. Krom tohoto obsahuje různé hydrolytické enzymy, které jsou nezbytné pro průnik skrz zona pellucida. Bičík je vytvářen centriolami, z nichž jedna tvoří spojovací část krčku spermií, druhá tvoří axiální vlákno bičíku. Vnější hustá síť vláken není odvozena od centriolu, i když jsou připojena k vnějším mikrotubulům axiálního vlákna. Vývoj středního vlákna se objevuje v pokročilejší fázi procesu spermatogeneze, kdy mitochondrie kondenzují do spirály kolem proximální části bičíku. Doba trvání spermatogeneze, tj. doba mezi spermatogonálním dělením a uvolněním spermatozoidu je u většiny savců 60 dnů. Průchod epididymem dalších 8 – 14 dnů (Lullmann-Rauch 2012).

Takto vytvořené, zatím nepohyblivé spermie, se posouvají do hlavy nadvarlete za pomoci tekutiny tvořené semenotvornými kanálky ve varletní síti. V nadvarletí získávají schopnost pohybu vpřed přímo za hlavičkou a oplozovací schopnost. Spermie se následně deponují v ocasu nadvarlete, kde se nachází až 70 % všech vytvořených spermií. Zbytek spermií je fagocytován nebo odchází společně s močí (Reece 1998).

3.3 Stavba spermie

Spermie je mužská pohlavní buňka tvořící se v semenotvorných kanálcích varlat. Tubuly semenotvorných kanálků obsahují složitou řadu různě vyvinutých zárodečných buněk, které nakonec vytvoří zárodečné gamety. Spermie jsou prodloužené buňky sestávající u většiny zvířat ze zploštělé hlavičky a bičíku. Spermie je pokryta plasmalemou neboli plazmatickou membránou. V přední části hlavičky, se nachází akrosom. Dále pak hlavičku a bičík spojuje krček. Celý popis spermie viz obrázek 3.

Hlavička spermie

Hlavním znakem hlavičky je oválné, ploché jádro obsahující kompaktní chromatin tvořený kyselinou deoxyribonukleovou (DNA). Dále obsahuje akrosomový váček a dvojici centriolů, kdy proximální centriol je důležitý pro dělicí vřetenko při dokončení druhého meiotického dělení vajíčka.

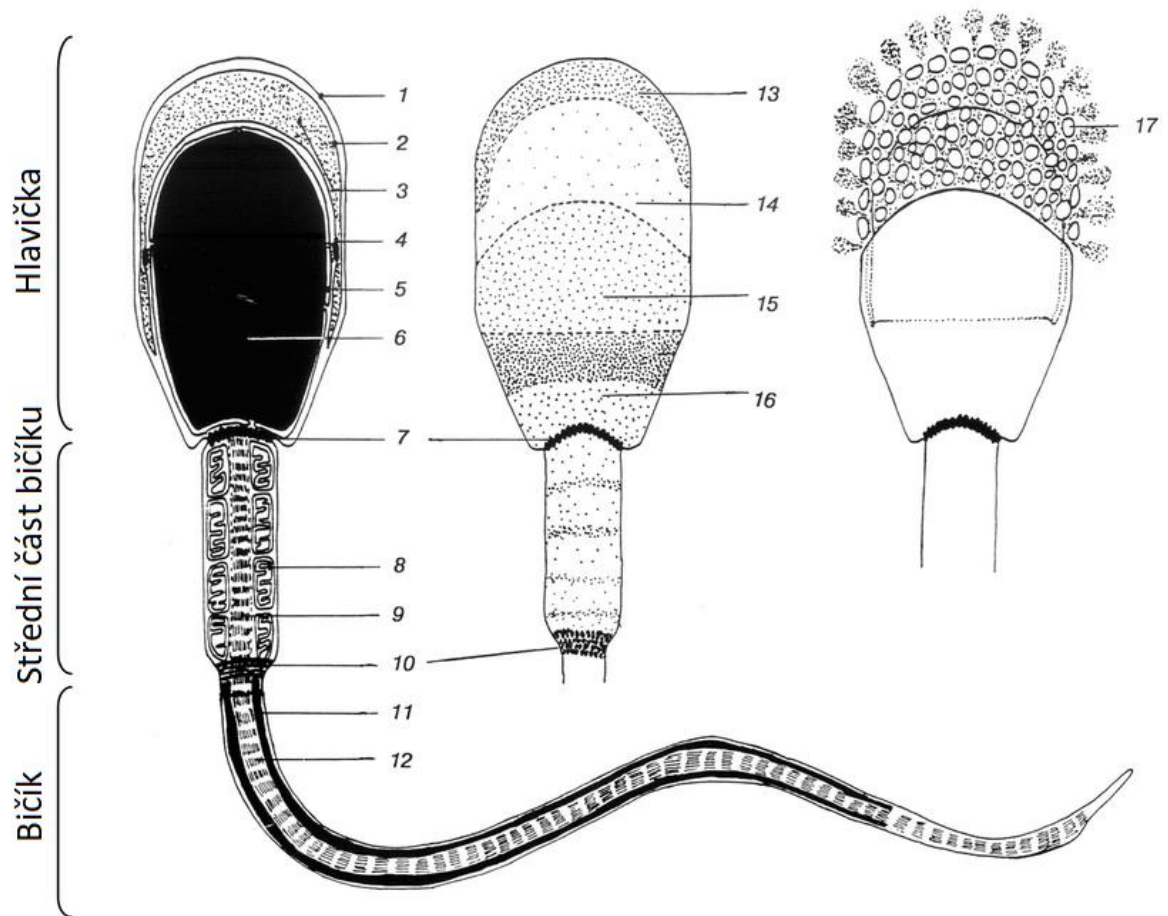
Akrosom

Akrosom je krycí organela, překrývající přední část jádra spermie. Má tvar podobný čepičce a obsahuje akrosin, hyaluronidázu a jiné hydrolytické enzymy podílející se na oplození. Akrosom patří mezi nezbytné části spermie, bez kterých by nemohlo dojít k oplození. Podílí se na spojení spermie a zona pellucida (ZP) a následné penetraci skrz ZP. Při vazbě spermie na ZP dochází k akrosomální exocytóze, kdy fúzuje vnější akrosomální membrána s membránou

plazmatickou. Akrosom je rozdělen na akrosomální čepičku a ekvatoriální segment (Kim et al. 2001).

Bičik spermie

Bičik spermie zajišťuje pohyb vpřed za hlavičkou a je složen z několika segmentů, a to z krčku, středního, hlavního a koncového segmentu. Krček je spojovací část mezi hlavičkou spermie a bičkem. Oblast bičíku mezi krčkem a prstencem tvoří střední část, která obsahuje mitochondrie. Centrální jádro střední části bičíku je tvořeno axonemou, která se skládá z devíti párů mikrotubulů uspořádaných radiálně kolem dvou středních vláken (Reece 1998, Lullmann-Rauch 2012)



Obrázek 3: Anatomické uspořádání spermie. 1) plazmatická membrána, 2) vnější akrosomální membrána, 3) matrice akrosomálních enzymů, 4) vnitřní akrosomální membrána, 5) jaderná membrána, 6) jádro, 7) krček, 8) mitochondrie, 9) proximální část bičíku, 10) prstenec, 11) vláknité pouzdro, 12) axonema + vnější hustá vlákna, 13) apikální hřeben, 14) pre-equatoriální část, 15) ekvatoriální segment, 16) post-ekvatoriální segment, 17) smíšené vesikuly vytvořené během reakce akrosomu přes fúzi mezi plazmatickou membránou a vnější akrosomovou membránou (Gadella et al. 2008).

3.4 Epididymální maturace

Ve finální fázi gametogeneze vychází spermie z testes, ale stále nejsou pohyblivé ani fertillní, proto vyžadují významnou post-testikulární modifikaci, aby mohly být schopné oplození. Po opuštění varlat nemají spermie schopnost progresivního pohybu vpřed ani možnost oplodnit vajíčko. Epididymální maturace umožňuje spermii získat pohyb vpřed a schopnost akrosomální reakce (Visconti et al. 1998, Mardešić 2013).

Specifické prostředí v epididymu hraje zásadní roli při řízení a vyvolání konečných změn ve spermii. Stupeň zrání spermií v epididymis je mimo kontrolu genomu zárodečných buněk a je proto z velké části důsledkem jejich interakce s epididymální tekutinou. Většinou se jedná o vazbu se specifickými proteiny přítomnými v lumen epididymu. Pobyt v epididymu je důležitý pro ochranu gamet až do ejakulace, stejně jako pro regulaci funkčnosti a integrity akrosomu (Dechaux et al. 2005).

Dechaux et al. (2005) zjistili, že je výrazný rozdíl mezi spermii z varlat a epididymu, kdy hlavní změna byla v progresivním snížení detekce určitých proteinů na spermii. Bylo pozorováno, že některé proteiny, které spermie získá již během spermatogeneze, se pomalu ztrácí při průchodu epididymis. Některé proteiny se ale naopak na spermii během jejich epididymálního zrání objevují (Dacheux et al. 1989). Bylo popsáno několik typů proteinů s odlišnou funkcí v epididymální tekutině různých druhů savců včetně člověka, které se přímo nebo nepřímo účastní maturace spermií (Dacheux et al. 2016).

3.5 Ejakulace

Během ejakulace dochází k vypuzení spermií z nadvarlete společně se sekrety přídatných pohlavních žláz do samičího reprodukčního traktu. Ejakulát je směs spermií a semenné plazmy, kdy poměr a obsah spermií se liší mezi jednotlivými ejakulovanými frakcemi, jak mezidruhově, tak i mezi jednotlivými zvířaty. Kančí ejakulát je velmi objemný a lze jej rozdělit do třech frakcí. První frakce ejakulace u kance obsahuje granulocyty, především neutrofilů a velice málo proteinů. Následná frakce je naopak velmi bohatá na spermie (Karlsson 2011, Šrámková 2013).

3.6 Semenná plazma

Semenná plazma je směs sekretů reprodukčních pohlavních orgánů samců, podporující životaschopnost spermií. Upravuje pro spermie příznivě pH v pochvě samice a má stimulační

vliv na pohyblivost spermií. Jedná se o směs sekretů pocházejících z varlat, epididymu a samčích přídatných pohlavních žláz, mezi něž patří semenné váčky, ampula chámovodu, prostata a bulbouretrální žlázy. Její pH se pohybuje mezi 7,35-7,50 a tím má pufovací vlastnosti, které chrání spermie od kyselého prostředí vagíny. Tato komplexní tekutina obsahuje organické, ale i anorganické látky, mezi které patří i vysokomolekulární látky v podobě různých proteinů. Jednotlivé proteiny se svou strukturou a vlastnostmi liší druh od druhu. Mají ale společnou jednu zásadní věc, a to interagovat s velkou škálou ligandů, a tím zásadně ovlivňovat vazebné vlastnosti spermií. Některé proteiny ze semenné plazmy se navážou na povrch spermií při ejakulaci a tyto proteiny následně chrání spermie a umožňují jim dosáhnout cílového místa. Slouží jako ochrana akrosomu před předčasnou akrosomální reakcí. Další roli mohou mít proteiny semenné plazmy při konzervaci semenných dávek u kanců (Strzeżek et al. 2005, Jonáková et al. 2007).

Kromě toho, že semenná plazma má regulační funkci během oplození, tak má i jiné zásadní funkce. Jedná se například o inhibici zánětlivého procesu děložní sliznice po interakci se spermii, kdy snižuje leukocytózu v děloze (Rozeboom 2000, Strzeżek et al 2005).

Muino-Blanco et al. (2008) provedli pokus, kdy byla přidána semenná plazma do inseminačních dávek a byl sledován její vliv na oplození schopnost spermií. Bylo zjištěno, že přidání semenné plazmy do zamražených semenných dávek u kanců výrazně zlepšuje odolnost a oplození schopnost u kančích spermií (Muino-Blanco et al. 2008).

3.6.1 Proteiny semenné plazmy, jejich interakce se spermii

Semenná plazma by měla minimálně obsahovat 30 % proteinů, ale je to velmi individuální jak u jednotlivých druhů, tak i mezi zvířaty. Předpokládá se, že kontakt spermie se semennou plazmou prodlužuje životnost spermie. Při delším kontaktu naopak způsobuje jejich rychlejší stárnutí. Pokud dojde ke zředění semenné plazmy, prodlužuje se v in vitro podmínkách životaschopnost spermií (Druart et al. 2018).

