

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Detekce vybraných markerů motility u spermií hřebců**

**Diplomová práce**

**Bc. Eliška Kotousová**

**Reprodukční biotechnologie**

**RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.**

© 2024 ČZU v Praze



## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci Detekce vybraných markerů motility u spermií hřebců 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 21. dubna 2024

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za vedení, podporu a trpělivost během mé diplomové práce. Vaše podpora mi dodávala sílu v těžších chvílích během laboratorní práce. Také bych ráda poděkovala Ing. Ondřeji Šimoníkovi, Ph.D. za pomoc s vyhodnocením CASA daty. Velké poděkování patří mé rodině a blízkým, kteří mě po celou dobu studia velmi podporovali a vždy ve mě věřili.

# Detekce vybraných markerů motility u spermií hřebců

## Souhrn

Diplomová práce je zaměřena na hodnocení potenciaální plodnosti u plemenných hřebců prostřednictvím proteomických přístupů, identifikující klíčové proteiny spojené s reprodukci, které mohou sloužit jako potenciaální markery plodnosti. Práce se zabývala studiem a porovnáním vybraných molekulových markerů u tří hřebců s ohledem na motilitu spermií. Důraz byl kladen především na hřebce 2 a hřebce 3, kteří byli opakovaně odebíráni v jednom období. Cílem bylo posoudit hladiny fosforylovaných proteinů a množství proteinu kotvícího proteinkinázu A (AKAP4), který je považován za marker plodnosti. Kromě toho byla provedena lokalizace a detekce sialových kyselin v glykoproteinech spermií jako terminálních sacharidů glykanů přítomných v glykokalyx spermií. Naše výsledky ukázaly přítomnost proteinu AKAP4 v hlavní části bičíku spermie u analyzovaných hřebců. Jeho množství ve spermiích mezi hřebci nebylo prokázáno jako statisticky významné. Lokalizace fosforylovaných proteinů na tyrosinu ukázala bodový signál v postakrozomální oblasti hlavičky spermie. Kromě toho byly detekovány dva fosfoproteiny o molekulové hmotnosti 37 kDa a 34 kDa, přičemž byla pozorována kolísavá míra fosforylace během sezón. Bylo zjištěno, že míra fosforylace proteinů se s prodlužující se dobou od prvního odběru v reprodukční sezóně snižuje. V případě fosfoproteinu o molekulové hmotnosti 37 kDa byla navíc zaznamenána rozdílná míra fosforylace mezi hřebcem 2 a 3. Vizualizace vazby sialových kyselin v glykoproteinech hřebčích spermií pomocí biotinylovaných lektinů WGA, MAL II a SNA odhalila rozdílné glykosylační vzory. Následně statistické analýzy denzitometrických dat zdůraznily významné rozdíly v sialylaci mezi hřebci. Dále bylo provedeno vyhodnocení celkové a progresivní motility, přičemž byl zaznamenán signifikantní rozdíl v motilitě mezi hřebci 1 a 2. Vzhledem k omezenému počtu odběrů u hřebce 1 nebylo možné proteomická data vyhodnotit. Přesto naše výsledky naznačují, že by změny v množství a modifikacích vybraných proteinů mohly do jisté míry v případě získání více experimentálních dat korelovat s motilitou spermií, a tím i s fertilizační schopností spermií hřebců. Nicméně nám nebyl umožněn odběr hřebčího spermatu v reprodukční sezóně a nebyla nám poskytnuta přesná data o fertilizační historii hřebců.

**Klíčová slova:** AKAP4, sialoproteiny, fosforylace, Western blot

# Detection of selected motility markers in stallion spermatozoa

## Summary

The thesis focuses on evaluating the potential fertility in breeding stallions through proteomic approaches, identifying key proteins associated with reproduction that could serve as potential fertility markers. The thesis involved the examination and comparison of selected molecular markers in three stallions with regard to sperm motility. Emphasis was mainly focused on stallion 2 and 3, sampled repeatedly during one season. The aim was to assess the levels of phosphorylated proteins and the quantity of protein anchoring protein kinase A (AKAP4), considered a fertility marker. Additionally the localization and detection of sialic acids in sperm glycoproteins as terminal carbohydrate residues present in the sperm glycocalyx were conducted. Our results revealed the presence of AKAP4 protein in the main part of sperm flagella in the analyzed stallions. However its quantity in sperm was not statistically significant among the stallions. Localization of tyrosine phosphorylated proteins showed a punctate signal in the post-acrosomal region of the sperm head. Moreover two phosphoproteins with molecular weights of 37 kDa and 34 kDa were detected, with fluctuating phosphorylation levels during the season. It was found that the phosphorylation rate of proteins decreased with the increasing time from the first sampling in the reproductive season. Additionally differential phosphorylation levels between stallion 2 and stallion 3 were observed for the 37 kDa phosphoprotein. Visualization of sialic acid binding in stallion sperm glycoproteins using biotinylated lectins WGA, MAL II and SNA revealed distinct glycosylation patterns. Subsequent statistical analyses of densitometric data emphasized significant differences in sialylation among the stallions. Furthermore an evaluation of total and progressive motility showed a significant difference in motility between stallion 1 and stallion 2. Due to the limited number of samples from stallion 1, it was not possible to evaluate the proteomic data. Nonetheless our results suggest that changes in the quantity and modifications of selected proteins could, to some extent, correlate with sperm motility and thus the fertilization capability of stallion sperm if more experimental data were obtained. However we were not able to collect stallion sperm during the reproductive season and precise data on stallion's fertilization history were not provided to us.

**Keywords:** AKAP4, sialoproteins, phosphorylation, Western blotting

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	8
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b>	9
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	10
<b>3.1</b>	<b>Stavba hřebčí spermie</b>	10
<b>3.2</b>	<b>Faktory ovlivňující fertilitu hřebců</b>	13
3.2.1	Plazmatická membrána spermií a reaktivní formy kyslíku (ROS)	13
3.2.2	Glykokalyx spermií a role kyseliny sialové	13
<b>3.3</b>	<b>Molekulární procesy spojené s fertilitou hřebců</b>	15
3.3.1	Proteiny spermií a semenné plazmy hřebců	15
3.3.2	Hormonální vlivy podílející se na plodnosti hřebců	18
<b>3.4</b>	<b>Motilita hřebčích spermií a energetický metabolismus</b>	20
3.4.1	Hodnocení motility pomocí systému CASA	22
3.4.2	Kapacitace <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i>	23
3.4.3	PKA a tyrosinová fosforylace proteinů spermií	25
<b>4</b>	<b>Metodika</b>	30
<b>4.1</b>	<b>Biologický materiál pro analýzu</b>	30
<b>4.2</b>	<b>Hodnocení motility spermií pomocí systému CASA</b>	30
4.2.1	Příprava vzorků a využití Computer Assisted Sperm Analysis	30
<b>4.3</b>	<b>Fluorescenční mikroskopie</b>	31
4.3.1	Příprava mikroskopických preparátů	31
<b>4.4</b>	<b>Western blot detekce</b>	32
4.4.1	Příprava vzorků	32
4.4.2	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	33
4.4.3	Elektropřenos proteinů	33
4.4.4	Detekce proteinů a sialových kyselin	34
4.4.5	Analýza dat	34
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	35
<b>5.1</b>	<b>Lokalizace a detekce AKAP4 v hřebčích spermiích</b>	35
<b>5.2</b>	<b>Detekce a lokalizace fosforylovaných proteinů značených protilátkou 4G10</b>	37
<b>5.3</b>	<b>Lokalizace sialové kyseliny v glykanech spermií</b>	39
5.3.1	Detekce sialových kyselin v hřebčích spermiích	40
<b>5.4</b>	<b>Hodnocení motility pomocí systému CASA</b>	48
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	49
6.1	Fosforylace proteinů a exprese AKAP4 v hřebčích spermiích	49

6.2	Detekce sialovaných proteinů.....	52
7	<b>Závěr</b> .....	54
8	<b>Seznam literatury</b> .....	56



## 1 Úvod

Tato diplomová práce se zabývá tématem hodnocení plodnosti u plemenných hřebců. Plodnost je velmi důležitým znakem plemenných hřebců, ale je obtížné ji studovat, protože se jedná o komplexní parametr, který je ovlivněn změnami v prostředí, zdravotním stavu a výživě. U samců ji lze definovat jako schopnost samce produkovat sperma, které vede k úspěšné graviditě samice. Z tohoto důvodu bylo v posledních desetiletích provedeno několik studií zaměřených na hledání potenciálních markerů plodnosti hřebců. Výzkum se obecně zaměřuje na identifikaci markerů buď na proteomické nebo genomické úrovni. V současné době je známo více než 200 genů, které se podílejí na tvorbě fertálních spermií. Četné studie u lidí a myši odhalily velké množství proteinů, které se podílejí na mechanismech samčí reprodukce.

Proteiny ve spermii hrají klíčovou roli v procesech vedoucích k oplození. Jsou zodpovědné za různé funkce, včetně strukturální, signální a vazebné aktivity. Během maturace dochází ve spermii k důležitým změnám, které jsou klíčové pro její schopnost oplození. Významnou roli v procesech maturace hraje proteinové vybavení spermie včetně jejich post-translačních modifikací, které mohou odrážet maturační stav spermie. Míra fosforylace, sialylace a hladina proteinu kotvící proteinkinázy A (AKAP) představují klíčové markery, které mohou ovlivňovat motilitu spermií a následně také odrážet fertilizační schopnost spermií.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Byla stanovena hypotéza, která předpokládá, že vybrané proteinové markery související s regulací motility a fertility spermií se budou lišit u jednotlivých hřebců.

Na základě hypotézy byly stanoveny následující cíle:

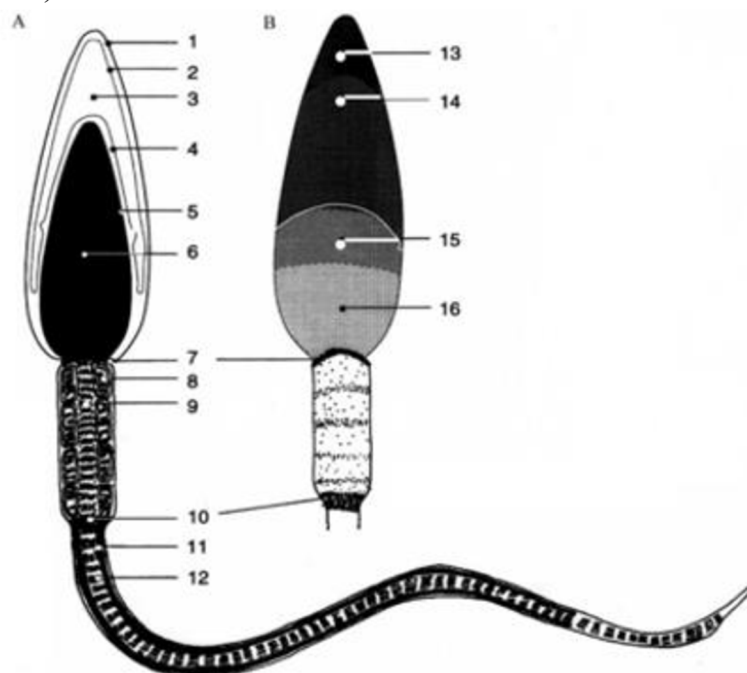
- 1) Vyhodnotit množství proteinu kotvícího proteinkinázu A (AKAP4)
- 2) Detekovat fosforylované a sialované proteiny spermií a porovnat jejich množství ve spermiích u jednotlivých hřebců
- 3) Vyhodnotit motilitu spermií pomocí CASA u jednotlivých hřebců v souvislosti s reprodukčním obdobím

### 3 Literární rešerše

#### 3.1 Stavba hřebčí spermie

Spermie jsou vysoce specializované buňky pro uchování a přenos genetického materiálu (Aurich 2005). Velikost hřebčí spermie je v poměru k velikosti těla pozoruhodně menší než u některých jiných druhů (Varner et al. 2014). Průměrná délka hřebčí spermie se uvádí 61–86  $\mu\text{m}$  (Bielanski & Kaczmariski 1979). Normální formy spermií se mezi jednotlivými plemennými hřebci značně liší, ale obecně platí, že průměrný hřelec má přibližně 50 % morfologicky normálních spermií (Brito 2014).

Tvar hlavičky savčí spermie se liší napříč druhy a obecně se má za to, že je důležitým faktorem, který určuje oplozovací schopnost. Obecně se udává, že hřebčí spermie je oválná, protáhlá s nejšířší přední třetinou a na podélném řezu má eliptický tvar (obr. č. 1) (Juhász et al. 2000).



Obrázek 1. *Schématické znázornění spermie hřebce (A – řez spermií, B – povrchový pohled na hlavičku spermie): 1) plazmatická membrána, 2) vnější akrozomální membrána, 3) akrozomální tekutina, 4) vnitřní akrozomální membrána, 5) jaderný obal, 6) jádro, 7) nuclear ring, 8) mitochondrie, 9) střední část, 10) annular ring, 11) hlavní a koncová část, 12) vláknitá pochva, 13) apikální segment, 14) preekvatoriální segment, 15) ekvatoriální segment, 16) postekvatoriální segment (Gadella et al. 2001).*

Hlavička spermie je tvořena jádrem, postakrozomální laminou a akrozomem. Stejně jako u většiny studovaných druhů velkých zvířat je akrozom u spermií hřelců membránově vázaná organela umístěná v rostrálních dvou třetinách hlavičky spermie, významnou složku obsahu tvoří hydrolytické enzymy (Juhász et al. 2000), nezbytné pro průnik spermie do oocyty. Ačkolí nejsou specificky popsány u hřebčích spermií, nejvýznamnější akrozomální enzymy u jiných druhů jsou akrozin, hyaluronidáza,  $\beta$ -galaktosidáza, různé typy proteináz, neuraminidázy, esterázy, arylsulfatáza a fosfolipáza A a C. Je pravděpodobné, že hřebčí spermie obsahují

mnoho z těchto enzymů (Meyers 2009). Tvorba savčího akrozomu je spojena s diferenciací spermatid během spermiogeneze. Biogeneze akrozomu je vysoce organizovaný proces, který zahrnuje přísun proteinů a membrán z Golgiho aparátu do vyvíjejícího se akrozomu (Moreno & Alvarado 2006). Až na určité rozdíly ve velikosti je akrozom u hřebčích spermií podobně umístěn a má podobnou strukturu, jako u jiných druhů domácích zvířat. Akrozom leží mezi plazmatickou membránou v přední oblasti hlavičky a jaderným obalem a jedná se o membránovou organelu (Meyers 2009). Akrozomální membrána je topologicky rozdělena na vnější akrozomální (OAM) a vnitřní akrozomální membránu (IAM), která je během akrozomální reakce vystavena na povrch spermie (Khawar et al. 2019). IAM je těsně přiléhající k jaderné membráně, zatímco OAM leží pod plazmatickou membránou. Obě membrány obklopují úzký heterogenní prostor tzv. akrozomální matrix (Hernández-Avilés et al. 2023). V přední části hlavičky spermie jsou lokalizovány specifické receptory pro vazbu spermie na zonu pellucidu (ZP) oocyty (Breitbart & Spungin 1997). Postakrozomální část hlavičky spermie tvoří lamina, která je složena ze specifických těsných lamel s vysokou elektronovou hustotou a pokrývá kaudální část jádra (Brito 2007). Na spojnici krčku a střední části bičíku se nachází prstenec, tzv. „posterior ring“ (Meyers 2009).

Jaderný obsah představuje vysoce kondenzovaný chromatin, tvořící většinu hlavičky spermie (Brito 2007), který je relativně dobře chráněn před poškozením (Chenoweth et al. 2022) v úzké asociaci s hlavními jadernými proteiny známými jako protaminy (Meyers 2009). Strukturální uspořádání chromatinu spermií je zásadní pro správné fungování těchto buněk. Četné disulfidické můstky slouží ke stabilizaci tohoto jaderného komplexu (Meyers 2009). Chromatinová struktura spermií je uspořádána tak, aby odolávala podmínkám, které by mohly poškodit DNA. Zároveň musí mít chromatin vlastnost rychle zpřístupnit samčí DNA ooplazmě po oplození (Dias 2017).

Hlavičku spermie s bičíkem spojuje krátký segment, tzv. krček. Bičík spermie se skládá ze tří oblastí, které se kaudálně zužují, ze střední části, hlavní části a koncové části. Bičík poskytuje pohyblivou sílu, která je nezbytná k průchodu spermie samičím pohlavním traktem, aby se dostala do místa oplodnění v ampule vejcovodu klisny (Meyers 2009). Střední část je nejširší část bičíku, táhne se od kaudálního konce krčku k prstenci (Juhász et al. 2000). Hlavní část bičíku představuje nejdélší část spermie. Základní strukturou bičíku je axonema (Hoek et al. 2022), která se táhne od krčku, pokračuje střední částí, hlavní a koncovou částí bičíku. Dalšími cytoskeletálními složkami bičíku jsou vláknitá pochva a vnější hustá vlákna (Miki et al. 2002). Tato vlákna mají tvar okvětních lístku a pevnou, keratinu podobnou vláknitou strukturu (Brito 2007). Hustá vlákna zajišťují tuhost a pružnost pro pohyb bičíku (Juhász et al. 2000). Podélně se zužují a jsou obklopena mitochondriálním pláštěm ve střední části a vláknitou pochvou v hlavní části bičíku (Miki et al. 2002). Koncová část bičíku je tvořena pouze axonemou nebo jednotlivými mikrotubuly, které jsou obklopeny plazmatickou membránou (Bielanski & Kaczmariski 1979).

Tvorba axonemy začíná během rané spermiogeneze (Lehti & Sironen 2017). Axonema se skládá z devíti periferních mikrotubulů (dublet) a dvou centrálních mikrotubulů, které probíhají po celé délce bičíku (Gagnon & Lamirande 2006). Vnější dublety mikrotubulů jsou propojeny nexinovými vlákny (Woolley 1997). Mikrotubuly jsou dlouhá trubicovitá filamenta, která jsou tvořena tubulinovými podjednotkami, které jsou základem mnoha podstatných buněčných procesů (O'Donnell & O'Bryan 2014). Tubulin  $\alpha$  a  $\beta$ , hlavní složky

mikrotubulů, mají zásadní význam pro strukturu a pohyblivost bičků. Tyto globulární proteiny o velikosti 50-55 kDa existují ve funkčním stavu jako heterodimer skládající se z  $\alpha$ - a  $\beta$ - řetězce (Oakley 2000). Podélné spojení tubulinů vytváří protofilamenta a laterální spojení 13 a 11 protofilament vytváří mikrotubuly A a B (Gagnon & Lamirande 2006). Na tyto mikrotubuly je navázáno několik struktur, které tvoří vysoce organizovanou proteinovou síť (Inaba 2011). Motorické proteiny pohybující se po mikrotubulech využívají energii z hydrolyzy ATP (Gupta 2005). Hydrolyza ATP umožňuje motorickým proteinům opakovaně se vázat a rozpojovat z vláken, čímž vzniká takzvaný kráčivý pohyb (Abraham et al. 2018). Tyto motorické proteiny patří do rodiny kinezinů a dyneinů (Gupta 2005). Kineziny se obvykle pohybují směrem k plusovému konci mikrotubulu, který je zakončen tubulinem  $\beta$ , naopak dyneiny se obvykle pohybují směrem k minusovému konci, který je zakončen tubulinem  $\alpha$  (Natividad 2020). Dyneinová raménka vystupující z mikrotubulu A směrem k mikrotubulu B sousedního dubletu, jsou hlavními aktéry aktivního posunu mikrotubulů. Podle polohy na mikrotubulu se dělí na vnější nebo vnitřní raménka (Inaba 2011). Dynein je protein, který přeměňuje chemickou energii obsaženou v ATP na mechanickou energii pohybu (Pereira et al. 2017). Jak uvádí Gagnon & Lamirande 2006, dyneinová raménka jsou komplex složený ze tří podjednotek. Těžké řetězce dyneinového komplexu mají centrální motorovou část se čtyřmi vazebnými místy pro ATP a mikrotubuly. Intermediární řetězce (o velikosti 60–120 kDa) se nacházejí na bázi dyneinových molekul a hrají roli při vazbě ramének na mikrotubuly necitlivé na ATP. Lehké řetězce (8-20 kDa) pak představují proteiny s různými funkcemi, jako je např. vazba  $\text{Ca}^{2+}$ .

Hřebčí spermie obsahují 40-50 mitochondrií ve střední části bičku (Meyers et al. 2019). Mitochondrie jsou multifunkční orgány, které nejen produkují energii pro buňku, ale jsou také důležité pro buněčnou signalizaci, apoptózu a mnoho biologických drah (Kruppa & Buss 2021). Mitochondrie mají čtyři vzájemně propojené oddíly: vnější mitochondriální membránu a vnitřní mitochondriální membránu, mezimembránový prostor a mitochondriální matrix (Amaral et al. 2013). Mitochondrie spermatických buněk vykazují specifické vlastnosti. Především jsou tyto orgány omezeny výhradně na střední část spermie (Piomboni et al. 2011). Za druhé se mitochondrie zárodečných buněk v průběhu spermatogeneze mění, zatímco spermatogonie a časné spermatocyty mají klasické mitochondrie, pozdní spermatocyty, spermatidy a spermie mají kondenzovanější a metabolicky účinnější formy (Amaral et al. 2013). Nejspecializovanějšími částmi jsou vnitřní mitochondriální membrána a matrix, kde se nachází mnoho enzymů, zpravidla uspořádaných do vícesložkových komplexů (Piomboni et al. 2011). Vnitřní mitochondriální membrána je místem produkce ATP oxidativní fosforylací a řídí transport iontů a metabolitů (Nicholls & Ferguson 2013).

Dvě hlavní metabolické cesty produkce energie ve spermii jsou glykolýza a oxidativní fosforylace (OXPHOS). Enzymy spojené s glykolýzou se nacházejí v hlavní části bičku, zatímco OXPHOS probíhá ve vnitřní mitochondriální membráně ve střední části spermie (Varner et al. 2014). Přestože je OXPHOS při produkci ATP výrazně účinnější než glykolýza, zdá se, že spermie většiny druhů jsou při produkci ATP závislé především na glykolýze (Storey 2008).

## 3.2 Faktory ovlivňující fertilitu hřebců

### 3.2.1 Plazmatická membrána spermií a reaktivní formy kyslíku (ROS)

Plazmatická membrána (PM) spermií je tvořena nasycenými mastnými kyselinami a polynenasycenými mastnými kyselinami (PUFA) s dlouhým řetězcem, které jsou prvotním cílem napadení ROS (Griffin et al. 2019). Bylo zjištěno, že plazmatická membrána pokývající hlavičku spermie se liší obsahem lipidů a proteinů v porovnání s membránou pokývající bičík spermie (Meyers 2009). Celkový obsah PUFA v PM spermiích hřebce je nejnižší v lednu a zvyšuje se s přechodem do reprodukčního období, nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v červnu (Aurich et al. 2018). ROS představované superoxidovým radikálem ( $O_2^-$ ), peroxidem vodíku ( $H_2O_2$ ) a oxidem dusnatým (NO), pokud vznikají při nízkých a kontrolovaných hladinách, působí jako druzí poslové (Lamirande & O'Flaherty 2008). Hlavním zdrojem ROS jsou mitochondrie (Martín-Cano et al. 2020). Vzhledem k vysokému obsahu nenasycených mastných kyselin v PM jsou savčí spermie citlivé na oxidativní stres, který je dán rovnováhou mezi tvorbou a odbouráváním ROS ve tkáni (Baumber et al. 2000). Zatímco mírná peroxidace zřejmě podporuje kapacitaci spermií, nadměrná peroxidace poškozuje PM, což vede ke ztrátě pohyblivosti a k celkové redukci plodnosti (Aurich 2005).

Peroxidace PUFA v membráně spermatických buněk je autokatalytická reakce, která může vést k buněčné dysfunkci spojené se ztrátou funkce a integrity membrány (Sanocka & Kurpisz 2004). Nicméně spermie a semenná plazma obsahují řadu enzymů a nízkomolekulárních antioxidantů, které odstraňují ROS, aby zabránily možnému poškození buněk (Baumber et al. 2000). Obranné systémy tvořené glutathionperoxidázou (GSH), superoxiddismutázou (SOD) a katalázou (CAT) fyziologicky kontrolují rovnováhu mezi produkcí a neutralizací ROS (Kankofer et al. 2005).

### 3.2.2 Glykokalyx spermií a role kyseliny sialové

Povrch savčích spermií je pokryt hustým povlakem molekul bohatých na sacharidy, které tvoří glykokalyx o tloušťce 20–60 nm. Většina cukerných zbytků je navázána na proteiny, které jsou buď integrovány do membrány spermie, nebo jsou s ní více či méně asociovány (Schroter et al. 1999). Přítomnost kyseliny sialové na povrchu buněk byla dokázána nejen u savců, ale i u jiných živočišných druhů (Warren 1963). Zajímavé je zmínit i přítomnost sialových kyselin u některých virů, různých bakterií, prvoků a patogenních hub (Schauer & Kamerling 2018). Některé kmeny *Escherichia coli* obsahují dlouhé sacharidové řetězce sestávající až z 200 molekul sialových kyselin (Traving & Schauer 1998). Stejně jako u jiných savčích buněk se sialové kyseliny vyskytují jako vnější monosacharid, který zakončuje většinu glykanů na povrchu spermatické buňky (Schroter et al. 1999). Mezi strukturální vlastnosti sialových kyselin patří přítomnost amino skupiny a karboxylové skupiny zajišťující záporný náboj molekuly, díky němuž se sialové kyseliny podílejí na vazbě a transportu kladně nabitých molekul (např.  $Ca^{2+}$ ) (Traving & Schauer 1998). Po kryokonzervaci dochází v glykokalyxu spermií k mnoha změnám. Dojde k velkým ztrátám sialových kyselin, které by mohly spermie chránit. Pokles sialových kyselin způsobí snížení záporného náboje na povrchu spermií, což vede k jejich aglutinaci. To může být jedním z důvodů, proč je míra plodnosti zmrazených spermií nižší než u čerstvých spermií (Wu et al. 2017). Sialové kyseliny se obecně nacházejí v tkáňových sekretech, jako je i semenná plazma, kde je součástí většiny glykoproteinů (Nag & Chaudhuri 1979). Kyseliny sialové představují skupinu více jak 20 sloučenin (Schauer 1985) obsahující acetylové a glykolylové deriváty kyseliny neuraminové (Nag & Chaudhuri 1979).

Mezi nejrozšířenější u savců patří N-glykolyneuraminová kyselina (Neu5Gc) a N-acetylnneuraminová kyselina (Neu5Ac) (Ghaderi et al. 2011).

Skupinou makromolekul rozpoznávající kyselinu sialovou jsou takzvané lektiny. Jsou to obvykle oligomerní glykoproteiny z rostlinných zdrojů, které se vážou na specifické zbytky sacharidů. Velmi rozšířenými lektiny vážající kyselinu sialovou patří WGA (Wheat germ agglutinin), LPA (*Limulus polyphemus* agglutinin), SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) a MAL II (*Maackia amurensis* agglutinin) (Traving & Schauer 1998). MAL II se běžně používá k detekci  $\alpha$ -2,3 vázané kyseliny sialové. SNA je nejčastěji používáno k detekci  $\alpha$ -2,6 vázané kyseliny sialové. Předpokládá se, že WGA má širokou specifitu a váže jak sialové kyseliny, tak i glykany obsahující N-acetylglukosamin (GlcNAc), který je hlavním rozpoznávajícím motivem pro WGA (Bojar et al. 2022).

Jedna z nejvýznamnějších úloh sialových kyselin je, že brání rozpoznání receptorů příslušnými ligandy a rozpoznání antigenních míst (Schauer 1985), přesněji řečeno mohou přispívat k ochraně spermií před imunitní reakcí dělohy samice (Ma et al. 2016). Snížení počtu spermií v děloze je většinou způsobeno působením samičích leukocytů (Ma et al. 2016). Nicméně toto maskování však může mít i škodlivý účinek, jak je vidět v případě některých nádorů, které jsou sialylovány v mnohem vyšší míře než v odpovídající zdravé tkáni (Traving & Schauer 1998). Sialové kyseliny se také podílejí na regulaci pohyblivosti spermií a vazbě spermie s oocytom (Alkhodair et al. 2018). U několika druhů je část sialových kyselin pokrývající gamety odstraněna, aby se usnadnilo specifické rozpoznání glykanů specifickými vazebnými proteiny (Fliniaux et al. 2022). Spermie procházející kapacitací v samičím reprodukčním traktu se zbavuje svých povrchových glykoproteinů, čímž se sníží jejich vazba na ovidukt. U býků úplné odstranění kyseliny sialové snižuje motilitu a schopnost penetrace hlenu, ale naopak dochází k polyspermnímu oplození (Fliniaux et al. 2022). Sialové kyseliny byly detekovány na akrozomální čepičce spermie, ve střední části a také v hlavní bičičku u lidských, býčích a beraních spermií (Alkhodair et al. 2018).

