

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Molekuly účastníci se vazby spermií na oviduktální epitel

Diplomová práce

Autor práce: **Bc. Vít Smejkal**

Obor studia: **Reprodukční biotechnologie**

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

Konzultant: **MVDr. Romana Krejčířová, Ph.D.**

© 2018/19 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Molekuly účastnící se vazby spermií na ovidukální epitel" jsem vypracoval 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 autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4. 2019

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za její ochotu, čas, odborné vedení a velice cenné rady, jež do vedení této diplomové práce vynaložila. Dále bych rád poděkoval MVDr. Romaně Krejčířové, Ph.D. a Ing. Ondřeji Šimoníkovi, Ph.D. za přípravu kryořezů a oviduktálních buněk pro izolaci proteinů. Také bych rád poděkoval doc. Ing. Evě Chmelíkové, PhD. a Ing. Jiřímu Šichtařovi, PhD. za určení stádia hormonálního cyklu u prasečích oviduktů.

Molekuly účastnící se vazby spermií na oviduktální epitel

Souhrn

Vazba spermií na buňky oviduktu je zprostředkována proteiny vázanými na povrchu spermií a sacharidovými strukturami na povrchu buněk oviduktálního epitelu. V průběhu kapacitace dochází ke ztrátě povrchového obalu spermií, což způsobí uvolnění spermií z oviduktálního rezervoáru. Vazebné molekuly na spermiích a odpovídající vazební partneři na buňkách oviduktu nejsou u prasat stále zcela prozkoumány. Navíc není nic známo o změnách na povrchu buněk epitelu oviduktu během hormonálního cyklu prasnic. Cílem této diplomové práce bylo sledovat vazby povrchových proteinů oviduktů a proteinů spermií v závislosti na jejich hormonálním a kapacitačním stavu.

Výsledky této diplomové práce popisují jednotlivé vazby povrchových proteinů ejakulovaných a kapacitovaných spermií na povrchové proteiny oviduktů ve dvou různých fázích hormonálního cyklu samice. Vazby povrchových proteinů oviduktů v preovulační a luteální fázi na povrchové proteiny ejakulovaných a kapacitovaných spermií ukázaly, že se na proteiny oviduktů vážou proteiny ejakulovaných spermií v celé škále molekulových hmotností s významně větší intenzitou než proteiny kapacitovaných spermií. Byla zjištěna rozdílná intenzita vazby AQN, PSPI a PSPII spermadhesinů na proteiny oviduktů v preovulační a luteální fázi a na oviduktální epitel nedospělé prasnice. Všechny spermadhesiny se vážaly na proteiny buněk oviduktu se stejnou molekulovou hmotností. Byly sledovány změny v sacharidových strukturách na povrchu oviduktálních buněk pomocí vybraných lektinů, kdy nebyla zaznamenána významná změna ve vazbě k buňkám epitelu oviduktu z nedospělé a dospělé prasnice. V rámci hormonálního cyklu samice byla zaznamenána změna detekce různých sacharidových struktur v glykoproteinech buněk oviduktu a jejich odlišné molekulární hmotnosti.

Z výsledků je patrné, že vazba povrchových proteinů spermií k buňkám oviduktu se liší v závislosti na stádiu reprodukčního cyklu, a že tyto změny mohou také souviset se změnami v sacharidových strukturách na jejich povrchu.

Klíčová slova: spermie, ovidukt, kapacitace, proteiny, spermadhesiny

Molecules involving in the sperm binding on the oviductal epithelium

Summary

Binding of sperm to oviduct cells is mediated by surface-bound proteins of sperm and carbohydrate structures on the cell surface of the oviductal epithelium. During capacitation, the sperm surface coating is lost, causing sperm release from the oviductal reservoir. Binding molecules on sperm and corresponding binding partners on oviduct cells are still not fully researched in pigs. Moreover, nothing is known about changes on the surface of the epithelial cells of the oviduct during the hormonal cycle of the sows. The aim of this thesis was to monitor the binding of oviduct surface proteins and sperm proteins in dependence on their hormonal and capacitive state.

The results of this diploma thesis describe the individual bindings of surface proteins of ejaculated and capacitated spermatozoa to the surface proteins of oviducts in two different stages of the reproductive cycle. Binding of surface proteins and oviducts in preovulatory and luteal phase to surface proteins of ejaculated and capacitated sperm showed that proteins of ejaculated sperm bind to oviduct proteins over a range of molecular weights with significantly greater intensity than proteins of capacitated sperm. Different intensity of binding of AQN1, PSPI and PSPII spermadhesins to oviductal proteins in preovulatory and luteal phases and to oviductal epithelium of immature sow was found. All spermadhesins have bonded to oviduct cell proteins with the same molecular weight. In places where no significant changes in binding to oviduct cell epithelium from juvenile and adult sows was noted, changes in carbohydrate structures on the surface of oviductal cells were observed using selected lectins. In the sow hormonal cycle, a change in the detection of different carbohydrate structures of the oviduct cell glycoproteins and their different molecular weights were observed.

The results show that the binding of surface proteins of sperm to oviduct cells varies depending on the stage of the reproductive cycle and that these changes may also be related to changes in carbohydrate structures on their surface

Keywords: sperm, oviduct, sperm capacitation, proteins, spermadhesins

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Samčí ejakulát	3
3.1.1 Morfologie spermie.....	3
3.2 Vývoj a zrání spermií	3
3.2.1 Spermatogeneze	3
3.2.2 Epididymální maturace spermií	4
3.2.3 Proteiny semenné plazmy	5
3.3 Oviduktální rezervoár	6
3.3.1 Vznik rezervoáru.....	7
3.3.2 Funkce oviduktálního rezervoáru	8
3.4 Molekuly účastníci se tvorby oviduktálního rezervoáru	9
3.4.1 Vazba spermie-ovidukt u různých druhů zvířat.....	9
3.4.2 Vazba spermie-vejcovod u prasat	11
3.5 Uvolnění spermií z rezervoáru	13
4 Metodika	15
4.1 Materiál	15
4.1.1 Biologický materiál.....	15
4.2 Metodika	15
4.2.1 Promytí spermií.....	15
4.2.2 Kapacitace.....	16
4.2.3 Izolace povrchových proteinů buněk	16
4.2.3.1 Spermie.....	16
4.2.3.2 Oviduktální buňky	16
4.2.3.3 Lýza buněk	16
4.2.3.4 Izolace biotinem značených povrchových proteinů	17
4.2.3.5 Eluce povrchových proteinů pro SDS elektroforézu.....	17
4.2.3.6 Eluce biotinem značených proteinů pro vazebné studie.....	17
4.2.4 Biotinylace proteinů semenné plazmy AQN 1, PSP I a PSP II	18
4.2.5 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s přísadkou SDS podle Laemmliho	18
4.2.6 Elektropřenos proteinů (Western blot)	19
4.2.7 Vazebná studie proteinů na NC membráně	20
4.2.8 Nepřímá fluorescenční mikroskopie – vazba lektinů a proteinů semenné plazmy na řezu oviduktu	20

5	Výsledky	22
5.1	Vazba povrchových proteinů spermií na oviduktální buňky.....	23
5.2	Detekce sacharidových struktur na epiteliálních buňkách prasečího oviduktu	29
6	Diskuze	34
7	Závěr.....	38
8	Seznam literatury	39

1 Úvod

Spermie po vstupu do samičího pohlavního traktu musí projít souborem maturačních změn nazvaným kapacitace. K ní dochází v isthmu oviduktu, kde spermie vyčkávají do ovulace vajíčka v oviduktálním rezervoáru. Oviduktální rezervoár je formován na základě vazby povrchových proteinů se sacharidovými strukturami přítomnými na povrchu buněk oviduktu. U prasat bylo popsáno, že za tuto vazbu jsou zodpovědné některé proteiny z rodiny spermadhesinů a protein DQH, které pocházejí ze semenné plazmy a vážou se na povrch spermií během ejakulace (Jonáková et al. 2000). Bylo zjištěno, že AQN1 spermadhesin dokáže vázat manosové a galaktosové struktury na povrchu epiteliálních buněk oviduktu (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005). DQH protein, který má vazebnou afinitu k mananu, je schopný se k oviduktu také vázat (Maňásková et al. 2007) a PSPI a PSPII spermadhesiny se podílí na vazbě k manosovým strukturám (Töpfer-Petersen et al. 1998). Na buňkách epitelu oviduktu byly kromě sacharidových struktur zprostředkovávající vazbu spermií v rezervoáru identifikovány také proteiny annexiny a glykoprotein SBG, které jsou schopny se na této vazbě podílet prostřednictvím AQN spermadhesinu (Talevi & Gualtieri, 2010). Spermie jsou z oviduktálního rezervoáru uvolňovány se začínající kapacitace po ovulaci oocyty, kdy se na základě hormonálního signálu mění prostředí v lumen oviduktu. Změny na povrchu apikálních buněk před a po ovulaci oocyty nejsou zcela prozkoumány. Stejně tak nejsou známy všechny molekuly podílející se na tvorbě oviduktálního rezervoáru u prasat, jak na straně spermií nebo oviduktálního epitelu.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Byla stanovena vědecká hypotéza, že vazba kančích spermií na oviduktální epitel se bude lišit v závislosti na hormonálním cyklu samice a kapacitačním stavu spermií.

Na základě této hypotézy byly stanoveny následující cíle:

- 1) detekovat povrchové proteiny ejakulovaných a kapacitovaných kančích spermií, které vážou povrchové proteiny oviduktu v různých fázích hormonálního cyklu;
- 2) detekovat povrchové proteiny epitelu oviduktu, které jsou schopny vázat vybrané povrchové proteiny spermií;
- 3) detekovat určité sacharidové struktury pomocí vybraných lektinů na povrchu oviduktálních buněk.

3 Literární rešerše

3.1 Samčí ejakulát

3.1.1 Morfologie spermie

Samec dokáže vyprodukovat milióny spermií, avšak jen velice málo jich dorazí, někdy žádná, až k oocytu a zvládne ho oplodnit. Mohou za to různé faktory, jako například špatná morfologie spermií, různé nemoci a poruchy reprodukčního aparátu, paraziti a v neposlední řadě regulační systém samičí pohlavní soustavy (Suarez 2008).

Spermie se skládá ze dvou hlavních částí, hlavičky a bičíku. Hlavička spermie je obalená cytoplazmatickou membránou. Velkou část hlavičky spermie zaujímá jádro a akrosom, cytoplasma tvoří jen její nepatrnou část. V tomto akrosomálním váčku se nachází hydrolytické enzymy, které napomáhají spermii při penetraci skrz membrány oocytu. Akrosom je ohraničen akrosomální membránou, která je definována jako vnitřní a vnější. Hlavička je rozdělena na několik domén: akrosomální čepičku, ekvatoriální segment a post-akrosomální část (Reece 1998; De Jonge et Barratt, 2006).

Bičík je od hlavičky oddělen. Spojovací částí a obsahuje centriolu. Tento útvar funguje jako základ pro bičík. Ve střední části bičíku jsou umístěny mitochondrie, které jsou důležité pro tvorbu energie pro pohyb spermie. Mitochondrie jsou uspořádány v takzvané mitochondriální spirále. Na konci mitochondrií se nachází prsteneček. Uvnitř bičíku se nachází axonema, svazek mikrotubulů a proteinů. Skládá se ze dvou centrálních mikrotubulů, které jsou obklopeny 9 zdvojenými mikrotubuly. Celý bičík je obalen plasmatickou membránou. Bičík zajišťuje transport spermií v samičím reprodukčním traktu směrem oocytu a během fertilizace (Reece, 1998; De Jonge et Barratt, 2006).

3.2 Vývoj a zrání spermií

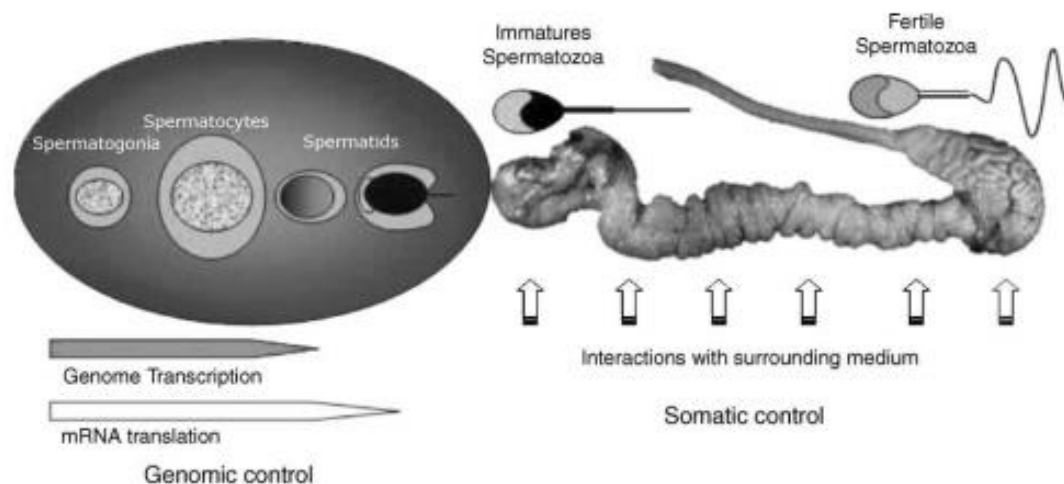
3.2.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze začíná u samců během puberty. Jedná se o kontinuální proces, kdy dochází k vývoji spermií ve semenotvorných kanálcích varlete. Jak spermatické buňky se vyvíjí, posouvají se blíže ke středu kanálků a následně jsou vypuštěny do lumenu. Během svého vývoje jsou spermatické buňky úzce spojeny se Sertolihovo buňkami a podstupují několik

vývojových stádií od spermatogonií až po spermie. Dochází k změně jejich tvaru z kulaté buňky na oválnou s bičíkem, vzniká spermatocyt a následně spermatida až po spermii se svým typickým tvarem a bičíkem (obr. 1). Produkce spermií není ve všech semenotvorných kanálcích synchronizována. Čas potřebný pro vytvoření spermií se liší druh od druhu (Knox 2001).

3.2.2 Epididymální maturace spermií

Pro správný průběh oplození musí spermie nejprve podstoupit epididymální maturaci (obr. 1). Po vývoji spermií ve varleti, následuje jejich přesun do nadvarlete. Nadvarle je rozděleno na několik částí: hlavu, tělo a ocas.



Obr. 1. Vývoj spermií ve varleti a následné dozrávání v nadvarleti (Dacheux et al. 2005).

Epitel nadvarlete je jeden z nejsložitějších v těle, když jej porovnáme s ostatními exokrinními žlázami. Jedná se o složení polarizovaných buněk epitelu, který se skládá z hlavních a bazálních buněk. Takto zformovaný komplex je utvářený v důsledku častých změn v samčím pohlavním traktu a přítomnosti komponent, jež se nevyskytují nikde jinde v těle (Dacheux et al. 2005).

Spermie dozrávají v nadvarlatech, kde jsou pro ně optimální podmínky, definované určitou teplotou, množstvím kyslíku, hodnotou pH a obsahem energetických složek. V hlavě nadvarlete nejprve dochází k absorpci vody, a tím i ke zvyšování koncentrace spermií. Na druhou stranu v ocasu nadvarlete, kde jsou spermie uchovávány do ejakulace, pak opět dochází k naředění spermií (Dacheux et al. 2005).

V nadvarleti dochází k intenzivním změnám v obsahu proteinů a jejich distribuci na povrchu spermií (Dacheux et al. 1998). Během průchodu spermií nadvarletem mizí některé

proteiny, jiné jsou naopak na povrch spermií navazovány z epididymální tekutiny (Okamura et al. 1995).