Interakce mezi plazmatickými proteiny semenné plazmy nebyly zatím plně a podrobně prozkoumány. Je známo, že tyto interakce se podílí na tvorbě agregovaných forem proteinů a na vazbě na povrch spermií. Takto povrchově navázané proteiny se mění v průběhu celé cesty pohlavními orgány. Existence agregovaných forem proteinů v semenné plazmě byla popsána jen u některých druhů (Manjunath & Therien 2002, Jonáková et al. 2004).

3.6.2 Proteiny semenné plazmy u jednotlivých druhů zvířat

Semenné plazmatické proteiny hřebce, býka a kance mohou být rozděleny do tří hlavních skupin podle jejich strukturních charakteristik (viz tab. 1). Nejvíce zastoupenými proteiny semenné plazmy u prasat jsou spermadhesiny (AQN-1, AQN-3, AWN, PSPI a PSPII) o velikosti 12-16 kDa. Naopak hlavními složkami semenné plazmy býků a hřebců jsou proteiny s fibronektinovou doménou (Töpfer-Petersen et al. 1998, Jonáková et al. 2010, Manjunath et al. 2007).

1. Spermadhesiny

Patří do skupiny živočišných lektinů a tvoří skupinu podskupin proteinů s CUB doménou (z angl. C – complement subcomponent; U – urchin epidermal growth factor; B – bone morphogenetic protein), která byla nalezena v řadě vývojově regulovaných procesů (Varela et al. 1997, Jonáková et al. 2010).

2. Proteiny obsahující fibronektinovou doménu typu II

Patří do velké rodiny buněčných a matrix adhezních proteinů, které zahrnují proteiny semenné plazmy, fibronektiny a receptory na povrchu buněk (Jonáková et al. 2010, Srivastava et al. 2013).

3. Různé proteiny vykazující enzymatické, inhibiční a další aktivity (Jonáková et al. 2010)

Proteiny patřící do prvních dvou skupin představují hlavní proteinové složky semenné tekutiny bílkovin jsou pravděpodobně způsobeny odlišnostmi ve velikosti a struktuře pohlavních žláz

Tab. 1: Druhy proteinů semenné plazmy u různých zvířat obsahující proteiny s fibronectinovou doménou typu II a spermadhesiny (Varela et al. 1997, Sanz et al. 1993, Jonáková et al. 2010, Rodríguez-Martínez et al. 2011).

Druh zvířete	Fibronectin typu II protein	Spermadhesin protein
Kanec	DQH (pB1)	AWN rodiny
		AQN rodina
		PSP-I/II
Býk	BSP-A1/A2	aSFP
	BSP-A3	Z13
	BSP-30kDa	
Hřebec	HSP1	HSP-7
	HSP2	
	HSP-12	

Hřebec

Obsah proteinů v semenné plazmě koní je oproti jiným druhům nízký a to kolem 10 mg/ml. Bylo prokázáno, že hřebčí semenné proteiny (HSP) mají tendenci tvořit multiproteinové agregáty o celkové molekulové hmotnosti asi 800 kDa složené z proteinů s přibližnou molekulovou hmotností 11-30 kDa, které představují asi 70 % celkového proteomu semenné plazmy (Fellenberg et al. 1985). Dále byla popsána řada proteinů s menším zastoupením v semenné plazmě, které mohou pocházet z varlat a mohou podpořit přežitelnost spermií. Proteiny s nízkou molekulovou hmotností 14-30 kDa, kromě HSP-4, vykazovaly schopnost vázat se na ejakulované spermie (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Většinu proteinů izolovaných z hřebčí semenné plazmy, u kterých byla prokázána potencionální úloha při oplodnění, tvoří HSP-1, HSP-2 a HSP-5 až HSP-8. HSP-1 a HSP-2 jsou nejvíce zastoupené proteiny v semenné plazmě hřebců. Představují 70-80 % z celkového množství proteinů. Také patří ke krátkým proteinům typu Fn-2. Bylo prokázáno, že HSP-3 je členem rodiny sekrečních proteinů bohatých na cystein (CRISP). HSP-6 a HSP-8 jsou různé isoformy bílkovin, které patří do skupiny proteinů kallikreinové rodiny s proteolytickou aktivitou. Jejich N-konec má specifickou sekvenci a isoformy vykazují vysoký stupeň homologie s lidským prostatickým specifickým antigenem (PSA), o kterém bylo zjištěno, že se podílí

na štěpení semenogelinu. HSP-7 je hřebčí homolog heparin vázajícího kančího spermadhesinu AWN (Töpfer-Petersen et al. 2005, Novak et al. 2010).

Býk

Semenná plazma býků obsahuje širokou škálu proteinů, kde jsou nejvíce zastoupeny a podle nové nomenklatury pojmenovány BSP (Binder of Sperm Proteins) proteiny (BSP-A1, BSP-A2 a BSP-A3). Jedná se kyselé proteiny s relativně malou molekulovou hmotností (15-30 kDa). Tyto proteiny jsou produkty semenných pohlavních žláz a váží se na spermie při ejakulaci. Hrají významnou roli při kapacitaci. Po vazbě na spermie a jsou schopné zůstat navázané i po kontaktu s tekutinou oviduktálního systému. Všechny proteiny patřící mezi BSP a vyskytující se u skotu jsou glykosylovány, s výjimkou BSPA3. BSP-A1 a A2 mají identickou aminokyselinovou sekvenci, ale mají jinou míru glykosylace. Struktury s fibronektinovou doménou typu II, přítomné v proteinech BSP, interagují s různými typy kolagenu a heparinu. Dále bylo prokázáno, že interagují s fosfolipidy a právě BSP proteiny váží fosfolipidy v plazmatické membráně spermií (Desnoyers et al. 1992, Thérien et al. 1998, Manjunath et al. 2007, Souza et al. 2011, Druart et al. 2018)

Kanec

V semenné plazmě kanců bylo prozatím zjištěno pět základních spermadhesinů: PSP-I, PSP-II (Major seminal plasma glycoprotein), AQN-1, AQN-3 a AWN-1 (označeny podle prvních aminokyselin), které tvoří až 80 % všech proteinů v plazmě (Töpfer-Petersen et al., 1998). Spermadhesiny PSP-I a PSP-II jsou zastoupeny v semenné plazmě nejvíce a mají různé funkční vlastnosti. Prasečí semenné proteiny PSP-I a PSP-II kontrolují invazi leukocytů do samičího reprodukčního traktu (Caballero et al. 2008, Aussrey et al. 2002, Aussrey et al. 2003, Rodríguez-Martínez et al. 2005). Spermadhesiny AWN-1, AQN-1 a AQN-3 se vážou na spermie během ejakulace, podporují kapacitaci spermií a stabilizaci akrosomu. Také zprostředkovávají vazbu spermií na zona-pellucida (Jonáková et al. 2004, Gonzáles-Cadavid et al. 2014).

AQN i AWN proteiny interagují se semenným plazmatickým proteinem pB1 neboli DQH a ADAM3b. Protein DQH tvoří komplex se spermadhesinami a váží se na fosforylcholin, který je v plazmatické membráně spermií (Jonáková et al., 2000, Gonzáles-Cadavid et al. 2014).

V semenné plazmě se dále objevují proteinázové inhibitory, které byly izolovány z reprodukčního traktu kanců. Nejlépe prozkoumané jsou inhibitory akrosinu. Je známo, že biologickou úlohou inhibitorů proteináz, je inaktivace akrosinu u spermií s poškozenými akrosomy nebo u těch, které předčasně prodělaly akrosomální reakci, a tím ochrana samčího

a samičího genitálního traktu proti proteolytické degradaci (Jonáková et al. 1992, Davidová et al. 2008).

3.6.3 Protein DQH

U skotu, králíků, psů, kanců a hřebců se v semenné plazmě nachází BSP proteiny z angl. binder sperm protein, dříve popsány jako typické proteiny býčí semenné plazmy (bovine seminal plasma proteins). U skotu bylo prokázáno, že se podílejí na navázání spermií na buňky oviduktu a jsou zásadní pro samotnou kapacitaci. Tyto proteiny byly následně nalezeny v semenné plazmě i dalších savčích druhů, a to kanců, hřebců, kozlů a bizonů. Bylo zjištěno, že tato zvířata mají homologní úsek DNA, který kóduje produkci proteinu shodný se skotem (Manjunath et al. 2009).

Proteiny patřící do rodiny BSP mají relativně nízkou molekulární hmotnost a to mezi 12-30 kDa a mohou být glykosylovány. BSP proteiny mají svou N-koncovou doménu velmi proměnlivou a je v ní obsažen tandemově uspořádaný fibronectin typu II (Manjunath et al. 2009).

DQH protein, popsáný také jako pB1 (Calvete et al. 1997), patří do stejné skupiny jako proteiny nacházející se v semenné plazmě býků, které se jmenují BSP A1/A2 a BSP-A3. Dále u hřebců je velmi podobný protein jako u kanců a býků, který je označován jako HSP1/HSP2 (Manjunath et al. 2009).

DQH protein má relativní molekulovou hmotnosti 13 kDa. Kompletní DQH kovalentní struktura, včetně jeho posttranslačních modifikací, byla určena Edmanovou degradací. DQH je složen ze 105 aminokyselin a v jeho molekule jsou 4 disulfidické můstky. Na N-konci jeho aminokyselinové sekvence se nachází treonin, který je glykosylován. Následují dvě opakování fibronectinu typu II (Bezouška et al. 1999).

Tento protein byl nalezen v agregovaných formách v semenné plazmě kanců, kde byl přítomen společně s heparin vázajícími spermadhesiny. Za pomoci imunologického testu byl zjištěn v semenných váčcích, ale ne v epididymálních a prostatických tekutinách. Bylo prokázáno, že DQH protein se váže na epitel oviduktu. Dále bylo zjištěno, že se neváže jen na heparin, ale i na jiné sulfatované polysacharidy jako je chondroitin sulfát, dextran sulfát, fukoidan, dále také na kyselinu hyaluronovou a fosforylcholin. Byla také popsána jeho schopnost vázat se na glykoproteiny zona pellucida a protilátky proti DQH proteinu blokovaly přímo vazbu spermií na vajíčko in vitro (Jonáková et al. 2000, Maňásková et al 2007).

3.7 Vejcovod a oviduktální rezervoár spermií

Ovidukt je velmi důležitý při kapacitaci spermií a z velké míry zabraňuje polyspermnímu oplození (polyspermii), neboť se na jeho sliznici zachytávají spermie, které se následně postupně uvolňují s počínající kapacitací. Spermie se váží na epitelové buňky oviduktu, a to v oblasti isthmu, neboli zúžení vejcovodu. Ke spojení epiteliálních buněk a spermií dochází spojením sacharidových zbytků na buňkách oviduktu a plazmatických proteinů nacházejících se na povrchu hlavičky spermie. U prasat se zdá, že se spermie váží na ovidukt za pomoci oligosacharidů s vysokým obsahem manosy (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005, Talevi & Gualtieri 2010). Uvolňování spermií z oviduktálního rezervoáru je spouštěno ovulací oocyty po hormonální signalizaci. Přesný mechanismus vazby na buňky oviduktu a následné uvolňování není zatím zjištěn. Existují tři hypotézy, které popisují uvolňování spermií z oviduktu.

- 1) ztráta povrchových proteinů proteolýzou nebo uvolněním z plazmatické membrány (Hotl & Fazelli 2010).
- 2) zvýšení motility a hyperaktivace spermií umožní uvolnění z oviduktálního rezervoáru (Suarez et al. 1991)
- 3) sacharidové zbytky na povrchu epiteliálních buněk jsou degradovány glykosidázami přítomnými v oviduktální tekutině při ovulaci (Talevi & Gualtieri 2010, Talevi et al. 2007, Gualtieri et al. 2010).

Mezi těmito hypotézami může být propojení a nemusí prakticky fungovat samostatně (Hotl & Fazelli 2010). Při tomto procesu dochází ke kapacitaci spermií a před tím je u spermií schopnost oplození snížena na minimum (Petrunkina 2001).

3.8 Kapacitace

Kapacitace je proces, při kterém dochází ke změnám jak uvnitř, tak vně spermie při průchodu samičím pohlavním ústrojím. Po tomto procesu jsou spermie schopny oplození samičí pohlavní gamety. Poprvé byl tento proces definován Changem a Austinem. Postupem let došlo k různým úpravám této definice a objevu nových poznatků spojených s kapacitací (Visconti et al. 1998).