Klíčovým enzymem katabolismu kyseliny sialové je sialidáza. Savčí sialidázy se na základě jejich subcelulární lokalizace dělí na Neu1 (lokalizované převážně v lysozomech), Neu2 (cytosol), Neu3 (plazmatické membrány) a Neu4 (lysosomy nebo mitochondrie a endoplazmatické retikulum) (Keil et al. 2022). Zbytky kyseliny sialové mohou být odstraněny z povrchu buněk pomocí sialidáz vázaných na membránu (Traving & Schauer 1998). Obecně změny ve struktuře sialových kyselin jsou výsledkem mnoha faktorů. Zajímavostí je, že změny v expresi transkriptů enzymů pro metabolismus sialových kyselin, sialyltransferáz a sialidáz, jsou spojeny s maligními onemocněními (Pearce & Laubli 2015).

### 3.3 Molekulární procesy spojené s fertilitou hřebců

Plodnost je velmi důležitým produkčním znakem plemenných hřebců, ale je obtížné ji studovat, protože se jedná o komplexní parametr, který se skládá z několika složek a který je ovlivněn rozdíly nebo změnami v prostředí, zdravotním stavu a výživě (Mahmoud & Nawito 2012). Nicméně molekulárně genetické markery mohou být užitečné jako včasné indikátory plodnosti hřebců (Giesecke et al. 2009) a mohou být užitečné při jejich plemenné selekci (Sieme & Distl 2012). V posledních letech se výzkum zaměřuje na identifikaci spolehlivých markerů plodnosti buď na genomické nebo proteomické úrovni (Novak et al. 2010).

V posledních desetiletích bylo provedeno také několik studií zaměřených na hledání potenciálních markerů plodnosti mimo jiné i u dalších hospodářských zvířat, plodnost samců je důležitým ekonomickým znakem v udržitelném chovu, neplodnost způsobuje velké ekonomické ztráty (Ozbek et al. 2021).

Proteiny semenné plazmy jsou sekreční proteiny pocházející především z nadvarlat a přídatných pohlavních žláz. Interakce semenné plazmy se spermiemi vyvolá vazbu proteinů na povrch spermií a přestavbu membrány, což může mít vliv na transport spermií, jejich přežití a oplodňovací schopnost v samičím pohlavním ústrojí (Druart & Graaf 2018). Proteiny se podílejí na úpravě povrchu spermií, ke které dochází během jejich průchodu samčím pohlavním ústrojím a později při ejakulaci. Obsah proteinů v hřebčí semenné plazmě je relativně nízký (10 mg/ml) ve srovnání s jinými savci, kteří obsahují přibližně 20-60 mg/ml (Topfer-Petersen et al. 2005).

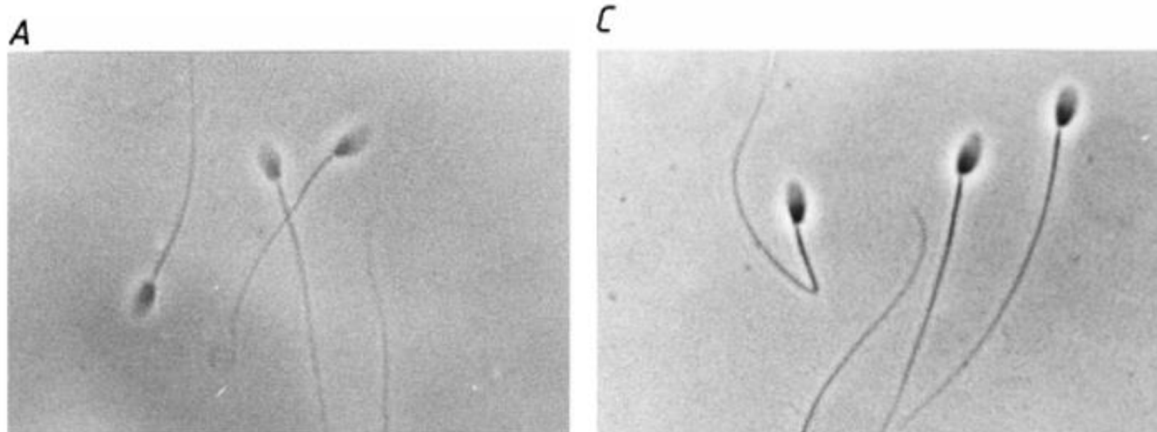
#### 3.3.1 Proteiny spermií a semenné plazmy hřebců

Semenná plazma (SP) obsahuje velkou proteinovou složku, která se významně podílí na funkci, transportu a životnosti spermií v samičím reprodukčním traktu (Druart et al. 2013). Jakékoli kvalitativní nebo kvantitativní změny proteinů spermií mohou vést k poruchám funkcí a ztrátám plodnosti. Komplexní charakterizace proteomu spermií je proto nezbytným předpokladem k pochopení funkční biologie spermií a k rozpoznání příčin vedoucí ke zhoršené oplodňovací schopnosti (Roca et al. 2020). V současné době je známo více než 200 genů, které se obecně podílejí na fertilitě spermatických buněk (Leeb et al. 2005), u hřebců bylo popsáno více než 60 kandidátních genů (Laseca et al. 2021). Níže je popsáno několik proteinů semenné plazmy, které jsou významně spojovány s plodností hřebců.

Hlavní proteiny semenné plazmy hřebců můžeme rozdělit do tří skupin, proteiny Fn-2 (fibronektin typu II), proteiny bohaté na cystein (CRISP) a spermadhesiny, jejichž přítomnost byla detekována pouze u kopytníků (Topfer-Petersen et al. 2005).

CRISP se nacházejí hojně v pohlavním ústrojí samců u řady druhů (Topfer-Petersen et al. 2005). CRISP jsou dvoudoménné proteiny s N-koncovou CAP doménou (typická pro superrodinu proteinů regulující patogenezí) o velikosti přibližně 21 kDa a C-koncovou doménou o velikosti přibližně 6 kDa obsahující 10 konzervovaných cysteinů, která je určujícím prvkem rodiny CRISP proteinů (Gibbs et al. 2008). Všechny savčí CRISP proteiny mají molekulovou hmotnost mezi 25 a 32 kDa, v závislosti na jejich glykosylaci (Gibbs et al. 2008). Byly popsány celkem tři proteiny patřící do rodiny CRISP, CRISP1, CRISP2 a CRISP3. Obecně jsou tyto proteiny exprimovány v samčím pohlavním ústrojí (Hamann et al. 2007), CRISP1 je primárně exprimován v nadvarletí, CRISP2 ve varlatech (Leeb et al. 2005) a CRISP3 se nachází jak v ampule chámovodu pospubertálních hřebců, tak v semenných váčcích (Fedorka et al. 2017). Volně navázané CRISP proteiny, především CRISP3, se mohou





Obrázek 2. **Lokalizace HSP-3 na hřebčích spermích pomocí nepřímé imunofluorescence:** A – pozitivní detekce v postakrozomální oblasti, C – pozitivní detekce ve střední části bičíku (Magdaleno et al. 1997).

ze spermie uvolnit promytím roztokem s vysokým obsahem soli. Určitý počet molekul CRISP však zůstává pevně vázán na povrch spermie (Topfer-Petersen et al. 2005). CRISP proteiny hřebčích spermii se přesněji nacházejí v ekvatoriální a postakrozomální oblasti a také ve střední části bičíku (Topfer-Petersen et al. 2005). U hřebců byl identifikován paralog proteinu CRISP3, nazýván jako HSP-3 (Gibbs et al. 2008), protein o velikosti 27 kDa (Magdaleno et al. 1997). Kvantitativní určení HSP-3 v semenné plazmě různých hřebců ukázalo velkou variabilitu jeho koncentrace, která se pohybovala od 0,3 až 1,3 mg/ml. K posouzení lokalizace HSP-3 byla využita nepřímá imunofluorescenční mikroskopie. Všechny CRISP proteiny obsahují signální peptid, který odpovídá jejich lokalizaci ve specifických intracelulárních kompartmentech (Gibbs et al. 2008). HSP-3 byl lokalizován v postakrozomální oblasti a ve střední části bičíku ejakulovaných spermii (obr. č. 2). Jeho lokalizace podporuje jeho možnou roli při zrání spermii nebo interakci gamet (Magdaleno et al. 1997).

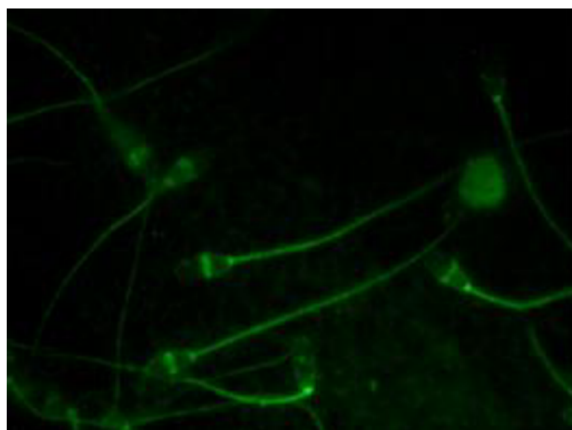
Mezi další důležitý protein patří fosfolipáza A2 (PLA2), který hraje zásadní roli v pozdních maturačních dějích spermii, akrozomální reakci a splnutí spermie s vajíčkem (Fiala-Rechsteiner et al. 2023).

V samčím pohlavním traktu byly identifikovány malé proteiny typu Fn-2 jsou charakterizovány dvěma tandemově uspořádanými jednotkami fibronektinu typu II (Fn-2). V nedávné době byly u řady savců, včetně hřebce také identifikovány dlouhé proteiny typu Fn-2, skládající se ze čtyř tandemově uspořádaných jednotek. Tyto proteiny jsou vzdáleně příbuzné malým proteinům typu Fn-2 (Topfer-Petersen et al. 2005). U hřebce byly identifikovány tři různé proteiny: SP-1, SP-2 a EQ-12. Proteiny typu Fn-2 jsou exprimovány v různých oblastech samčího reprodukčního traktu. EQ-12 je produkován v oblasti *corpus* a *cauda epididymis*, zatímco proteiny SP-1 a SP-2 jsou exprimovány převážně v ampule chámovodu (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2004). Jak krátké, tak dlouhé proteiny typu Fn-2 se během posttestikulárního zrání vážou na povrch spermii (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2004) specifickými interakcemi s cholinovými lipidy na spermatické membráně a jsou přítomny na ejakulovaných spermích (Topfer-Petersen et al. 2005).

Hřebčí SP obsahuje proteiny, které jsou strukturně podobné s býčými a kančími (Calvete et al. 1995). Většina izolovaných hřebčích proteinů, konkrétně HSP-1 a HSP-2, vykazují schopnost vázat heparin (Topfer-Petersen et al. 2005), který se váže na ejakulované spermie

a ovlivňuje proces kapacitace, čímž zvyšuje schopnost spermie projít akrozomální reakcí (Florman & Babcock 1991.) HSP-1 a HSP-2 jsou nejhojněji zastoupenými proteiny v hřebčí semenné plazmě, představující 70-80 % (Topfer-Petersen et al. 2005). Ve studii Garcia et al. (2014) byla sledována koncentrace proteinů HSP-1 a HSP-2 v ejakulátu od hřebců s dobrou a špatnou plodností. Výsledky poukazují na to, že koncentrace hlavních proteinů semenné plazmy HSP-1 a HSP-2 byla vyšší v ejakulátech pocházejících od hřebců se zhoršenou plodností. Tudíž se může jednat naopak o biomarker špatné plodnosti hřebců. Nicméně je důležité poukázat na to, že HSP-1/2 vykazuje aktivitu podobnou chaperonům a chrání řadu cílových proteinů proti tepelným a chemickým stresovým podmínkám (Kumar & Swamy 2016).

Spermadhesiny jsou rodinou polypeptidů o velikosti 12–16 kDa s CUB doménou (Haase et al. 2005), jsou hlavními proteiny semenné plazmy kanců (Haase et al. 2005) a poprvé byly popsány v kančí semenné plazmě (Topfer-Petersen et al. 2005). Expres spermadhesinů byla popsána také v samčím pohlavním ústrojí hřebců a býků (Topfer-Petersen et al. 1998). Obecně byly tyto proteiny nalezeny především v SP a po ejakulaci se vážou na povrch spermií (Griffin et al. 2019). Při ejakulaci spermadhesiny vytvářejí ochranný plášť kolem citlivé akrozomální oblasti hlavičky spermie, čímž pravděpodobně zabraňují předčasné akrozomální reakci (Topfer-Petersen et al. 1998). Člen rodiny spermadhesinů (homolog prasečího AWN) byl také identifikován v hřebčí semenné plazmě jako HSP-7, protein o velikosti 14 kDa (Topfer-Petersen et al. 2005) a sdílí primární strukturu z 98 % identickou s proteinem AWN pocházející ze semenné plazmy kanců. Pozitivní imunodetekce HSP-7 byla u hřebců zjištěna již ve spermatogoniích, v *rete testis* a *ductus epididymis* (Hoshiba & Sinowitz 1998). Během průchodu nadvarletem se na spermie váže velké množství tohoto proteinu. Je známo, že lokalizace HSP-3 je vyhrazena na ekvatoriální segment spermie (Topfer-Petersen et al. 2005). Nicméně bylo později zjištěno, že HSP-7 se neomezuje pouze na ekvatoriální segment, ale je přítomen i ve střední části bičíku spermie (obr. č. 3) (Heidmiller 2009), na rozdíl od prasečích spermadhesinů, u kterých můžeme pozorovat odlišnou lokalizaci a různé vzory exprese v rámci ejakulovaných, *in vitro* kapacitovaných spermiích a po akrozomální reakci (Kroh et al. 2022).



Obrázek 3. Pozitivní detekce HSP-7 v oblasti ekvatoriálního segmentu a střední části bičíku spermie (Heidmiller 2009).

Stejně jako jeho kančí homolog se hřebčí spermadhesin váže na sacharidy (Topfer-Petersen et al. 2005) a vykazuje schopnost vazby k ZP (Reinert et al. 1996, Hoshiba & Sinowatz 1998), proto může být exprese tohoto proteinu využita jako další možný marker plodnosti u hřebců (Griffin et al. 2019).

Protein SPATA1 specifický pro varlata se podílí na utváření hlavičky spermie během spermatogeneze. Proto byl tento gen související se spermatogenezí, vybrán jako další kandidát plodnosti hřebců a dále charakterizován (Giesecke et al. 2009). S cílem analýzy jednonukleotidových polymorfismů (SNP) bylo v rámci studie (Giesecke et al. 2009) celkem odebráno 179 vzorků od hannoverských plemenných hřebců a vyhodnoceno. SNP byly genotypizovány pomocí restričních endonukleáz nebo Real-time PCR. Bylo zjištěno, že koňský protein SPATA1 vykazuje 64% podobnost s myším proteinem SPATA1. Například u myši je tento gen považován za funkční marker plodnosti (Giesecke et al. 2002, 2009). Předpokládá se, že detekovaná intronová mutace SPATA1 přináší lepší plodnost prostřednictvím regulace genové exprese (Giesecke et al. 2009).

### 3.3.2 Hormonální vlivy podílející se na plodnosti hřebců

Geny kódující hormony, které se podílejí na regulaci vývoje varlat, pohlavní zralosti a sexuální aktivity, jsou také kandidáty na zařazení do skupiny molekul pro sledování plodnosti hřebců (Giesecke et al. 2010). Funkce varlat závisí na funkční hypotalamo-hypofyzárně-testikulární ose, která zahrnuje gonadotropin uvolňující hormon (GnRH), luteinizační hormon (LH), folikulostimulační hormon (FSH), testosteron, estrogeny a inhibiny (Giesecke et al. 2009). Tradičně se testosteron považují za samčí a estrogen za typicky samičí pohlavní hormon. Nicméně estradiol, převládající forma estrogenu, hraje také rozhodující roli v samčí reprodukci (Schulster et al. 2016).

GnRH je uvolňován z hypotalamu pulzujícím způsobem a aktivuje receptor spřažený s G-proteinem (GNRHR), který vyvolává uvolňování luteinizačního hormonu a folikulostimulačního hormonu z přední hypofýzy (Giesecke et al. 2009). Imunizace proti GnRH byla studována jako alternativa pro běžně používané chirurgické kastrace u hřebců. Po dvou až třech očkováních byl pozorován „kastroční“ účinek trvající 6 měsíců po první vakcinaci. Ošetření hřebci nevykazovali žádné libido v přítomnosti říjící klisny a nedocházelo k sexuálně agresivnímu chování. Studie ale ukázala, že imunizace GnRH je reverzibilní. Když imunizace nebyla opakována, bylo pozorováno obnovení funkce varlat a libido se obnovilo (Turkstra et al. 2005). LH a FSH jsou heterodimerní glykoproteiny složené ze dvou nekovalentně spojených polypeptidů. Ve varleti se LH váže na membránové receptory na Leydigových buňkách a stimuluje je k přeměně cholesterolu na testosteron (Brinsko 1996). U hřebců je uvolňování LH pozitivně korelováno s délkou světelného dne. Koncentrace LH v plazmě stoupá se začátkem připouštěcího období (Gerlach & Aurich 2000). FSH a testosteron stimulují řadu funkcí Sertoliho buněk, včetně syntézy a sekrece ABP (vazebný protein pro androgen), inhibinu, aktivinu a estrogenu a několika dalších látek jako je transferin (Brinsko 1996). Transferin funguje jako iontový transportér (Xin et al. 2019), který dodává železo jako výživnou složku zárodečným buňkám (Roser 2008) a je přítomen v SP. Nicméně se zdá, že tento protein nesouvisí s plodností u hřebců (Roser 2008).

Testosteron je hlavní hormon zodpovědný za vývoj sekundárních pohlavních znaků samce, současně má tento hormon vliv na regulaci fertility a libida (Walker & Cheng 2005). Počáteční studie zaměřené na koncentraci testosteronu byla provedena již v roce 1976, kdy byla změřena jeho koncentrace v plazmě u 24 plnokrevných hřebců v různých hodinách během dne. Všichni hřebci vykazovali nízké hladiny mezi 16. a 24. hodinou. Poté se hladina zvýšila na maximální průměrnou hodnotu  $3,49 \pm 0,89$  ng/ml v 8 hodin (Sharma 1976). Zjištěné údaje z této studie poukazují na denní kolísání hladin testosteronu u hřebců. Nicméně i u jiných druhů byly zaznamenány denní výkyvy hladin testosteronu. Obecně savčí varlata plní dvě hlavní funkce: produkci spermií a syntézu steroidních hormonů, z nichž jsou estrogeny konečným produktem získaným přeměnou testosteronu enzymem zvaným aromatáza (Carreau et al. 2007). Estradiol je u samců nezbytný pro regulaci libida, erektilní funkce a spermatogeneze (Schulster et al. 2016).

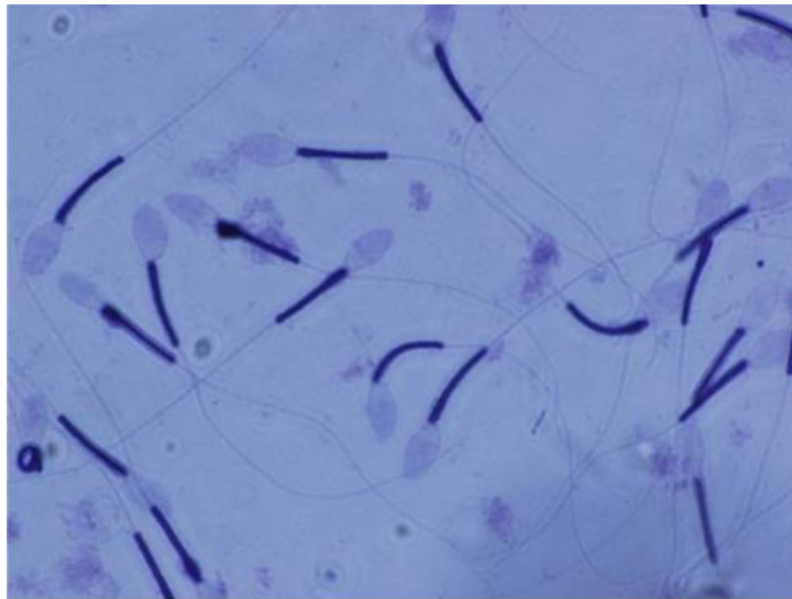
Stimulace epididymu steroidními hormony (testosteron a estradiol-17 $\beta$ ) vedly ke zvýšení produkce laktoferinu. Laktoferin je jedním z nejhojnějších proteinů vylučovaných nadvarlaty hřebce. Pro potenciální regulaci laktoferinu byly zkoumány tkáně z *caput*, *corpus* a *cauda epididymis*. Estradiol-17 $\beta$  významně stimuloval zvýšení sekrece laktoferinu nad výchozí hodnotu u *cauda epididymis*, naopak účinek testosteronu nebyl významný v žádné oblasti. Zdá se, že právě estrogen reguluje sekreci laktoferinu v *cauda epididymis* u postpubertálních hřebců, nikoli testosteron (Pearl & Roser 2014).

Posledním důležitým hormonem ovlivňující samčí fertilitu je inhibin (Ball et al. 2019). Gen pro inhibin (INHBA) byl také vybrán jako kandidát pro sledování plodnosti hřebců a analyzován na intragenové markery pro zjištění případné souvislosti s mírou březosti (Giesecke et al. 2010). Inhibin je glykoprotein tvořený heterodimery skládající se z podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  (Barakat et al. 2012), které jsou produkovány především Sertoliho buňkami a v menší míře i v Leydigových buňkách. Inhibin reguluje hypofyzární FSH (Roser 2008). Největší nárůst inhibinu je pozorován u hřebců v rozmezí druhého až pátého roku. U neplodných hřebců byly zaznamenány významně nižší koncentrace plazmatického a intratestikulárního inhibinu než u plodných hřebců (Giesecke et al. 2010), nicméně hladina testosteronu zůstala stejná (Roser 2008). Tudiž intratestikulární inhibin může být dobrým ukazatelem pro detekci časného poklesu plodnosti (Roser 2008). V rámci studie byla také detekována intronová mutace *INHBA*, která by mohla hrát kritickou roli v plodnosti hřebců. Tyto mutace mohou mít také vliv na regulaci exprese *INHBA* (Giesecke et al. 2010).

### 3.4 Motilita hřebčích spermií a energetický metabolismus

Jednou z hlavních vlastností spermií je jejich pohyblivost, která je nezbytná pro zajištění samčí plodnosti. Jedinci se špatně pohyblivými nebo nepohyblivými spermii jsou obvykle zcela neplodní nebo neschopni oplození bez použití pokročilých technik asistované reprodukce (Turner 2005).

Ve skutečnosti existují dva typy motility, aktivovaná pozorovatelná u ejakulovaných spermií a hyperaktivovaná, která je pozorována u spermií v místě oplodnění (Turner 2005). Oba typy pohyblivosti vyžadují dostatečný přísun energie ve formě ATP (Piomboni et al. 2011). ATP ve spermiích vzniká kombinací metabolických drah, včetně oxidativní fosforylace a Krebsova cyklu v mitochondriích ve střední a glykolýzy v hlavní části bičíku. Oxidativní fosforylace je nejefektivnější cesta tvorby ATP (Hoek et al. 2006). Oxidativní fosforylace vytváří třicet molekul ATP na jednu molekulu oxidované glukózy. Tvorba ATP prostřednictvím oxidativní fosforylace je tedy patnáctkrát účinnější než glykolýza. Souhrnně lze říci, že oxidace látek a fosforylace ADP spolu s protonovým gradientem napříč vnitřní mitochondriální membránou jsou klíčovými faktory při tvorbě ATP (du Plessis et al 2014) (obr. č. 4). Je ale důležité si uvědomit, že spermie mohou kromě glukózy metabolizovat i jiné substráty glykolytickou cestou k udržení pohyblivosti (Hoek et al. 2022).



Obrázek 4. *Spermie hřebců využívá především mitochondriální oxidativní fosforylaci k tvorbě adenosin trifosfátu pro motilitu (mitochondrie spermií lze vizualizovat barvením pomocí nitroblue tetrazolium) (Varner et al. 2014).*

$\text{Ca}^{2+}$  dráha a dráha cAMP-dependentní proteinkináza jsou dvě důležité metabolické dráhy, které se podílejí na regulaci pohyblivosti spermií (Pereira et al. 2017). Syntézu cAMP katalyzují adenylcyklázy (AC) (Stegborn 2014). AC jsou klíčovými enzymy, který na počátku signální dráhy syntetizuje cAMP a aktivuje dyneiny ve strukturách axonemy jejich fosforylací (Shiba & Inaba 2014). Savčí AC lze rozdělit na dva odlišné typy, transmembránové AC (tmAC) a rozpustné AC (sAC, známé také jako AC10). sAC je přímo aktivována  $\text{HCO}_3^-$  a  $\text{Ca}^{2+}$ . sAC jsou jediné signální proteiny, o nichž je známo, že jsou přímo regulovány  $\text{HCO}_3^-$  (Pereira et al. 2017). Naopak tmAC jsou regulovány především heterotrimerními G-proteiny

jako součást receptorových drah spřažených s G-proteiny (Steebhorn 2014). tmAC a sAC hrají odlišnou roli v regulaci motility spermií. tmAC přechodně syntetizuje vysokou hladinu cAMP a naproti tomu sAC se podílí především na regulaci asymetrie kmitání bičíku (Shiba & Inaba 2014).

Vápník je základním regulačním faktorem pro kapacitaci, hyperaktivaci a akrozomální reakci spermií (Pereira et al. 2017). Při nízkých intracelulárních koncentracích  $\text{Ca}^{2+}$  kmitají bičíky symetricky, ale když se hladina  $\text{Ca}^{2+}$  zvýší, kmitání se stane více asymetrické a spermie se hyperaktivují (Suarez 2008).

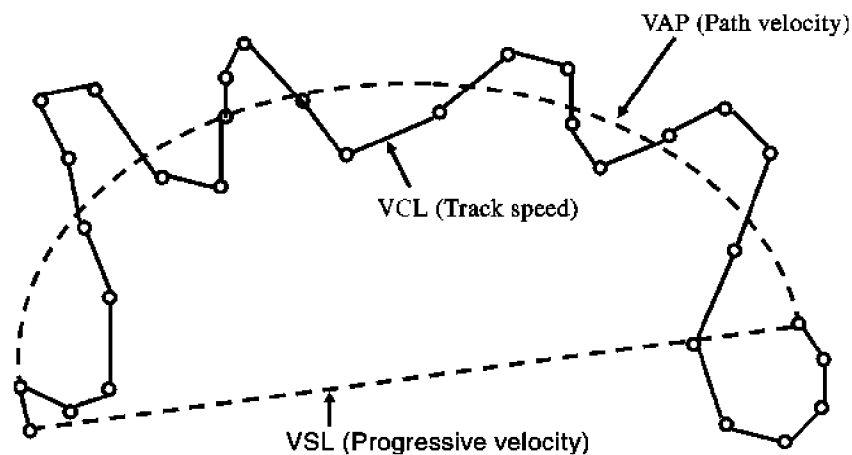
Během transportu spermií k oocyту v reprodukčním traktu samice dochází k jejich zrání, které vyvolává změny v jejich motilitě. Tyto změny zlepšují efektivitu jejich migrace samičím reprodukčním traktem a napomáhají úspěšnému oplodnění (Hoek et al. 2022). Při uvolňování spermií ze semenného epitelu varlete je bičík nepohyblivý. Průchod spermií nadvarletem je klíčovým faktorem pro aktivaci pohyblivosti spermií. V proximálních oblastech nadvarlete jsou spermie ještě nezralé. Během průchodu nadvarletem se se hladina intracelulárního cAMP ve spermiích kontinuálně zvyšuje od *corpus epididymis* k *cauda epididymis*, kdy spermie získávají pohyblivost (Souza et al. 2017). Jakmile spermie získají schopnost pohybu, prostředí v distálních oblastech nadvarlete udržuje pohyb bičíku spermie téměř zablokovan díky nízkému pH, nízkým koncentracím  $\text{Na}^+$  a vysokým koncentracím  $\text{K}^+$ . Celková doba průchodu spermií nadvarletem byla u hřebců odhadnuta přibližně na 10 dní (Meyers 2009). Při ejakulaci jsou spermie vystaveny změnám ve složení vnějšího prostředí, a to prostřednictvím tekutin s vysokou iontovou silou, nízkou osmolalitou, nízkým obsahem  $\text{K}^+$  a vysokým obsahem  $\text{Na}^+$ , které přispívají k opětovné aktivaci motility. V určitém okamžiku poté, co spermie dosáhne vejcovou, dojde k hyperaktivaci bičíku. Následně se vzor rytmu bičíku změní na asymetrický pohyb s vyšší frekvencí (Dias 2017). Hyperaktivovaná motilita pomáhá spermiím dosáhnout místa oplodnění. U některých hřebců se můžeme setkat s nežádoucí vyšší citlivostí na zmrazení vyúsťující ve špatnou motilitu spermií po rozmrazení, která souvisí s poškozením membrán, osmotickým a oxidačním stresem během kryokonzervace (Stephens et al. 2013). Z tohoto důvodu jsou testována různá aditiva pro udržení kvality spermatu. Rota et al. (2019) provedl studii s cílem vyhodnotit, zda přidavek různých koncentrací kofeinu a pentoxifylinu po rozmrazení dávek mění parametry pohyblivosti kryokonzervovaných spermií hřebců. Kofein a pentoxifylin jsou metylxantinové deriváty inhibující fosfodiesterázu (Stephens et al. 2013), což vede ke zvýšení cAMP (Rossi et al. 2020). Vysoká hladina cAMP vytváří ATP, který se používá jako zdroj energie pro pohyb spermií (Stephens et al. 2013). V rámci studie kofein v koncentraci 5 mM dokázal zlepšit celkové procento pohyblivosti, progresivní motilitu a rychlost spermií. Kromě toho přidání kofeinu okamžitě výrazně zvýšilo VCL (rychlost na křivočaré dráze). Podobně i pentoxifylin při koncentraci 5 i 10 mM zvýšil celkovou pohyblivost a rychlost spermií po rozmrazení (Rota et al. 2019).

