

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Změny ve fosforylaci vybraných proteinů ve spermích
během jejich maturace**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Barbora Klusáčková

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: MVDr. Romana Krejčířová, Ph.D.

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

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Změny ve fosforylaci vybraných proteinů ve spermích během jejich maturace" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucí mé diplomové práce MVDr. Romaně Krejčířové, Ph.D. za její odborné vedení, poskytnutí materiálů a skvělý přístup a motivaci. Dále bych chtěla poděkovat konzultantce této práce RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za její cenné rady. Chtěla bych také poděkovat mému manželovi za jeho podporu a trpělivost při mých studiích a zpracovávání této práce. Nakonec bych chtěla poděkovat Bc. Pavlíně Perneroové za užitečné rady a psychickou podporu.

Změny ve fosforylaci vybraných proteinů ve spermiích během jejich maturace

Souhrn

Aby spermie byla schopná oplodnit oocyt, musí projít procesem maturace. Během ní se u spermií odehrávají kvalitativní změny, které dají spermiím fertilizační schopnost. Maturace se odehrává již při průchodu spermií nadvarlaty (epididymální maturace), pokračuje během ejakulace a dále se odehrává i v samičím pohlavním traktu. Zde spermie prodělává kapacitaci. Kapacitace souvisí se změnami na plazmatické membráně, ale i uvnitř spermie. Tyto změny vedou k zahájení hyperaktivace motility, a nakonec k vylití akrozomálního váčku. Jelikož je spermie již transkripčně neaktivní, všechny změny na jejích proteinech se odehrávají prostřednictvím posttranslačních modifikací. Jednou z těchto posttranslačních úprav je fosforylace proteinů, která se může odehrávat na tyrozinových, serinových a treoninových zbytcích. Fosforylace je proces zodpovídající za mnohé buněčné procesy a je jedním z hlavních markerů kapacitace.

Cílem této práce bylo vyhodnotit, zda se během jednotlivých maturačních stádií vyskytuje u kančí spermie fosforylace na tyrozinových a serinových zbytcích, a jak se případně tato fosforylace během maturace proměňuje. Vycházeli jsme z hypotézy, že se ve spermiích v různých maturačních stádiích budou vyskytovat změny v lokalizaci fosforylovaných proteinů a v míře fosforylace, jelikož fosforylace je provázána s procesem maturace.

V této diplomové práci byla detekována fosforylace na tyrozinových a serinových zbytcích pomocí specifických protilátek. Fosforylaci jsme zkoumali pomocí imunodetekce a denzitometrie. Sledovali jsme změny mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermiemi a spermiemi po akrozomální reakci. Pomocí denzitometrické analýzy jsme u tyrozinu pozorovali nárůst fosforylace během kapacitace a dále také po akrozomální reakci. Nalezli jsme 10 proteinů vykazujících tyrozinovou fosforylaci a u většiny z nich jsme pozorovali signifikantní nárůst relativní optické denzity během kapacitace. Dále jsme pomocí imunofluorescence pozorovali několik fluorescenčních vzorů vyskytujících se napříč všemi maturačními stádii. Byli jsme schopni určit vzor tyrozinové fosforylace na akrozomální oblasti, v EqSS a v bičíku jako vzor, který se začíná více vyskytovat během kapacitace. Fosforylace na tyrozinu v těchto oblastech by mohla tedy být markerem kapacitace.

Na serinu jsme imunodetkovali 12 proteinů, z nichž jen jeden se vyskytoval u ejakulovaných spermií. Byl tedy pozorován nárůst serinové fosforylace během kapacitace. Imunofluorescenčními technikami jsme hodnotili i serinovou fosforylaci. Zde jsme našli také několik vzorů, ale nepodařilo se nám prokázat závislost mezi výskytem vzorů a stádiem maturace.

Pozorovali jsme, že nejen proces kapacitace, ale obecně celá maturace spermií je úzce spojena s fosforylací na tyrozinových, a i na serinových zbytcích.

Klíčová slova: kančí spermie, maturace, fosforylace, fosfotyrozin, fosfoserin

Changes in the phosphorylation of selected proteins in sperm during their maturation

Summary

In order for sperm to be able to fertilize an oocyte, it must go through a maturation process. During that time qualitative changes take place on the sperm, which give the sperm fertilization ability. Maturation takes place during the passage of spermatozoa through epididymis (epididymal maturation), continues during ejaculation and also takes place in the female genital tract. There sperm undergoes capacitation. Capacitation is related to changes in the plasma membrane, but also within the sperm. These changes lead to hyperactivation of motility, and eventually to the spillage of the acrosomal vesicle. Since sperm is no longer transcriptionally active, all changes in its proteins take place through posttranslational modifications. One of these posttranslational modifications is protein phosphorylation, which can occur at tyrosine, serine and threonine residues. Phosphorylation is a process responsible for many cellular processes and it is one of the main markers of capacitation.

The aim of this work was to evaluate whether boar sperm phosphorylation occurs at tyrosine and serine residues during individual maturation stages, and how this phosphorylation changes during maturation. We hypothesized that sperm at different maturation stages would undergo changes, as phosphorylation is associated with the maturation process.

In this thesis, phosphorylation at tyrosine and serine residues was detected using specific antibodies. We investigated phosphorylation using immunodetection methods. We observed changes between ejaculated and capacitated sperm and sperm after acrosomal reaction. Using densitometry, we observed an increase in phosphorylation of tyrosine during capacitation and further after the acrosomal reaction. We found 10 protein bands showing tyrosine phosphorylation and in most of them we observed a significant increase in relative optical density during capacitation. Furthermore, we observed by immunofluorescence several fluorescence patterns occurring across all maturation stages. We were able to identify the pattern of tyrosine phosphorylation on the acrosomal region, in EqSS and in the flagellum, as a pattern that begins to occur more often during capacitation. Thus, tyrosine phosphorylation in these regions could be a marker of capacitation.

We detected 12 protein bands showing serine phosphorylation immunodetectionally, only one of which occurred in ejaculated spermatozoa. Thus, an increase in serine phosphorylation was observed during capacitation. We also evaluated serine phosphorylation by immunofluorescence techniques. We found several patterns there, but we failed to prove the relationship between the occurrence of patterns and the stage of maturation.

We have observed that not only the process of capacitation, but in general the whole maturation of sperm is closely linked to phosphorylation on tyrosine and serine residues.

Keywords: boar spermatozoa, maturation, capacitation, phosphotyrosine, phosphoserine

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Stavba spermie	10
3.1.1	Hlavička.....	10
3.1.2	Krček	11
3.1.3	Bičík	11
3.2	Maturace spermií	11
3.2.1	Epididymální maturace.....	11
3.2.2	Ejakulace	13
3.2.3	Kapacitace	14
	Hyperaktivace motility.....	15
3.3	Vazba spermie a vajíčka a akrozomální reakce	16
3.4	Fosforylace proteinů	17
3.4.1	Kinázy	17
3.4.2	Fosfatázy	18
3.5	Fosforylace proteinů ve spermiích	19
3.5.1	Fosforylace během spermatogeneze.....	20
3.5.2	Fosforylace během maturace.....	20
3.5.3	Fosforylace během fertilizace.....	24
4	Materiál a metodika	25
4.1	Materiál	25
4.1.1	Spermie.....	25
4.1.2	Použité roztoky	25
4.1.3	Protilátky	26
4.1.4	Standardy pro elektroforetickou separaci	26
4.2	Metodika	26
4.2.1	Příprava pelet z inseminační dávky (ID)	26
4.2.2	Příprava pelet z nativního ejakulátu (NAT)	27
4.2.3	Zpracování epididymálních spermií	27
4.2.4	Fixace spermií na skla formaldehydem v suspenzi	27
4.2.5	Nepřímá imunofluorescence – detekce fosforylovaných proteinů	28
4.2.6	Elektroforéza (SDS PAGE).....	28
4.2.7	Western blot	29
4.2.8	Imunodetekce proteinů na membránách.....	29
5	Výsledky	30

5.1	Detekce fosforylovaných proteinů pomocí imunofluorescence.....	30
5.1.1	Detekce fosforylace pomocí protilátky proti fosfotyrozinu	30
5.1.2	Detekce fosforylace pomocí protilátky proti fosfoserinu	44
5.2	Detekce fosforylovaných proteinů v extraktech spermíí	60
6	Diskuze	72
7	Závěr	79
8	Literatura	80

1 Úvod

Spermie opouštějící varlata nejsou schopny proniknout zónou pellucidou oocytu a oplodnit oocyt. Aby fertilizační schopnosti nabyly, musí projít procesem maturace. Maturace se odehrává v nadvarlatech, během ejakulace a *in vivo* v samičím pohlavním traktu (Yanagimachi 1994). V nadvarlatech spermie získávají nové proteiny, které se k nim dostávají v epididymosomech z buněk nadvarletního epitelu (Dacheux et al. 2012). Během epididymální maturace spermie získávají schopnost pohybu, která je u nich v ocasu nadvarlat opět potlačena. Během ejakulace se spermie dostává do kontaktu se semennou plazmou, ze které získává dekapacitační faktory. Ty zabraňují tomu, aby spermie prodělala kapacitaci předčasně. V oviduktu samice spermie interagují s epiteliálními buňkami oviduktu a vytváří se zde oviduktální rezervoár, kde se následně odehrává i zásadní krok, kapacitace. Kapacitace je nejdůležitějším stupněm maturace spermií, během něhož se odehrávají změny vedoucí k hyperaktivaci pohybu a k akrozomální reakci. Pouze spermie, která prodělá kapacitaci je schopna oplodnit oocyt. Kapacitaci je možno navodit i v *in vitro* podmínkách za využití definovaných kapacitačních médií (Yanagimachi 1994).

Spermie během celého procesu maturace ze svého okolí získávají nové proteiny a zároveň u nich dochází ke změnám na jejich vlastních proteinech. Na těchto změnách se podílí i posttranslační modifikace, jako je např. glykosylace nebo fosforylace. Fosforylace je v buňce klíčovým procesem. Nejčastěji jsou proteiny a jejich funkce v buňce regulovány právě pomocí přidávání nebo odebrání fosfátu na tyrozinové, serinové a treoninové zbytky. Nejčastějším typem fosforylace je fosforylace tyrozinová (Visconti 2009).

Fosforylace se odehrává již během spermatogeneze, kdy dochází k fosforylaci histonů na serinu (Krishnamoorthy et al. 2006). Fosforylace ovlivňuje motilitu spermie, kdy v nadvarlatech je motilita ovlivněna aktivitou glykogen syntáz-kinázy-3 a zároveň i její vlastní fosforylací. Po ejakulaci je motilita znovu obnovena díky aktivitě protein kinázy A (Han & Haines 2007). Klíčový maturační krok, kapacitace, je spuštěna fosforylačními kaskádami. Co se týče fosforylace na tyrozinu, existují tři cesty, kterými je kapacitace spouštěna. První z nich je cAMP dependentní dráha, která je pro spermie unikátní. Druhá dráha využívá receptorové tyrozin kinázy vázané na membráně a poslední cesta využívá receptory vázané k nonreceptorovým tyrozin kinázám. Na kapacitaci se podílí fosforylace na serinových a treoninových zbytcích, např. přes aktivitu protein kinázy A (Naz & Rajesh 2004).

Fosforylace odpovídá za kvalitativní změny, které se ve spermií odehrávají a má velký vliv na důležitý maturační krok – kapacitaci. Bez toho, aniž by spermie kapacitací prošla, by nemohlo dojít k navázání na zónu pellucida oocytu, nedošlo by k akrozomální reakci a spermie by nebyla schopna oocyt oplodnit. Je tedy důležité zkoumat jaké proteiny fosforylaci podléhají a jaký to má vliv na maturaci spermie (Yanagimachi 1994). Díky tomu by bylo možné pochopit lépe další důležité procesy odehrávající se ve spermií a případně i odhalit možné příčiny idiopatické neplodnosti.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem této diplomové práce je potvrdit fosforylaci na vybraných proteinech kančích spermii na tyrozinových a serinových zbytcích a popsat, jak se tato fosforylace mění mezi ejakulovanými spermii, spermii *in vitro* kapacitovanými a spermii, u kterých byla *in vitro* navozena akrozomální reakce.

Cíl této práce vychází z hypotézy, že budou detekovány změny v lokalizaci fosforylace ve spermii mezi jednotlivými maturačními stádii a že se bude měnit míra s jakou jsou proteiny fosforylovány.

3 Literární rešerše

3.1 Stavba spermie

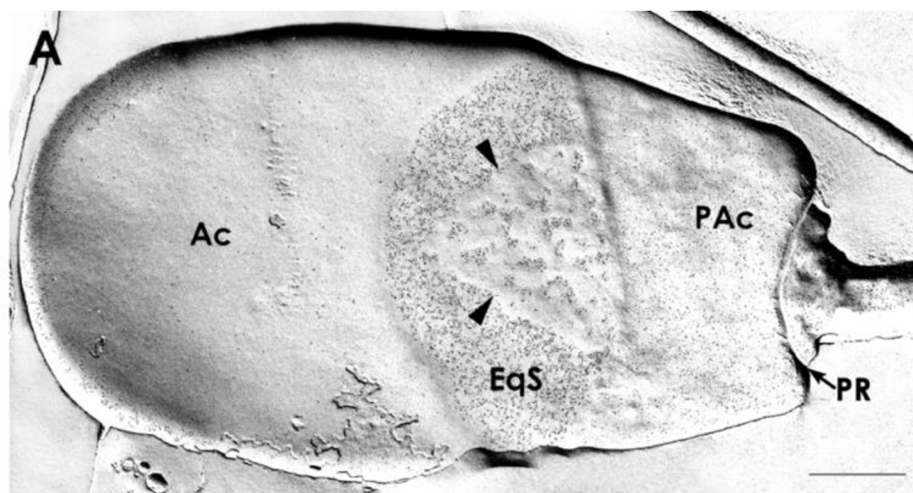
Samčí gamety neboli spermie, jsou z vnějšího pohledu rozlišené na tři hlavní úseky, a to na hlavičku, krček a bičík. Každá část má svou specifickou funkci a obsahuje různé komponenty. Celá spermie je obalena cytoplazmatickou membránou, která hraje důležitou roli v maturaci spermií a komunikaci gamet (Yanagimachi 1994; Fawcett 1970; Gadella & Luna 2014).

3.1.1 Hlavička

Hlavička je u savců ve většině případů dorzoventrálně zploštělá a má oválný tvar. Přestože se hlavičky svým tvarem a velikostí mezi druhy liší, složení a uložení akrozomu bývá analogické. Akrozom vytváří strukturu podobnou čepičce, která pokrývá značnou část povrchu jádra (Fawcett 1970; Gage 1998).

Tvar a velikost jádra se mezi jednotlivými druhy savců různí. Je obaleno dvojitou membránou skládající se z vnitřního a vnějšího listu, které jsou odděleny úzkým perinukleárním prostorem. Chromatin je v jádře v těsném kontaktu s vnitřním listem jaderné membrány a je velmi kondenzovaný. Tato pevná kondenzace je specifická právě pro spermie a spočívá ve výměně histonů za protaminy (Fawcett 1970; Gadella & Luna 2014).

Na hlavičce najdeme akrozomální váček, který obsahuje lytické enzymy sloužící k narušení vaječných obalů (Fawcett 1970; Eddy 2006). Hlavičku je možno rozdělit na apikální část, hlavní část a ekvatoriální segment. Na přechodu mezi hlavní částí a ekvatoriálním segmentem se nachází ztlustění akrozomální čepičky a je zde zvýšená denzita akrozomálního obsahu. Rozdělení hlavičky na jednotlivé zóny mizí po primární vazbě gamet. Pod akrozomem se nachází subakrozomální prostor. Tento prostor odděluje akrozomální čepičku od jaderného obalu (Fawcett 1970).



Obrázek 1: EqSS na kančí spermii: znázorněný černými šipkami (Jones et al. 2008).

Na plazmatické membráně se pod ekvatoriálním segmentem nachází ekvatoriální subsegment (EqSS) (viz obrázek 1). Formuje se v pozdní spermiogenezi během elongace.

U býka je EqSS poloměsíčitý a u berana je střední velikosti ve tvaru čtvrtměsíce, u kance (viz obrázek 1) je větší a anteriorně zasahující do ekvatoriálního segmentu. EqSS se podílí na fúzi gamet, ale tato schopnost se objevuje jen během a po akrozomální reakci (AR). Dojde k tomu vlivem uvolnění proteáz z akrozomu, které aktivují prekurzorové fúzní proteiny. EqSS je obohacen o proteiny fosforylované na tyrozinu (Tyr), což se děje během epididymální maturace. Fosfoproteiny v EqSS jsou intracelulární, pravděpodobně jsou lokalizované na posteriorní části vnější akrozomální membrány (OAM) (Jones et al. 2008).

3.1.2 Krček

Na hlavičku spermie navazuje krček nasedající kapitulou na implantační fossu tvořenou jadernou membránou. V krčku jsou umístěny dvě centrioly – proximální a distální. V dorsoventrální oblasti krčku se vyskytují jedna až dvě mitochondrie (Gage 1998). Dále je v krčku přítomná struktura membranózního štítu, která vzniká z jaderné membrány potom, co dojde ke kondenzaci chromatinu. Tato struktura se v pozdních fázích spermatogeneze zvětšuje. Je možné, že u některých druhů funguje jako endogenní zásoba energie (Fawcett 1970).

3.1.3 Bičik

K tomu, aby se spermie dostala k vajíčku a byla oplození schopná je důležitá její motilita. Pohyb spermie je zajištěn bičíkem, který je složen ze tří částí (spojovací část, hlavní oddíl a koncová část) (Yanagimachi 1994; Gage 1998).

Energie pro pohyb bičíku je generován pomocí metabolismu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) ve střední části, která je bohatá na mitochondrie (Gage 1998). Hlavní stavební jednotkou bičíku jsou mikrotubuly. Každý dublet mikrotubulů se skládá z podjednotkového vlákna A a druhého vlákna B, které sdílí společnou stěnu. Z podjednotky A vycházejí dvě raménka, z nichž vnější je ve spojení s následujícím dubletem v kruhu. Okolo axonemy je devět vnějších denzních provazců (Fawcett 1970).

Hlavní část bičíku je nejdelší a vykazuje největší schopnost pohybu. Na povrchu je v této části přítomen fibrózní štít. Jedná se o elastická vlákna, podírající strukturu axonemy při vlnění bičíku (Fawcett 1970).

3.2 Maturace spermíí

Fertilizační schopnost je u spermíí získávána na několika stupních – během jejich průchodu nadvarlaty, při styku se seminální plazmou při ejakulaci, během průchodu samičím reprodukčním traktem a styku se samičími epiteliálními buňkami v něm a během interakce s vaječnými strukturami (Caballero et al. 2011; Zigo et al. 2020).

3.2.1 Epididymální maturace

Oplození u savců záleží na fyziologické struktuře a funkčnosti gamet. Spermie po opuštění varlat putují do nadvarlat, kde dochází k jejich maturaci, kontrole a skladování (Lu 1999; Sutovsky et al. 2001). Aby spermie plně dozrála, získala pohyblivost a schopnost oplození, musí projít nadvarlaty, kde se odehrává proces maturace (Yanagimachi 1994;

Dacheux et al. 2012). Tento proces je nezbytný, což se ukazuje v *in vitro* prostředí, kdy spermie odebrané z varlat nikdy nedosáhnou plné maturace. Pochopení procesu postvarletní diferenciaci může objasnit řadu příčin idiopatické neplodnosti (Dacheux et al. 2012).

Nadvarlata jsou samčím orgánem, kde dochází k maturaci a skladování spermií. Mají tři části a to hlavu, tělo a ocas. Jedná se o soustavu kanálků, které jsou vystlány epitelem, který je vysoce sekrečně aktivní. Epiteliální buňky mají kromě sekreční role ještě funkci absorpční a endocytickou, okyselují nadvarletní tekutinu, produkují antioxidanty, fagocytují a také hrají roli při imunitní odpovědi (Caballero et al. 2011).

V nadvarlatech dochází k přeměně povrchových proteinů spermií. Dochází zde k posttranslačním modifikacím, některé proteiny jsou odstraňovány a jiné proteiny se do spermií nově zabudovávají. Prostředí lumen nadvarlat se ve svém průběhu mění, a to nejen obsahem proteinů, ale i svým chemickým složením (Dacheux et al. 2012). Např. od proximálního konce k distálnímu klesá koncentrace sodných iontů, chloridů a zároveň narůstá koncentrace organických molekul (Caballero et al. 2011). Během epididymální maturace se výrazně mění povrchové domény plazmatické membrány spermií. Do membrány jsou nově zabudovávány glykoproteiny sekretované epididymálními buňkami, jsou specificky odstraňovány některé fosfolipidy a některé lipidy a proteiny jsou přemísťované do specifických domén. Proteiny, které jsou ve spermii přítomné už z varlat jsou v nadvarlatech přeměňovány pomocí posttranslačních modifikací jako je fosforylace a glykosylace (Akbarsha et al. 2015). Jedná se tedy o komplexní mikroprostředí, díky kterému spermie získávají pohyblivost a schopnost oplodnit oocyt (Lu 1999; Dacheux et al. 2012).

Proteom nadvarletní tekutiny se skládá z více než 200 hlavních proteinů které se podílí na maturaci a stabilizaci spermatické plazmatické membrány, což spermie ochraňuje před oxidativním poškozením při jejich skladování a při ejakulaci do samičího pohlavního traktu (Sutovsky et al. 2001). Spermatozoa jsou po svém odchodu z varlat ještě neaktivní, a proto musí během procesu zrání dojít k jejich interakci s určitými proteiny. Tyto proteiny mohou být vylučovány buňkami epitelu nadvarlat přímo do nadvarletní tekutiny, nebo mohou být obsaženy např. v epididymosomech (Dacheux et al. 2012). Epididymosomy jsou sekreční vezikuly, které vylučuje epitel nadvarlat (Silviera et al. 2018). Vzikají fragmentací apikálních bublin na epiteliích nadvarlat (Caballero et al. 2011). Jsou v nich obsaženy miRNA, mRNA a proteiny. Jsou vylučovány do lumen nadvarletních kanálků pomocí apokrinní sekrece. Jejich obalová membrána je obohacena o fosfolipidy, sfingomyeliny a kyselinu arachidonovou. Dosahují velikosti 50–250 nm, jsou tedy větší, než klasické exosomy. Obsahují velké množství proteinů, které mohou být přeneseny ze somatických buněk nadvarletního epitelu přímo do spermií (Silviera et al. 2018). Takto získané proteiny mohou fungovat jako obalové, nebo jsou ukotveny do membrány spermií pomocí glykofosfatidylinositolové (GPI) kotvy. Některé integrální proteiny ve své struktuře nemají N-koncovou specifickou signální sekvenci, a tak není možné, aby byly dále translokovány do endoplazmatického retikula (ER) (Caballero et al. 2011).

Kromě integrace některých epididymálních proteinů musí dojít také k posttranslačním modifikacím stávajících proteinů. Mezi významné modifikace se řadí fosforylace a glykosylace (Dacheux et al. 2012; Jankovičová et al. 2017). V nadvarlatech dále také dochází k zesít'ování a agregaci proteinů na povrchu spermií, což může představovat mechanismy pro zrání a kontrolu kvality buněk (Dacheux et al. 2012).

Kvalita spermií je kontrolována v nadvarlatech. Nadvarletní epiteliální buňky produkují proteolytický marker ubiquitin, který se preferenčně váže na povrch defektních spermií, které mají poruchy v utváření bičíku a hlavičky. Proteiny jsou rozpoznávány proteolytickým ubiquitinovým mechanismem podle nesprávné terciální struktury, změně glykosylace nebo oxidačnímu poškození. Ubiquitinem jsou také označeny defektní spermie, na kterých byly rozpoznány proteiny s netypickou posttranslační modifikací (Kelsey et al. 2020).

Spermie, které prošly přes kontrolu kvality a nebyly degradovány putují do ocasu nadvarlat. Zde jsou uloženy a jsou imotilní, ale jsou imobilizovány sekundárně. Jejich motilita je znovu navozena v samičím pohlavním traktu, do té doby jsou uchovávány v nepohyblivém stavu. Imobilizace spermií se děje pomocí fosforylace a defosforylace. V nepohyblivém stavu mají spermie inaktivované proteinkinázy v bičíku, nebo mají aktivované proteinfosfatázy. Právě v nadvarlatech však před jejich uskladněním získávají spermie svou motilitu. Vznik pohyblivosti je doprovázen se zvýšením hladiny vnitrobuněčného cAMP, což souvisí se snížením aktivity glykogen syntáz-kinázy-3 (GSK3) a proteinfosfatázy 1 (Han & Haines 2007).

Spermie obsahují některé proteiny bohaté na cystein, jako je například sekreční protein bohatý na cystein 1 (CRISP1), které spermii slouží jako inhibitor kapacitace prematurních spermií (Luno et al. 2013).

3.2.2 Ejakulace

Během ejakulace se spermie dostávají do kontaktu se semennou plazmou, která je produkována semennými vajíčky, bulbouretrálními žlázami, Cowperovými žlázami a prostatou. Složení semenné plazmy se z mezidruhového hlediska liší. Semenná plazma poskytuje spermii nové prostředí, ze kterého mohou do svého povrchu zabudovávat nové proteiny. Tato tekutina jim poskytuje ochranu v samičím pohlavním traktu. Díky semenné plazmě jsou zakryty proteiny potřebné pro oplození a celý povrch spermie je stabilizován. Ochranným faktorům ze semenné plazmy se souhrnně říká dekapacitační faktory, jelikož zabraňují předčasné kapacitaci spermie (Gadella & Luna 2014; Zigo et al. 2020).

Faktory semenné plazmy také napomáhají formování oviduktálního rezervoáru. V isthmu oviduktu se spermie zachycují na buňky samičího epitelu a dostávají se z rezervoáru až po hyperaktivaci motility (Petrunikina et al. 2001; Zigo et al. 2020). Proteiny, které spermie získává ze semenné plazmy a napomáhají jí v této specifické vazbě se souhrnně označují jako spermadhesiny. Vykazují afinitu k cukerným zbytkům, které se vyskytují na povrchu oviduktálního epitelu (Zigo et al. 2020).

V seminální plazmě byly také nalezeny vezikuly podobné epididymosomům a jsou označovány jako prostatosomy. Tyto vezikuly byly původně objeveny u lidí, ale následně byla jejich přítomnost potvrzena u dalších savčích druhů, např. u býků. U lidí jsou tyto vajíčky sekretovány právě prostatou, zatímco u býků se zdá, že jsou spíše produkovány semennými vajíčky. Jejich velikost a složení membrány odpovídá epididymosomům, ale jejich vznik je poněkud odlišný. Jsou vytvářeny v cytoplazmě buněk přídatných žláz a následně jsou do seminální plazmy vyloučeny pomocí exocytózy. Jejich funkce byly studovány na lidských spermii, kde mají imunopresivní účinky, zvyšují motilitu spermií, stabilizují plazmatickou membránu spermie a také hrají roli při kapacitaci. Během ejakulace jsou tedy spermie v kontaktu s komponenty seminální plazmy. U býků je jedním z těchto komponent rodina

proteinů bovinní seminální plazmy, které obsahují dvě fibronektinové domény, které se váží na cholinové fosfolipidy na plazmatické membráně spermií. Díky tomu je spuštěn jeden z prvních mechanismů kapacitace, a to cholesterolový efflux (Caballero et al. 2011).

3.2.3 Kapacitace

Kapacitace je proces zahrnující soubor biochemických modifikací, kterými spermie musí projít, než je schopna oplodnit vajíčko a *in vivo* se odehrává v samičím pohlavním traktu (Yanagimachi 1994; Breitbart et al. 2005; Ded 2010). Proces kapacitace začíná již během ejakulace, když jsou spermie smíseny se seminální plazmou. Seminální plazma je složená z produktů samčích přídatných žláz (Caballero et al. 2011). Po ejakulaci je do samičího reprodukčního traktu transportováno velké množství spermií, ale jen některé se naváží na ovidukální epieliální buňky (OEC). Tato vazba je velmi důležitá pro tvorbu rezervoáru spermií, které budou později schopny oplodnit oocyt. Průchod spermií oviduktem je složitý proces, který se podílí na kontrole kapacitace, jejímž hlavním mechanismem je tyrozinová fosforylace (Luno et al. 2013). Vazba spermií na buňky ovidukálního epitelu utlumuje fosforylaci a tím se oddaluje kapacitace, aby došlo k synchronizaci s ovulací (Petrunkina 2001; Naz & Rajesh 2004; Zigo et al. 2020). Vlivem změn koncentrace samičích pohlavních hormonů, dojde k uvolnění spermií z vazby s OEC. Spermie se tak mohou pohybovat z ovidukálního rezervoáru a dochází u nich ke kapacitaci (Luno et al. 2013; Zigo et al. 2020).

Spermie se na OEC váže prostřednictvím receptorů na rostrální části hlavičky spermie a karbohydrátových receptorů na plazmatické membráně OEC. Jedná se o druhově specifickou vazbu. Některé molekuly účastníci se vazby na OEC přítomné na povrchu spermie pocházejí přímo ze semenné plazmy. Těmito molekulami jsou např. spermadheziny, konkrétně u kance AQN-1, AQN-2 a AWN, které tvoří protektivní vrstvu okolo plazmatické membrány a stabilizují ji (Zigo et al. 2020). Požadavkem pro vazbu spermie na OEC je snížená akrozomová fosforylace. K OEC se mohou vázat pouze spermie s intaktním akrozomem, s nízkou intracelulární hladinou vápníku, sníženou fosforylací proteinů na plazmatické membráně a normální chromatinovou strukturou. Adhezivní molekuly na spermiích s afinitou k OEC se ztrácí ze spermatického povrchu po uvolnění z ovidukálního rezervoáru díky jejich fosforylaci (Luno et al. 2013).

Na povrchu lidské a býčí spermie byl nalezen inzulinu podobný růstový faktor I (IGF-I) receptor, který vykazuje Tyr kinázovou aktivitu. Jeho ligand je přítomen v seminální plazmě a tento receptorový systém se účastní transdukce signálu vedoucí ke kapacitaci a exocytóze akrozomu (Naz & Rajesh 2004).

Bylo prokázáno, že nikotinamidadeninukleotid (NADH) a nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH) jsou faktory podporující kapacitaci. Exogenní NADPH zvyšuje Tyr fosforylaci u bovinních spermií a vyvolává kapacitaci. NADPH je koenzymem spermatické oxidázy, takže napomáhá produkci superoxid aniontu, který je transformován do H₂O₂ pomocí superoxid dismutázy. Reaktivní formy kyslíku (ROS) se dále podílejí na stimulaci kapacitace (Asquith 2004; Naz & Rajesh 2004; Awda & Buhr 2010).

Na aktivaci kapacitace se dále také podílí progesteron. Na akrozomální membráně se nacházejí progesteron vázající místa, nebo také progesteronové receptory. Progesteron u člověka stimuluje influx Ca²⁺ přes progesteronový receptor 1 (PR1), což má za následek

zvýšenou Tyr fosforylací díky zvýšení hladiny cAMP a zvyšuje fluiditu membrány. Progesteron je také zodpovědný za hyperaktivaci motility a akrozomální reakci, konkrétně přes progesteronové receptory PR2 a PR3 (Naz & Rajesh 2004).

Ve spermích při kapacitaci dochází i ke změnám v plazmatické membráně. Plazmatická membrána spermie je na svém povrchu heterogenní. Nachází se zde například prstencovité struktury zabraňující volnému pohybu molekul. V souvislosti se získáním oplozovací schopnosti na povrchu spermie během kapacitace dochází ke změnám lokalizace jednotlivých molekul (Gadella et al. 2008; Visconti 2009). Dochází k reorganizaci membrány pomocí přesunů určitých enzymů, membránových lipidů a cholesterolu a ke změně membránové fluidity vlivem cholesterolového effluxu (Caballero et al. 2011).

Na kapacitaci se podílí také aktin přítomný ve spermích. Zatímco ve spermatogenních buňkách se aktin vyskytuje hlavně ve filamentární formě v subakrozomálním prostoru mezi jádrem a tvořícím se akrozomálním váčkem, ve zralých spermích se vyskytuje v hojném množství i jako monomerní forma, a to v ekvatoriální oblasti, postakrozomálním regionu a v bičíku. Jeho přítomnost v hlavičce naznačuje zapojení do AR a procesu kapacitace. Polymerace aktinu je důležitá pro zahájení motility během postvarletní maturace a je nezbytná pro proniknutí spermie do ooplazmy a dekonenzaci spermatického jádra. U kanců, býků a morčat se polymerace děje i během kapacitace. U býčích spermii je jedním z ligandů spouštějících transdukcí signálu vedoucí k Tyr fosforylaci epididymální růstový faktor (EGF), který interaguje s receptorem EGFR na spermatické hlavičce. EGF tak stimuluje Tyr fosforylací několika proteinů, aktivuje fosfolipázu C γ a aktivuje polymeraci aktinu během kapacitace. U býčích spermii jsou procesy polymerace aktinu, tak i Tyr fosforylace závislé na přítomnosti bikarbonátu. Oba děje jsou závislé na aktivitě proteinkinázy A (PKA) a Tyr kináz, jsou pozitivně ovlivňované EGF a hydrogen peroxidem a jsou blokovány glukózou. Tyr fosforylace aktivuje proteinkinázu A a C (PKA a PKC), které se účastní sestavování filamentárního aktinu. Rozpad filamentární formy aktinu na monomery se děje za účelem zahájení AR (Breitbart 2003; Breitbart et al. 2005). Pouze spermie, které prodělají proces kapacitace mohou podstoupit akrozomální reakci (Yanagimachi 1994; Breitbart et al. 2005).

Hyperaktivace motility

Hyperaktivace motility je další důležitou událostí v procesu maturace spermie. Odehrává se v samičím pohlavním traktu a napomáhá spermii oddělit se od oviduktálního epitelu a pokračovat do místa oplození, kde napomáhá spermii překonat mukózní obal okolo oocyту a dostat se skrze ZP. Hyperaktivace motility spočívá ve zvýšení amplitudy vlnění bičíku a asymetrii pohybu (Harayama & Nakamura 2008). Velký vliv na aktivaci hyperaktivity mají vápníkové ionty, které interagují s axonemou. Dalšími důležitými faktory pro udržení hyperaktivity jsou cAMP, bikarbonát a některé metabolické substráty. Vápníkové ionty a cAMP mohou hrát roli ve fosforylaci proteinů. Zvýšená Tyr fosforylace v bičíku je asociovaná s hyperaktivací motility (u křečků a opic). Hyperaktivace se často projevuje současně během kapacitace, ale mechanismus aktivace těchto dějů je oddělený (Suarez & Ho 2003).

3.3 Vazba spermie a oocytu a akrozomální reakce

U savců je interakce mezi spermii a oocytem a jejich vzájemná aktivace zprostředkována oocytárním glykoproteinovým obalem neboli zonou pellucidou (ZP) (Wassarman 1999; Breitbart et al. 2005). První interakce mezi spermii a vajíčkem spočívá ve vazbě spermie k ZP, tudíž receptory na povrchu kapacitované spermie jsou klíčem k oplození (Tumova et al. 2021).