Samotná kapacitace představuje řadu biochemických a biofyzikálních změn, jako je změna intracelulárního pH, dále zvýšení fluidity plazmatické membrány, motility a také amplitudy rotačního pohybu bičíku. Dále nastávají během kapacitace změny na molekulární úrovni, kdy

jsou patrné změny v hlavičce a bičíku spermie (Visconti et al. 1998). Tyto základní změny na spermích jsou zásadní k tomu, aby mohlo dojít ke spojení spermie a oocytu. Změny propustnosti plazmatické membrány spermíí pro extracelulární kalciové ionty a indukce konformačních změn membrána-lipid-protein pak vedou k akrozomální reakci (Langlais et al. 1985).

Kapacitace může být opožděna, ale pokud je zahájena, tak není plně reverzibilní a spermie jsou předem předurčeny k zániku, pokud nedojde ke spojení spermie a oocytu. Kapacitace začíná odstraněním dekapacitačních faktorů. Mezi které patří například AQN a AWN, vyskytující se u prasat (Töpfer-Petersen et al., 1998). Některé z proteinů jsou původem ze semenné plazmy, jiné z epididymu. Odstranění dekapacitačních faktorů vede prvně k efluxu cholesterolu ze spermatické plazmatické membrány. Cholesterol je hlavní sterol spermíí. Jeho přímý zdroj není stále jasný. Nicméně se předpokládá, že cholesterol spermie získávají přímo z prostředí samičího traktu. Předpokládá se, že ztráta cholesterolu přímo ovlivňuje lipidovou dvouvrstvu spermíí plazmatické membrány a ta se stává „fusogenní“. Dříve se předpokládalo, že cholesterol inhibuje membránovou fúzi, ale dnes již došlo k přehodnocení a nyní se připouští, že cholesterol obecně spíše podporuje membránovou fúzi než inhibici. Dřívější studie, které zkoumali ztrátu cholesterolu vedoucí k expozici receptoru pro manosu na povrch spermíí. Může tak dojít ke třem možnostem interakce spermie-zona pellucida, a to 1) manosa a manosylované proteiny interagují se spermii a následně se vážou na zona pellucida, 2) manosa a manosylované proteiny indukují akrosomovou reakci, 3) přímo vazbě na glykoproteiny zona pellucida obsahující ve svých sacharidových řetězcích manosu (Chen et al. 1995; Cross et al. 1998).

Samotná kapacitace, jak již bylo řečeno výše, není plně reverzibilní. Jen přidání dekapacitačních faktorů, jako jsou sulfáty sterolu, nacházející se v semenných váčcích, může vyvolat dekapacitaci. Předpokládá se, že tento systém funguje jenom v případě, kdy intracelulární hladiny vápníku nedosáhly prahových hodnot potřebných k aktivaci nevratného procesu akrosomové reakce (Langlais et al. 1985).

Pro kapacitaci kančích spermíí je potřeba vápník a hydrogenuhličitan, které indukují reorganizaci membránové lipidové struktury a podporují zvýšení motility spermíí. Kapacitace kančích spermíí koreluje s cholesterolovým efluxem ze spermatické plazmatické membrány a s fosforylací tyrosinu. Přítomnost ovidukální tekutiny v kapacitačním médiu zvyšuje počet kapacitovaných spermíí (Lusignan et al. 2007)

Proto existují média, která obsahují sérový albumin, hydrogenuhličitan a vápník, bez kterého by nemohlo dojít ke kapacitaci (Visconti et al. 1998).

1. Sérový albumin

Sérový albumin se přidává do médií jako složka, která během *in vitro* kapacitace působí na plazmatickou membránu a odstraňuje cholesterol. Jak bylo popsáno výše, tak odstranění cholesterolu způsobuje fluiditu membrány. Experimenty ukázaly, že albumin se dá nahradit lipoproteiny s vysokou hustotou nebo proteiny přenášející lipidy přítomné ve folikulární nebo oviduktální tekutině (Visconti et al. 1998).

2. Vápník

Samotná úloha Ca^{2+} při kapacitaci je v současné době kontroverzní. U jednotlivých druhů se hladiny vápníku výrazně liší. Je potřebný pro kapacitaci a proto se přidává do kapacitačních médií (Visconti et al. 1998).

3. Hydrogenuhličitan

Hydrogenuhličitan (HCO_3) má nízké hladiny v epididymu a vysoké v semenné plazmě a vejcovodu. Přítomnost HCO_3 v extracelulárním prostředí pozitivně koreluje s motilitou spermií u prasat (Visconti et al. 1998). Transmembránový pohyb HCO_3 aniontu by mohl být zodpovědný za nárůst intracelulárního pH, který je pozorován během kapacitace. Další působení tohoto aniontu by mohlo být v regulaci cAMP uvnitř spermií, protože aktivita savčí spermatické adenylcyklázy je výrazně stimulována HCO_3 (Visconti et al. 1998).

Změny na povrchu spermie během kapacitace

Samotná plazmatická membrána spermií prochází velmi rozsáhlou remodelací při ejakulaci, kdy dochází ke kontaktu se semennou plazmou obsahující velké množství proteinů. Některé proteiny, jak bylo výše zmíněno, se navážou na membránu a následně mohou působit inhibitory aktivity spermií. Samotné složení proteinových vrstev spermie se během ejakulace mění. V oblasti isthmus oviduktu dochází za pomoci sacharidů nacházejících se na povrchu spermií k přichycení spermií k oviduktálnímu epitelu. Tato interakce je také závislá na druhu zvířete. Signál, který je spojený s uvolněním vajíčka z oviduktu je doprovázen uvolněním proteinu z povrchu spermie, které tam jsou navázány během ejakulace a dochází k uvolnění z oviduktálního rezervoáru. Tato událost pravděpodobně není odlišná pro většinu druhů zvířat (Dacheux et al. 1989; Petrunina 2001).

3.9 Degradace proteinů v buňkách

Eukaryotické buňky obsahují dva hlavní systémy pro degradaci proteinů. První objevený byl lysosomální aparát, kdy membránově uzavřené vakuoly obsahují více kyselých proteáz a jiné hydrolázy. Lysosom byl po dlouhou dobu pokládán za jediné místo, kde dochází k rozpadu proteinů. Studie s inhibitory lysosomální acidifikace nebo lysosomální proteázy prokázaly, že tato struktura obvykle hraje obvykle pouze malou roli při degradaci cytosolových proteinů. Jedná se především o degradaci proteinů spojených s membránou nebo extracelulárními proteiny převzaté endocytózou. Dnes je již zřejmé, že většina proteinů v buňkách savců je hydrolyzována odlišnou cestou, při které je potřeba ATP a proteasom. Nejprve je substrát určen k degradaci označen kovalentní vazbou molekulou ubiquitinu. Konjugace ubiquitinu s proteinem vede k jeho rychlé degradaci pomocí proteasomu 26S, proteolytického komplexu závislého na ATP (Lee et al. 1998).

3.10 Proteasom a jeho role při fertilizaci

Proteasom je multiproteinový katalytický komplex, který je zodpovědný za řízenou degradaci intracelulárních proteinů, označených polyubiquitinovým řetězcem a následně jsou tyto proteiny štěpeny na oligopeptidy. Tento způsob degradace je označován jako ubiquitin-proteasomový systém (Klener 2010).

Ubiquitin-proteasomový systém

Ubiquitin-proteasomový systém je zodpovědný za regulovanou proteolýzu specifickou pro všechny eukaryotické proteiny. Ubiquitin je malý chaperone protein, který kovalentně značí jiné proteiny. Chaperone protein je protein, který napomáhá kovalentnímu skládání a rozkládání makromolekulárních struktur. Ubiquitin je nejvíce konzervativní eukaryotický protein a je celkově složen ze 76 aminokyselin. Sedm aminokyselin jsou Lys-zbytky, na které se ostatní molekuly ubiquitinu váží v tandemové formě k vytvoření isopeptidově vázaných multi-ubiquitinových řetězců. Polyubiquitinový řetězec obsahuje čtyři nebo více ubiquitinových molekul. Proteasom proteiny rozštěpí na peptidy o velikosti až 25 aminokyselinových zbytků, které se uvolňují a jsou vystaveny dalšímu štěpení cytosolovými endopeptidázami (Voges et al. 1999, Sutovsky 2011).

Funkce proteasomu 26S

Proteasom 26S je proteáza s více podjednotkami a specifickou afinitou k proteinům značeným ubiquitinem. 26S proteasom má jádro 20S a má jeden nebo dva konce 19S. Úloha 19S podjednotky je rozpoznat a navázat polyubiquitovaný protein jako protein určený k degradaci. Poté je substrátový protein naštěpen a přesune se do jádra 20S. Jako základní protein vstupuje do jádra 20S (Sutovsky 2011, Tanaka et al. 2009).

20S jaderná částice se skládá ze čtyř soustředných kroužků, z nichž každý sestává ze sedmi podjednotek, které spolu tvoří dutou strukturu. V jádru dochází k proteolýze substrátových proteinů (Sutovsky 2011, Sutovsky 2004).

Část 19S je koncová část, buď na jedné, nebo na druhé straně polyubiquitinového proteinu. Skládá se ze dvou částí, a to ze základny a víka, které mají má 14 ATPázových podjednotek, kdy základna 19S je připojena k vnějšímu kroužku 20S jádra. Mezi ATPázové podjednotky patří i podjednotka PMSD4 (angl. mismatch repair system component homolog 4), která je zodpovědná za rozpoznání a vazbu polyubiquitovaných řetězců. Z celkových podjednotek PMSD (angl. mismatch repair system component) se MPN (angl. metalloenzyme domain) a PCI (ang. Proteasom domain) domény s podjednotkami signálního COP9 (angl. signalosome complex subunit 1), což je proteinový komplex podílející se na různých regulačních funkcích, včetně regulace proteasomální proteolýzy prostřednictvím proteinové deubiquitinace a neddylace (neddylace je konjugace proteinu NEDD8 s proteinovými substráty analogická k ubiquitinaci) (Sutovsky 2011, Maghames et al. 2018).

Jedná se o jiné zakončení než 19S popsané výše. Toto ukončení nahrazují 19S u určitých typů proteasomů zahrnující částice aktivátoru proteasomu PA200 a PA28, které jsou běžně známy jako 11S regulační částice nebo jako 11S regulační komplex (Sutovsky 2011).

PA200 je molekula, která je součástí podjednotky proteinu PMSE4. PA28 je heptamer složený ze sedmi molekul nebo proteasomální podjednotky PSME3 nebo heterodimery podjednotky PSME1 a PMSE2. Oba aktivátory PA28 a PA200 se mohou asociovat s jádrem 20S hybridních proteasomů. Takové proteasomy mohou být schopny degradovat proteiny, které nejsou označeny ubiquitinem, ačkoliv tento scénář není definitivně stanoven (Sutovsky 2011, Kloetzel & Ossndorp 2004).

Ubiquitinace

Degradace proteinů za pomoci ubiquitinace zahrnuje dva odlišné kroky: signalizaci proteinu kovalentním připojením více molekul ubiquitinu a degradaci cílového proteinu s uvolněním volného a znovu použitelného ubiquitinu. Kovalentní připojení molekuly ubiquitinu

k substrátu přes lysin nastává pomocí ubiquitinových C-konců. Následně mohou být vytvořeny poly-ubiquitinové řetězce na jednom z ubiquitinových sedmi lysinových zbytků, z nichž pět je schopno indukovat poly-ubiquitinový řetězec. Připojení jediné molekuly ubiquitinu k substrátovému proteinu vede k lyzomální degradaci, často spojované s endocytotickou dráhou (Ciechanover 1994, Sutovsky et al. 2003, Yokota et al. 2007).