### 3.4.1 Hodnocení motility pomocí systému CASA

Počítačem řízená analýza spermií (Computer assisted sperm analysis; CASA) je systém používaný ke stanovení individuálních vzorců motility spermií. Hodnocení pohyblivosti spermií a dalších kinetických parametrů, jako je křivočará, přímočará a průměrná dráhová rychlost, je nezbytnou součástí hodnocení kvality spermií (Giaretta et al. 2017). Hodnocení plodnosti hřebce je důležitou součástí výběru plemeniků. Kromě toho mohou být znalosti o předcházející kvalitě ejakulátu neocenitelné při podezření na problémy s plodností (Colenbrander et al. 2003). Pro optimalizaci výsledků gravidity klisen by sperma mělo splňovat některá kritéria, jako je minimální celkový počet spermií na dávku a minimální progresivní procento spermií na dávku.

Spermie se obvykle analyzují po standardním zředěním čistého spermatu v komplexním roztoku. Žádné takové médium není podobné soustavě tekutin, kterému jsou spermie postupně vystaveny ve vysoce proměnlivém těle samice. Místo toho CASA poskytuje informace o spermiích v definovaných, standardizovaných podmínkách, které umožňují srovnání s jinými podobně hodnocenými vzorky (Amann & Waberski 2014).

Dascanio (2014) uvádí postup při analýze semene, kdy pro kvalitní vyhodnocení parametrů je důležité získat ejakulát bez hrubých nečistot, který se následně zředí za použití průmyslových ředidel dostupných na trhu. Pomocí mechanické pipety se naplní komůrka na mikroskopickém sklíčku, určeného pro analýzu CASA, příslušným objemem. Při samotné analýze je velmi důležité, aby vzorek byl neustále zahříván na teplotu přibližně 37 °C. Změny teplot mají významný vliv na odhad motility. Následně se orientuje sklíčko tak, aby se objektiv nacházel ve střední části komůrky. Je důležité se vyhnout okrajům komůrky, kde by spermie nemusely být tak pohyblivé v důsledku interakce se stěnou komůrky. Obvykle se hodnotí pět nebo více samostatných polí, aby bylo možné průměrně vyhodnotit pohyblivost spermií. Každá komůrka se použije pouze jednou a poté se vyřadí. Software následně poskytuje dva hlavní parametry – celkovou a progresivní pohyblivost (Dascanio 2014). Mezi významné kinematické parametry patří například VSL (časově zprůměrovaná rychlost hlavičky spermie podél přímky mezi její první zjištěnou polohou a poslední zjištěnou polohou ( $\mu\text{m/s}$ ), VCL (rychlost křivočaré dráhy ( $\mu\text{m/s}$ ) a VAP (průměrná dráhová rychlost ( $\mu\text{m/s}$ ) (obr. 5).



Obrázek 5. Příklad dráhy pohybu spermií vyhodnocené pomocí systému CASA (Kathiravan et al. 2011).

### 3.4.2 Kapacitace *in vivo* a *in vitro*

Pro čerstvě ejakulované spermie není charakteristická progresivní pohyblivost či schopnost oplodnění. Nejprve musí projít řadou biochemických a fyziologických změn, které se souhrnně nazývají kapacitace. Pouze kapacitované spermie mají výhradní schopnost prodělat akrozomální reakci a následně oplodnit vajíčko (Jin & Yang 2016). V ejakulátu jsou obvykle přítomny miliardy spermií, které tuto úlohu plní (Varner et al. 2014). Proč je ke splnění tohoto úkolu zapotřebí tak velkého množství spermií? Opověď částečně vyplývá ze skutečnosti, že oplodnění v živých organismech je ze své podstaty neefektivní proces. Pouze 0,0007 % spermií získá přístup do vejcovodu, kde dojde k oplození (Rigby et al. 2000).

Jak bylo zmíněno, ke kapacitaci *in vivo* dochází po vystavení spermií samičímu reprodukčnímu traktu, ale lze ji vyvolat i *in vitro* (Breitbart & Spungin 1997). Většina informací o různých aspektech kapacitace spermií pochází právě ze studií *in vitro*. Pro následný vývoj oplodnění *in vitro* je zapotřebí určitých faktorů, aby se spermie staly oplození schopnými (Visconti 2009). Spermie lze *in vitro* kapacitovat pomocí chemicky definovaných médií obsahujících vhodné koncentrace elektrolytů, metabolických zdrojů energie a sérového albuminu jako akceptoru cholesterolu (Naz & Rajesh 2004).

Kapacitace je pod kontrolou vnějších, tak vitálních faktorů, přičemž hlavními vnějšími signály zprostředkovávající kapacitaci jsou sterolové akceptory (tradičně albumin) a toky iontů, konkrétně  $\text{HCO}_3^-$  a  $\text{Ca}^{2+}$ . O mechanismu transportu hydrogenuhličitánů do spermií je známo velmi málo (Breitbart 2003). Tyto signální molekuly společně aktivují dráhy PKA (proteinkináza A) a PTK (tyrosinkináza), které regulují kapacitaci (Rato 2017). Kupříkladu  $\text{HCO}_3^-$ , který se váže v cytosolu, stimuluje enzym SACY (rozpustná adenylylcykláza), která katalyzuje produkci cAMP za použití ATP jako substrátu (Llera et al. 2016). Reakce na  $\text{HCO}_3^-$  je rychlá a hladina cAMP se zvýší během 60s, po němž následuje zvýšení aktivity PKA (Signorelli et al. 2012). Tento enzym je tedy nezbytnou součástí signalizačních kaskád cAMP, které aktivují motilitu spermií (Marquez & Suarez 2007). Nicméně je pozoruhodné, že molekulární podstata procesu kapacitace není stále příliš dobře pochopena, přestože od první zprávy o kapacitaci spermií uplynulo více než 50 let (Jin & Yang 2016). Během kapacitace hrají také velmi důležitou roli tzv. dekapacitační faktory, které chrání a stabilizují povrch membrány spermií tak, aby nedošlo k jejich předčasné kapacitaci, jinak by nebyly schopné dorazit do místa setkání gamet včas a oplodnit oocyt. Mezi kandidátní proteiny dekapacitačních faktorů hřebců identifikovaných ve spermiích jsou dle Swegen & Aitken (2014) zahrnovány proteiny GOT2 (aspartate aminotransferase), PEBP1 (phosphatidethanolamine binding protein 1), PEBP4 (phosphatidethanolamine binding protein 4) a CRISP-2 (cysteine-rich secretory protein).

Je však známo několik vnitrobuněčných změn, ke kterým během samotné kapacitaci dochází (Breitbart & Spungin 1997). Kapacitace zahrnuje eflux cholesterolu, zvýšení membránové fluidity, influx iontů, což vede ke změně membránového potenciálu spermií, následnému zvýšení fosforylace tyrosinu (pTyr) v proteinech, indukci hyperaktivace a akrozomové reakce (Naz & Rajesh 2004).

Kapacitaci přesněji můžeme rozdělit na rychlé a pomalé kapacitační události (Signorelli et al. 2012). Velmi časnou událostí je například aktivace pohyblivosti spermií. (Visconti 2009). Tyrosinová fosforylace proteinů je dalším bodem kapacitace, ale dochází k ní až v pozdních fázích kapacitace (Signorelli et al. 2012). V *in vitro* podmínkách je pTyr závislá na přítomnosti



BSA,  $\text{HCO}_3^-$  a  $\text{Ca}^{2+}$  v kapacitačním médiu. Konkrétně nepřítomnost některé z těchto složek média zabraňuje pTyr a samotné kapacitaci (Visconti 2009).

Změny v distribuci a složení lipidů a fosfolipidů v plazmatické membráně jsou charakteristickým znakem kapacitace spermií (Baldi et al. 2000). Plazmatická membrána je bariéra mezi vnějším a vnitřním prostředím buňky, která představuje výchozí bod kapacitace (Bailey 2010) a zajišťuje průchod různých molekul. Uvádí se, že některé z nedůležitějších změn, které provázejí proces kapacitace, se odehrávají právě na úrovni plazmatické membrány spermií, což je typická fosfolipidová dvojvrstva obsahující cholesterol, komplexní sacharidy a proteiny (Meyers 2009). Jak již bylo zmíněno, plazmatická membrána hřebčí spermie je tvořena nasycenými mastnými kyselinami a PUFA s dlouhým řetězcem. Kupříkladu kyselina dokosapentaenová je převládající PUFA ve spermiích Shetlandských hřebců (Aurich et al. 2018). Lipidy jsou uspořádány jako dvojvrstva, hydrofobní konce směřují dovnitř a hydrofilní konce jsou natočeny směrem ven. Některé z proteinů se účastní na vytváření transportních kanálů skrze membránu nebo jsou povrchovými receptory (Juhász et al. 2000). Je dobře známo, že vyplavování cholesterolu úzce souvisí s kapacitací (Jin & Yand 2017). Cholesterol je základní složkou plazmatické membrány savců, protože podporuje stabilitu membrány, aniž by snižoval její fluiditu (Leahy & Gadella 2015) a je to silný dekapacitační faktor (Aitken & Nixon 2013).

$\text{HCO}_3^-$  a  $\text{Ca}^{2+}$  řídí laterální redistribuci membránových lipidů (Maiten et al. 2021, Leahy & Gadella 2015) v apikální oblasti hlavičky spermie. Zde je cholesterol exportován z membrány spermie k akceptorům cholesterolu v extracelulární tekutině (např. albumin FAF), tím se zvýší propustnost membrány (Fujinoki 2011). Bylo prokázáno, že  $\text{HCO}_3^-$  je klíčovým efektoem tohoto procesu efluxu, protože v jeho nepřítomnosti se hladina cholesterolu v albuminu FAF nemění. Redistribuce cholesterolu je řízena bikarbonátově závislou aktivací produkce cAMP a cAMP-dependentní proteinkinázou A (PKA) (Leahy & Gadella 2015). K vyplavování cholesterolu z membrány během kapacitace významně přispívá oxidační stres (Aitken & Nixon 2013). Uvolňování cholesterolu doprovází kapacitaci spermií a koreluje se zvýšením fosforylace proteinů. Pracovní hypotéza, která odpovídá tomuto poznatku je, že aktivace raftových komplexů při uvolňování cholesterolu a regulace fosforylačních drah jsou koordinovány a tvoří součást stejné signální dráhy (Visconti et al. 2011).

Je známo, že vápník ovlivňuje různé funkce spermií, jako je pohyblivost, kapacitace a schopnost oplodnění (Mitra & Shivaji 2005). Základní proces maturace spermií je regulován především četnými signálními kaskádami a  $\text{Ca}^{2+}$  v něm hraje dynamickou roli jako intracelulární druhý posel (Rahman et al. 2014). Na rozdíl od mnoha jiných druhých poselů,  $\text{Ca}^{2+}$  je pro život nezbytný, přesto dlouhodobě vysoké intracelulární hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  vedou k apoptóze (Clapham 1995).  $\text{Ca}^{2+}$  může pocházet ze dvou zdrojů: extracelulární  $\text{Ca}^{2+}$  přiváděný přes kanály plazmatické membrány nebo  $\text{Ca}^{2+}$  uložený v organelách jako je například nadbytečný jaderný obal (RNE) (Suarez 2008). Akrozomální reakce spermií (AR), která je zásadní pro oplodnění savců, zahrnuje změny propustnosti  $\text{Ca}^{2+}$  vedoucí k exocytóze akrozomálního vezikulu. Akrozom, intracelulární zásobárna  $\text{Ca}^{2+}$ , jejíž pH je kyselé, obsahuje hydrolytické enzymy. Je známo, že akrozomální pH se během kapacitace zvyšuje, což koreluje se spontánní AR. Některé stimulatory AR zvyšují intracelulární koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  uvolňováním  $\text{Ca}^{2+}$  z vnitřních zásob, hlavně akrozomu. Předpokládá se, že Catsper a  $\text{Ca}^{2+}$  kanál specifický pro spermie se podílejí na AR (Chávez et al. 2017). CatSper umožňuje influx vápníku do bičíku

spermie, který je potřebný k přechodu symetrického pohybu bičíku k výkonnému pohybu, který se nazývá hyperaktivace. Jako hlavní vápníkový kanál je CatSper hlavní mechanismus, který přivádí extracelulární vápník do spermií a je proto životně důležitý pro plodnost spermií (Lishko & Mannowetz 2018). Catsper kanály jsou omezeny na hlavní část bičíku, zatímco RNE leží v těsné blízkosti mitochondrií na bázi střední části mitochondriální pochvy (Suarez 2008). Influx  $\text{Ca}^{2+}$  může být také vyvolán mobilizací  $\text{Ca}^{2+}$  prostřednictvím receptorů inositol-1,4,5-trifosfátu a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázy (Rato 2017).

### 3.4.3 PKA a tyrosinová fosforylace proteinů spermií

V eukaryotických buňkách je jedním z nejběžnějších mechanismů regulace aktivity proteinů přidávání nebo odstraňování fosfátových skupin ze serinových, treoninových nebo tyrosinových zbytků. Přidání nebo odstranění fosfátových skupin může vyvolat alosterické modifikace, které vedou ke konformačním změnám v proteinech, a to buď k jejich aktivaci nebo inaktivaci (Naz & Rajesh 2004). Spermie v podstatě nesyntetizují proteiny, takže dynamická povaha proteomu spermií bude částečně záviset na získávání nových proteinů z prostředí a díky posttranslačním modifikacím proteinů již vytvořených (Rato 2017). Fosforylace proteinů je přísně regulovaný proces, který je řízen protichůdným působením proteinkináz a fosfatáz (Diviani & Scott 2001). Ačkoli ve spermiích byla zaznamenána jak fosforylace serinu a treoninu, tak pTyr je velmi důležitá a může být hlavním nebo dokonce výhradním ukazatelem signálních transdukčních drah v buňce (Naz & Rajesh 2004). Fosforylace tyrosinových zbytků na proteinech spermií je jedním z faktorů, které ovlivňují důležitý vnitrobuněčný mechanismus regulující funkci spermií, který může být významným ukazatelem kapacity (Pommer et al. 2003). Jak již bylo zmíněno, zralé spermie jsou transkripčně klidné, což znamená, že za účelem změny funkce proteinů podporující procesy kapacity, procházejí tyto proteiny cyklem fosforylace a defosforylace (Bernecic et al. 2019). K podpoře kapacity a zvýšení fosforylace jsou zapotřebí  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a cholesterol (Lopez-Úbeda & Matás 2015). Je naznačováno, že zvýšení fosforylace proteinů je podmíněno syntézou cAMP a aktivací PKA (Visconti et al. 2011), skládající se ze dvou regulačních podjednotek (PKA-R) a dvou katalytických podjednotek (PKA-C). Aktivita PKA je závislá na aktivitě adenylátcykláz a fosfodiesteráz (Naz & Rajesh 2004). Podjednotky PKA-R působí jako receptory cAMP a umožňují aktivitu PKA-C. Jakmile je PKA aktivní, dochází ke zvýšení pTyr proteinů spermií nepřímou aktivací tyrosinkináz (Graf et al. 2020). Také aktivace PKA vede ke zvýšení polymerace aktinu, což je nezbytný proces pro rozvoj hyperaktivované motility (Ickowicz et al. 2012). Ve skutečnosti hraje PKA v regulaci pohyblivosti spermií přinejmenším dvě nezávislé role, „rychlé“ působení je nutné pro aktivaci rytmu bičíku a „pomalé“ působení, jako je změna symetrie vlnění bičíku, což vyžaduje aktivitu PKA po delší dobu (Signorelli et al. 2012). *In vitro* inkubace hřebčích spermií za definovaných podmínek dle McPartlin et al. (2008) vedla ke zjištění, že přítomnost BSA a  $\text{HCO}_3^-$  v médiu byly kritickými složkami pro pTyr. Při studiu účinku každé z těchto složek zvlášť bylo zjištěno, že BSA je nutný k udržení pohyblivosti spermií i k podpoře zvýšení pTyr. Navíc, když bylo BSA nahrazeno jinou bílkovinou, kaseinem, byla pohyblivost rovněž zachována, ale nedošlo však ke zvýšení fosforylace tyrosinu v proteinech.

Na základě experimentů (Pommer et al. 2003) došlo k porovnání pTyr a pohyblivosti hřebčích spermií po *in vitro* kapacitaci u čerstvého a kryokonzervovaného ejakulátu. Imunofluorescenční značení ukázalo, že procento spermií, u kterých byla zvýšena fluorescence v bičíku u čerstvých a kryokonzervovaných spermií se zvýšilo po 1 h inkubace v médiu v přítomnosti aktivátorů motility (dibutyryl cAMP a kofein), ve srovnání s jejich příslušnými vzorky inkubovanými 0 h a 1 h bez přítomnosti aktivátorů. Motilita spermií se během 1 h inkubace nezměnila ani u čerstvých, ani u kryokonzervovaných spermií s nebo bez dibutyryl cAMP a kofeinu. Bylo zjištěno, že přítomnost aktivátorů významně zvýšila procento buněk vykazujících fosforylaci u čerstvých a kryokonzervovaných spermií. Kromě toho byl účinek aktivátorů větší u životaschopných buněk po zmrazení ve srovnání s čerstvými, protože procento buněk vykazující imunofluorescenci spojenou s bičíkem bylo přibližně 100 % oproti 70 %. Toto zvýšení fosforylace u kryokonzervovaných spermií podporuje hypotézu o změnách plazmatické membrány a navíc ukazuje, že integrita signálních transdukčních drah zahrnujících PKA není narušena (Pommer et al. 2003).

Mezi proteiny, které jsou fosforylovány během kapacitace patří AKAP proteiny (Varner & Johnson 2007), chaperony, jako jsou proteiny tepelného šoku, HSP-90, HSP-70, HSP-60 a endoplazmin (erp99), a protein obsahující valosin (VCP/p97), který by mohl hrát roli jako spojovací článek mezi kapacitací a akrozomální reakcí (Naresh & Atreja 2015).

#### 3.4.3.1 Proteiny kotvící PKA (AKAP) a jejich funkce

AKAP jsou rodinou proteinů, které mají společnou schopnost ukotvit kinázy závislé na cAMP (tj. PKA) na specifické subcelulární oblasti (Turner et al. 2005). AKAP hrají důležitou roli jak v samčích, tak i v samičích reprodukčních systémech, zejména během procesu gametogeneze, ale i motility, kapacitace a akrozomální reakce (Carnegie et al. 2009). Některé z AKAP jsou typické pro somatické buňky, ale jiné jsou specificky exprimovány v samičích a samčích gametách (Luconi et al. 2011). U savců bylo nalezeno asi 50 AKAP (Wong & Scott 2004). AKAP také regulují širokou škálu signálních molekul a buněčných procesů. Většina AKAP může vázat spektrum proteinů, včetně fosfatáz, receptorů spřažených s G-proteiny, iontových kanálů (Xu & Qi 2014). AKAP však obecně nezprostředkovávají přímo šíření signálu. Místo toho fungují jako „lešení“, které moduluje signalizaci mezi jednotlivými vazebnými partnery. (Greenwald & Saucerman 2011). Původně byly AKAP pojmenovány podle své zdánlivé molekulové hmotnosti (Skroblin et al. 2010), nyní se označují podle čísla genu (Johnson et al. 2012).

Ačkoli se liší pro konkrétní sekvence, které umožňují interakci s různými cíli, mají AKAP společné klíčové vlastnosti (Luconi et al. 2011), a to doménu vázající PKA, jedinečnou lokalizační sekvenci a schopnost vytvářet vysokomolekulární komplexy s dalšími signálními proteiny. V rámci samčího reprodukčního traktu mezi nejvýznamnější AKAP patří izofomy AKAP3 a AKAP4, které jsou jedinečně exprimovány spermatidami a spermii. Převážně jsou lokalizovány v bičíku a podílejí se na pohyblivosti spermií. Kromě AKAP3 a AKAP4, které jsou hlavní složkou vláknité pochvy cytoskeletálních struktur bičíku spermií, se k nim přidávají také AKAP220, S-AKAP84 a WAVE-1, jejichž exprese se také objevuje během spermatogeneze (Luconi et al. 2011). Podrobný popis hlavních AKAP proteinů podílejících se na samčí reprodukci viz. obr. číslo 6.

Oficiální název	Role	Tkáňová exprese	Buněčná lokalizace
WAVE-1	vývoj akrozomu, motilita spermií	samčí pohlavní buňky	Golgiho aparát, mitochondrie
AKAP3	motilita spermií, akrozomální reakce	spermatidy	vláknitá pochva, akrozom
AKAP4	motilita spermií	spermatidy	vláknitá pochva
AKAP3	vazba na oocyt	spermatidy	vnější povrch spermie
AKAP1	mitochondrie	spermatidy	mitochondrie
AKAP11	motilita spermií	samčí pohlavní buňky	cytosol, centrozom, střední část bičíku

Obrázek 6. *AKAP podílející se na samčí reprodukci (modifikováno dle Luconi et al. 2011).*

AKAP tvoří základ cAMP signalizace. Cyklický AMP (cAMP) slouží jako druhý posel různých biologických drah. Většina, ale ne všechny signály přenesené cAMP, jsou zprostředkovány fosforylačními reakcemi katalyzovanými PKA. Přechodné zesílení signálu poskytovaného cAMP je zajištěno dvěma cykly fosforylace proteinů. První z nich je katalyzován cAMP-dependentní proteinkinázou. Ta fosforyluje a aktivuje fosforylázovou kinázu, která zase fosforyluje a aktivuje glykogenfosforylázu (Gomperts et al. 2003). V nepřítomnosti cAMP je PKA neaktivní (Gomperts et al. 2003) a existuje jako stabilní tetramer složený ze dvou katalytických (C) a dvou regulačních (R) podjednotek. Každá regulační podjednotka je schopna vázat dvě molekuly cAMP (Rababa'h et al. 2014). PKA jsou často navázány na AKAP, které je umísťují na specifická subcelulární místa, a tak poskytují mechanismus pro určení, které proteiny se fosforylují (Miki et al. 2002). Fosforylace proteinů reguluje nejen AKAP kompartmentalizaci, ale dokonce ovlivňuje aktivitu ukotvených enzymů, u nichž dochází k fosforylačním-defosforylačním procesům. Nejdůležitější je, že fosforylace AKAP může ovlivnit složení ukotveného komplexu tím, že reguluje vazbu specifických partnerů (Luconi et al. 2011). Tyrosinová fosforylace AKAP3 po stimulaci  $\text{HCO}_3^-$  a inhibici aktivity fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) pomocí chemické látky LY294002 vedlo ke zvýšené vazbě PKA a její kompartmentalizaci ve vláknité pochvě bičíku spermie, což nakonec vedlo ke stimulaci motility spermií (Luconi et al. 2005). AKAP se mohou lokalizovat do různých subcelulárních oblastí jako je plazmatická membrána, Golgiho aparát, centrozom, jádro, mitochondrie a cytosol, kde organizují vysokomolekulární struktury a spojují produkci cAMP, kinázy, fosfatázy a jejich substráty (Luconi et al. 2011). Regulace lokalizace a složení AKAP komplexů lze dosáhnout i různými molekulárními mechanismy. Konkurence mezi vazebnými partnery může ovlivnit pohyb AKAP. Například aktin a PKA RII soupeří o stejnou vazebnou doménu na WAVE-1 (Westphal et al. 2000).

AKAP jsou schopné vázat D/D doménu, kterou obsahují všechny regulační podjednotky PKA: RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$  a RII $\beta$  (Burgers et al. 2012). Proteiny interagující s D/D doménou využívají k vazbě amfipatický helix. Ne všechny AKAP se ale vážou na D/D doménu prostřednictvím amfipatického helixu. Mezi tyto AKAP patří proteiny, jako je pericentrin, jehož vazebná doména je delší, sestávající z 100 aminokyselin. Jedná se o nehelikální oblast bohatou na leucin (Skroblin et al. 2010). Nicméně existují rozdíly ve specifčnosti AKAP

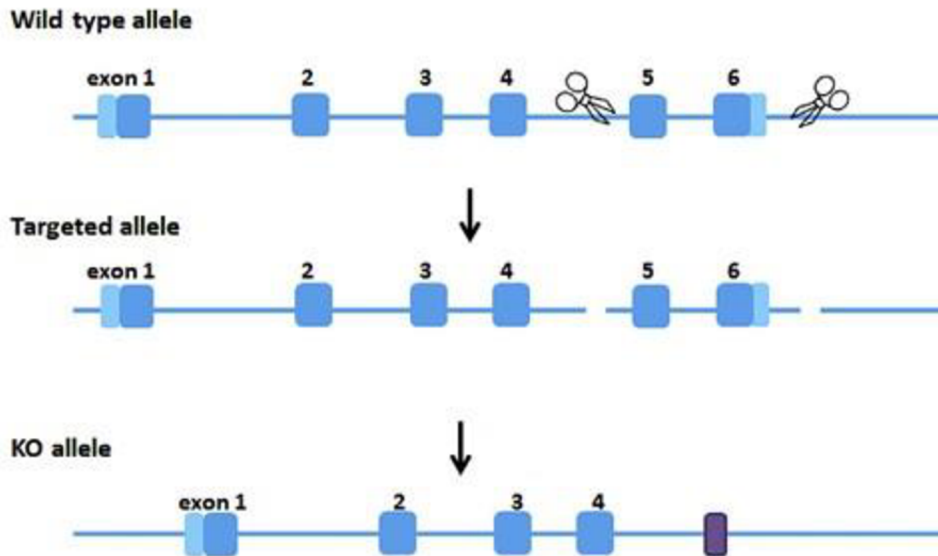
s ohledem na vazbu podjednotek RI a RII (Skroblin et al. 2010). Většina členů AKAP se váže na podjednotku PAK-RII (Poppinga et al. 2014). Bylo identifikováno ale i několik AKAP s duální specificitou, které se vážou na oba podtypy PKA, PKA-RI a PKA-RII. Patří mezi ně D-AKAP1 a D-AKAP2 (Beene & Scott 2007).

#### 3.4.3.2 *proAKAP4/AKAP4 a jejich role v motilitě spermií*

Vláknitá pochva je jedinečná cytoskeletální struktura, která se nachází v hlavní části bičíku spermie a nejhojnějším proteinem ve vláknité pochvě je právě AKAP4 (Brown et al. 2003). AKAP4 hraje ústřední roli ve struktuře bičíku, chemotaxi, kapacitaci a motilitě spermií. U savců je AKAP4 exprimován během postmeiotické fáze spermatogeneze (Miki et al. 2002) a je syntetizován jako prekurzor, proAKAP4, který je během vytváření vláknité pochvy štěpen na zralý AKAP4 (Blommaert et al. 2019). ProAKAP4 a AKAP4 byly u hřebců detekovány ve vzorku spermatu a v izolovaných spermiích, ale nikoli v seminální plazmě (Blommaert et al. 2019).