Spermatozoa se na ZP vážou pomocí své intaktní plazmatické membrány, na které se nachází receptory s vazebnou afinitou k ZP. Tímto způsobem se spermie aktivuje a spustí se u ní akrozomální reakce. Primární vazba spermie a oocytu je závislá na Ca^{2+} (Wassarman 1999; Flesh et al. 2001).

Povrchové proteiny spermie s afinitou k ZP jsou do plazmatické membrány spermie zabudovávány během spermatogeneze, maturace v nadvarlatech, ale i během ejakulace ze seminální plazmy. Některé proteiny s vazebnou afinitou k ZP nacházející se v akrozomu, jsou během kapacitace translokovány do plazmatické membrány, kde se mohou účastnit primární vazby spermie a vajíčka (Tumova et al. 2021). Na spermii se nachází např. protein sp56 (sperm-zona binding protein), který se vyskytuje na plazmatické membráně, ale i v akrozomální matrix, což znamená, že tento protein se účastní primární, ale i sekundární vazby. U některých proteinů se specifitou k ZP se ukazuje, že jsou aktivovány během kapacitace pomocí fosforylace (Flesh et al. 2001).

Oligosacharidy ZP3 obsahují α -navázané neredukující galaktózové zbytky, které jsou velmi důležité ve vazbě se spermii. Přítomnost α -fukózových zbytků na ZP3 oligosacharidech posiluje sílu vazby spermie se ZP (Yanagimachi 1994; Wasserman 1999). Na povrchu ZP jsou i další cukerné zbytky, např. β -N-acetylglukosamin a α -manóza, které jsou při vazbě v interakci s glykosyltransferázami a glykohydrolázami na povrchu spermie. Kromě zmíněných cukerných zbytků se na vazbě podílí i sulfátované cukry, a to jak na straně ZP, tak i na povrchu spermie. Toto bylo potvrzeno tím, že polysulfátované molekuly, jako je např. chondroitin sulfát B, dextran sulfát, fukoidan a suramin inhibují vazbu spermie na ZP (White et al. 2000).

Akrozomální reakce je dějem, kterým musí spermie projít, aby mohla splynout s oocytem. Jedná se o sekreci určitých proteinů, které hrají další roli během fúze s oocytem. Exocytóza akrozomálního váčku je u savců spuštěna potom, co se vazebné proteiny na povrchu spermie dostanou do kontaktu s glykoproteinem ZP3 na povrchu zona pellucida oocytu. Tato vazba zapřičiňuje vstup Ca^{2+} iontů do spermie, které podporují průběh akrozomální reakce. Akrozomální reakce je spuštěna tím, že ZP3 aktivuje spermatickou fosfolipázu c (PLC). Tato následně štěpí PIP2 (phosphatidylinositol-1,4-bisphosphate) na dva produkty, a to IP3 (inositol-1,4,5-triphosphate) a DAG (diacylglycerol). ZP3 interaguje s G-proteiny na povrchu spermie a otevírá iontové kanály, kterými vstupují do spermii Ca^{2+} . Na tyto kanály se svou C-koncovou doménou váže multidoméno-*vý* protein enkurin, který má na svém N-konci doménu bohatou na prolin. Na tuto doménu se váže PI3-K (1-phosphatidylinositol-3-kinase) přes svou SH3 doménu. Aktivovaná PI3-K dává vzniknout PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate), který aktivuje Ser/Thr kinázy. Těmito Ser/Thr kinázami jsou proteinkináza B (PKB/Akt) a atypická proteinkináza c (PKC ζ). Tyto kinázy jsou lokalizovány v akrozomální oblasti a účastní se procesu exocytózy akrozomálního váčku. PKB/Akt je také přímo aktivována pomocí ZP, a to fosforylací na serin (Ser) a treonin (Thr) (Florman et al. 2008).

Na AR se podílí i aktin přítomný v hlavičce spermie. Rozpad filamentární formy aktinu na monomery se děje za účelem zahájení AR (Breitbart et al. 2005).

Po akrozomální reakci jsou na spermiu odhaleny proteiny Izumo, které interagují s receptory Juno na oolemě. Po kontaktu těchto proteinů dojde ke splynutí plazmatických membrán gamet (Bianchi & Wright 2014; Tumova et al. 2021).

3.4 Fosforylace proteinů

Posttranslační modifikace, a to hlavně fosforylace a defosforylace jsou pro buňky klíčové (Uner & Sakkas 2003; Jankovičová et al. 2018). Regulace aktivity proteinů je nejčastěji prováděna právě pomocí přidávání nebo odebrání fosfátových skupin z tyrozinových, serinových anebo treoninových hydroxylových zbytků. Přidávání fosfátových skupin enzymy kinázami se označuje jako fosforylace a odebrání těchto skupin pomocí enzymů fosfatáz je označována jako defosforylace (Han & Haines 2007).

Fosforylace je centrálním mechanismem buňky pro signalizaci a regulaci buněčných procesů. Až třetina eukaryotických proteinů je během života buňky fosforylována (Witze et al. 2007). Procesy, které jsou řízeny pomocí fosforylace jsou reverzibilní, což je způsobeno tím, že se jich účastní proteinkinázy (PKs) i proteinfosfatázy (PPs). Pro buněčnou signalizaci je důležitá koordinace aktivity protein tyrozinkináz (PTKs) a protein tyrozinfosfatáz (PTPs) (Hunter 1995; Mustelin 2007).

3.4.1 Kinázy

Proteinkinázy jsou klíčovými enzymy v buněčném vývoji a signalizaci a jsou velmi významnými enzymy i v procesu spermatogeneze (Salicioni 2007). Genom obratlovců obsahuje geny pro více než 1000 různých PKs. Proteinkinázy odpovídají za většinu transdukce signálů v buňkách modifikací aktivity substrátů (Manning et al. 2002). PKs jsou v základním stavu neaktivní a aktivovány jsou fosforylací. Tak vznikají kinázové kaskády, kdy jedna kináza aktivuje druhou což vede k transdukci signálu až k cílovému substrátu. Tyto fosforylace jsou reverzibilní a pomocí fosfatáz může dojít k opětovné defosforylaci (Cohen 2000). Podílejí se i na dalších procesech, jako je metabolismus, transkripce, přestavby cytoskeletu, děje buněčného cyklu, apoptóza a buněčná diferenciaci (Manning et al. 2002).

Kinázy je možno rozdělit do skupin na základě sekvence jejich katalytické domény, sekvenční podobnosti, vnější struktury katalytické domény a známé biologické funkce. Na základě fylogenetického srovnání kináz člověka, kvasinky, háďátka a octomilky lze říct, že rozdělení skupin kináz je shodné pro celou živočišnou říši. Kinázy je možno rozdělit i podle toho, zda přidávají fosfátovou skupinu na hydroxyl serinu nebo treoninu, nebo na hydroxyl tyrozinu (Manning et al. 2002). Fosforylace na serinu je nejběžnějším typem, zatímco fosforylace na tyrozinu je specifická pro vyšší eukaryota (Mustelin 2007).

Kinázy mají významnou funkci ve spermatogenezi a v maturaci spermií. Proteintyrozinkinázy (PTKs) hrají důležitou roli v kapacitaci, akrozomální reakci a při penetraci ZP (Breitbart & Noar 1999). Existují dva typy PTKs a to receptotové a nereceptotové. Receptotové PTKs jsou transmembránové proteiny, které mají N-koncovou doménu, jednu transmembránovou doménu a C-koncovou doménu. N-koncová doména je extracelulární a váže

aktivační ligandy, transmembránová doména kotví kinázu do membrány a C-koncová doména obsahuje katalytickou podjednotku. Nereceptorové kinázy nemají transmembránovou doménu, bývají to rozpustné vnitrobuněčné proteiny, ale mohou asociovat s membránou. Nereceptorové PTKs mohou fungovat jako katalytické podjednotky membránových receptorů, které nemají svou vlastní katalytickou doménu (Hunter 2009).

Jednou z PTKs je proteinkináza A (PKA), která je aktivována pomocí cAMP. Koncentrace cAMP vzrůstá během kapacitace, a tudíž vzrůstá aktivita PKA. cAMP vzniká činností adenylyl cyklázy (AC), která je aktivována díky Ca^{2+} , HCO_3^- a také kyslíkovým radikálům. PKA je zodpovědná během kapacitace za fosforylaci proteinů a během akrozomální rektace by mohla mít vliv na vylévání Ca^{2+} z akrozomu (Breitbart & Noar 1999). PKA je heterotetramerní kináza která má dvě cAMP vazebné regulační podjednotky a dvě katalytické podjednotky. Katalytické podjednotky jsou aktivovány po navázání cAMP autofosforylací na treoninu (Harayama & Nakamura 2008).

3.4.2 Fosfatázy

Fosfatázy jsou enzymy odebírající fosfátové skupiny z hydroxylových skupin proteinů. Jsou tedy antagonisty ke kinázám a mají velmi specifické a vysoce regulované funkce v buněčných procesech a aktivně se podílí na buněčné signalizaci (Hunter 1995; Mustelin 2007). Fosfatázy je možno stejně jako kinázy dělit na Ser/Thr specifické, Tyr specifické a s duální specifitou. Podle struktury je možno fosfatázy rozdělit do několika skupin, které se v evoluci vyvinuly samostatně a nesdílejí tak žádné strukturní podobnosti (Mustelin 2007).

Tyr fosfatázy

Tyr fosfatázy je možno rozdělit do 4 rodin (I., II. a III. třída fosfatáz s cysteinem v aktivním místě a fosfatázy s kyselinou asparagovou v aktivním místě). Fosfatázy s kyselinou asparagovou (Asp) v aktivním místě mají široké spektrum substrátů a fosfát mohou odebrat z hydroxylových zbytků aminokyselin (AMK) v proteinech, fosfolipidů, cukrů, nukleotidů a epoxidů. Do I. třídy fosfatáz s cysteinem (Cys) v aktivním místě patří receptorové a nereceptorové fosfatázy a VH-1 podobné fosfatázy, kam se řadí mitogen-aktivované proteinkináz fosfatázy (MPKs). II. třída fosfatáz s Cys v aktivním místě obsahuje skupinu CDC25 (cell division cycle 25) fosfatáz podílejících se na regulaci buněčného cyklu. Enzymy řadící se do III. třídy fosfatáz s Cys v aktivním místě jsou přítomny u všech organismů, je možno je najít i u bakterií (Mustelin 2007).

Ser/Thr fosfatázy

Ser/Thr fosfatázy (PPs) jsou typicky metaloproteiny, které hydrolyzují fosfoestery na Ser/Thr zbytcích proteinů. Tyto fosfatázy mají čtyři katalytické podjednotky (PP1, PP2A, PP2B a PP2C). PP1 se u savců vyskytuje ve čtyřech homologních izoformách ($\text{PP1}\alpha$, $\text{PP1}\beta/\delta$, $\text{PP1}\gamma1$ a $\text{PP1}\gamma2$). Všechny tyto čtyři izoformy obsahují konzervovanou aminokyselinovou sekvenci na C konci, kterou mají proteiny ovlivňované cyklin dependentními kinázami. Takže je patrné, že je samotná fosfatáza regulovaná pomocí fosforylace. PP1 se v buňce nevyskytuje samostatně, ale fungují v komplexu s regulačními podjednotkami. Hormony a další substráty s PP1 komunikují právě přes tyto regulační podjednotky (Han & Haines 2007).

Aktivita PP1 je regulována inhibitory 1 a 2 (I1, I2). Aktivita I1 je regulována pomocí fosforylace jednoho Thr zbytku pomocí PKA a Ca²⁺/kalmodulin dependentní defosforylace na stejném zbytku. I2 se váže na PP1 za tvorby neaktivního intermediátu, který se může přeměnit na aktivní, je-li fosforylována vazba mezi I2 a PP1 pomocí GSK3 (Han & Haines 2007).

PP1 α a PP1 γ 2 jsou exprimovány ve spermatidách a buňkách varlat. PP1 γ 2 je výrazně přítomen v jadérku raných spermatid a ve spermatozoích je přítomen i v hlavičce a bičíku. Funkce PP1 γ 2 byla prokázána u knock outovaných myši, kdy -/- jedinci tvořili aneuploidní spermie, spermatogeneze probíhala převážně jen do stádia kulatých spermatid a netvářely se téměř žádné zralé spermie (Han & Haines 2007).

V extraktech lidských spermií byla objevena PP1 γ 2, nebo PP2A, zatímco např. u psa a kance byla objevena forma PP2B. V extraktu býčích spermií byla objevena PP1 i PP2B. PP1 γ 2 může hrát roli při regulaci motility spermií v nadvarlatech a to tak, že fosforylace PP1 γ 2 se zvyšuje a tím se snižuje její aktivita během maturace spermií, které tak mohou získávat schopnost motility (Han & Haines 2007).

V bičíku spermie jsou cílem PP1 AKAPs (A-kinase anchoring proteins). AKAPs jsou multienzymové signální komplexy, které transdukují signál od membránových receptorů. Váží se s cAMP dependentními kinázami jako je PKA, ale některé se váží i s PKC a Ser/Thr fosfatázami. AKAP ve vazbě s kinázou nebo fosfatázou se může vázat na mikrotubul a ovlivňovat tak dynamiku jejich stavby tím, že navádí k mikrotubulu cAMP (Han & Haines 2007).

3.5 Fosforylace proteinů ve spermii

Posttranslační modifikace jsou děje, kdy dochází ke kovalentním změnám na proteinech, a to jejich štěpením, nebo vazbou nových skupin na AMK (Mann & Jensen 2003). Pro spermie jsou z posttranslačních modifikací klíčové fosforylace a defosforylace. Spermie jsou již diferenciované a transkripčně neaktivní a již nevznikají ani nové varianty proteinů (Ashrafzadeh et al. 2013). Aby mohlo docházet k modulaci funkce proteinů, dochází u nich k posttranslačním modifikacím (Jankovičová et al. 2018).

Fosforylace proteinů je jedním z hlavních mechanismů ovlivňujících děje odehrávající se ve spermii, jako je maturace a získání schopnosti oplození. Fosforylace proteinů probíhá již během epididymální maturace, ale následuje i ihned po ejakulaci a zodpovídá za proces kapacitace (Visconti 2009).

Tyrozínová fosforylace je hlavním procesem během kapacitace. Tento proces může být ovlivněn hladinou HCO₃⁻, Ca²⁺, albuminu, ale i energetických substrátů jako je glukóza, pyruvát a laktát. Důležitost přítomnosti glukózy pro oplození byla prokázána u myši, kdy, pokud glukóza nebyla spermii poskytnuta, nedošlo ke splynutí spermie a vajíčka. Přítomnost glukózy je klíčová hlavně pro spermie, které ji metabolizují pomocí pentózofosfátového cyklu (PPP) za vzniku NADPH. U lidských spermií bylo prokázáno, že NADPH může modulovat Tyr fosforylaci, z čehož je možno usuzovat, že glukóza metabolizována v PPP může fungovat jako regulační faktor tyrozínové fosforylace. U býčích spermií se vyskytuje Tyr fosforylace indukovaná heparinem, která může být následně tlumena právě pomocí glukózy (Urner et al. 2001).

Proteiny nejsou fosforylované jen na Tyr, ale i na serinových a treoninových zbytcích. Ser/Thr fosforylaci zajišťují PKA a ERK (extracellular signal-regulated kinase) 1 a 2. ERK cesta byla prokázána u člověka a drůbeže, kdy se ukazuje že hraje významnou roli při hyperaktivaci motility. U člověka je ERK 2 stimulována progesteronem a tato kináza hraje důležitou roli i v kapacitaci a AR. Zvýšená Ser/Thr fosforylace v souvislosti s kapacitací byla prokázána u lidí a křečků (Naz & Rajesh 2004).

3.5.1 Fosforylace během spermatogeneze

Diploidní zárodečné buňky (spermatogonie) prochází redukčním dělením neboli meiózou a dávají tak vznik haploidním spermii. Meióza je regulována hlavně pomocí fosforylačních a defosforylačních kaskád. Tyto kaskády využívají MAP (mitogen-activated protein) kinázy a ERKs. Samotné kinázy jsou aktivované duální fosforylací na treoninových a tyrozinových zbytcích. MAP kinázy jsou exprimovány ve všech spermatogenních buňkách, ale jejich fosforylace je odlišná. Nejvíce jsou fosforylované v raných vývojových stádiích. Nejvyšší fosforylace je detekovatelná v preleptotenních stádiích a je skoro nedetekovatelná v pachytenních primárních spermatocytech a kulatých spermatidách (Lu et al. 1999).

Spermiogeneze sestává ze dvou hlavních postmeiotických událostí. Dochází ke zmenšování velikosti a spermie se protahuje a sbaluje se chromatin. Chromatin obsahuje opakující se jednotky, nukleozomy, které se skládají z oktamerů histonů (dvě kopie dimerů H3/H4 a H2A/H2B) a DNA. Posttranslační modifikace histonů, jejich výměna za jiné varianty, a nakonec výměna za protaminy se podílejí na vyšším sbalování chromatinu. V histonech, nebo v proteinech které histony nahrazují, se vyskytuje vysoká míra fosforylace na Ser1. Tyto proteiny jsou specifické pro varlata. Během meiotického vývoje dochází k fosforylaci na Ser H4 a H3. Fosforylace H4 je pozorovatelná až do pozdních vývojových stádií. Po dokončení meiózy se ještě vyskytuje fosforylace na H4, to je možno pozorovat ještě během elongace spermii. Fosforylace na H3 se po dokončení meiózy již nevyskytuje (Krishnamoorthy et al. 2006).

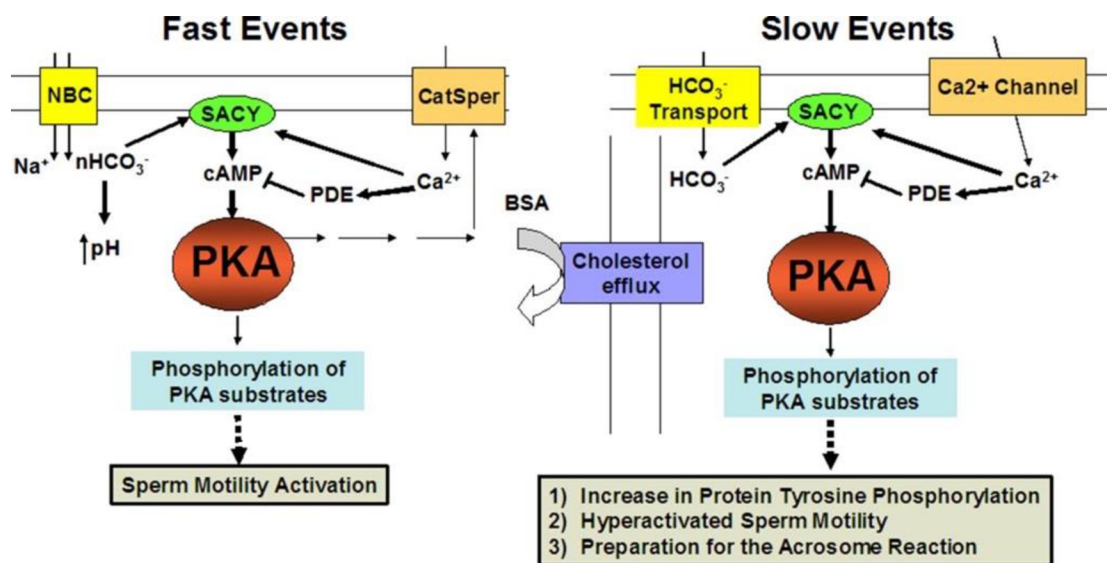
3.5.2 Fosforylace během maturace

Fosforylace je jedním z hlavních mechanismů maturace spermii. Je možno ji pozorovat během epididymální maturace i po vstupu spermii do samičího traktu (Salicioni et al. 2007; Jankovičová et al. 2018). Během průchodu spermii nadvarlaty je pozorovatelná Tyr fosforylace na proximální části akrozomální oblasti a po kapacitaci je fosforylace pozorovatelná i v EqSS a na celé akrozomální oblasti (Fàbrega 2011). Kapacitace je spouštěna pomocí fosforylačních kaskád což v závěru vede až k vylití akrozomálního váčku. Je tedy možno říct, že fosforylace je důležitým principem, jak spermie získává schopnost oplození (Salicioni et al. 2007; Jankovičová et al. 2018).

Jeden z procesů, který je regulován pomocí fosforylace je motilita spermie. Ta se během maturace spermie mění, ustává úplně v ocasu nadvarlete, kde jsou spermie uchovávány, po ejakulaci se spermie stávají pohyblivými a během hyperaktivace se mění charakter motility (Somanath et al. 2004). Protein podílející se na změnách v motilitě spermie skrze Ser/Thr fosforylaci je GSK3. Tento enzym má dvě izoformy (α a β) a obě jsou přítomné v hlavičce a

bičičku spermií, přičemž ale hlavně se zde vyskytuje izoforma α (Somanath et al. 2004; Aparicio 2007). Vlastní funkce enzymu je inhibována jeho fosforylací na Ser, a to pomocí PKA, nebo přes další doplňkovou kinázu. GSK3 se podílí na regulaci motility bovinních a kančích spermií. U bovinních spermií bylo zjištěno, že GSK3 je až šestkrát aktivnější v nepohyblivých spermích z hlavy nadvarlat než v pohyblivých spermích ocasu nadvarlat. Během průchodu nadvarlaty se totiž zvyšuje fosforylace GSK3 na Ser a tím se snižuje jeho aktivita (Aparicio 2007).

Ihned po ejakulaci je znovu zahájena schopnost motility spermie pomocí PKA (viz Obrázek 2). Samotná funkce PKA je stimulována tím, že se spermie dostane do kontaktu se semennou plazmou, ze které se do spermie dostávají Ca^{2+} a HCO_3^- . Ca^{2+} a HCO_3^- mají důležitou roli v metabolismu cAMP, který stimuluje PKA. V pozdějších stádiích probíhá kaskáda vedoucí k fosforylaci podobným principem, ale navíc je nutné, aby byly v okolí spermie látky fungující jako akceptory cholesterolu (Visconti 2009).



Obrázek 2: Fosforylace proteinů a její funkce po ejakulaci (Visconti 2009).

Po ejakulaci je znovuzahájena progresivní motilita spermie, ale zároveň je spermie udržována v nehyperaktivovaném stavu. V prematurních spermích, dokud není hyperaktivace motility žádoucí, je v bičičku pomocí cAMP aktivované PI3K negativně regulována Tyr fosforylace proteinu AKAP3 a tím je snižována VCL (curvilinear velocity) a VSL (straight line velocity), bez omezení progresivní motility spermií. Tím je zamezeno hyperaktivaci motility u nezralých spermií, které ještě nemohou oplodnit oocyt (Harayama & Nakamura 2008).

Existují tři hlavní cesty, kterými je zahájena kapacitace a všechny zahrnují fosforylaci proteinů na Tyr, jedná se o cAMP dependentní dráhu, dráhu využívající Tyr kinázy a dráhu využívající receptory vázané k non-receptorovým Tyr kinázám, viz Obrázek 3. Během kapacitace se fosforylace ve velkém objevuje v akrozomální oblasti, což má souvislost s účastí proteinů na vazbě se ZP. Významně fosforylovanou částí spermie je i bičiček, což má souvislost s hyperaktivací motility. Tato fosforylace se ale nevyskytuje u kance (Naz & Rajesh 2004).

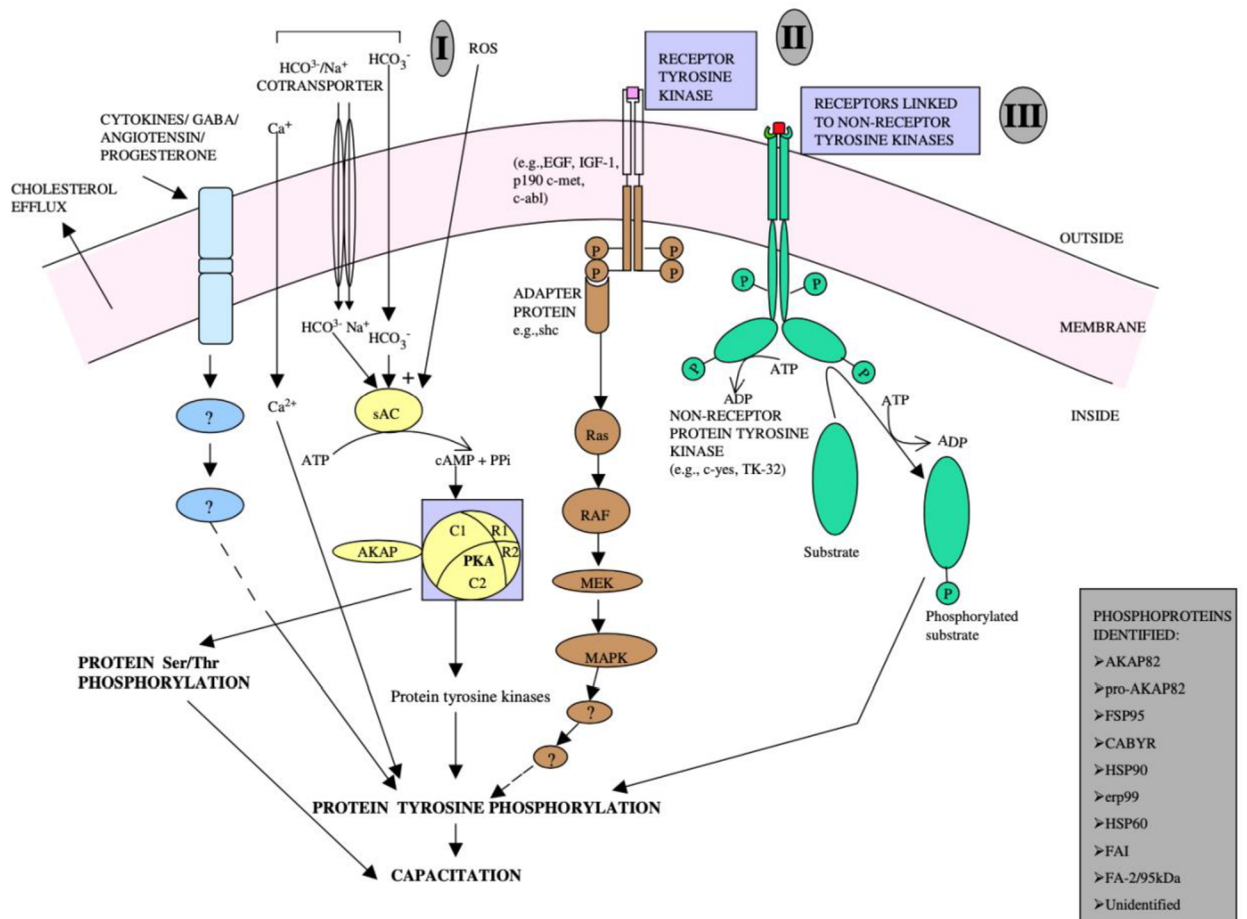
První drahou využívající Tyr fosforylaci vedoucí ke kapacitaci je cAMP dependentní dráha, která je unikátní pro spermie. Bylo dokázáno, že pokud je ke spermím přidán H89 (inhibitor PKA) je kapacitace zablokována a neprobíhá a naopak, pokud byl ke spermím přidán

dibutyryl cAMP (analog cAMP prostupující membránou), docházelo ke zvýšené rychlosti kapacitace, protože se tím i zvyšovala fosforylace proteinů. Tato dráha využívá rozpustnou adenylát cyklázu (sAC), která je stimulována $\text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$, HCO_3^- a ROS. $\text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$ se dostávají do buňky přes plazmatickou membránu pomocí kotransportu. HCO_3^- ovlivňuje kapacitaci i několika dalšími způsoby. Jeho průchodem přes plazmatickou membránu dochází k nárůstu intracelulárního pH, hyperpolarizaci membrány, vyvolává rapidní změny v lipidovém složení membrány a u kance a člověka hraje roli ve zvýšení motility spermie. sAC přeměňuje adenosintrifosfát (ATP) na cAMP a pyrofosfát (PP_i). cAMP následně působí na PKA, která následně stimuluje protein tyrozinkinázy. PKA je tetramer skládající se ze dvou katalytických a dvou regulačních podjednotek. Váže se s AKAP, čímž je zajištěna její specifita. PKA kromě nepřímé Tyr fosforylace přes aktivaci protein Tyr kináz, zajišťuje i přímou Ser/Thr fosforylaci, což ale nespadá do cAMP dependní dráhy aktivace kapacitace (Naz & Rajesh 2004).

U člověka se ve fibrózní pochvě v hlavním oddílu bičíku vyskytují proteiny AKAPs, konkrétně AKAP82, pro-AKAP82 a FSP95, což jsou proteiny s největším podílem tyrozinové fosforylace vyskytující se během kapacitace. AKAPs se vyskytují i u jiných savčích druhů, ale není zachována shodná fosforylace. U myši se například nachází AKAP4, který je fosforylován na Ser/Thr a jeho analog u křečků je fosforylován na Tyr (Naz & Rajesh 2004).

Druhým typem dráhy využívající Tyr fosforylaci je cesta přes receptorové Tyr kinázy (RTKs) vázané v membráně. Ty se po navázání ligandu do extracelulární receptorové domény aktivují a buď dojde k jejich autofosforylaci anebo fosforylují další proteiny. Mezi RTKs patří např. EGF, IGF-1, p190c-met a c-abl. Po autofosforylaci na intracelulární doměně je navázán adaptorový protein, který spouští kaskádu vedoucí přes Ras protein a několik MAPK. Celá tato fosforylační kaskáda vede k Tyr fosforylaci zapříčiňující kapacitaci (Naz & Rajesh 2004).

Třetím typem je dráha spouštěná pomocí receptorů vázaných k non-receptorovým Tyr kinázám, které mohou být vázané v plazmatické membráně, v jaderné membráně anebo se mohou vyskytovat volně v cytoplazmě. Dochází k fosforylaci specifického substrátu, který se podílí na Tyr fosforylaci (Naz & Rajesh 2004).



Obrázek 3: Role Tyr fosforylace při kapacitaci a AR (Naz & Rajesh 2004).

Kapacitace je ovlivňována i Ser/Thr fosforylací. U člověka byly objeveny proteiny, které se zdají být fosforylované na serinu pouze během procesu kapacitace (u spermii, které kapacitované ještě nebyly, nebo u nich již kapacitace plně proběhla, se serinová fosforylace neprojevila). Dále u nich byla také detekována treoninová fosforylace. Jako jeden z těchto proteinů byl identifikován antigen FA-1, u kterého je přítomna fosforylace na serinu, treoninu ale i tyrozinu. Všechny tyto tři zbytky jsou fosforylovány intenzivně během kapacitace, před kapacitací na tomto proteinu nebyla přítomná fosforylace žádná. Fosforylace se ještě zvyšuje po kontaktu spermie se ZP (Naz 1999).

Typický vzor serinové fosforylace se vyskytuje na akrozomové oblasti, po kapacitaci je fosforylace přesunuta do subakrozomální oblasti. V případě treoninu je typická fosforylace v ekvatoriální oblasti a s kapacitací se vyskytuje kromě ekvatoriální oblasti dále také ve střední a hlavní části bičíku (Naz 1999).

Během kapacitace je proteinkinázou A inhibován protein GSK3, tím že je fosforylován na Ser. Tento protein je aktivní v ocasu nadvarlete, kde jsou spermie uchovávány imotilní. Během kapacitace získávají zpět schopnost pohybu a GSK3 musí být opět inhibován. U kančích spermii byla prokázána během procesu kapacitace zvyšující se fosforylace na Ser u izofomy GSK3 α , ale tato fosforylace nebyla přítomná u druhé izofomy (Aparicio 2007).

Za pomoci specifické protilátky bylo dokázáno, že u myši se vyskytuje prolinem řízená Ser/Thr fosforylace, a to převážně během kapacitace spermie. Fosforylační vzor byl výrazný v oblasti hlavní části bičíku a lehce byla fosforylace přítomná i na anteriorní části hlavičky.

Fosforylace zbytků na serinu a treoninu, které předcházejí v aminokyselinové sekvenci prolinu je jedním z hlavních regulačních kroků v procesu buněčné diferenciaci a proliferaci. Díky tomu jsou měněny konformace proteinů a jsou získávána nová vazebná místa pro signální kaskády. Prolin se vyskytuje ve dvou izoformách *cis* a *trans* vzhledem k místu fosforylace. Izomerizace mezi těmito formami způsobuje změnu konformace proteinu, a tudíž i změnu jeho biologické funkce. Za změnu konformace prolinu mezi *cis* a *trans* zodpovídají peptidyl-prolyl izomerázy (PPIases), které se specificky váží na motiv fosfoserin/fosfothreonin-prolin. Mezi prolinem řízené kinázy patří cyklin dependentní kinázy (CDK), MAPK, GSK a Jun N-terminální kinázy (JNK) (Jha et al. 2006).

3.5.3 Fosforylace během fertilizace

Vazba spermie na ZP spustí AR. Aby mohla u spermie nastat AR, musí nejprve dojít ke kapacitaci. Při kapacitaci dojde ke spuštění signálních fosforylačních kaskád. Dochází k aktivaci adenylát cyklázy (AC) a vzniká cAMP, je aktivována PKA a jsou fosforylovány proteiny na Tyr. Navázáním spermií na ZP je stimulována další aktivita cAMP/PKA systému a je aktivována PKC. PKC otevírá vápníkové kanály v plazmatické membráně spermie. PKA spolu s IP3 aktivuje vápníkové kanály ve vnější akrozomální OAM, což vede k nárůstu cytosolického vápníku. Nastává disperze F-aktinu a OAM se dostává do blízkosti k PM, následně s ní splývá čímž dochází k vylití akrozomálního váčku. Na F-aktin, který se váže na membrány spermie se navazuje fosforylovaná PLC γ . PLC vytváří DAG, který zvyšuje fúzíbilní membrán, aktivuje PKC a PLA₂. PLC γ se nachází v akrozomální oblasti hlavičky savčí spermie (Breitbart 2003).

Zvýšená Tyr fosforylace je asociovaná s vazbou spermie na ZP, akrozomální reakcí a vazbou a fúzí gamet. Spermie, které se vážou na ZP a následně fúzí s PM oocyty jsou typické tím, že je u nich přítomná Tyr fosforylace (Urner & Sakkas 2003). Mezi Tyr fosforylací a vazbou spermie na ZP existuje kauzální vztah. Téměř všechny spermie, které se navážou na ZP vykazují fosforylací na Tyr ve vnitřních bičíkových strukturách a na vnějším povrchu hlavičky. Tento fosforylační vzor se nevyskytuje u většiny spermií, které se nedokázaly navázat na ZP. Cílovými proteiny Tyr fosforylace na hlavičce spermie mohou být proteiny zodpovědné za remodelaci povrchu PM spermie, jako jsou chaperony a proteiny tepelného šoku. Tím že jsou fosforylované tyto proteiny na hlavičce spermie, dojde ke konformačním změnám, které usnadní tvorbu vazebných komplexů mezi proteiny spermie a ZP (Asquith 2004).