Všudypřítomný systém ubiquitinu je zapojen do různých fází gametogeneze a oplodnění. V předchozích studiích od Sutovsky a kolektivu prokázali, že ubiquitinový systém zprostředkuje degradaci spermiových mitochondrií uvnitř oplodněného vajíčka, což je hypotéza poskytující možné vysvětlení mateřské dědičnosti mitochondriální DNA (Sutovsky et al. 2003)

Inhibitory proteasomu

Dostupnost inhibitorů proteasomu nyní umožňuje rychlou analýzu neporušených buněk, kdy použití inhibitorů může blokovat ubiquitin-proteasomový systém a s ním i degradaci ubiquitinem značených proteinů (Lee et al. 1998)

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

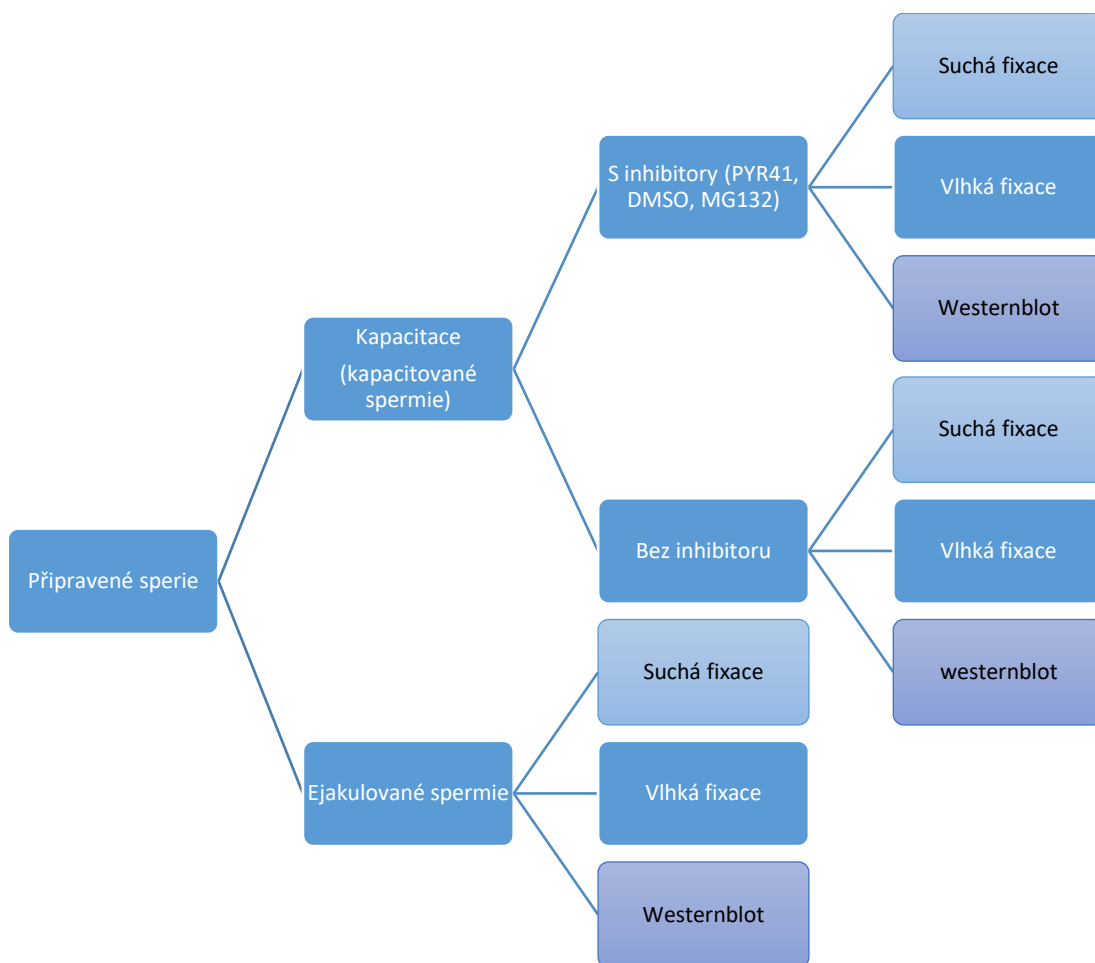
Pokud není níže uvedeno jinak, tak pro všechny pokusy byly použity chemikálie od SIGMA-ALDRICH z USA. Byly použity centrifugy Benchmark LC-8 series a Hettich, Mikro 22 R a CO₂ inkubátor SANYO MCO-19AIC.

Pro všechny pokusy byly použity semenné dávky od plemene Ladrance, které byly získány z inseminační stanice PROAGRO Nymburk a skladovány při 17 °C.

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava semene pro další pokusy

Ze semenných dávek bylo odebráno 5 ml. Následně bylo provedeno promývání spermií z důvodu odstranění ředidla a spermie byly odstředěny při 300 x g po dobu 10 minut. Vždy byl odstraněn supernatant a bylo doplněno 5 ml PBS (Phosphate buffered Saline tablet; 0,01 M fosfátový pufr, 0,0027 M KCl, 0,137 M NaCl). Celý tento proces byl zopakován dvakrát. Následně byla zkontrolována koncentrace spermií v Bürkerově komůrce a v případě větší nebo menší koncentrace, došlo k úpravě na koncentraci $2,5 - 5 \times 10^7$ spermií na mililitr. Takto upravené spermie byly připraveny pro další zpracování viz Obr 4.



Obrázek 4: Diagram pokusu

4.2.2 Kapacitace spermií

Pro kapacitaci byly použity již připravené spermie bez ředidla ze semenných dávek. Samotné spermie byly resuspendovány v kapacitačním médiu: do 50 ml Basic TL-Hepes (6,6634 g NaCl; 0,2386 g KCl; 0,0408 g NaH₂PO₄; 1,4 ml laktátu sodného; 0,1018 g MgCl₂*6H₂O; 2,383 g Hepes; 0,0220 g pyruvátu sodného; 2,186 g sorbitolu; 0,025 g gentamicinu; 0,065 g penicilinu; 0,1 g PVA v 1 litru destilované vody), bylo přidáno 0,099 g glukózy, 0,0275 g pyruvátu sodného, 1 g BSA, 0,0084 g NaHCO₃, 0,0147 g CaCl₂*2 H₂O) do výsledné koncentrace 2,5 – 5 x 10⁷ spermií na mililitr. Inhibitory MG-132 a PYR-41 byly rozpuštěny v DMSO (dimethylsulfoxid) a následně přidány do kapacitačního média do výsledné 100 μM koncentrace. Takto připravené roztoky se spermiemi byly rozděleny do čtyř skupin:

1. Nemodifikované, jen s kapacitačním médiem bez inhibitorů
2. Inhibitor MG-132 (MG-132, EMD Milipore Corp.)
3. Inhibitor PYR-41 (PYR-41)

4. DMSO (kontrola)

Pro každou skupinu bylo potřeba 10 ml roztoku, které následně byly rozpipetovány do 20 mikrozkušavek po 0,5 ml.

Takto připravené mikrozkušavky byly vloženy do termostatu, kde byla teplota 38 °C a 5 % CO₂. Spermie v mikrozkušavkách byly následně ponechány kapacitovat po dobu 1,5 hodiny. Po kapacitaci byly mikrozkušavky spojeny a následně spermie promyty. Promývání bylo prováděno odstřediváním při 300 x g 10 minut, po každém odstředění byl odstraněn supernatant a bylo doplněno PBS na 5 ml. Takto připravené spermie byly použity pro další experimenty.

4.2.3 Příprava mikroskopických preparátů

Po promytí spermii ve všech skupinách byla připravena suspenze spermii pro preparáty na fluorescenční mikroskopii.

Byla zkontrolována koncentrace spermii v suspenzi pod světelným mikroskopem Nikon (ECLIPSE E600) pro přípravu preparátu na mikroskopická skla. Pokud bylo v připravené suspenzi málo spermii, tak bylo provedeno znovu odstředění a snížení následného objemu PBS, které bylo přidáno po odstranění supernatantu. Pokud byla koncentrace spermii příliš vysoká, bylo přidáno PBS do požadované koncentrace.

Před samotnou aplikací suspenze spermii bylo potřeba nakreslit dvě kolečka za pomoci PAN Pen (LIQUID BLOCKER SUPER PAN PEN, Agar Scientific) a doprostřed obou koleček a bylo kápnuto 20 µl suspenze spermii, kdy jedno kolečko bylo připraveno pro reakci s protilátkou a druhé pro negativní kontrolu. Takto připravené preparáty byly ponechány schnout na vzduchu a byly uchovávány v lednici pro další zpracování.

Připravené preparáty byly následně 3x promyty PBS. Preparáty zpracovány pouze zasušením spermii na mikroskopickém skle byly dány do kyvety s vymraženým acetonem na 10 minut. K takto zafixovanému preparátu bylo přidáno 100 µl myší monoklonální protilátky proti prasečímu proteinu DQH (DQH klon G12, vyrobena v Ústavu molekulární genetiky AV ČR, Praha; Maňásková et al. 2007) naředěna s PBS v poměru 1:5 a ponecháno inkubovat přes noc ve vlhké komůrce.

Po inkubaci byla znovu sklíčka 3x promyta PBS a dále na ně bylo aplikováno 100 µl sekundární protilátky (Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG (H+L), Invitrogen by ThermoFischer

Scientific) naředěné v poměru 1:300 v PBS. Inkubace probíhala ve tmě po dobu 1 hodiny ve vlhké komůrce. Poté byly preparáty promyty PBS a na sklíčka nanášeno 100 μ l PNA lektinu konjugovaného s rhodaminem (Rhodamine Peanut Agglutinin, Vector laboratories) naředěný 1:500 v PBS. Preparáty byly inkubovány ve vlhké komůrce ve tmě při laboratorní teplotě 30 minut. Následně byly preparáty opláchnuty PBS a dále destilovanou vodou. Po osušení bylo aplikováno do jednotlivých koleček přibližně 10 μ l montovacího média s DAPI (Vecta-Shield DAPI, Vector Laboratories). Mikroskopická skla byla překryta krycím sklíčkem a zafixována po krajích lakem a takto připravené preparáty byly prohlédnuty pod fluorescenčním mikroskopem Nikon a zdokumentovány v programu NIS a konfokálním mikroskopem ZEISS. Za pomoci programu byla provedena analýza obrazu a následně byla statisticky zhodnocena v programu Microsoft Excel a to ANOVA: jednofaktorovým výběrem.

4.2.4 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Příprava proteinů spermií pro SDS elektroforézu

Pro extrakci proteinů byly použity připravené spermie z kapacitace a promyté ejakulované spermie v podobě pelet (5×10^7 buněk). Pro extrakci proteinů ze spermií byl použit vzorkový pufr pro elektroforézu s obsahem detergentu dodecyl sulfátu sodného (SDS). K připravených peletám spermií byl přidán 2x koncentrovaný vzorkový pufr (4,2 ml destilovaná voda, 1,0 ml 0,5 M Tris HCl pH 6,8, 0,8 ml glycerol, 1,6 ml 2 % SDS, 0,4 ml 0,05 % bromfenolová modř). Jeho množství bylo zvoleno podle velikosti pelety (objem 1:2 – peleta : vzorkový pufr). Spermie se vzorkovým pufrem byly ponechány na ledu a během hodiny byly promíchávány po 5 minutách. Dále byly vzorky povařeny 5 minut a zcentrifugovány při 10 000 x g 5 minut. Spermie se vzorkovým pufrem byly skladovány při -20°C.

Příprava gelu pro SDS elektroforézu

Pro elektroforézu byla použita vertikální elektroforéza – systém Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad) a byly připraveny jednotlivé roztoky pro přípravu gelu a samotnou elektroforézu.

Byla sestavena výše uvedená aparatura. Byl připraven roztok pro separační 15% akrylamidový gel (5,0 ml 30% akrylamid/ bis-akrylamid (Bio-Rad), 2,25 ml 1,5 M Tris. HCl pH 8,8 (Bio-Rad), 2,5 ml destilovaná voda, 100 μ l 10 % SDS, 4,5 μ l TEMED, 70 μ l 10% persíran amonný). Takto

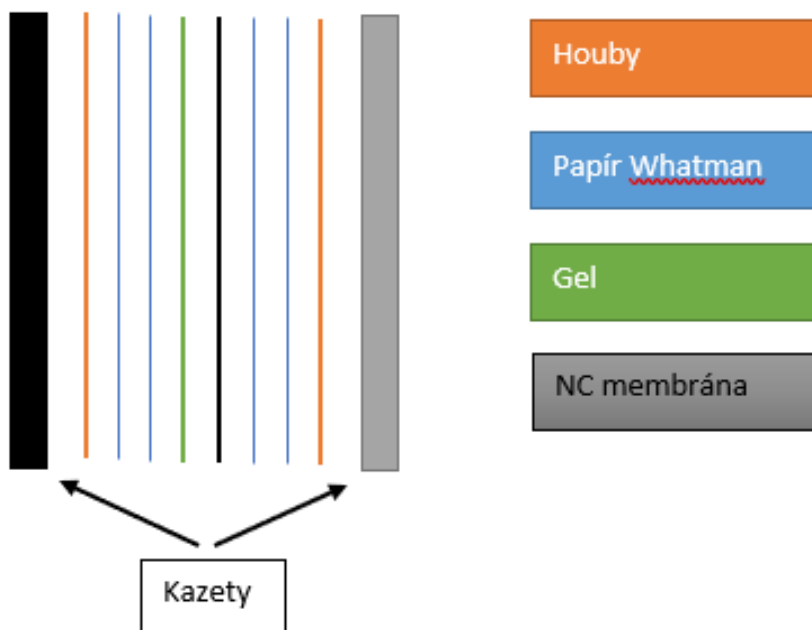
připravený roztok byl nalit mezi skla a poté převrstven destilovanou vodou. Gel polymeroval po dobu 30 minut.