Bylo prokázáno, že AKAP4 se podílí na kompartmentalizaci PKA v bičíku u několika druhů (Leeb et al. 2005). Novější studie poukazují, že množství proAKAP4 odráží schopnost spermií udržet aktivitu a funkčnost bičíku až do místa oplodnění (Dordas-Perpinya et al. 2022). Vztahu mezi koncentrací proAKAP4 a parametry pohyblivosti hřebčích spermií se zabývala Dordas-Perpinya et al. (2022), kdy byl analyzován ejakulát od 13 různých hřebců. Motilita jednotlivých hřebců byla hodnocena pomocí systému CASA a samotná koncentrace proAKAP4 byla vyhodnocena metodou ELISA. Podle koncentrace proAKAP4 byly vytvořeny dvě skupiny, a to s nízkou (rozmezí 5,06 – 35,61 ng/10<sup>6</sup> spermií) nebo vysokou (rozmezí 39,92 – 82, 23 ng/10<sup>6</sup> spermií) koncentrací proAKAP4. Procento celkového počtu pohyblivých spermií bylo významně nižší u ejakulátů s nízkou koncentrací proAKAP4 ve srovnání s ejakuláty s vysokou koncentrací. Naopak procento progresivně pohyblivých spermií se nelišilo mezi ejakuláty s nízkou nebo vysokou koncentrací proAKAP4. Čím pomalejší byly spermie, tím nižší byla koncentrace proAKAP4 naměřena (Dordas-Perpinya et al. 2022).

Omezená časoprostorová exprese AKAP4 poskytuje jedinečnou příležitost využít testování modelu „lešení“ a zjištění, jak ztráta AKAP4 ovlivňuje složení vláknité pochvy a funkci spermií (Miki et al. 2002). U myší populace byl proveden knockout (KO) genu pro AKAP4 pomocí CRISPR-Cas9 (obr. č. 7). U linií myší s KO genu pro AKAP4 byla zaznamenána produkce normálního počtu spermií, ale tyto spermie nicméně nevykazovaly progresivní pohyblivost a samci byli neplodní (Fang et al. 2019).



Obrázek 7. Schématické znázornění vytváření KO pomocí CRISPR-Cas9. Mutace byla vytvořena odstraněním exonu 5 a exonu 6 (Fang et al. 2019).

Miki et al. (2002) zjistil, že samci, kterým chyběl AKAP4, byli neplodní. Pohyblivost spermií byla snížena, hlavní část bičíku byla výrazně zmenšena v průměru a vláknitá pochva byla neúplně vyvinutá. Za možné vysvětlení těchto změn se nabízí, že PKA již nebyla ukotvena v blízkosti cílových proteinů, které se podílejí na regulaci aktivity bičíku, či došlo k významným strukturálním změnám vláknité pochvy. Nicméně byla položena otázka, zda je ukotvení PKA nutné pro samotnou funkci spermií (Miki et al. 2002).

## 4 Metodika

### 4.1 Biologický materiál pro analýzu

Ejakulát použitý pro účely této diplomové práce poskytl Zemský hřebčinec v Písku s.p.o. Celkem byli odebráni tři teplokrevní hřebci (hřebci č. 1, 2. a 3.) mimo reprodukční sezónu. Okamžitě po odběru byl ejakulát laboratorně posouzen, zředěn za použití průmyslového ředidla INRA 96 (IMV Technologies, Francie), obsahující antibiotika penicilin a gentamycin a antimykotikum amfortericin B a následně převezen v chladicím boxu do laboratoře KVD a BTÚ AVČR k dalšímu zpracování.

	VZOREK	DATUM ODBĚRU	
HŘEBEC Č. 1	1 <sub>1</sub>	7.2. 2023	■ před sezónou
HŘEBEC Č. 1	1 <sub>2</sub>	22.2. 2023	
HŘEBEC Č. 2	2 <sub>1</sub>	15.2. 2023	
HŘEBEC Č. 3	3 <sub>1</sub>	16.10. 2023	■ postreprodukční období
HŘEBEC Č. 2	2 <sub>2</sub>	16.10. 2023	
HŘEBEC Č. 3	3 <sub>2</sub>	30.10. 2023	
HŘEBEC Č. 2	2 <sub>3</sub>	30.10. 2023	
HŘEBEC Č. 3	3 <sub>3</sub>	6.11. 2023	
HŘEBEC Č. 2	2 <sub>4</sub>	6.11. 2023	

### 4.2 Hodnocení motility spermií pomocí systému CASA

#### 4.2.1 Příprava vzorků a využití Computer Assisted Sperm Analysis

Pro odpočet motility spermií na CASA systému (ISAS, Arquimea Group, S.A. Španělsko; Laboratoř reprodukční biologie, BTÚ AVČR) byl z každé inseminační dávky odebrán reprezentativní vzorek o objemu 1 ml do kónické mikrozkuhavky Safe-Lock Eppendorf o objemu 1,5 ml. Následně byly vzorky ponechány na vyhřevné destičce po dobu 10 minut při 37,5 °C pro rozvinutí optimální motility nutné k objektivnímu posouzení parametrů motility pomocí systému CASA. Poté byly pipetovány jednotlivé vzorky o objemu 2 µl do separovaných komůrek mikroskopického skla Leja 8/20 B. V programu CASA byl změněn analyzovaný druh na koně a došlo k nastavení počtu snímaných snímků na 50. Mikroskopická skla byla po celou dobu analýzy umístěna na mikroskopickém vyhřevném stolku pro udržení optimální teploty, snímání proběhlo při zvětšení 10x. Následně došlo k postupnému snímání šesti odlišných ploch napříč jednotlivými komůrkami pro stanovení objektivních parametrů motility daného vzorku. Systém poskytl podrobná data o celkové motilitě, kinematických parametrech a koncentraci daných vzorků.

## 4.3 Fluorescenční mikroskopie

### 4.3.1 Příprava mikroskopických preparátů

Celkové objemy inseminačních dávek byly jednotlivě rozpipetovány po 5 ml do označených falkon o objemu 15 ml. Průmyslové ředidlo INRA96 bylo odstraněno centrifugací (17 °C, 700xg, 7 minut). Sediment spermií byl celkem 3x promyt roztokem PBS (Phosphate-buffered saline, Sigma-Aldrich, USA) po 5 ml, opakovaně stáčen a odstraněn supernatant. Poté bylo přidáno 5 ml fyziologického roztoku (0,9% roztok NaCl) a sediment spermií byl šetrně rozmíchán. Za použití PAP Pen liquid blocker (Sigma-Aldrich, USA) byly vytvořeny dva hydrofobní prstence na mikroskopických sklíčkách. Z připravené suspenze spermií bylo pipetováno 20 µl roztoku do jednotlivých prstenců, u první poloviny mikroskopických sklíček byla provedena fixace spermií okamžitým přidáním 50 µl vymraženého roztoku aceton:metanol v poměru 1:1, u zbývající poloviny mikroskopických sklíček pouze acetonem o objemu 50 µl. Inkubace vzorků probíhala za laboratorní teploty po dobu 5 minut. Následně byly vzorky 3x promyty fyziologickým roztokem a šetrně osušeny buničinou. Takto jednotlivě připravená mikroskopická sklíčka pro účely imunofluorescenční mikroskopie byla uložena do specializovaných kazet a z důvodu dlouhodobého uchování umístěna do chladničky. Následující den byly preparáty 1x omyty pomocí PBS. Do jednotlivých prstenců byl přidán blokační pufr Super blocking buffer v PBS (Thermo Fisher Scientific, USA) o objemu 100 µl, blokace probíhala při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Poté byly preparáty 1x opláchnuty PBS (Phosphate-buffered saline, Sigma-Aldrich, USA). Následně proběhla inkubace biotinem značeného lektinu (WGA, MAL II, SNA; Vector Laboratories, Inc., USA) rozpoznávající sialovou kyselinu vázanou v glykanech ředěného v HEPES pufru (10 mM HEPES, pH 7,5; 0,15 M NaCl; 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,01 mM MnCl<sub>2</sub>) v poměru 1:300. Do levého hydrofobního prstence bylo nanášeno 80 µl. Pravý hydrofobní prstenc se vzorkem spermií sloužil jako negativní kontrola, kde bylo nanášeno pouze 100 µl HEPES pufru. V druhém případě proběhla inkubace s myší monoklonální protilátkou proti fosfotyrosinu (klon 4G10, Millipore Corporation, USA) ředěného v PBS v poměru 1:300. Do levého hydrofobního prstence bylo nanášeno 80 µl roztoku a do pravého hydrofobního prstence bylo nanášeno 100 µl PBS jako negativní kontroly. V případě použití myší monoklonální protilátky Anti-AKAP4 (klon 7E10, SPQI S.A.S – Company, Francie), rozpoznávající C-koncovou oblast AKAP4, bylo do levého hydrofobního prstence nanášeno 50 µl roztoku a do pravého prstence 100 µl PBS na buňky. Vzorky byly následně vloženy do vlhké komůrky a inkubovány přes noc při 4°C. Následující den byly preparáty 1x omyty PBS a inkubovány v případě lektinů se streptavidin konjugovaným s fluorochromem FITC (Thermo Fisher Scientific, USA) vázající biotin, ředěným v poměru 1:300, na oba hydrofobní prstence byl nanášen objem 100 µl. Na mikroskopická sklíčka s primární protilátkou 4G10 a Anti-AKAP4 byla nanášena sekundární protilátka proti myším IgG (Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488; Invitrogen, USA) ředěná v poměru 1:300. Na preparáty bylo napipetováno 100 µl. Preparáty byly následně inkubovány po dobu 45 minut ve vlhké komůrce. Po uplynutí doby inkubace byly preparáty 1x omyty PBS. Následně bylo provedeno značení akrozomu pomocí PNA lektinu konjugovaného s rhodaminem (PNA-rhodamine, Vector Laboratories, Inc., USA). Do obou prstenců bylo nanášeno 100 µl roztoku ředěného 1:500 v PBS na buňky. Inkubace probíhala ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Poté byly preparáty 1x omyty PBS a následně destilovanou vodou a šetrně



osušeny buničinou. Poté bylo do každého prstence naneseo 7  $\mu$ l montovacího média s DAPI (Vectashield Plus Antifade Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, Inc., USA) k vizualizaci jádra spermií a preparáty byly přikryty krycím sklíčkem. Po 10–15 minutách byly preparáty hodnoceny pod epifluorescenčním mikroskopem (Nikon Eclipse E600, Japonsko) a obrázky snímány v programu NIS Elements.

#### **4.4 Western blot detekce**

##### **4.4.1 Příprava vzorků**

Výše vytvořené suspenze spermií s fyziologickým roztokem byly rozpipetovány po 1,5 ml do kónických mikrozkuvek o objemu 1,5 ml. Následně bylo provedeno stočení všech vzorků (700xg, 10 minut). Supernatant byl odstraněn a k peletě spermií byl přidán Laemmli pufr (Bio-Rad, USA) pro SDS elektroforézu s inhibitory fosfatáz a proteáz (Pierce<sup>TM</sup> Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets, EDTA-Free, Thermo Scientific, USA) o objemu 1:2. K vzorkům hřebce č. 1, 3, 4, 5 a 7 byl přidán vzorkový pufr o objemu 150  $\mu$ l, k vzorku č. 2 bylo přidáno 50  $\mu$ l, k vzorkům č. 6 a 9 bylo přidáno 500  $\mu$ l a k vzorku č. 8 bylo přidáno 400  $\mu$ l vzorkového pufru. Následně byly vzorky rozsuspendovány pomocí Vortex V-1plus (Biosan) a umístěny do ledu, kde proběhla lyzace po dobu 30 minut. Po uplynutí doby byla připravená nová sada mikrozkuvek o objemu 1,5 ml. Jednotlivé výchozí sady vzorků byly rozděleny na poloviční objem do nově připravených zkuvek. Jedna sada vzorků byla označena jako R – redukující podmínky a druhá sada vzorků byla označena jako N – neredukující podmínky. Sada se vzorky připravovanými za redukujících podmínek obsáhla všech 9 vzorků jednotlivých hřebců. Sada za neredukujících podmínek obsáhla 8 vzorků bez vzorku č. 2 z důvodu příliš malé pelety spermií, která neumožnila vytvoření dostatečně velkého množství extraktu nutného pro obě sady vzorků. Následně byly redukující vzorky (95 °C, 5 minut) a neredukující vzorky (38 °C, 5 minut) inkubovány v Termo-shaker TS-100 (Biosan). Obě sady byly stočeny (10 000xg, 2 minuty). Vzniklý supernatant byl odpipetován do nových zkuvek a řádně označen. K vzorkům připravených za redukujících podmínek byl dodatečně přidán merkaptoethanol do finální 5% koncentrace. K vzorkům č. 1, 3, 4, 5 a 7 byl přidán objem odpovídající 5  $\mu$ l, ke vzorku č. 2 byly přidány 3  $\mu$ l, ke vzorkům č. 6 a 9 bylo přidáno 15  $\mu$ l a ke vzorku č. 8 bylo přidáno 12  $\mu$ l. Následně došlo k vortexování a opětovnému povaření (95 °C, 5 minut) v Termo-shaker. Pro detekci AKAP4 a PTyr byly použity vzorky připravené za redukujících podmínek a pro detekci lektiny byly použity vzorky za neredukujících podmínek.

#### 4.4.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Byl vytvořen 12% polyakrylamidový separační gel.

Chemikálie potřebné k výrobě 12% separačního gelu a 4% zaostřovacího gelu:

- destilovaná H<sub>2</sub>O
- N, N, N', N' - Tetramethylethylenediamine (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris pufr B (Resolving Gel Buffer, 1,5M Tris-HCl, pH 8,8, Bio-Rad, USA)
- Tris pufr C (Stacking Gel Buffer, 0,5M Tris-HCl, pH 6,8, Bio-Rad, USA)
- 10 % SDS (Sigma-Aldrich, USA)
- Acrylamide/bis-acrylamide 30% solution (Bio-Rad, USA)
- 10 % APS (persíran amonný, Serva, Německo)

Postupně byl namíchán roztok pro vytvoření dvou separačních gelů přidáním výše zmíněných látek: 3,5 ml H<sub>2</sub>O, 2,5 ml pufr B, 4 ml 30 % akrylamid, 100 µl 10 % SDS, 4,5 µl tetramethylethylenediamine a 70 µl 10 % APS. Roztok byl napipetován po 5 ml mezi elektroforetická skla a převrstven H<sub>2</sub>O. Tuhnutí separačního gelu probíhalo při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po uplynutí doby byl namíchán 4% zaostřovací gel sestávající z následujících látek: 1,5 ml H<sub>2</sub>O, 625 µl pufr C, 325 µl 30 % akrylamid, 25 µl 10 % SDS, 3,8 µl tetramethylethylenediamine a 50 µl 10 % APS. Po přidání poslední látky byla odlita navrstvená H<sub>2</sub>O a napipetován 1 ml připraveného roztoku zaostřovacího gelu mezi elektroforetická skla na již ztuhlý separační gel. Následovně byl zanořen hřebínek pro vytvoření 12 jamek pro aplikaci vzorků. Po uplynutí doby potřebné pro tuhnutí zaostřovacího gelu (asi 30 minut) byla elektroforetická skla umístěna do elektroforetické aparatury. Následně byl přidán elektronového pufr (v ředění 1:5, Tris 15 g, glycin 72 g, SDS 5 g, doplněno do 1 l H<sub>2</sub>O) do elektroforetické nádoby a šetrnému vysunutí hřebínku. Pomocí Hamiltonovy pipety byly nejdříve nanесeny 2 µl hmotnostního standardu (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards, Dual Color, Bio-Rad, USA) a následně nanесeno 10 µl jednotlivých vzorků. Poté byla aparatura připojena ke zdroji napětí (Electrophoresis Power Supply – EPS 1001) a nastaveno napětí 80 V na 30 minut a následně zvýšeno na 150 V přibližně na dobu 1 hodiny.

#### 4.4.3 Elektropřenos proteinů

Po ukončení elektroforézy byl proveden elektropřenos proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu (Millipore Corporation, USA). V první řadě byly připraveny pro každý gel po 2 kusech houbiček, 4 kusech filtračního papíru Whatman (Chromatography paper, GE Healthcare, USA), 1 nitrocelulózová membrána a samotná kazeta. V průběhu skládání kazety bylo vše uchováno v transférovém pufru (3,03 g Tris, 14,4 g glycin ve 200 ml H<sub>2</sub>O, 200 ml methanolu a doplněno do 1 l H<sub>2</sub>O) při laboratorní teplotě. Přesný postup skládání kazety: černá strana kazety, houbička, 2 kusy filtračního papíru, gel, nitrocelulózová membrána, 2 kusy filtračního papíru a houbička. Následně byla kazeta uzavřena a umístěna do nádoby určené k elektropřenosu. Dvě nádoby celkem se čtyřmi kazetami byly naplněny transférovým pufrům a připojeny ke zdroji, kde byl nastaven konstatní elektrický proud na 1 A. Elektropřenos probíhal 1 h a během něj byly nádoby chlazeny ledem.

#### 4.4.4 Detekce proteinů a sialových kyselin

##### 4.4.4.1 Inkubace proteinů s protilátkami Anti-AKAP4 (klon 7E10) a 4G10

Po uplynutí doby potřebné k elektropřenosu byly kazety vyjmuty a nitrocelulóзовые membrány byly omyty destilovanou vodou a barveny na proteiny roztokem Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA). Ponceau bylo aplikováno po dobu 1 minuty. Následně byla membrána 1x omyta destilovanou vodou a PBS s 0,1 % Tween pro odstranění zabarvení proteinů. Mezitím byl připraven 5% roztok mléka (Trans-Blotto, non-fat dry milk, Santa Cruz Biotechnology, USA) v destilované vodě. Inkubace membrány probíhala při laboratorní teplotě po dobu 45 minut na třepače DLAB SK-L180-E. Po uplynutí doby byla membrána omyta PBS s 0,1 % Tween a aplikována primární protilátka Anti-AKAP4 (klon 7E10, SPQI S.A.S – Company, Francie) ředěná 1:5000 v 5 ml PBS, myší monoklonální protilátka proti fosfotyrosinu (klon 4G10, Millipore Corporation, USA) ředěná 1:500 v 1 ml PBS. Pro negativní kontrolu bylo na membránu naneseno pouze 5 ml PBS. Membrány byly inkubovány při 4°C přes noc. Poté byly membrány 3x omyty PBS s 0,1 % Tween po dobu 10 minut a aplikována sekundární protilátka proti myším Ig (Goat Anti – Mouse IgG (H+L) - HRP Conjugate; Bio-Rad) ředěné 1:3000 v 3 ml PBS. Inkubace probíhala při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny, následně byly membrány 5x k promyty PBS s 0,1 % Tween.

##### 4.4.4.2 Inkubace proteinů s WGA, MAL II, SNA lektiny

Membrány se vzorky připravenými za neredukujících podmínek byly po stejně jako v případě inkubace s protilátkou obarveny pro přítomnost proteinů. Po odbarvení membrán byla volná místa na membránách blokována pomocí 5% roztoku želatiny (Sigma-Aldrich) v destilované vodě přes noc při 4°C. Druhý den byla membrána omyta PBS s 0,1 % Tween. Následně byly aplikovány biotinem značené lektiny WGA, MAL II a SNA (Vector Laboratories, Inc., USA) ředěných v konečné koncentraci 1 µg/ml v 5 ml HEPES pufru na jednotlivé membrány a jejich inkubace probíhala při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin. Poté byly membrány 3x omyty PBS s 0,1 % Tween a inkubovány s avidin-peroxidázou (Sigma Aldrich, USA) v koncentraci 1 µg/ml ve 3 ml PBS na jednotlivé membrány. Inkubace probíhala při pokojové teplotě po dobu 45 minut, poté byly membrány 5x promyty PBS s 0,1 % Tween a připraveny k detekci. Pro detekci signálu reakce s protilátkami a lektiny byl použit přístroj Azure c300 (Azure Biosystems) s využitím chemiluminiscenčního substrátu (SuperSignal West Pico PLUS, Thermo Scientific, USA) v poměru 1:1, který byl aplikován na jednotlivé membrány před samotnou detekcí.

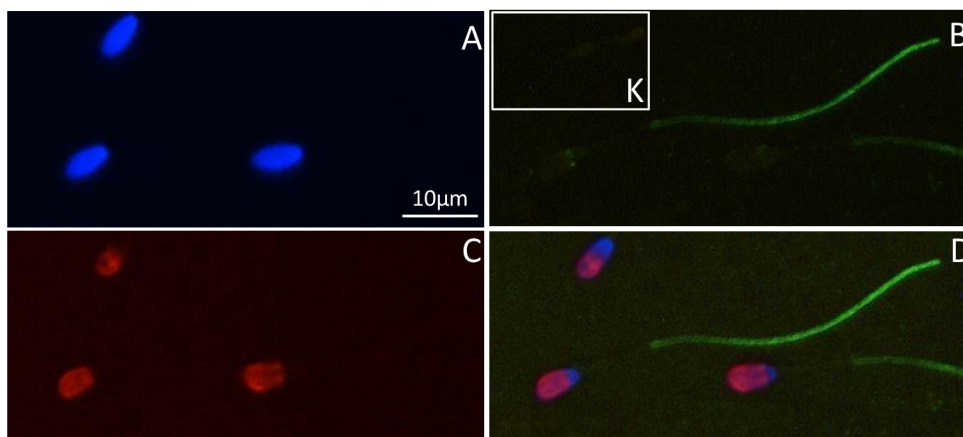
#### 4.4.5 Analýza dat

Jednotlivé hodnoty denzity byly k dalšímu zpracování vypočteny v programu Image Studio Digits Ver 4.0. Následná denzitometrická analýza probíhala v programu GraphPad Prism 5. Pro porovnání souboru statistických dat byly použity dva hlavní neparametrické testy, jednofaktorová ANOVA (Kruskalův-Wallisův test) a t-test (Mann-Whitneyův test). Pro statistické vyhodnocení motility pomocí CASA byl využit dvoufaktorový test ANOVA.

## 5 Výsledky

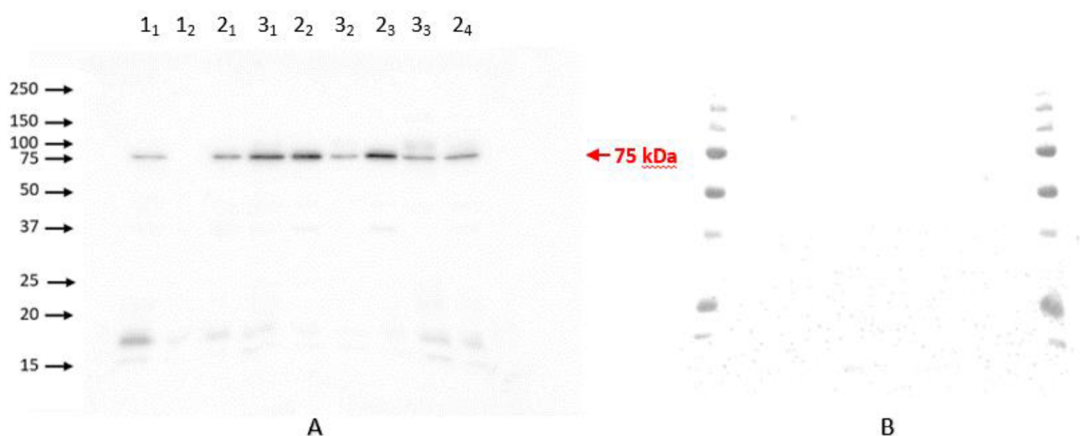
### 5.1 Lokalizace a detekce AKAP4 v hřebčích spermích

Vizualizace vazby s protilátkou Anti-AKAP4 (klon 7E10) na spermích fixovaných aceton-metanolem je zaznamenána na obrázku 8. Pozitivní signál lze vidět v hlavní části bičíku (obr. 8B) u spermíí s neporušeným akrozomem vizualizovaným pomocí PNA lektinu (obr. 8C). V negativní kontrole nebyl zaznamenán žádný zelený fluorescenční signál (obr. 8K).



Obrázek 8. **Detekce proteinu AKAP4 na spermích hřebce č. 2:** **A** – jádra značená DAPI (modře), **B** – pozitivní reakce s protilátkou Anti-AKAP (klon 7E10) (zeleně), **C** – akrozomy značené PNA (červeně), **D** – prolnuté snímky (DAPI, Anti-AKAP4, PNA), **K** – negativní kontrola. Zvětšení 400x, měřítko 10 µm.

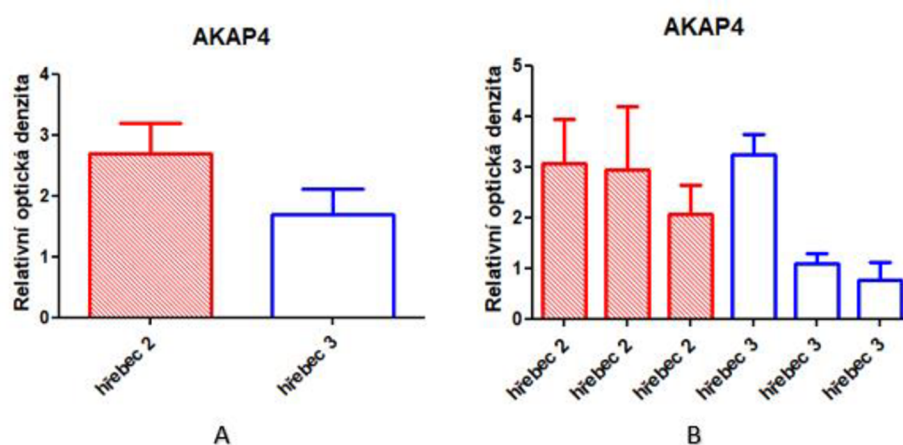
Obrázek 9A ukazuje detekci proteinu AKAP4 v extraktu spermíí od jednotlivých hřebců z několika odběrů. U všech hřebců byl detekován proteinový proužek o přibližné molekulové hmotnosti (mol. hm.) 75 kDa. U všech vzorků byla zvolena stejná nanáška proteinů. U hřebce 1 z 2. odběru ( $1_2$ ), byla detekce velmi slabá. Na obrázku 9B je ukázána negativní kontrola, kde nebyl zaznamenán žádný nespecifický signál.



Obrázek 9. **Detekce proteinu AKAP4 v extraktu spermíí:** **A** – nitrocelulózová membrána s glykoproteiny detekovanými pomocí protilátky Anti-AKAP (klon 7E10), **B** – negativní kontrola;  $1_1$ ,  $1_2$ ,  $2_1$ ,  $3_1$ ,  $2_2$ ,  $3_2$ ,  $2_3$ ,  $3_3$ ,  $2_4$  označuje čísla vzorků ID jednotlivých hřebců. Vzorky  $1_1$ ,  $1_2$ ,  $2_1$  byly odebrány z počátku reprodukční sezóny, vzorky  $3_1$ ,  $2_2$ ,  $3_2$ ,  $2_3$ ,  $3_3$ ,  $2_4$  byly odebrány v postreprodukčním období.

Na obrázku 10 lze vidět statistické vyhodnocení výsledků denzitometrické analýzy intenzity signálu u detekovaného AKAP4 proteinu o 75 kDa. Hodnoty ukazují srovnání intenzity signálu u hřebce 2 a hřebce 3. U hřebce 2 byl detekován silnější průměrný signál AKAP4 než u hřebce 3 (obr. 10A). Naměřené hodnoty byly vždy vztaženy k hřebci 1, který nebyl do výsledků zahrnut z důvodu odběrů pouze v předsezónním období, ale posloužil nám jako standard pro normalizaci jednotlivých měření. Hodnocení imunodetekce proteinu AKAP4 bylo opakováno třikrát. Rozdíl v množství detekovaného AKAP4 mezi hřebci 2 a 3 nebyl vyhodnocen jako statisticky významný ( $p > 0,05$ ).