U kapacitovaných spermií a během akrozomální reakce je výrazná aktivita MAP kinázových a ERKs kaskád. Dochází i k interakci jednotlivých prvků těchto kaskád, jako jsou PKA, PKC, PTK. Ukazuje se, že existuje více paralelních cest vedoucích k fosforylaci proteinů, která je potřebná k získání schopnosti oplození (Awda & Buhr 2010).

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Spermie

Pro tuto práci byly použity spermie 17 kanců z inseminační stanice LIPRA PORK, a.s. Skršín, jednalo se o spermie ve formě nativního ejakulátu a inseminačních dávek. Ejakulát byl na inseminační dávku zpracováván v den odběru. Nativní ejakulát i inseminační dávky byly dopravovány do laboratoře a uchovávány v temperovaném boxu se stálou teplotou 17 °C. Nativní ejakulát byl v laboratoři zpracováván v den odběru, inseminační dávky byly při 17 °C uchovávány do druhého dne a následně zpracovány. Vzorky epididymálních spermií byly získány ze zmrazeného materiálu ze zásob KVD ČZU.

4.1.2 Použité roztoky

- Zásobní 10x koncentrovaný roztok PBS (Phosphate-buffered saline) s pH 7,2 byl připraven smísením 90 g NaCl, 12 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 2 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O a destilované vody v celkovém objemu roztoku 1 l.
- PBS-T byl připraven smísením 1 l 1x koncentrovaného pracovního roztoku PBS a 0,5 ml Tweenu.
- PBS na buňky byl připraven rozmícháním 5 PBS tablet v 1 l destilované vody.
- 5x koncentrovaný zásobní roztok elektroforetického pufru byl připraven rozpuštěním 7,5 g Tris, 36 g glycinu, a 2,5 g SDS (dodecylsírany sodného) v 0,5 l destilované vody.
- Transferový pufr byl připraven smísením 3,03 g Tris a 14,4 g glycinu a rozpuštěním ve 200 ml destilované vody. Bylo přidáno 150 ml methanolu a roztok byl doplněn do 1 l destilovanou vodou.
- Neredukující vzorkový pufr 5x koncentrovaný byl připraven smícháním 0,6 ml Tris HCl, 5 ml 50% glycerolu, 2 ml 10% SDS, 0,5 ml bromfenolové modři, 0,9 ml destilované vody.
- 5% mléko bylo připraveno rozpuštěním 2,5 g sušeného mléka v 50 ml 1x koncentrovaného PBS.
- 2% formaldehyd s 2% BSA pro fixaci na skla byl připraven smícháním 9,333 ml destilované vody, 0,666 ml 30% formaldehydu a 200 µl BSA.
- Základ pro kapacitační médium Basic TL-Hepes s pH 7,3 byl připraven smícháním 1 l destilované vody, 6,6634 g NaCl, 0,2386 g KCl, 0,0408 g Na₂HPO₄, 1,4 ml laktátu sodného, 0,1018 g MgCl₂ x 6 H₂O, 2,383 g Hepes, 0,0220 g pyruvátu sodného, 2,186 g sorbitolu, 0,025 g gentamicinu, 0,065 g penicilinu a 0,1 g PVA.
- Kapacitační médium s pH 7,2 – 7,4 bylo připraveno smísením 50 ml Basic TL-Hepes, 0,099 g glukózy, 0,0275 g pyruvátu sodného, 1 g BSA, 0,0084 g NaHCO₃ a 0,0147 g CaCl₂ x 2 H₂O.

4.1.3 Protilátky

Jako primární protilátka proti fosfotyrozinu byla použita monoklonální protilátka 4G10[®] Platinum, Anti-Phosphotyrosine (mouse monoclonal cocktail IgG_{2b}) od firmy EMD Millipore (catalog number 05-1050) produkovanou v myších. Při nanášení na skla byla ředěna v poměru 1:300 v PBS. Při značení membrány bylo použito ředění 1:1000 v PBS.

Jako primární protilátka proti fosfoserinu byla použita polyklonální protilátka od firmy EMD Millipore (catalog number AB1603) produkovaná v králících. Při nanášení na skla byla protilátka ředěna v poměru 1:50 v PBS. Při značení membrán jsme využívali ředění 1:500.

Protilátek proti α -tubulinu pro značení na membrány byly použity dva typy, monoklonální protilátka produkovaná v myších (clone DM1A) od firmy Sigma Aldrich a polyklonální protilátka produkovaná v králících (catalog number PA1-38814) od firmy Thermo Fisher Scientific. V obou případech byly protilátky ředěny 1:10 000 v PBS.

Jako negativní izotopová kontrola myši primární protilátky na membránách byl využit sérový myši imunoglobulin IgG ředěný v poměru 1:10 000 v PBS.

Sekundární protilátky na membrány byly použity 2, kozí anti-myši GAM (Bio-Rad, USA) a kozí anti-králíčí GAR (Bio-Rad, USA), obě při ředění 1:3000 v PBS. Sekundární protilátky na skla byly použity 2, kozí anti-myši (GAM) a kozí anti-králíčí (GAR) od firmy Thermo Fisher Scientific. Konkrétně Alexa Fluor[™] 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) a Alexa Fluor[™] 488 goat anti-mouse IgG (H+L). Jedná se o protilátky konjugované s FITC. Ředění bylo u obou protilátek stejné, a to v poměru 1:300 v PBS.

4.1.4 Standardy pro elektroforetickou separaci

Standardy pro určení přibližných molekulových hmotností nalezených proteinových pruhů byly použity dva: Precision Plus Protein[™] All Blue Prestained Protein Standards #1610373 (Bio-Rad, USA) a Precision Plus Protein[™] Dual Color Standards #1610374S (Bio-Rad, USA), které oba obsahovaly 10 rekombinantních proteinů o definovaných molekulových hmotnostech.

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava pelet z inseminační dávky (ID)

ID byla přepravována a uchovávána v termoboxu při teplotě 17 °C. Obsahovala spermie o přibližné koncentraci $5-8 \times 10^7$ v 1 ml. ID byla rozdělena do tří 15ml zkumavek po 5 ml. Zkumavky byly odstředěny 10 min při RT při 270 g. Supernatant byl odstraněn a ke spermii bylo přidáno 5 ml PBS na buňky. Spermie byly odstředěny při stejných parametrech. Takto byly spermie promyty 3x. Do zkumavek určených pro kapacitaci a indukci AR u spermii bylo přidáno 5 ml základu pro kapacitační médium Basic Hepes. K peletě ejakulovaných spermii bylo přidáno 5 ml PBS na buňky a spermie byly v těchto roztocích promyty. Do zkumavek určených pro kapacitaci a indukci AR bylo přidáno 10 ml kapacitačního média a byly umístěny do termostatu při 38 °C a 5% CO₂, kde 1,5 hod probíhala kapacitace.

Do zkumavky, ve které byly ejakulované spermie, bylo přidáno 5 ml PBS na buňky a směs byla rozdělena do pěti mikrozkuvek Eppendorf o objemu 1,5 ml. Mikrozkuvky byly odstředěny při 20 °C, 10 min na 300 g. Byl odstraněn supernatant a zkumavky byly zamrazeny.

Po 1,5 hod byly zkumavky určené pro kapacitaci a indukci AR vyjmuty z termostatu a byly odstředěny při RT, 10 min na 270 g a následně promyty v PBS na buňky. Do zkumavky určené pro indukci AR bylo přidáno 10 ml PBS na buňky a 10 µl kalcium ionoforu. Takto byla inkubována v termostatu při 38 °C a 5% CO₂ na 1,5 hod, s občasným promícháním.

Zkumavka s kapacitovanými spermii byla zpracována stejným způsobem jako zkumavka s ejakulovanými spermii.

Po 1,5 hod byla zkumavka určená pro indukci AR spermii vyjmuta z termostatu a odstředěna při RT, 10 min na 270 g. Byl odstraněn supernatant a peleta byla 2x promyta v PBS. Následně byla zkumavka zpracována stejně jako předchozí, ale dala vzniknout pouze třem peletám v mikrozkuvkách kvůli větším ztrátám při promývání.

4.2.2 Příprava pelet z nativního ejakulátu (NAT)

Nativní ejakulát byl přivezen v chladícím boxu při teplotě 17 °C. Byl zpracováván ihned po odběru a přivezení do laboratoře. Vzorek byl koncentrovanější než ID. Do tří 15ml zkumavek byl napipetován 1 ml ejakulátu a k němu bylo přidáno 5 ml PBS na buňky. Další postup při zpracování spermii z nativního ejakulátu byl stejný jako při zpracování ID s rozdílem, že doba kapacitace byla 3,5 hod.

4.2.3 Zpracování epididymálních spermii

Spermie byly získány ze zamraženého nadvarlete, které bylo rozmrazeno ve vodě při RT. Pomocí chirurgických nůžek bylo nadvarle rozděleno na jednotlivé oddíly (hlavu, tělo a ocas). Z povrchu bylo odstraněno povrchové vazivo a byly obnaženy kanálky, které byly nastříhány na kousky velké cca 0,5 x 0,5 cm a byly vloženy do tří falkon s 10 ml PBS. Zkumavky s nadvarletními kanálky a PBS byly vloženy do termostatu na 30 min při 38 °C a 5% CO₂. Následně byl obsah zkumavek přes gázu přefiltrován do čistých zkumavek, které byly odstředěny 5 min při RT na 50 g. Byl odsát supernatant se spermii. Zkumavky byly odstředěny 10 min při RT při 270 g. Byl odstraněn supernatant a k peletám spermii z hlavy a těla nadvarlat bylo přidáno 10 ml PBS na buňky. K peletě z ocasu nadvarlat bylo přidáno 5 ml PBS, tento úsek měl menší výtěžnost spermii. Spermie byly rozděleny po 1 ml do mikrozkuvek. Mikrozkuvky byly odstředěny při 20 °C, 10 min na 300 g. Byl odstraněn supernatant a pelety byly zamrazeny.

4.2.4 Fixace spermii na skla formaldehydem v suspenzi

Při přípravě pelet bylo odebráno 100 µl z každé fáze maturity a z každého oddílu nadvarlat do mikrozkuvek Eppendorf. Do mikrozkuvek bylo přidáno 400 µl PBS na buňky. Připravené mikrozkuvky byly stočeny na centrifuze při RT, 5 min na 300 g a následně byl odstraněn supernatant. Do zkumavek bylo přidáno 150 µl 2% formaldehydu ve vodě s 2% BSA. Zkumavky byly inkubovány při RT 20 min. Následně byly odstředěny při stejných parametrech a byly 2x promyty v PBS na buňky.

Suspenze byla naředěna PBS na buňky na koncentraci požadovanou pro nátěr na skla (kontrola pod mikroskopem). Na dva kroužky připravené pomocí PAN Pen liquid rocker na podložních sklíčkách byla nanese suspenze spermií v objemu 10 μ l. Po zaschnutí suspenze byla sklíčka uchovávána v lednici.

4.2.5 Nepřímá imunofluorescence – detekce fosforylovaných proteinů

Nepřímá imunofluorescence je technika pro detekci antigenů označených protilátkami v konjugaci s fluorofory.

Skla se zafixovanými spermii byla omyta PBS a osušena. Do každého kolečka bylo přidáno 150 μ l SuperBlocku (Thermo Scientific, USA) a skla byla inkubována ve vlhké komůrce ve tmě 30 min při RT. Následně byla skla opět omyta PBS a osušena. Do levého kolečka byla nanese 100 μ l směsi naředěné primární protilátky proti fosfotyrozinu v ředění 1:300, nebo fosfoserinu v ředění 1:50 v PBS. Do pravého kolečka bylo nanese 100 μ l PBS (kontrola). Skla byla inkubována ve vlhké komůrce v lednici do druhého dne.

Druhý byla skla omyta PBS. Do obou koleček na sklech bylo nanese 100 μ l směsi sekundární protilátky v ředění 1:300 v PBS konjugované s FITC. Pro P-Tyr byla použita GAM (Alexa Fluor™ 488, Invitrogen, USA), pro P-Ser byla použita GAR (Alexa Fluor™ 488, Invitrogen, USA). Následovala inkubace ve vlhké komůrce ve tmě 30 min při RT. Skla byla omyta PBS a osušena. Do obou koleček bylo nanese 100 μ l roztoku PNA s rhodaminem (Rhodamin Peanut Agglutinin, Vector Laboratories, USA) v ředění 1:1000 v PBS pro značení akrozomů a skla byla inkubována ve vlhké komůrce ve tmě 30 min při RT. Ve tmě byla skla omyta PBS a následně i destilovanou vodou a byly na ně nanese 2 μ l VectaShieldu DAPI (Antifade Mounting Medium, Vector Laboratories, USA) pro značení jaderné DNA. Skla byla překryta krycím sklíčkem.

Preparáty byly pozorovány pod imunofluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E600. Byly snímány kamerou Nikon Digital Sight DS-Fi1 (Japonsko) a softwarem pro analýzu obrazu NIS Elements.

4.2.6 Elektroforéza (SDS PAGE)

Elektroforéza je metodou rozdělovací proteiny v elektrickém poli. SDS (dodecylsírán sodný) je detergent, který udává všem proteinům záporný náboj, a tak jsou proteiny rozdělovány podle molekulové hmotnosti.

Vzorky byly rozmrazeny. K 50 μ l vzorku bylo přidáno 150 μ l neredukujícího vzorkového pufru. Následovala lyzace na ledu po dobu 30 min. Vzorky byly povařeny 5 min na thermoshakeru a následně odstředěny 2 min při 4 °C a 10 000 g. Dále byl zpracováván supernatant. Ke 100 μ l supernatantu bylo přidáno 5 μ l merkptoetanolu a opět došlo k povaření. Takto byly vzorky použity jako nanášky do gelu.

Byl použit 12% separační a následně 4% zaostřovací SDS PAGE (viz kapitola Materiál), tyto gely byly navrstveny mezi sestavu skel. Sestava skel byla vložena do elektroforetické aparatury Bio-Rad. Elektroforetická nádoba byla naplněna elektroforetickým pufrem. Vzorky byly nanese pomocí mikrostříkačky Hamilton po 12 μ l. Do jedné jamky byl nanese standard pro určení molekulové hmotnosti proteinů o objemu 3 μ l.

Elektroforéza probíhala nejprve 20 min na 80 V, následně bylo napětí zvýšeno na 140 V po dobu 45 min a dále bylo zvyšováno, dokud se vzorky nedostaly na konec gelu. Gely byly využity pro elektropřenos.

4.2.7 Western blot

Western blot je metoda přenesení proteinů z elektroforetického gelu na nitrocelulóзовou membránu. Přenos byl proveden pomocí filtračních papírů, houbiček a porézní kazety která byla vložena do aparatury pro Western blot tak, aby byly záporně nabitě proteiny (pomocí SDS) přenášeny na membránu směrem k anodě. Do nádoby aparatury byl nalit transferový pufr. Elektropřenos probíhal 1 hod za stálého elektrického proudu o velikosti 1 A a aparatura byla po dobu přenosu chlazena ledem.

4.2.8 Imunodetekce proteinů na membránách

Po dokončení elektropřenosu byly proteiny na membráně vizualizovány pomocí barvení Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA) po dobu 1 min. Membrána byla odbarvena promytím v destilované vodě a PBS. Následně byla membrána inkubována 30 min v 5% mléce při RT kvůli deaktivaci volných míst na membráně. Následně byla 2x promyta v PBS-T kvůli blokování nespecifických vazeb.

Na membránu byla nanášena primární protilátka (proti fosfotyrozinu v ředění 1:1000, fosfoserinu v ředění 1:500, α -tubulinu v ředění 1:10 000 a myší sérový imunoglobulin v ředění 1:10 000 jako negativní kontrola) v PBS. Jako negativní kontrola králičí protilátky bylo využíváno jen čisté PBS. Membrána s protilátkami byla kultivována v lednici při 4 °C do druhého dne. Další den byly membrány promyty na rotační třepačce 3x 10 min v PBS-T. Na membránu byla nanášena sekundární protilátka v konjugaci s křenuvou peroxidázou v ředění 1:3000 (Goat anti rabbit a Goat anti mouse) v PBS v celkovém množství 3 ml. Takto byly membrány inkubovány ve falkonech 1 hod při RT na rotační třepačce. Po inkubaci následovalo promývání 4x 5 min v PBS-T na rotační třepačce a následně 2x 5 min v PBS.

Pro promytí byly proteiny vizualizovány na přístroji Azure c300 Gel Imaging System (Azure Biosystem, USA). Byly smíchány 2 složky chemiluminiscenčního substrátu West Pico PLUS v poměru 1:1 v celkovém množství 200 μ l, který byl nanášen na membránu.

Některé membrány byly využity opakovaně. Z membrán bylo odstraněno značení protilátkami ihned po vizualizaci na Azure c300 Gel Imaging System. Membrány byly opláchnuty na rotační třepačce 10 min ve stripovacím roztoku Restore WB stripping Buffer Thermo Scientific. Následně byly membrány promyty 5 min v PBST-T a 5 min v PBS. Byly vložena mezi dva suché filtrační papíry, označeny, obaleny alobalem a zamrazeny. Před dalším použitím byly membrány promyty v PBS a následně byly po dobu 1 hod na rotační třepačce v 5% mléce při RT. Pokud byla původně na membránu využita myší primární protilátka, musela být při druhém značení využita králičí primární protilátka a naopak. K primárním protilátkám byly využity odpovídající sekundární protilátky.

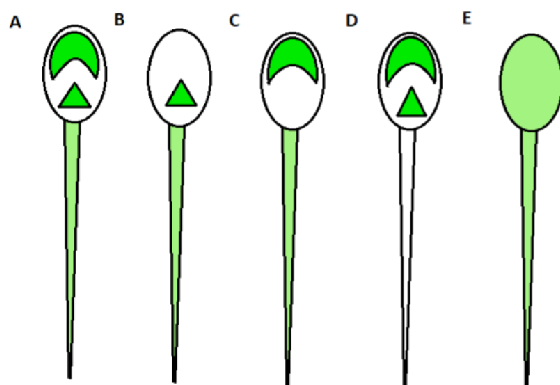
5 Výsledky

5.1 Detekce fosforylovaných proteinů pomocí imunofluorescence

Aby byla detekována změna fosforylace ve spermiích během jejich maturace, byly odebrané spermie kapacitovány *in vitro* a následně u nich byla *in vitro* navozena AR. Dále byly také hodnoceny spermie odebrané z jednotlivých oddílů nadvarlat. Spermie z jednotlivých stupňů maturace byly fixovány na skla a imunofluorescenčně značeny. Byly extrahovány jejich proteiny, které byly následně zkoumány pomocí elektroforézy a Western blot imunodetekce. Byly využity protilátky proti fosfotyrozinu a proti fosfoserinu a bylo sledováno, zda se mění fosforylační vzory a jak se mění míra fosforylace proteinů na spermiích.

5.1.1 Detekce fosforylace pomocí protilátky proti fosfotyrozinu

Spermie vykazovaly fosforylaci proteinů na tyrozinových zbytcích. Bylo detekováno několik fosforylačních vzorů, což je ukázáno na následující sérii snímků z imunofluorescenčních preparátů. Na obrázku 4, je schematicky znázorněna pozorovaná fosforylace proteinů pomocí protilátky proti PY (fosfotyrozinu) s následnou vizualizací pomocí fluorescence. Tyto vzory se vyskytovaly napříč všemi skupinami zkoumaných spermií. Nejčastěji zastoupeným vzorem byl vzor A, tedy silná fluorescence v EqSS a akrozomálním váčku a slabá fluorescence na bičíku. Pokud byla ve spermií detekována fosforylace na bičíku, byl signál vždy slabý. Na některých snímcích se nacházel vzor E, tedy slabá fluorescence na celé spermií, který byl pravděpodobně způsoben nespecifickou vazbou protilátky při příliš dlouhé inkubaci.



Obrázek 4: Detekované fosforylační vzory za využití protilátky proti PY: Tmavší barva – silný signál, světlejší barva – slabý signál; v následujících tabulkách a snímcích využito písmenné označení.

Ejakulované spermie

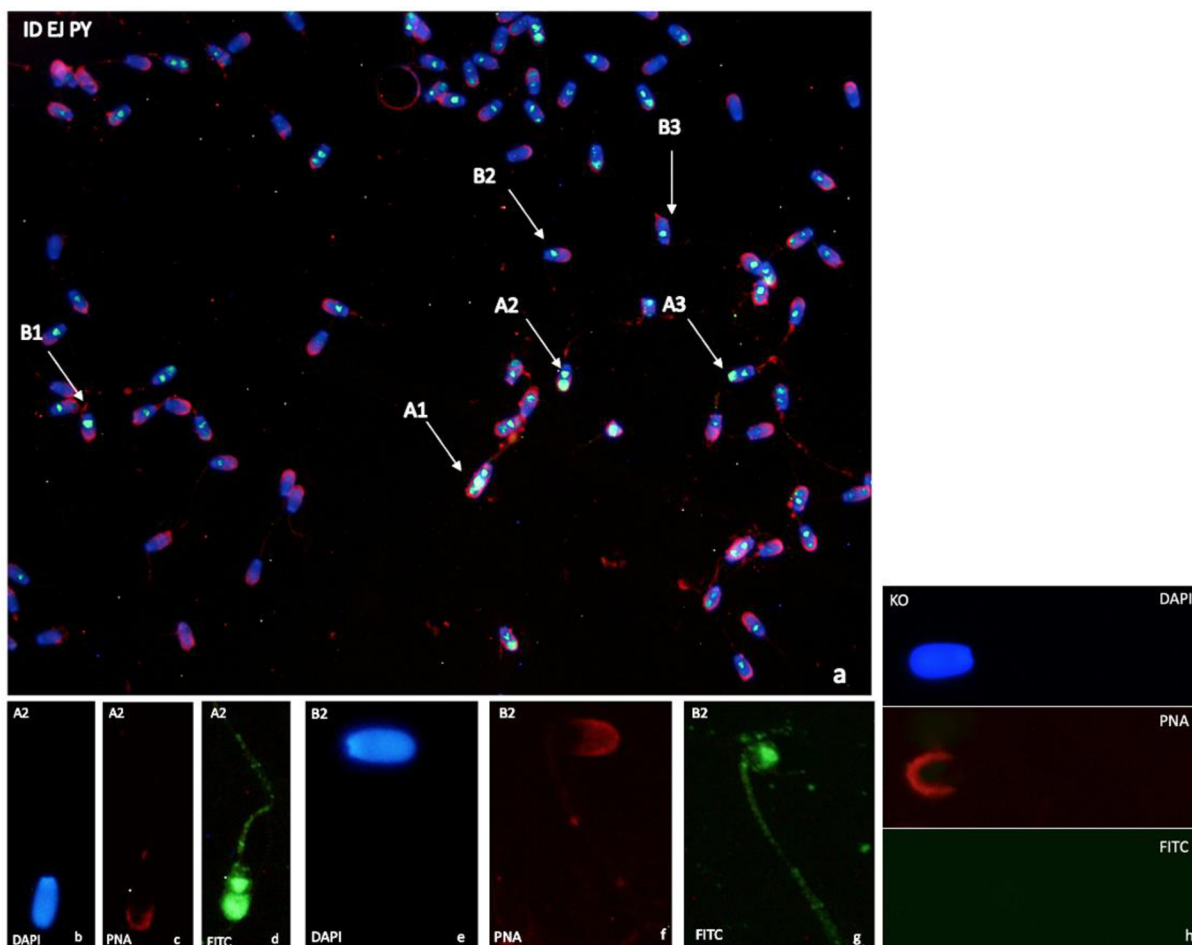
V tabulce 1 je zaneseno procentuální zastoupení ejakulovaných spermií vykazujících určité tyrozinové fosforylační vzory. Celkem bylo pomocí imunofluorescenčního značení zkoumáno 19 vzorků ejakulovaných spermií. Některé vzorky byly hodnoceny dvakrát a to

proto, že byla změněna doba kultivace spermií s primární protilátkou. V tabulce jsou zaneseny vzorky připravené z nativních ejakulátů a inseminačních dávek. V každém vzorku bylo zhodnoceno 100 až 200 spermií a výsledný počet byl přepočítán na procenta. U ejakulovaných spermiích se vyskytovaly všechny výše zmíněné fosforylační vzory. Největší zastoupení měl fosforylační vzor A a B. Nejméně byl zastoupen vzor D. Vzory A a B jako nejdominantnější zastoupené vzory je možno vidět dále na obrázku 5.

Tabulka 1: Procentuální zastoupení ejakulovaných spermií vykazujících jednotlivé fosforylační vzory (viz obrázek 4).

Procentuální zastoupení tyrozinových fosforylačních vzorů na ejakulovaných spermiích						
id vzorku	NAT/ID	vzor A (%)	vzor B (%)	vzor C (%)	vzor D (%)	vzor E (%)
NAT EJ SU 730 26.7.21 PY	NAT	91,5	0,0	7,0	0,0	1,6
NAT EJ SU 710 17.9.21 PY	NAT	81,8	18,2	0,0	0,0	0,0
NAT EJ SU 730 17.9.21 PY	NAT	95,0	0,0	3,0	2,0	0,0
NAT EJ SU 679 20.9.21 PY	NAT	99,0	1,0	0,0	0,0	0,0
NAT EJ SU 744 20.9.21 PY	NAT	93,2	6,1	0,7	0,0	0,0
NAT EJ SU 679 20.9.21 PY	NAT	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
NAT EJ SU 710 13.9.21 PY	NAT	0,0	57,4	0,0	0,0	42,6
NAT EJ SU 730 13.9.21 PY	NAT	0,0	56,5	0,0	0,0	43,5
NAT EJ SU 730 26.9.21 PY	NAT	22,9	72,9	1,0	0,0	3,1
NAT EJ SU 744 20.9.21 PY	NAT	0,5	99,5	0,0	0,0	0,0
NAT EJ SU 722 18.10.21 PY	NAT	70,6	5,9	16,5	0,0	7,1
ID EJ SU 679,700 27.7.21. PY	ID	93,9	3,9	2,2	0,0	0,0
ID EJ SU 685,673 27.7.21. PY	ID	94,1	3,0	3,0	0,0	0,0
ID EJ SU 711 13.7.21 PY	ID	86,3	10,8	2,8	0,0	0,0
ID EJ SU 668,711 2.9.21 PY	ID	75,0	0,0	0,0	0,0	25,0
ID EJ SU 730,740 2.9.21 PY	ID	94,0	0,0	4,5	0,0	1,5
ID EJ SU _ 13.7.21 PY	ID	0,0	95,3	0,0	0,0	4,7
ID EJ SU 668,711 31.8.21 PY	ID	0,0	33,7	0,0	0,0	66,3
ID EJ SU 730,740 31.8.21 PY	ID	0,0	15,1	0,0	0,0	84,9
Celkem ze všech EJ spermií		54,3	36,5	1,9	0,1	7,2

Na obrázku 5 je série snímků z imunofluorescenčního mikroskopu zachycující fosforylaci na Tyr u ejakulovaných spermií z inseminační dávky. Na větším snímku je možno vidět proložení tří fotografií, kdy je pomocí DAPI (modře) značeno jádro, pomocí PNA lektinu v konjugaci s rhodaminem (červeně) je značen akrozom a je detekována fosforylace (zeleně). Šipky ukazují na spermie, na kterých je snadno pozorovatelné typické fluorescenční značení. Při proložení všech tří vrstev se ztrácí slabý fluorescenční signál, který vykazují spermie například na bičíku, ale ten je patrný na menších snímcích, kde je možno vidět fosforylační vzory, které byly charakteristické pro ejakulované spermie. Jsou jimi vzor A, kde jasně svítí akrozomální oblast, EqSS a slabě svítí bičík a vzor B, kde je fluorescence přítomna na EqSS a na bičíku.



Obrázek 5: Ejakulované spermie z inseminační dávky značené protilátkou proti PY 4G10 při zvětšení 400x: (a) celkový pohled na spermie značené fluorofory DAPI, rhodaminem a Alexa 488, šipkami jsou označeny spermie vykazující typické vzory, vzory jsou označeny písmeny podle schématického obrázku viz výše; (b), (c) a (d) spermie vykazující fosforylační vzor A, na (a) označena jako A2; (e), (f) a (g) spermie vykazující fosforylační vzor B, na (a) označena jako B2; (b) a (e) jádro spermii označené modrým fluoroforem DAPI; (c) a (f) akrozom spermie označený červeným fluoroforem rhodaminem; (d) a (g) pozitivní reakce s protilátkou označená zeleně fluoroforem Alexa 488; (h) negativní kontrola pro fluorofory DAPI, rhodamin a Alexa 488.

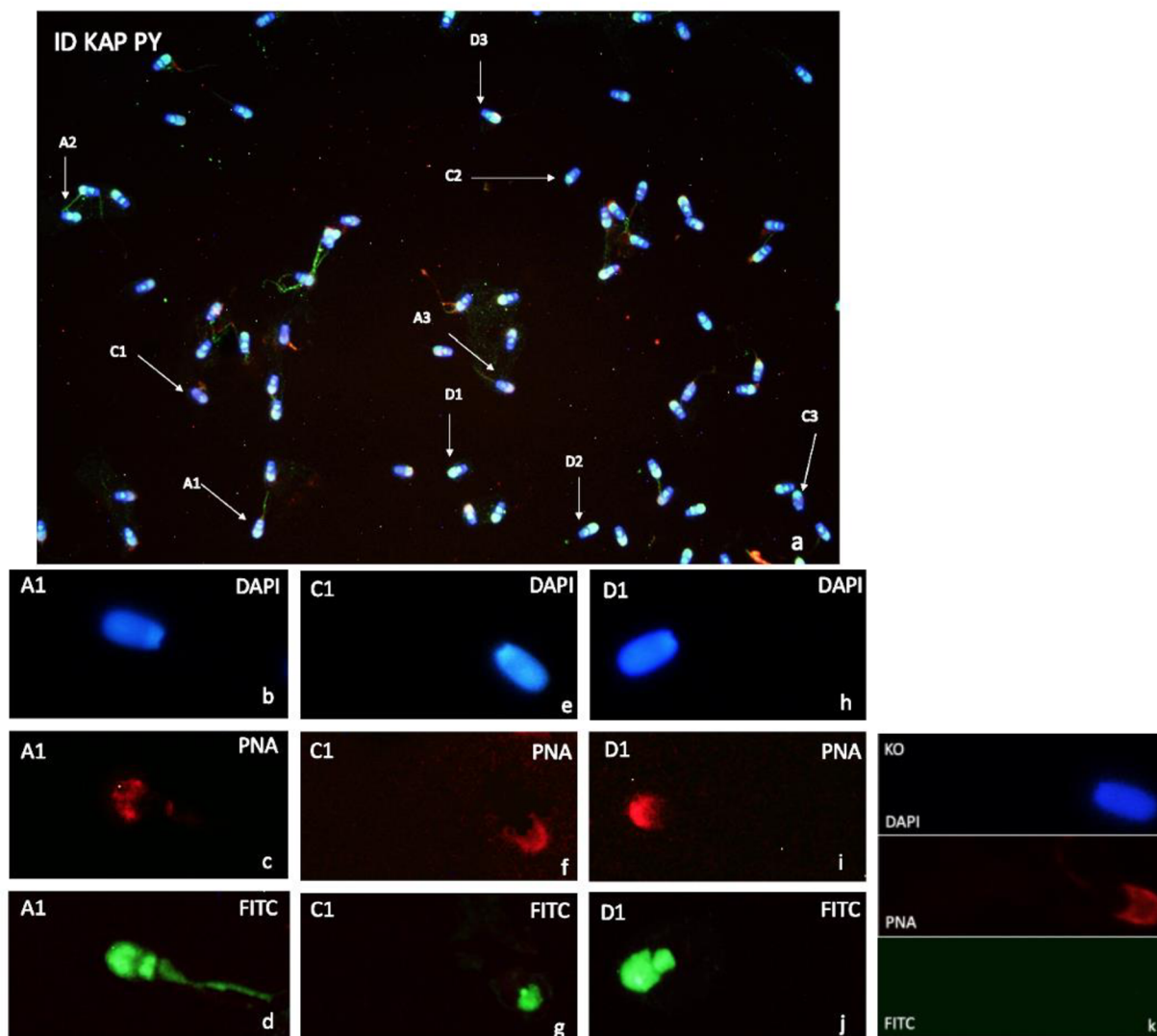
Kapacitované spermie

V tabulce 2 je zaneseno procentuální zastoupení spermii po *in vitro* kapacitaci vykazujících jednotlivé tyrozinové fosforylační vzory. Celkem bylo pomocí imunofluorescenčního značení zkoumáno 15 různých vzorků spermii. V tabulce jsou vzorky připravené z nativních ejakulátů a inseminačních dávek. V každém vzorku bylo zhodnoceno 100 až 200 spermii a výsledný počet byl přepočítán na procenta. Opět byly přítomné všechny výše zmíněné fosforylační vzory. Nejčastější byly opět A a B, ale byly zde více zastoupeny i vzory E a D. Nejméně zastoupený byl vzor C.

Tabulka 2: Procentuální zastoupení tyrozinových fosforylačních vzorů (viz obrázek 4) na kapacitovaných spermích.

Procentuální zastoupení tyrozinových fosforylačních vzorů na kapacitovaných spermích						
id vzorku	NAT/ID	vzor A (%)	vzor B (%)	vzor C (%)	vzor D (%)	vzor E (%)
NAT KAP SU 730 26.7.21 PY	NAT	87,3	0,7	2,0	9,3	0,7
NAT KAP SU 710 17.9.21 PY	NAT	83,0	0,0	0,0	17,0	0,0
NAT KAP SU 730 17.9.21 PY	NAT	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NAT KAP SU 679 20.9.21 PY	NAT	21,1	78,9	0,0	0,0	0,0
NAT KAP SU 744 20.9.21 PY	NAT	1,2	82,9	0,0	0,0	15,9
NAT KAP SU 679 20.9.21 PY	NAT	0,0	69,1	2,5	0,0	28,4
NAT KAP SU 710 13.9.21 PY	NAT	0,0	83,9	0,0	0,0	16,1
NAT KAP SU 730 13.9.21 PY	NAT	0,0	70,4	0,0	0,0	29,6
NAT KAP SU 744 20.9.21 PY	NAT	0,0	48,7	1,3	0,0	50,0
ID KAP SU 685,673 27.7.21. PY	ID	78,7	0,0	0,5	20,7	0,0
ID KAP SU 679,700 27.7.21 PY	ID	93,4	2,5	4,1	0,0	0,0
ID KAP SU 668,711 2.9.21 PY	ID	92,9	7,1	0,0	0,0	0,0
ID KAP SU 730,740 2.9.21. PY	ID	98,6	0,7	0,7	0,0	0,0
ID KAP SU 740,679 7.9.21 PY	ID	0,0	88,5	0,0	0,0	11,5
ID KAP SU 756,673 7.9.21 PY	ID	0,0	56,8	0,0	0,0	43,2
Celkem ze všech KAP spermíí		52,3	32,7	0,9	4,6	9,5

Na obrázku 6 je série snímků z imunofluorescenčního mikroskopu zachycující fosforylaci na Tyr u spermíí, u kterých byla navozena kapacitace *in vitro*, pomocí kapacitačního média Basic TL-HEPES (viz 4.1.2) z inseminační dávky. Větší snímek je opět vytvořen proložením tří vrstev fotografií z imunofluorescenčního mikroskopu. Značení pomocí fluoroforů je zachováno. Na sérii menších snímků jsou zachyceny tři spermie, jedna vykazuje opět fosforylační vzor A, jedna vzor C a jedna vzor D. Vzor B nebyl na větším snímku zachycen a spermie po kapacitaci vykazující tento vzor se nelišily od těch ejakulovaných. Vzor E na tomto větším snímku také není a spermie vykazující tento vzor bude ukázána v další sérii snímků. Spermie vykazující fosforylační vzor A svítí na akrozomální čepičce, EqSS a na bičíku. Spermie vykazující vzor C Svítí jen na akrozomální čepičce. Spermie se vzorem D vykazují fluorescenci na akrozomální čepičce a na EqSS.