Byl připraven 4% zaostřovací gel (1,52 ml destilovaná voda, 0,625 ml 0,5 M Tris. HCl pH 6,8 (Bio-Rad), 0,25 ml 30 % akrylamid/bis-akrylamid (Bio-Rad), 0,025 ml 10 % SDS, 3,8 µl TEMED, 50 µl 10 % persíran amonný). Po navrstvení roztoku zaostřovacího gelu mezi skla byly vloženy hřebínky pro tvorbu jamek. Gel byl ponechán polymerovat po dobu 10 minut. Skla s gelem byla vložena do aparatury pro elektroforézu, která byla zalita elektrodoým pufrem (5x koncentrovaný: 15 g Tris, 72 g glycin, 5 g SDS, do 1 l destilovaná voda; ředěno 1:4). Po vyndání hřebínků byly do jamek aplikovány proteinové molekulové standardy (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad) a připravené proteinové vzorky. Celá aparatura byla zapojena do zdroje napětí (Bio-Rad), kde bylo nastaveno 80 V a po dvaceti minutách došlo ke změně na 150 V, a to na přibližně hodinu, dokud nebyly proteiny v gelu rozděleny. Gel se separovanými proteiny byl vyjmut a promyt v destilované vodě.

Elektropřenos proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu – Western blot

Pro tuto metodu byly nejdříve připraven gel se separovanými proteiny po SDS elektroforéze, nitrocelulózová membrána (Hybond C, Amersham), filtrační papír Whatman (Chromatography paper; GE Healthcare) a houbičky, které byly navlhčeny v transferovém pufru (3,03 g Tris, 14,4 g glycin, 800 ml destilovaná voda, 200 ml metanol) po dobu 15 min.

Jednotlivé komponenty seskládány do kazety, podle níže uvedeného obrázku 4.



Obrázek 5: Složení kazety na Western Blot

Zkompletované kazety byly vloženy do aparatury pro elektropřenos. Aparatura byla zapojena do zdroje stejnosměrného napětí při konstantním proudu 500 mA. Elektropřenos probíhal 1,5 hodiny. Kazeta byla poté vyjmuta, membrána opláchnuta destilovanou vodou a obarvena Ponceau (Ponceau S solution) pro vizualizaci proteinů po dobu 60 sekund.

Imunodetekce

Nejprve proběhla deaktivace volných míst na membráně za pomoci 5 % sušeného mléka (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad) rozpuštěného v PBS 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byla membrána promývána v PBS s 0,1% Tweenem 20 (Tween 20; Merck) dvakrát po 5 minutách na třepačce. Následovala inkubace se specifickou myší monoklonální protilátkou proti prasečímu DQH proteinu (DQH klon G12, Maňásková et al. 2007) naředěnou 1:100 v PBS přes noc v lednici. Pro kontrolu koncentrace nanesených proteinů byla membrána inkubována s protilátkou proti alfa-tubulinu (myší monoklonální protilátka DM1A) a to v poměru 1:500 v PBS přes noc v lednici. Po inkubaci byla membrána promyta 3x PBS-T po 10 minutách pro odstranění nespecifických interakcí. Membrána byla inkubována se sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům konjugovanou s křenuvou peroxidázou (goat anti-mouse IgG (L+H), Horseradish Peroxidase-Linked; Bio-Rad). Sekundární protilátka byla ředěna v PBS v poměru 1:3 000. Inkubace probíhala 1 hod při

laboratorní teplotě na rotační třepačce (DLAB; SK-L18-E). Po inkubaci byla membrána promyta 4x po 5 minutách v PBS-T a 2x po 5 minutách PBS.

Následně byla provedena vizualizace specifické detekce proteinu protilátkou za pomoci chemiluminiscenčního substrátu (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Thermo SCIENTIFIC) v přístroji Azure c600 (Azure Biosystems; Biocev, Vestec).

Výsledky detekce byly zpracovány denzitometricky pomocí programu Image Studio Lite Verze 5.2. a statisticky zhodnoceny v programu Microsoft Excel a to ANOVA: jednofaktorovým výběrem.

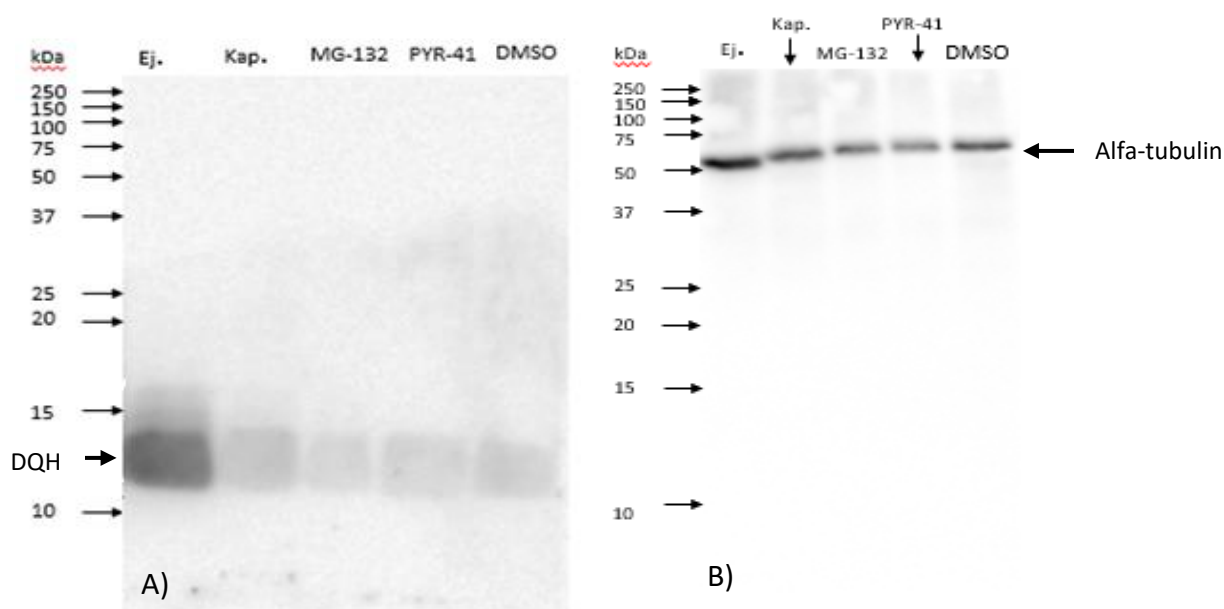
5 Výsledky

Pro detekci DQH proteinu během inhibice UPS v průběhu kapacitace byly kančí spermie kapacitovány in vitro s přidavkem inhibitorů proteasomu MG-132 a ubiquitin aktivačního enzymu PYR-41. Jako kontrola ovlivnění kapacitace rozpouštědlem bylo přidáno DMSO do kapacitačního média (kap. 4.2.2.).

5.1 Detekce DQH proteinu v extraktech spermií

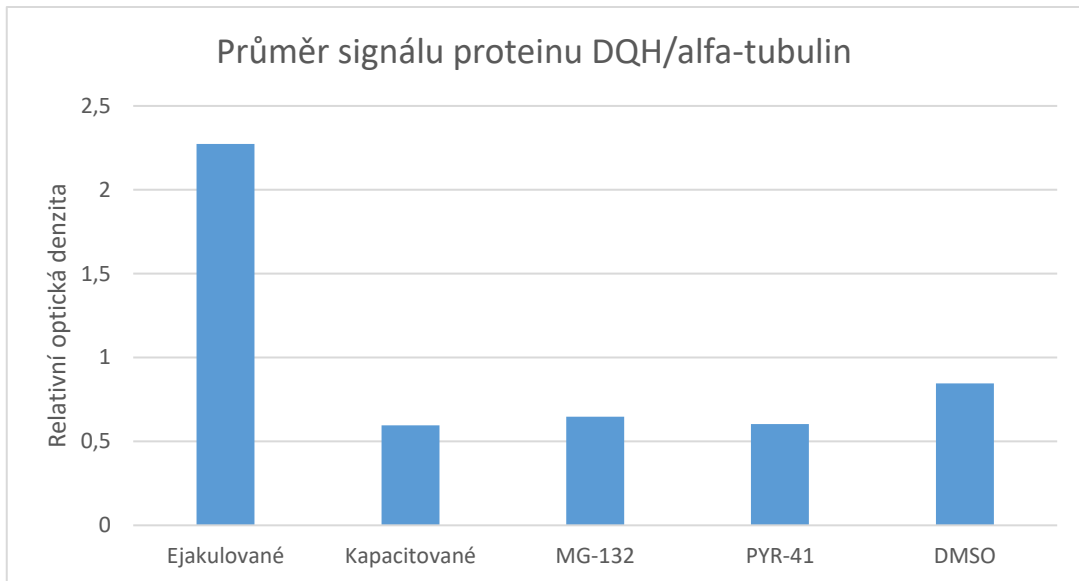
Byla provedena extrakce proteinů (kap. 4.5.1.) a následně SDS elektroforéza (kap. 4.5.4.). Separované proteiny byly přeneseny na nitrocelulóзовou membránu.

DQH protein byl detekován pomocí monoklonální protilátky ve vzorcích nekapacitovaných ejakulovaných spermií (Ej) a spermií po in vitro kapacitaci v nemodifikovaném (Kap) a modifikovaném médiu (MG-132, PYR-41, DMSO) (viz obr. 5A). Detekce byla následně denzitometricky vyhodnocena a vztažena k celkové nanášce proteinů spermií stanovené protilátkou proti alfa-tubulinu (obr. 5B). Primární protilátka proti proteinu DQH reagovala s proteinem o molekulové hmotnosti 13 kDa.



Obrázek 6: Imunodetekce DQH proteinu (A) a alfa-tubulinu (B) v extraktech kančích spermií: Ej – ejakulované spermie, Kap - kapacitovanými spermie, MG-132 – Kapacitované spermie s inhibitorem proteasomu MG-132, PYR-41 – kapacitované spermie s inhibitorem ubiquitin aktivačního enzymu PYR-41, DMSO – kapacitované spermie s rozpouštědlem inhibitorů DMSO pro zjištění ovlivnění kapacitace rozpouštědlem.

Bylo vyhodnoceno 5 membrán detekovaných pomocí protilátky proti DQH proteinu. Graf 1 vyjadřuje průměr signálu DQH proteinu detekovaného v extraktech spermií vztaženého k alfa-tubulinu.



Graf 1: Průměr signálu proteinu DQH vztažného k signálu detekce alfa-tubulinu. Ejakulované spermie, kapacitované spermie nemodifikované, MG-132 - modifikované kapacitované spermie s inhibitelem proteasomu MG-132, PYR-41 - kapacitované spermie s inhibitelem PYR-41, DMSO – modifikované kapacitované spermie s rozpouštědlem inhibitorů.