Epididymální tekutina obsahuje velké množství proteinů, které plní různou funkci během maturace spermií. U prasat byly v epididymální tekutině nalezeny různé enzymy, např. manosidáza (Okamura et al. 1995), metaloproteinázy a jejich inhibitory (Métayer et al. 2002) glutathionperoxidáza a hexosaminidáza (Dacheaux et al. 1998), které opracovávají povrch spermií. Epididymální proteiny mohou být zapojeny do výměny některých hydrofobních komponent z membrány spermií, jako je cholesterol a androgeny (Guyonnet et al. 2011). Jak spermie prochází nadvarletem, dochází také k těsnému připojení např. AQN a AWN proteinů na fosfolipidovou dvojvrstvy (Töpfer-Petersen et al. 2009). Proti bakteriálním útokům jsou spermie chráněny díky epididymálním β -defensinům (Yamaguchi & Ouchi, 2012), lipokalinům a CRES (cystatin-related epididymal spermatogenic) proteinům (Wang et al. 2012).

Některé z epididymálních proteinů hrají roli v redukci reaktivních forem kyslíku (ROS) a chrání spermie proti oxidativnímu stresu (Dacheux & Dacheux, 2014).

3.2.3 Proteiny semenné plazmy

Odlíšnost a množství proteinů obsažených v semenné plazmě závisí na druhu zvířete. U většiny druhů jsou tyto proteiny původem ze semenných váčků, prostaty nebo nadvarlete. Většina proteinů semenné plazmy patří do rodiny proteinů s fibronektinovou doménou typu II (Fn-2), mezi spermadhesiny nebo CRISPs proteiny (cysteine-rich secretory proteins) (Rodríguez-Martínez et al. 2011).

V semenné plazmě prasat, krav a koní se vyskytují spermadhesiny, které se vážou na povrch spermií. Jejich struktura a funkce je nejvíce prozkoumána u prasat, kde se v semenné plazmě vyskytuje nejvíce spermadhesinů. Patří mezi ně proteiny z AWN a AQN rodiny a PSP (porcine seminal plasma) proteiny a jejich glykosylované isoformy. Jedná se o multifunkční proteiny, které vykazují vysoké vazné schopnosti k sacharidům, fosfolipidům, glykosaminoglykanům, a proteasovým inhibitorům (Töpfer-Petersen et al. 2009).

Při ejakulaci se v spermiích formuje ochranná vrstva v sensitivní akrosomální oblasti, což zabraňuje předčasné akrosomové reakci. Následně při *in vitro* kapacitaci dochází ke ztrátě těchto spermadhesinů, kromě spermadhesinů vázaných fosfolipidovou dvojvrstvou. (Töpfer-Petersen et al. 2009).

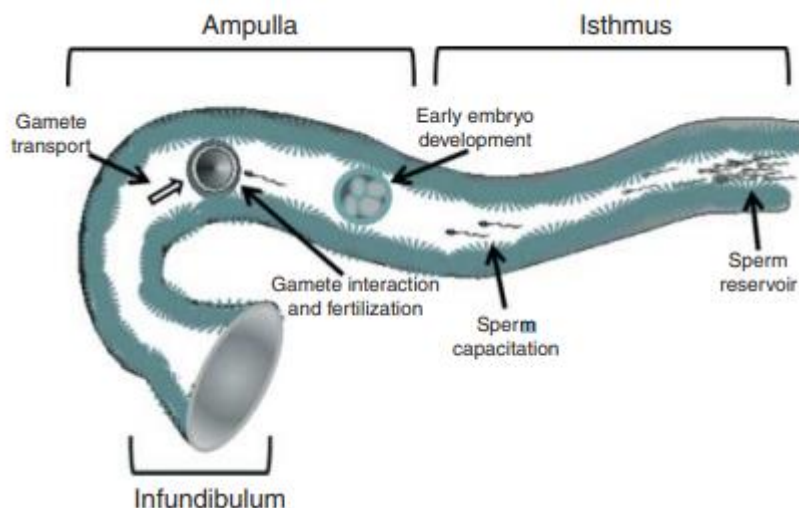
Proteiny semenné plazmy mají funkci regulace kapacity, vytvoření oviduktálního rezervoáru spermíí, regulaci imunitních reakcí a transport spermíí v reprodukčním traktu samic (Rodríguez-Martínez et al. 2011).

3.3 Oviduktální rezervoár

Téměř u všech savců, kromě vejcorodých, se vyskytuje vnitřní oplození. Jedná se o přenos spermíí ze samce do reprodukčního ústrojí samice. Spermie tak musí ujít dlouhou cestu reprodukčním traktem a následnou kapacitací, aby vůbec došlo k oplození (Suarez 2016).

Vejcovod je využíván pro zajištění hladkého průběhu oplodnění a průběh správného raného embryonálního vývoje (Suarez 2008).

Samičí ovidukt je složen z několika částí (viz obr. 2). Infundibulum, uterotubální spojení, slouží jako bariéra proti infekcím a regulační aparát. Ampule, která vytváří prostředí pro správné oplození a vývoj a v neposlední řadě isthmus, který slouží jako rezervoár pro spermie (Suarez 2008). V isthmus, navzdory tomu, že se zde vyskytuje méně záhybů a možností pro zakotvení spermíí, se spermie usazují nejčastěji, neboť jen velice málo jich doputuje až do ampuly vejcovodu (Gualtieri & Talevi 2000).



Obr. 2. Rozdělení vejcovodu s procesy oplození (Ghersevich et al. 2015)

Vnitřní epitel vejcovodu je z většiny tvořen řasinkovými a sekrečními buňkami (Suarez 2006).

U některých druhů zvířat se vyskytuje již zmíněné uterotubální spojení, jež se zavírá a otevírá, a tím se reguluje vstup spermíí. Spermie, kterým se nakonec podaří proniknout až do

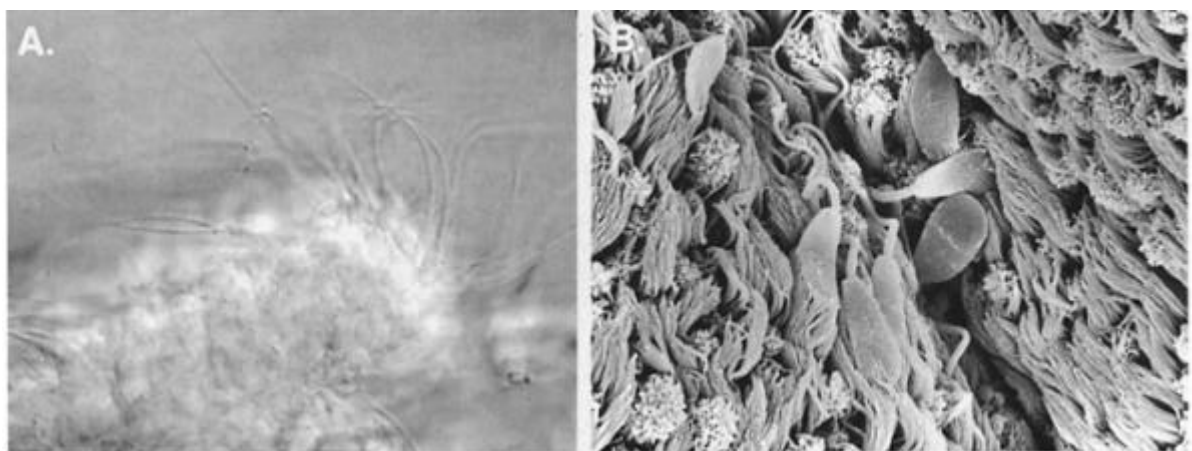
samotného oviduktu, se uchyťí ve zřasených sliznicích, známých jako krypty vejcovodu. U většiny savců je toto uchycení zapříčiněno vazbou spermií na oviduktální epitel. Čím více se poté blíží doba ovulace, tím se blíží kapacitace spermií včetně hyperaktivace motility. Kapacitované spermie následně ztrácí své povrchové vazebné proteiny a pokračují dále oviduktem směrem do ampula. Proces samotného uvolnění je postupný, a tudíž mohou spermie snáze, za pomoci sekretů vejcovodu, postupovat až k uvolněnému oocytu. Hyperaktivované spermie pak dokáží lépe proniknout skrz cumulus matrix a následně i zona pellucida, aby došlo k samotné fúzi gamet (Suarez 2008).

3.3.1 Vznik rezervoáru

Formování reprodukčního traktu u samice je řízeno několika faktory. Prvním je co největší usnadnění migrace spermií za současného zabránění přenosu patogenů. Druhým faktorem je uchování spermií, kdy spermie musí zůstat naživu po několik hodin, dnů i měsíců. Třetím faktorem je strategie výběru těch nejlepších spermií k oplození. (Suarez 2016).

U některých savců jsou spermie ukládány do slizničních krypt (Bedford et al. 1999). U většiny ostatních druhů je však kontakt s oviduktem zprostředkován vazebnými proteiny spermií k epitelu (Suarez 1987). Proteiny v apikální oblasti plazmatické membrány hlavičky váží spermie k oviduktu (viz. obr. 3.) a zvyšují *in vitro* přežitelnost spermií (Fazeli et al. 2003).

Díky uchování spermií v oviduktálním rezervoáru jsou spermie schopné si udržet svou motilitu o mnoho lépe než spermie, které volně plavou v oviduktální tekutině (Gualtieri & Talevi 2000).



Obr. 3. Býčí spermie navázané na epitelu oviduktů. Vlevo pod optickým mikroskopem, vpravo pod elektronovým mikroskopem (Suarez 1998).

Byly popsány dva hlavní typy komunikace mezi spermii a samičím reprodukčním traktem. První je na základě odpovědi na spermie proplovajícími skrz dělohu a tekutiny. Když spermie narazí na stěnu, tak má velice silnou tendenci plavat podél ní. Navíc je popoháněná plavat v protiproudu toku tekutin. Samičí trakt si tak sám vede spermie až k místu oplození. Druhým typem komunikace je molekulární interakce, která je zprostředkována mezi molekulami na povrchu spermií a receptory na epitelu oviduktu (Suarez 2016).

K uvolnění spermií vede kapacitace, kdy dochází ke změně v plazmatické membráně spermie nebo k úplnému vymizení některých vazebných molekul (Suarez 1998). Postupné uvolňování spermií zabraňuje polyspermnímu oplození (Suarez 2008).

Rozrušení vazby je následně způsobeno, pravděpodobně, několika událostmi, které nejsou ještě zcela prozkoumány. Jendou z nich je hormonální změna v reprodukčním traktu samice. Další je přítomnost gamet, které dokáží měnit sekreční aktivitu vejcovodu. V neposlední řadě má na uvolňování spermií i účinek komplexu cumulus-oocyt. Byly zjištěny nárůsty aktivity glykolytických enzymů, jako jsou β -D-galaktosidáza, α -D-mannosidáza a β -N-acetyl-galaktosaminidáza v oviduktální tekutině na začátku folikulární fáze a jejich úbytek ve fázi po ovulaci. Tím, jak se na povrchu oviduktálních buněk vyskytují sacharidové řetězce s obsahem manosy a galaktosy, tak mohou glykosidázy přebírat roli v remodelování povrchu vejcovodu, a tak uvolňovat spermie z rezervoáru (Carrasco et al. 2008); (Carrasco et al. 2008b). Velké množství spermií je uvolněno z oviduktálního rezervoáru za pomoci progesteronu nebo preovulační tekutiny (Hunter 2008). Avšak nízké koncentrace progesteronu v oviduktální tekutině během estrálního cyklu poukazují na to, že se můžeme vyloučit přímé působení progesteronu na uvolnění spermií (Brüssow et al. 2008). Studie, které se zabývaly oviduktálním proteomem zjistily, že přítomnost gamet upravuje mikroprostředí vejcovodu (Georgious et al., 2007).

3.3.2 Funkce oviduktálního rezervoáru

Oviduktální rezervoár slouží jako zábrana vzniku polyspermního oplození, kdy dochází k selekci spermií. Udržuje také spermie v oplození schopném stavu, než dojde k ovulaci oocytu. V oviduktálním rezervoáru dochází k procesu kapacitace a hyperaktivace motility spermií (Suarez 1998).

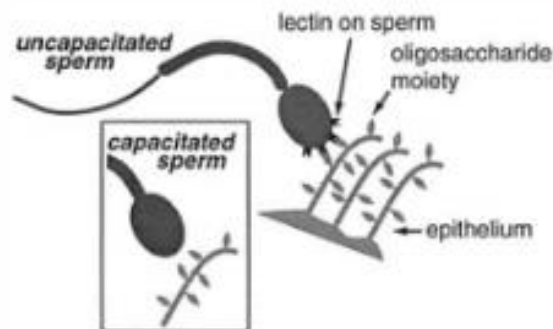
3.4 Molekuly účastníci se tvorby oviduktálního rezervoáru

Sacharidové struktury podílející se na oviduktálním rezervoáru se liší druh od druhu, stejně jako proteinový receptor na povrchu hlavičky spermie (Suarez 2001). Flexibilní glykanové řetězce v oviduktech působí jako zachytávači vstupujících spermií, a tak dokáží lokalizovat spermie blízko k epitelu a nastartovat mechanismy, které se podílí na stále ne zcela dobře prozkoumaných komunikacích mezi spermiemi a somatickými buňkami oviduktu (Wagner et al. 2002). Může dokonce dojít k tomu, že velice příbuzné druhy mohou mít zcela jiné sacharidy zodpovědné za formování oviduktálního rezervoáru spermií (Weiss 1994).

3.4.1 Vazba spermie-ovidukt u různých druhů zvířat

Existují rozdíly mezi různými druhy zvířat, například v koncentracích a složení látek přítomných v oviduktální tekutině. Část těchto látek pochází z tekutiny vejcovodu a část jich je syntetizována a vylučována epitelem vejcovodu. Některé z nich mohou být regulovány za pomoci cyklických hormonálních změn, které zvyšují syntézu v periovulačním období (Buhi 2002).

Při zkoumání hlodavců bylo zjištěno, že po odebrání spermií ze samice byly motilní pouze spermie, které byly navázané na epitel vejcovodu. Navíc, když byla zkoumána hyperaktivace a kapacitace spermií *in vitro*, tak se spermie následně nedokázaly uchytit na epitelu vejcovodů (Smith & Yanagimachi 1991). Tudíž se dá předpokládat, že změny na hlavičce spermie mohou za ztrátu afinity k epitelu (viz. obr. 4). Avšak vazebná místa na epitelu můžou i přes tento úbytek na spermii zůstat stále ve stejném počtu (Suarez 1998).



Obr. 4. Rozdíl mezi nekapacitovanou spermií, která se váže za pomoci svých lektinových molekul na epitel vejcovodu na sacharidy, glykoproteiny nebo glykolipidy. V rámečku je kapacitovaná spermie již bez vazebných molekul, které ztratila (Suarez 1998).

Byl takto zkoumán fetuin, jehož hlavní sacharidovou složkou je koncová kyselina sialová. Bylo zjištěno, že fetuin inhibuje vazbu křeččích spermií na epitel. Fetuin byl označen zlatým barvivem, a tak byla zviditelněna vazba fetuinu na hlavičky čerstvých epididymálních spermií. Čerstvé spermie vázaly více proteinů než kapacitované. Díky těmto údajům bylo zjištěno, že existuje na hlavičkách spermií lektin, který váže fetuin a dochází tak k připojení spermie k epitelu (DeMott et al. 1995).

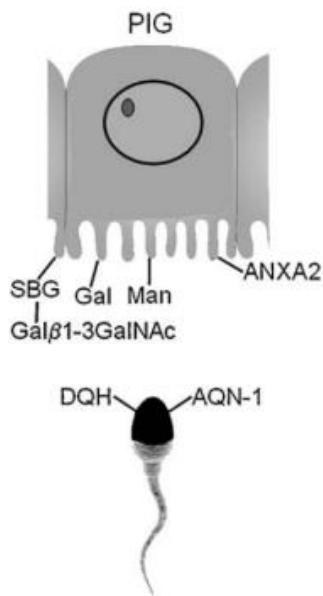
U koní byl zkoumán asialofetuin s hlavním cukrem, kterým je galaktosa. Asialofetuin blokuje vazbu spermií na oviduktální epitel (Lefebvre et al. 1995). Později byl izolován protein z periakrosomální plazmatické membrány spermií vážající galaktosu pomocí galaktosové afinní chromatografie (Dobrinski et al. 1996).