Obrázek 6: Kapacitované spermie z inseminační dávky značené protilátkou proti PY 4G10 při zvětšení 400x: (a) celkový pohled na spermie značené fluorofory DAPI, rhodaminem a Alexa 488, šipkami jsou označeny spermie vykazující typické vzory, vzory jsou označeny písmeny podle schématického obrázku viz výše; (b), (c) a (d) spermie vykazující fosforylační vzor A, na (a) označena jako A1; (e), (f) a (g) spermie vykazující fosforylační vzor C, na (a) označena jako C1; (h), (i) a (j) spermie vykazující fosforylační vzor D, na (a) označena jako D1; (b), (e) a (h) jádro spermii označené modrým fluoroforem DAPI; (c), (f) a (i) akrozom spermie označený červeným fluoroforem rhodaminem; (d), (g) a (j) pozitivní reakce s protilátkou označená zeleně fluoroforem Alexa 488; (k) negativní kontrola pro fluorofory DAPI, rhodamin, Alexa 488.

Spermie po AR

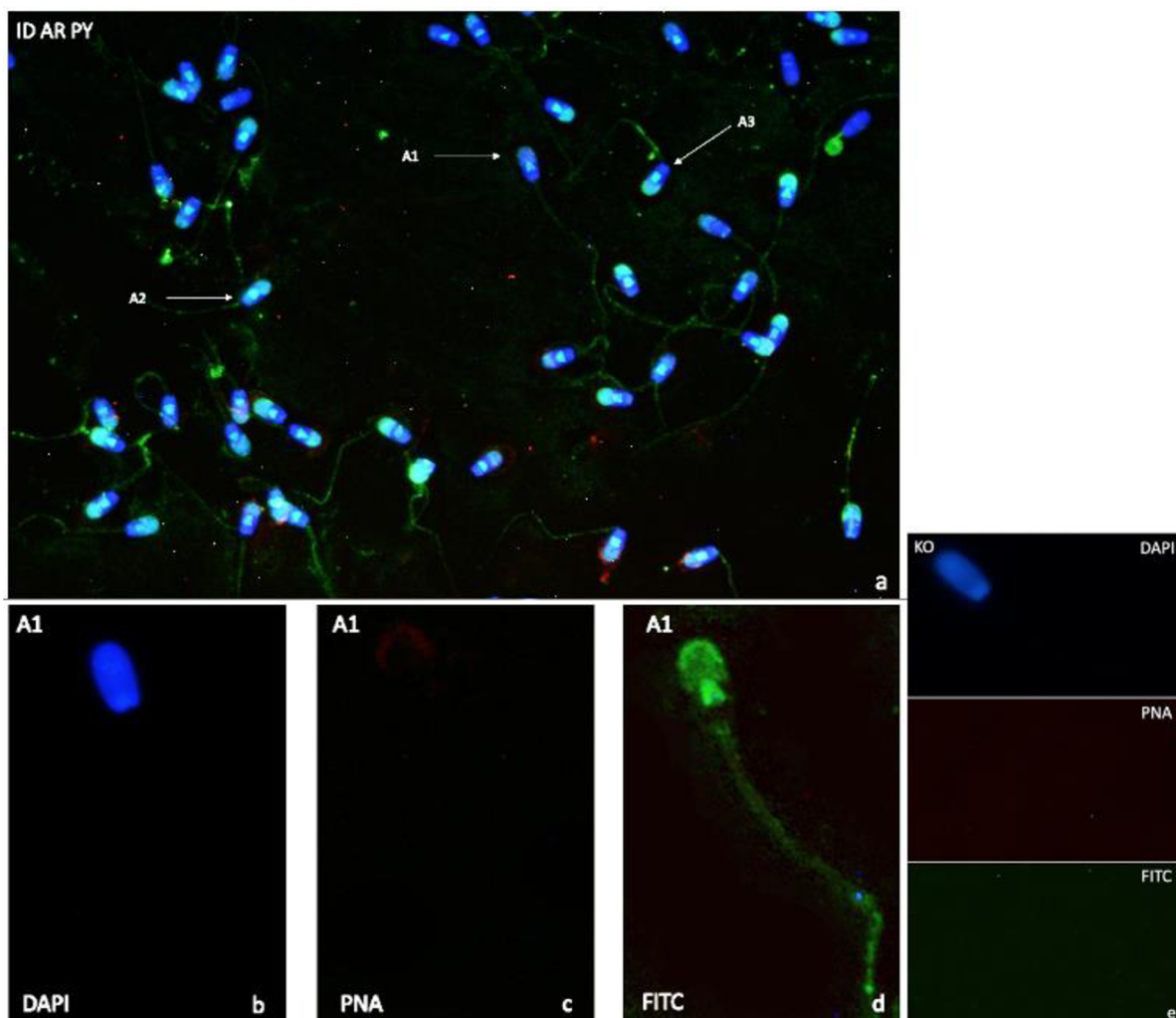
V tabulce 3 je zaneseno procentuální zastoupení jednotlivých tyrozinových fosforylačních vzorů u spermii po *in vitro* navození AR. AR byla navozena pomocí inkubace spermii s kalcium ionoforem. Bylo zkoumáno 9 různých vzorků spermii. V tabulce jsou zaneseny vzorky připravené z nativního ejakulátu i z inseminační dávky. V každém vzorku

bylo napočítáno 100 až 200 spermií a počty spermií u jednotlivých vzorů byly přepočítány na procenta. Vzorků bylo méně než ejakulovaných a kapacitovaných spermií, protože tyto vzorky byly vícekrát promývány, a tak docházelo ke ztrátám spermií. Ne z každého vzorku byly tedy odebrány spermie pro nátěry na skla. V tabulce je možno vidět, že je zde opět nejrozšířenější vzor A, ale jsou zde zastoupeny i ostatní kategorie, přičemž vzory B, C a E jsou zastoupeny v podobné četnosti.

Tabulka 3: Procentuální zastoupení spermií po akrozomální reakci vykazujících jednotlivé fosforylační vzory (viz obrázek 4).

Procentuální zastoupení tyrozinových fosforylačních vzorů ve spermiích po AR						
id vzorku	NAT/ID	vzor A (%)	vzor B (%)	vzor C (%)	vzor D (%)	vzor E (%)
NAT AR SU 700 26.7.21. PY	NAT	37,6	1,0	0,0	0,0	61,4
NAT AR SU 710 17.9.21 PY	NAT	98,8	0,0	0,0	1,3	0,0
NAT AR SU 730 17.9.21 PY	NAT	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NAT AR SU 679 20.9.21 PY	NAT	30,1	40,7	29,2	0,0	0,0
NAT AR SU 744 20.9.21 PY	NAT	26,9	62,7	10,4	0,0	0,0
ID AR SU 679,700 27.7.21. PY	ID	92,2	0,0	7,8	0,0	0,0
ID AR SU 685,673 27.7.21. PY	ID	97,3	0,0	2,7	0,0	0,0
ID AR SU 668,711 2.9.21 PY	ID	68,8	0,0	4,7	14,1	12,5
ID AR SU 730,740 2.9.21 PY	ID	81,7	0,0	9,9	0,0	8,5
Celkem ze všech AR spermií		73,2	9,8	7,5	1,1	8,4

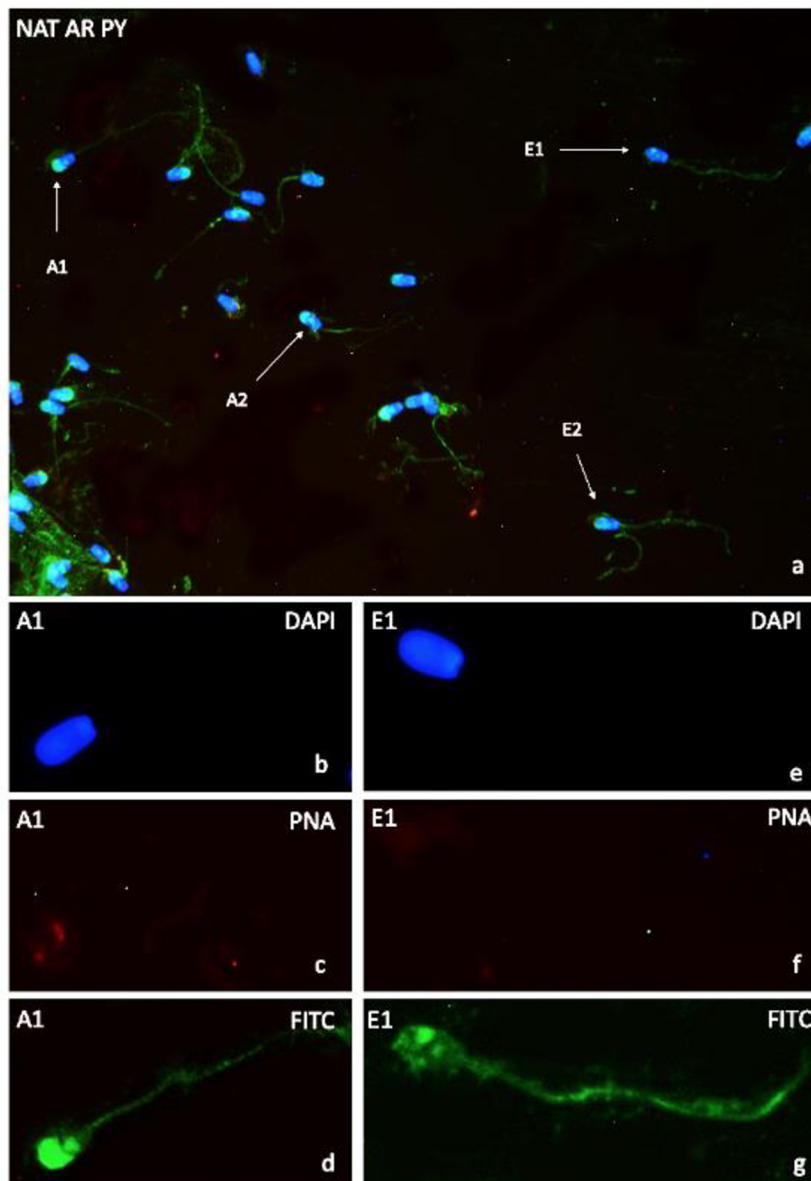
Na obrázku 7 je možno vidět sérii snímků zachycujících fosforylaci na Tyr u spermií, u kterých byla navozena akrozomální reakce *in vitro*. Jedná se o spermie z inseminační dávky. Větší snímek je opět vytvořen proložení třech vrstev fotografií z imunofluorescenčního mikroskopu. Na tomto snímku můžeme vidět pouze fosforylační vzory A, proto následuje ještě jedna série snímků spermií po AR. Tyto spermie na snímku ale stále vykazují slabý fluorescenční signál na akrozomu při značení PNA lektinem v konjugaci s rhodaminem. Pravděpodobně tedy u těchto spermií ještě neproběhla z nějakého důvodu AR a jedná se opět pouze o kapacitované spermie. Na sérii menších snímků je spermie vykazující vzor A, která ale nemá viditelné značení akrozomu PNA lektinem, akrozom se tedy jeví zreagovaný. Může ale také jít o slabý signál, který nebyl mikroskopem zachycen.



Obrázek 7: Spermie po AR z inseminační dávky značené protilátkou proti PY při zvětšení 400x: (a) celkový pohled na spermie značené fluorofory DAPI, rhodaminem a Alexa 488, šipkami jsou označeny spermie vykazující typické vzory, vzory jsou označené písmenem podle schématického obrázku viz výše; (b), (c) a (d) spermie vykazující fosforylační vzor A, na (a) označena jako A1; (b) jádro spermií označené modrým fluoroforem DAPI; (c) zreagovaný, nebo slabě značený akrozom spermie označený červeným fluoroforem rhodaminem; (d) pozitivní reakce s protilátkou označená zeleně fluoroforem Alexa 488; (e) negativní kontrola pro fluorofory DAPI, rhodamin a Alexa 488 (kontrola odpovídá i následující sérii snímků v obrázku 8).

Na obrázku 8 je možno vidět sérii snímků zachycujících fosforylaci na Tyr u spermií, u kterých byla navozena AR *in vitro*. Jedná se o spermie připravené z nativního ejakulátu. Větší snímek je vytvořen proložení tří vrstev fotografií z imunofluorescenčního mikroskopu. Tento obrázek je druhým zachycující spermie po AR. Na tomto snímku je zachycen fosforylační vzor E, který byl u spermií po AR významně zastoupen, ale na snímcích z inseminačních dávek nebyl hezky pozorovatelný. Vzorek E se ale vyskytoval převážně jen u jednoho vzorku, je tedy možné, že se jedná pouze o artefakt. Na sérii menších snímků jsou spermie, které vykazují fosforylační vzory A a E, přičemž u spermií vykazujících vzor A, můžeme vidět, že je zde stále přítomna fluorescence na akrozomu, a tudíž ještě nedošlo k vylištění akrozomálního váčku.

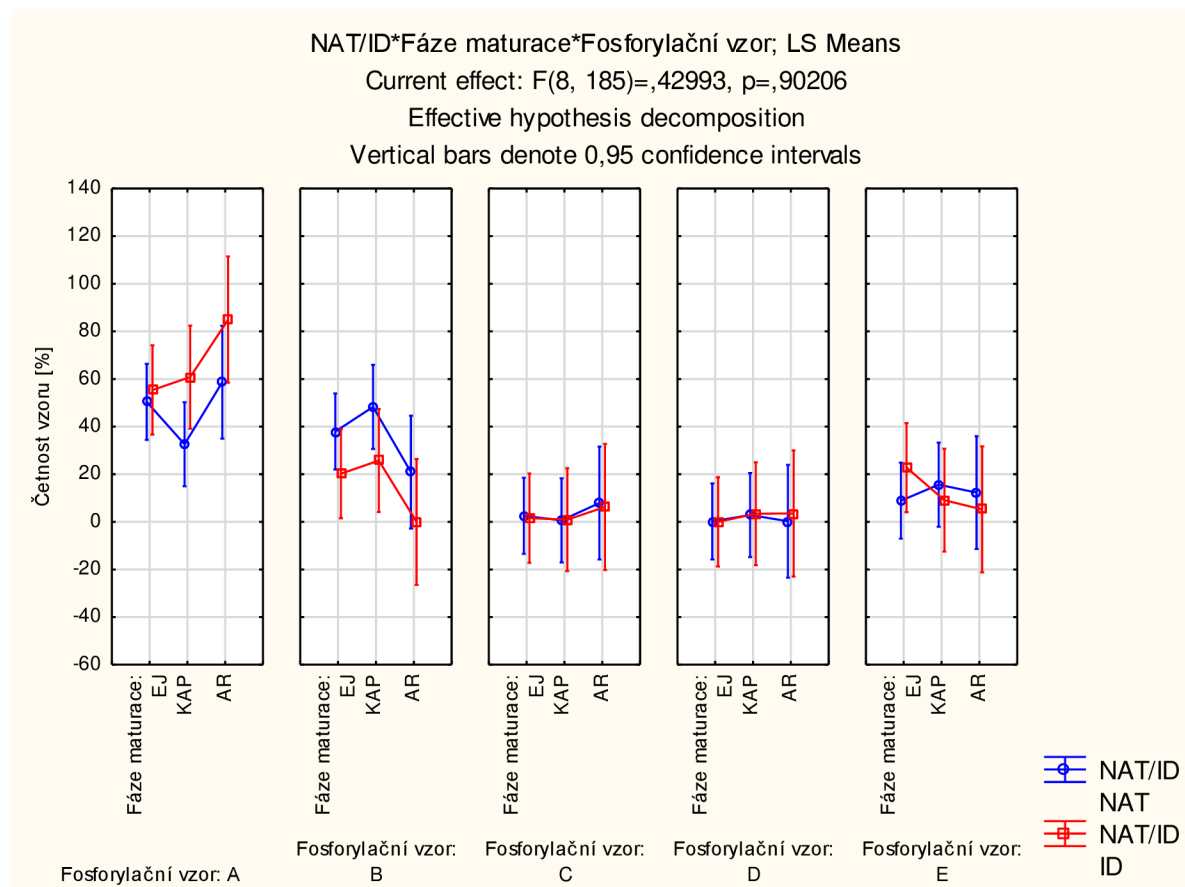
U spermie vykazující vzor E se zdá být akrozom již zreagovaný. Vzor E se vyskytoval i u všech předcházejících kategorií maturace a fluorescence pomocí FITC vypadala v ostatních případech stejně.



Obrázek 8: Spermie po AR z nativního ejakulátu značené protilátkou proti PY 4G10 při zvětšení 400x: (a) celkový pohled na spermie značené fluorofory DAPI, rhodamin a Alexa 488, šipkami jsou označeny spermie vykazující typické vzory, vzory jsou označeny písmeny podle schématického obrázku viz výše; (b), (c) a (d) spermie vykazující fosforylační vzor A, na (a) označena jako A1; (e), (f) a (g) spermie vykazující fosforylační vzor E, na (a) označena jako E1; (b) a (e) jádro spermii označené modrým fluoroforem DAPI; (c) a (f) akrozom spermie označený červeným rhodaminem; (d) a (g) pozitivní reakce s protilátkou označená zeleně fluoroforem Alexa 488.

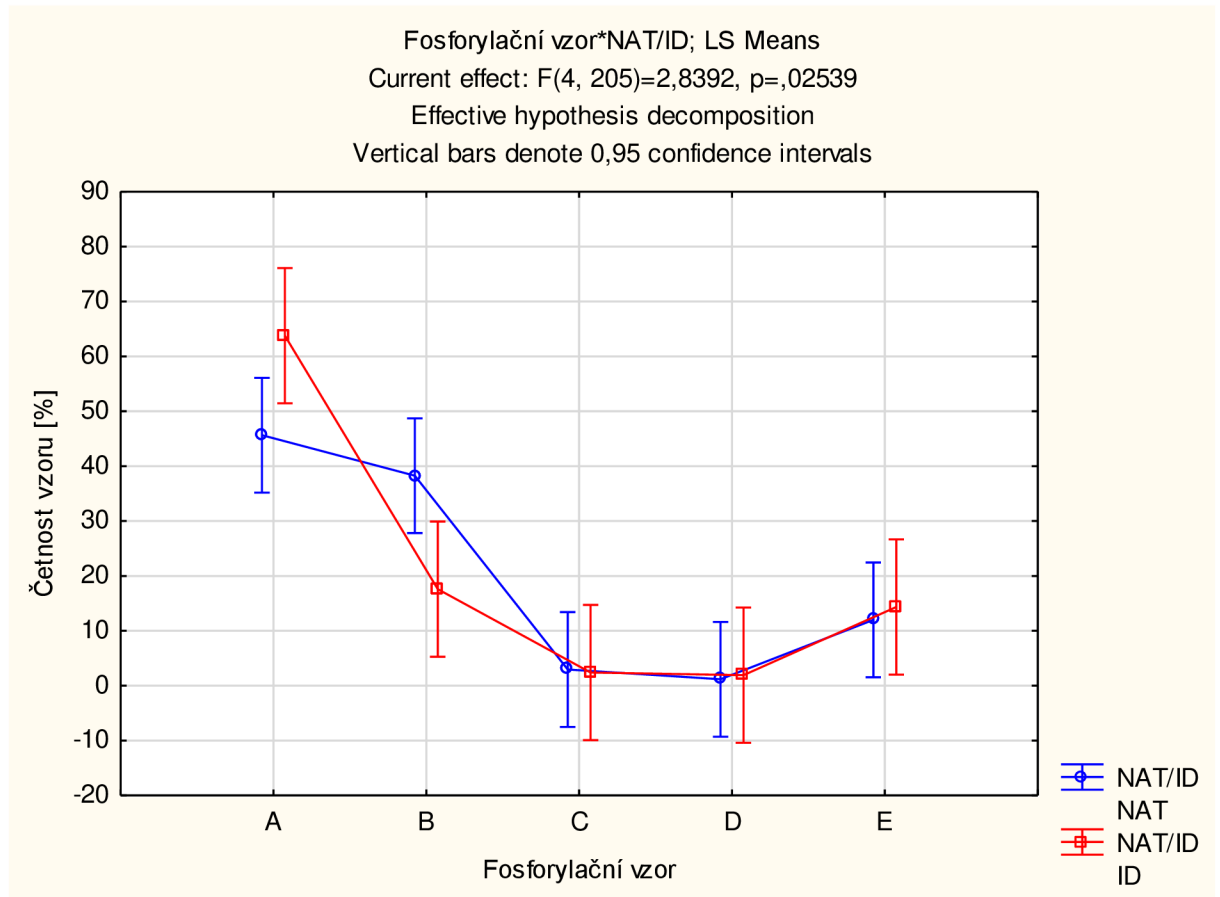
Pro zhodnocení významnosti fáze maturace pro výskyt určitého fosforylačního vzoru byla použita metoda statické analýzy ANOVA. Byl hodnocen vliv fáze maturace a původu vzorku

(zda spermie pocházely z inseminační dávky nebo z nativního ejakulátu) na procentuálním zastoupení určitého tyrozinového fosforylačního vzoru. Vstupními daty byly hodnoty uvedené v tabulkách 1–3. Výsledky analýzy jsou uvedeny v grafu 1. Podrobnější výsledky analýzy následují v grafech 2 a 3.



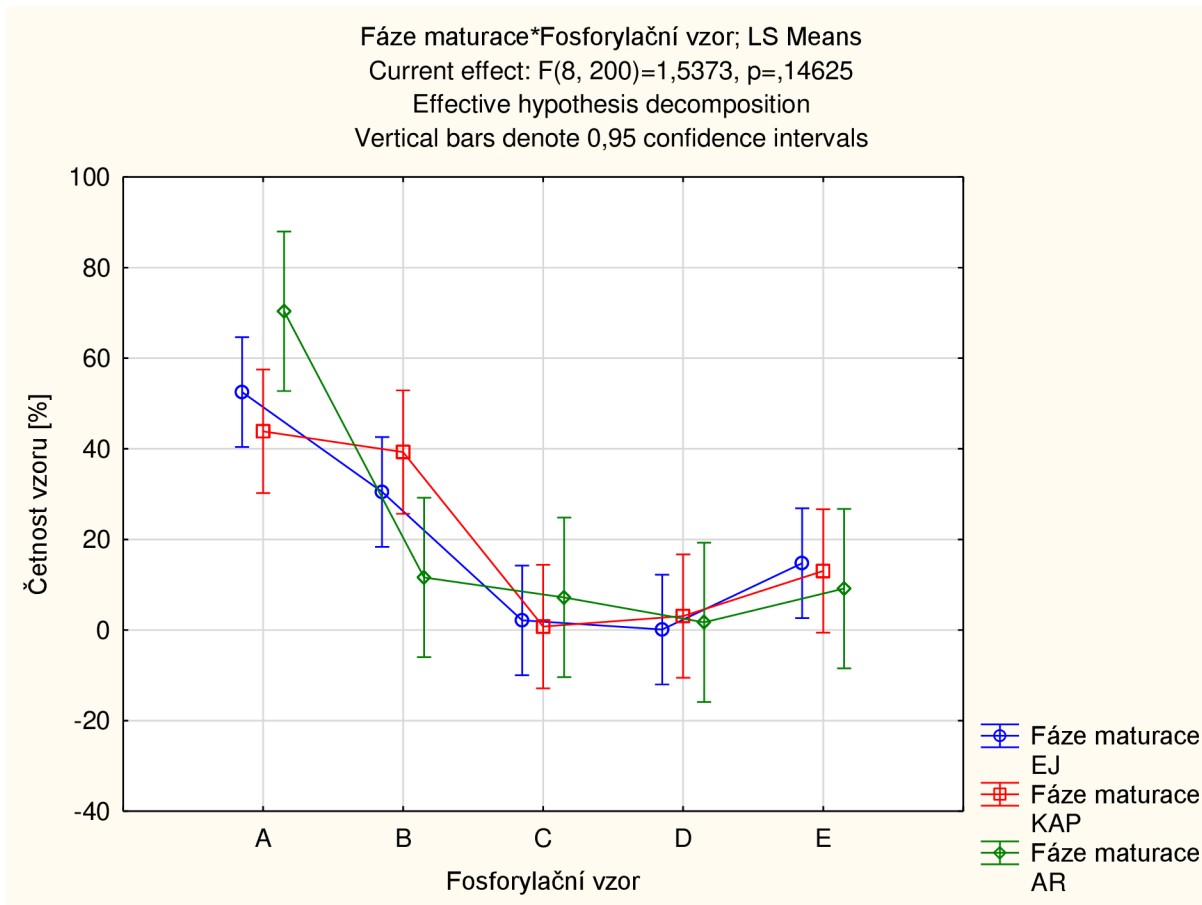
Graf 1: Statistické vyhodnocení vlivu maturační fáze a původu vzorku na četnosti jednotlivých tyrozinových fosforylačních vzorů: Analýza byla provedena na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Průměrné četnosti tyrozinových fosforylačních vzorů se mezi jednotlivými maturačními fázemi statisticky významně neliší. Byl prokázán vliv původu vzorku (z nativního ejakulátu nebo z inseminační dávky) na zastoupení vzorů A a B. (Jednotlivé fluorescenční vzory: A – silný signál v EqSS a akrozomální oblasti a slabý signál v bičiku; B – silný signál na EqSS a slabý signál na bičiku; C – silný signál v akrozomální oblasti a slabý signál na bičiku; D – silný signál v EqSS a akrozomální oblasti; E – slabý signál na celé spermii.)

Při hladině významnosti $\alpha=0,05$ byl prokázán alespoň jeden statisticky významný rozdíl ($p=0,025$) v přítomnosti jednotlivých tyrozinových fosforylačních vzorů v závislosti na původu vzorku. V grafu 2 je vidět, že procentuální zastoupení vzorů A a B se statisticky významně liší mezi spermii pocházejícími z nativního ejakulátu a inseminační dávky.



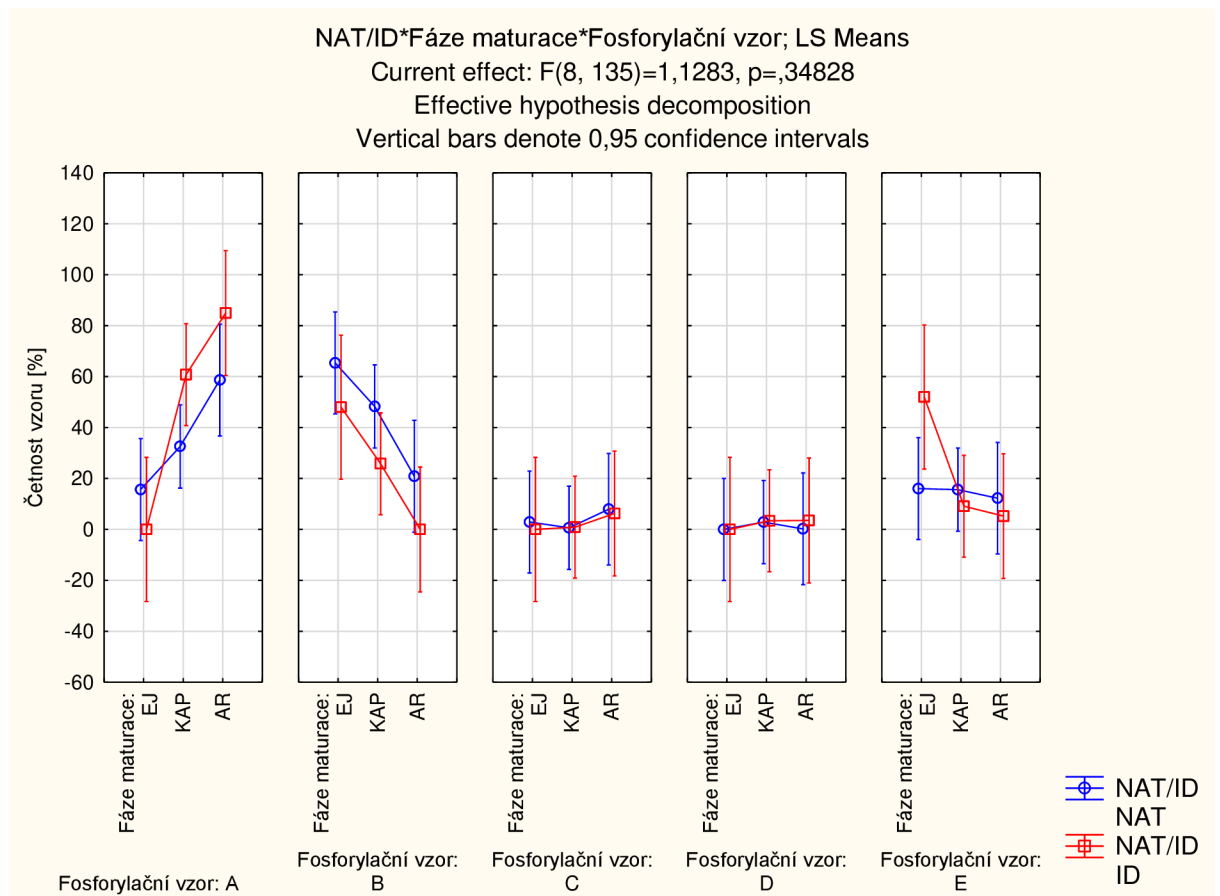
Graf 2: Statistické vyhodnocení vlivu původu vzorku (nativní ejakulát, nebo inseminační dávka) na četnosti jednotlivých tyrozinových fosforylačních vzorů: Analýza byla provedena na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Existuje statisticky významný rozdíl ($p=0,025$) v procentuálním zastoupení tyrozinových fosforylačních vzorů A a B mezi vzorky připravenými z nativního ejakulátu a inseminační dávky. Ostatní vzory nevykazují v zastoupení statisticky významný rozdíl. (Jednotlivé fluorescenční vzory: A – silný signál v EqSS a akrozomální oblasti a slabý signál v bičíku; B – silný signál na EqSS a slabý signál na bičíku; C – silný signál v akrozomální oblasti a slabý signál na bičíku; D – silný signál v EqSS a akrozomální oblasti; E – slabý signál na celé spermii.)

Při hladině významnosti $\alpha=0,05$ byl zkoumán statisticky významný rozdíl v přítomnosti jednotlivých tyrozinových fosforylačních vzorů v závislosti na fázi maturace. Mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermii a spermii po AR nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v přítomnosti jednotlivých fosforylačních vzorů. ($p=0,146$) Tato analýza je v grafu 3.



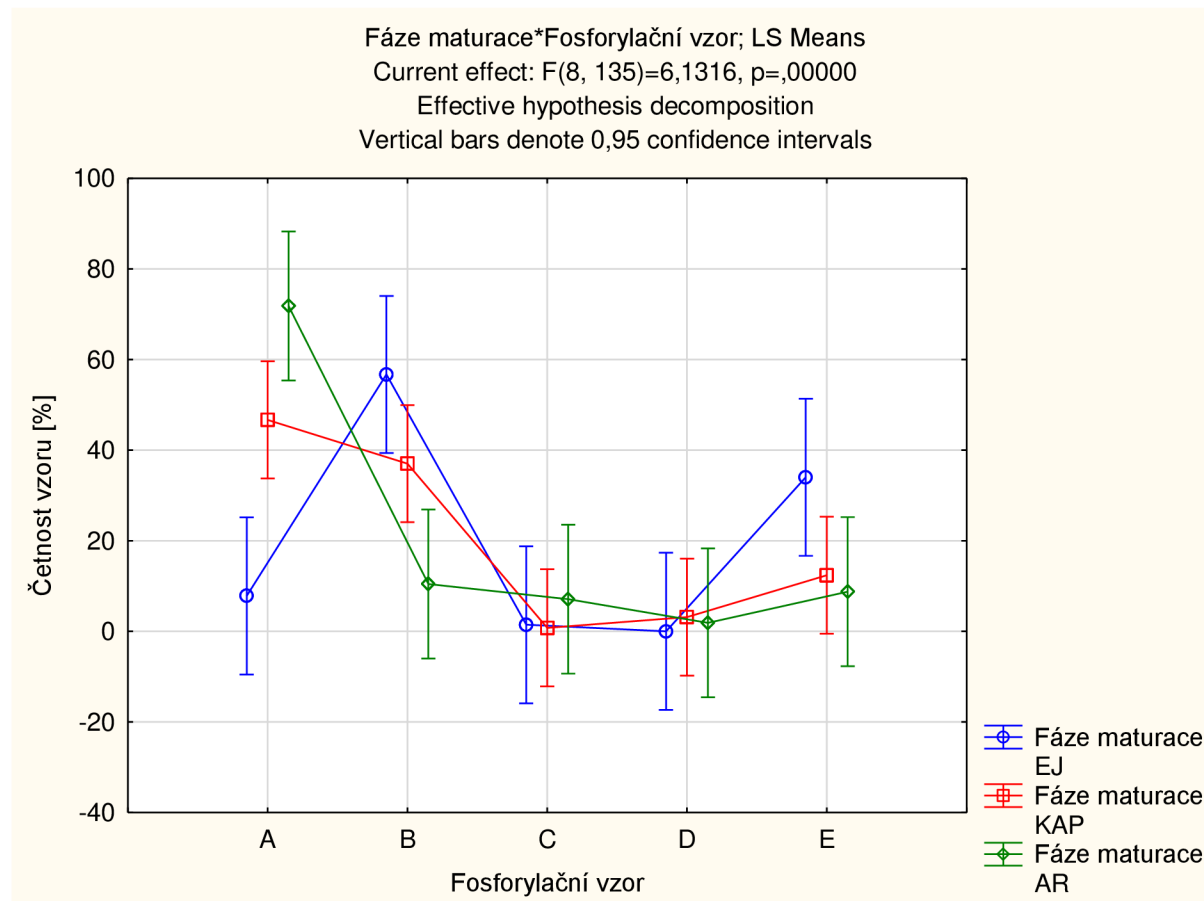
Graf 3: Statistické vyhodnocení vlivu maturační fáze (ejakulované spermie, kapacitované spermie, spermie po AR) na četnosti jednotlivých tyrozinových fosforylačních vzorů: Analýza byla provedena na hladině významnosti $\alpha=0,05$. V zastoupení jednotlivých tyrozinových fosforylačních vzorů v závislosti na fázi maturace nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. (Jednotlivé fluorescenční vzory: A – silný signál v EqSS a akrozomální oblasti a slabý signál v bičíku; B – silný signál na EqSS a slabý signál na bičíku; C – silný signál v akrozomální oblasti a slabý signál na bičíku; D – silný signál v EqSS a akrozomální oblasti; E – slabý signál na celé spermii.)