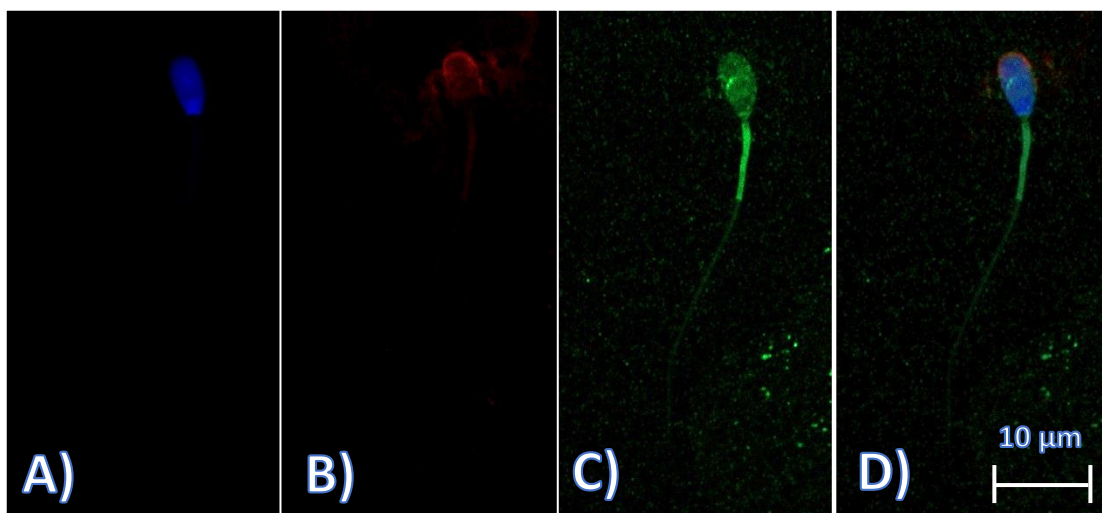
Podle denzitometrického hodnocení došlo po kapacitaci k výraznému úbytku proteinu DQH ve spermiích. Relativní množství DQH proteinu v ejakulovaných spermiích bylo poměrně vysoké oproti kapacitovaným spermiím. Množství DQH proteinu detekovaného v extraktu spermií kapacitovaných v médiu s inhibitelem MG-132 a PYR-41 bylo vyšší o 8,5 %, resp. 1,2 % než ve spermiích kapacitovaných. U spermií kapacitovaných v přítomnosti DMSO bylo množství proteinu o 41,8 % větší než u spermií kapacitovaných v nemodifikovaném médiu.

Byla provedena statistická analýza za pomoci faktorové ANOVA. Kapacitované spermie modifikované s inhibitory (MG-132, PYR-41 a DMSO) byly zhodnoceny vůči kapacitovaným spermiím v médiu bez přídavku inhibitorů. Mezi těmito položkami nebyl nalezen žádný statistický významný rozdíl ($P > 0,05$).

5.2 Lokalizace DQH proteinu ve spermích

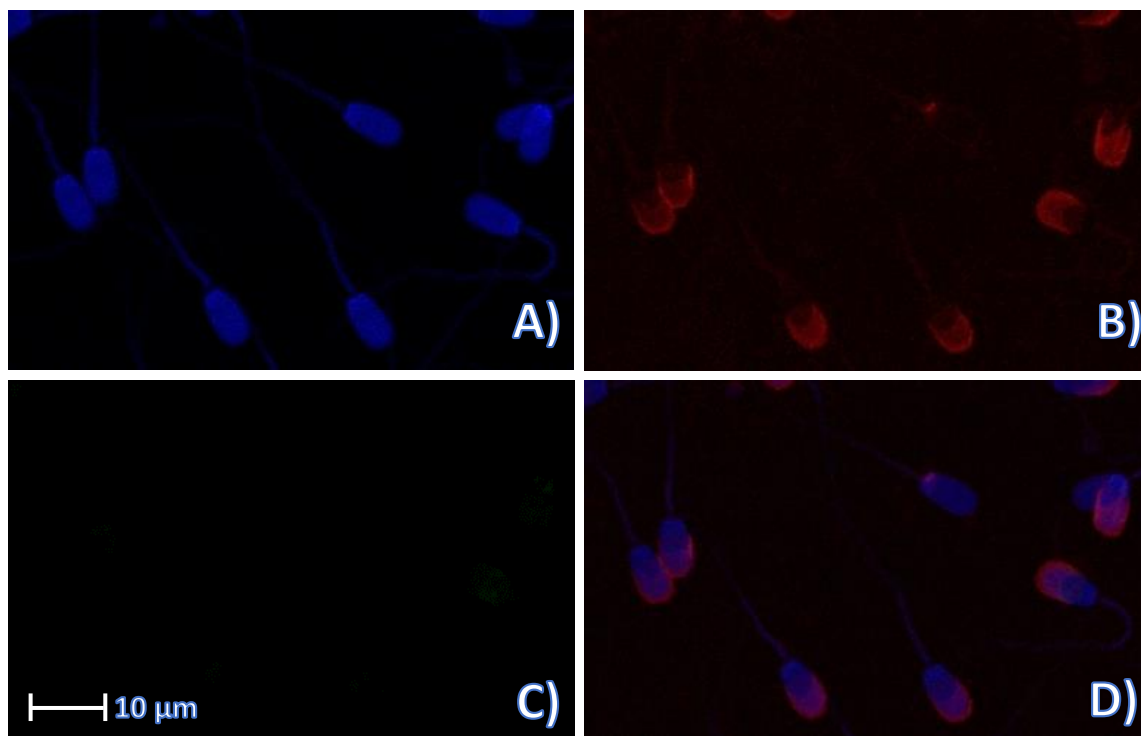
Pomocí nepřímé fluorescenční mikroskopie (kap. 4.5.3.) byla sledována lokalizace DQH proteinu na preparátech spermií ejakulovaných, kapacitovaných v nemodifikovaném médiu nebo kapacitovaných v modifikovaném médiu s inhibitory PYR-41, MG-135 a rozpouštědlem DMSO. Lokalizace DQH proteinu byla detekována pomocí monoklonální protilátky a následně sekundární protilátkou s fluorochromem (zelené značení). Integrita akrosomu byla sledována pomocí PNA lektinu značeného Rhodaminem (červené značení) a jádro bylo značeno DAPI (modrá fluorescence). Jako negativní kontrola byly spermie inkubovány pouze se sekundární protilátkou značenou fluochromem, kde nebyla zaznamenána žádná fluorescence.

Na obrázku 6 je jasně vidět lokalizace proteinu DQH na celé ploše hlavičky a také ve střední části bičíku, kde se nacházejí mitochondrie (obr. 6C a D). Akrosom a jádro jsou neporušeny (obr. 6A a B).



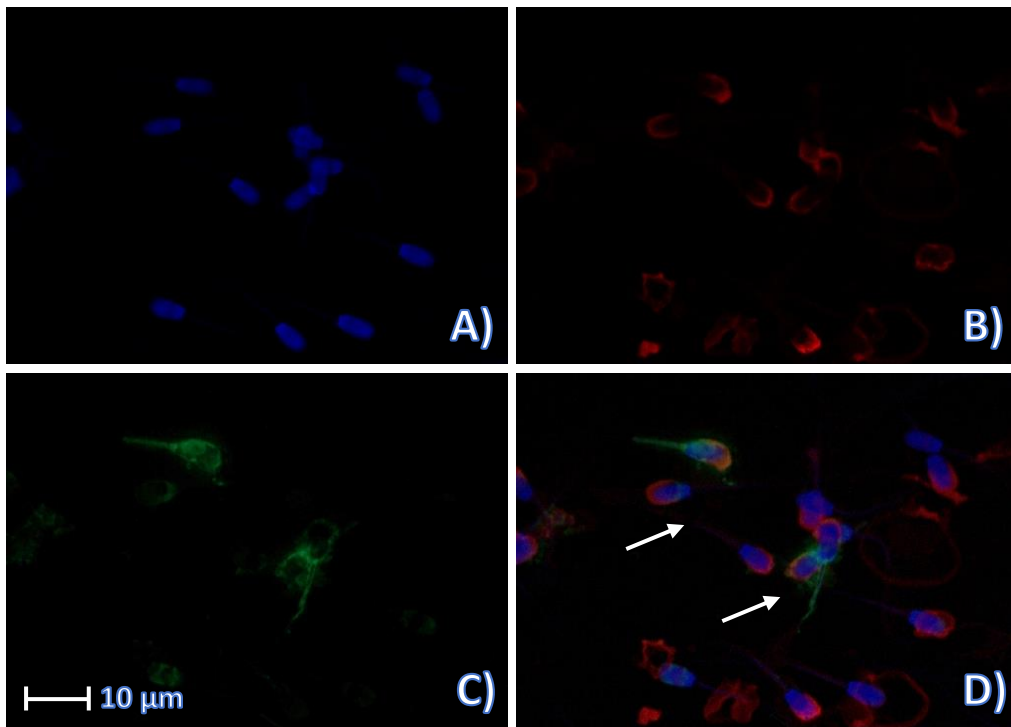
Obrázek 6: Lokalizace DQH proteinu v kančí spermii. A) Jádro označené za pomoci DAPI. B) Akrosom označený za pomoci PNA-Rhodaminu. C) Reakce s protilátkou proti proteinu DQH. D) Složený obrázek. Vyhodnocení pomocí konfokálního mikroskopu, reprezentativní obrázek.

Na obrázku číslo 8 je zobrazena lokalizace DQH proteinu v in vitro kapacitovaných spermii v nemodifikovaném médiu pomocí protilátky (obr. 8C). Na většině buněk nebyla viditelná žádná detekce.



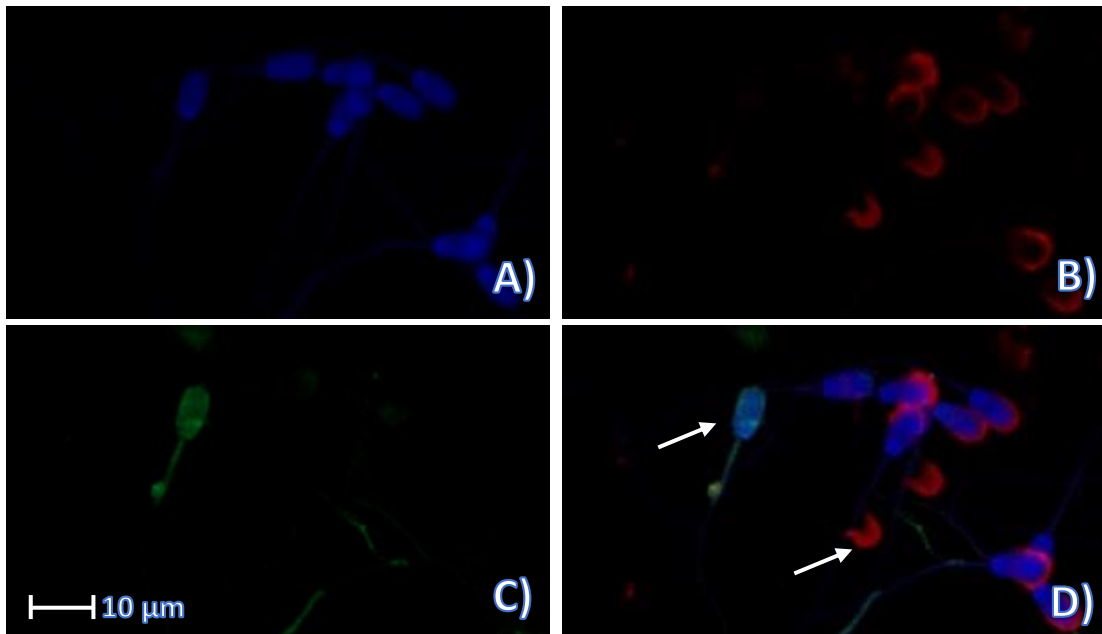
Obrázek 8: Kapacitované spermie. A) Jádro označené za pomoci DAPI. B) Akrosom označený za pomoci PNA-Rhodaminu. C) Reakce s protilátkou proti proteinu DQH. D) Složený obrázek. Vyhodnocení pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Spermie kapacitované v modifikovaném médiu s inhibítozem proteasomu MG-132 jsou na obrázku číslo 9. Jsou viditelné spermie označené primární protilátkou proti DQH proteinu, u kterých chyběl akrosom nebo byl narušený (viz šipka Obr. 9D). U těchto spermií byl DQH protein detekován v oblasti hlavičky a střední části bičíku jako to je u spermií ejakulovaných. Dále u většího počtu spermií byly pozorovány změny na akrosomu a to jeho narušení nebo naprosté odstranění.