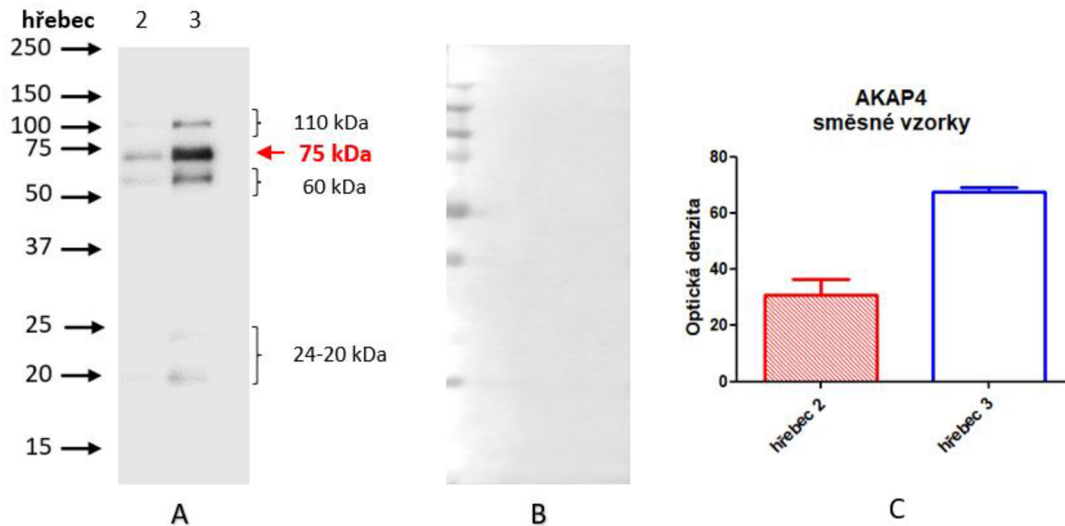
Na obrázku 10B je znázorněna intenzita signálu u hřebce 2 a hřebce 3 z jednotlivých odběrů v postreprodukčním období. Pokles detekovaného množství AKAP4 v posledních dvou odběrech u hřebce 3 byl výrazný, a to více jak o polovinu. Nicméně ani rozdíl mezi hřebci ani odběry nebyl vyhodnocen jako statisticky významný ( $p > 0,05$ ).



Obrázek 10. **A** – intenzita signálu AKAP4 proteinu,  $p > 0,05$ . **B** – intenzita signálu AKAP4 proteinu z jednotlivých odběrů,  $p > 0,05$ . Odchytky mezi jednotlivými měřeními jsou znázorněny jako střední chyba průměru (SEM).

Na obrázku 11A je znázorněna detekce proteinu AKAP4 v extraktu spermií směsných vzorků. Směsné vzorky byly vytvořeny pro smazání individuality jednotlivých odběrů a získání ucelené informace o množství proteinu AKAP4 ve spermiích jednotlivých hřebců. Na nitrocelulózové membráně u obou hřebců byl detekován proteinový proužek o mol. hm. 75 kDa jako tomu bylo u jednotlivých odběrů. Navíc byly detekovány proteiny o 65 a 110 kDa a objevil se signál také kolem 20 a 25 kDa. Intenzivnější proužek byl v obou opakováních zaznamenán u hřebce 3. Součástí obrázku 11 je kontrolní negativní detekce bez primární protilátky (11B).

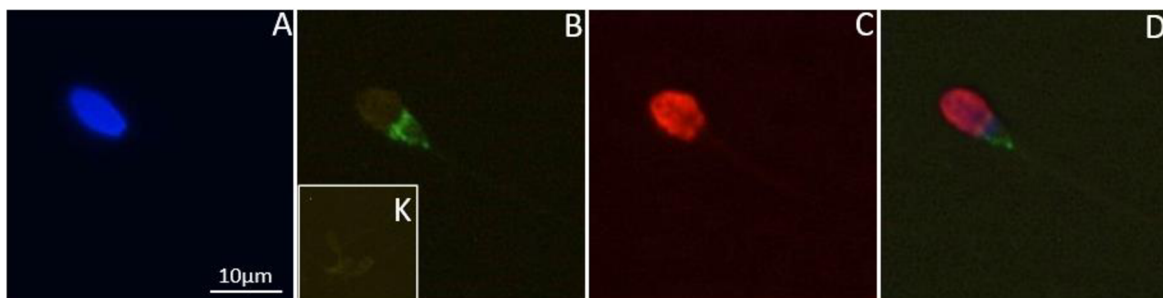
Na obrázku 11C je statistické vyhodnocení denzitometrické analýzy detekce proteinu AKAP4 v rámci směsných vzorků proteinových extraktů spermií od hřebce 2 a 3. Denzitometrická analýza potvrdila intenzivnějšího signál u hřebce 3 než u hřebce 2 a rozdíl v množství detekovaného proteinu AKAP4 mezi hřebci nebyl vyhodnocen jako statisticky významný ( $p > 0,05$ ).



Obrázek 11. *Detekce proteinu AKAP4 v extraktu spermií směsných vzorků ID hřebce 2 a hřebce 3: A – nitrocelulózová membrána s glykoproteiny detekovanými pomocí protilátky Anti-AKAP (klon 7E10), B – negativní kontrola bez primární protilátky, C – intenzita signálu protilátky pro AKAP4 u směsných vzorků ze všech odběrů,  $p > 0,05$ . Odchyšky mezi jednotlivými měřeními jsou znázorněny jako střední chyba průměru (SEM).*

## 5.2 Detekce a lokalizace fosforylovaných proteinů značených protilátkou 4G10

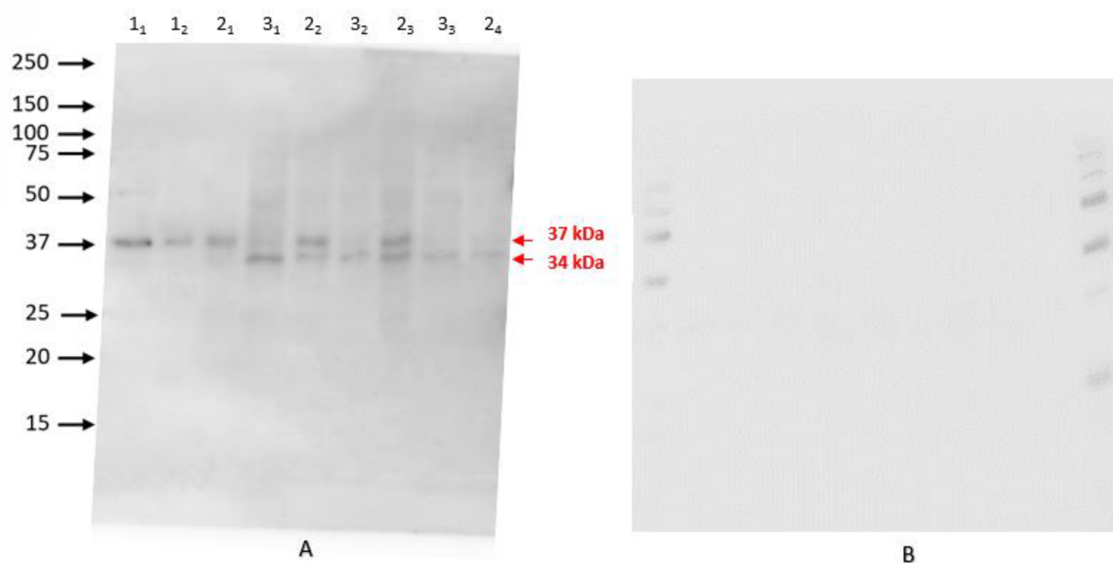
Na hřebcích spermiích, které byly fixovány pomocí aceton-metanolu, byl nalezen bodový signál v post-akrozomální oblasti hlavičky (obr. 12B) odpovídající proteinům fosforylovaným na tyrosinu (pTyr). Tento signál byl zaznamenán na spermiích s nepoškozeným akrozomem vizualizovaným pomocí PNA lektinu (obr. 12). Detekovaný vzor signálu byl shodný u obou hřebců. V negativní kontrole nebyl zaznamenán žádný zelený fluorescenční signál (obr. 12K).



Obrázek 12. *Detekce fosfotyrosinu na spermiích hřebce č. 3: A – jádro značeno DAPI (modře), B – pozitivní reakce s protilátkou proti fosfotyrosinu (4G10) (zeleně), C – akrozom značený PNA (červeně), D – prolnuté snímky (DAPI, 4G10, PNA), K – negativní kontrola. Zvětšení 400x, měřítko 10  $\mu$ m.*

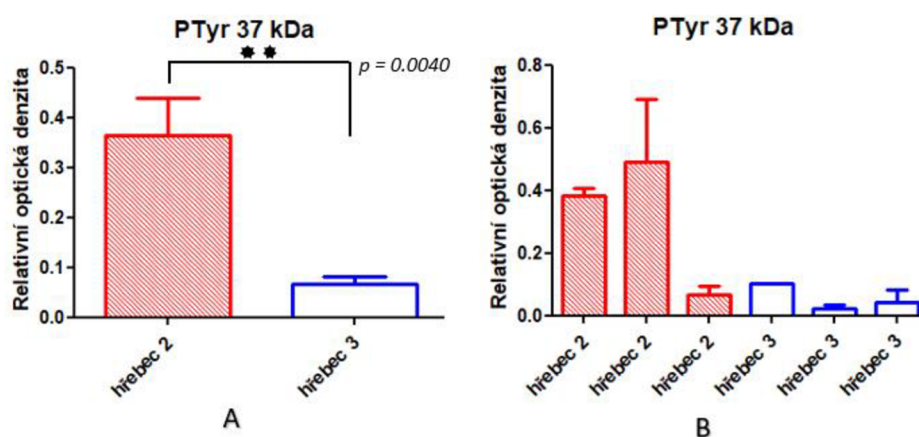
K detekci fosfotyrosinu v extraktu spermií byla použita myší monoklonální protilátka 4G10. Na obrázku 13A je zobrazena nitrocelulózová membrána s detekovanými fosforylovanými proteiny o mol. hm. 37 kDa a 34 kDa, které se plošně vyskytovaly v extraktech spermií o různé intenzitě u všech hřebců. Tyto 2 fosforylované proteiny byly

viditelné při všech opakováních detekce, které bylo provedeno celkem 3x. Součástí obrázku je kontrolní negativní detekce bez primární protilátky (obr. 13B).



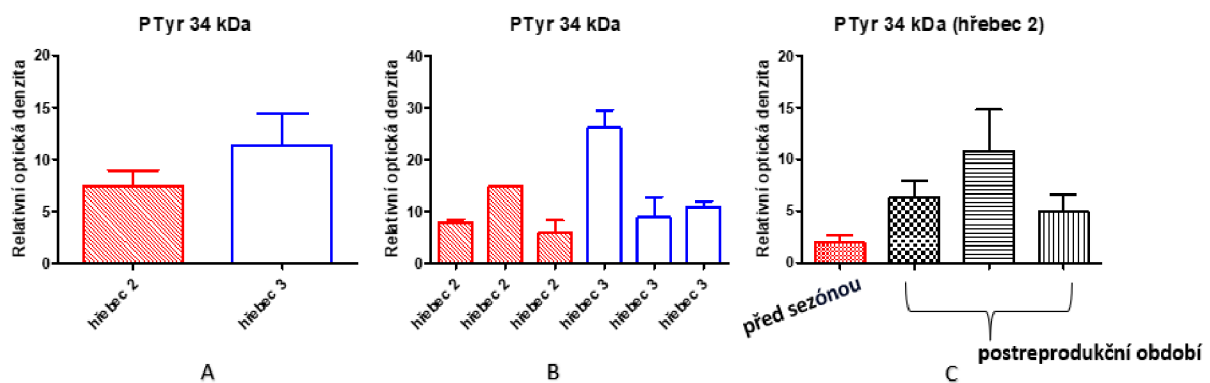
Obrázek 13. **Detekce fosfotyrosinu v extraktu spermii:** **A** – nitrocelulózová membrána s proteiny detekovanými pomocí protilátky proti fosfotyrosinu (4G10), **B** – negativní kontrola bez primární protilátky; 1<sub>1</sub>, 1<sub>2</sub>, 2<sub>1</sub>, 3<sub>1</sub>, 2<sub>2</sub>, 3<sub>2</sub>, 2<sub>3</sub>, 3<sub>3</sub>, 2<sub>4</sub> označuje čísla vzorků ID jednotlivých hřebců.

Na obrázku 14 je statistické vyhodnocení denzitometrické analýzy intenzity signálu fosfotyrosinu na proteinu o mol. hm. 37 kDa vztaženém k hřebci 1 ve třech opakováních. Obrázek 14A znázorňuje porovnání signálu mezi jednotlivými hřebci. Pokles v množství fosfotyrosinu u hřebce 3 byl výrazný a základě analýzy byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými hřebci,  $p = 0,0040$ . Obrázek 14B znázorňuje intenzitu signálu fosfotyrosinu o mol. hm. 37 kDa z jednotlivých odběrů z postreprodukčního období. Nejvyšší míra signálu je zaznamenána u hřebce číslo 2. Zde je vidět, že intenzita signálu se rapidně snižovala s odstupem času. Mezi jednotlivými odběry neexistuje statisticky významný rozdíl.



Obrázek 14. **A** – denzitometrická analýza intenzity signálu 37 kDa fosfoproteinu,  $p < 0,01$ . **B** – denzitometrická analýza intenzity signálu 37 kDa fosfoproteinu z jednotlivých odběrů,  $p > 0,05$ . Odchylky mezi jednotlivými měřeními jsou znázorněny jako střední chyba průměru (SEM).

Na obrázku 15 je statistické vyhodnocení denzitometrické analýzy intenzity signálu proteinu o mol. hm. 30 kDa fosforylovaném na tyrosinu. U obrázku 15A je viditelný rozdíl v intenzitě signálu detekovaného fosfoproteinu mol. hm. 30 kDa u hřebce číslo 3 v porovnání s intenzitou signálu fosfotyrosinu 37 kDa, který byl u stejného hřebce výrazně nízký. Nicméně tento rozdíl není statisticky významný ( $p > 0,05$ ). Na obrázku 15C je zaznamenáno porovnání intenzity signálu na počátku reprodukční sezóny a v postreprodukčním období. Je viditelný rozdíl v intenzitě signálu na počátku reprodukční sezóny, kdy docházelo k „nastartování“ organismu na nadcházející intenzivní reprodukční sezónu a v postreprodukčním období, kdy ještě přetrvávala zvýšená intenzita signálu fosfotyrosinu 30 kDa, která nicméně kolísala v rámci odběrů.



Obrázek 15. **A** – intenzita signálu 30 kDa proteinu,  $p > 0,05$ . **B** – intenzita signálu 30 kDa proteinu z jednotlivých odběrů,  $p > 0,05$ . **C** – komparace intenzity signálu hřebce číslo 2 na začátku reprodukční sezóny a v postreprodukčním období,  $p > 0,05$ . Odchytky mezi jednotlivými měřeními jsou znázorněny jako střední chyba průměru (SEM) (střední chyba průměru).

### 5.3 Lokalizace sialové kyseliny v glykanech spermií

Vizualizace vazby sialové kyseliny v glykoproteinech spermií byla provedena pouze u inseminačních dávek (ID) od hřebce 2 a hřebce 3 z postreprodukční sezóny z důvodu opakovaných odběrů u těchto hřbců.

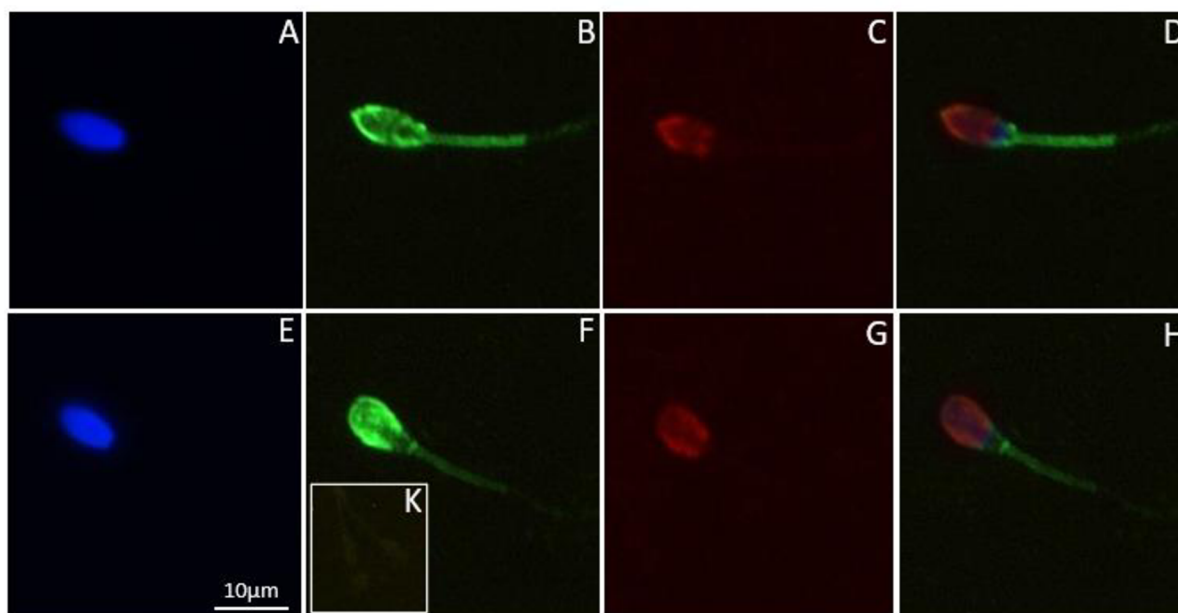
Ke značení jader spermií bylo použito fluorescenční barvivo DAPI (modré značení), vizualizace vazby biotinylovaných lektinů WGA, MAL II a SNA byla provedena pomocí streptavidinu konjugovaného s fluorochromem FITC (zelené značení), akrozomy byly značeny PNA lektinem konjugovaným s rhodaminem (červené značení). Jednotlivé detekce jsou obohaceny o prolnuté snímky (DAPI, lektin, PNA) a negativní kontroly (K). Standardně bylo u všech detekcí použito zvětšení 400x.



### 5.3.1 Detekce sialových kyselin v hřebčích spermích

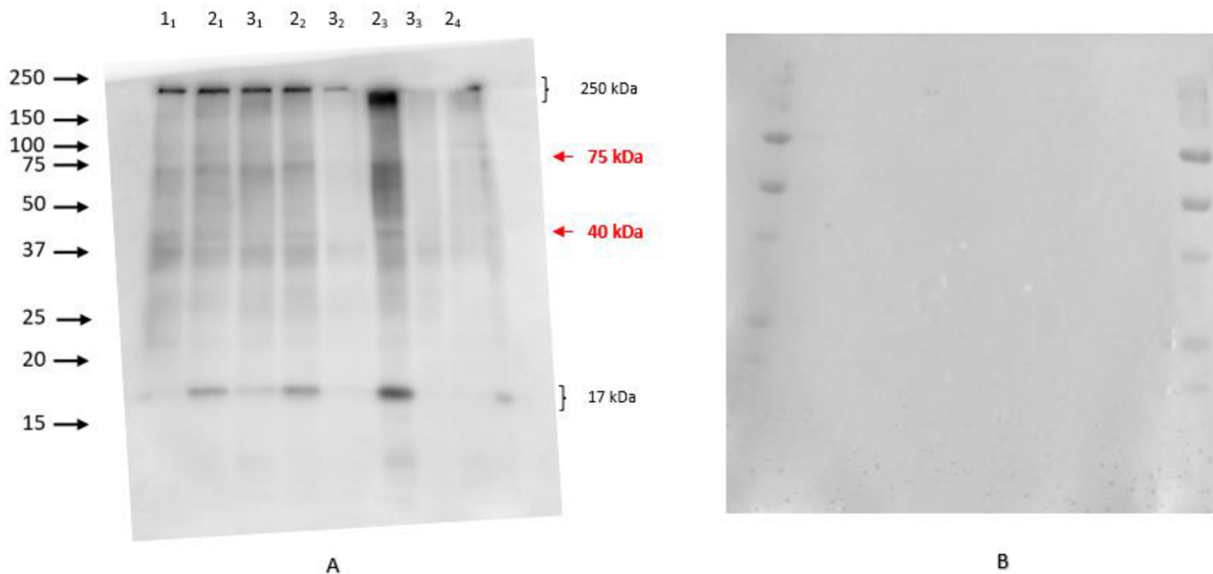
#### 5.3.1.1 Lokalizace sialové kyseliny pomocí WGA lektinu

Vzory detekované pro vazbu s WGA lektinem rozpoznávajícím N-acetylglukosaminové a sialované sacharidové struktury v glykanech po fixaci spermií acetonem jsou znázorněny na obrázku 16. Detekce signálu byla zaznamenána po celé hlavičce spolu se značením ve střední části bičíku (obr. 16B), ale byl také detekován signál pouze v hlavičce samotné (obr. 16F). Detekovaný vzor signálu byl shodný u obou hřebců. Na snímku jsou zobrazeny spermie s neporušeným akrozomem detekovaným pomocí PNA lektinu (obr. 16C, G). V negativní kontrole nebyl zaznamenán žádný zelený fluorescenční signál (obr. 16K).



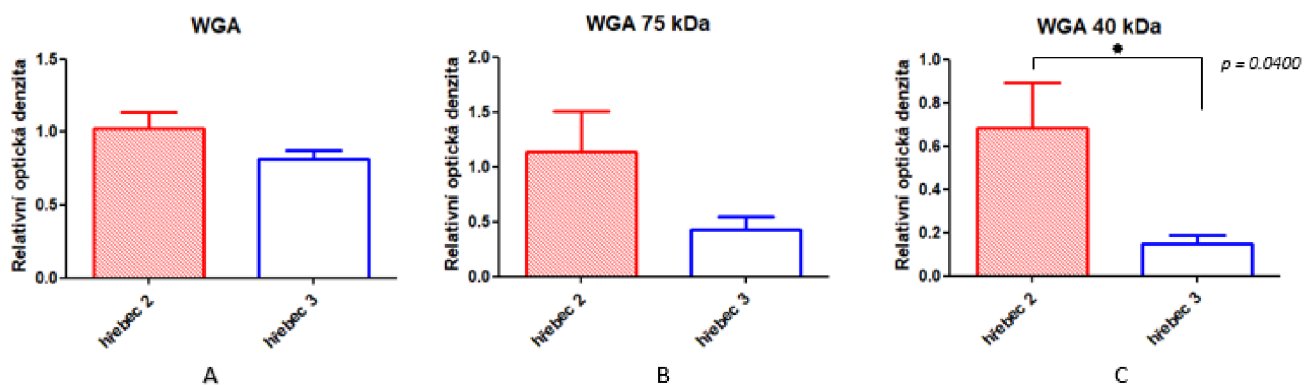
Obrázek 16. *Detekce sialové kyseliny a N-acetylglukosaminu na spermích hřebce č. 3: A, E – jádra značená DAPI (modře), B, F – pozitivní reakce s WGA lektinem (zeleně), C, G – akrozomy značené PNA (červeně), D, H – prolnuté snímky (DAPI, WGA, PNA), K – negativní kontrola. Zvětšení 400x, měřítko 10 μm.*

Obrázek 17 znázorňuje detekci sialové kyseliny a N-acetylglukosaminu pomocí WGA lektinu. Detekovány byly proteinové proužky o mol. hm. 75 kDa a 40 kDa o různě kolísavé intenzitě signálu. Dále byly identifikovány proteinové proužky odpovídající přibližné hodnotě 250 kDa a 17 kDa. Součástí je obrázek 17B kontrolní negativní detekce.



Obrázek 17. **Detekce sialových kyselin a N-acetylglukosaminu v extraktu spermii:** **A** – nitrocelulósová membrána s glykoproteiny detekovanými pomocí lektinu WGA, **B** – negativní kontrola bez biotinem značeného lektinu; 1<sub>1</sub>, 2<sub>1</sub>, 3<sub>1</sub>, 2<sub>2</sub>, 3<sub>2</sub>, 2<sub>3</sub>, 3<sub>3</sub>, 2<sub>4</sub> označuje čísla vzorků ID jednotlivých hřebců.

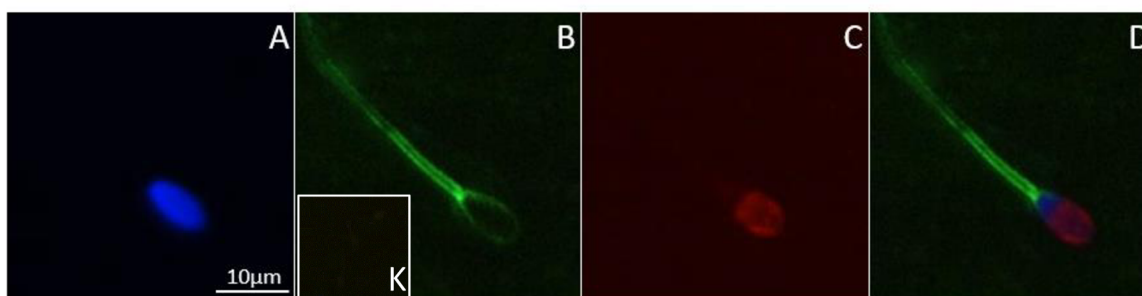
Na obrázku 18 je statistické vyhodnocení denzitometrické analýzy intenzity detekce signálu sialové kyseliny a N-acetylglukosaminu pomocí WGA lektinu. Na obrázku 18A není signifikantní rozdíl ( $p > 0,05$ ) v intenzitě signálu celkové detekce těchto sacharidových struktur. Obrázek 18B znázorňuje intenzitu signálu glykoproteinového proužku o mol. hm. 75 kDa, zde je znatelný rozdíl v míře signálu, kdy byl výrazný pokles zaznamenán u hřebce 3, ale není zde statisticky významný rozdíl ( $p > 0,05$ ). Na obrázku 18C je vidět porovnání intenzity signálu detekovaného glykoproteinu o mol. hm. 40 kDa. Zde byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi hřebcem 2 a hřebcem 3,  $p = 0,0400$ .



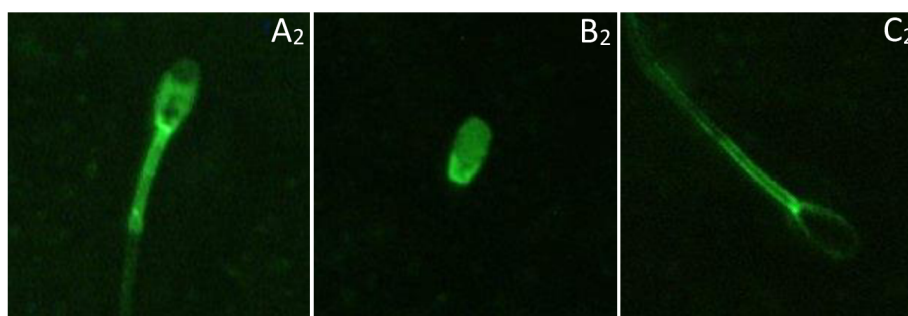
Obrázek 18. **A** – intenzita celkového signálu detekovaného WGA lektinem,  $p > 0,05$ . **B** – intenzita signálu 75 kDa glykosylovaného proteinu,  $p > 0,05$ . **C** – intenzita signálu 40 kDa glykoproteinu,  $p < 0,05$ . Odchytky mezi jednotlivými měřeními jsou znázorněny jako střední chyba průměru (SEM) (střední chyba průměru).

### 5.3.1.2 Lokalizace sialové kyseliny pomocí MAL II lektinu

Vzory detekované pro vazbu s MAL II lektinem při fixaci spermií acetonem jsou znázorněny na obrázku 19 a obrázku 20. Celkem byly detekovány tři vzory (obr. 20). Vzor typický pro hřebce 3 byl zaznamenán na bičíku, především v jeho střední části, spolu s obrysem hlavičky spermie (C<sub>2</sub>). Zatímco u hřebce 2 byly detekovány dva vzory, střední část bičíku spolu s detekcí na hlavičce (A<sub>2</sub>) a signál pouze v oblasti hlavičky (B<sub>2</sub>). V negativní kontrole nebyl zaznamenán žádný zelený fluorescenční signál (obr. 19K).