U býků bylo prokázáno, že vazba spermií a oviduktu je zprostředkována fukosou. Po ošetření fukosidazou se vazba spermií na ovidukt snižuje. Bylo zjištěno, že fukosa je přítomna na vnitřním epitelu oviduktu, a že na vazbě spermie na ovidukt se podílí specifické lektiny, které se vážou na fukosové ligandy (Lefebvre et al. 1997). U býčích spermií byl popsán protein BSP1, který dokáže rozpoznat fukosové zbytky (Gwathmey et al. 2003). BSP1 se dokáže navázat na tyto zbytky na oviduktálním epitelu (Hung & Suarez, 2010), anebo reagovat s anexiny v oviduktální tekutině (Carrasco et al. 2008). Jedná se o nejlépe zmapovaný zvířecí model pro vazbu spermie na ovidukt (Coy et al. 2012). U krav byly popsány anexiny ANXA1, ANXA2, ANXA4 a ANXA5. Jedná se o hlavní kandidáty pro vazbu spermie k oviduktálního epitelu. Všechny tyto anexiny jsou také přítomny na apikálním povrchu oviduktálního mukózního epitelu, většinou na řasinkových buňkách. Anexiny obsahují ve své struktuře již

zmíněnou fukosu (Ignotz et al. 2007). Obě tyto skupiny proteinů (ANXA a BSP) se dokáží vázat s glykosaminoglykany v ovidukální tekutině vejcovodu a zabránit tak navázání k sobě navzájem. Avšak na druhou stranu, tato vazba s glykosaminoglykany může vést později k rozrušení vazby mezi spermii a ovidukálním epitelem po kapacitaci (Ignotz et al. 2007).

3.4.2 Vazba spermie-vejcovod u prasat

U prasat je spojení spermie a vejcovodu uskutečněno na základě vysoké afinity spermii k vazebným místům obsahujícím oligomanosu a hybridní typy N-glykanů (Green et al. 2001). Vazba spermii na ovidukt je zprostředkována sacharidy, a tudíž vazebná molekula by měla mít schopnost vázat se na povrch spermie a zároveň mít schopnost interagovat se sacharidy. Spermadhesiny, hlavní sekreční produkty semenných vaků prasat, se nacházejí v semenné plazmě. Jedním ze spermadhesinů je AQN1, který se těsně váže na povrch spermie nejspíše za pomoci vazby s fosfolipidy (Töpfer-Petersen et al. 1998). Zároveň však připouští možnost vazby s manosovými a galaktosovými strukturami. AQN1 inhibuje *in vitro* vazbu spermii na explantáty vejcovodů v závislosti na jeho koncentraci (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005). Vazebná místa pro manosu jsou rozprostřená po celé apikální oblasti hlavičky spermie a při kapacitaci se ztrácejí. Po kapacitaci se následně sníží i možnosti navázání AQN1 na epitel oviduktu a dojde k výraznému snížení vaznosti spermii na ovidukt (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005). Dalším proteinem na hlavičce kančích spermii je DQH protein. Jedná se o heparin vázající povrchový protein, vyskytující se v apikální části hlavičky ejakulované spermie. Při ejakulaci napomáhá formovat ovidukální rezervoár u samic za pomoci vazby na manosu na apikálním povrchu ovidukálních buněk (Liberda et al. 2006; Maňásková et al. 2007). Dlouho bylo považováno, že jediným spermie vázajícím proteinem k oviduktu u prasat je spermie vázající glykoprotein (SBG) izolovaný z ovidukálních, epiteliálních buněk, který obsahuje O-vazný Gal 1-3 GalNAc disacharid (Marini et al. 2003). Kančí AQN1 spermadhesin dokáže v tomto disacharidu rozpoznat galaktosu. AQN1 se tak může navázat na takto vystavený protein (viz obr. 5). Tato interakce je jednou z nejdůležitějších interakcí vázajících spermie na ovidukt u prasat. SBG jsou lokalizovány v lumenu vejcovodu, kde byly detekovány shluky spermii, což je důkaz, že se zde spermie váží (Teijeiro et al. 2008; Talevi & Gualtieri 2010).



Obr. 5. Vazba spermie na vejcovod. SBG- sperm binding glycoprotein (spermie vázající glykoprotein), Man – manosa, Gal- galaktosa, ANXA2- annexin 2, Galβ1-3GalNA galaktosa-beta 1-3 N-acetylgalaktosamin (Talevi & Gualtieri 2010).

Mimo AQN1 se na spermích prasat vyskytuje i AWN spermadhesin (Dráb et al. 2017), který má schopnost vázat se na sacharidové zbytky. Překvapivě bylo zjištěno, že tento protein je tvořen také epiteliálními buňkami prasečího oviduktu (Song et al. 2010). Avšak role AWN v samičí oviduktu nebyla doposud plně prozkoumána, mohl by být však nápomocen při uvolňování spermií z oviduktálního rezervoáru (Coy et al. 2012)

U prasat byly také izolovány anexiny z oviduktálních buněk na základě jejich afinity k membránovým proteinům na spermích. Jedním z anexinů je A2 (AnxA2) lokalizovaném na apikálním povrchu oviduktálních epiteliálních buněk. Je hlavním kandidátem, jako receptor kančích spermií, pro formování oviduktálního rezervoáru, nejspíše prostřednictvím interakce s AQN1 (Teijeiro et al. 2009). AnxA2 může být navázán na protein S100A10 (S100 calcium-binding protein A10), anebo se vyskytovat samostatně. Obě možnosti výskytu se však od sebe liší různými biologickými funkcemi. Bylo zjištěno, že se AnxA2 navázaný na S100A10 vyskytuje v oviduktech prasat a krav, ale také u myší, člověka, kočky, psa i králíka. Nejvíce však u prasnic. Zde se vyskytuje ve vnější vrstvě apikální plazmatické membrány oviduktálních epiteliálních buněk. Na spermie se tedy AnxA2 váže ve formě monomeru, avšak v cytoplazmě prasečích oviduktálních apikálních buněk je AnxA2 asociován se S100A10 (Teijeiro et al. 2015).

Byly také zkoumány inhibice vazby kančích spermií na explantáty oviduktálního epitelu za pomoci glykoproteinů. Z množství těchto proteinů se sacharidovou složkou oligosacharidových struktur, pouze asialofetuin a ovalbumin vykazovaly inhibiční aktivity,

naznačující, že ovalbumin může blokovat vysokou afinitu vazných míst a asialofetuin nízkou afinitu vazných míst. Zatímco fetuin obsahující koncovou sialovou kyselinu neměl žádný efekt. Ovalbuminové glykopeptidy bývají izolovány pomocí afinitní chromatografie s konkanavalinem A a kapalinovou chromatografií na reverzní fázi. Glykopeptidy jsou pak analyzovány za pomoci hmotnostní spektrometrie. Byly zjištěny dva typy glykanů s vysokým obsahem manos (Wagner et al. 2002).

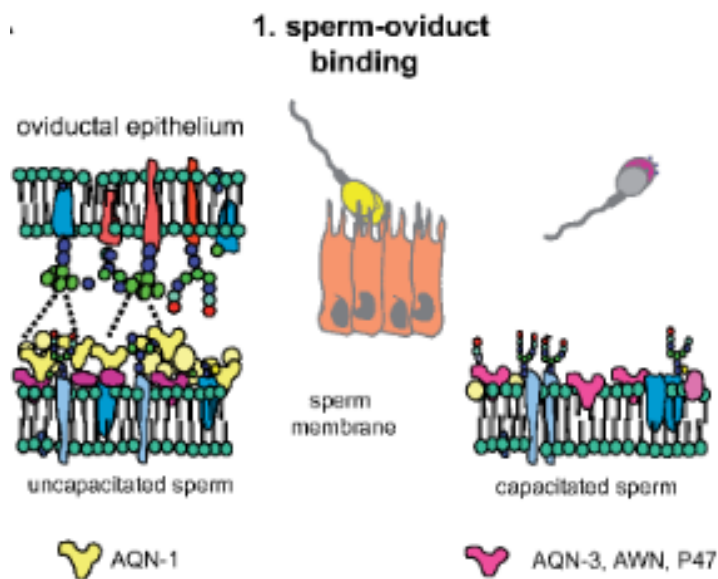
Za jedny z nejdůležitější receptorů pro vytvoření vazby spermie-ovidukt u prasat se považují i glykany obsahující Lewis^x. Jedná se o trisacharidový antigen, který účinkuje spolu s glykolipidy (Silva et al. 2016). Bylo tak zjištěno, že se tyto antigeny vyskytují v isthmu. S jejich pomocí je pak díky 3-O-sulfátovaným Le^x (suLe^x) vázáno až 60 % hlaviček nekapacitovaných spermií. Le^x se vyskytují i v různých pozicích, kdy například 3-O-sulfo-Le^A se váže pouze na méně jak 5 % spermií. Spermie však nejvíce preferují tento suLe^x a váží se do koráلكových struktur. Po kapacitaci však nastává pokles vazných míst, a to až na méně jak 10 %. Tímto jevem je dáno uvolnění spermií z oviduktálních krypt (Machado et al. 2014).

Byla provedena studie, kdy bylo zjištěno za pomoci 377 glykanů, že spermie vykazují obrovskou afinitu k strukturám obsahující Le^x nebo biantennární 6- sialovaný N-cetylactosamin (Kadirvel et al. 2012). Struktury obsahující Lewis^x se vyskytují i u lidí (Yurewicz, et al. 1982).

U prasat existují však i další molekuly na apikální membráně oviduktálních buněk pro udržení schopnosti oplození spermií. Studie prokázaly, že vazbu zprostředkovává i HSP70 (z angl. heat shock protein 70 kDa) (Elliott et al. 2009). Následná účinnost tohoto proteinu HSPA8 je zjiřitelná prodloužením přežití spermií. Tento protein se tak nejspíše využívá pro udržení životaschopnosti spermií v oviduktu (Fazeli et al. 2003).

3.5 Uvolnění spermií z rezervoáru

Spermie jsou uvolněny z oviduktálního rezervoáru při jejich kapacitaci (Suarez 1998). K uvolnění spermií dochází buď odstraněním povrchových proteinů, které zprostředkovávají vazbu spermií k buňkám oviduktu (viz. obr. 6) (Töpfer-Petersen et al. 2008) nebo odštěpením sacharidových zbytků na povrchu epitelu oviduktu prostřednictvím glykolytických enzymů, přítomných v oviduktální tekutině v době ovulace (Carrasco et al. 2008). Hnací silou je také zvýšení motility do stavu hyperaktivace (Suarez 2008).



Obr. 6. Uvolnění spermií z oviduktálního rezervoáru u prasat. AQN1 se naváže na manosu. Když dojde k kapacitaci, proteiny na membránovém plášti spermie zaniknou a spermie se uvolní (Töpfer-Petersen et al. 2008).

Kapacitací se rozumí soubor fyziologických změn u spermií. Jako součást kapacitace se uvádí zvýšení asymetrického vlnění bičíku a zvýšení amplitudy. Při kapacitaci dochází ke změnám na plazmatické membráně spermie, které vedou ke schopnosti spermie prodělat akrosomální reakci. Následuje zvýšení intracelulárního pH, změna membránového potenciálu tzv. hyperpolarizace plazmatické membrány spermie a následná změna propustnosti membrán (Stival et al. 2016).

Ke změnám v plazmatické membráně patří asymetrické přenášení fosfolipidů, které má za následek zhroucení fosfolipidové asymetrie a dojde ke snížení cholesterolu v plazmatické membráně spermie, následuje rozvolnění membrán a dochází k setkávání domén (Knobil 2006). Tyto procesy společně podporují oplození-schopnost spermie. Na molekulární úrovni pak při kapacitaci dochází k několika krokům (Stival et al. 2016). Po odstranění cholesterolu dochází k několika přenosům signálů. Začne se řídit tok HCO_3^- , K^+ a Ca^{2+} . Tyto ionty regulují aktivitu SACY (sperm soluble adenyl cyclase), zvyšují intracelulární cAMP (cyclic adenosine monophosphate) a aktivují PKA (protein kináza A). Následuje aktivace cSRC kináz, které následně regulují serin/threonin fosfatázy a PKA. V důsledku toho nastává fosforylace tyrosinu spojovaného s kapacitací spermií (Coy 2012).

4 Metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

Za účelem zkoumání molekul, účastnících se na vazbě spermií na oviduktální epitel bylo použito kančích spermií. Spermie byly získány jako inseminační dávka od firmy ProAgro Nymburk a.s. od samce plemene Landrase.

Inseminační dávky byly dováženy v polystyrenových kontejnerech s vnitřní teplotou 17°C a následně uchovávány v laboratoři také při 17°C. V této práci se pracovalo se spermiemi ihned po přivezení a nedošlo tak k delšímu uchovávání spermií než 1 den.

Prasečí ovidukty byly získány od jatečných prasnic z Kolče. Celkem byly zpracovány 2 reprodukční soustavy od 3 dospělých a 1 prepubertální samice. Bylo určeno stádium hormonálního cyklu podle velikosti folikulů. Do laboratoře byly převezeny v polystyrenových krabicích na ledu a ihned zpracovány. Byla provedena extrakce samotných oviduktů. Pro přípravu kryorezů byly následně odděleny úseky isthmů, které byly v připravených alobalových miskách zality přípravkem TissueTek (OCT Compound for Cryostat Sectioning, Austrálie) a opatrně pokládány do tekutého dusíku. Poté byly zpracovány jako kryorezy na přístroji cryo-cut Leica (Biocev, Vestec).

4.2 Metodika

4.2.1 Promytí spermií

Spermie byly promyty. Toto bylo provedeno tak, že se odebralo do zkumavek 2x 5 ml ejakulátu z chladicího boxu. Tyto zkumavky byly následně vloženy do centrifugy na 10 minut při 300 x g při pokojové teplotě. Po stočení byly zkumavky vyjmuty a supernatant odsán pipetou. K vzorkům se následně přidalo 5 ml PBS (Phosphate buffer saline, Sigma-Aldrich) (NaCl, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, destilovaná voda) a zkumavky byly opět vloženy do centrifugy (Benchmark, LC-8 series) na 10 minut a 300 x g. Tento krok byl zopakován ještě 2x.

4.2.2 Kapacitace

Promyté spermie byly naředěny na optimální koncentraci a to $2,5-5 \times 10^7$ spermií/ml pomocí kapacitačního média TBM (113,1 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 20 mM TRIS, 11 mM glukosa, 5 mM pyruvát sodný, 1 ml gentamycinu, ve 100 ml H₂O, pH 7,4) + BSA (1 mg/ml). Suspenze se spermiemi byla rozdělena po 500 µl do 20 zkumavek Eppendorf a inkubovány 3 hodiny při 38°C a 5 % CO₂. Po třech hodinách kapacitace byla suspenze spermií dvakrát promyta PBS a vždy centrifugována při 300 x g 10 min.

4.2.3 Izolace povrchových proteinů buněk

Pro značení povrchových proteinů kančích spermií a oviduktálních buněk bylo využito kitu Cell Surface Protein Isolation Kit (Pierce®, Thermo Scientific).

4.2.3.1 Spermie

Ejakulované spermie a spermie po in vitro kapacitaci (5×10^7 buněk) byly inkubovány s 10 ml biotinylačního činidla Sulfo-NHS-SS-Biotinem v PBS při 4°C 30 minut s občasným mírným protřepáním.

Po 30 minutách byly spermie stočeny při 500 x g 3 minuty a supernatant byl odsán. Spermie byly dvakrát promyty 5 ml TBS (Tris buffered saline; 130 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,4) a centrifugovány při 500 x g 3 minuty.