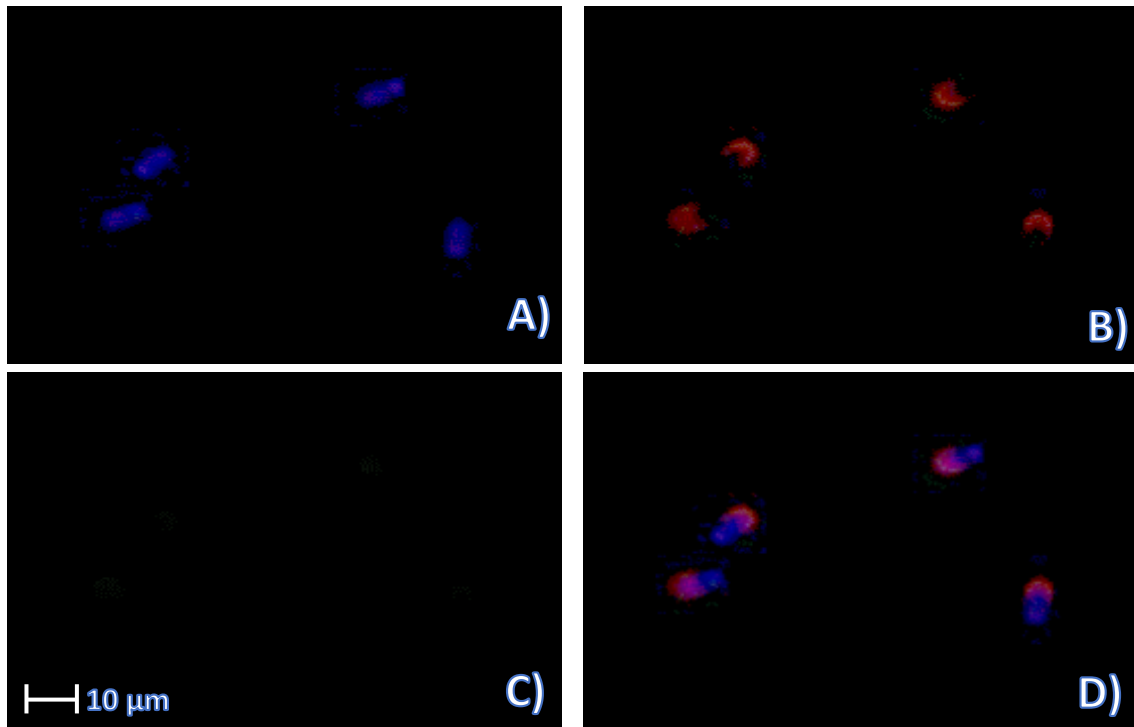
Obrázek 7: Kapacitované spermie v modifikovaném médiu s inhibítozem proteasomu MG-132. A) Jádro označené DAPI. B) Akrosom označený za pomoci PNA-Rhodaminu. C) DQH protein označený primární protilátkou. D) Složený obrázek. Vyhodnoceno pomoci fluorescenčního mikroskopu.

Lokalizace DQH proteinu ve spermích kapacitovaných s inhibitorem ubiquitin aktivačního enzymu PYR-41 jsou ukázány na obrázku 10. Protein DQH byl detekován jen na spermích, které byly bez akrosomu (viz šipka Obr. 10D) a velká část spermíí měla akrosomy narušené. Jak je vidět na obrázku 10D jsou viditelné akrosomy bez jádra, které nejsou označeny ani protilátkou proti DQH proteinu (viz šipka Obr. 10D).



Obrázek 10: Kapacitované spermie v modifikovaném médiu s inhibitorem ubiquitin aktivačního enzymu PYR-41. A) Jádro označené DAPI. B) Akrosom označený PNA-Rhodaminem. C) Protilátkou označený DQH protein. D) Složený obrázek. Vyhodnoceno pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Kapacitované spermie v modifikovaném kapacitačním médiu jen s DMSO jsou zobrazeny na obrázku 11. Jak je vidět na obrázku, spermie vypadají jako spermie kapacitované v nemodifikovaném kapacitačním médiu. Akrosomy nejsou narušeny jako to je u MG-132 a PYR-41.



Obrázek 11: Kapacitované spermie modifikované společně s ředidlem inhibitorů DMSO (Dimethyl sulfoxid). A) Jádro označené DAPI. B) Akrosom označen PNA-RHODAMINEM. C) Protibátka označený DQH protein. D) DAPI, PNA-RHODAMIN, protibátka označený DQH protein. Vyhodnoceno za pomoci fluorescenčního mikroskopu.

Dále byla provedena analýza obrazu a data byla následně statisticky vyhodnocena za pomoci ANOVA s jednofaktorovým výběrem. V případě kapacitovaných spermií byl vyhodnocen statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) ve vztahu ke spermiích ejakulovaným. Mezi spermiemi kapacitované v modifikovaném médiu (MG-132, PYR-41 a DMSO) a kapacitovanými v nemodifikovaném médiu nebyl zjištěn žádný významný statistický rozdíl ($P > 0,05$).

6 Diskuse

Pro oplození je nezbytné, aby prošly spermie kapacitací uvnitř samičího traktu. Během kapacitace dochází k výrazným změnám jak uvnitř, tak i na povrchu spermie. Bylo prokázáno, že během ejakulace se proteiny semenné plazmy naváží na spermii a následně během kapacitace jsou degradovány nebo vyvazovány z povrchu spermie. Na degradaci proteinů se může podílet ubiquitin-proteasomový systém, kdy je protein, který má být degradován označen ubiquitinem a za pomoci proteasomu je následně rozštěpen. Proto předpokládáme, že i protein DQH by mohl být tímto způsobem odstraňován z povrchu spermií během kapacitace.

Kančí DQH protein patří do skupiny proteinů s fibronektinovou doménou II, je součástí semenné plazmy a váže se na spermie během ejakulace. Tento protein interaguje s glykosaminoglykany přítomnými v oviduktu pranice a tím se předpokládá, že je nezbytný pro samotnou kapacitaci jako dekapacitační faktor. DQH protein byl potvrzen jako receptor pro vazbu spermie k oviduktálním buňkám (Maňásková et al. 2007, Talevi & Gualtieri 2010). Jeho degradace během kapacitace tedy souvisí s uvolněním spermií z oviduktálního rezervoáru.

Předpokládali jsme, že do degradace DQH proteinu během kapacitace je zapojen ubiquitin-proteasomový systém (UPS), protože byl DQH nalezen jako protein asociovaný s proteasomem (Miles et al. 2013). K inhibici UPS během *in vitro* kapacitace kančích spermií byly použity inhibitory pro blokaci aktivity proteasomu (inhibitor MG-132) a enzymu aktivující ubiquitin (Pyr-41), který zprostředkovává ubiquitinaci proteinů.

Proteiny spermií byly separovány za pomoci SDS elektroforézy a byla provedena detekce DQH proteinu. V proteinových extraktech ze spermií byl detekován protein o molekulové hmotnosti 13 kDa, což odpovídá již dříve publikovaným údajům o tomto proteinu (Jonáková et al. 1998, Maňásková et al. 2007). Bylo zjištěno výrazné snížení množství proteinu DQH v kapacitovaných spermiích oproti ejakulovaným stejně jako uvádí nedávno provedená studie (Zigo et al. 2019). Detekce proteinu ukázala, že malé množství proteinu stále na spermiích zůstává, což může naznačovat, že některé spermie stále nebyly zcela zkapacitovány. Předpoklad, že inhibitor proteasomu zabrání degradaci proteinu se nepotvrdil. Inhibitor MG-132 inhibuje hydrolytickou aktivitu enzymů, které jsou součástí proteasomu (Sutovsky et al. 2003), ale inhibuje i jiné typy proteas (Kisselev & Goldberg 2001).

Došli jsme k závěru, že pravděpodobně nedochází k navázání ubiquitinu na DQH protein nebo jen velmi málo DQH proteinu je ubiquitinem modifikováno, protože protilátka značila pouze protein o odpovídající molekulové hmotnosti samotného DQH (13 kDa) a ne jeho případných polyubiquitinačních forem. Navíc inhibice pomocí PYR-41 neukázala statisticky významný rozdíl v množství proteinu ve spermii po kapacitaci. Po kapacitaci spermií společně s inhibitorem MG-132, nebyla zcela jasně potvrzena hypotéza o degradaci DQH za pomoci proteasomu. Naše výsledky se zcela neshodují s výsledky podobné práce od Zigo et al. (2019), ve které bylo potvrzeno, že inhibitor proteasomu MG-132 částečně blokoval degradaci DQH proteinu během kapacitace. Nicméně byla shodně potvrzena degradace proteinu DQH během kapacitace spermií. Nicméně jsme vyhodnotili data pouze z pěti imunodetekcí a je potřeba další experimenty provést.

Lokalizace DQH proteinu sledovaná pomocí fluorescenčního a konfokálního mikroskopu potvrdila výsledky imunodetekce tohoto proteinu v proteinových extraktech spermií. Byla jasně určena lokalizace DQH proteinu na ejakulovaných kančích spermích, která je v souladu s již dříve publikovanými výsledky (Maňásková et al. 2007). Zjistili jsme, že během ejakulace se protein váže na hlavičku a střední část bičíku. Po kapacitaci nebyla na většině spermií zaznamenána žádná reakce, což může naznačovat jeho úplnou degradaci. Nicméně Maňásková et al. (2007) uvádí studii na DQH proteinu jako o možném vazebném receptoru pro zona pellucida vajíčka, což by znamenalo, že tento protein částečně na povrchu spermií zůstává i po kapacitaci. Podobně je tomu například u jiných proteinů kančí semenné plazmy vázajících se na povrch spermií – spermadhesinů AQN a AWN1 (Dostálová et al. 1994), které mohou hrát také roli ve vazbě na vajíčko (Jonáková et al. 2000). Toto také potvrdila imunodetekce malého množství DQH proteinu v extraktu z kapacitovaných spermií v našich experimentech.

Na imunofluorescenčních snímcích spermií po kapacitaci v modifikovaném médiu jsme objevili, že pokud spermie neměla akrosom nebo měla akrosom příliš narušený, byl DQH protein lokalizován ve střední části bičíku a celé hlavičce, což může být důsledek nespecifického navázání DQH protilátky na porušenou spermii.

U inhibitoru PYR-41, který inhibuje enzym aktivující ubiquitin, jsme zaznamenali v podstatě stejný vliv na kapacitaci spermií vyhodnocené pomocí detekce a lokalizace DQH proteinu jako u inhibitoru MG-132. Jako spermie kapacitované společně s inhibitorem MG-132 měly zničené akrosomy nebo naprosto akrosomy chyběly téměř u 30% spermií. Takto narušené akrosomy,

mohou být zničeny v důsledku použití inhibitoru nebo samotného rozpouštědla, v našem případě DMSO, proto jsme provedli kontrolní kapacitaci spermií jen s přidavkem rozpouštědla. Vliv DMSO na množství nebo lokalizaci DQH proteinu nebyl zaznamenán. Zigo et al. (2019) použili ve své studii pro hodnocení degradace DQH proteinu během kapacity in vitro s inhibicí proteasomu stejný inhibitor, a to MG-132, ale rozpuštěný v etanolu. DMSO jsme vybrali díky předpokládanému menšímu množství rizik při samotné kapacitaci. Naproti tomu etanol způsobuje apoptózu a sníženou integritu DNA (Rahimipour et al. 2013). Zatímco určitá koncentrace DMSO (10 %) tyto nedostatky nemá (Stoss et al. 1983; He et al. 2004). Bylo zjištěno, že DMSO v koncentraci vyšší než 10 % snižuje přežitelnost spermií (Stoss et al. 1983). V našich experimentech se pohybovala výsledná koncentrace DMSO pouze kolem 1 %.

Po zhodnocení výsledků z analýzy obrazu se potvrdili předešlé výsledky, což jenom potvrzuje, že s velkou pravděpodobností nedochází k degradaci proteinu DQH za pomoci UPS, i když během kapacity dochází k jeho úbytku ve spermiích. Mezi skupinou spermií kapacitovaných v modifikovaném a nemodifikovaném médiu nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl. Z našich výsledků vyplývá, že se na degradaci DQH, povrchového proteinu spermií, ubiquitin-proteasomový systém s největší pravděpodobností nepodílí. Celkově jsme došli k závěru, že protein DQH, jakožto protein interagující s glykosaminoglykany nacházejícími se v oviduktu samice, může být během kapacity z povrchu kančích spermií spíše vyvazován s jejich pomocí. Bylo popsáno, že vazba kančích spermií v ovidukálním rezervoáru může být zprostředkována také DQH proteinem (Maňásková et al. 2007, Talevi & Gualtieri 2010) a změnou prostředí v oviduktu s počínající kapacitací se mohou spermie z ovidukálního rezervoáru uvolňovat vyvázáním DQH proteinu díky glykosaminoglykanům..

7 Závěr

DQH protein, jakožto protein semenné plazmy, se váže na spermie během ejakulace. Stanovená hypotéza, že během kapacitace dochází k jeho degradaci, byla experimentálně potvrzena, a to pomocí imunodetekce a imunolokalizace. U spermií před kapacitací byl DQH protein zjištěn na celé hlavičce ejakulované spermie, ale po kapacitaci již protein na hlavičce nebyl nalezen. A i denzitometrické hodnocení ukázalo výrazný úbytek proteinu DQH po kapacitaci v in vitro podmínkách.