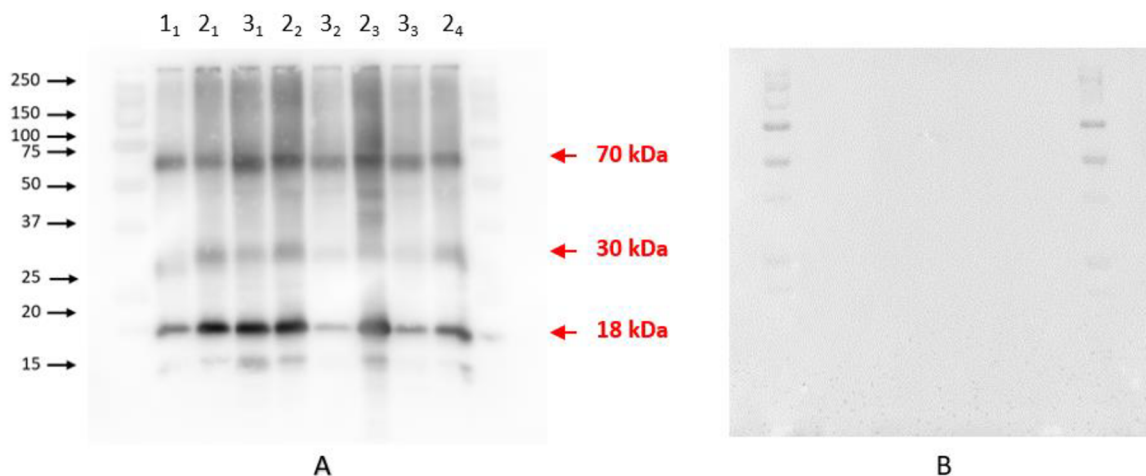


Obrázek 19. **Detekce  $\alpha$ -2,3 vázané kyseliny sialové na spermích hřebce č. 3:** **A** – jádro značeno DAPI (modře), **B** – pozitivní reakce s MAL II lektinem, **C** – akrozom značený PNA (červeně), **D** – prolnuté snímky (DAPI, MAL II, PNA), **K** – negativní kontrola. Zvětšení 400x, měřítko 10 $\mu$ m.



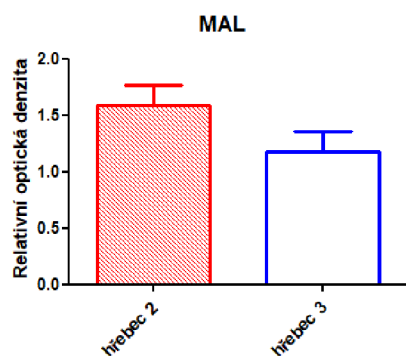
Obrázek 20. **Porovnání rozdílného signálu značení MAL II lektinu u hřebce č. 2 a hřebce č. 3:** **A<sub>2</sub>** – signál v střední části bičíku s hlavičkou, **B<sub>2</sub>** – signál pouze v oblasti hlavičky, **C<sub>2</sub>** – signál na převážné části bičíku s obrysem hlavičky spermie.

WB analýza  $\alpha$ -2,3 vázané kyseliny sialové pomocí MAL II lektinu ukázala u jednotlivých hřebců glykosylované proteinové proužky o mol. hm. 70 kDa, 30 kDa a intenzivnější 18 kDa (obr. 21). Na obrázku 21B je ukázána negativní kontrola, kde nebyl zamenán žádný nespecifický signál.

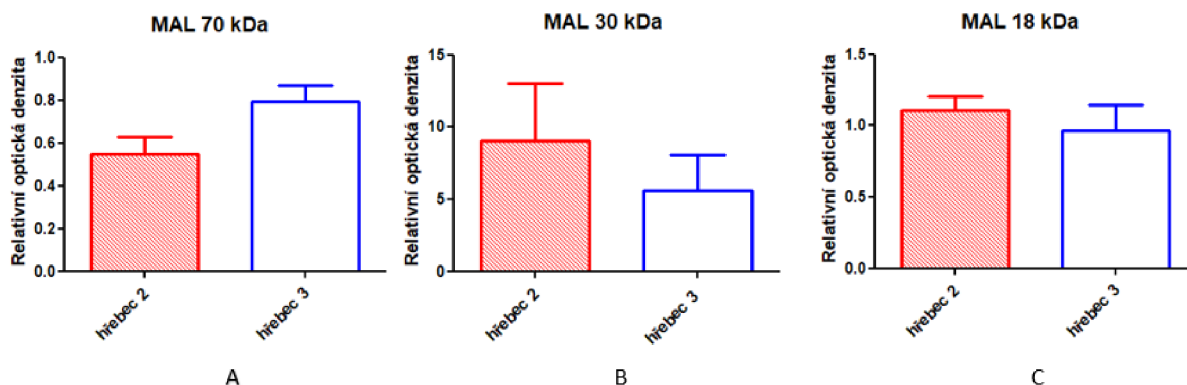


Obrázek 21. **Detekce sialových kyselin v extraktu hřebčích spermii:** **A** – nitrocelulózová membrána s glykoproteiny detekovanými pomocí lektinu *MAL II*, **B** – negativní kontrola bez biotinylovaného lektinu; 1<sub>1</sub>, 2<sub>1</sub>, 3<sub>1</sub>, 2<sub>2</sub>, 3<sub>2</sub>, 2<sub>3</sub>, 3<sub>3</sub>, 2<sub>4</sub> označuje čísla vzorků ID jednotlivých hřebců.

Na obrázku 22 je statistické vyhodnocení denzitometrické analýzy intenzity signálu  $\alpha$ -2,3 vázané kyseliny sialové detekované pomocí MAL II. Obrázek 22 znázorňuje intenzitu signálu celkové míry sialylace proteinů spermii, nejvyšší signál byl zaznamenán u hřebce 2. Obrázek 23A znázorňuje intenzitu signálu u detekovaného proteinu o mol. hm. 70 kDa, v tomto případě dosahoval signál vyšších hodnot u hřebce 3. Naopak u hodnocení intenzity signálu u sialoproteinů o mol. hm. 30 kDa a 18 kDa (obr. 23B, C) byla míra sialylace vyšší u hřebce 2. Žádná z následujících denzitometrických analýz nezaznamenala statisticky významný rozdíl mezi intenzitou signálu MAL II ve spermii obou hřebců.

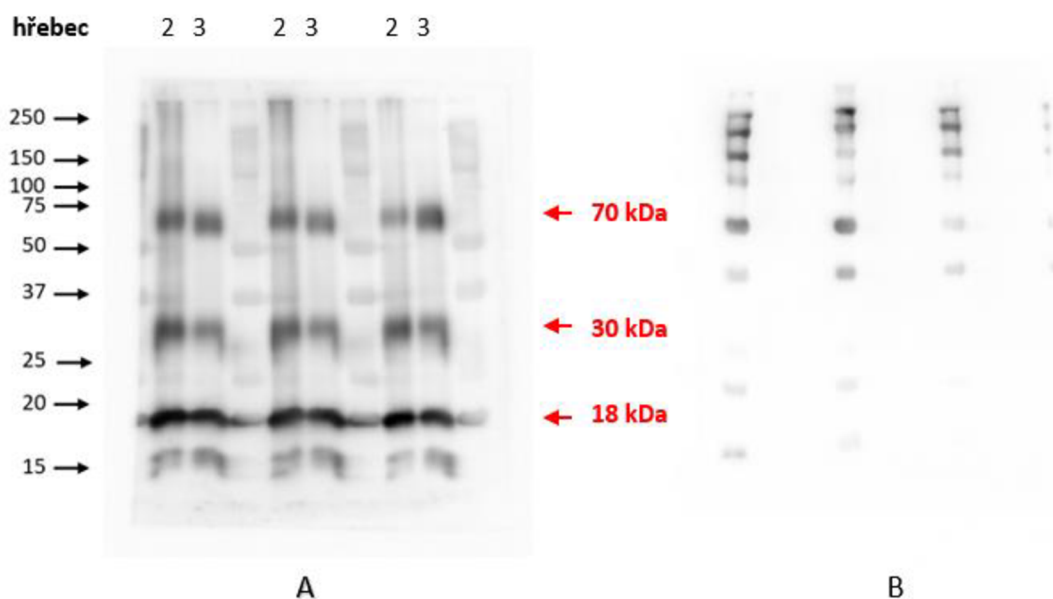


Obrázek 22. – **Intenzita signálu celkové míry sialylace detekované MAL II lektinem**,  $p > 0,05$ . Odchyly mezi jednotlivými měřeními jsou znázorněny jako střední chyba průměru (SEM) (střední chyba průměru).



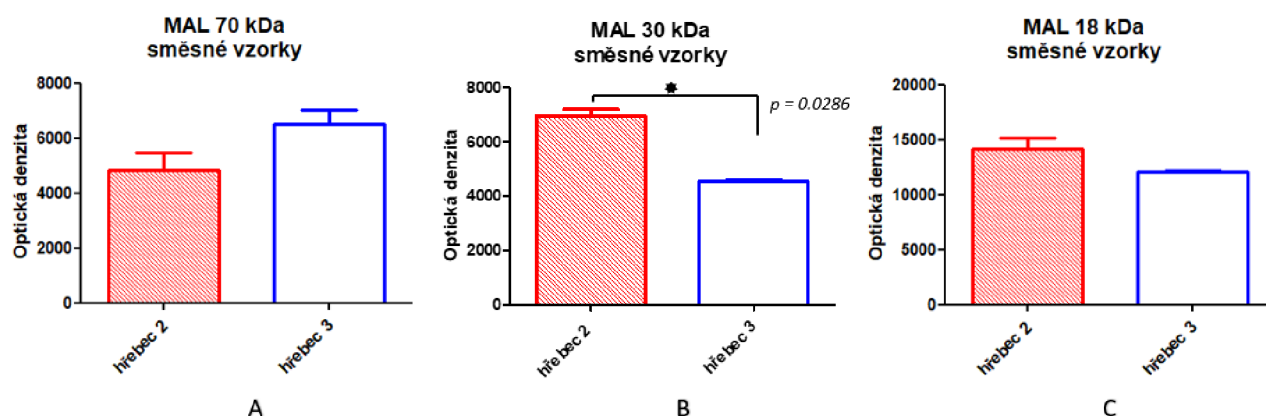
Obrázek 23. **A** – intenzita signálu proteinu 70 kDa,  $p > 0,05$ . **B** – intenzita signálu proteinu 30 kDa,  $p > 0,05$ . **C** – intenzita signálu proteinu 18 kDa,  $p > 0,05$ . Odchylky mezi jednotlivými měřeními jsou znázorněny jako střední chyba průměru (SEM).

Obrázek 24 znázorňuje nitrocelózovou membránu s detekovanými glykoproteiny pomocí MAL II lektinu o mol. hm. 70 kDa, 30 kDa a 18 kDa ve směsných vzorcích. Nejintenzivnější signál byl opět detekován u proteinového proužku o mol. hm. 18 kDa u obou hřebců. Součástí je membrána s kontrolní negativní detekcí na obrázku 24B bez biotinem značeného lektinu.



Obrázek 24. **Detekce sialových kyselin v extraktu spermií směsných vzorků ID hřebce č. 3 a hřebce č. 2:** **A** – nitrocelulózová membrána s glykoproteiny detekovanými pomocí lektinu MAL, **B** – negativní kontrola.

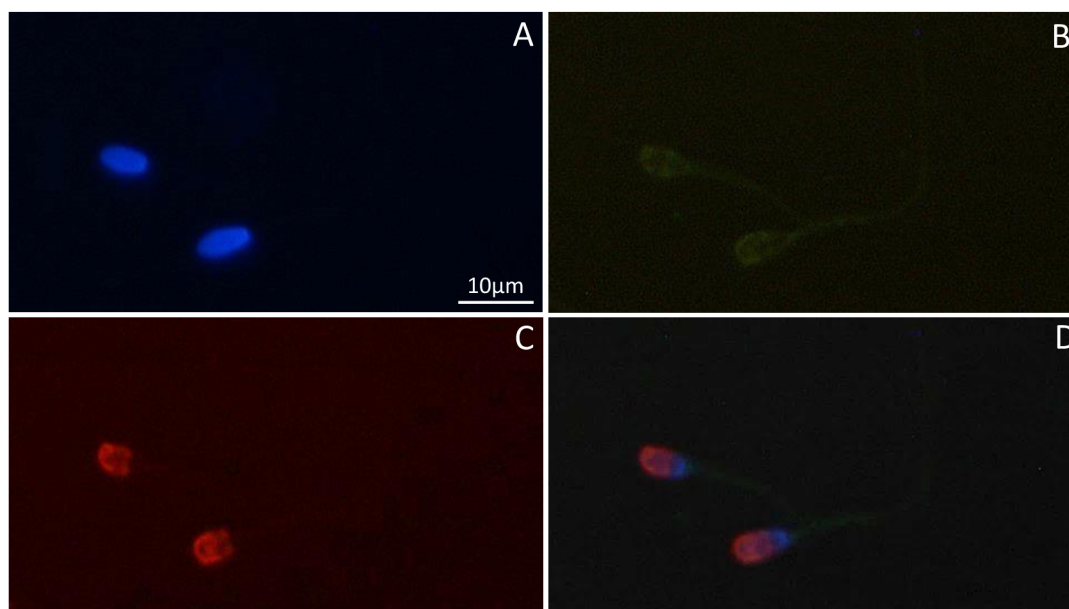
Na obrázku 25 je statistické vyhodnocení denzitometrické analýzy intenzity signálu  $\alpha$ -2,3 vázané kyseliny sialové pomocí MAL II lektinu ve směsných vzorcích o mol. hm. 70 kDa, 30 kDa a 18 kDa. V míře sialylace proteinů spermií o 70 a 18kDa nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi hřebci ( $p > 0,05$ ). Naopak u glykoproteinu o 30kDa (obr. 25B) existuje statisticky významný rozdíl v sialylaci mezi hřebcem 2 a hřebcem 3 ( $p = 0,0286$ ).



Obrázek 25. **Intenzita signálu MAL II lektinu u směsných vzorků.** **A** – intenzita signálu sialoproteinů 70 kDa,  $p > 0,05$ . **B** – intenzita signálu sialoproteinů 30 kDa,  $p < 0,05$ . **C** – intenzita signálu sialoproteinů 18 kDa,  $p > 0,05$ . Odchytky mezi jednotlivými měřeními jsou znázorněny jako střední chyba průměru (SEM) (střední chyba průměru).

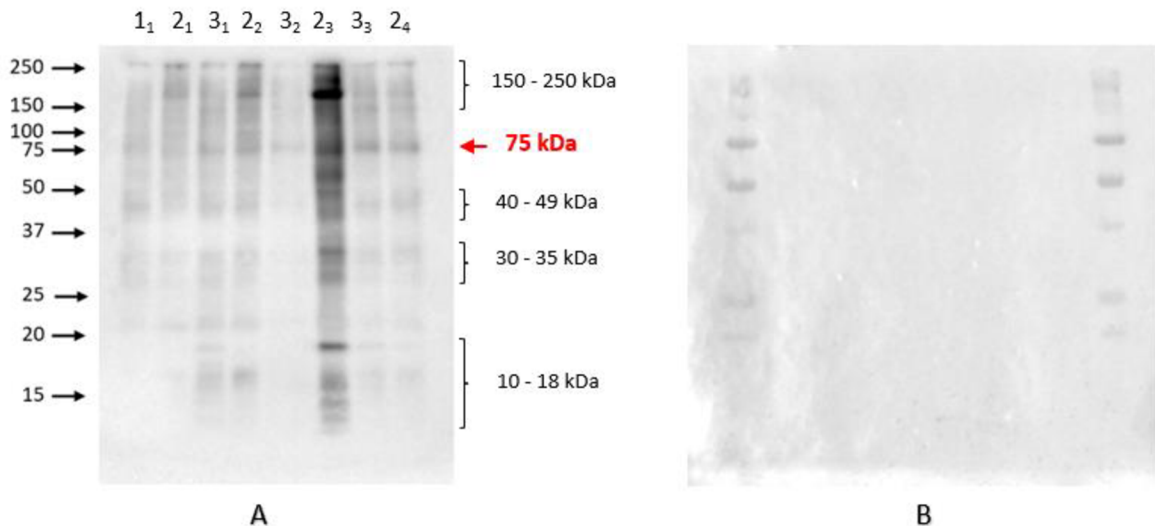
### 5.3.1.3 Lokalizace sialové kyseliny pomocí SNA lektinu

V případě detekce vazby SNA lektinu rozpoznávající sialové kyseliny ve spojení  $\alpha$ -2,6 na hřebcích spermiích nebyl zaznamenán pozitivní signál (obr. 26B).



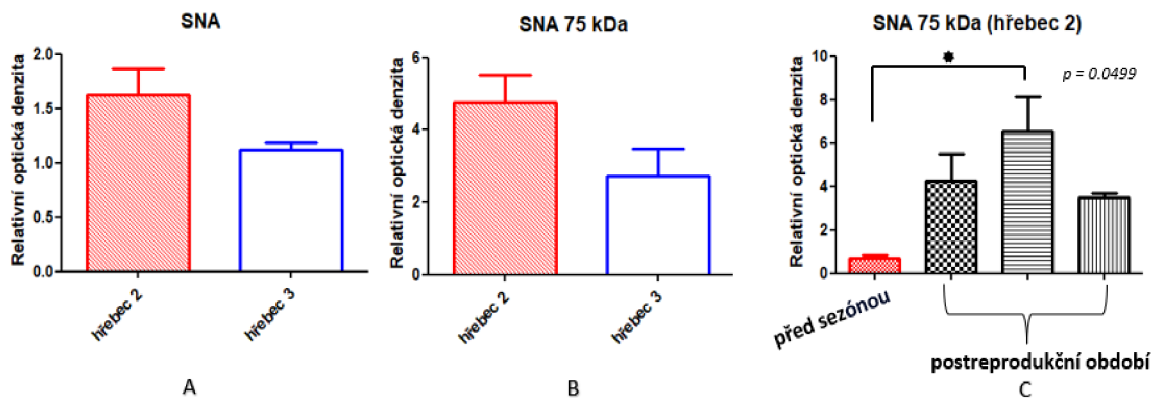
Obrázek 26. **Detekce  $\alpha$ -2,6 vázané kyseliny sialové na spermiích hřebce č. 3:** **A** – jádra značená DAPI (modře), **B** – **negativní** reakce s SNA lektinem, **C** – akrozomy značené PNA (červeně), **D** – proluté snímky (DAPI, SNA, PNA). Zvětšení 400x, měřítko 10  $\mu$ m.

WB analýza  $\alpha$ -2,6 vázané kyseliny sialové pomocí SNA lektinu detekovala v proteinovém extraktu spermií u jednotlivých hřebců proteinový proužek o mol. hmotnosti 75 kDa (obr. 27). U jednotlivých hřebců byly dále identifikovány sialované proteinové proužky o širokém molekulárním rozpětí. Nejvíce detekovaných proteinových proužků odpovídalo rozmezí 10-18 kDa, 30-35 kDa, 40-49 kDa a 150-250 kDa (obr. 27A). U vzorku spermií hřebce 2 ze 3. odběru ( $2_3$ ) je viditelná celkově silná sialylace proteinů, a naopak velmi slabá sialylace proteinů u spermií hřebce 3 z odběru 2 ( $3_2$ ). Na obrázku 27B je ukázána negativní kontrola, kde nebyl zamenán žádný nespecifický signál.



Obrázek 27. **Detekce sialových kyselin v extraktu spermií:** **A** – nitrocelulósová membrána s glykoproteiny detekovanými pomocí lektinu SNA, **B** – negativní kontrola;  $1_1, 2_1, 3_1, 2_2, 3_2, 2_3, 3_3, 2_4$  označuje čísla vzorků ID jednotlivých hřebců.

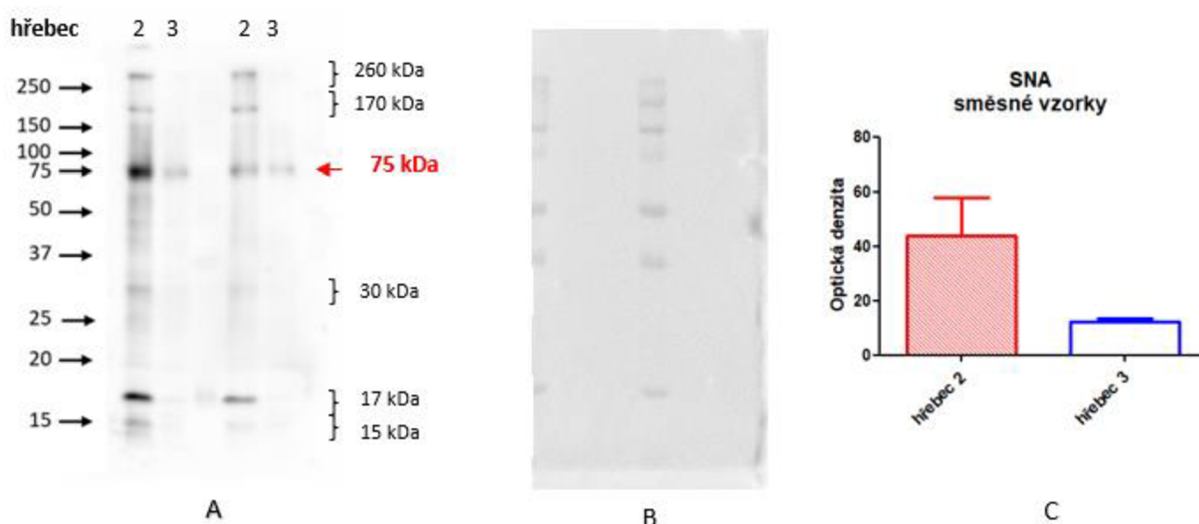
Obrázek 28 znázorňuje statistické vyhodnocení denzitometrické analýzy intenzity signálu  $\alpha$ -2,6 vázané kyseliny sialové detekované pomocí SNA lektinu. U obrázku 28A je znázorněna intenzita signálu u celkové sialylace. Neexistuje statisticky významný rozdíl v sialovaných proteinech spermií mezi hřebcem 2 a hřebcem 3 ( $p > 0,05$ ). Na obrázku 28B je znázorněna intenzita signálu selektovaného 75kDa proteinu. Vyšší průměrný signál byl detekován u hřebce 2. Nicméně neexistuje statisticky významný rozdíl mezi hřebci ( $p > 0,05$ ). Na obrázku 28C je znázorněno porovnání intenzity signálu SNA lektinu hřebce 2 na počátku reprodukční sezóny a v průběhu postreprodukčního období. U odběru na počátku reprodukční sezóny a druhém odběru postreprodukčního období existuje statisticky významný rozdíl v sialylaci proteinů spermií ( $p = 0,0499$ ).



Obrázek 28. **A** – intenzita signálu celkové nanášky,  $p > 0,05$ . **B** – intenzita signálu selektovaného 75 kDa proteinu,  $p > 0,05$ . **C** – komparace intenzity signálu hřebce číslo 2 na počátku sezóny a v postreprodukčním období,  $p < 0,05$ . Odchyłky mezi jednotlivými měřeními jsou znázorněny jako střední chyba průměru (SEM) (střední chyba průměru).

WB analýza  $\alpha$ -2,6 vázané kyseliny sialové pomocí SNA lektinu detekovala ve směsných vzorcích extraktu spermií ze všech odběrů u obou hřebců proteinový proužek o mol. hm. 75 kDa (obr. 29A). U hřebce 2 byly navíc detekovány proteinové proužky o mol. hm. odpovídající přibližně 15 kDa, 17 kDa, 30 kDa, 170 kDa a 260 kDa. Tyto detekované proteiny byly ve velmi slabé míře detekovány i u hřebce 3. Na obrázku 29B je ukázána negativní kontrola, kde nebyl zamenán žádný nespecifický signál.

Na obrázku 29C je statistické vyhodnocení denzitometrické analýzy intenzity signálu  $\alpha$ -2,6 vázané kyseliny sialové detekované pomocí SNA lektinu ve směsných vzorcích. U hřebce 2 byla zaznamenána vysoká intenzita signálu odpovídající průměrné hodnotě 43,9546. Nicméně neexistuje statisticky významný rozdíl v sialylaci proteinů mezi hřebci ( $p > 0,05$ ).

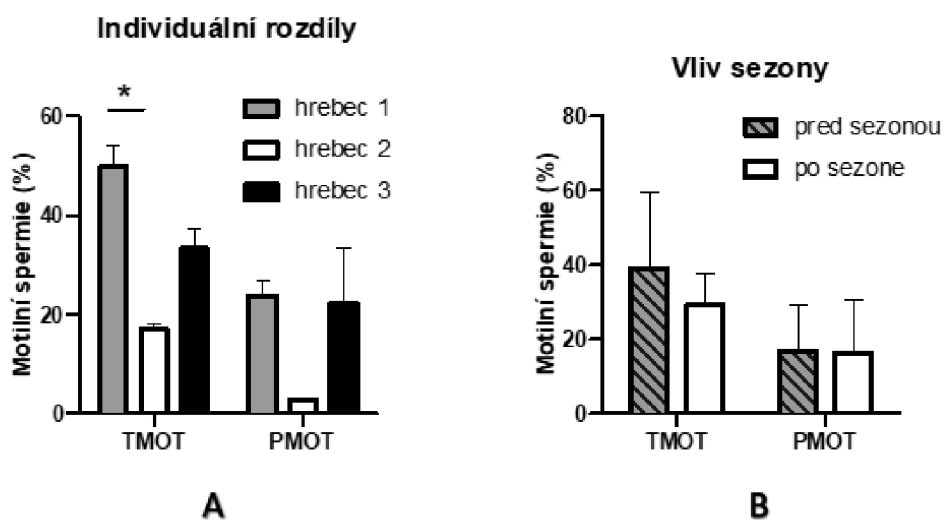


Obrázek 29. **Detekce sialových kyselin v extraktu spermií směsných vzorků ID hřebce č. 3 a hřebce č. 2:** **A** – nitrocelulósová membrána s glykoproteiny detekovanými pomocí lektinu SNA. **B** – negativní kontrola. **C** – intenzita signálu  $\alpha$ -2,6 vázané kyseliny sialové u směsných vzorků detekované SNA lektinem.  $p > 0,05$ . Odchyłky mezi jednotlivými měřeními jsou znázorněny jako střední chyba průměru (SEM) (střední chyba průměru).



#### 5.4 Hodnocení motility pomocí systému CASA

Pomocí systému CASA byly porovnány rozdíly mezi jednotlivými hřebci v rámci celkové a progresivní motility (obr. 30A). Nejvyšší celková a progresivní motilita byla naměřena u hřebce 1, naopak byl naměřen významný pokles hodnoty celkové a progresivní motility. Rozdíl mezi hřebcem 1 a 2 v celkové motilitě (TMOT) byly vyhodnocen jako statisticky významný ( $p < 0,05$ ). Zároveň byl hodnocen vliv sezóny na celkovou a progresivní motilitu (obr. 30B), kde mezi hřebci nebyl nalezen statisticky významný rozdíl jak v celkové, tak progresivní motilitě.



Obrázek 30. **A** – individuální rozdíly hřebců v hodnotách celkové motility (TMOT) a progresivní motility (PMOT). **B** – rozdíl v celkové motilitě (TMOT) a progresivní motilitě (PMOT) před sezónou a po sezóně.

## 6 Diskuze

Proteomické analýzy se staly účinným nástrojem pro pochopení složitých molekulárních mechanismů, které jsou základem plodnosti hřebců. Charakterizací proteomu semenné plazmy, spermií a reprodukčních tkání mohou být identifikovány markery související se stavem plodnosti a může se zvýšit efektivita a úspěšnost šlechtitelských programů. Mezi domácími zvířaty představují koně druh zvláštního zájmu, u něhož v posledním desetiletí exponenciálně vzrostly reprodukční technologie. Toto výzkumné úsilí přineslo obrovské množství nových informací o funkční biologii spermií hřebců (Peña et al. 2024).

Práce staví na předchozích výzkumech zaměřených na identifikaci molekulárních markerů plodnosti u hřebců a dalších hospodářských zvířat. Bylo cíleno na porovnání markerů u tří hřebců s ohledem na motilitu spermií. Nicméně zvláštní pozornost byla věnována hřebcům 2 a 3, kteří byli opakovaně odbíráni v jednom období. Hřelec 1, u kterého jsme získali ejakulát jen ze dvou odběrů v počátku reprodukčního období, byl sice do analýz zahrnut, ale sloužil pro nás spíše jako vzorek pro normalizaci hodnot pro oba další hřebce. Ejakulát od tohoto hřebce se nám bohužel nepodařilo získat také v postreprodukčním období, a navíc analýzy proteinů především z druhého odběru nebyly uspokojivé pravděpodobně z důvodu rozpadu proteinů ve vzorcích. Cílem práce bylo vyhodnotit množství proteinu kotvícího proteinkinázu A (AKAP4), detekovat fosforylované a sialované proteiny spermií a porovnat jejich množství u jednotlivých hřebců. Také vyhodnotit motility spermií pomocí CASA u jednotlivých hřebců v souvislosti s reprodukčním obdobím. Následně byly provedeny statistické analýzy denzitometrických dat, které zdůraznily významné rozdíly v detekci proteinů a sacharidových struktur spermií mezi hřebci. Práce také zahrnuje vyhodnocení celkové a progresivní motility spermií, přičemž byly zaznamenány rozdíly v motilitě před a po reprodukční sezóně což naznačuje potenciální sezónní vliv na tento funkční parametr spermií.