V průběhu zpracování této diplomové práce byla změněna metodika pro imunofluorescenční značení pomocí protilátky proti fosfotyrozinu. Nejprve bylo využíváno inkubace preparátu spermií na mikroskopickém sklíčku s primární protilátkou v lednici do druhého dne. Změna metodiky spočívala ve zkrácení doby inkubace s primární protilátkou pouze na 1 hod v lednici při 4 °C. Předchozí výsledky statistické analýzy byly zpracovány za použití hodnot získaných ze všech vzorků. Pro zjištění, zda výsledky nebyly ovlivněny dlouhou dobou inkubace byly z analýzy vyjmuty hodnoty těchto vzorků. Při vyhodnocení takto upravených dat, byly získány odlišné výsledky než v předchozím případě (grafy 4–6). V grafu 4 jsou uvedeny výsledky analýzy rozptylů ANOVA při hladině významnosti $\alpha=0,05$. Oproti grafu 1 je znatelný rozdíl u vzorů A a B.



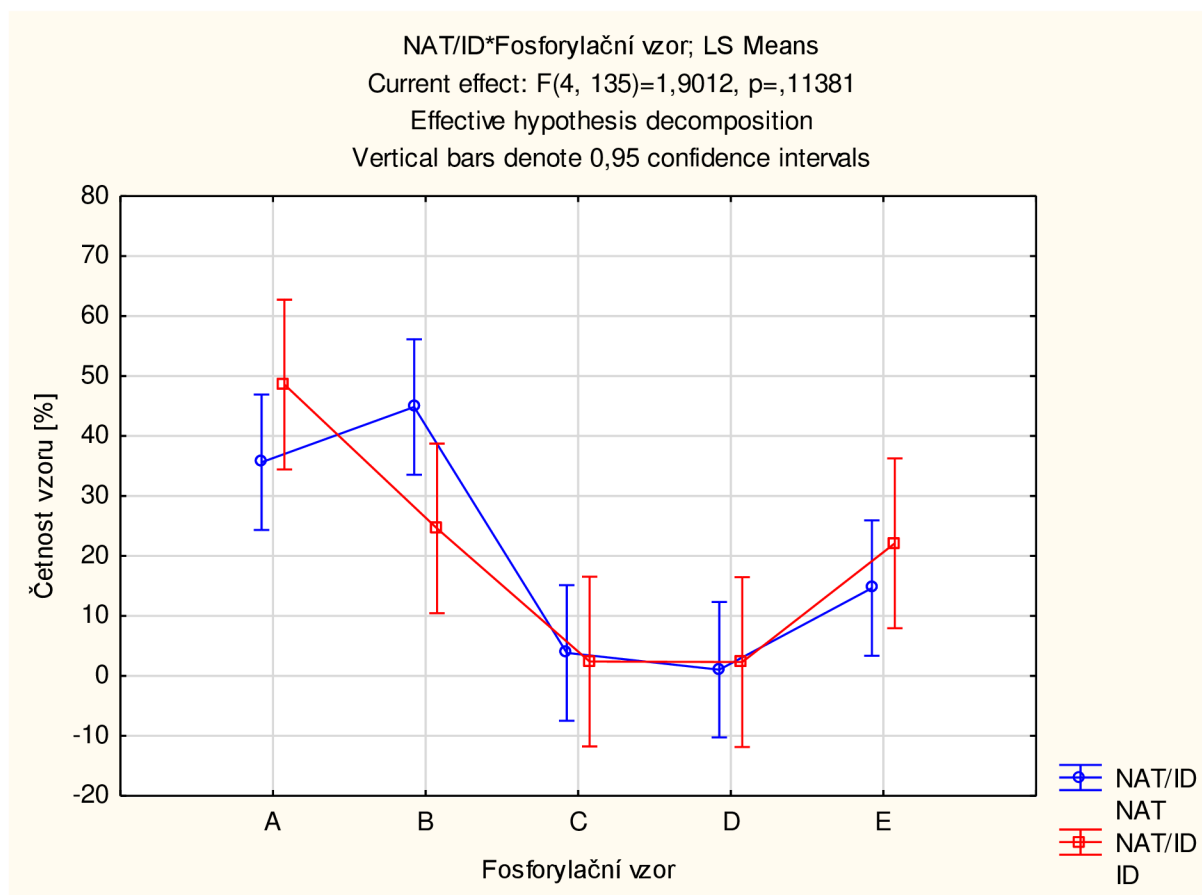
Graf 4: Statistické vyhodnocení vlivu maturační fáze a původu vzorku na četnosti jednotlivých tyrozinových fosforylačních vzorů: Analýza byla provedena na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Byl prokázán vliv maturační fáze na výskyt fosforylačních vzorů. Vliv původu vzorku (nativní ejakulát, nebo inseminační dávka) již není statisticky významný. (Jednotlivé fluorescenční vzory: A – silný signál v EqSS a akrozomální oblasti a slabý signál v bičičku; B – silný signál na EqSS a slabý signál na bičičku; C – silný signál v akrozomální oblasti a slabý signál na bičičku; D – silný signál v EqSS a akrozomální oblasti; E – slabý signál na celé spermii.)

V grafu 5 je podrobnější analýza závislosti přítomnosti jednotlivých tyrozinových fosforylačních vzorů na stádiu maturace. Existuje statisticky významný rozdíl ($p=0,000$) ve výskytu vzoru A. Nejméně se vyskytuje u ejakulovaných spermií, nejvíce je zastoupen u spermií po AR. Velký rozdíl je pozorovatelný i v případě vzoru B, který je nejvýznamněji zastoupen u ejakulovaných spermií, nejméně je zastoupen u spermií po akrozomální reakci. Ejakulované spermie také v porovnání s ostatními maturačními stádii vykazují větší zastoupení vzoru E.



Graf 5: Statistické vyhodnocení vlivu maturační fáze (ejakulované spermie, kapacitované spermie, spermie po AR) na četnosti jednotlivých tyrozinových fosforylačních vzorů: Analýza byla provedena na hladině významnosti $\alpha=0,05$. V zastoupení jednotlivých tyrozinových fosforylačních vzorů v závislosti na fázi maturace byl nalezen statisticky významný rozdíl ($p=0,000$). (Jednotlivé fluorescenční vzory: A – silný signál v EqSS a akrozomální oblasti a slabý signál v bičíku; B – silný signál na EqSS a slabý signál na bičíku; C – silný signál v akrozomální oblasti a slabý signál na bičíku; D – silný signál v EqSS a akrozomální oblasti; E – slabý signál na celé spermii.)

Při zahrnutí dat ze všech vzorků byla potvrzena statisticky významná závislost na přítomnosti jednotlivých tyrozinových fosforylačních vzorů na tom, zda byl vzorek připraven z nativního ejakulátu nebo z inseminační dávky. Při vyřazení vzorků s dlouhou dobou inkubace s primární protilátkou, se tento faktor ukázal bez statisticky významného vlivu (graf 6).



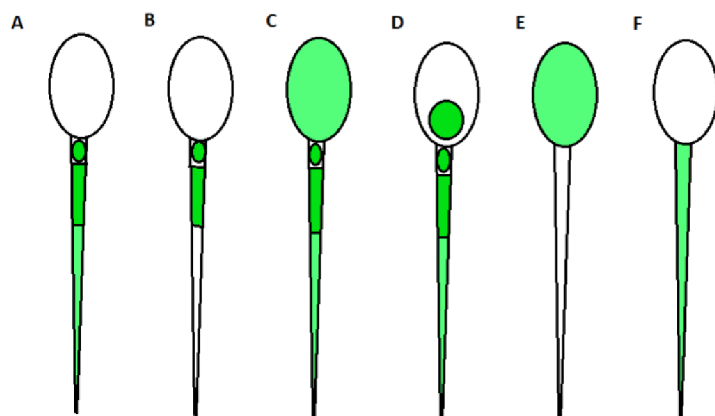
Graf 6: Statistické vyhodnocení vlivu původu vzorku (nativní ejakulát, nebo inseminační dávka) na četnosti jednotlivých tyrozinových fosforylačních vzorů: Analýza byla provedena na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Neexistuje statisticky významný rozdíl ($p=0,114$) v procentuálním zastoupení tyrozinových fosforylačních vzorů A a B mezi vzorky připravenými z nativního ejakulátu a inseminační dávky. (Jednotlivé fluorescenční vzory: A – silný signál v EqSS a akrozomální oblasti a slabý signál v bičiku; B – silný signál na EqSS a slabý signál na bičiku; C – silný signál v akrozomální oblasti a slabý signál na bičiku; D – silný signál v EqSS a akrozomální oblasti; E – slabý signál na celé spermii.)

Epididymální spermie

U vzorku epididymálních spermií nebyl detekován žádný imunofluorescenční signál po inkubaci s protilátkou proti fosfotyrozinu, nebyly tedy statisticky vyhodnoceny.

5.1.2 Detekce fosforylace pomocí protilátky proti fosfoserinu

Spermie vykazovaly fosforylaci proteinů na serinových zbytcích. Bylo detekováno několik fosforylačních vzorů, což je ukázáno na následující sérii snímků z imunofluorescenčních preparátů. Na obrázku 9, je schematicky znázorněna pozorovaná fosforylace proteinů pomocí protilátky proti PS (fosfoserinu) s následnou detekcí pomocí sekundární protilátky v konjugaci s Alexa 488. Vzory A až D se vyskytovaly v ejakulovaných a kapacitovaných spermích a ve spermích po AR. Vzory E a F jsou přidány do schématu, jelikož se vyskytují ve vzorcích z epididymálních spermí. Spermie vykazující fosforylační vzor A svítily na bičíku, přičemž zde byl výrazný signál v oblasti krčku a střední části bičíku. Spermie se vzorem B měly značení právě jen na krčku a střední části bičíku, na hlavní a koncové části bičíku nebyl přítomen ani slabý signál. Spermie vykazující fosforylační vzor C svítily celé a opět byl výraznější signál na krčku a střední části bičíku. Vzor D měl opět přítomnou fluorescenci na celém bičíku s výrazným krčkem a bičíkem, ale navíc byl ještě přítomen výrazný signál na hlavičce v oblasti EqSS v kulatém tvaru. Vzory E a F nevykazovaly silný signál, spermie vykazující vzor E měly slabou fluorescenci na celé hlavičce a spermie vykazující vzor F měly slabou fluorescenci na celém bičíku.



Obrázek 9: Detekované fosforylační vzory za využití protilátky proti PS: Tmavší barva – silný signál, světlejší barva – slabý signál; v následujících snímcích, tabulkách a analýzách je využito písmenné značení.

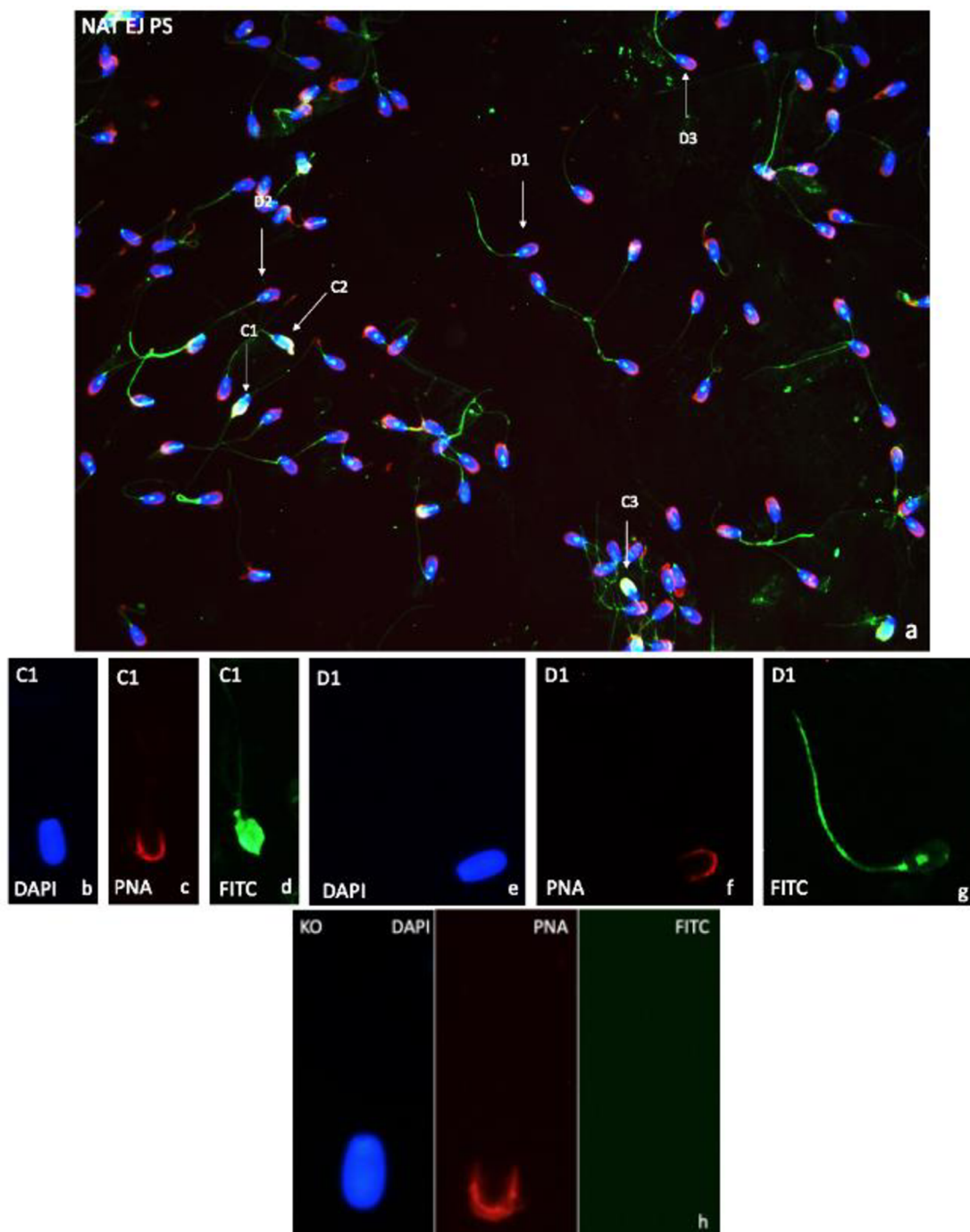
Ejakulované spermie

V tabulce 4 je procentuální zastoupení ejakulovaných spermí vykazujících specifické vzory fosforylace proteinů na serinových zbytcích. Bylo hodnoceno 10 různých vzorků spermí a v tabulce jsou zaneseny společně výsledky z nativního ejakulátu a inseminační dávky. Mezi ejakulovanými spermími byly nejvíce zastoupeny vzory A, C a D.

Tabulka 4: Procentuální zastoupení ejakulovaných spermií vykazujících jednotlivé serinové fosforylační vzory (viz obrázek 9): NE značí vzorky nevykazující pozitivní reakci s protilátkou proti fosfoserinu (tyto vzorky jsou v tabulce pro ilustraci počtu zpracovaných vzorků, ale nejsou zaneseny do statistických analýz).

Procentuální zastoupení serinových fosforylačních vzorů na ejakulovaných spermiích							
id vzorku	NAT/ID	vzor A (%)	vzor B (%)	vzor C (%)	vzor D (%)	vzor E (%)	vzor F (%)
NAT EJ SU 710 17.9.21. PS	NAT	0,0	2,6	94,7	2,6	0,0	0,0
NAT EJ SU 730 17.9.21 PS	NAT	4,1	10,2	85,7	0,0	0,0	0,0
NAT EJ SU 679 20.9.21 PS	NAT	0,0	0,0	5,9	94,1	0,0	0,0
NAT EJ SU 744 20.9.21 PS	NAT	1,4	0,0	2,7	95,9	0,0	0,0
NAT EJ SU 730 26.7.21 PS	NAT	87,7	2,9	9,4	0,0	0,0	0,0
ID EJ SU 668,711 2.9.21 PS	ID	NE	NE	NE	NE	NE	NE
ID EJ SU 730,740 2.9.21 PS	ID	NE	NE	NE	NE	NE	NE
ID EJ SU 679,700 27.7.21 PS	ID	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
ID EJ SU 685,673 27.7.21 PS	ID	28,6	14,3	57,1	0,0	0,0	0,0
ID EJ SU 711 13.6.21 PS	ID	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Celkem ze všech EJ spermií		34,9	2,4	27,3	35,3	0,0	0,0

Na obrázku 10 je možno vidět sérii snímků z imunofluorescenčního mikroskopu zachycující fosforylaci na Ser u ejakulovaných spermií z nativního ejakulátu. Na větším snímku je možno vidět proložení tří fotografií, kdy je pomocí DAPI (modře) značeno jádro, pomocí PNA lektinu v konjugaci s rhodaminem (červeně) je značen akrozom a fosforylace je znázorněna pomocí Alexa 488 (zeleně). Šipky ukazují na spermie, na kterých je snadno pozorovatelné typické fluorescenční značení. Na menších snímcích jsou dvě spermie, jedna vykazující vzor C a jedna vykazující vzor D. Spermie vykazující fosforylační vzor C svítí celá, spermie vykazující fosforylační vzor D svítí na bičíku a v oblasti EqSS.



Obrázek 10: Ejakulované spermie z nativního ejakulátu značené protilátkou proti PS při zvětšení 400x: (a) celkový pohled na spermie značené fluorofory DAPI, rhodaminem a Alexa 488, šipkami jsou označeny spermie vykazující typické vzory, vzory jsou označeny písmeny podle schématického obrázku viz výše; (b), (c) a (d) spermie vykazující fosforylační vzor C, na (a) označena jako C1; (e), (f) a (g) spermie vykazující fosforylační vzor D, na (a) označena jako D1; (b) a (e) jádro spermií označené modrým fluoroforem DAPI; (c) a (f) akrozom spermie označený červeným fluoroforem rhodaminem; (d) a (g) pozitivní reakce s protilátkou označená zeleně fluoroforem Alexa 488; (h) negativní kontrola pro fluorofory DAPI, rhodamin a Alexa 488.

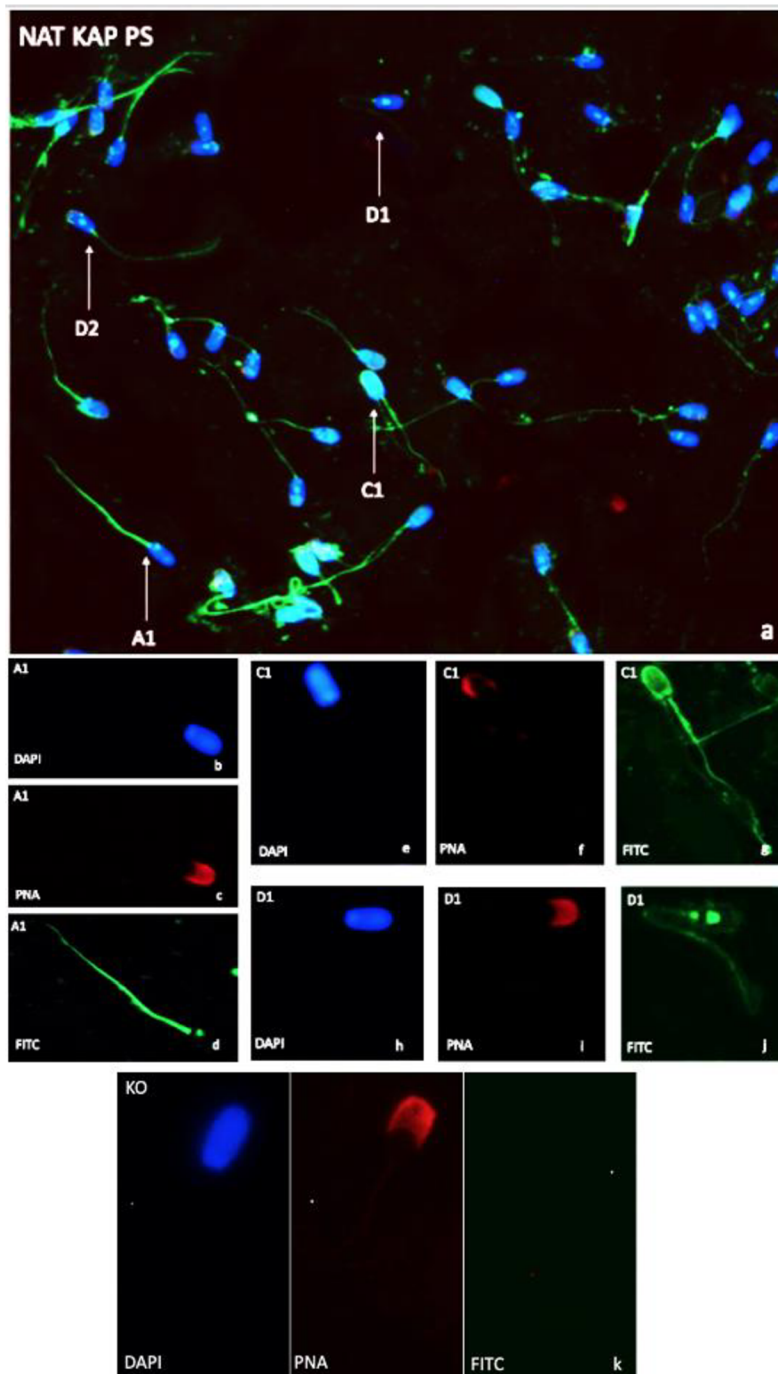
Kapacitované spermie

V tabulce 5 je zaneseno procentuální zastoupení *in vitro* kapacitovaných spermií, které vykazují dané serinové fosforylační vzory. Kapacitace byla provedena pomocí inkubace spermií v kapacitačním médiu. Bylo zkoumáno 9 různých vzorků. U kapacitovaných spermií bylo nejvíce spermií vykazujících fosforylační vzory A a C. V malém množství jsou zde zastoupeny i vzory B a D.

Tabulka 5: Procentuální zastoupení kapacitovaných spermií vykazujících jednotlivé serinové fosforylační vzory (viz obrázek 9): NE značí vzorky nevykazující pozitivní reakci s protilátkou proti fosfoserinu (tyto vzorky jsou v tabulce pro ilustraci počtu zpracovaných vzorků, ale nejsou zaneseny do statistických analýz).

Procentuální zastoupení serinových fosforylačních vzorů na kapacitovaných spermiích							
id vzorku	NAT/ID	vzor A (%)	vzor B (%)	vzor C (%)	vzor D (%)	vzor E (%)	vzor F (%)
NAT KAP SU 710 17.9.21 PS	NAT	40,5	26,2	33,3	0,0	0,0	0,0
NAT KAP SU 730 17.9.21 PS	NAT	20,0	30,0	50,0	0,0	0,0	0,0
NAT KAP SU 679 20.9.21 PS	NAT	8,0	0,0	70,7	21,3	0,0	0,0
NAT KAP SU 744 20.9.21 PS	NAT	72,5	0,0	27,5	0,0	0,0	0,0
NAT KAP SU 730 26.7.21 PS	NAT	NE	NE	NE	NE	NE	NE
ID KAP SU 668,711 2.9.21. PS	ID	NE	NE	NE	NE	NE	NE
ID KAP SU 730,740 2.9.21 PS	ID	NE	NE	NE	NE	NE	NE
ID KAP SU 679,700 27.7.21 PS	ID	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ID KAP SU 685,673 27.7.21 PS	ID	97,0	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0
Celkem ze všech EJ spermií		56,2	7,1	31,7	5,0	0,0	0,0

Na obrázku 11 je série snímků z imunofluorescenčního mikroskopu. Na velkém snímku jsou překryty tři snímky. Na sérii malých snímků jsou zachyceny tři spermie, které vykazují fosforylační vzory A, C a D. Spermie s fosforylačním vzorem A má fluorescenční signál na bičíku. Spermie vykazující fosforylační vzor C svítí celá. Spermie vykazující vzor D má výraznou fluorescenci v oblasti krčku a EqSS.



Obrázek 11: Kapacitované spermie z nativního ejakulátu značené protilátkou proti PS AB1603 při zvětšení 400x: (a) celkový pohled na spermie značené fluorofory DAPI, rhodamin a Alexa 488, šipkami jsou označeny spermie vykazující typické vzory, vzory jsou označeny písmeny podle schématického obrázku viz výše; (b), (c) a (d) spermie vykazující fosforylační vzor A, na (a) označena jako A1; (e), (f) a (g) spermie vykazující fosforylační vzor C, na (a) označena jako C1; (h), (i) a (j) spermie vykazující fosforylační vzor D, na (a) označena jako D1; (b), (e) a (h) jádro spermii označené modrým fluoroforem DAPI; (c), (f) a (i) akrozom spermie označený červeným fluoroforem rhodaminem; (d), (g) a (j) pozitivní reakce s protilátkou označená zeleně fluoroforem Alexa 488; (k) negativní kontrola pro fluorofory DAPI, rhodamin a Alexa 488.

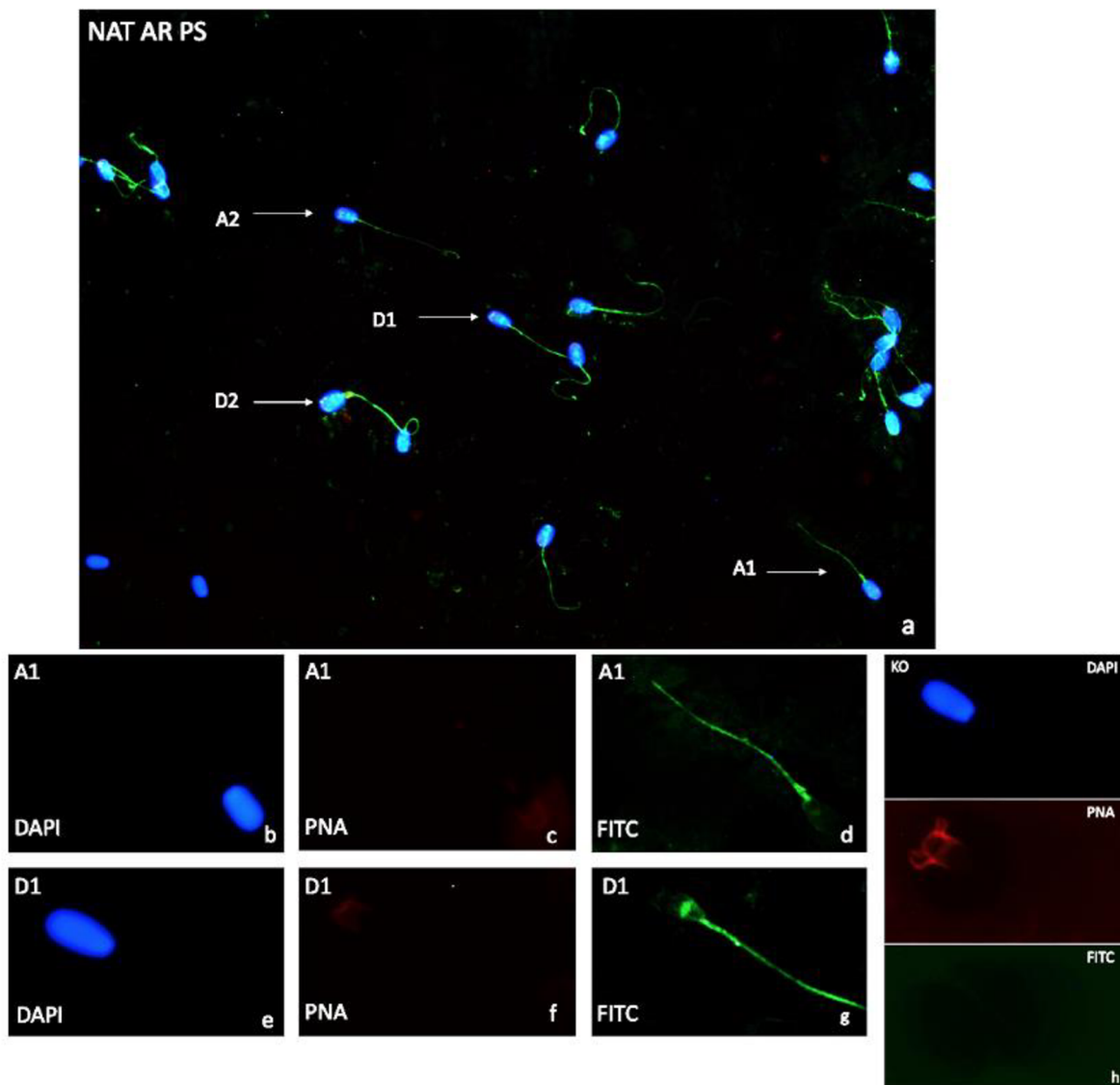
Spermie po AR

V tabulce 6 je zaneseno procentuální zastoupení spermií po *in vitro* indukované AR vykazující určité fosforylační vzory. Vyhodnoceno bylo 9 vzorků a stejně jako v případě kapacitovaných spermií byly nejvíce zastoupeny vzory A a C. Opět byly přítomny i vzory B a D.

Tabulka 6: Procentuální zastoupení spermií po akrozomální reakci vykazujících jednotlivé vzory (viz obrázek 9): NE značí vzorky nevykazující pozitivní reakci s protilátkou proti fosfoserinu (tyto vzorky jsou v tabulce pro ilustraci počtu zpracovaných vzorků, ale nejsou zaneseny do statistických analýz).

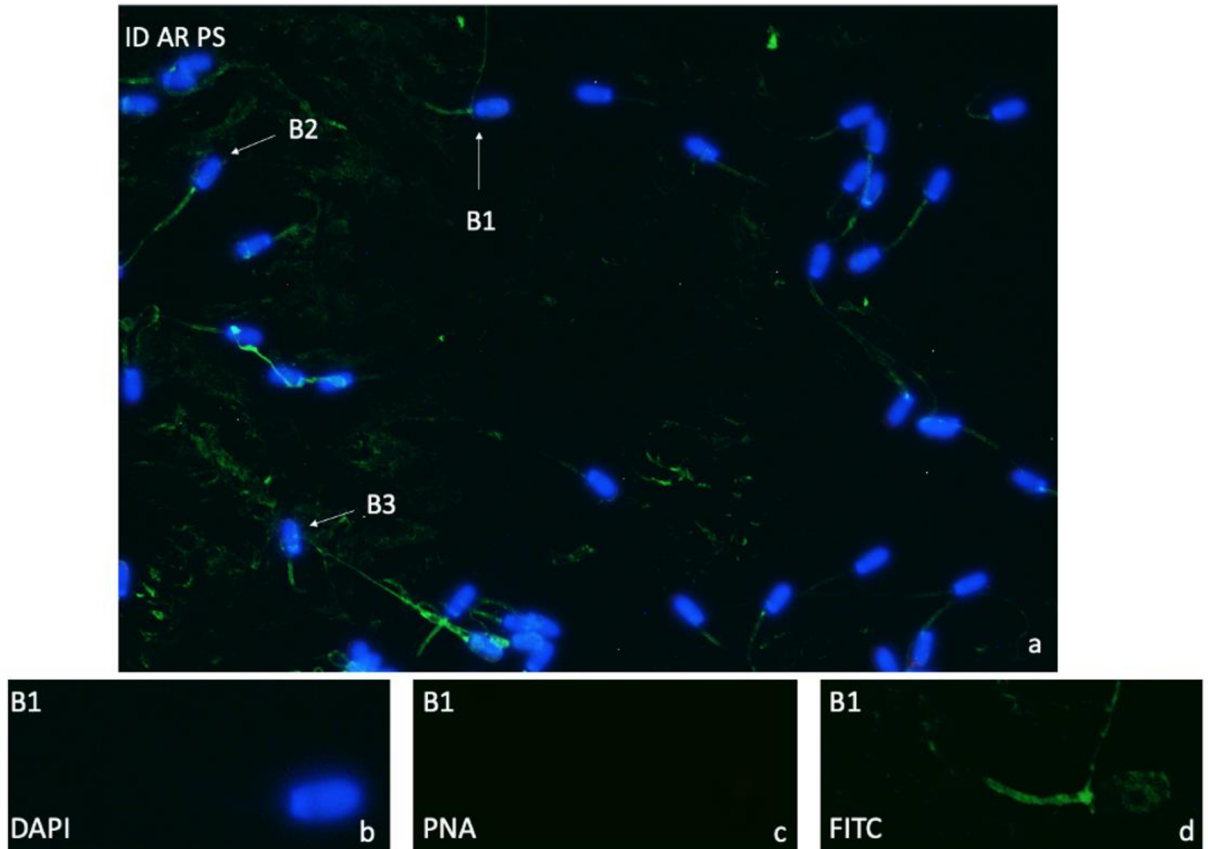
Procentuální zastoupení serinových fosforylačních vzorů na spermiích po AR							
id vzorku	NAT/ID	vzor A (%)	vzor B (%)	vzor C (%)	vzor D (%)	vzor E (%)	vzor F (%)
NAT AR SU 710 17.9.21 PS	NAT	69,7	15,2	10,6	4,5	0,0	0,0
NAT AR SU 730 17.9.21 PS	NAT	54,7	14,1	28,1	3,1	0,0	0,0
NAT AR SU 679 20.9.21 PS	NAT	19,1	0,0	76,5	4,4	0,0	0,0
NAT AR SU 744 20.9.21 PS	NAT	57,4	0,0	38,2	4,4	0,0	0,0
NAT AR SU 700 26.7.21 PS	NAT	0,0	0,0	100,0	0,0	NE	NE
ID AR SU 668,711 2.9.21 PS	ID	NE	NE	NE	NE	NE	NE
ID AR SU 730,740 2.9.21 PS	ID	NE	NE	NE	NE	NE	NE
ID AR SU 679,700 27.7.21	ID	85,4	11,0	3,7	0,0	0,0	0,0
ID AR SU 685,673 27.7.21	ID	44,4	0,0	53,3	2,2	0,0	0,0
Celkem ze všech EJ spermií		47,4	6,0	44,0	2,6	0,0	0,0

Na obrázku 12 je možno vidět sérii snímků z imunofluorescenčního mikroskopu zachycujících serinovou fosforylací ve spermích po AR, které byly vykultivované z nativního ejakulátu. Akrozomy na snímcích ve většině případů byly zreagované a nevykazovaly fluorescenci. Na malých snímcích jsou spermie vykazující fosforylační vzory A a D.