Nepodařilo se ale potvrdit předpoklad, že degradace DQH probíhá prostřednictvím ubiquitin-proteasomového systému. Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v množství DQH u spermií kapacitovaných v médiu s přidavkem inhibitoru proteasomu (MG-132) a inhibitoru enzymu aktivujícího ubiquitin (PVR-41) ve srovnání se spermiemi inkubovanými v nemodifikovaném médiu. Ze získaných výsledků vyplývá, že se ubiquitin-proteasomový systém pravděpodobně nepodílí na degradaci DQH proteinu během kapacitace kančích spermií, ale že je protein z povrchu spermie odstraňován jiným způsobem. Došli jsem k závěru, že dochází k vyvazování DQH proteinu z povrchu spermie za pomoci glykosaminyglykanů v oviduktu.

8 Zdroje

- Assreuy AM, Alencar NM, Cavada BS, Rocha-Filho DR, Feitosa RF, Cunha FQ. 2003, Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. *Biological Reproduction*. 68:1836–1841.
- Assreuy AM, Calvete JJ, Alencar NM, Cavada BS, Rocha-Filho DR, Melo SC. 2002. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. *Biological Reproduction*. 67:1796–1803.
- Caballero I, Vazquez JM, García EM, Parrilla I, Roca J, Calvete JJ. 2008. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology*. 70:1352-1355.
- Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1997. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Letters homepage*. 407:201-206.
- Ciechanover A. 1994. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway. *Cell*. 79:13-21.
- Cross NL. 1998. Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction*. 59:7-11.
- Dachaux JL, Dachaux M, Paquignon M. 1989. Changes in Sperm Surface Membrane and Luminal Protein Fluid Content during Epididymal Transit in the Boar. *Biology of reproduction*. 40:635-651.
- Davidová N, Jonáková V, Maňásková-Postlerová P. 2008. Expression and localization of acrosin inhibitor in boar reproductive tract. *Cell and Tissue Research*. 383:303.
- Dechaux JL, Dechaux F, Druart X. 2016. Epididymal protein markers and fertility. *Animal reproduction science*. 169:76-87.
- Dechaux JL, Castella S, Gatti JL, Dechaux F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*. 63:319-341.
- Desoyer L, Manjunath P. 1992. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Exhibit Novel Interactions with Phospholipid. *The journal of biological chemistry*. 267:10149-10155.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1994. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal,

ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 25:48-54.

- Druart X, De Graaf S. 2018. Seminal plasma proteomes and sperm fertility. *Animal reproduction science*. 194:33-40.
- Druart X, Rickard JP, Mactier S, Kohnke PL, Kershaw-Young CM, Bathgate R, Gibb Z, Crossett B, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Grupen GG, De Graaf PS. 2013. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Journal of proteomics*. 91:13-22.
- Dylevský I. 2009. *Funkční anatomie*. Grada, Praha.
- Ekhlasi-hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsolova M, Petrunkina A, Töpfer-Petersen E. 2005. Spermadhesin AQN1 Is a Candidate Receptor Molecule Involved in the Formation of the Oviductal Sperm Reservoir in the Pig. *Biology of Reproduction*. 73:236-545.
- Fellenberg R, Zweifel HR, Grunig G, Pellegrini A. 1985. Proteinase Inhibitors of Horse Seminal Plasma. A high Molecular Mass, Acid-Soluble Proteinase Inhibitor. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. 366:705-712.
- Gonzáles-Cadavid V, Martins JAM, Moreno FB, Andrade TS, Santos ACL, Monteiro-Moreira ACO, Moreira RA, Moura AA. 2014. Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. *Theriogenology*. 82:697-707
- Gualtieri R, Mollo V, Barbato V, Talevi R. 2010. Ability of sulfated glycoconjugates and disulfide-reductants to release bovine epididymal sperm bound to the oviductal epithelium in vitro. *Theriogenology*. 73: 1037–1043.
- He S, Woods LC. 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*.3:254-262.
- Holt W, Fazeli A. 2010. The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. *Molecular Reproduction and Development*. 77: 934-943.
- Holtgrew-Bohling JK. 2016. *Large Animal Clinical Procedures for Veterinary Technicians*.

- Chen J-S, Doncel GF, Alvarez C, Acosta AA. 1995. Expression of mannosebinding sites on human spermatozoa and their role in sperm-zona pellucida binding. *Journal of andrology*. 16:55-63.
- Jonakova V, Jonak J, Ticha M. 2010. *Reproductive Genomics in Domestic Animals*. Wiley-Blackwell, Iowa.
- Jonáková V, Kraus M, Veselský L, Cechova D, Bezouška K, Tichá M. 1998. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *Journal of Reproduction Fertility*. 114:25-34.
- Jonáková V, Manásková P, Tichá M. 2007. Separation, characterization and identification of boar seminal plasma proteins. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life science*. 849:307-3014.
- Jonáková VM, Tichá M. 2004. Boar seminal plasma proteins and their binding properties. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 69:461/475.
- Karlsson A. 2011. Seminalplasma – komponenter och dess betydelse för spermens överlevnad. *Sveriges lantbruksuniversitet*. 1-13.
- Kim K, Foster AJ, Gerton GL. 2001. Differential Release of Guinea Pig Sperm Acrosomal Components During Exocytosis. *Biology of Reproduction*. 1:148-157
- Kittnar O. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
- Klener P, Klener P. 2010. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Grada, Praha.
- Kloetzel PM, Ossendorp F. 2004. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Current Opinion in Immunology*. 16:76–81.
- Laglais J, Roberts KD. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Research*. 12:183-224.
- Lee DH, Goldenberg AL. 1998. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends in Cell Biology*. 8:397-403.
- Lullmann-Rauch R. 2012. *Histologie*. Praha: Grada. ISBN 9788024737294.
- Lusignan MF, Bergeron A, Crête MH, Lazure C, Manjunath P. 2007. Induction of Epididymal Boar Sperm Capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 Proteins, Members of the BSP Protein Family. *Biology of Reproduction*. 76:424-432.

- Maghames CHM, Lobato-Gil S, Perrin A, Trauchessec H, Rodriguez S, Urbach S, Marin P, Xirodimas DP. 2018. NEDDylation promotes nuclear protein aggregation and protects the Ubiquitin Proteasome System upon proteotoxic stress. *Nature Communications* volume. 9.
- Maňásková P, Liberda J, Tichá M, Jonáková V. 2002. Isolation of non-heparin-binding and heparin-binding proteins of boar prostate. *Journal of Chromatography B*. 770:137-143.
- Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J. 2007. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Society of Reproduction and Fertility supplement*
- Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS, Fan J, Wright MW. 2009. New Nomenclature for Mammalian BSP Genes. *Biology of Reproduction*. 80:394-397.
- Manjunath P, Thérien I. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*. 53:109-119.
- Mardešić T. *Diagnostika a léčba poruch plodnosti*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4458-2.
- Miles EL, O’Gorman C, Samuel M, Walters E, Yi YJ, Sutovsky M, Prather RS, Wells KD, Sutovsky P. 2013. Transgenic pig carrying green fluorescent proteasomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:6334-6339.
- Muino-Blanco T, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA. 2008. Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. *Reproduction in Domestic Animals*. 43:18-31.
- Novak S, Ruiz-Sanchez A, Dixon WT, Foxcroft GR, Dyck MK. 2010. Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars. *J Androl*. 31:188-200.
- Novak S, Smith TA, Paradis F, Burwash L, Dyck MK, Foxcroft GR, Dixon WT. 2010. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology*. 74:956-967.
- Petrunkina AM, Gehlhaar R, Drommer W, Waberski D, Topfer-Petersen E. 2001. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Reproduction*. 121:889-896.

- Rahimipour M, Talebi AR, Anvari M, Sarcheshmeh AA, Omid M. 2013. Effects of different doses of ethanol on sperm parameters, chromatin structure and apoptosis in adult mice. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2:423-428.
- Reece WO. 1998. *Fyziologie domácích zvířat*. Grada, Praha.
- Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ. 2011. Seminal Plasma Proteins: What Role Do They Play?. *Journal of Reproductive Immunology*. 66:11-22.
- Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vázquez JM. 2005. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*. 63:514–35.
- Rozeboom K. 2000. Improving fertility with seminal plasma. *Swine News*. 23:1-4.
- Sanz L, Calvete J, Mann K, Babius H, Töpfer-Petersen E. 1993. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: A dual role for spermadhesins in fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 35.
- Souza CEA, Moural AA, Lima-Souza AC, Killian GJ. 2011. Binding patterns of seminal plasma proteins on bovine epididymal and ejaculated sperm membrane. *Veterinary medicine*. 63.
- Srivastava N, Jerome A, Srivastava SK, Ghosh SK, Kumar A. 2013. Bovine seminal PDC-109 protein: An overview of biochemical and functional properties. *Animal Reproduction Science*. 138:1-13.
- Stoss J, Holtz W. 1983. IV. THE EFFECT OF DMSO CONCENTRATION AND EQUILIBRATION TIME ON SPERM SURVIVAL, SUCROSE AND KC1 AS EXTENDER COMPONENTS AND THE OSMOLALITY OF THE THAWING SOLUTION. Elsevier Science Publishers B.V. 32:321-330.
- Strzezek J, Wysocki P, Kordan W, Kuklińska M, Mogielnicka M, Soliwoda D, Fraser L. 2005. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reproductive biology*. 3:279-290
- Strzezek J, Wysocki P, Kordan W, Kuklinska M, Mogielnicka M, Soliwoda D. 2005. Proteomics of boar seminal plasma current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reproduction biology*. 5:279-90

- Suarez SS, Dai XB, Demott RP, Redfern K, Mirando MA. 1992. Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro. *Journal of andrology* 13: 75–80.
- Sutovsky P, Manandhar G, McCauley TC, Caamano JN, Sutovsky M, Thompson WE. 2004. Proteasomal interference prevents zona pellucida penetration and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. 71: 1625–1637.
- Sutovsky P, McCauley TC, Sutovsky M, Day BN. 2003. Early Degradation of Paternal Mitochondria in Domestic Pig (*Sus scrofa*) Is Prevented by Selective Proteasomal Inhibitors Lactacystin and MG132. *Biology of Reproduction*. 68:1793-1800.
- Sutovsky P. 2011. Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction*. 114:1-14.
- ŠRÁMKOVÁ T. Poruchy sexuality u somaticky nemocných a jejich léčba. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4453-7.
- Talevi R, Gualtieri R. 2010. Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology*. 73:796-801.
- Talevi R, Zagami M, Castaldo M, Gualtieri R. 2007. Redox regulation of sperm surface thiols modulates adhesion to the fallopian tube epithelium. *Biological reproduction*. 76: 728–735.
- Tanaka K. 2009. The proteasome: overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*. 85:12–36.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P. 1998. Proteins of Bovine Seminal Plasma and High-Density Lipoprotein Induce Cholesterol Efflux from Epididymal Sperm. *Biology of Reproduction*. 59:768-776.
- Töpfer-Petersen E, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H, Ekhlas-Hundrieser M. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Animal Reproduction Science*. 89:159-170.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, varela PF, Ekhlas-Hundrieser M, Dostálová Z, Sanz L, Calvete JJ. 1998. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*. 30:217-224.
- Varela PF, Romero A, Sanz L, Romao MJ, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ. 1997. The 2.4 Å resolution crystal structure of boar seminal plasma PSP-I/PSP-II: a zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. *Journal of Molecular Biology*. 274:635-659.

- Visconti PE, Kopf GS. 1998. Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction*. 59:1-6.
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W. 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual Review of Biochemistry*. 68:1015-1068.
- Yokota N, Sawada H. 2007. Sperm proteasomes are responsible for the acrosome reaction and sperm penetration of the vitelline envelope during fertilization of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Developmental Biology*. 308:222-231.
- Zigo M, Jonakova V, Manaskova-Postlerova P, Kerns K, Sutovsky P. Ubiquitin-proteasome system participates in the de-aggregation of spermadhesins and DQH protein during boar sperm capacitation. *Reproduction research*. 157:283-295.

Obrázky

- Obrázek 1: Kuster C, Althouse GC. 2006. Reproductive Physiology and Endocrinology of Boars. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 717-721.
- Obrázek 2: SHERWOOD, Lauralee. *Human physiology: from cells to systems*. 9th edition. Boston: Cengage Learning, [2016].
- Obrázek 3: Gadella B, Tsai PJ, Boerke A, Brewis IA. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *The International Journal of Developmental Biology*. 52:473-480.