### 6.1 Fosforylace proteinů a exprese AKAP4 v hřebčích spermiích

Fosforylace proteinů je postranlační modifikace, která se podílí na regulaci většiny biologických procesů. Fosforylace proteinů představuje velmi důležitý aspekt kapacitace. Fosforylace/defosforylace je řízena aktivitou proteinkináz a fosfatáz a aktivity těchto kináz a fosfatáz poskytují buňce „spínač“, který může zapnout a vypnout funkci různých proteinů (Naz & Rajesh 2004). První historická zmínka o pTyr byla popsána u myši spermie, kdy byly pomocí protilátky proti fosfotyrosinu identifikovány tři proteiny o molekulové hmotnosti 52, 75 a 95 kDa. Imunofluorescence lokalizovala detekci v akrozomální oblasti hlavičky spermie (Leyton & Saling 1989). V rámci našeho výzkumu byly u všech vzorků vyhodnoceny fosforylované proteiny o molekulové hmotnosti 37 kDa a 34 kDa. Na aceton-metanolem fixovaných hřebčích spermiích s permeabilizovanou plazmatickou membránou byl nalezen bodový signál v post-akrozomální oblasti hlavičky. Nicméně ve studii Bubeníčková et al. (2020) byl popsán odlišný vzor pTyr u hřebců, a to v rámci celé hlavičky. Tento odlišný vzor fosforylace můžeme vysvětlovat jiným způsobem fixace spermií, a to fixací formaldehydem s následnou permeabilizací membrány pomocí 0,1 % Tritonu. Pommer et al. (2003) detekoval tři imunofluorescenční vzorce tyrosinové fosforylace hřebčích spermií, ekvatoriální segment, bičík a kombinace ekvatoriálního segmentu s bičíkem. Tyto vzory byly nalezeny na spermiích, které byly inkubovány v médiu a podmínkách navozujících případnou kapacitaci. Rozdíly v lokalizaci fosforylovaných proteinů tyrosinových zbytků ve spermiích mohou souviset

s různými funkcemi. Kupříkladu pTyr lokalizována v bičíku pozitivně koreluje s motilitou a hyperaktivací (Pommer et al. 2003). V rámci studie Dyrda et al. 2021 byl porovnáván vliv období na míru fosforylace proteinů izolovaných z epididymu během reprodukční sezóny a mimo ni. Větší množství fosforylovaných proteinů bylo pozorováno v reprodukčním období. Zvýšená tyrosinová fosforylace souvisí s kapacitací spermii (Naresh & Atreja 2015). Zdá se, že během kapacitace dochází u spermii k výraznému zvýšení pTyr proteinů, což bylo potvrzeno například u kanců v hlavičce spermii (Tardif et al. 2001). Flesch et al. (2001) prokázal přítomnost dvou pTyr proteinů na povrchu hlavičky (35 kDa a 46 kDa) u kančích kapacitovaných spermatických buněk vykazující afinitu k ZP. Vzhledem k tomu, že tyto dva proteiny byly fosforylovány v kapacitovaných spermii, ale ne v čerstvě ejakulovaných spermii, předpokládá se, že pTyr vede k aktivaci těchto dvou proteinů vázající ZP (Flesch et al., 2001). U lidských spermii byly detekovány tři pTyr proteiny o mol. hm. 95, 51 a 14-18 kDa podílející se na vazbě ZP (Naz 1996). Dalším proteinem, který je fosforylován na tyrosinu je 55kDa protein (CABYR), který se udává do spojitosti s motilitou u skotu (Vijayaraghavan et al. 1997). V rámci naší studie jsme detekovali 2 fosforylované proteiny o 37 a 34 kDa, které byly nalezeny při všech opakováních experimentů. Byla porovnávána míra těchto dvou fosforylovaných proteinů na začátku reprodukční sezóny a v postreprodukčním období u jednoho hřebce, jehož ejakulát byl odebrán v obou obdobích. Míra fosforylace 34 kDa proteinu byla na začátku reprodukční sezóny nižší v porovnání s hodnotami naměřenými v postreprodukčním období, které byly výrazně vyšší, nicméně s přibývajícím časovým odstupem docházelo k jejich postupnému poklesu. Je možné, že námi detekovaný 37 kDa protein nemusí korelovat s motilitou, což je patrné z jeho výrazně nižší hladiny u hřebce 3, i přestože u tohoto jedince byla pozorována vyšší motilita. Studie Desantis et al. (2010) předpokládá, že určitá míra fosforylace je konstantní po celý rok, během reprodukční sezóny pak může postupně docházet k růstu fosforylovaných proteinů a v postreprodukčním období se bude hladina fosforylovaných proteinů postupně snižovat až na konstantní hladinu. Přítomnost sezónních rozdílů by mohla souviset s hladinou cirkulujících hormonů, jejichž působení probíhá přes buněčné signalizace a jejichž sekrece je stimulována prodlužující se délkou dne (Desantis et al. 2010). Na základě závěrů ve studii vedené Dyrda et al. (2021) můžeme předpokládat, že během reprodukční sezóny, kdy jsou hřebci v pravidelných intervalech odebírání, bude míra fosforylace dosahovat nejvyšších hodnot. Tento předpoklad by mohl být podpořen studií Augusto et al. (1997), která zjistila sezónní variabilitu v progresivní motilitě. Dle výsledků byla zaznamenána nejvyšší míra progresivní motility v létě, což souvisí s obdobím zvýšené aktivity odebíraných hřebců. Naopak nejnižší míra progresivní motility byla zaznamenána na jaře, což může být spojeno s obdobím regenerace. Nicméně pro ověření této hypotézy by bylo poměrně náročné časově i organizačně zajistit dostatečné množství inseminačních dávek v rámci celé reprodukční sezóny pro zajištění průkaznosti. Z tohoto důvodu jsme byli nuceni analyzovat inseminační dávky pouze z několika odběrů před a po reprodukční sezóně.

Mezi dva významné pTyr proteiny u lidí patří AKAP3 a AKAP4, které hrají roli ve funkcích spermií, jako je kapacitace, akrozomová reakce a motilita (Naz & Rajesh 2004). Naproti tomu v myších spermiích je AKAP4 fosforylován na Ser/Thr zbytcích, nikoli na tyrosinových zbytcích. I u stejného proteinu tedy existuje druhově specifické rozdíly ve vzorci fosforylace (Naz & Rajesh 2004). Tyto proteiny a zejména AKAP4 je považován za soudobý marker plodnosti samců (Griffin et al. 2020). Při knockout genu pro AKAP4 samci produkují normální počet spermií, ale spermie nevykazují progresivní motilitu a ve výsledku jsou samci neplodní (Fang et al. 2019). U lidí byla zjištěna souvislost defektního AKAP4 s astenozoospermií (tj. snížený počet pohyblivých spermií) a může vysvětlovat případy neplodných jedinců s četnými morfologickými abnormalitami bičíku spermie (Baccetti et al. 2005). Dráha závislá na cAMP může také regulovat tyrosinovou fosforylací proteinů stimulací aktivity PKA (Luconi et al. 2005), a proto jsou proteiny AKAP velmi důležité při regulaci motility spermií, protože ukotvují enzymy, jako jsou proteinkinázy a fosfatázy s příslušnými substráty, aby koordinovaly fosforylační a defosforylační děje (Luconi et al. 2011). Což tedy naznačuje, že AKAP jsou klíčovými aktéry v regulaci vývoje bičíku a pohyblivosti spermií. Například u lidí jsou AKAP3 a AKAP4 proteiny, které ukotvují cAMP-dependentní PKA (Eddy et al. 2003). Ve studii zaměřené na detekci proteinu kotvícího proteinkinázu A (AKAP4) u hřebčích spermií, byl pomocí protilátky Anti-AKAP4 (klon 7E10) detekován proteinový pouzek o molekulové hmotnosti 80 kDa. Pozitivní detekce byla zaznamenána ve vzorku izolovaných spermií, nikoli v semenné plazmě (Blommaert et al. 2019). Použitím shodné protilátky jako ve studii Blommaert et al. 2019 jsme detekovali protein o mol. hm. 75 kDa. Rozdílně detekované molekulové hmotnosti proteinu AKAP4 mohou být teoreticky vysvětleny správností samotného odhadu či zde může hrát roli lyzace při přípravě vzorků nebo použití rozdílných podmínek při separaci. Při vizualizaci vazby s protilátkou Anti-AKAP4 (klon 7E10) na spermiích fixovaných aceton-metanolem byl zaznamenán pozitivní signál v hlavní části bičíku. Lokalizace proteinu AKAP4 je u hřebců (Blommaert et al. 2019), býků (Moss et al. 1999), myší (Miki et al. 2002) a dalších savců vysoce shodná (více než 70 %) (Delehedde et al. 2018). Naše výsledky v detekci množství AKAP4 proteinu ve spermiích nicméně ukázaly nejednoznačné rozdíly mezi hřebci. U jednotlivých odběrů se ukázala o něco nižší hladina AKAP4 ve spermiích hřebce 3, nicméně u vzorků, kde byl smazán vliv jednotlivých odběrů (směsné vzorky) byl trend naprosto opačný. Nicméně rozdíl na základě denzitometrických dat byl v obou případech vyhodnocen jako statisticky nesignifikantní. Je proto důležité využít vzorků spermií z více odběrů, a to především z reprodukčního období, abychom mohli s jistotou tvrdit, že existuje korelace mezi množstvím AKAP4 a motilitou spermií (Dordas-Perpinya et al. 2022).

## 6.2 Detekce sialovaných proteinů

Povrch savčích spermii je pokryt hustým povlakem molekul bohatých na sacharidy, které tvoří glykokalyx. Stejně jako u jiných savčích buněk se sialové kyseliny vyskytují jako vnější monosacharid, který zakončuje většinu glykanů na povrchu spermatické buňky. Sialyace na povrchu buněk může být rozpoznána různými proteiny vázající kyselinu sialovou. Lektiny vázající kyselinu sialovou (SIGLEC) jsou největší rodinou proteinů vázající kyselinu sialovou. Navíc exprese SIGLEC souvisí s reprodukční schopností savců (Yi et al. 2023). Jako transmembránový receptor se SIGLEC běžně vyskytují na membráně buněk související s imunitou, jako jsou leukocyty a makrofágy (Varki & Gagneux 2012). Možné role těchto proteinů zahrnují vazebné interakce se sialovými kyselinami přítomnými v samčím i samičím reprodukčním traktu a na gametách. Byly identifikovány SIGLEC 1, 2, 5, 6, 10 a 14, které vykazovaly druhově a regionálně specifickou expresi na spermích. Téměř univerzální exprese byla patrná v oblasti krčku a střední části spermie, zatímco variabilní druhová exprese byla zjištěna v oblasti hlavičky a bičíku spermie (Alkhodair et al. 2018). Dále bylo zjištěno, že kyselina sialová, známá také jako kyselina N-acetylneuraminová (Neu5Ac), může být obsažena v glykanech spermii v různých vazbách ( $\alpha$ -2,3,  $\alpha$ -2,6 a  $\alpha$ -2,8). K vizualizaci vazby sialových kyselin v glykanech spermii byly v rámci naší studie použity biotinylované lektiny WGA, MAL II a SNA, které rozpoznávají sialové kyseliny vázané v různých pozicích (Bojar et al. 2022). Výzkumy naznačují, že sialové kyseliny hrají zásadní roli ve funkci spermii a regulaci pohyblivosti (Du Toit et al. 2009). V případě porovnání celkové sialylace detekované SNA lektinem, se intenzita signálu u SNA a MAL II významně nelišila. V rámci detekovaných jednotlivých sialoproteinů vykazoval vyšších hodnot míry sialylace protein o velikosti 75 kDa u hřebce 2 v porovnání s glykoproteiny detekovanými MAL II lektinem, kde byla zaznamenána nižší míra nesignifikantního signálu u sialovaných proteinů 70 kDa a 18 kDa. Nejvyšších hodnot míry sialylace dosahoval protein o mol. hm. 30 kDa u hřebce 2, jehož rozdíl oproti hřebci 3 byl vyhodnocen jako statisticky významný ( $p = 0,0286$ ). Nicméně pokud se podíváme na vyhodnocení motility spermii právě u hřebce 2, tak zde bylo zjištěno nižší procento celkově i progresivně pohyblivých spermii. WGA lektin reagoval s glykoproteiny o mol. hm. 75 kDa, a navíc s glykoproteiny o mol. hm. 40 kDa. Dále byly identifikovány další proteinové proužky s odlišnými molekulovými hmotnostmi v rámci WGA a SNA lektinu. SNA lektin reagoval s glykoproteiny v širším rozmezí molekulových hmotností, včetně několika rozmezí, které nebyly detekovány WGA lektinem. Takže SNA lektin detekoval více různých glykoproteinů podle tohoto srovnání.

Celkem byly detekovány tři vzory pro vazbu s MAL II lektinem, střední část bičíku spolu s obrysem hlavičky spermie, dále signál ve střední části bičíku spolu s detekci na hlavičce a signál detekovaný pouze na hlavičce spermie. Některé povrchové domény spermii vykazují afinitu k více než jednomu lektinu, což svědčí o rozmanitosti jejich vystavených sacharidových zbytků (Retamal et al. 2000). To potvrzuje naše zjištění, kdy byla detekována pozitivní vazba proteinového pouzku o stejné molekulové hmotnosti tj. 75 kDa jak u WGA, tak u SNA lektinu. Nicméně je důležité zdůraznit, že nemáme přímý důkaz, zda se jedná o povrchový sialoprotein. Pro potvrzení by bylo nutné cíleně izolovat proteiny z povrchu spermii a provést další analýzy. Vzory detekované pro vazbu s WGA lektinem v glykanech byly dva. Detekce byla zaznamenána po celé hlavičce spolu se značením ve střední části bičíku, ale byl také detekován signál pouze v hlavičce samotné. Shodný vzor pro vazbu s WGA byl zjištěn také v práci

Desantis et al. (2010) zaměřené na hřebce, kde byla zaznamenána pozitivní detekce na hlavičce, přesněji v akrozomální čepičce. Sezónními vlivy na kvalitu spermatu se zabýval Accogli et al. (2016) u bizonů, kteří mají sezónní reprodukční aktivitu. Byly zkoumány změny ve struktuře povrchové glykosylace spermií v období páření ve srovnání se spermii v období mimo páření. V rámci reprodukčního období a mimo reprodukční období byla zaznamenána vazba s použitými lektiny, i když s různou intenzitou singálu. Signál u WGA lektinu byl významně vyšší v případě reprodukčního páření. Naproti tomu signál u SNA lektinu byl významně vyšší mimo reprodukční období a MAL II lektin nevykazoval významné rozdíly v intenzitě signálu mezi oběma obdobími. Intenzita signálu SNA u námi analyzovaného hřebce 2 vykazovala vyšší intenzitu mimo reprodukční období. U odběru na počátku reprodukční sezóny a druhém odběru postreprodukčního období byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v sialylaci proteinů spermií ( $p = 0,0499$ ). Nicméně je důležité si uvědomit, že hodnota  $p = 0,0499$  je velmi blízko hranice statistické významnosti ( $p < 0,05$ ). Pokud by hodnota  $p$  byla nižší, mohli bychom s větší jistotou tvrdit, že rozdíl v sialylaci je skutečný a není jen náhodný. Avšak s hodnotou  $p$  blízkou hranici, není tento závěr tak jednoznačný. Na základě této informace tedy není možné jednoznačně tvrdit, zda sialylaci lze považovat za spolehlivý marker fertility. Intenzita signálu MAL II u hřebce 2 nevykazovala významné rozdíly v intenzitě signálu mezi oběma obdobími, jako v případě výsledků zjištěných ve studii Accogli et al. (2016). Z důvodu neposkytnutí inseminačních dávek v rámci reprodukční sezóny nemůžeme s jistotou konstatovat, zda by intenzita signálu WGA u hřebce 2 byla také vyšší jako v případě výše zmíněné studie zaměřené na bizony.

Závěrem můžeme potvrdit, že na základě stanovené hypotézy byl zaznamenán rozdílný trend v intenzitě signálu odpovídající množství AKAP4 proteinu přítomného ve spermii u jednotlivých hřebců. Mezi oběma hřebci byl také nalezen trend v množství fosforylovaných proteinů. Byla provedena detekce sialovaných proteinů a porovnáno jejich množství u jednotlivých hřebců. Statistické vyhodnocení ukázalo významné rozdíly v sialylaci proteinů, což naznačuje význam těchto sledovaných molekul jako potencionálních markerů fertility. Ze zjištěných dat vyplývá, že existují rozdíly v motilitě a sialylaci mezi jednotlivými hřebci, přičemž některé rozdíly jsou statisticky významné a jiné nikoliv. Je důležité vzít v úvahu počet vzorků a samotné opakování. I když není počet vzorků u všech hřebců stejný, u každého hřebce bylo provedeno opakování celkem třikrát. Tato opakování pomáhají zvýšit spolehlivost výsledků. Také můžeme potvrdit, že dochází k rozdílné distribuci glykokonjugátů v hřebčích spermii, kde byl nalezen rozdíl v lokalizaci glykoproteinů ve vazbě s MAL II u hřebce 2.

Naše dosavadní výsledky otevírají možnosti pro zkoumání dalších markerů, které by mohly dále rozšířit pochopení plodnosti hřebců. Je nezbytné otestovat potenciální markery, zejména během reprodukčního období, aby byla zjištěna jejich spolehlivost. Je nutné konstatovat, že současný výběr protilátek pro detekci koňských proteinů je omezený, což může bránit komplexní analýze fertilizačních proteinových markerů spermií hřebců. Nicméně lektinová detekce sacharidových struktur napříč druhy není limitovaná, a proto jejich využití by mohlo usnadnit charakterizaci nových markerů, a nakonec by mohlo přispět k efektivnímu posuzování plodnosti hřebců.

## 7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala studiem a porovnáním vybraných proteinových markerů u dvou stěžejních hřebců. Z celkového počtu analyzovaných hřebců bylo především cíleno na hřebce 2 a hřebce 3 z důvodu jejich opakovaných odběrů v jednom období. Cílem práce bylo vyhodnocení množství fosforylovaných proteinů a proteinu kotvící proteinkinázu A (AKAP4), který se považuje za soudobý marker fertility. Navíc byla provedena spermií u jednotlivých detekce a lokalizace sialových kyselin v glykoproteinech spermií jako klíčových molekul glykokalyxu nezbytných pro správnou funkci spermatických buněk.

Protein AKAP4 kotvící proteinkinázu A, který je klíčová v regulaci motility spermií byl detekován v hlavní části bičíku spermií u analyzovaných hřebců. Při detekci proteinu AKAP4 v extraktu spermií byl identifikován proteinový proužek o molekulové hmotnosti 75 kDa. V rámci denzitometrické analýzy byla vyšší celková intenzita signálu zaznamenána u hřebce 2 v porovnání s hřebcem 3. Nicméně u směsných vzorků byl tento trend naprosto opačný. Hodnocení rozdílu v rámci denzitometrické analýzy nebylo shledáno v obou případech statisticky významné.

Lokalizace fosforylovaných proteinů na tyrosinu, jejich detekce slouží jako marker pro hodnocení maturačního stavu spermií u různých druhů, ukázala shodný bodový signál v post-akrozomální oblasti hlavičky u všech analyzovaných hřebců. V extraktu hřebců u jednotlivých hřebců byly detekovány ve všech opakováních dva shodné proteinové proužky o molekulové hmotnosti 37 a 34 kDa. Denzitometrická analýza intenzity signálu odhalila, že s prodlužující se dobou od prvního odběru v postreprodukční sezóně se míra fosforylace u proteinu o 37 kDa signifikantně snižuje. Naopak u fosfoproteinu o 34 kDa byla zaznamenána kolísavá průměrná intenzita signálu. Porovnání míry signálu fosfotyrosinu v lyzátu hřebčích spermií ukázalo, že nejnižších hodnot bylo naměřeno u odběru na počátku reprodukční sezóny v porovnání s postreprodukčním období, kdy signál dosahoval 2x až 3x vyšší míru intenzity signálu.

Vizualizace vazby sialové kyseliny v glykoproteinech spermií byla provedena pomocí biotinylovaných lektinů WGA, MAL II a SNA. Vzory detekované pro vazbu s WGA lektinem rozpoznávajícím N-acetylglukosaminové a polysialované sacharidové struktury v glykanech na fixovaných spermiích byly zaznamenány po celé hlavičce spolu se značením ve střední části bičíku a také pouze na samotné hlavičce spermie. Detekovaný vzor byl shodný u všech hřebců. Vzory detekované pro vazbu s MAL II lektinem byly tři. Vzor typický pro hřebce 3 byl zaznamenán na většině bičíku spolu s obrysem hlavičky spermie. Zatímco u hřebce 2 byly detekovány dva zbývající vzory, střední část bičíku spolu s detekcí na hlavičce a signál pouze v oblasti hlavičky. V případě detekce vazby SNA lektinu rozpoznávající sialové kyseliny ve spojení  $\alpha$ 2-6 nebyl zaznamenán pozitivní signál.

Při WB analýze sialové kyseliny a N-acetylglukosaminu pomocí WGA lektinu byly identifikovány glykosylované proteiny o 75 a 40 kDa. WB analýza  $\alpha$ -2,3 vázané kyseliny sialové pomocí MAL II lektinu detekovala u jednotlivých hřebců sialované proteiny o 70 a 30 kDa a intenzivnějšího proteinového proužku o 18kDa. WB analýza  $\alpha$ -2,6 vázané kyseliny sialové pomocí SNA lektinu detekovala u jednotlivých hřebců shodný proteinový proužek o 75kDa. V rámci statistického vyhodnocení denzitometrické analýzy signálu sialylace proteinů hřebčích spermií pomocí WGA lektinu byl zjištěn statisticky významný rozdíl v průměrné intenzitě signálu proteinového proužku o 40 kDa mezi hřebcem 2 a hřebcem 3. Statistické

vyhodnocení denzitometrické analýzy sialylace  $\alpha$ -2,3 vázané kyseliny sialové pomocí MAL II naopak ukázalo vyšší intenzitu signálu u hřebce 2. Nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi intenzitou signálu MAL II ve spermiích obou hřebců. U statistického vyhodnocení denzitometrické analýzy intenzity signálu SNA lektinu rozpoznávajícího  $\alpha$ -2,6 vázanou kyselinu sialovou byla mimo jiné porovnána intenzita signálu na počátku reprodukční sezóny a v postreprodukčním období. Stejně jako v případě denzitometrické analýzy fosfoproteinu o molekulové hmotnosti 30 kDa zde bylo naměřeno nízkých hodnot u odběru na počátku reprodukční sezóny v porovnání s postreprodukčním období, kdy signál dosahoval vyšší míry signálu. U odběru na počátku reprodukční sezóny a v druhém odběru během postreprodukčního období existuje statisticky významný rozdíl v sialylaci proteinů spermií.

Hodnocení procentuálního zastoupení celkové a progresivní motility bylo provedeno pomocí systému CASA v rámci dvou faktorů – individuálních rozdílů a vlivu sezóny. Nejvyšších hodnot celkové a progresivní motility dosahoval hřbec 1, naopak nejnižších hodnot dosahoval hřbec 2. V rámci období před sezónou bylo zaznamenáno vyšší procentuální zastoupení celkové motility, které nebylo vyhodnoceno jako signifikantní. Naopak po reprodukční sezóně se hodnoty celkové a progresivní motility nelišily.

Závěrem můžeme říci, že stanovená hypotéza byla potvrzena pouze částečně, neboť nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly u všech námi vybraných markerů.



## 8 Seznam literatury

Abraham Z, Hawley E, Hayosh D, Webster-Wood VA, Akkus O. 2018. Kinesin and Dynein Mechanics: Measurement Methods and Research Applications. *Journal of Biomechanical Engineering* **140**.

Accogli G, Lacalandra GM, Aiudi G, Cox SN, Desantis S. 2017. Differential surface glycoprofile of buffalo bull spermatozoa during mating and non-mating periods. *Animal* **11**:1807-1815.

Ahuja LG. 2018. *Protein Tyrosine Phosphatases*. Walter de Gruyter, Berlin.

Aitken RJ, Nixon B. 2013. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Molecular Human Reproduction* **19**:785-793.

Alkhodair K, Almhanna H, McGetrick J, Gedair S, Gallagher ME, Fernandez-Fuertes B, Tharmalingam T, Larsen PB, Fitzpatrick E, Lonergan P, Evans ACO, Carrington SD, Reid CJ. 2018. Siglec expression on the surface of human, bull and ram sperm. *Reproduction* **155**:361-371.

Amann RP, WWaberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* **81**:5-17.

Amaral A, Lourenco B, Marques M, Ramalho-Santos J. 2013. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* **146**:163-174.

Augusto C, Gacek F, Artes R. 1997. Seasonal variations in stallion sperm features and their relationship with fertility of the breeding stock. *Brazilian journal of veterinary research and animal science* **3**:167-172.

Aurich Ch. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **89**:65-75.

Aurich Ch, Ortega-Ferrusola C, Vega FJP, Schrammel N, Morcuende D, Aurich J. 2018. Seasonal changes in the sperm fatty acids composition of Shetland pony stallions. *Theriogenology* **107**:149-153.

Baccetti B, Collodel G, Estenoz M, Manca D, Moretti E, Piomboni P. 2005. Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia. *Human Reproduction* **20**:2790-2794.

Bailey JL. 2010. Factors Regulating Sperm Capacitation. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **56**:334-348.

Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. 2000. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Frontiers in Bioscience* **5**:110-123.

Ball BA, Gravance CG, Wessel MT, Sabeur K. 2003. Activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) in reproductive tissues of the stallion and effects of angiotensin II on sperm motility. *Theriogenology* **59**:901-914.

Ball BA, Davolli GM, Esteller-Vico A, Fleming BO, Wynn MAA, Conley AJ. 2019. Inhibin-A and Inhibin-B in stallions: Seasonal changes and changes after down-regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Theriogenology* **123**:108-115.

Barakat B, Itman C, Mendis SH, Loveland KL. 2012. Activins and inhibins in mammalian testis development: New models, new insights. *Molecular and Cellular Endocrinology* **359**:66-77.

Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG. 2000. The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential, and Membrane Lipid Peroxidation. *Journal of Andrology* **21**:895-902.

Beene DL, Scott JD. 2007. A-kinase anchoring proteins take shape. *Current Opinion in Cell Biology* **19**:192-198.

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

Bielanski W, Kaczmarek F. 1979. Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility. *J Reprod Fertil Suppl.* **27**:39-45.

Blommaert D, Sergeant N, Delehedde M, Jouy N, Mitchell V, Franck T, Donnay I, Lejeune P, Serteyn D. 2019. Expression, localization, and concentration of A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) and its precursor (proAKAP4) in equine semen: Promising marker correlated to the total and progressive motility in thawed spermatozoa. *Theriogenology* **131**:52-60.

Bojar D, Meche L, Meng G, Eng W, Smith DF, Cummings RD, Mahal LK. 2022. A Useful Guide to Lectin Binding: Machine-Learning Directed Annotation of 57 Unique Lectin Specificities. *ACS Chemical Biology* **11**:2993-3012.

Breitbart H. 2003. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cellular and Molecular Biology* **49**:3.

Brinsko SP. 1996. GnRH Therapy for Subfertile Stallions. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **12**:149-160.

Brito LFC. 2007. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* **6**:249-264.

Brouwers JF, Boerke A, Silva PFN, Garcia-Gil N, van Gestel RA, Helms JB, van de Lest Ch. HA, Gadella BM. 2011. Mass Spectrometric Detection of Cholesterol Oxidation in Bovine Sperm. *Biology of Reproduction* **85**:128-136.

Burgers PP, Ma Y, Margarucci L, Mackey M, van der Heyden MAG, Ellisman M, Scholten A, Taylor SS, Heck AJR. 2012. A Small Novel A-Kinase Anchoring Protein (AKAP) That Localizes Specifically Protein Kinase A-Regulatory Subunit I (PKA-RI) to the Plasma Membrane. *Journal of Biological Chemistry* **287**:43789-43797.

Calvete JJ, Reinert M, Sany L, Topfer-Petersen E. 1995. Effect of glycosylation on the heparin-binding capability of boar and stallion seminal plasma proteins. *Journal of Chromatography* **711**:167-173.

Carreau S, Silandre D, Bourguiba S, Hamden K, Said L, Lambard S, Galeraud-Denis I, Delalande C. 2007. Estrogens and male reproduction: a new concept. *Braz J Med Biol Res* **40**:761-768.