4.2.3.2 Oviduktální buňky

Pro biotinylací povrchových proteinů epiteliálních buněk prasečích oviduktů byl přímo do lumen isthmické části oviduktu aplikován roztok Sulfo-NHS-SS-Biotinu v PBS. Z obou stran byl ovidukt uzavřen pomocí peánů a ponechán 30 minut při 4°C. Poté byl ovidukt podélně rozříznut a apikální buňky epitelu byly seškrábnuty tupou stranou skalpelu do mikrozkušavek.

4.2.3.3 Lýza buněk

Pro lyzaci buněk bylo použito 250 µl lyzačního pufru z kitu Cell Surface Protein Isolation Kit (Lysis Buffer). Buňky byly inkubovány 30 minut na ledu a každých 5 minut intenzivně protřepány. Poté následovala centrifugace (Hettich centrifugen, Mikro 22 R) 2 minuty při 10 000 x g a teplotě 4°C.

4.2.3.4 Izolace biotinem značených povrchových proteinů

Byly připraveny dvě kolonky z kitu Cell Surface Protein Isolation Kit (Column Accessory Pack). Kolonky byly složeny a do vrchní části bylo přidáno 500 µl avidin imobilizovaného na gelových kuličkách z kitu (Immobilized NeutrAvidin™ Gel). Kolonky byly vloženy do mikrozkušavek a centrifugovány 1 minutu při 1000 x g a 4°C. Následně byl odstraněn supernatant a na povrch kolonky bylo přidáno 500 µl promývacího pufru z kitu (Wash Buffer). Kolonky byly opakovaně promyty pufrům pomocí centrifugace. Poté byly kolonky dole uzavřeny a byl do nich nanesen lyzát buněk. Inkubace s avidinem probíhala 60 minut na rotačním přístroji při pokojové teplotě.

Po inkubaci byly kolonky otevřeny a provedena centrifugace 1 minutu při 1000 x g a teplotě 4°C. Proteklý supernatant byl odstraněn a avidinový nosič byl 3x promyt 500 µl promývacího pufru s přidavkem proteasových inhibitorů. Proběhla vždy centrifugace 1 minutu při 1000 x g v chlazené centrifuze na 4°C.

4.2.3.5 Eluce povrchových proteinů pro SDS elektroforézu

Byl připraven neredukující vzorkový pufr pro SDS elektroforézu: 0,5 M Tris.HCl, pH 6,8 (Bio-Rad), glycerol, 2% SDS (dodecyl sulfát sodný, GE Healthcare 0,05% bromfenolová modř. Do 450 µl neredukujícího vzorkového pufru bylo přidáno 23,7 µl 1 M dithiotreitolu (DTT, kit). Do každé kolonky s avidinem, které byly zespodu uzavřeny, bylo přidáno 150 µl takto připraveného vzorkového pufru a kolonky byly inkubovány na rotačním přístroji po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Poté byly kolonky otevřeny, vloženy do mikrozkušavek a proběhla centrifugace 2 minuty při 1000 x g. Uvolněné rozpuštěné proteiny byly zamrazeny a uchovány pro následnou SDS elektroforézu.

4.2.3.6 Eluce biotinem značených proteinů pro vazebné studie

Pro eluci povrchových proteinů značených biotinem byla využita 4 M močovina v PBS. 250 µl roztoku močoviny bylo nanášeno do kolonky s navázanými biotinem značenými proteiny a proběhla inkubace na rotačním přístroji 60 minut při pokojové teplotě. Po 60 minutách byly kolonky otevřeny, vloženy do mikrozkušavek a centrifugovány 2 minuty při 1000 x g. Proteklý supernatant byl následně přenesen do speciální odsolovací kolonky (Zeba™ Desalt Spin Columns, 2 ml) (Thermo Scientific). Byla provedena centrifugace 5 minut při 1000 x g pro odstranění močoviny. Pomocí dialyzačních zkušavek byla provedena výměna

pufry za za HEPES pufr (Ignotz 2007) (0,106 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2,98 g HEPES, 0,1332 g $CaCl_2$, 3,7986 g NaCl, 0,1864 KCl, 0,0358 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, v 500 ml destilované H_2O ; pH 7,5). Výměna proběhla centrifugací 10 minut při 10000 x g. Poté byly proteiny ve vrchní části kolonky odebrány, byla změřena jejich koncentrace pomocí BCA kitu (PierceTM BCA Protein Assay Kit, Thermo scientific) na spektrofotometru Biochrom Libra S22 (Fischer Scientific) a zamraženy.

4.2.4 Biotinylace proteinů semenné plazmy AQN 1, PSP I a PSP II

Bylo naváženo 2 mg PSP a AQN1 proteinů, ty byly rozpuštěny v 200 μ l 1 mM HCl. Tento roztok byl poté zředěn 4 ml 0,5 M $NaHCO_3$, pH 8,8. K tomuto roztoku bylo poté přidáno 50 μ l DMF s 1 mg NHS-biotinu. Roztok byl následně přenesen na třepací zařízení (DLAB, SK-L 180-E) do temna na 2 hodiny.

Po dvou hodinách byla reakce zastavena 100 μ l koncentrovanou kyselinou octovou. Celý roztok byl následně naředěn 1 ml 0,5 M $NaHCO_3$ a 1 ml 1 mM HCl. Takto vzniklý roztok byl přenesen do odsolovacích zkumavek (ZebaTM Desalt Spin Columns, 20 ml; Thermo Scientific). Byla provedena centrifugace 10 minut při 10 000 x g a výměna za TBS.

4.2.5 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s přidavkem SDS podle Laemmliho

Pro provedení elektroforézy byly připraveny gely a sestaven aparát na elektroforézu. Byl připraven roztok pro 15% separační akrylamidový gel (2,5 ml destilovaná voda, 5 ml roztok A (Acrylamide/bis-Acrylamide 30% Solution, Bio-Rad); 2,5 ml 1,5 M Tris, pH 8,8 (Resolving Gel Buffer; Bio-Rad), 100 μ l 10% SDS (dodecyl síran sodný), 4,5 μ l Temed (GE Healthcare PlusOne), 70 μ l 10% persíran amonný, APS). Roztok byl aplikován do meziprostoru mezi skly po 5 ml a převrstven destilovanou vodou.

Po 30 minutách polymerace gelu, byla voda odstraněna a byl připraven 4% zaostřovací gel (1,52 ml destilovaná voda, 0,625 ml 0,5 M Tris, pH 6,8 (Stacking Gel Buffer; Bio-Rad), 0,325 ml roztok A, 0,025 ml 10% SDS, 3,8 μ l Temed, 50 μ l 10% APS). Roztok gelu byl navrstven na již ztuhlý separační gel a byly do něj ponořeny hřebínky na vytvoření 15 jamek pro aplikaci vzorků. Takto se byl gel ponechán 10 minut tuhnout. Skla s gely byla následně vložena do aparatury pro elektroforézu a zalita elektrodoým pufrem o pH 8,3 (15 g Tris, 72 g

glycinu; Sigma-Aldrich), 5 g SDS, destilovaná voda do 1 litru, pak následně ředěno 1:4 destilovanou vodou).

Byly vyjmuty hřebínky a do vzniklých jamek bylo za pomoci Hamiltonovy stříkačky aplikováno podle potřeby 4 μ l proteinových molekulárních standardů (Precision Plus Protein™ Standards Dual Color) (Bio-Rad) a 15 μ l proteinů (lyzát buněk oviduktu nebo spermií). Elektroforéza probíhala nejprve při konstantním napětí 80 V po dobu asi 30 minut, poté při 150 V asi 1,5 hodiny. Gely byly následně vyjmuty z aparatury, promyty destilovanou vodou a buď obarveny Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25 g Coomassie Blue R-250, 45 ml metanolu, 9 ml kyseliny octové do 100 ml dest. vody) na proteiny nebo vloženy do transferového pufru pro Western blot.

4.2.6 Elektropřenos proteinů (Western blot)

Elektropřenos proteinů z gelu na nitrocelulózovou (NC) membránu byl proveden v aparatuře od firmy Bio-Rad. Gely s rozdělenými proteiny po SDS elektroforéze byly 10 minut inkubovány spolu s filtračními papíry Wathman (GE Healthcare Whatman chromatography paper), houbičkami a NC membránou (Amersham Biosciences Hybond-C Extra membrane) v transferovém pufru (3,03 g Tris, 14,4 g glycin, 200 ml vody, 200 ml metanolu a doplněno do 1 l destilovanou vodou).

Kazeta pro elektropřenos byla uspořádána následujícím způsobem: houbička, 2 výstřižky chromatografického papíru Whatman, gel, membrána, 2 výstřižky chromatografického papíru Whatman a nahoru houbička. Kazeta byla vložena do vaničky s transferovým pufrem tak, aby proteiny, které mají stále díky SDS záporný náboj, putovaly na NC membránu, tedy ke kladné elektrodě. Vanička byla během elektropřenosu, který probíhal při konstantním proudu 500 mA 1,5 hodiny, chlazena ledem. Poté byla membrána vyjmuta, promyta destilovanou vodou a PBS a proteiny byly reverzibilně obarveny pomocí Ponceau S (Sigma-Aldrich) po dobu 1 minuty. Pozadí membrány bylo odmyto destilovanou vodou, obarvené proteiny byly zdokumentovány a pomocí PBS byla barva Ponceau odmyta.

4.2.7 Vazebná studie proteinů na NC membráně

NC membrána s rozdělenými proteiny byla deaktivována pomocí 1% rybí želatiny (Sigma-Aldrich) 1 hodinu na třepačce při pokojové teplotě. Poté byla membrána 2x promyta

po dobu 5 minut na třepačce PBS s 0,05% Tweenem 20 (Sigma-Aldrich) (PBS-T). Membrány byly vloženy do parafilmových kapsiček a byly inkubovány v HEPES pufru (Ignotz 2007) nebo PBS s biotinem značenými proteiny AQN 1, PSP I a PSP II spermadhesiny (10 µg/ml), lektiny (ConA-Biotinylated Concanavalin A, SNA-Biotinylated Elderberry Bark Lectin, WGA-Biotinylated Wheat Germ Agglutinin, PSA-Biotinylated Pisum Sativum Agglutinin) ředěnými 20 µg/ml nebo proteiny z apikálních částí oviduktálních buněk (10 µg/ml).

Inkubace probíhala 2 hodiny na třepačce při pokojové teplotě (biotinem značené spermadhesiny) nebo přes noc v lednici. Poté byly membrány promyty 3x po 10 minutách PBS-T pro odstranění nespecifických interakcí. Následovala inkubace s avidinem konjugovaným s křenovou peroxidázou (Avidin-HRP; Sigma-Aldrich) v koncentraci 1 µg/ml PBS po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě na třepačce. Membrána byla 4x promyta po 5 minutách v PBS-T a následně 2x pouze PBS. Vizualizace navázaných proteinů a lektinů proběhla pomocí chemiluminiscenčního substrátu SuperSignal West Pico (Pierce) a detekce byla snímána na přístroji Azure c600 (Azure Biosystems; Biocev, Vestec).

Molekulové hmotnosti detekovaných proteinů byly určeny z kalibračních křivek, vytvořených na základě vzdálenosti molekulových proteinových standardů od horního okraje gelu. Denzitometrická analýza míry vazeb vybraných proteinů byla provedena v programu Image Studio Digit (LI-COR Biosciences).

4.2.8 Nepřímá fluorescenční mikroskopie – vazba lektinů a proteinů semenné plazmy na řezy oviduktu

Na podložní sklíčka s kryorezy oviduktů bylo pomocí hydrofobní fixy Pen liquid Blocker (Sigma-Aldrich) ohraničen prostor kolem řezů. Následně byla skla ponořena do vymraženého acetonu na 30 minut za účelem fixace. Skla s preparáty byla opláchnuta PBS a proběhla deaktivace 150 µl, 2,5% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich) v PBS po dobu 30 minut.

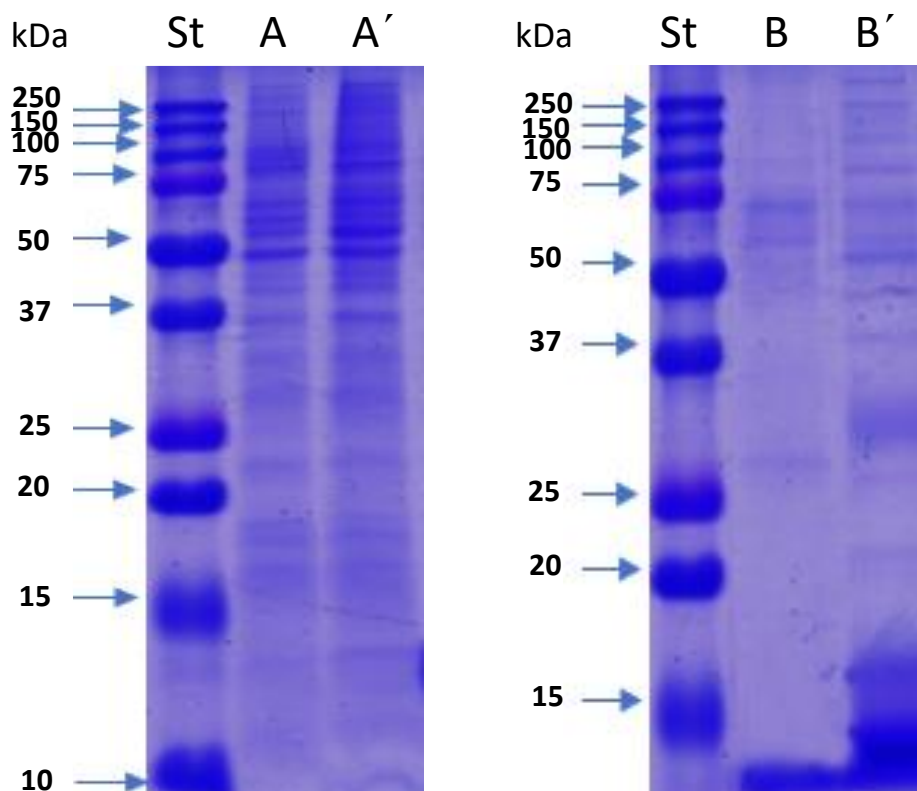
Poté byly preparáty opláchnuty v PBS a na řezy bylo přidáno 100 µl biotinem značených lektinů (ConA, SNA, WGA, PSA), které byly ředěné 1:100 v HEPES pufru (10 mM HEPES, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,1 mM CaCl₂, 0,01 mM MnCl₂). Dále byla sledována také vazba s lektinem GNL (Galanthus nivalis Lectin 2mg) konjugovaným s FITC (fluoresceinthiokyanát) (1:300 v HEPES) a také biotinem značenými proteiny kančí semenné plazmy PSPI, PSPII a AQN1 spermadhesiny (10 µg/ml) (naředěné 50 µl na 950 ml TBS). Inkubace proběhla v temnu ve vlhké komůrce 60 minut v inkubátoru při 38°C. Preparáty byly promyty PBS a na

biotinem značené proteiny a lektiny bylo naneseno 100 μ l streptavidinu konjugovaného s FITC (Vector Laboratories) nebo Texas red (Vector Laboratories) naředěného 1:300 v PBS. Inkubace proběhla 30 minut v temnu. Negativní kontrola byla inkubována pouze se 100 μ l streptavidinu konjugovaného s FITC nebo Texas red. Poté byly preparáty opláchnuty PBS a následně destilovanou vodou a ošetřeny montovacím médiem VectaShield s DAPI (Vector Laboratories). Na preparáty bylo následně položeno krycí sklíčko zafixované lakem a zhodnoceno pod epifluorescenčním mikroskopem Nikon s dokumentačním programem NIS.

5 Výsledky

Část ejakulovaných spermií byla podrobena kapacitaci *in vitro* (kap. 4.2.2). Následně byly izolovány povrchové proteiny z ejakulovaných a kapacitovaných spermií (kap. 4.2.3). Byla určena stádia hormonálního cyklu oviduktů a následně z nich byly izolovány povrchové proteiny z epiteliálních buněk.