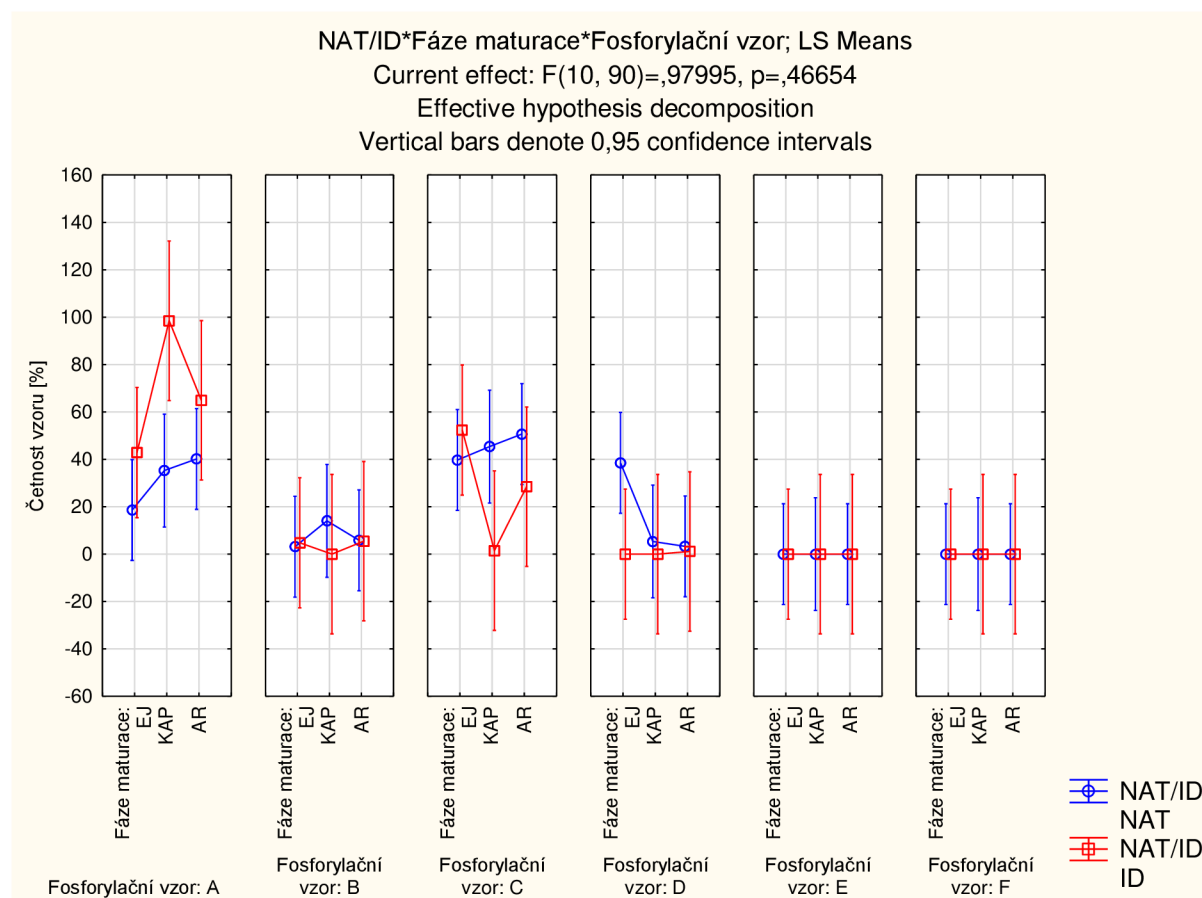
Obrázek 12: Spermie po AR z nativního ejakulátu značené protilátkou proti PS AB1603 při zvětšení 400x: (a) celkový pohled na spermie značené fluorofory DAPI, rhodamin a Alexa 488, šipkami jsou označeny spermie vykazující typické vzory, vzory jsou označeny písmeny podle schématického obrázku viz výše; (b), (c) a (d) spermie vykazující fosforylační vzor A, na (a) označena jako A1; (e), (f) a (g) spermie vykazující fosforylační vzor D, na (a) označena jako D1; (b) a (e) jádro spermii označené modrým fluoroforem DAPI; (c) a (f) akrozom spermie označený červeným fluoroforem rhodaminem; (d) a (g) pozitivní reakce s protilátkou označená zeleně fluoroforem Alexa 488; (h) negativní kontrola pro fluorofory DAPI, rhodamin, Alexa 488 (kontrola odpovídá i následující sérii snímků na obrázku 13).

Na obrázku 13 je série snímků zachycující spermie po AR z inseminační dávky, které vykazují fosforylaci na Ser. Na větším snímku jsou vidět spermie vykazující vzor B, tedy fluorescenci na krčku a na střední části bičíku. Fosforylační vzor B se vyskytoval v menším množství i u ejakulovaných a kapacitovaných spermií a fluorescence vypadala stejně i v těchto případech.



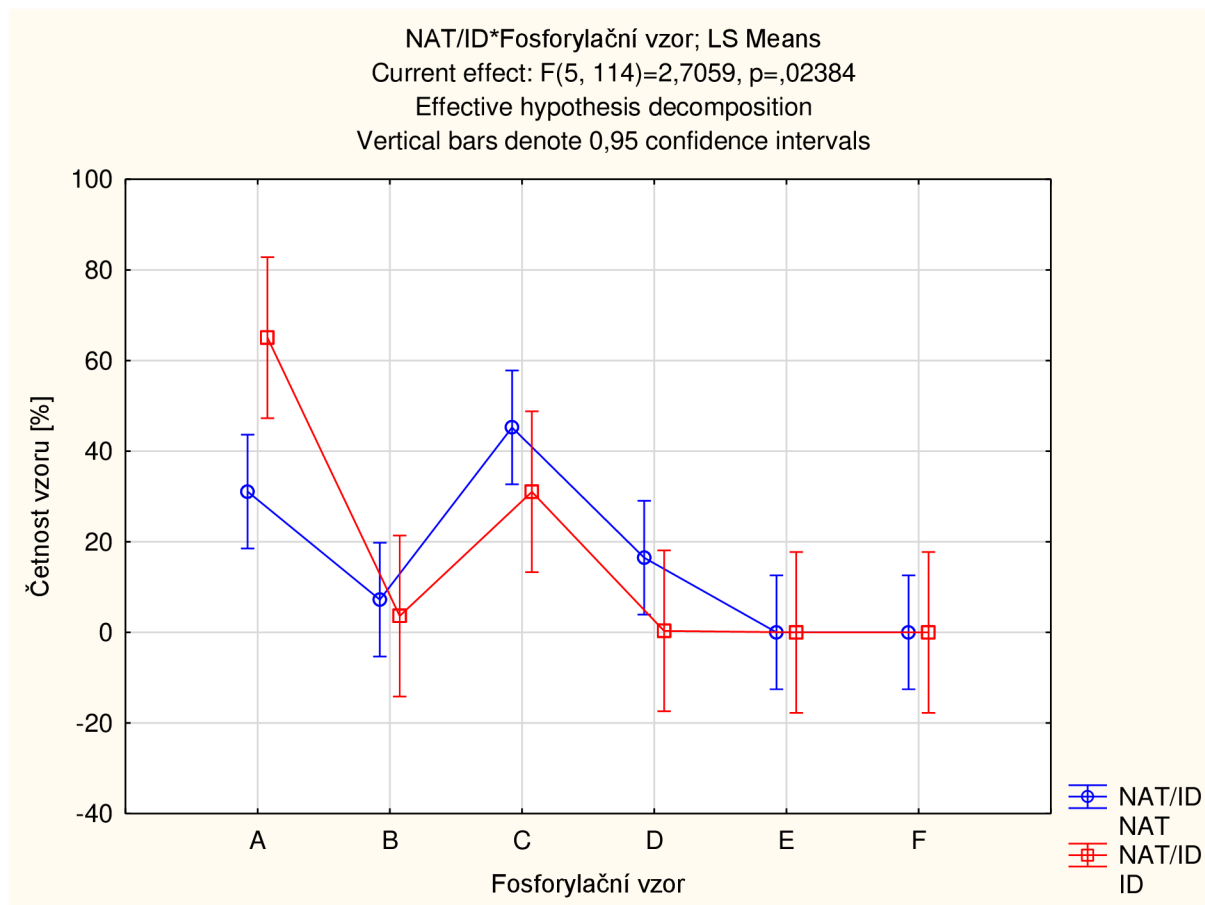
Obrázek 13: Spermie po AR z inseminační dávky značené protilátkou proti PS AB1603 při zvětšení 400x: (a) celkový pohled na spermie značené fluorofory DAPI, rhodaminem a Alexa 488, šipkami jsou označeny spermie vykazující typický vzor, vzor je označen písmeny podle schématického obrázku viz výše; (b), (c) a (d) spermie vykazující fosforylační vzor B, na (a) označena jako B1; (b) jádro spermií označené modrým fluoroforem DAPI; (c) akrozom spermie označený červeným fluoroforem rhodaminem; (d) pozitivní reakce s protilátkou označená zeleně fluoroforem Alexa 488.

Pro zhodnocení významnosti fáze maturace pro výskyt určitého serinového fosforylačního vzoru byla použita metoda statické analýzy ANOVA. Byl hodnocen vliv fáze maturace a původu vzorku (zda spermie pocházely z inseminační dávky nebo z nativního ejakulátu) na procentuálním zastoupení určitého serinového fosforylačního vzoru. Vstupními daty byly hodnoty uvedené v tabulkách 4–6. Vzorky, které nevykazovaly žádnou fluorescence, byly z analýzy vyjmuty. Nejednalo se o náhodný, nebo staticky významný jev. Vzorky byly inkubovány s protilátkou, pro kterou bylo použito příliš velké ředění (1:100 v PBS). Ředění bylo sníženo na 1:50 v PBS a následně už spermie vykazovaly imunofluorescenci. Výsledky analýzy jsou uvedeny v grafu 7. Podrobnější výsledky analýzy následují v grafech 8 a 9.



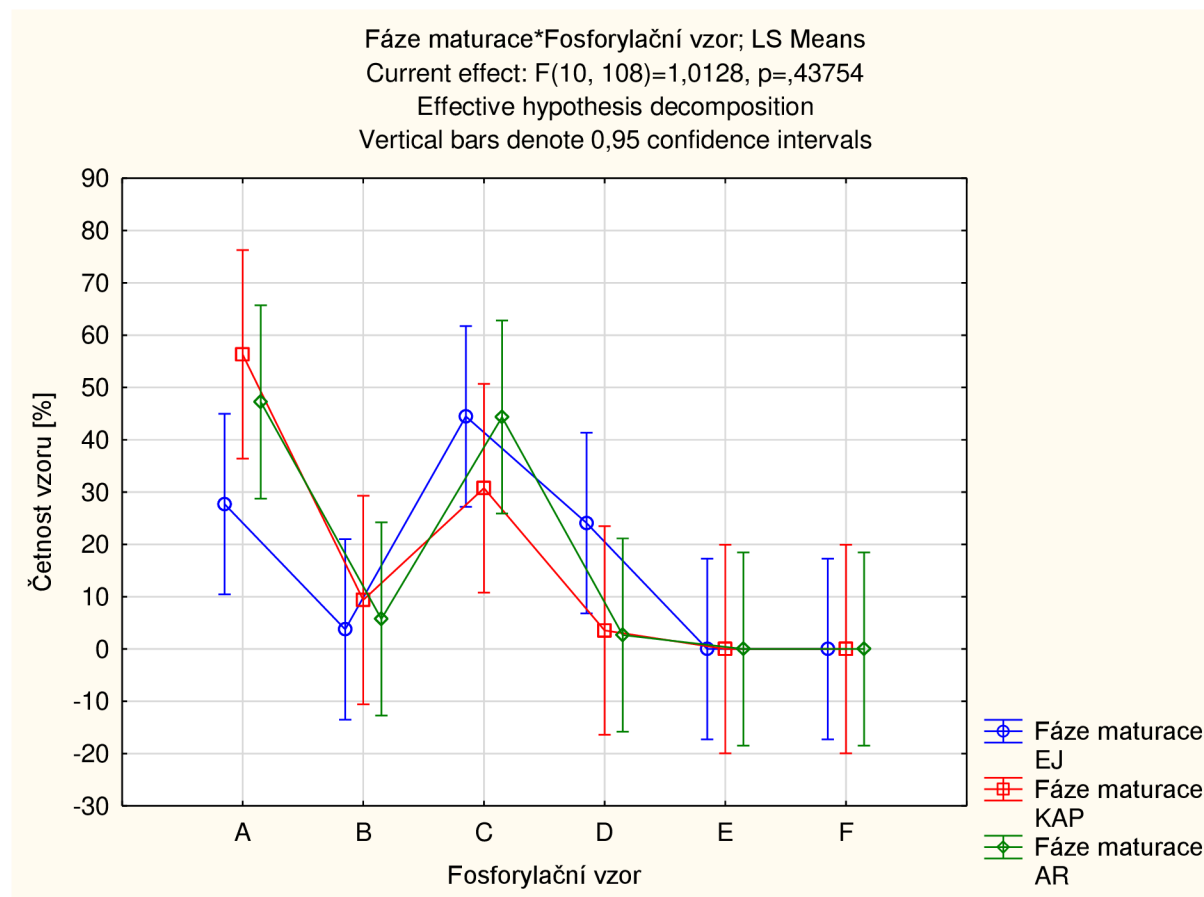
Graf 7: Statistické vyhodnocení vlivu maturační fáze a původu vzorku na četnosti jednotlivých serinových fosforylačních vzorů: Analýza byla provedena na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Průměrné četnosti serinových fosforylačních vzorů se mezi jednotlivými maturačními fázemi statisticky významně neliší. Byl prokázán vliv původu vzorku (z nativního ejakulátu nebo z inseminační dávky) na zastoupení vzoru A. (Jednotlivé fluorescenční vzory: A – fluorescence na bičiku se silným signálem v krčku a střední části bičiku; B – silný signál v krčku a střední části bičiku; C – signál na celé spermii se silným signálem v krčku a střední části bičiku; D – silný signál v ekvatoriálním segmentu a fluorescence na bičiku se silným signálem v krčku a střední části bičiku; E – slabý signál na hlavičce; F – slabý signál na bičiku.)

Při hladině významnosti $\alpha=0,05$ byl dokázán alespoň jeden statisticky významný rozdíl ($p=0,024$) v přítomnosti jednotlivých serinových fosforylačních vzorů v závislosti na původu vzorku. V grafu 8 je vidět, že procentuální zastoupení vzoru A se statisticky významně liší mezi spermii pocházejícími z nativního ejakulátu a z inseminační dávky.



Graf 8: Statistické vyhodnocení vlivu původu vzorku (nativní ejakulát, nebo inseminační dávka) na četnosti jednotlivých serinových fosforylačních vzorů: Analýza byla provedena na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Existuje statisticky významný rozdíl ($p=0,024$) v procentuálním zastoupení serinového fosforylačního vzoru A mezi vzorky připravenými z nativního ejakulátu a inseminační dávky. Ostatní vzory nevykazují v zastoupení statisticky významný rozdíl. (Jednotlivé fluorescenční vzory: A – fluorescence na bičíku se silným signálem v krčku a střední části bičíku; B – silný signál v krčku a střední části bičíku; C – signál na celé spermii se silným signálem v krčku a střední části bičíku; D – silný signál v ekvatoriálním segmentu a fluorescence na bičíku se silným signálem v krčku a střední části bičíku; E – slabý signál na hlavičce; F – slabý signál na bičíku.)

Při hladině významnosti $\alpha=0,05$ byl zkoumán statisticky významný rozdíl v přítomnosti jednotlivých serinových fosforylačních vzorů v závislosti na fázi maturace. Mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermii a spermii po AR nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v přítomnosti jednotlivých fosforylačních vzorů. ($p=0,438$) Tato analýza je v grafu 9.



Graf 9: Statistické vyhodnocení vlivu maturační fáze (ejakulované spermie, kapacitované spermie, spermie po AR) na četnosti jednotlivých serinových fosforylačních vzorů: Analýza byla provedena na hladině významnosti $\alpha=0,05$. V zastoupení jednotlivých serinových fosforylačních vzorů v závislosti na fázi maturace nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. (Jednotlivé fluorescenční vzory: A – fluorescence na bičíku se silným signálem v krčku a střední části bičíku; B – silný signál v krčku a střední části bičíku; C – signál na celé spermii se silným signálem v krčku a střední části bičíku; D – silný signál v ekvatoriálním segmentu a fluorescence na bičíku se silným signálem v krčku a střední části bičíku; E – slabý signál na hlavičce; F – slabý signál na bičíku.)

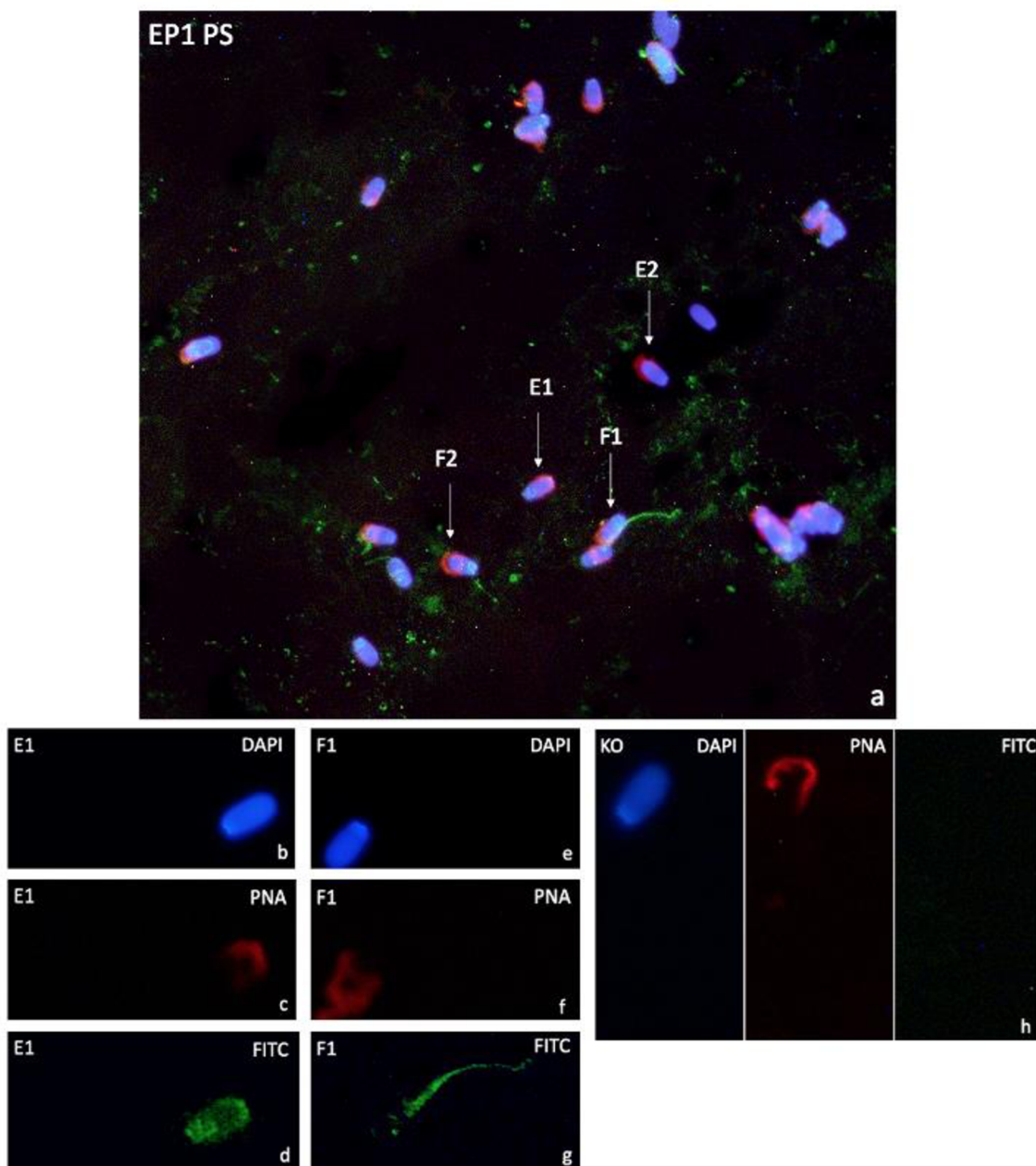
Epididymální spermie

Změna serinové fosforylace byla zkoumána i na epididymálních spermích. V tabulce 7 je možno vidět procentuální zastoupení spermíí vykazující jednotlivé serinové fosforylační vzory v závislosti na úseku nadvarlat ze kterého byly získány. V hlavě nadvarlat nejvíce spermíí vykazovalo vzor E, tedy fosforylaci na celé hlavičce. V těle nadvarlat spermie nejvíce vykazovaly fosforylaci na hlavičce (vzor E) a na celé spermii (vzor C). V ocasu nadvarlat se vyskytoval nejvíce fosforylační vzor F, tedy fosforylace na bičíku. Většina spermíí odebraných z nadvarlat neměla značený akrozom. Spermie byly získány ze zmraženého nadvarlete a akrozomy mohly být poškozeny nízkými teplotami.

Tabulka 7: Procentuální zastoupení spermíí odebraných z nadvarlat vykazujících jednotlivé fosforylační vzory (viz obrázek 9).

Procentuální zastoupení serinových fosforylačních vzorů na epididymálních spermích							
id vzorku	úsek nadvarlat	vzor A (%)	vzor B (%)	vzor C (%)	vzor D (%)	vzor E (%)	vzor F (%)
EP1 23.11.21 PS	hlava	0,0	0,0	0,0	0,0	79,6	20,4
EP2 23.11.21 PS	tělo	0,0	0,0	34,7	0,0	58,9	6,5
EP3 23.11.21 PS	ocas	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Celkem ze všech EP spermíí		0,0	0,0	17,8	0,0	62,7	19,5

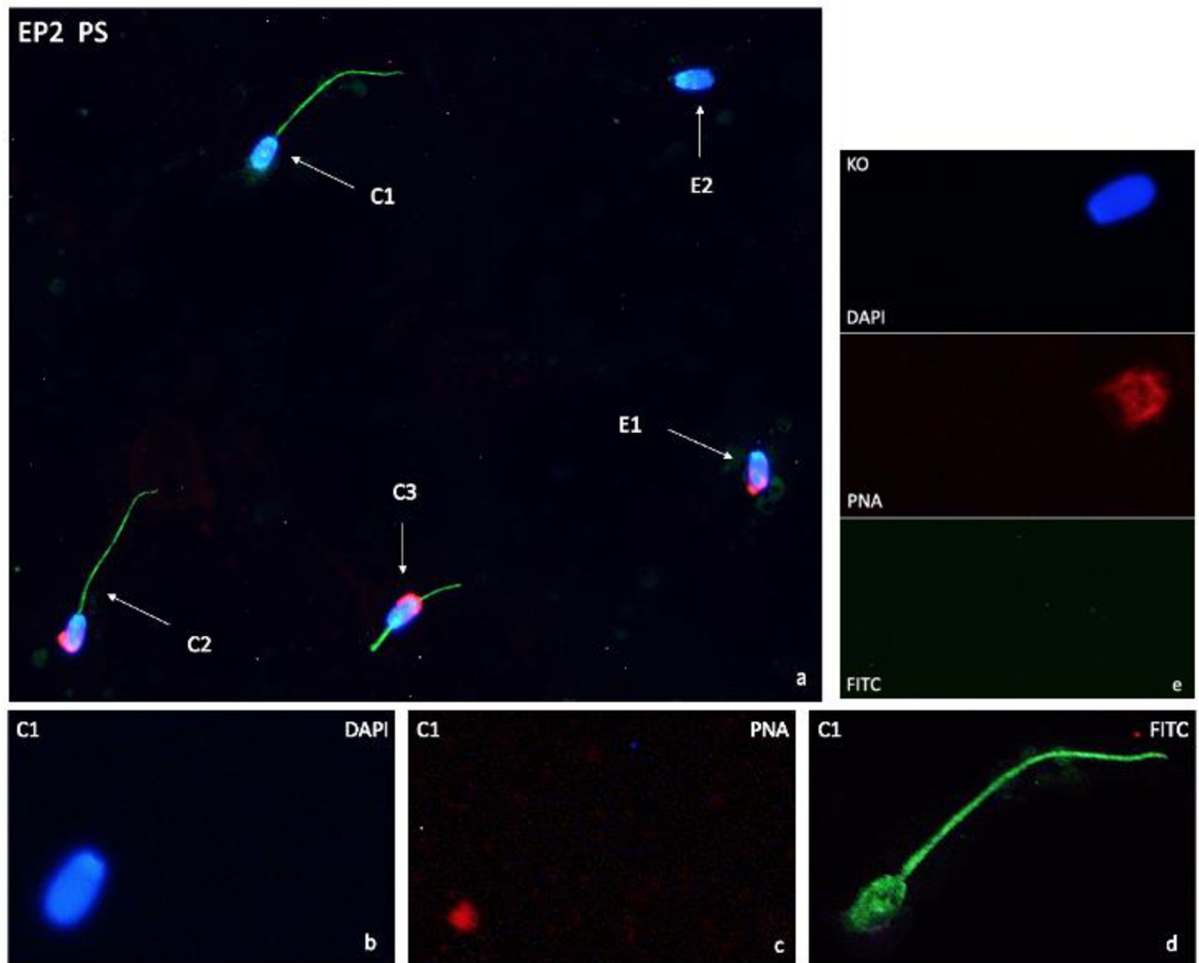
Na obrázku 14 je série snímků zachycující serinovou fosforylaci ve spermích odebraných z hlavy nadvarlat. Na větším snímku jsou proloženy tři snímky, které zachycují značení jádra pomocí fluorochromu DAPI, značení akrozomu pomocí PNA lektinu v konjugaci s rhodaminem a fosforylaci značenou imunofluorescenčně pomocí Alexa 488. Na sérii menších snímků jsou zachyceny dvě spermie, jedna vykazující fosforylační vzor E a jedna vykazující fosforylační vzor F. U spermíí odebraných z hlavy nadvarlat převládá fosforylační vzor E. Fluorescenční signál u vzorů E a F je velmi slabý.



Obrázek 14: Spermie odebrané z hlavy nadvarlat značené protilátkou proti PS AB1603 při zvětšení 400x: (a) celkový pohled na spermie značené fluorofory DAPI, rhodaminem a Alexa 488, šipkami jsou označeny spermie vykazující typické vzory, vzory jsou označené písmeny podle schématického obrázku viz výše; (b), (c) a (d) spermie vykazující fosforylační vzor E, na (a) označena jako E1; (e), (f) a (g) spermie vykazující fosforylační vzor F, na (a) označena jako F1; (b) a (e) jádro spermií označené modrým fluoroforem DAPI; (c) a (f) akrozom spermie označený červeným flouoroforem rhodaminem; (d) a (g) pozitivní reakce s protilátkou označená zeleně flouoroforem Alexa 488; (h) negativní kontrola pro fluorofory DAPI, rhodamin, Alexa 488.

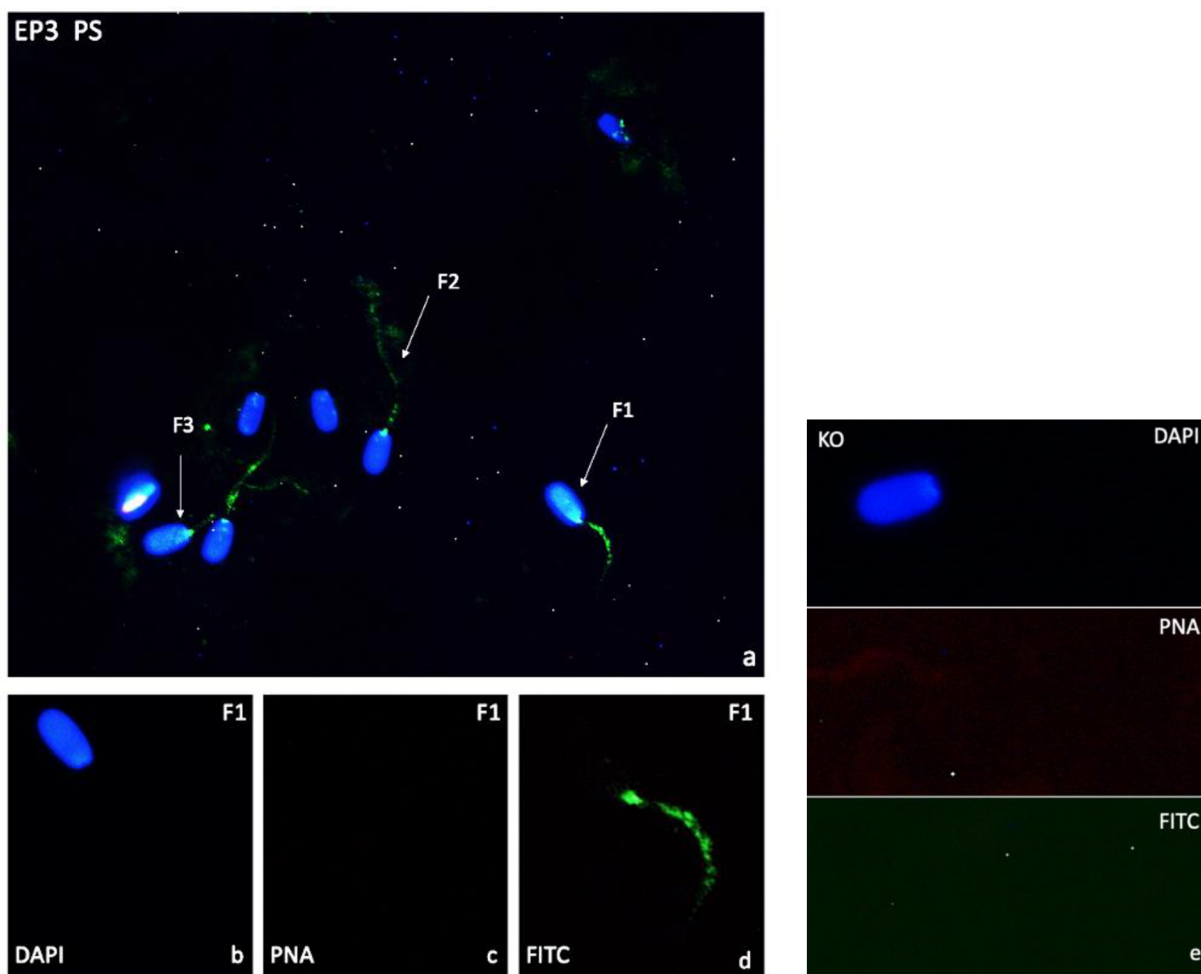
Na obrázku 15 je série snímků ukazující spermie odebrané z těla nadvarlat. Některé spermie z tohoto úseku měly velmi malé značení akrozomu pomocí PNA lektinu, jak je možno vidět i

na jednom z menších snímků (c). Spermie na větším snímku vykazují vzory C a E, vzor E vypadal stejně jako u předchozího segmentu nadvarlat. Vzor C je ukázán na menších snímcích.



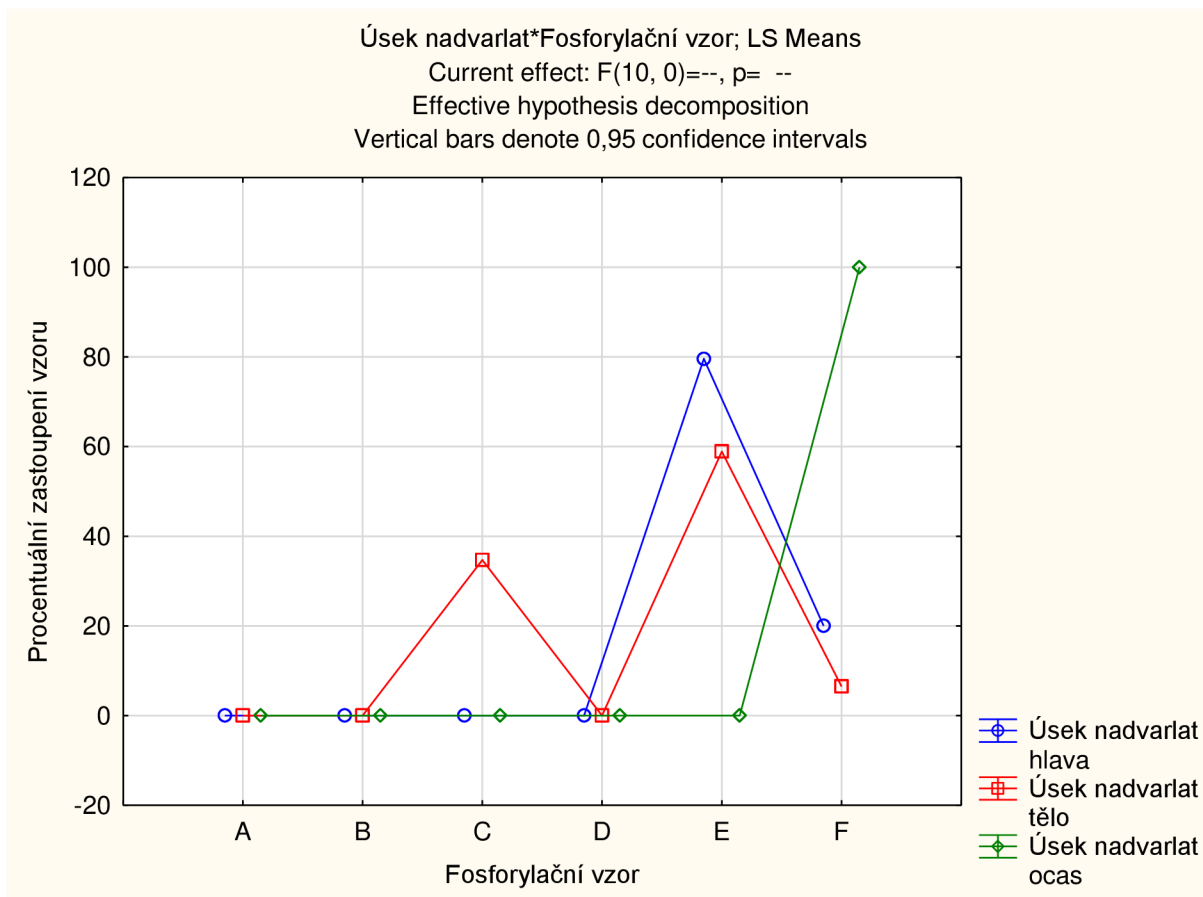
Obrázek 15: Spermie odebrané z těla nadvarlat značené protilátkou proti PS AB1603 při zvětšení 400x: (a) celkový pohled na spermie značené fluorofory DAPI, rhodaminem a Alexa 488, šipkami jsou označeny spermie vykazující typické vzory, vzory jsou označeny písmeny podle schématického obrázku viz výše; (b), (c) a (d) spermie vykazující fosforylační vzor C, na (a) označena jako C1; (b) jádro spermii označené modrým fluoroforem DAPI; (c) akrozom spermie označený červeným flouoroforem rhodaminem; (d) pozitivní reakce s protilátkou označená zeleně flouoroforem Alexa 488, (e) negativní kontrola pro fluorofory DAPI, rhodamin, Alexa 488.