Colenbrander B, Badella BM, Stout TAE. 2003. The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. *Reproduction in Domestic Animals* **38**:239-366.

Chávez JC, de la Vega-Beltrán JL, José O, Torres P, Nishigaki T, Trevino CL, Darszon A. Acrosomal alkalization triggers Ca<sup>2+</sup> release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Journal of Cellular Physiology* **233**:4735-4747.

Chenoweth P. 2022. Sperm Morphology. Pages 45-55 in Chenoweth P. J, Lorton S. P, editors. *Manual of Animal Andrology*. CABI Publishing, Wallingford.

Clapham DE. 1995. Calcium signaling. *Cell Press* **80**:259-268.

Dascanio JJ. 2014. Computer-Assisted Sperm Analysis. Pages 368-372 in Dascanio J. J, McCue P. M, editors. *Equine reproductive procedures*. John Wiley and Sons, Hoboken.

Delehedde M, Bloomaert D, Jouy N, Scabello J, Miersman H, Franck T, Serteyn D, Mitchell V, Sergeant N. 2018. Concentration of proAKAP4 as a pertinent read-out of sperm quality in mammals. *Animal Reproduction Science* **194**:24.

Desantis S, Ventriglia G, Zizza S, Nicassio M, Valentini L, Di Summa A, Lacalandra GM. 2010. Lectin-binding sites on ejaculated stallion sperm during breeding and non-breeding periods. *Theriogenology* **73**:1146-1153.

Dias TR. 2017. Functional and Biochemical Aspects of Spermatozoa. Pages 230-256 in Alves M. G, Oliveira P. F, editors. *Andrology: Current and Future Developments*. Bentham Science Publishers, Sharjah.

Diviani D, Scott JD. 2001. AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *Journal of Cell Science* **114**:1431-1437.

Dordas-Perpinya M, Yanezz-Ortiz I, Serfeant N, Mevel V, Bruyas Jean-Francois, Catalán J, Delehedde M, Briand-Amirat L, Miro J. 2022. Pro AKAP4 Concentration Is Related to Sperm Motility and Motile Sperm Subpopulations in Frozen-Thawed Horse Semen. *Animals* **12**:3417.

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 CG, de Graaf SP. 2013. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Journal of Proteomics* **91**:13-22.

Du Plessis SS, Agarwal A, Mohanty G, van der Linde M. 2014. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian Journal of Andrology* **17**:230-235.

Dyrda K, Orzolek A, Ner-Kluza J, Wysocki P. 2021. Influence of the Season and Region Factor on Phosphoproteome of Stallion Epididymal Sperm. *Animals* **11**:3487.

Eddy EM, Toshimori K, O'Brien D. 2003. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microscopy, Research and Technique* **61**:103-115.

Ekhlesi-Hundrieser M, Schafer B, Kirchhoff Ch, Hess O, Bellair S, Muller P, Topfer-Petersen E. 2004. Structural and Molecular Characterization of Equine Sperm-Binding Fibronectin-II Module Proteins. *Molecular Reproduction and Development* **70**: 45-57.

Erikson DW, Way AL, Bertolla RP, Chapman DA, Killian GJ. 2007. Influence of osteopontin, casein and oviductal fluid on bovine sperm capacitation. *Animal Reproduction* **4**:103-112.

Fang Xiang, Huang Ling-Long, Xu Jian, Ma Cai-Qi, Chen Zhi-Heng, Zhang Zhan, Liao Cai-Hua, Zheng Shu-Xin, Huang Peng, Xu Wen-Ming, Li Na, Sun Ling. 2019. Proteomics and single-cell RNA analysis of AKAP4-knockout mice mdoel confirm indispensable role of AKAP4 in spermatogenesis. *Developmental Biology* **454**:118-127.

Fedorka CE, Scoggin KE, Squires EL, Ball BA, Troedsson MHT. 2017. Expression and localization of cysteine-rich secretory protein-3 (CRISP-3) in the prepubertal and postpubertal male horse. *Theriogenology* **87**:187-192.

Fiala-Rechsteiner S, Bueno VLC, Barros E, Lopez CJR, Vidigal PMP, Ramos HJO, Bastos HBA, Mattos RC. 2023. Proteomic profile of stallion seminal plasma. *Journal of Equine Veterinary Science* **125**:104587.

Flesch FM, Wijnand E, Van De Lest CHA, Colenbrander B, Van Golde LMG, Gadella BM. 2001. Capacitation Dependent Activation on Tyrosine Phosphorylation Generates Two Sperm Head Plasma Membrane Proteins With High Primary Binding Affinity for the Zona Pellucida. *Molecular Reproduction and Development* **60**:107-115.

Fliniaux I, Marchand G, Molinaro C, Decloquement M, Martoriati A, Marin M, Bodart J-F, Harduin-Lepers A, Cailliau K. 2022. Diversity of sialic acids and sialoglycoproteins in gametes and at fertilization. *Frontiers in Cell and Development Biology*.

Florman HM, Babcock DF. 1991. Progress toward understanding the molecular basis of capacitation. Pages 195-232 in Wassarman PM, author. *Elements of Mammalian Fertilization: Basic Concepts*:001. CRC Press, Boca Raton.

Fujinoki M. 2011. Serotonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction* **142**:255-266.

Gadella BM, Rathi R, Brouwers FHM, Stout TAE, Colenbrander B. 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science* **68**:249-265.

Gagnon C, Lamirande E. 2006. Controls of sperm motility. Pages 108-133 in De Jonge ChJ, Barratt ChLR, editors. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press, New York.

Garcia LAD, Brito ELR, Serpa P, Gregory J, Natalini C, Mattos R. C, Jobim MIM. 2014. Horse Seminal Plasma proteins (HSP-1 and HSP-2) concentration: a possible marker for poor fertility? *Pferdeheilkunde* **30**:557-560.

Gerlach T, Aurich J. E. 2000. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Animal Reproduction Science* **58**:197-213.

Ghaderi D, Springer SA, Ma F, Cohen M, Secrest P, Taylor RE, Varki A, Gagneux P. 2011. Sexual selection by female immunity against paternal antigens can fix loss of function alleles. *Proc Natl Acad Sci USA* **43**:17743-17748.

Giaretta E, Munerato M, Yeste M, Galeati G, Spinaci M, Tamanini C, Mari G, Bucci D. 2017. Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility: Relationship with other sperm quality parameters. *Animal Reproduction Science* **176**:11-19.

Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK. 2008. The CAP Superfamily: Cysteine-Rich Secretory Proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-Related 1 Proteins – Roles in Reproduction, Cancer, and Immune Defense. *Endocrine Reviews* **29**:865-897.

Giesecke K, Hamann H, Stock KF, Woehlke A, Sieme H, Distl O. 2009. Evaluation of SPATA1-associated markers for stallion fertility. *Animal Genetics* **40**:359-365.

Giesecke K, Hamann H, Sieme H, Distl O. 2010. INHBA-Associated Markers as Candidates for Stallion Fertility. *Reproduction in Domestic Animals* **45**:342-347.

Gomperts BD, Kramer IM, Tatham PER. 2003. *Signal Transduction*. Academic Press, London.

González-Cadavid V, Martins J. A. M., 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.

Graf CB, Ritagliati C, Stival C, Luque G. M, Gentile I, Buffone MG, Krapf D. 2020. Everything you ever wanted to know about PKA regulation and its involvement in mammalian sperm capacitation. *Molecular and Cellular Endocrinology* **518**:1-18.

Greenwald EC, Saucerman JJ. 2011. Bigger, better, faster: principles and models of AKAP signaling. *J Cardiovasc Pharmacol* **58**:462-469.

Griffin RA, Baker M, Aitken RJ, Swegen A, Gibb Z. 2019. What makes a fertile sperm? Unique molecular attributes of stallion fertility. *Reproduction* **158**:125-137.

Griffin RA, Swegen A, Baker M, Aitken RJ, Skerrett-Byrne DA, Rodriguez AS, Martín-Cano FE, Nixon B, Peña FJ, Delehedde M, Sergeant N, Gibb Z. 2020. Mass spectrometry

reveals distinct proteomic profiles in high-and low-quality stallion spermatozoa. *Reproduction* **160**:695-707.

Gupta GS. 2005. Microtubule Based Motor Proteins. *Proteomics of Spermatogenesis* **824**:191-210.

Haase B, Schlotterer Ch, Hundrieser ME, Kuiper H, Distl O, Topfer-Petersen E, Leeb T. 2005. Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene* **352**:20-29.

Haas GG, DeBault LE, D'Cruz O. 1988. The effect of fixatives and/or air-drying on the plasma and acrosomal membranes of human sperm. *Fertility and Sterility* **50**:487-492.

Hamann H, Jude R, Sieme H, Mertens U, Topfer-Petersen E, Distl O, Leeb T. 2007. A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Animal Genetics* **38**:259-264.

Heidmiller MK. 2009. Characterization of the equine spermadhesin HSP-7 found on stallion spermatozoa as it relates to stallion fertility and sperm capacitation (Thesis). California Polytechnic State University, San LLuis Obispo.

Hernández-Avilés C, Ramírez-Agámez L, Varner DD, Love ChC. 2023. The stallion sperm acrosome: Considerations from a research and clinical perspective. *Theriogenology* **196**:121-149.

Hoshiba H, Sinowatz F. 1998. Immunohistochemical Localization of the Spermadhesin AWN-1 in the Equine Male Genital Tract. *Anat Histol Embryol* **27**:351-353.

Ickowicz D, Finkelstein M, Breitbart H. 2012. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian Journal of Andrology* **14**:816-821.

Inaba K. 2011. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Molecular Human Reproduction* **17**:524-538.

Jia B, Liang J, Lv Ch, Memon S, Fang Y, Wu G, Quan G. 2021. The characteristics of proteome and metabolome associated with contrasting sperm motility in goat seminal plasma. *Scientific Reports* **11**:15562.

Jin Shi-Kai, Yang Wan-Xi. 2016. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget* **8**:3600-3627.

Johnson KR, Nicodemus-Johnson J, Carnegie GK, Danziger RS. 2012. Molecular evolution of a-kinase anchoring protein (AKAP) -7: implications in comparative PKA compartmentalization. *BMC Evolutionary Biology* **12**:125.

Juhász J, Nagy P, Kulcsár M, Huszenicza G. 2000. Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: a review. *Acta Veterinaria Brno* **69**:247-259.

Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich Ch. 2005. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. *Theriogenology* **63**:1354-1365.

Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Arangasamy A, Kastelic JP. 2019. Sperm and seminal plasma proteomics of high – versus low-fertility Holstein bulls. *Theriogenology* **126**:41-48.

Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikey G, Rengarajan K, Kadirvel G. 2011. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system. *Reproduction in Domestic Animals* **46**:165-172.

Katila T, Kareskoski M. 2006. Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa. *Pferdeheilkunde Equine Medicine* **22**:193-200.

Keil JM, Rafn GR, Turan IM, Aljohani MA, Sahebjam-Atabaki R, Sun Xue-Long. 2022. Sialidase Inhibitors with Different Mechanisms. *Journal of Medicinal Chemistry* **65**:13574-13593.

Khawar MB, Gao H, Li W. 2019. Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **7**:1-12.

Kroh PD, Braun BC, Liu F, Muller P, Muller K. 2022. Boar spermadhesin AWN: novel insights in its binding behavior and localization on sperm. *Biology of Reproduction* **106**:775-791.

Kruppa AJ, Buss F. 2021. Motor proteins at the mitochondria-cytoskeleton interface. *Journal of Cell Science* **134**:1-13.

Kumar CS, Swamy MJ. 2016. HSP-1/2, a major horse seminal plasma protein, acts as a chaperone against oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **473**:1058-1063.

Kumar P, Kumar D, Singh I, Yadav PS. 2012. Seminal Plasma Proteome: Promising Biomarkers for Bull Fertility. *Agricultural Research* **1**:78-86.

Lamirande E, O'Flaherty C. 2008. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics* **1784**:106-115.

Laseca N, Anaya G, Pena Z, Pirosanto Y, Molina A, Peyrás SD. 2021. Impaired Reproductive Function in Equines: From Genetics to Genomics. *Animals* **11**:1-15.

Leahy T, Gadella BM. 2015. New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian Journal of Andrology* **17**:561-567.

Leeb T, Sieme H, Topfer-Petersen E. 2005. Genetic markers for stallion fertility-lessons from humans and mice. *Animal Reproduction Science* **89**:21-29.

Lehti MS, Sironen A. 2017. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biology of Reproduction* **97**:522-536.

Leyton L, Saling P. 1989. 95 kd Sperm Proteins Bind ZP3 and Serve as Tyrosine Kinase Substrates in Response to Zona Binding. *Cell* **57**:1123-1130.

Lishko PV, Mannowetz N. 2018. CatSper: a unique calcium channel of the sperm flagellum. *Current Opinion in Physiology* **2**:109-113.

Llera AH, Martin-Hidalgo D, Gil MC, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ. 2016. New insights into transduction pathways that regulate boar sperm function. *Theriogenology* **85**:12-20.

Lopez-Úbeda R, Matás C. 2015. An Approach to the Factors Related to Sperm Capacitation Process. *Andrology* **4**:1.

Luconi M, Cantini G, Baldi E, Forti G. 2011. Role of a-kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction. *Frontiers in Bioscience-Landmark* **16**:1315-1330.

Luconi M, Porazzi I, Ferruzzi P, Marchiani S, Forti G, Baldi E. 2005. Tyrosine phosphorylation of the a kinase anchoring protein 3 (AKAP3) and soluble adenylyl cyclase are involved in the increase of human sperm motility by bicarbonate. *Biology of Reproduction* **72**:22-32.

Luetjens CM, Weinbauer GF. 2012. Testosterone: biosynthesis, transport, metabolism and (non-genomic) actions. Pages 15-32 in Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, editors. *Testosterone: Action, Deficiency, Substitution*. Cambridge University Press, New York. Ma X, Pan Q, Feng Y, Choudhury B. P, Ma Q, Gagneux P, Ma F. 2016. Sialylation Facilitates the Maturation of Mammalian Sperm and Affects Its Survival in Female Uterus. *Biology of Reproduction* **6**:123.

Magdaleno L, Gasset M, Varea J, Schambony AM, Urbanke C, Raida M, Topfer-Petersen E, Calvete JJ. 1997. Biochemical and conformational characterisation of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *FEBS Letters* **420**:179-185.

Mahmoud KGM, Nawito MF. 2012. Molecular Markers for Fertility in Farm Animals. *Iranian Journal of Applied Animal Science* **2**:203-222.

Marquez B, Suarez SS. 2007. Soluble adenylyl cyclase is required for activation of sperm but does not have a direct effect on hyperactivation. *Reproduction, Fertility and Development* **20**:247-252.

Martín-Cano FE, Gaitskell-Phillips G, Ortiz-Rodríguez JM, Silva-Rodríguez A, Román A, Rojo-Domínguez P, Alonso-Rodríguez E, Tapia JA, Gil MC, Ortega-Ferrusola C., Pena FJ. 2020. Proteomic profiling of stallion spermatozoa suggests changes in sperm metabolism and compromised redox regulation after cryopreservation. *Journal of Proteomics* **221**:103765.

Martín-Hidalgo D, Macías-García B, García-Marín L. J, Bragado M, J, González-Fernández L. 2020. Boar spermatozoa proteomic profile varies in sperm collected during the summer and winter. *Animal Reproduction Science* **219**.

McPartlin LA, Littell J, Mark E, Nelson JL, Travis AJ, Bedford-Guaus SJ. 2008. A defined medium supports changes consistent with capacitation in stallion sperm, as evidenced by increases in protein tyrosine phosphorylation and high rates of acrosomal exocytosis. *Theriogenology* **69**:639-650.



Meyers S, Bulkeley E, Foutouhi A. 2019. Sperm mitochondrial regulation in motility and fertility in horses. *Reproduction in Domestic Animals* **54**:22-28.

Meyers SA. 2009. Sperm Physiology. Pages 47–56 in Samper J. C, editor. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Elsevier – Health Sciences Division, USA.

Mitra k, Shivaji S. 2005. Proteins implicated in sperm capacitation. *Indian Journal of Experimental Biology* **43**:1001-1015.

Miki K, Willis WD, Brown PR, Goulding EH, Fulcher KD, Eddy EM. 2002. Targeted Disruption of the Akap4 Gene Causes Defects in Sperm Flagellum and Motility. *Developmental Biology* **248**:331-342.

Moss SB, Turner RNO, Burkert KL, Butt HV, Gerton GL. 1999. Conservation and Function of a Bovine Sperm A-Kinase Anchor Protein Homologous to Mouse AKAP82. *Biology of Reproduction* **61**:335-342.

Moreno RD, Alvarado CP. 2006. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: New and old evidence. *Molecular Reproduction and Development* **73**:1430-1434.

Nag A, Chaudhuri N. 1979. Sialic acid in human semen. *Indian J Physiol Pharmacol* **23**:325-328.

Naresh S, Atreja SK. 2015. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology* **70**:211-216.

Natividad Ch. 2020. *Genetics, Molecular Biology, Cell Biology, Ecology, and Evolution*. Delve Publishing, Oakville.

Naz RK, Rajesh PB. 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology* **2**:75.

Naz RK. 1996. Involvement of protein tyrosine phosphorylation fo human sperm in capacitation/acrosome reaction and zona pellucida binding. *Frontiers in bioscience* **1**:206-213.

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.

Oakley BR. 2000. An abundance of tubulins. *Trends in Cell Biology* **10**:537-542.

O'Donnel L, O'Bryan MK. 2014. Microtubules and spermatogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **30**:45-54.

Ozbek M, Hitit M, Kaya A, Jousan FD, Memili E. 2021. Sperm Functional Genome Associated With Bull Fertility. *Frontiers in Veterinary Science* **8**.

Pearce OMT, Laubli H. 2015. Sialic acids in cancer biology and immunity. *Glycobiology* **26**:111-128.

Pearl ChA, Roser JF. 2014. Lactoferrin expression and secretion in the stallion epididymis. *Reproductive Biology* **14**:148-154.

Peña FJ, Cabi FEM, Becetto-Rey L, Ferrusola CO, Gaitskell-Phillips G, da Silva-Alvarez E, Cruz Gil M. 2024. Proteomics is advancing the understanding of stallion sperm biology.

Pereira R, Sá R, Barros A, Sousa M. 2017. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian Journal of Andrology* **19**:5-14.

Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. 2011. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *International Journal of Andrology* **35**:109-124.

Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA. 2003. Phosphorylation of Protein Tyrosine Residues in Fresh and Cryopreserved Stallion Spermatozoa under Capacitating Conditions. *Biology of Reproduction* **68**:1208-1214.

Poppinga WJ, Munoz-Llancao P, González-Billault C, Schmidt M. 2014. A-kinase anchoring proteins: cAMP compartmentalization in neurodegenerative and obstructive pulmonary disease. *British Journal of Pharmacology* **171**:5603-5623.

Rababa'h A, Singh S, Suryavanshi SV, Altaravsheh SE, Deo SV, McConnell BK. 2014. Compartmentalization Role of A-Kinase Anchoring Proteins (AKAPs) in Mediating Protein Kinase A (PKA) Signaling and Cardiomyocyte Hypertrophy. *International Journal of Molecular Sciences* **16**:218-229.

Rahman MS, Kwon Woo-Sung, Pang Myung-Geol. 2014. Calcium Influx and Male Fertility in the Context of the Sperm Proteome: An Update. *BioMed Research International* **2014**:1-13.

Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Topfer-Petersen E. 1996. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *European Journal of Biochemistry* **242**:636-640.

Retamal C, Urzúa J, Lorca C, Lopez ML, Alves EW. 2000. Changes in the plasma membrane proteins of stallion spermatozoa during maturation in the epididymis. *Journal of submicroscopic cytology and pathology* **2**:229-239.

Rigby S, Derczo S, Brinsko S, Blanchard T, Taylor T, Forrest D, Varner D. 2000. Oviductal Sperm Numbers Following Proximal Uterine Horn or Uterine Body Insemination.

Roca J, Perez-Patino C, Barranco I, Padilla LC, Martínez EA, Rodriguez-Martinez GH, Parrilla I. 2020. Proteomics in fresh and preserved pig semen: Recent achievements and future challenges. *Theriogenology* **150**:41-47.

Roncoletta M, Morani E, de Silva Carvalho, Esper CR, Barnabe VH, Franceschini PH. 2006. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Animal Reproduction Science* **91**:77-87.

Roser JF. 2008. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. *Animal Reproduction Science* **107**:179-196.

Rossi M, Gonzalez-Castro R, Falomo ME. 2020. Effect of Caffeine and Pentoxifylline Added Before or After Cooling on Sperm Characteristics of Stallion Sperm. *Journal of Equine Science* **87**:102902.

Rota A, Sabatini Ch, Przybyl A, Ciaramelli A, Panzani D, Camillo F. 2019. Post-thaw Addition of Caffeine and/or Pentoxifylline Affect Differently Motility of Horse and Donkey-Cryopreserved Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* **75**:41-47.

Sanocka D, Kurpisz M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* **2**.

Schauer R. 1985. Sialic acids and their role as biological masks. *Trends in Biochemical Sciences* **10**:357-360.

Schauer R, Kamerling JP. 2018. Exploration of the Sialic Acids World. *Adv Carbohydr Chem Biochem* **75**:1-213.

Scott I, Ramirez-Reveco A, Parodi J. 2016. The Restrain of Bovine Sperm Cell Motility Increases Survival: Role of Extracellular Calcium in the Phenomena. *Journal of Veterinary Science a Technology* **7**:1-6.

Schroter S, Osterhoff C, McArdle W, Ivell R. 1999. The glycocalyx of the sperm surface. *Human Reproduction* **5**:302-313.

Schulster M, Bernie AM, Ramasamy R. 2016. The role of estradiol in male reproductive function. *Asian Journal of Andrology* **18**:435-440.

Sharma OP. 1976. Diurnal Variations of Plasma Testosterone in Stallions. *Biology of Reproduction* **15**:158-162.

Shiba K, Inaba K. 2014. Distinct Roles of Soluble and Transmembrane Adenylyl Cyclases in the Regulation of Flagellar Motility in *Ciona* Sperm. *International Journal of Molecular Sciences* **15**:13192-13208.

Si Y, Okuno M. 1999. Role of Tyrosine Phosphorylation of Flagellar Proteins in Hamster Sperm Hyperactivation. *Biology of Reproduction* **61**:240-246.

Sieme H, Distl O. 2012. Genomics and Fertility in Stallions. *Journal of Equine Veterinary Science* **32**:467-470.

Signorelli J, Diaz ES, Morales P. 2012. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell and Tissues Research* **349**:765-782.

Skroblin P, Grossmann S, Schafer G, Rosenthal W, Klussmann E. 2010. Chapter Five – Mechanisms of Protein Kinase A Anchoring. *International Review of Cell and Molecular Biology* **283**:235-330.

Souza APB, Schorr-Lenz AM, Lucca F, Bustamante-Filho IC. 2017. The epididymis and its role on sperm quality and male fertility. *Animal Reproduction* **14**:1234-1244.

Steegborn C. 2014. Structure, mechanism, and regulation of soluble adenylyl cyclases – similarities and differences to transmembrane adenylyl cyclases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease* **1842**:2535-2547.

Stephens TD, Brooks RM, Carrington JL, Cheng L, Carrington AC, Porr ChA, Splan RK. 2013. Effects of pentoxifylline, Caffeine, and Taurine on Post-Thaw Motility and Longevity of Equine Frozen Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* **33**:615-621.

Stewart BL, Roser JF. 1998. Effects of age, season, and fertility status on plasma and intratesticular immunoreactive (IR) inhibin concentrations in stallions. *Domestic Animal Endocrinology* **15**:129-139.

Storey BT. 2008. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar. Friend and foe. *Fertilization* **52**:427-437.

Suarez SS. 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update* **14**:647-657.

Swegen A, Aitken RJ. 2014. Characterisation of the stallion sperm proteome. *Journal of Equine Veterinary Science* **34**.

Tardif S, Dubé C, Chevalier S, Bailey JL. 2001. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biology of Reproduction* **65**:784-792.

Du Toit D, Bornman MS, Van Asegen CH, Du Plessis DJ. 2009. Sialic Acid Concentration and Sperm Motility. *Journal of Reproductive Systems* **32**:21-23.

Topfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff Ch, Leeb T, Sieme H. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Animal Reproduction Science* **89**:159-170.

Topfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostálová Z, Sanz L, Calvete JJ. 1998. Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* **30**:217-224.

Traving C, Schauer R. 1998. Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**:1330-1349.

Turkstra JA, van der Meer FJUM, Knaap J, Rottier PJM, Teerds KJ, Colenbrander B, Muelen RH. 2005. Effects of GnRH immunization in sexually mature pony stallions. *Animal Reproduction Science* **86**:247-259.

Turner RMO, Casas-Dolz R, Schlingmann KL, Hameed S. 2005. Characterization of an A-kinase anchor protein in equine spermatozoa and examination of the effect of semen cooling and cryopreservation on the binding of that protein to the regulatory subunit of protein kinase-A. *American Journal of Veterinary Research* **66**:1056-1064.

Turner RM. 2005. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development* **18**:25-38.

Van de Hoek M, Rickard JP, de Graaf S. P. 2022. Motility Assessment of Ram Spermatozoa. *Biology* **11**:1715.

Varki A, Gagneux P. 2012. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Glycobiology of the Immune Response* **1253**:16-36.

Varner DD, Gibb Z, Aitken RJ. 2014. Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. *Equine Veterinary Journal* **47**:16-24.

Varner D, Johnson L. 2007. From a Sperm's eye view – revisiting our perception of this intriguing cell. *AAEP PROCEEDINGS* **53**:104–177.

Vijayaraghavan S, Trautman KD, Goueli SA, Carr DW. 1997. A Tyrosine Phosphorylated 55 Kilodalton Motility Associated Bovine Sperm Protein is Regulated by Cyclic Adenosine 3', 5' - Monophosphates and Calcium. *Biology of Reproduction* **56**:1450-1457.

Visconti PE. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *PNAS* **106**:667-668.

Visconti PE, Krapf D, de la Vega-Beltrán JL, Acevedo JJ, Darszon A. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian Journal of Andrology* **13**:395-405.

Walker WH, Cheng J. 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* **130**:15-28.

Warren L. 1963. The distribution of sialic acids in nature. *Comp Biochem Physiol* **10**:153-171.

Westphal RS, Soderling SH, Alto NM, Langeberg LK, Scott JD. 2000. *The EMBO Journal* **19**:4589-4600.

Wisse E, Braet F, Duimel H, Vreuls C, Koek G, Damink SWMO, van den Broek MAJ, De Geest B, Dejong CHC, Tateno Ch, Frederik P. 2010. Fixation methods for electron microscopy of human and other liver. *World Journal of Gastroenterology* **16**:2851-2866.

Wong W, Scott JD. 2004. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**:959-970.

Woolley DM. 1997. Studies on the eel sperm flagellum: I. The structure of the inner dynein arm complex. *Journal of Cell Science* **110**:85-94.

Wu Yan-Cheng, Xin Ai-Jie, Lu H, Diao H, Cheng L, Gu Yi-Hua, Wu B, Tao Sheng-Ce, Li Z, Shi Hui-Juan, Yhang Yong-Lian. 2017. Effects of Cryopreservation on Human Sperm Glycocalyx. *Reproductive and Developmental Medicine* **1**:233-238.

Xin Miaomiao, Vechtová P, Shaliutina-Kolesova A, Fussy Z, Loginov D, Dzyuba B, Linhart O, Boryshpolets S, Rodina M, Li Ping, Loginova Y, Štěrba J. 2019. Transferrin Identification in Sterlet (*Acipenser ruthenus*) Reproductive System. *Advanced Technology in Animals Reproduction* **9**:753.

Xu K, Qi H. 2014. Sperm-Specific AKAP3 Is a Dual-Specificity Anchoring Protein That Interacts With Both Protein Kinase A Regulatory Subunits Via Conserved N-Terminal Amphipathic Peptides. *Molecular Reproduction and Development* **81**:595-607.

Yi S, Feng Y, Wang Y, Ma F. 2023. Sialylation: fate decision of mammalian sperm development, fertilization, and male fertility. *Biology of Reproduction* **109**:137-155.

Zhu W, Cheng X, Ren Ch, Chen J, Zhang Y, Chen Y, Jia X, Wang S, Sun Z, Zhang R, Zhang Z. 2020. Proteomic characterization and comparison of ram (*Ovis aries*) and buck (*Capra hircus*) spermatozoa proteome using a data independent acquisition mass spectrometry (DIA-MS) approach. *PLOS ONE* **2**.