Na obrázku 7 je zobrazen elektroforézový gel se separovanými povrchovými proteiny z ejakulovaných (A) a kapacitovaných (A') spermií a s povrchovými proteiny apikálních buněk oviduktu v preovulační (B) a luteální (B') fázi, obarvenými pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250. Proteiny spermií jsou viditelné v celé škále molekulových hmotností a nejsou viditelné rozdíly mezi proteinovým profilem ejakulovaných a kapacitovaných kančích spermií. Mezi izolovanými povrchovými proteiny oviduktů jsou jasné rozdíly v expresi proteinů, kdy v buňkách pocházejících z oviduktů v preovulační fázi je viditelně méně proteinů, výrazné proteinové proužky okolo 15 a 27 kDa a mezi 50 a 75 kDa (obr. 7B).



Obr. 7. SDS elektroforéza povrchových proteinů barvených Coomassie Brilliant Blue ejakulovaných (A) a *in vitro* kapacitovaných (A') kančích spermií a povrchových proteinů oviduktů v preovulační fázi (B), v luteální fázi (B'). Modré šipky značí molekulární hmotnost proteinů standardů (St) v kDa.

5.1 Vazba povrchových proteinů spermií na oviduktální buňky

Separované povrchové proteiny ejakulovaných a kapacitovaných spermií pomocí SDS elektroforézy (kap. 4.2.5) byly přeneseny na NC membránu (kap. 4.2.6). Byla provedena vazebná studie inkubací biotinem značených povrchových proteinů oviduktů v preovulační a luteální fázi. Nanesení proteinů bylo ověřeno pomocí barvení Ponceau na NC membráně, negativní kontrola byla provedena inkubací separovaných proteinů na NC membráně pouze se streptavidinem konjugovaným s křenovou peroxidázou.

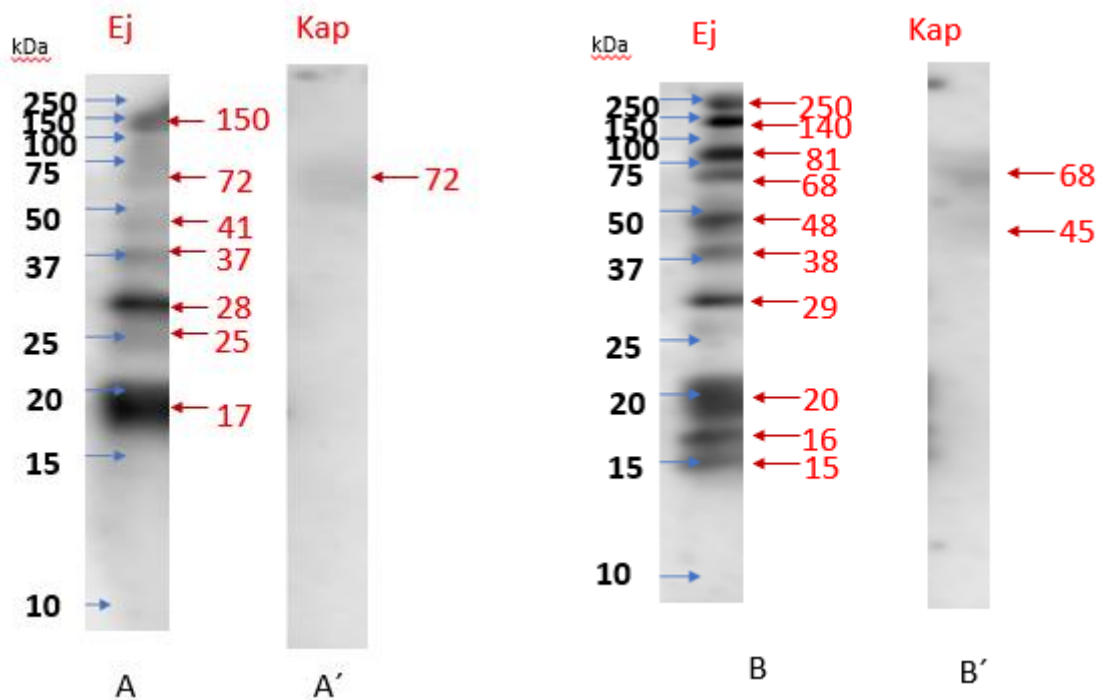
Na obrázku 8 jsou zobrazeny membrány s povrchovými proteiny ejakulovaných a kapacitovaných spermií po inkubaci s povrchovými biotinem, značenými oviduktálními buňkami v preovulační fázi (A, A') a luteální fázi (B, B'). Kontrola byla negativní a není zobrazena.

Na membráně A (obr. 8) můžeme pozorovat vazbu povrchových proteinů preovulačního oviduktu na povrchové proteiny ejakulovaných spermií. Nejsilnější vazby jsou viditelné s proteiny s mol. hm. okolo 17, 28 a 150 kDa. Slabší vazba byla zaznamenána u oviduktálních proteinů okolo 25 a 37 kDa a nejslabší vazby jsou viditelné u proteinů s velikostmi okolo 41 a 72 kDa.

Na membráně A' (obr. 8) vidíme vazbu povrchových proteinů kapacitovaných spermií pouze na protein o 72 kDa preovulačního oviduktu.

Na membráně B (obr. 8) je vidět vazba povrchových proteinů oviduktu v luteální fázi na povrchové proteiny ejakulovaných spermií. Nejsilnější vazba byla zaznamenána u proteinů o molekulových hmotnostech okolo 16, 20, 29, 81 a 140 kDa. Slabší vazba je viditelná u proteinů okolo 15, 38, 48, 68 a 250 kDa.

Na posledním membráně B' (obr. 8) pozorujeme vazbu povrchových proteinů oviduktu v luteální fázi na povrchové proteiny kapacitovaných spermií. Je viditelná slabá vazba pouze u proteinů o 45 a 68 kDa.



Obr. 8. Vazba biotinem značených povrchových proteinů oviduktálních buněk v preovulační (A, A') a luteální (B, B') fázi na povrchové proteiny ejakulovaných (A, B) a kapacitovaných (A', B') kančích spermií. Modré šipky značí molekulární hmotnost proteinů standardů v kDa. Červené šipky značí vazbu oviduktálních proteinů na proteiny spermií o značených molekulárních hmotnostech.

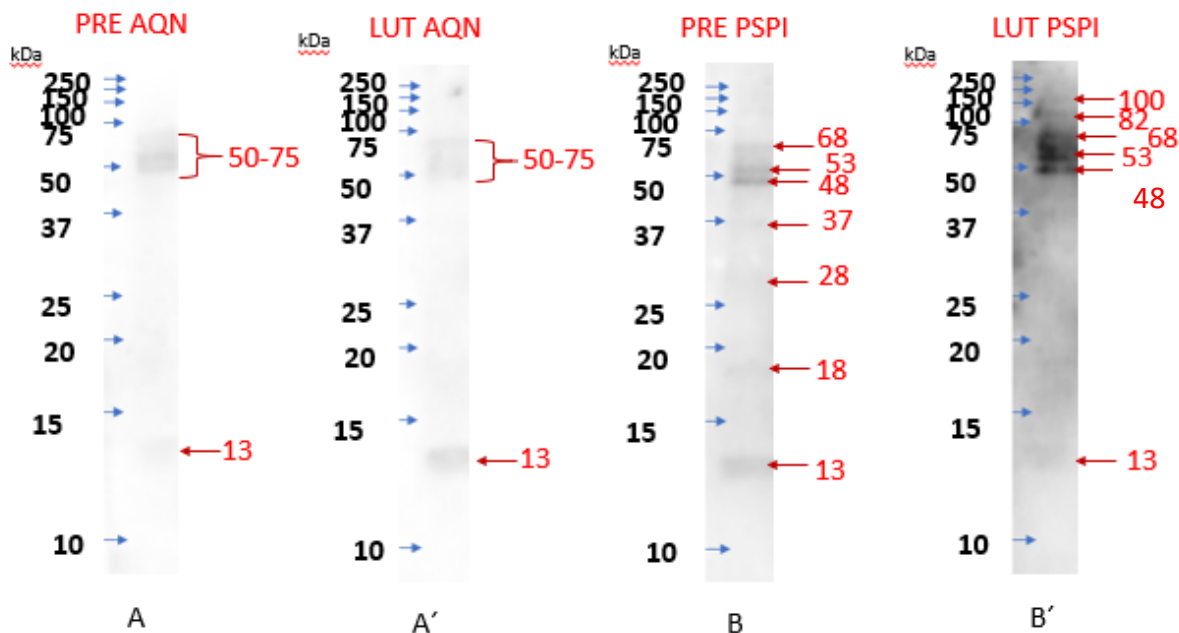
Na obrázku 9 jsou zobrazeny membrány znázorňující vazbu biotinem značených spermadhesinů AQN (A, A') PSPI (B, B'), PSPII (C, C') na povrchové proteiny oviduktálních buněk v preovulační (A, B, C) a luteální (A', B', C') fázi. Na membráně D je ukázána negativní kontrola. Následně bylo provedeno denzitometrické porovnání síly proteinů.

Na membrány A (povrchové proteiny oviduktálních buněk v preovulační fázi) a A' (povrchové proteiny oviduktálních buněk v luteální fázi) byl nanesen biotinem značený spermadhesin AQN. Na membráně A se spermadhesin vázal slabou vazbou na molekulární hmotnosti oviduktálních proteinů okolo 13, 50-75 kDa. U membrány A' byla vazba na oviduktální proteiny okolo 13 kDa silnější a 50-75 kDa slabší.

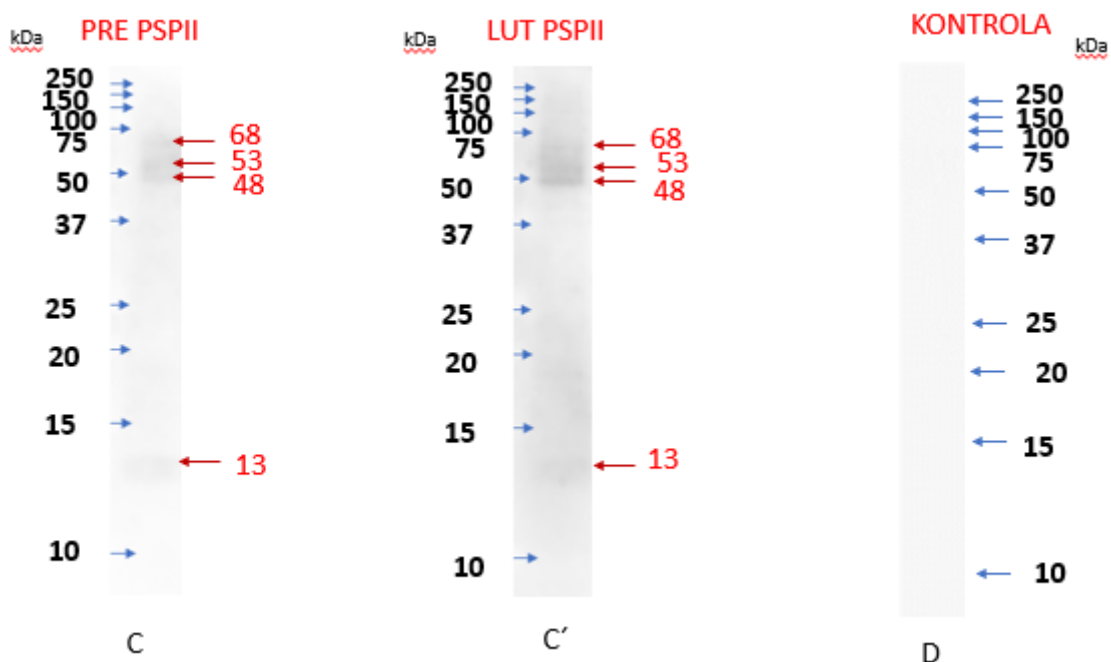
Na membrány B (povrchové proteiny oviduktálních buněk v preovulační fázi) a B' (povrchové proteiny oviduktálních buněk v luteální fázi) byl nanesen biotinem značený spermadhesin PSPI. Na membráně B se vyskytují některé vazby na proteiny oviduktu okolo 13, 48, 53 a 68 kDa a některé velice slabé u proteinů okolo 18, 37, 28 kDa. Na membráně B' byla viditelná silnější vazba proteinu PSPI na oviduktální proteiny okolo 48, 53 a 68 kDa než na oviduktální proteiny preovulační fáze. Zároveň byly objeveny i slabší vazby na proteiny okolo 13, 82 a 100 kDa.

Na membrány C (povrchové proteiny oviduktálních buněk v preovulační fázi) a C' (povrchové proteiny oviduktálních buněk v luteální fázi) byl nanesen biotinem značený spermadhesin PSPII. Na C membráně je vidět velice slabá vazba na oviduktální proteiny okolo 13, 48, 53 a 68 kDa. Zatímco na membráně C' byly zaznamenány silnější vazby na proteiny 48 a 53 kDa a slabší na 13 a 68 kDa oviduktální proteiny z luteální fáze.

Na membráně D je zobrazena negativní kontrola.



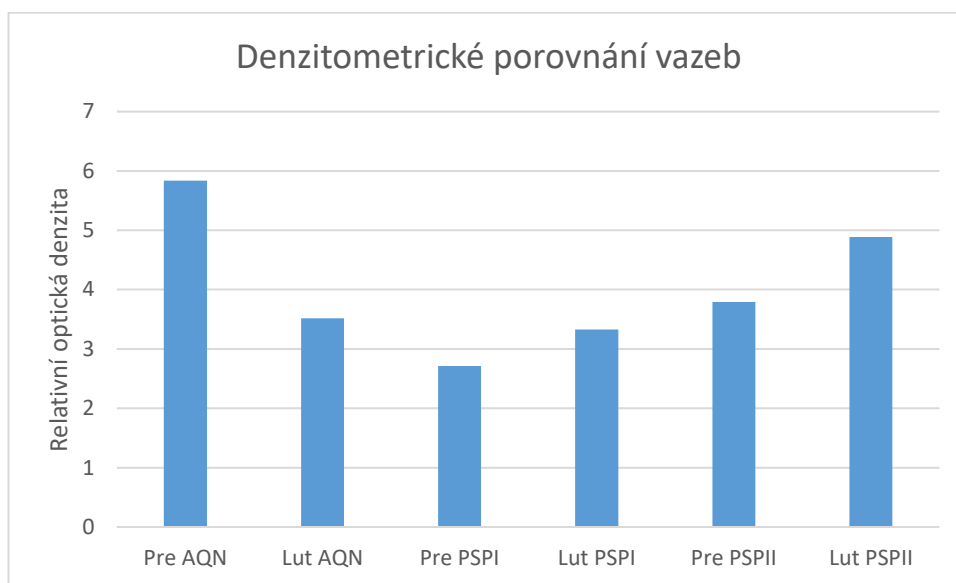
OBR. 9. Vazba biotinem značených spermadhesinů AQN (A, A'), PSPI (B, B') na povrchové proteiny oviduktálních buněk v preovulační (A, B) a luteální (A', B') fázi. Modré šipky značí molekulární hmotnost proteinů standardů v kDa. Červené šipky značí vazbu oviduktálních proteinů na proteiny spermií o značených molekulárních hmotnostech.



OBR. 9 pokračování. Vazba biotinem značených spermadhesinů PPSPII (C, C') na povrchové proteiny oviduktálních buněk v preovulační (C) a luteální (C') fázi. (D) Negativní kontrola. Modré šipky značí molekulární hmotnost proteinů standardů v kDa. Červené šipky značí vazbu oviduktálních proteinů na proteiny spermií o značených molekulárních hmotnostech.