Na obrázku 16 je možno vidět spermie odebrané z ocasu nadvarlat. Spermie z ocasu nadvarlat vykazovaly převážně slabou fluorescenci na bičíku. Zisk spermii z ocasu nadvarlat byl velmi malý, spermie se z malých kanálků velmi obtížně extrahovaly a jejich zisk byla až pětkrát menší než z předchozích úseků nadvarlat. Aby byl zisk spermii, pokud možno největší, docházelo při jejich získávání k většímu počtu odstředění. Spermie získané z ocasu nadvarlat nevykazovaly značení akrozomů pomocí PNA lektinu. Je možné, že byly akrozomy porušeny intenzivní odstředěním a nešetrným zacházením se spermii při jejich extrakci. Na menších snímcích lze vidět spermii, která vykazuje fosforylační vzor F, tedy fosforylaci na bičíku.



Obrázek 16: Spermie odebrané z ocasu nadvarlat značené při zvětšení 400x: (a) celkový pohled na spermie značené fluorofory DAPI, rhodaminem a Alexa 488, šipkami jsou označeny spermie vykazující typický vzor, vzor je označen písmenem podle schématického obrázku viz výše; (b), (c) a (d) spermie vykazující fosforylační vzor F, na (a) označena jako F1; (b) jádro spermii označené modrým fluoroforem DAPI; (c) akrozom spermie označený červeným flouroforem rhodaminem nevykazující fluorescenci; (d) pozitivní reakce s protilátkou označená zeleně flouroforem Alexa 488; (e) negativní kontrola pro fluorofory DAPI, rhodamin a Alexa 488.

Pro zhodnocení významnosti úseku nadvarlat, ze kterého byly spermie odebrány (hlava, tělo a ocas) pro výskyt určitého serinového fosforylačního vzoru byla použita metoda statické analýzy ANOVA.) Vstupními daty byly hodnoty uvedené v tabulce 7. Pro statistické vyhodnocení byl ale pozorovaný soubor příliš malý, a tak nebylo možno imunofluorescenci statisticky vyhodnotit. Pro ilustraci je uveden graf 10, který ukazuje procentuální zastoupení serinových fosforylačních vzorů v jednotlivých úsecích nadvarlat.



Graf 10: Vliv úseku nadvarlat, ze kterého byly spermie odebrány (hlava, tělo, ocas) na četnosti jednotlivých serinových fosforylačních vzorů: graf ukazuje procentuální zastoupení serinových fosforylačních vzorů v jednotlivých úsecích nadvarlat. (Jednotlivé fluorescenční vzory: A – fluorescence na bičíku se silným signálem v krčku a střední části bičíku; B – silný signál v krčku a střední části bičíku; C – signál na celé spermii se silným signálem v krčku a střední části bičíku; D – silný signál v ekvatoriálním segmentu a fluorescence na bičíku se silným signálem v krčku a střední části bičíku; E – slabý signál na hlavičce; F – slabý signál na bičíku.)

5.2 Detekce fosforylovaných proteinů v extraktech spermií

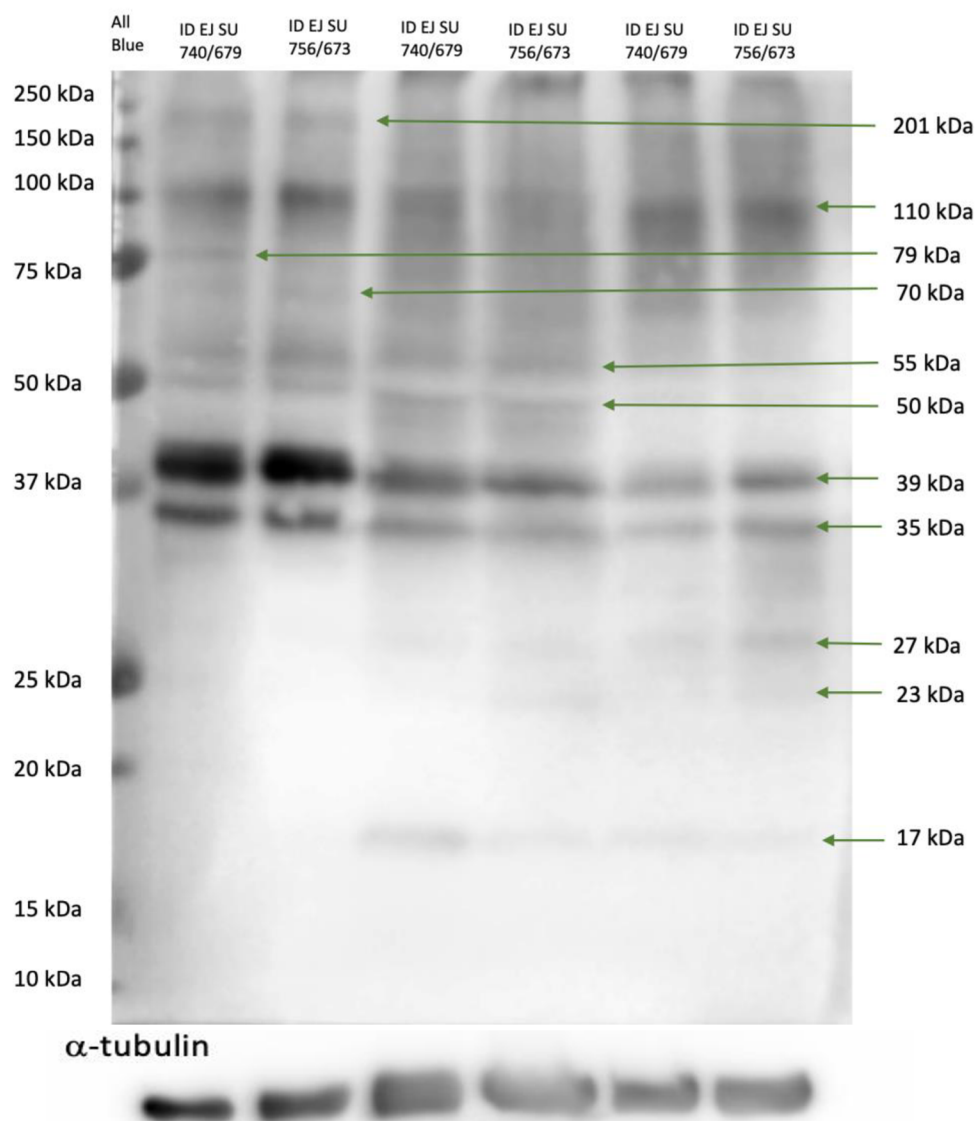
Fosforylace proteinů ve spermiích a jejich změny během maturace byly analyzovány i pomocí Western blotové analýzy. Byly zkoumány fosforylace na ejakulovaných a kapacitovaných spermiích a ve spermiích po AR, přičemž kapacitace a AR byly indukovány *in vitro*. Proteiny z jednotlivých extraktů byly rozděleny pomocí SDS PAGE a následně byly přeneseny na nitrocelulóзовou membránu, kde byly značeny pomocí specifických protilátek. Tímto způsobem byla prokázána fosforylace a její změny během maturace spermií na tyrozinových i serinových zbytcích. Pomocí kalibrační křivky v MS Excel byly vypočítány přibližné molekulové hmotnosti jednotlivých fosforylovaných proteinů.

Tyrozinová fosforylace byla detekována na proteinech o molekulových hmotnostech cca 201, 110, 79, 70, 55, 50, 39, 35, 27, 23 a 17 kDa (obrázek 17). Proteiny o velikosti 110, 70, 39 a 35 kDa byly detekovány u všech tří maturačních stádií. Proteiny o velikosti 55 a 50 kDa byly detekovány u ejakulovaných a kapacitovaných spermií. Proteiny o velikosti 201 a 79 kDa byl detekován pouze u ejakulovaných spermií. Proteiny o velikosti 27, 23 a 17 kDa byly detekovány u kapacitovaných spermií a u spermií po AR.

Serinová fosforylace byla detekována na proteinech o molekulových hmotnostech cca 112, 72, 60, 52, 49, 45, 41, 38, 32, 30, 28 a 21 kDa (obrázek 18). Protein o velikosti 72 kDa byl jako jediný přítomný u všech tří maturačních stádií, jinak se u ejakulovaných spermií nevyskytovaly jiné proteiny fosforylované na Ser. U kapacitovaných spermií a u spermií po AR byly přítomny proteiny o velikostech 112, 60, 52, 49, 44, 41, 38, 30 a 28 kDa. Proteiny o velikostech 32 a 21 kDa se vyskytovaly pouze u spermií po AR.

Byla hodnocena přítomnost a změna fosforylace i na epididymálních spermiích. Zvláště byly hodnoceny extrakty ze spermií získaných z hlavy, těla a ocasu nadvarlete. Byla prokázána přítomnost a změna Tyr i Ser fosforylace. Tyr fosforylace (obrázek 19) byla detekována na proteinech o molekulových hmotnostech cca 95, 61, 51, 49, 40, 37, 34 a 29 kDa. Ve všech třech oddílech nadvarlat byly detekovány proteiny s Tyr fosforylací o molekulových hmotnostech 95, 51 a 37 kDa. Pouze v hlavě nadvarlat byly detekovány Tyr fosforylované proteiny o molekulových hmotnostech 29 a 34 kDa. V hlavě a ocasu byly detekovány Tyr fosforylované proteiny o molekulových hmotnostech 61 a 49 kDa a v těle a ocasu byl detekován protein s Tyr fosforylací o velikosti 40 kDa. Serinová fosforylace byla detekována na proteinech o molekulových hmotnostech cca 91, 75 a 49 kDa (obrázek 20). Ve všech třech oddílech byly detekovány proteiny fosforylované na Ser o molekulových hmotnostech 91 a 75 kDa. Proteinový pruh značený protilátkou proti fosfoserinu o molekulové hmotnosti 49 kDa byl přítomen pouze v extraktech z ocasu nadvarlat.

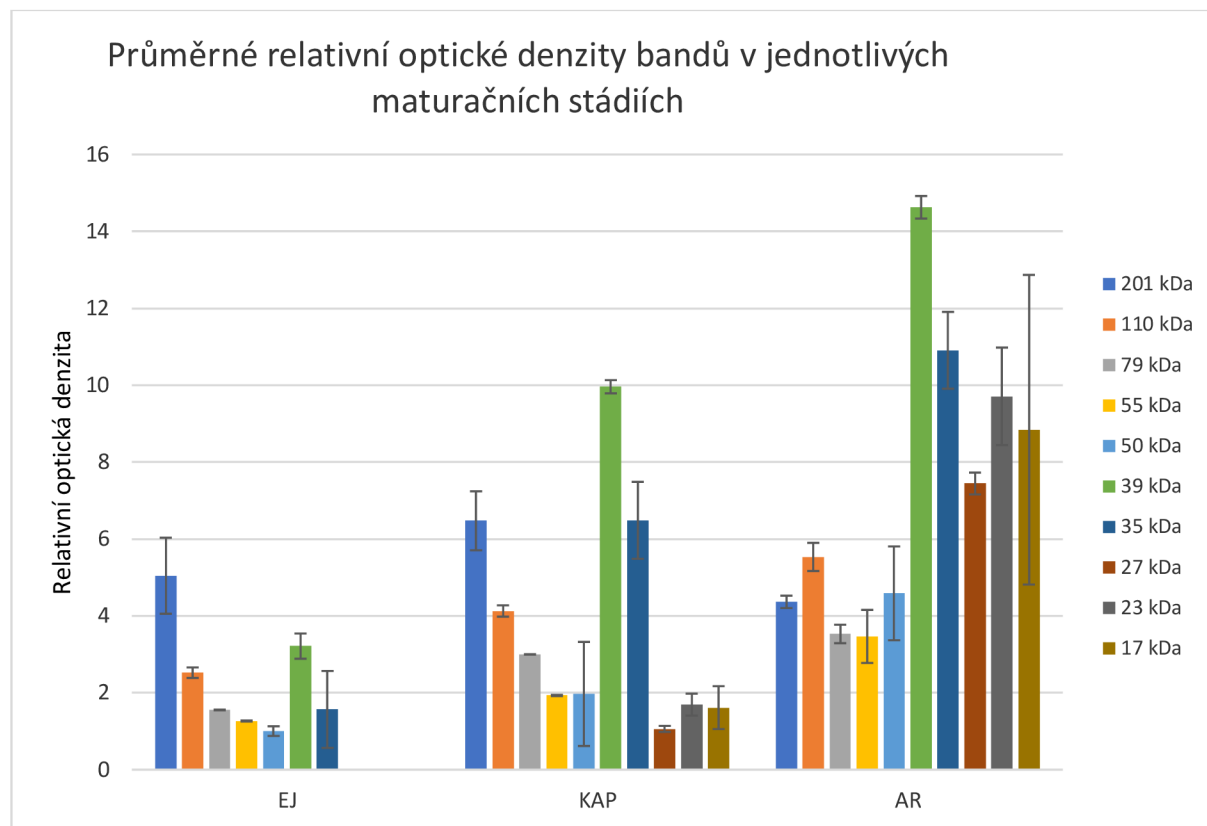
Pro zhodnocení změny fosforylace proteinů byla provedena denzitometrická analýza. Na následujících grafech jsou ukázány změny relativní (vztaženo k α -tubulinu) optické denzity fosforylovaných proteinů z extraktů spermií z jednotlivých maturačních stádií. Aby mohly být proteiny porovnány mezi sebou, byla vždy po vztažení hodnot k α -tubulinu ještě přiřazena jednomu proteinu hodnota 1 a následně byly ostatní hodnoty vztaženy ještě k tomuto proteinu.



Obrázek 17: *Imunodetekce tyrozinové fosforylace na ejakulovaných a kapacitovaných spermích a ve spermích po AR pomocí protilátky proti PY 4G10: detekce Tyr fosforylace v extraktech z kančích spermii na nitrocelulózkové membráně; proti fosfotyrozinu byla použita myší monoklonální protilátka 4G10 Platinum, v ředění 1:1000 v PBS; sekundární protilátka byla GAM v konjugaci s křenovou peroxidázou, v ředění 1:3000; standard All Blue, jehož molekulové hmotnosti jsou vyneseny nalevo vedle membrány; zelené šipky ukazují molekulové hmotnosti jednotlivých proteinů se specifickým protilátkovým označením; dole kontrola proteinové nanášky pomocí detekce α -tubulinu myší protilátkou proti α -tubulinu.*

Pro proteiny fosforylované na Tyr o molekulových hmotnostech 201, 110, 79, 55, 50, 39, 35, 27, 24 a 17 kDa byla provedena denzitometrická analýza. Byla změřena relativní optická denzita jednotlivých proteinů (vztaženo k α -tubulinu). Relativní optické hodnoty pro molekulové hmotnosti v jednotlivých maturačních stádiích byly zprůměrovány a zaneseny do grafu 11. Následně byla provedena statistická analýza (dvouvýběrový t-test) v programu STATISTICA pro zhodnocení odlišnosti relativní optické denzity proteinů mezi jednotlivými

maturačními stádii. Hladina významnosti pro t-testy byla $\alpha=0,05$. Pro přehlednost nejsou p hodnoty uvedeny v grafu 11, ale výsledky statistické analýzy jsou zaneseny do tabulky 8.



Graf 11: Denzitometrická analýza Tyr fosforylovaných proteinů: Průměrná relativní optická denzita Tyr fosforylovaných proteinů a její změna mezi maturačními stádii; hodnoty vztaženy k relativní optické denzitě proteinu 50 kDa u EJ spermii, kterému byla přiřazena hodnota 1; chybová úsečka – směrodatná odchylka.

Tabulka 8: Výsledky statistické analýzy porovnání relativních optických denzit jednotlivých proteinů značených protilátkou proti fosfotyrozínu mezi maturačními stádii: analýza provedena na hladině významnosti $\alpha=0,05$; statisticky významné výsledky ($p<0,05$) jsou v tabulce uvedeny červeně.

Statisticky významná rozdílnost mezi průměrnými denzitami na hladině významnosti $\alpha=0,05$						
	Průměrná denzita EJ	Průměrná denzita KAP	Průměrná denzita AR	EJ vs. KAP	EJ vs. AR	KAP vs. AR
201 kDa	50,9607	65,3995	44,0793	0,367	0,562	0,112
110 kDa	25,4756	41,6811	55,8992	0,015	0,016	0,069
79 kDa	15,6677	30,2736	35,6536	0,000	0,014	0,153
55 kDa	12,7705	19,4733	34,9999	0,016	0,018	0,035
50 kDa	10,1049	19,8946	46,3295	0,000	0,034	0,062
39 kDa	32,4630	100,6391	147,8050	0,037	0,011	0,122
35 kDa	15,8121	65,5209	110,2170	0,005	0,002	0,006
27 kDa	0,0000	10,7008	75,1968	0,000	0,000	0,002
23 kDa	0,0000	17,0780	98,1175	0,000	0,000	0,025
17 kDa	0,0000	16,2893	89,3422	0,000	0,000	0,213

Protein fosforylovaný na Tyr o molukulové hmotnosti 201 kDa nevykazoval statisticky významný rozdíl relativních optických denzit mezi jednotlivými maturačními stádii.

U proteinu fosforylovaném na Tyr o molekulové hmotnosti 110 kDa byly zjištěny statisticky významné rozdíly v relativní optické denzitě mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermii a mezi ejakulovanými spermii a spermii po AR. Mezi kapacitovanými spermii a spermii po AR nebyl pozorován statisticky významný rozdíl.

Pro protein fosforylovaný na Tyr o molekulové hmotnosti 79 kDa byly zjištěny statisticky významné rozdíly v relativní optické denzitě mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermii a mezi ejakulovanými spermii a spermii po AR. Mezi kapacitovanými spermii a spermii po AR nebyl pozorován statisticky významný rozdíl.

Pro protein fosforylovaný na Tyr o molekulové hmotnosti 55 kDa byly detekovány statisticky významné rozdíly v relativní optické denzitě mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermii, mezi ejakulovanými spermii a spermii po AR i mezi kapacitovanými spermii a spermii po AR.

Protein fosforylovaný na Tyr o molekulové hmotnosti 50 kDa vykazoval statisticky významné rozdíly v relativní optické denzitě mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermii a mezi ejakulovanými spermii a spermii po AR. Mezi kapacitovanými spermii a spermii po AR nebyl pozorován statisticky významný rozdíl.

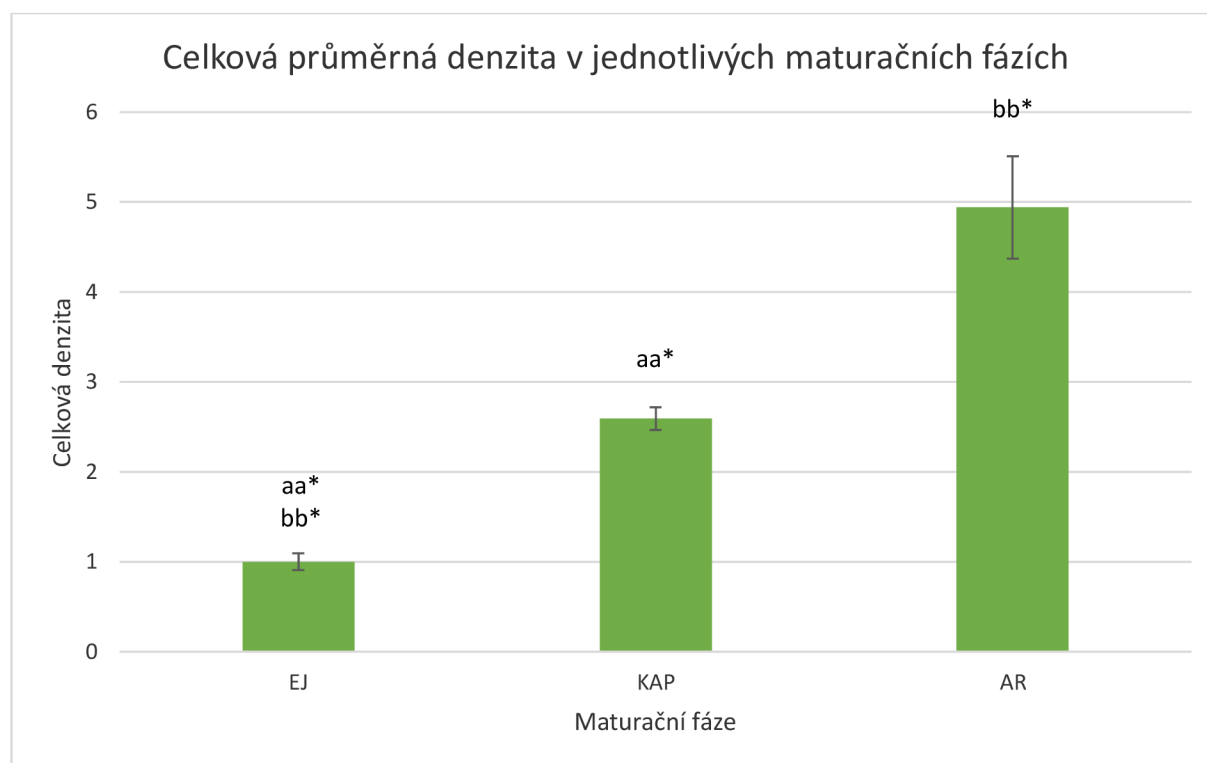
Denzitometrická analýza pro protein fosforylovaný na Tyr o molekulové hmotnosti 39 kDa ukázala statisticky významné rozdíly v relativní optické denzitě mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermii a mezi ejakulovanými spermii a spermii po AR. Mezi kapacitovanými spermii a spermii po AR nebyl pozorován statisticky významný rozdíl.

Pro protein fosforylovaný na Tyr o molekulové hmotnosti 35 kDa byly zjištěny statisticky významné rozdíly v relativní optické denzitě mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermii, mezi ejakulovanými spermii a spermii po AR, a i mezi kapacitovanými spermii a spermii po AR.

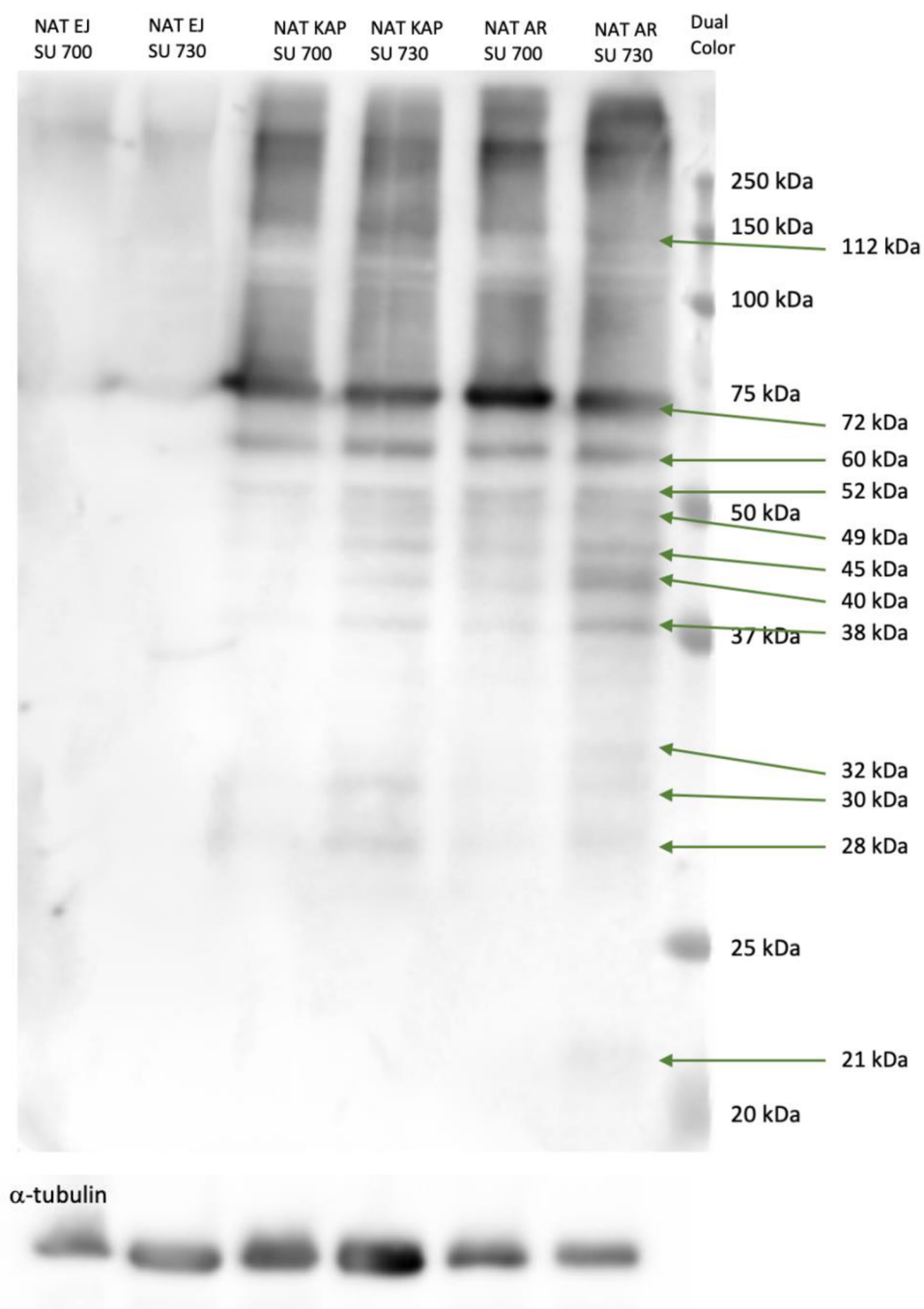
Protein fosforylovaný na Tyr o molekulové hmotnosti 27 kDa se nevyskytoval u ejakulovaných spermii, byl přítomen jen u kapacitovaných spermii a spermii po AR. Mezi těmito dvěma maturačními stádii byl detekován statisticky významný rozdíl v relativní optické denzitě proteinu. Stejně tak tomu bylo pro protein o molekulové hmotnosti 27 kDa.

Protein fosforylovaný na Tyr o molekulové hmotnosti 17 kDa se nevyskytoval u ejakulovaných spermii, byl přítomen jen u kapacitovaných spermii a spermii po AR. Mezi těmito dvěma maturačními stádii nebyl detekován statisticky významný rozdíl v relativní optické denzitě proteinu, jelikož u spermii po akrozomální reakci byl příliš velký rozptyl hodnot mezi jednotlivými vzorky.

V grafu 12 je denzitometrická analýza pro celkovou relativní optickou denzitu proteinů fosforylovaný na Tyr v jednotlivých stádiích maturace. Pomocí dvouvýběrového t-testu s hladinou významnosti $\alpha=0,05$ byl prokázán statisticky významný rozdíl v celkové relativní optické denzitě ejakulovaných a kapacitovaných spermií ($p=0,011$) a ejakulovaných spermií a spermií po AR ($p=0,022$). Mezi celkovou relativní optickou denzitou kapacitovaných spermií a spermií po AR nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl.



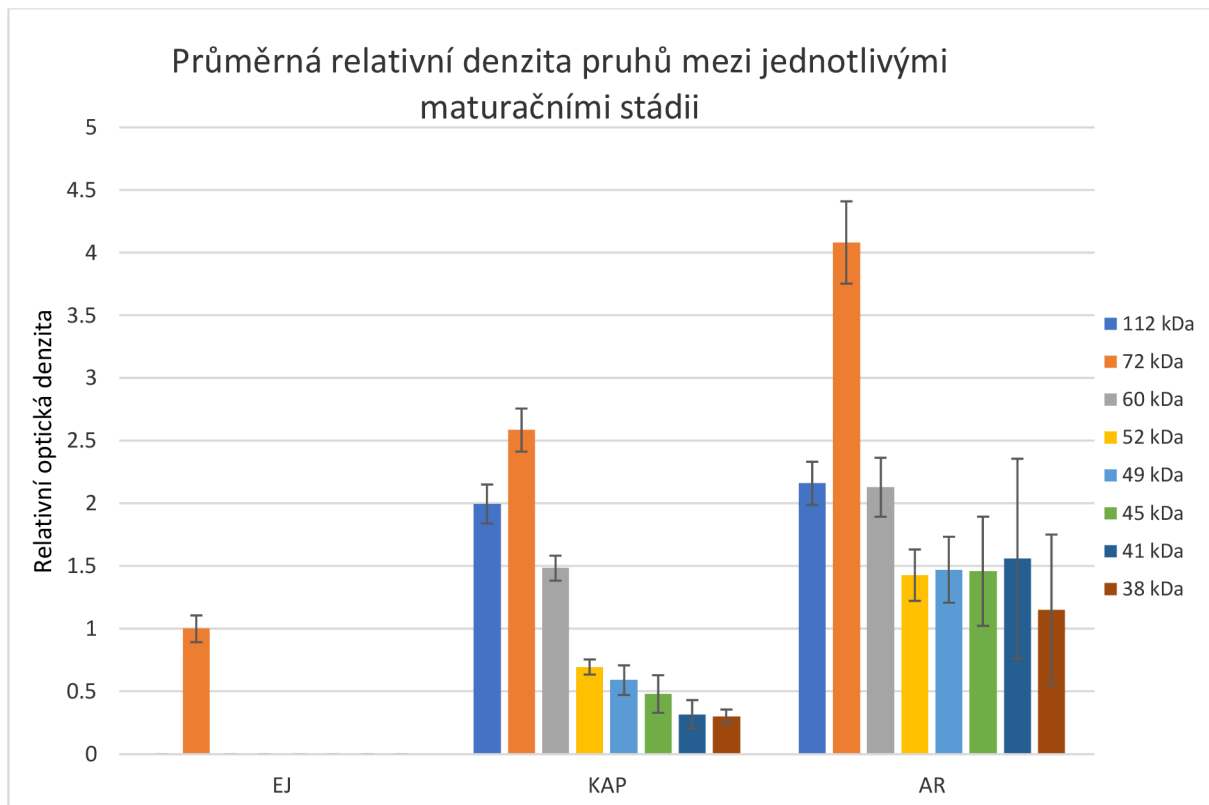
Graf 12: Denzitometrická analýza Tyr fosforylovaných proteinů: Celková průměrná relativní optická denzita v jednotlivých maturačních stádiích; vztaženo k hodnotě relativní optické denzity ejakulovaných spermií, které byla přiřazena hodnota 1; chybové úsečky – směrodatné odchylky od průměru; hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * – $p < 0,05$; aa – srovnání celkové relativní optické denzity mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermii, bb – srovnání celkové relativní optické denzity mezi ejakulovanými spermii a spermii po AR.



Obrázek 18: Imunodetekce serinové fosforylace v ejakulovaných a kapacitovaných spermích a ve spermích po AR pomocí protilátky proti PS AB1603: detekce Ser fosforylace v extraktech z kančích spermii na nitrocelulóзовé membráně; jako protilátka proti fosfoserinu byla použita králičí polyklonální protilátka v ředění 1:500; sekundární protilátka byla GAR v konjugaci s křenovou peroxidázou, v ředění 1:3000; standard Dual Color, jehož molekulové hmotnosti jsou vyneseny napravo vedle membrány; zelené šipky ukazují molekulové hmotnosti jednotlivých proteinů se specifickým protilátkovým značením; dole kontrola proteinové nanášky pomocí detekce α -tubulinu myší protilátkou proti α -tubulinu.

Pro proteiny fosforylované na Ser o molekulových hmotnostech 112, 72, 60, 52, 49, 45, 41 a 38 kDa byla provedena denzitometrická analýza. Byla změřena relativní optická denzita

jednotlivých proteinů (vztaženo k α -tubulinu). Následně byly relativní optické denzity proteinů v rámci jednotlivých maturačních stádií zprůměrovány a tyto průměrné hodnoty byly vyneseny do grafů. Byla provedena statistická analýza (dvouvýběrový t-test) v programu STATISTICA pro zhodnocení odlišnosti relativní optické denzity jednotlivých proteinových pruhů mezi maturačními stádií. Hladina významnosti pro t-testy byla $\alpha=0,05$. Průměrné relativní optické denzity jednotlivých proteinů jsou zaneseny v grafu 13. Pro přehlednost nejsou výsledky statistické analýzy zaneseny v grafu 13, ale jsou v tabulce 9.



Graf 13: Denzitometrická analýza Ser fosforylovaných proteinů: Průměrná relativní optická denzita (vztažená k α -tubulinu) Ser fosforylovaných proteinů a její změna mezi maturačními stádii; hodnoty vztaženy k relativní optické denzitě proteinu 72 kDa u EJ spermii, kterému byla přiřazena hodnota 1; chybová úsečka – směrodatná odchylka.

Tabulka 9: Výsledky statistické analýzy porovnání relativních optických denzit jednotlivých Ser fosforylovaných proteinových pruhů mezi maturačními stádii: analýza provedena na hladině významnosti $\alpha=0,05$; statisticky významné výsledky ($p < 0,05$) jsou v tabulce uvedeny červeně.

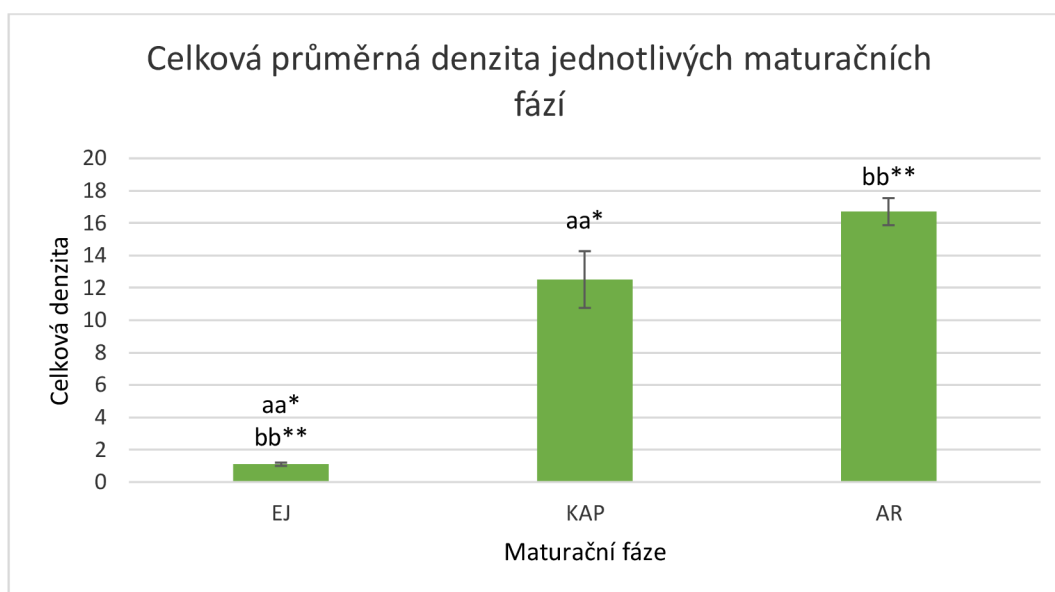
Statisticky významná rozdílnost mezi průměrnými denzitami na hladině významnosti $\alpha=0,05$						
	Průměrná denzita EJ	Průměrná denzita KAP	Průměrná denzita AR	EJ vs. KAP	EJ vs. AR	KAP vs. AR
112 kDa	0,00000	0,77098	0,83479	0,000	0,000	0,550
72 kDa	0,42753	0,99883	1,57696	0,018	0,013	0,056
60 kDa	0,00000	0,57330	0,82254	0,000	0,000	0,127
52 kDa	0,00000	0,26865	0,55168	0,000	0,000	0,076
49 kDa	0,00000	0,22809	0,56845	0,000	0,000	0,092
45 kDa	0,00000	0,18550	0,56379	0,000	0,000	0,167
41 kDa	0,00000	0,12302	0,60266	0,000	0,000	0,263
38 kDa	0,00000	0,11608	0,44534	0,000	0,000	0,292

Denzitometrická analýza pro protein fosforylovaný na Ser o molekulové hmotnosti 112 kDa detekovala tento protein pouze na kapacitovaných spermích a spermích po AR. Mezi těmito maturačními stádii nebyl detekován statisticky významný rozdíl.