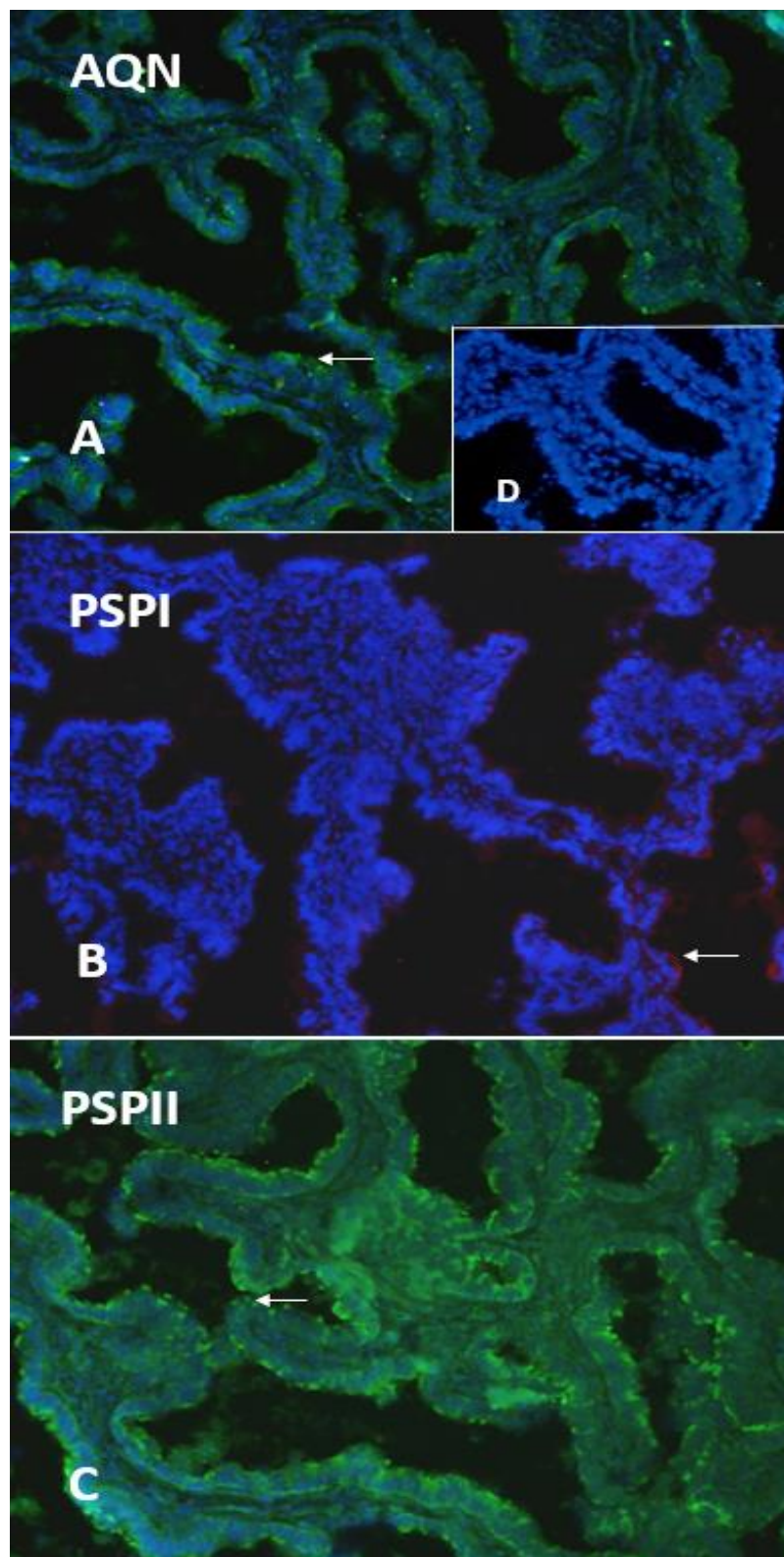
Na obrázku 10 je zobrazen graf denzitometrické zhodnocení intenzity vazeb biotinem značených spermadhesinů na buňky oviduktu (Obr. 9). Optická denzita detekce byla vztažena k celkové nanášce proteinů oviduktu ve vzorcích.

AQN spermadhesin se vázal intenzivněji k proteinů oviduktálních buněk v preovulační fázi než ve fázi luteální. Naopak PSPII protein se vázal o něco silněji k povrchovým proteinům izolovaným z buněk oviduktů v luteální fázi než ve fázi preovulační. Podobně tomu bylo i u PSPI spermadhesinu, ale rozdíl mezi silou vazby byl velmi malý.



OBR. 10. Denzitometrické hodnocení míry vazby spermadhesinů AQN, PSPI a PSPII na povrchové proteiny oviduktálních buněk v preovulační (Pre) a luteální (Lut) fázi.

Na obrázku 11 je ukázána vazba biotinem značených spermadhesinů AQN (A), PSPI (B), PSPII (C) na oviduktální epitel. Byla použita metoda nepřímé imunofluorescenční mikroskopie s použitím kryorezů získaných z nedospělé samice (kap. 4.2.8). Na obrázku 11D je zobrazena negativní kontrola bez navázaných spermadhesinů. V obrázcích jsou modře značena jádra buněk pomocí DAPI a zeleně vazba spermadhesinů. Na obrázku 11A je vidět vazba AQN spermadhesinu na apikální buňky epitelu oviduktu. Obrázek 11B ukazuje velmi slabou vazbu PSPI spermadhesinu (značeno červeně) na oviduktální epitel. Na obrázku C je viditelná silná vazba PSPII spermadhesinu (zeleně) na apikální buňky epitelu oviduktu.

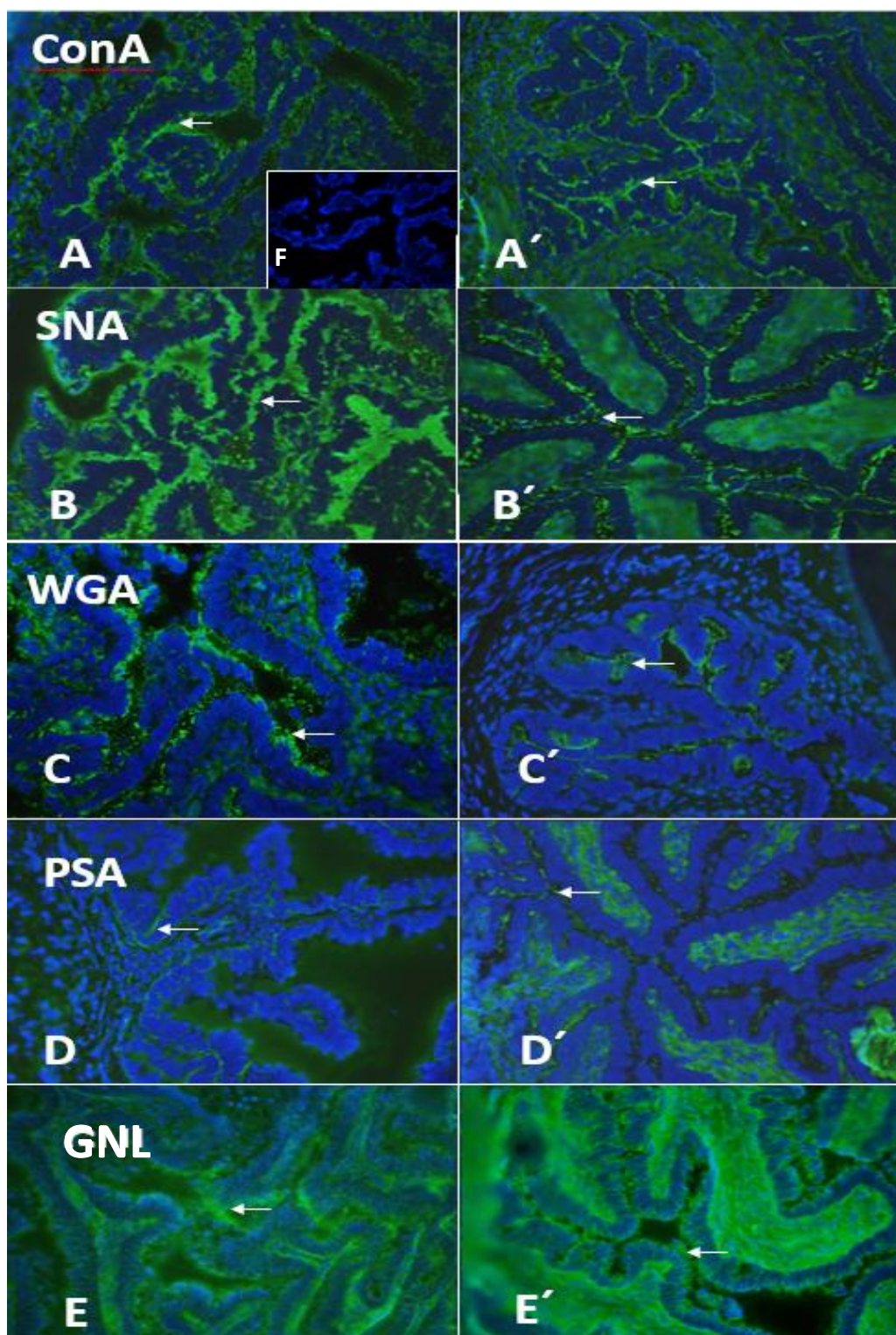


Obr. 11. Lokalizace navázaných, biotinem značených spermadhesinů na oviduktálních buňkách nedospělé samice. Šipky značí některá místa navázání. Pozitivní reakce zeleně (FITC)/červeně (Texas red), jádra buněk modře (DAPI). Zvětšení 400x.

5.2 Detekce sacharidových struktur na epiteliálních buňkách prasečího oviduktu

Na obrázku 12 je zobrazena detekce vazby vybraných biotinem značených lektinů na oviduktální buňky. Byla použita metoda nepřímé imunofluorescenční mikroskopie (kap. 4.2.8) s použitím kryorezů získaných z nedospělé (A-E) a dospělé samice (A'-E'). Byly použity biotinem značené lektiny ConA (A, A'), SNA (B, B'), WGA (C, C'), PSA (D, D'), GNL (E, E') s různou specifitou vazby sacharidových struktur. Obrázek 12F ukazuje negativní kontrolu řezu oviduktu bez inkubace s lektiny. V obrázcích jsou modře značena jádra buněk pomocí DAPI a zeleně je znázorněna vazba lektinů.

Ve vazbě lektinů na oviduktální buňky není viditelný rozdíl mezi řezy oviduktu od nedospělé (A-E) a dospělé samice (A'-E'). Všechny vybrané lektiny se na ovidukty vázaly s podobnou intenzitou. Lektiny PSA (D, D') a GNL (E, E') se vázaly spíše ke tkáni oviduktu než k apikálním buňkám epitele, jako tomu bylo u lektinů ConA (A, A'), SNA (B, B') a WGA (C, C'). Specifickou vazbu k apikálním buňkám epitelu vykazovaly především lektiny ConA (rozpoznává manosu a glukosu) a WGA (rozpoznává sialovou kyselinu a N-acetylglukosamin). Rozdíl v intenzitě vazby u oviduktálního epitelu nedospělých a dospělých prasnic byl nejvíce viditelný u lektinů SNA (rozpoznává sialovou kyselinu) a PSA (rozpoznává fukosu na N-acetylglukosaminu a manosu), kde se SNA intenzivněji vázal také k buňkám uvnitř tkáně u nedospělé prasnice a PSA u dospělé.



OBR. 12. Vazba biotinem značených lektinů ConA (A, A'), SNA (B, B'), WGA (C, C'), PSA (D, D'), GNL (E, E') na ovidukální epitel nedospělé (A-E) a dospělé (A'-E') prasnice. F - negativní kontrola bez inkubace s lektiny, pouze streptavidin-FITC. Šipky značí některá místa vazby. Pozitivní reakce zeleně (FITC), jádra buněk modře (DAPI). Zvětšení 400x.

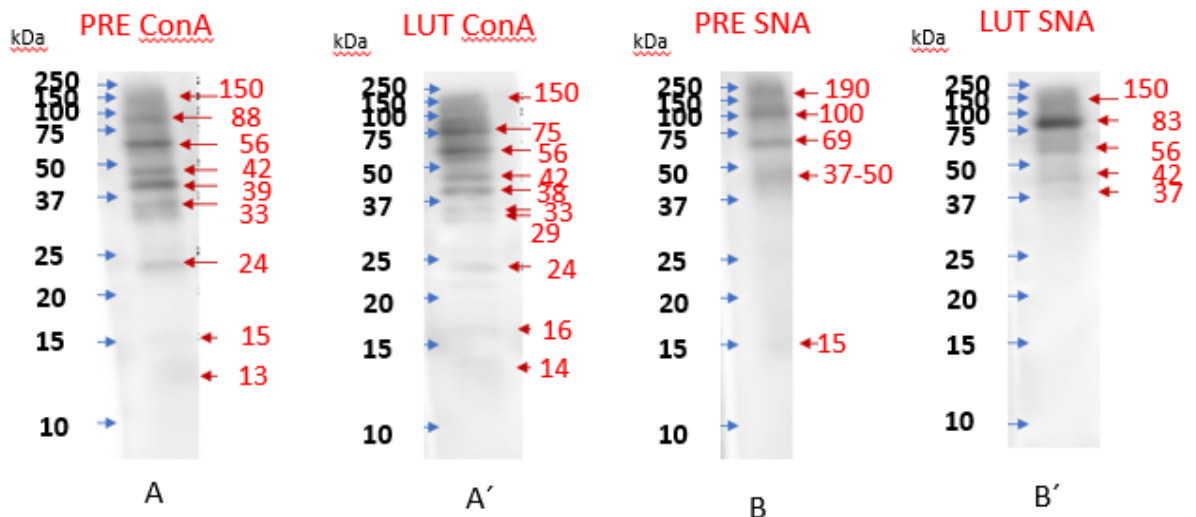
Na obrázcích 13 a 14 jsou zobrazeny membrány se separovanými povrchovými proteiny oviduktálních buněk v preovulační (A-E) a luteální (A'-E') fázi a jejich vazba s biotinem značenými lektiny ConA (A, A') SNA (B, B'), WGA (C, C'), PSA (D, D'). Membrány E a E' (obr. 15) ukazují negativní kontrolu bez inkubace s lektiny (kap. 4.2.7). Následně bylo provedeno denzitometrické porovnání síly proteinů.

Na membráně A (povrchové proteiny oviduktů v preovulační fázi) a A' (povrchové proteiny oviduktů v luteální fázi) je ukázána vazba s lektinem ConA. Tento lektin dokáže vázat mannosylové a glukosylové struktury glykoproteinů.

Na membráně A (Obr. 13) jdou dobře vidět silné vazby s glykoproteiny okolo 39 a 56 kDa. Slabší vazby se vyskytovaly u proteinů s mol. hm. okolo 24, 33, 42, 88 a 150 kDa a nejslabší vazby jsou viditelné u glykoproteinů s 13 a 15 kDa. U membrány A' můžeme vidět, že se síla vazeb se příliš nezměnila u proteinů 24, 38, 42 a 150 kDa. Nejsilnější vazby s ConA jsou viditelné u glykoproteinů okolo 56 a 75 kDa. Nejslabší vazbu s ConA vykazovaly glykoproteiny o mol. hm. 14, 16, 24, 29 a 33 kDa.

Membrány B (povrchové proteiny oviduktů v preovulační fázi) a B' (povrchové proteiny oviduktů v luteální fázi) byly inkubovány s lektinem SNA, který rozpoznává kyselinu sialovou v sacharidových řetězcích glykoproteinů.

Na membráně B (Obr. 13) jsou viditelné silné vazby s SNA u glykoproteinů okolo 69 a 100 kDa. Slabší vazby se vyskytují u glykoproteinů o mol. hm. 47 a 190 kDa a slabá vazba s SNA okolo 15 kDa. U membrány B' se však vyskytuje jedna velice silná vazba, a to u glykoproteinu s velikostí 83 kDa. Slabší vazby jsou viditelné okolo 56 a 150 kDa a slabé vazby u glykoproteinů velikosti 37 a 42 kDa.



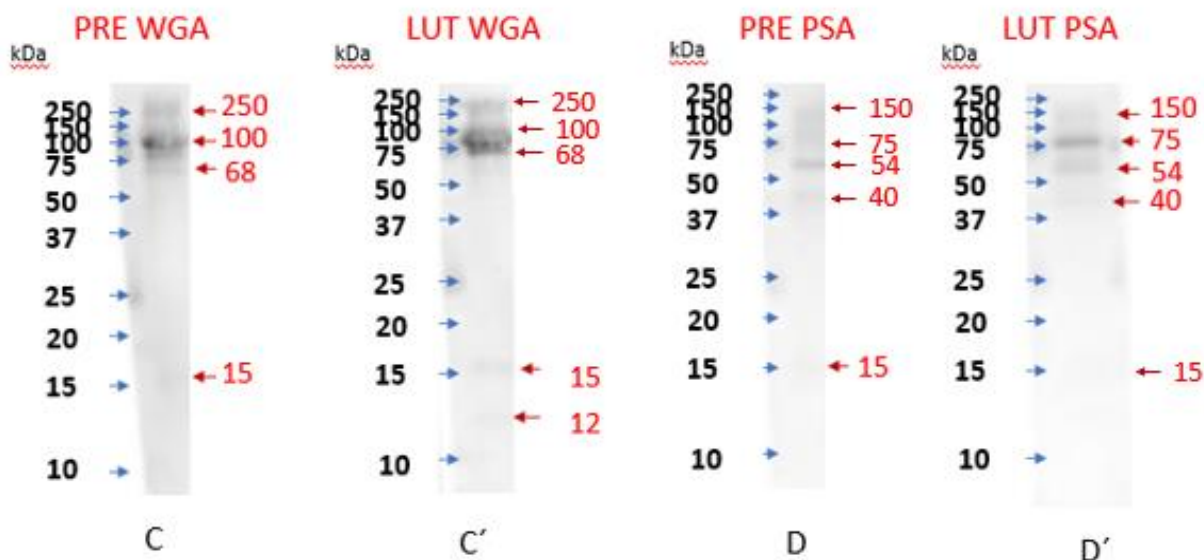
OBR. 13. Vazba biotinem značených lektinů ConA (A, A'), SNA (B, B') na povrchové proteiny oviduktálních buněk v preovulační (A, B) a luteální (A', B') fázi. Modré šipky značí molekulární hmotnost proteinů standardů v kDa. Červené šipky značí vazbu lektinu na glykoproteiny oviduktálních proteinů o určených molekulárních hmotnostech.

Membrány C (povrchové proteiny oviduktů v preovulační fázi) a C' (povrchové proteiny oviduktů v luteální fázi) byly inkubovány s lektinem WGA. Tento lektin dokáže vázat sacharidové struktury obsahující sialové kyseliny a N-acetylglukosamin.

Na membráně C (Obr. 14) je viditelná jedna silná vazba na glykoprotein okolo 100 kDa. Jsou zde viditelné slabší vazby u glykoproteinů 68 a 250 kDa a velmi slabá okolo 15 kDa. U proteinů oviduktu v luteální fázi (C') byla detekována silná vazba s WGA kolem 68 a 100 kDa, slabší pak 250 kDa a velice slabé vazby u glykoproteinů 12 a 15 kDa.

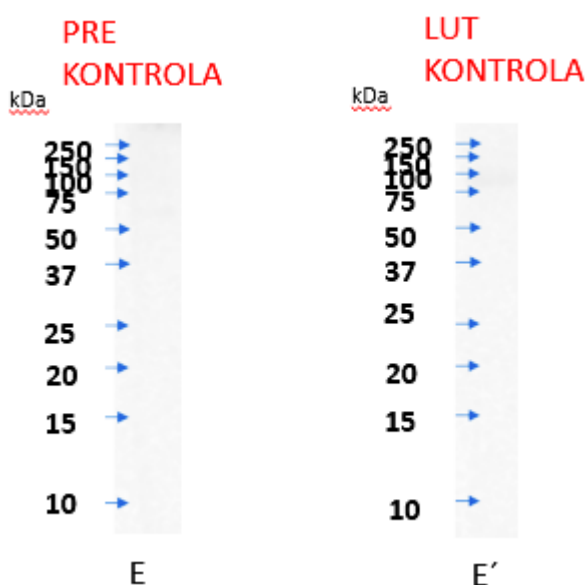
Na membrány D (povrchové proteiny oviduktů v preovulační fázi) a D' (povrchové proteiny oviduktů v luteální fázi) byly nanášeny lektiny PSA. Tento lektin dokáže vázat manosylové a fukosylové struktury v sacharidových řetězcích glykoproteinů.

Na membráně D (Obr. 14) jsou viditelné pouze velice slabé vazby s PSA u glykoproteinů okolo 15, 40, 54 (silnější) a 75 kDa. Zatímco na membráně D' je vidět jedna silnější vazba na glykoprotein okolo 75 kDa a slabé vazby u 40, 54 a 150 kDa.



OBR. 14. Vazba biotinem značených lektinů WGA (C, C'), PSA (D, D') na povrchové proteiny oviduktálních buněk v preovulační (C, D) a luteální (C', D') fázi. Modré šipky značí molekulární hmotnost proteinů standardů v kDa. Červené šipky značí vazbu lektinu na glykoproteiny oviduktálních proteinů o určených molekulárních hmotnostech.

Membrány E (povrchové proteiny preovulačních oviduktů) a E' (povrchové proteiny luteálních oviduktů) byly inkubovány bez lektinů a představují negativní kontroly (Obr. 15).



OBR. 15. Povrchové proteiny oviduktálních buněk (negativní kontrola) v preovulační (E) a luteální (E') fázi. Modré šipky značí molekulární hmotnost proteinů standardů v kDa.

6 Diskuze

Oviduktální rezervoár je potřebný pro správný průběh oplození u některých druhů zvířat. Po vstupu spermií do samičího pohlavního traktu dochází k jejich přichycení na řasnatý epitel vejcovodu. Vazba na ovidukt je zprostředkována povrchovými proteiny přítomnými na hlavičce spermie a sacharidovými složkami na povrchu epiteliálních buněk vejcovodu. Takto je udržována životnost spermií až do doby ovulace vajíčka. Následné uvolnění spermií je zapříčiněno kapacitací, jež zahrnuje několik po sobě jdoucích kroků. U různých druhů zvířat, ale i u zvířat druhově velice blízkých, byly popsány odlišné proteiny, ale i sacharidy na oviduktech, které tuto vazbu zajišťují. Z toho vyplývá, že vazba spermií k oviduktu je druhově specifická.

U prasat již bylo popsáno několik proteinů na spermiích, které zajišťují vazbu spermií k oviduktu. Hlavními kandidátními molekulami jsou spermadhesiny a pB1/DQH protein, které jsou schopny vázat sacharidy (Calvete et al. 1997; Töpfer-Petersen et al. 1998). Tyto proteiny jsou hlavními sekrečními produkty semenných vaků kance a vážou se na povrch spermií během ejakulace. Některé proteiny oviduktálních buněk, které byly popsány jako vazební partneři pro spermie, byly také již identifikovány. U prasete byl popsán SBG (sperm binding glycoprotein; Marini et al. 2003) a anexin 2 (Teijeiro et al. 2009).

V této práci jsme se nejprve zaměřili na detekci vazeb mezi proteiny spermií a povrchovými proteiny oviduktů v preovulační a luteální fázi reprodukčního cyklu. Pro sledování vazeb proteinů oviduktu a spermií byla provedena vazebná studie na NC membráně s povrchovými ejakulovanými a kapacitovanými proteiny spermií, které byly inkubovány s povrchovými proteiny oviduktů ve dvou různých fázích hormonálního cyklu samice. Při detekci vazeb na povrchové proteiny spermií byly viditelné vazby v různých molekulových hmotnostech. U kapacitovaných spermií byla zaznamenána stejně intenzivní vazba, jak u preovulačních, tak u luteálních oviduktů, a to okolo 72 kDa. Podle Ekhlasi-Hundrieser et al. (2005) se vazebná místa pro manosu, která jsou rozprostřena po celé apikální oblasti hlavičky spermie, při kapacitaci ztrácejí. Také podle Suarez (2008) ztrácí spermie po kapacitaci své povrchové vazebné proteiny. Tato tvrzení můžeme potvrdit dle této naší vazebné studie, kdy se kapacitované proteiny spermií na proteiny oviduktů již téměř nevážou. Velké rozdíly byly viditelné mezi vazbou ejakulovaných spermií na povrchové proteiny oviduktů v preovulační a luteální fázi. Proteiny, resp. glykoproteiny, izolované z preovulačních oviduktálních buněk se vázaly na proteiny spermií okolo 17 a 28 kDa, slaběji pak na proteiny okolo 150 a 37 kDa. Proteiny oviduktů v luteální fázi vykazovaly silné vazby téměř ve všech molekulárních

hmotnostech (15-250 kDa). Vazba proteinů oviduktálních buněk na proteiny spermií okolo 15 kDa může ukazovat na vazbu na spermadhesiny, jejichž velikost se pohybuje v těchto molekulových hmotnostech (Jonáková et al. 1998).

Podle barvení na proteiny nejsou na první pohled viditelné rozdíly v proteinových profilech kančích ejakulovaných a kaptovaných spermích. Naopak proteinový profil mezi proteiny povrchu oviduktů v rozdílných fázích hormonálního cyklu prasnice se poměrně liší.

Je překvapivé, že vazby na proteiny ejakulovaných spermií jsou silnější u luteálních oviduktů. Dalo by se předpokládat, že intenzita vazby ejakulovaných spermií bude větší na preovulační ovidukty, neboť spermie vyčkávají na ovulaci oocyty (Suarez 2016). To je v rozporu s našimi výsledky, kdy byly ovidukty v luteální fázi, tudíž po ovulaci, a spermie by se tak měly vázat méně a mělo by se to projevit slabší intenzitou vazby. Nicméně abychom mohli udělat z této studie jasný závěr, museli bychom izolovat povrchové proteiny z více oviduktů a pokusy zopakovat. Navíc zde mohlo hrát roli nepřesné určení hormonální fáze cyklu, ve kterém byl vaječník prasnice a s ním i ovidukt.

V semenné plazmě prasat se vyskytují PSP, AQN a AWN proteiny (spermadhesiny) a jejich glykosylované isoformy (Töpfer-Petersen et al. 1998). Tyto proteiny se vážou na povrch spermií a vykazují vysoké vazebné schopnosti k sacharidům, fosfolipidům a glykosaminoglykanům (Töpfer-Petersen et al. 1998; Jonáková et al. 2000). Následně při kapacitaci dochází ke ztrátě těchto proteinů z povrchu spermií. V naší práci jsme testovali míru vazby spermadhesinů AQN 1, PSP I a PSP II na povrchové proteiny oviduktů. Již dříve bylo popsáno, že právě AQN 1 spermadhesin je zodpovědný za vazbu spermie k oviduktu (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005). PSP proteiny pak vykazují vysokou afinitu k manosovým strukturám (Solís et al. 1998). Jak z experimentu na NC membráně na separovaných proteinech oviduktu, tak na kryořezech, byla viditelná velmi slabá vazba PSP I proteinu. To podporuje i studie Jonáková et al. (2000), kdy bylo zjištěno, že se AQN 1 a PSP II proteiny spermií váží s molekulami přítomnými v oviduktální tekutině, převážně pak PSP II, který se dokáže vázat s některými kyselými polysacharidy. Zatímco PSP I vykazovalo jen malou schopnost vazby s těmito látkami (Jonáková et al. 2000). Silnější vazba PSPII spermadhesinu na oviduktální proteiny v luteální fázi je překvapující, ale opět nemůžeme z těchto našich předběžných výsledků udělat definitivní závěry, proto bude potřeba experimenty ještě několikrát zopakovat.

Všechny vybrané spermadhesiny se váží převážně na proteiny o molekulových hmotnostech mezi 50 a 75 kDa. Jako vazebný partner pro AQN 1 protein byl již dříve nalezen anexin 2 v oviduktu prasnice o velikosti 37 kDa (Teijeiro et al. 2009) a SBG o velikosti 220 kDa

(Marini & Cabada 2003). V naší vazebné studii se však vazba AQN 1 proteinu na proteiny o této molekulové hmotnosti neprokázala.

Ekhlesi-Hundrieser et al. (2005) připouští možnost vazby AQN1 s manosovými a galaktosovými strukturami. Toto tvrzení jsme ověřili pomocí vazby vybraných lektinů na oviduktální epitel.

Přítomnost určitých sacharidových struktur na oviduktech v preovulační a luteální fázi reprodukčního cyklu prokázala vazba s vybranými lektiny. Vybrané lektiny rozpoznávaly proteiny izolované z povrchu apikálních buněk oviduktů a s podobnou intenzitou se také vázaly k buňkám oviduktu na kryorezech. Na řezech se v některých případech zdála vazba lektinu ne příliš specifická v oblasti povrchu apikálních buněk. Na kryorezech nebyl viditelný rozdíl mezi vazbou lektinů na oviduktální buňky získaných z nedospělé a dospělé prasnice, což ukazuje na to, že se sacharidové struktury příliš nemění během dospívání. Toto zjištění bylo podpořeno srovnáním vazby lektinů na povrchové buňky epitelu oviduktu prasnic v rozdílných fázích hormonálního cyklu, kdy bylo viditelné, že se u detekovaných struktur celková intenzita vazby lektinů nelišila. Lišily se především velikosti detekovaných proteinů/glykoproteinů oviduktů v těchto dvou fázích.

U vazby s ConA, který dokáže vázat mannosylové a glukosylové struktury, byl nepatrný posun v molekulových hmotnostech glykoproteinů mezi preovulačními a luteálními ovidukty. Tyto změny by mohly být způsobeny aktivní glykosylací, či naopak glykosidickou aktivitou enzymů přítomných v oviduktální tekutině během cyklu (Carrasco et al. 2008). SNA lektin rozpoznávající kyselinu sialovou vykazoval viditelný rozdíl ve vazbě pouze v jednom glykoproteinu z oviduktu v luteální fázi o 83 kDa, na který se vázal velmi silně. WGA lektin dokáže vázat struktury N-acetylglukosaminové na oviduktech a byl zde vidět opět posun k nižším molekulovým hmotnostem u detekovaných glykoproteinů v luteální fázi. PSA lektin dokáže vázat mannosylové struktury, ale také fukosylové zbytky na oviduktech. Tato vazba byla překvapivě jak na proteinech přenesených na membráně, tak na řezech nejslabší, i když PSA váže mannosylové struktury podobně jako ConA. Pro detekci mannosových struktur na povrchu oviduktálního epitelu bylo použito i lektinu GNL na kryorezech. Vazba s tímto lektinem byla již dříve popsána v práci Ekhlesi-Hundrieser et al. (2005) se stejným výsledkem.

Wagner et al. (2002) našli na oviduktech prasat dva typy glykanů s vysokým obsahem manos. Podobně Green et al. (2001) popsal, že je u prasat spojení spermií a vejcovodu vytvořeno na základě vysoké afinity spermií k vazebným místům obsahujícím sialomanosu a hybridní typy N-glykanů. Tyto poznatky byly v našich experimentech potvrzeny, neboť jak lektiny vázající manosové, tak lektiny rozpoznávající kyselinu sialovou interagovaly

s prasečími ovidukty a izolovanými povrchovými glykoproteiny. Změny v sacharidových řetězcích na epitelu oviduktu prasat během cyklu mohou být způsobeny výskytem glykosidáz v oviduktální tekutině (Carrasco et al. 2008). Zvýšená aktivita manosidázy v oviduktu těsně ořed ovulací by mohla přispět k remodelaci oviduktálního epitelu a následnému uvolnění spermií z oviduktálního rezervoáru.

Pro potvrzení přítomnosti kyseliny sialové na povrchu oviduktálních buněk byl využit lektin SNA. Wagner et al. 2002 popsali, že při inkubaci fetuinu s explantáty oviduktálních epitelů nedochází k blokaci vazných míst. Což může dokazovat to, že na oviduktech je již přítomná sialová kyselina a nemůže tak dojít k dalšímu navázání. V novějších studiích pak bylo zjištěno, že určité sialované struktury sacharidů by mohly hrát roli ve vazbě spermií na oviduktální epitel u prasat (Kadirvel et al. 2012).

V této práci jsme se zaměřili pouze na vybrané proteiny a detekci určitých sacharidových struktur na buňkách epitelu oviduktu prasnice. Do budoucna by bylo dobré se zaměřit také na detekci galaktosových struktur, na které se také váže AQN1 spermadhesin (Teijeiro et al. 2008) nebo na další povrchové proteiny spermií schopné vazby k oviduktu jako je tomu v případě DQH proteinu (Maňásková et al. 2007), protože jeho vazebný partner na oviduktu nebyl doposud studován.

Tato práce představuje předběžnou studii detekce vazby povrchových proteinů spermií před a po kapacitaci na povrchové proteiny apikálních buněk oviduktu v různých fázích hormonálního cyklu samice. Především proteiny/glykoproteiny, které jsou přítomny na povrchu oviduktálního epitelu a vážou spermie, nebyly dosud zcela prozkoumány. Proto je také nutné detekované molekuly účastníci se vazeb mezi spermiemi a ovidukty identifikovat. Z důvodu časové náročnosti izolace povrchových buněk, jak spermií, tak epitelů oviduktu, nebyl žádný z experimentů dostatečně zopakován. Nebylo také možné provést statistické vyhodnocení, protože nebylo získáno patřičné množství experimentálních dat.

7 Závěr

Byly provedeny vazebné studie proteinů na NC membráně s povrchovými proteiny ejakulovaných a kapacitovaných spermií, povrchovými proteiny z vnitřního epitelu vejcovodů, spermadhesiny (AQN, PSPI, PSPII) a lektiny (ConA, SNA, WGA, PSA).

Vazby povrchových proteinů oviduktů v preovulační a luteální fázi na povrchové proteiny ejakulovaných a kapacitovaných spermií ukázaly, že se na proteiny oviduktů vážou proteiny ejakulovaných spermií s daleko větší intenzitou, než proteiny kapacitovaných spermií. Byly zjištěny také rozdíly mezi vazbou povrchových proteinů ejakulovaných spermií na proteiny oviduktů v preovulační a luteální fázi, kdy se vyskytovaly silné vazby s proteiny okolo 17, 28 a 150 kDa, přičemž v případě luteálních oviduktů byla detekována vazba s proteiny okolo 16, 20, 29, 81 a 250 kDa.

Byla testována vazba vybraných proteinů vyskytujících se na povrchu spermií AQN, PSPI a PSPII spermadhesinů s povrchovými proteiny oviduktů. Studie ukázala vazbu spermadhesinů především na oviduktální proteiny o velikosti 13, 48, 53 a 68 kDa. Intenzita vazby byla rozdílná, kdy se nejvíce vázal AQN protein na proteiny preovulačních oviduktů a PSPII na proteiny oviduktu v luteální fázi. Vazba spermadhesinů na oviduktální epitel byla testována také na kryorezech oviduktu z nedospělé prasnice, kde byla zjištěna velmi slabá vazba PSPI, silnější proteinu AQN a nejsilněji se vázal PSPII protein.

Pomocí vybraných lektinů (ConA, SNA, PSA, WGA, GLN) byly sledovány sacharidové struktury na povrchu oviduktálních buněk na kryorezech. Specificky se k povrchovým buňkám vázal především lektin ConA a WGA. Vazebná studie s lektiny na NC membráně ukázala největší rozdíl ve vazbě lektinu SNA a PSA na povrchové proteiny apikálních buněk epitelu oviduktu v odlišných fázích hormonálního cyklu. Navíc byly detekovány různé sacharidové struktury v glykoproteinech buněk oviduktu odlišných velikostí, u kterých byla zaznamenána změna v rámci hormonálního stádia.

Hypotéza, že vazba kančích spermií na oviduktální epitel se bude lišit v závislosti na hormonálním cyklu samice a kapacitačním stavu spermií, byla námi potvrzena. Nicméně tato práce je předběžnou studií a do budoucna je nutné získat mnohem více experimentálních dat pro jasnou identifikaci molekul, které se přímo účastní tvorby oviduktálního rezervoáru u prasat.

8 Seznam literatury

- Bedford JM, Mock OB, Nagdas SK, Winfrey VP, Olson GE. 1999. Reproductive features of the eastern mole (*Scalopus aquaticus*) and star-nose mole (*Condylura cristata*). *J Reprod Fertil.* 117: 345-53.
- Brüssow KP, Rátky J, Rodriguez-Martinez H. 2008. Fertilization and early embryonic development in the porcine fallopian tube. *Reprod Domest Anim.* 43(Suppl 2):245–51.
- Buhi WC. 2002. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen dependent glycoprotein. *Reproduction* 123:355–362.
- 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 Lett.* 407(2):201–206.
- Carrasco LC, Romar R, Aviles M, Gadea J, Coy P. 2008. Determination of glycosidase activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle. *Reproduction.* 136:833-842.
- Carrasco LC, Coy P, Avilés M, Gadea J, Romar R. 2008b. Glycosidase determination in bovine oviductal fluid at the follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development.* 20:808-817.
- Coy P, García-Vázquez FA, Visconti PE, Avilés M. 2012. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction.* 144: 649-660.
- Dacheux J-L, Castella S, Gatti JL, Dacheux F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology.* 63: 319-341.
- Dacheux J-L, Dacheux F. 2014. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction.* 147(2):27-42.
- Dacheux J-L, Druart X, Fouchecourt S, Syntin P, Gatti J-L, Okamura N, Dacheux F. 1998. Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation with particular reference to the boar. *Journal of Reproduction and Fertility.* 53:99-107.
- De Jonge CHJ, Barratt CH. 2006. *The Sperm Cell.* New York. Cambridge University Press.
- DeMott RP, Lefebvre R, Suarez SS. 1995. Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod.* 52:1395-1403.
- Dobrinski I, Igotz GG, Thomas PGA, Ball BA. 1996. Role of carbohydrates in the attachment of equine spermatozoa to uterine tubal (oviductal) epithelial cells in vitro. *Am J Vet Res.* 57:1635-1639.
- Dráb T, Ren Š, Maňásková-Postlerová P, Tichá M, Jonáková V, Liberda J. 2017. Glycosidases in porcine follicular fluid and their effect on zona pellucida-AWN 1 spermadhesin interaction. *Theriogenology.* 100:80-87.

- Ekhlasi-Hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsoлова M, Petrunkina A, Toöper-Petersen E. 2005. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biol Reprod.* 73(3):536–545.
- Elliott RM, Lloyd RE, Fazeli A, Sostaric E, Georgiou AS, Satake N. 2009. Effects of HSPA8, an evolutionarily conserved oviductal protein, on boar and bull spermatozoa. *Reproduction.* 137(2):191–203.
- Fazeli A, Elliott RM, Duncan AE, Moore A, Watson PF, Holt WV. 2003. In vitro maintenance of boar sperm viability by a soluble fraction obtained from oviductal apical plasma membrane preparations. *Reproduction.* 125(4):509–517.
- Georgiou AS, Snijders AP, Sostaric E, Aflatoonian R, Vazquez JL, Vazquez JM. 2007. Modulation of the oviductal environment by gametes. *J Proteome Res.* 6(12):4656–66
- Ghersevich S, Estefanía M, Zumoffen C. 2015. Oviductal secretion and gamete interaction. *Reproduction.* 149:1470-1626.
- Green CE, Bredl J, Holt WV, Watson PF, Fazeli A. 2001. Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro. *Reproduction.* 122(2):305–15.
- Gualtieri R, Talevi R. 2000. In Vitro-Cultured Bovine Oviductal Cells Bind Acrosome-Intact Sperm and Retain This Ability upon Sperm Release. *Biology of Reproduction.* 62:1754 1762.
- Guyonnet B, Dacheux F, Dacheux J-L, Gatti J-L. 2011. The Epididymal Transcriptome and Proteome Provide Some Insights Into New Epididymal Regulations. *Journal of Andrology.* 32(6):651-664.
- Gwathmey TM, Ignatz GG, Suarez SS. 2003. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biology of Reproduction* 69: 809–815.
- Hung PH, Suarez SS. 2010. Regulation of sperm storage and movement in the ruminant oviduct. *Reproduction in Domestic Ruminants* 7:255–264.
- Hunter RH. 2008. Sperm release from oviduct epithelial binding is controlled hormonally by peri-ovulatory graafian follicles. *Mol Reprod Dev.* 75(1):167–74.
- Ignatz GG, Cho MY, Suarez SS. 2007. Annexins Are Candidate Oviductal Receptors for Bovine Sperm Surface Proteins and Thus May Serve to Hold Bovine Sperm in the Oviductal Reservoir. *Biology of reproduction.* 77 (6):906-913.
- Jonáková V, Maňásková P, Kraus M, Liberda J, Tichá M. 2000. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Molecular Reproduction and Development.* 56(S2):275-277.
- Jonáková V, Kraus M, Veselský L, Čechová 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. *Reproduction*. 114(1):25-34.
- Kadirvel G, Machado SA, Korneli C, Collins E, Miller P, Bess KN, Aoki K, Tiemeyer M, Bovin N, Miller DJ. 2012. Porcine sperm bind to specific 6-sialylated biantennary glycans to form the oviduct reservoir. *Biol Reprod* 87:147.
- Knobil E, Neill JD. 2006. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. USA: Gulf Professional Publishing.
- Knox R. 2001. Improving reproductive efficiency of the breeding herd. *Artificial insemination of swine*. 1-16.
- Lefebvre R, DeMott RP, Suarez SS, Samper JC. 1995. Specific inhibition of equine sperm binding to oviductal epithelium. *Biology of reproduction*. 52(1): 689-696.
- Lefebvre R, Lo MC, Suarez SS. 1997. Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biol Reprod*. 56:1198-1204.
- Liberda J, Maňásková P, Prelovská L, Tichá M, Jonáková V. 2006. Saccharide mediated interactions of boar sperm surface proteins with components of the porcine oviduct. *Journal of Reproductive Immunology*. 71(2):112-125.
- Machado SA, Kadirvel G, Daigneault BW, Korneli C, Miller P, Bovin N, Miller DJ. 2014. Lewis^x-Containing Glycans on the Porcine Oviductal Epithelium Contribute to Formation of the Sperm Reservoir. *Biology of reproduction*. 91(6): 1-9.
- Maňásková P, Peknicová J, Elzeinová F, Tichá M, Jonáková V. 2007. Origin, localization and binding abilities of boar DQH sperm surface protein tested by specific monoclonal antibodies. *J Reprod Immunol*. 74:103–13.
- Marini PE, Cabada MO. 2003 One step purification and biochemical characterization of a spermatozoa-binding protein from porcine oviductal epithelial cells. *Mol Reprod Dev*. 66(4):383–90.
- Métayer S, Dacheux F, Dacheux JL, Gatti JL. 2002. Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. *Biol Reprod*. 66(5):1219-29.
- Okamura N, Tamba M, Liao HJ, Onoe S, Sugita Y, Dacheux F, Dacheux J-L. 1995. Cloning of complementary DNA encoding a 135-kilodalton protein secreted from porcine corpus epididymis and its identification as an epididymis-specific alpha-mannosidase. *Molecular Reproduction and Development*. 42:141-148.
- Reece WO. 1998. *Fyziologie domácích zvířat*. Praha: Grada.
- Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ. 2011. Seminal Plasma Proteins: What Role Do They Play?. *American Journal of Reproductive Immunology*. 66(1):11-22.

- Silva E, Frost D, Li L, Bovin N, Miller DJ. 2016. Lactahedrin is a candidate oviduct Lewis X trisaccharide receptor on porcine spermatozoa. *Andrology*. 5(3):1-9.
- Smith TT, Yanagimachi R. 1991. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fertil*. 91:567-573.
- Solís D, Romero A, Jiménez M, Díaz-Mauriño T, Calvete TT. 1998. Binding of mannose-6-phosphate and heparin by boar seminal plasma PSP-II, a member of the spermadhesin protein family. *FEBS Lett*. 431(2):273-8.
- Song C, Gao B, Wu H, Wang X, Chen G, Mao J. 2010. Spatial and temporal expression of spermadhesin genes in reproductive tracts of male and female pigs and ejaculated sperm. *Theriogenology*. 73:551–559.
- Stival C, Puga Molina L. del C, Paudel B, Buffone M. G, Visconti P. E, Krapf D. 2016. Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. 220:93–106.
- Suarez SS. 1987. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ. *Biol Reprod*. 36:203-10.
- Suarez SS, Brockman K, Lefebvre R. 1997. Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod*. 56:447-53.
- Suarez SS. 1998. The Oviductal Sperm Reservoir in Mammals: Mechanism of Formation. *Biology of Reproduction*. 58:1105-1107.
- Suarez SS. 2001. Carbohydrate-Mediated Formation of the Oviductal Sperm Reservoir in Mammals. *Cells Tissues Organs*. 168:105-112.
- Suarez SS. 2006. Gamete and zygote transport. In *The Physiology of Reproduction*, 3rd edn, Raven Press. Eds E Knobil & JD Neill. New York, NY: Raven Press.
- Suarez SS. 2008. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int. J. Dev. Biol*. 52: 455-462.
- Suarez SS. 2016. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell Tissue Res*. 363:185-194.
- Talevi R, Gualtieri R. 2010. Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology*. 73: 796-801.
- Teijeiro JM, Cabada MO, Marini PE. 2008. Sperm binding glycoprotein (SBG) produces calcium and bicarbonate dependent alteration of acrosome morphology and protein tyrosine phosphorylation on boar sperm. *J Cell Biochem*. 103(5): 1413–23.
- Teijeiro JM, Ignatz GG, Marini PE. 2009. Annexin A2 is involved in pig (*Sus scrofa*) sperm oviduct interaction. *Mol Reprod Dev*. 76(4):334–41.

Teijeiro JM, Roldán ML, Marini PE. 2015. Annexin A2 and S100A10 in the mammalian oviduct. *Cell Tissue Res.* 363(2):1-12.

Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostàlovà Z, Sanz L, Calvete JJ. 1998. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia.* 30(4-5):217-224.

Töpfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Tsoolova M. 2008. Glycobiology of fertilization in the pig. *The International journal of developmental biology.* 52: 717-736.

Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostàlovà Z, Sanz L, Calvete JJ. 2009. Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia.* 30(4-5):217-224.

Wagner A, Ekhlesi-Hundrieser M, Hettel Ch, Petrunkina A, Waberski D, Nimtz M, Topfer Petersen E. 2002. Carbohydrate-Based Interactions of Oviductal Sperm Reservoir Formation Studies in the Pig. *Molecular reproduction and development.* 61:249-257.

Wang L, Yuan Q, Chen S, Cai H, Lu M, Liu Y, Xu Ch. 2012. Antimicrobial Activity and Molecular Mechanism of the CRES Protein. *PLOS ONE.* 7(11):1-8.

Weiss WI. 1994. Recognition of cell surface carbohydrates by C-type animal lectins. In: Metcalf BW, Dalton BJ, Poste G (eds.), *Cellular Adhesion.* New York. New York: Plenum Press.

Yamaguchi Y, Ouchi Y. 2012. Antimicrobial peptide defensin: identification of novel isoforms and the characterization of their physiological roles and their significance in the pathogenesis of diseases. 88(4):152-166.

Yurewicz EC, Matsuura F, Moghissi KS, 1982. Structural characterization of neutral oligosaccharides of human midcycle cervical mucin. *J Biol Chem.* 257 (5):2314-22.