Protein fosforylovaný na Ser o molekulové hmotnosti 72 kDa byl detekován ve všech třech maturačních stádiích. Byl detekován statisticky významný rozdíl mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermii a mezi ejakulovanými spermii a spermii po AR. Mezi kapacitovanými spermii a spermii po AR se nevyskytoval statisticky významný rozdíl.

Protein fosforylovaný na Ser o molekulové hmotnosti 60 kDa byl detekován pouze u kapacitovaných spermii a spermii po AR. Mezi těmito maturačními stádii nebyl detekován statisticky významný rozdíl. To stejné platilo pro proteiny o molekulových hmotnostech 52, 49, 45, 41 a 38 kDa.

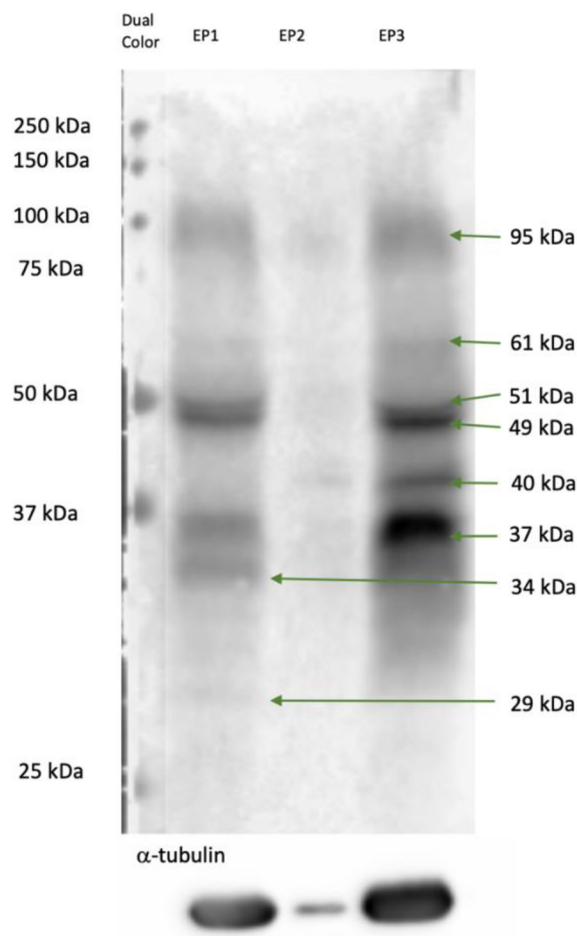
V grafu 14 je denzitometrická analýza pro celkovou relativní optickou denzitu proteinů fosforylovaných na Ser v jednotlivých stádiích maturace. Pomocí dvouvýběrového t-testu s hladinou významnosti $\alpha=0,05$ byl prokázán statisticky významný rozdíl v celkové relativní optické denzitě ejakulovaných a kapacitovaných spermii ($p=0,023$) a ejakulovaných spermii a spermii po AR ($p=0,003$). Mezi celkovou relativní optickou denzitou kapacitovaných spermii a spermii po AR nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl.



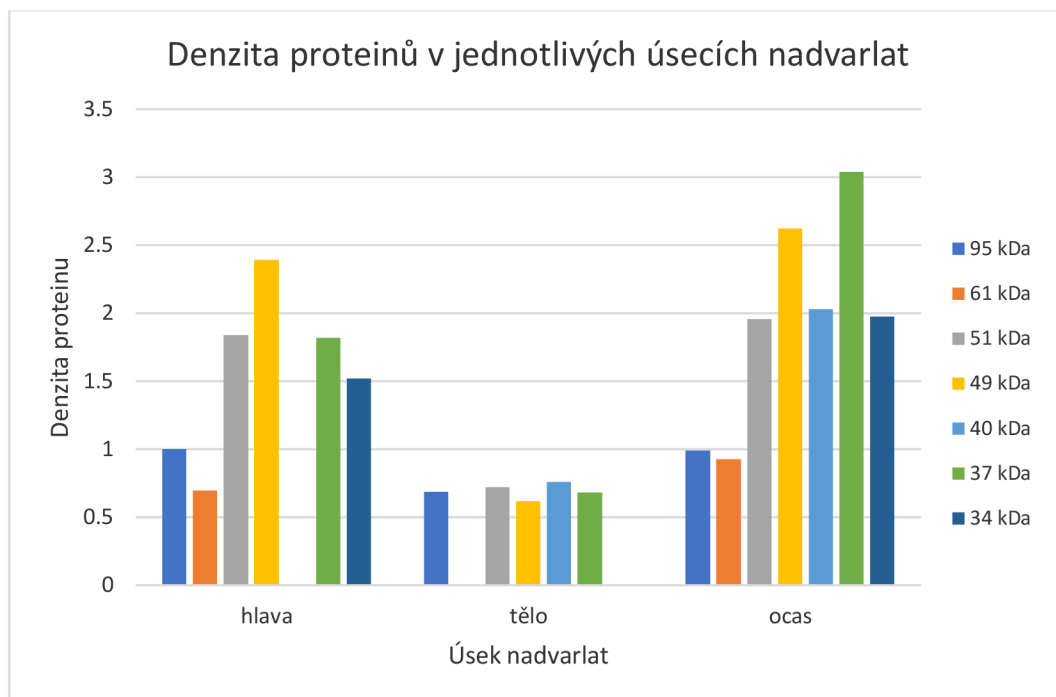
Graf 14: Denzitometrická analýza Ser fosforylovaných proteinů: Celková průměrná relativní optická denzita v jednotlivých maturačních stádiích; hodnoty vztaženy k hodnotám EJ spermii, kterým byla přiřazena hodnota 1; chybové úsečky – směrodatné odchylky od průměru; hladina významnosti $\alpha = 0,05$; * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,01$; aa – srovnání celkové relativní optické denzity mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermii, bb – srovnání celkové relativní optické denzity mezi ejakulovanými spermii a spermii po AR.

Denzitometrické měření bylo provedeno i na spermích izolovaných z jednotlivých úseků nadvarlat. Byla hodnocena změna relativní optické denzity (vztaženo k α -tubulinu) fosforylovaných proteinů mezi hlavou, tělem a ocasem nadvarlat. Byla hodnocena změna v tyrozinové a serinové fosforylaci.

Obrázek 19: Imunodetekce tyrozinové fosforylace na epididymálních spermích pomocí protilátky proti PY 4G10: detekce Tyr fosforylace v extraktech z kančích spermíí na nitrocelulókové membráně; protilátka proti fosfotyrozinu byla myší monoklonální protilátka 4G10 v ředění 1:1000 v PBS; sekundární protilátka byla GAM v konjugaci s křenovou peroxidázou, v ředění 1:3000; standard Dual Color, jehož molekulové hmotnosti jsou vyneseny nalevo vedle membrány; zelené šipky ukazují molekulové hmotnosti jednotlivých pruhů pro proteiny se specifickým protilátkovým označením; EP1 – hlava nadvarlete, EP2 – tělo nadvarlete a EP3 ocas nadvarlete; dole kontrola proteinové nanášky pomocí detekce α -tubulinu myší protilátkou proti α -tubulinu.

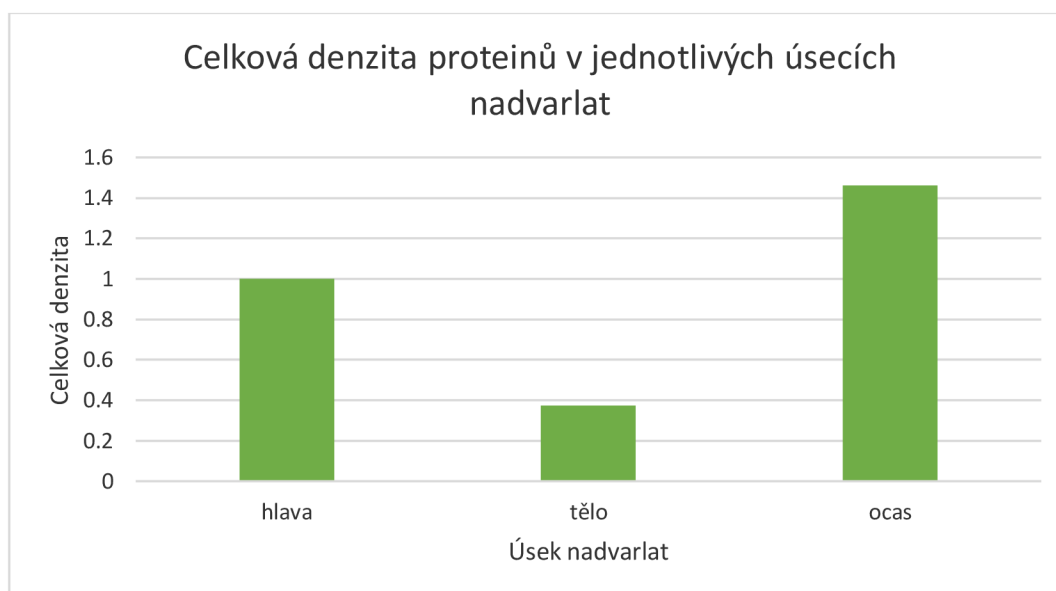


Graf 15 ilustruje zjištěnou relativní optickou denzitu jednotlivých Tyr fosforylovaných proteinů v hlavě, těle a ocasu nadvarlat a její změnu mezi úseky nadvarlat. Hodnoceny byly proteiny o molekulových hmotnostech 95, 61, 51, 49, 40, 37 a 34 kDa. Měření bylo provedeno z nedostatku času jen jednou, proto není dostatek hodnot pro statistickou analýzu. Zjištěné hodnoty jsou pouze ilustrativní.

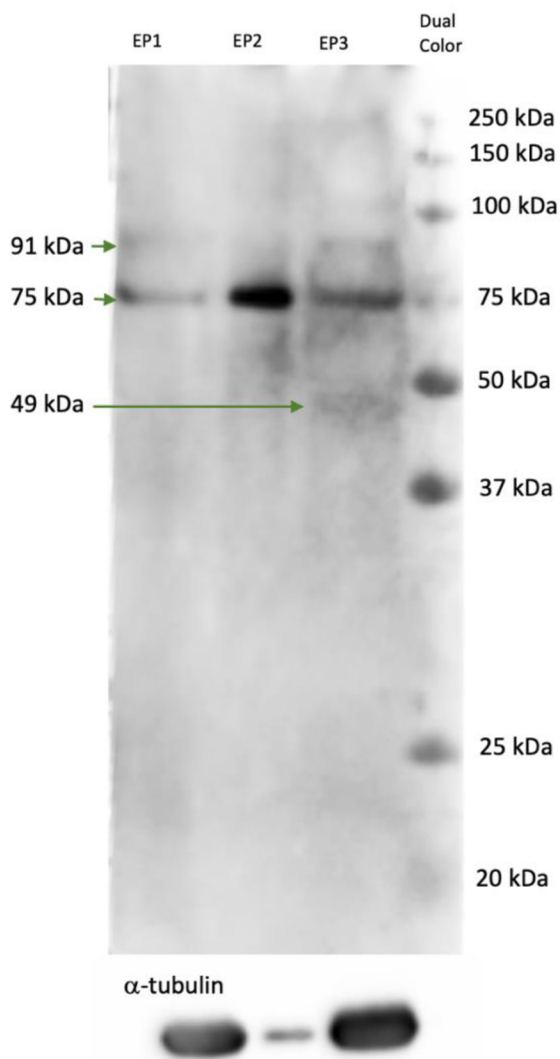


Graf 15: Denzitometrická analýza Tyr fosforylovaných proteinů: Relativní optická denzita proteinových pruhů značených protilátkou proti fosfotyrozinu v hlavě, těle a ocasu nadvarlat; vztaženo k relativní optické denzitě proteinu 95 kDa hlavy nadvarlat, kterému byla přiřazena hodnota 1.

V grafu 16 je zobrazena celková relativní optická denzita jednotlivých úseků nadvarlat. Největší denzita byla detekována v ocasu nadvarlat a nejmenší v těle nadvarlat.

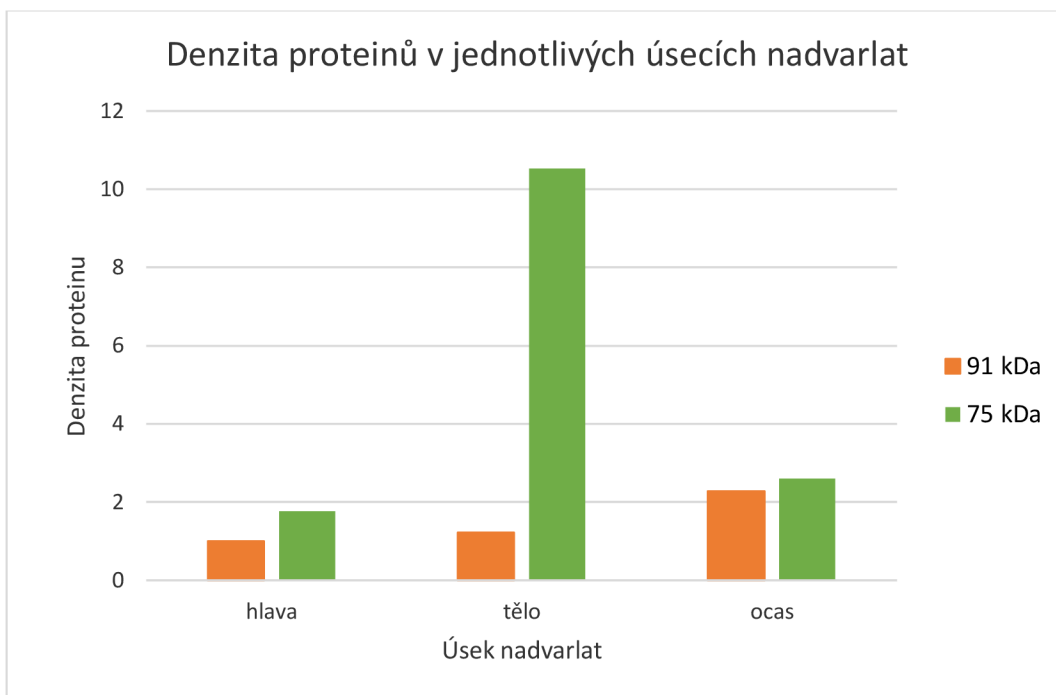


Graf 16: Denzitometrická analýza Tyr fosforylovaných proteinů: Celková relativní optická denzita proteinových pruhů značených protilátkou proti fosfotyrozinu v hlavě, těle a ocasu nadvarlat; vztaženo k relativní optické denzitě hlavy nadvarlat, které byla přiřazena hodnota 1.



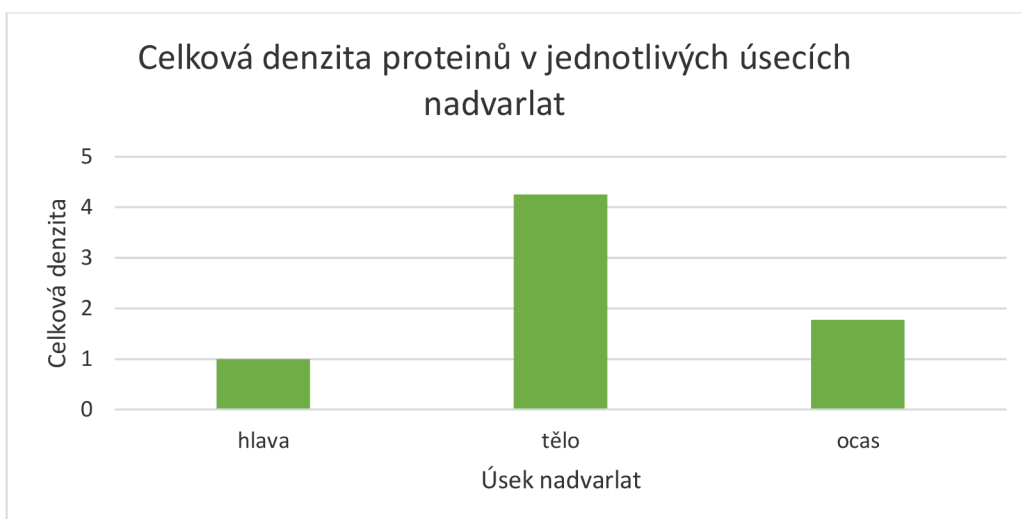
Obrázek 20: Imunodetekce serinové fosforylace v epididymálních spermích pomocí protilátky proti PS: detekce Ser fosforylace v extraktech z kančích spermii na nitrocelulózové membráně; jako protilátka proti fosfoserinu byla použita králičí polyklonální protilátka v ředění 1:500; sekundární protilátka GAR v konjugaci s křenovou peroxidázou, v ředění 1:3000; standard Dual Color, jehož molekulové hmotnosti jsou vyneseny napravo vedle membrány; zelené šipky ukazují molekulové hmotnosti jednotlivých pruhů pro proteiny se specifickým protilátkovým označením; EP1 – hlava nadvarlete, EP2 – tělo nadvarlete a EP3 ocas nadvarlete; dole kontrola proteinové nanášky pomocí detekce α -tubulinu myší protilátkou proti α -tubulinu.

Graf 17 ilustruje zjištěnou relativní optickou denzitu jednotlivých Ser fosforylovaných proteinů v hlavě, těle a ocasu nadvarlat a její změnu mezi úseky nadvarlat. Hodnoceny byly proteiny o molekulových hmotnostech 91 a 75 kDa. Protein o molekulové hmotnosti vykazoval vysokou relativní optickou denzitu v těle nadvarlat. Měření bylo provedeno z nedostatku času jen jednou, proto není dostatek hodnot pro statistickou analýzu. Zjištěné hodnoty jsou pouze ilustrativní.



Graf 17: Denzitometrická analýza Ser fosforylovaných proteinů: Relativní optická denzita proteinových pruhů značených protilátkou proti fosfoserinu v hlavě, těle a ocasu nadvarlat; vztaženo k relativní optické denzitě proteinu 91 kDa hlavy nadvarlat, kterému byla přiřazena hodnota 1.

V grafu 18 je zobrazena celková relativní optická denzita proteinů fosforylovaných na Ser v jednotlivých úsecích nadvarlat. Největší denzita byla detekována v těle nadvarlat, v hlavě a ocasu byla nižší.



Graf 18: Denzitometrická analýza Ser fosforylovaných proteinů: Celková relativní optická denzita proteinových pruhů značených protilátkou proti fosfoserinu v hlavě, těle a ocasu nadvarlat; vztaženo k relativní optické denzitě hlavy nadvarlat, které byla přiřazena hodnota 1.

6 Diskuze

Zralé spermie opouštějící varlata nejsou schopny oplodnit oocyt. Aby získaly fertilizační schopnost, musí projít procesem maturace. Maturace se odehrává v nadvarlatech a po ejakulaci v samičím pohlavním traktu (Yanagimachi 1994). Během maturace ve spermiích dochází ke kvalitativním změnám, např. získáváním nových proteinů z okolí, zesíťováním proteinů do funkčních domén nebo díky posttranslačním úpravám proteinů (Sutovsky et al. 2001; Dacheaux et al. 2012). Spermie jsou již transkripčně neaktivní, a proto u nich dochází ke změnám prostřednictvím posttranslačních modifikací, jako je např. glykosylace a fosforylace (Dacheux et al. 2012). Fosforylace je jedním z hlavních mechanismů, kterými jsou regulovány děje odehrávající se ve spermiích, výrazně se podílí na procesu kapacitace (Visconti 2009). Fosforylační kaskády mají v důsledku vliv na vylití akrozomálního váčku. Fosforylace je tedy důležitým mechanismem, jak spermie získává schopnost oplození (Salicioni et al. 2007).

Kapacitace a AR jsou procesy, kterými spermie musí projít, aby byla schopna oplodnit oocyt. *In vivo* se odehrávají v samičím pohlavním traktu. V laboratorních podmínkách je možno kapacitaci a AR navodit *in vitro* pomocí kapacitačních médií (Yanagimachi 1994). Fosforylace ve spermiích a s tím spojená kapacitace je ovlivněna hladinou HCO_3^- , Ca^{2+} , albuminu, glukózy, pyruvátu a laktátu (Urner et al. 2001). Pro kapacitaci *in vitro* bylo v této práci použito kapacitační médium na základě TL-HEPES PVA s BSA. BSA vyvazuje cholesterol z membrány, čímž je nahrazen cholesterolový eflux nastávající při kapacitaci *in vivo*. (Yi et al. 2011). AR byla *in vitro* navozena přidáním kalcium ionoforu do kapacitačního média. Ionofor vnáší do spermie Ca^{2+} , což v *in vitro* podmínkách simuluje přirozený influx Ca^{2+} do spermie při zahájení AR v *in vivo* prostředí (Talbot et al. 1976).

V této diplomové práci jsme se zabývali změnou fosforylace proteinů spermií během jejich maturace. Sledovali jsme změny ve fosforylaci na tyrozinových a serinových zbytcích. Hodnotili jsme, jak se fosforylace liší u ejakulovaných a kapacitovaných spermií a u spermií po akrozomální reakci. Sledovali jsme, zda se mezi sebou liší spermie z nativního ejakulátu a z inseminační dávky. Hodnotili jsme, zda dochází ke změnám i během epididymální maturace. Tyto procesy byly sledovány pomocí nepřímé imunofluorescence a denzitometrické analýzy.

Pro sledování fosforylace technikou nepřímé imunofluorescence bylo zásadní využití správné fixační metody. Zvolili jsme fixační metodu podle Tardif et al. (2001), kdy jsme použili pro fixaci 2% formaldehyd s 2% BSA ve vodě. Tato metoda se zdála neúčinnější při využití protilátky pro fosfotyrozinu, což ukázala ve své diplomové práci Černá (2019).

Při hodnocení tyrozinové fosforylace v ejakulovaných spermiích jsme sledovali několik fosforylačních vzorů. Nejprve jsme prováděli inkubaci spermií na sklech s primární protilátkou proti fosfotyrozinu 4G10 přes noc do druhého dne. V tomto případě převažoval fosforylační vzor, kdy byla přítomná výrazná fluorescence na akrozomální oblasti, EqSS, a slabá fluorescence na bičíku. Zároveň zde byly ve větší míře zastoupené spermie vykazující fosforylační vzor, který jsme označili jako B, kdy byla přítomná silná imunofluorescence v EqSS a slabá fluorescence na bičíku. Toto naše pozorování nebylo v souladu se studií Tardif et al (2001), kdy bylo značení v akrozomální oblasti sice také pozorováno, ale v daleko menší míře a nebylo pozorováno žádné značení na bičíku. Kvůli nespecifickému značení na ejakulovaných spermiích byla pozměněna metodika a inkubace s protilátkou proti fosfoserinu

nadále probíhala jen 1 hod. Po této změně metodiky se ve vzorcích ejakulovaných spermií výrazně snížil výskyt detekce fosforylace v akrozomální oblasti a zvýšil se počet pozorování spermií značených na hlavičce pouze na EqSS. Značení na bičíku se nadále vyskytovalo, bylo ale slabé. Ve studii Luno et al. (2013) byla detekována fluorescence na bičíku kančích spermií, a to u spermií kapacitovaných *in vitro*, které byly kultivované s ovidukálními epiteliálními buňkami. S touto studií je v nesouladu náš nález dominantního zastoupení fosforylačního vzoru B (fluorescence v bičíku a EqSS), jelikož studie Luno et al. (2013) udává, že fosforylace v EqSS se začíná vyskytovat až při kapacitaci spermií. Fujinoki et al. (2004) uvádí, že na bičíku kančích spermií se nachází protein AKAP, který je na Tyr fosforylovaný. Je tedy možné, že jsme v bičíku detekovali právě tento protein. Teijeiro & Marini (2012) uvádí, že konkrétně AKAP4 má velikost přibližně 80 kDa. My jsme našli protein o podobné molekulové hmotnosti (79 kDa) a tento protein byl detekovatelný v ejakulovaných, kapacitovaných spermiích i ve spermiích po AR, stejně jako fluorescence na bičíku. Jeho relativní optická denzita se zvýšila během kapacitace, což by odpovídalo studii Fujinoki et al. (2014), kteří dávají protein AKAP do souvislosti s kapacitací ale i s hyperaktivací motility. Jedná se ale pouze o dohad. Abychom tento protein jako AKAP4 mohli identifikovat, muselo by následovat podrobnější zkoumání. Protein bychom mohli identifikovat imunodetekcí. Abychom si byli jistí, že jsme našli protein z bičíku, museli bychom nejprve suspenzi spermií opakovaně odstředovat a promývat homogenizačním pufrem, a nakonec bychom pomocí 100 úderů teflonového homogenizéru oddělili hlavičky od bičíků (Fujinoki et al. 2004). Následně bychom protein detekovali imunodetekčně, jako ve studii Teijeiro & Marini (2012). Extrahovali bychom proteiny z bičíků spermií, které bychom imunoprecipitovali protilátkou proti fosfotyrozinu. Následně bychom po Western blottingu využili imunoznačení protilátkou proti AKAP4. Pomocí primární protilátky proti AKAP4 bychom mohli protein detekovat i imunofluorescenčně na zafixovaných spermiích.

Na kapacitovaných spermiích jsme opět zaznamenali větší množství fosforylačních vzorů. Před změnou metodiky, týkající se délky inkubace spermií s primární protilátkou, jsme v kapacitovaných spermiích pozorovali v porovnání s ejakulovanými spermiemi větší procentuální výskyt vzoru B, tedy fosforylace na EqSS a bičíku. Po změně metodiky došlo ke změně, zastoupení fosforylačního vzoru B vzrostlo ve prospěch ejakulovaných spermií a u kapacitovaných spermií byl signifikantně zastoupen fosforylační vzor A, tedy fosforylace na akrozomální oblasti, EqSS a slabě také na bičíku. Přítomnost značení akrozomální oblasti na kapacitovaných spermiích souhlasí s pozorováním Tardif et al. (2001). V této studii byla kapacitace dána do souvislosti s tyrozinovou fosforylací v oblasti akrozomu. Námí pozorovaný dominantní vzor u kapacitovaných spermií popsali také ve studii Luno et al. (2013) na kapacitovaných spermiích. V této studii byly hodnoceny spermie kapacitované *in vitro* za kultivace s ovidukálními epiteliálními buňkami. Fosforylační vzory byly v této studii rozděleny jako typické pro stupeň kapacitace mírný, střední a vysoký. Vzorek, který je v této diplomové práci označen jako C (fosforylace na akrozomální oblasti a bičíku) byl typicky přítomný u spermií s nízkým stupněm kapacitace. Vzorek C jsme v malé míře pozorovali napříč všemi stádii maturace. Vzorek, který byl v této diplomové práci označen jako vzorek A, a byl prokázán jako signifikantně se vyskytující u kapacitovaných spermií, byl také zmíněn ve studii Luno et al. (2013), kdy byl dáván do souvislosti s vysokou mírou kapacitace.

Spermie, u kterých byla *in vitro* navozena AR pomocí kalcium ionoforu, vykazovaly před i po změně metodiky největší procentuální zastoupení spermií vykazujících výraznou fosforylaci na akrozomální oblasti a EqSS. Spermie bez značení akrozomální oblasti se ve vzorcích spermií po indukci AR vyskytovaly velmi zřídka. Pro kontrolu proběhnutí AR byly akrozomy značeny PNA lektinem v konjugaci s rhodaminem. Ve vzorcích spermií s indukovanou AR bylo u většiny spermií sníženo značení akrozomů PNA lektinem; usuzovali jsme tedy, že u těchto spermií došlo k vylití akrozomálního váčku.

Do diplomové práce jsme chtěli začlenit i popis změny tyrozinové fosforylace během epididymální maturace. Tento pokus se nám nepodařil, metodou nepřímé imunofluorescence nebyla fosforylace na tyrozinu detekována. Jednalo se pravděpodobně o chybu v metodice. Z důvodu nedostatku času nebyl pokus zopakován. Posouzení změny fosforylace na tyrozinu během epididymální maturace by bylo zajímavé, jelikož již v nadvarlatech se fosforylace odehrává, což jsme dokázali imunodetekcí proteinů z extraktů epididymálních spermií. Studie Jankovičová et al. (2018) zkoumala změnu tyrozinové fosforylace ve spermiích během jejich průchodu nadvarlaty. Bylo nalezeno šest fosforylačních vzorů, které byly různou mírou zastoupeny v jednotlivých úsecích nadvarlat. V hlavě nadvarlat se vyskytovaly nejvíce spermie bez fluorescenčního značení, spermie s fosforylací v celém ekvatoriálním segmentu, spermie s fosforylací na akrozomální oblasti a spermie s fosforylací na akrozomu a v EqSS. V těle nadvarlat se vyskytovaly nejvíce spermie se silným fluorescenčním signálem v akrozomální oblasti, některé měly navíc slabé značení na EqSS a byly zde přítomné i spermie bez fluorescenčního značení. V ocasu nadvarlat byly přítomné převážně jen spermie se silným fluorescenčním signálem v akrozomální oblasti a některé se slabým značením na EqSS (Jankovičová et al. 2018). Tyrozinová fosforylace v epididymálních spermiích byla zkoumána i ve studii Jones et al. (2008). Pomocí protilátky proti fosfotyrozinu 4G10 zde byla detekována fosforylace na Tyr ve spermiích odebraných z ocasu nadvarlat. Ve spermiích z ocasu nadvarlat byla pozorována silná fluorescence v EqSS a také byla pozorována slabá fluorescence na bičíku a akrozomu. V této studii pozorovali rozdíl ve značení protilátkou proti fosfotyrozinu u fixovaných a nefixovaných spermií. U nefixovaných spermií byla pozorovatelná slabá fluorescence na střední části bičíku a v postakrozomální oblasti. Fixace tedy má vliv na výskyt jednotlivých fluorescenčních vzorů (Jones et al. 2008).

Nepřímou imunofluorescencí spermií značených protilátkou proti fosfotyrozinu 4G10 se nám podařilo pozorovat změnu lokalizace tyrozinové fosforylace během maturace spermií. Po vyloučení vzorků připravených nevhodným metodickým přístupem jsme statistickou analýzou potvrdili, že fosforylace na tyrozinových zbytcích proteinů v oblasti akrozomu má souvislost s kapacitací a následně s akrozomální reakcí.

Výsledky nepřímé imunofluorescence jsme podpořili denzitometrickou analýzou. Ta byla provedena detekcí fosforylovaných proteinů z extraktů spermií na nitrocelulóзовých membránách. Na membránách, na kterých byly použity vzorky z ejakulovaných a kapacitovaných spermií a spermií po AR, jsme detekovali 10 proteinů, které byly fosforylované na tyrozinu. Jednalo se o proteiny o přibližných molekulových hmotnostech 201, 110, 79, 55, 50, 39, 35, 27, 24 a 17 kDa. Molekulové hmotnosti byly vypočítány pomocí kalibrační křivky, nejedná se tedy o přesné hodnoty. Ve studii Fàbrega et al. (2011) bylo detekováno 14 proteinů fosforylovaných na tyrozinu. Některé zde uvedené fosforylované proteiny by mohly být shodné s těmi, které jsme našli my. V uvedené studii byl detekován

protein o přibližné molekulové hmotnosti 76 kDa, který by mohl odpovídat proteinu s námi spočítanou molekulovou hmotností 79 kDa. Dále Fàbrega et al. (2011) objevili proteiny o molekulových hmotnostech 49, 40 a 37 kDa, které by mohly odpovídat některým námi zjištěným proteinům s vypočítanými molekulovými hmotnostmi 50, 39 a 35 kDa. Zjistili jsme také změnu relativní optické denzity proteinů mezi jednotlivými maturačními stádii spermií. Protein o molekulové hmotnosti cca 201 kDa byl detekován u všech tří maturačních stádií ve stejném množství. Proteiny o molekulové hmotnosti cca 110, 79, 55, 50, 39 a 35 kDa byly pozorovány u všech maturačních stádií, jejich relativní optická denzita se během kapacitace zvyšovala. Dva hlavní Tyr-fosforylované proteiny jsou identifikovány jako SPACA1 (u kance o velikosti 34 a 39 kDa a u berana 35 a 40 kDa). Kančí SPACA1 obsahuje 3 Tyr zbytky a je fosforylován na Y268 blízko C koncové domény. Je možné, že je ještě dodatečně fosforylován na Ser/Thr (dvě serinové fosforylace na S255 a S277). SPACA1 je přítomen v celém ekvatoriálním segmentu, ale jen v EqSS je fosforylován na Tyr (Jones et al. 2008). Je tedy pravděpodobné, že proteiny, u kterých jsme určili molekulové hmotnosti jako 39 a 35, jsou právě SPACA1. Proteiny o molekulových hmotnostech cca 27, 24 a 17 kDa se nevyskytovaly u ejakulovaných spermií, toto pozorování je v souladu se studií Fàbrega et al. (2011) kde bylo zjištěno, že proteiny o molekulových hmotnostech 23 a 12 kDa byly signifikantně více fosforylované u kapacitovaných spermií oproti ejakulovaným a fosforylované proteiny o molekulových hmotnostech 28 a 20 kDa nebyly u ejakulovaných spermií detekovány vůbec. Protein o molekulové hmotnosti cca 17 kDa, by mohl být protein dříve identifikovaný jako p21 (Dubé et al. 2004), jehož tyrozinová fosforylace byla dávana do souvislosti s prodlouženou dobou pobytu spermií v nepříznivých podmínkách a s destabilizací jejich membrány. Případně by se mohlo jednat o protein, který byl ve studii Esworthy et al. (1994) identifikován jako PHGPx (fosfolipid hydroperoxid glutathion peroxidáza) s molekulovou hmotností 19 kDa. PHGPx je protein nacházející se u kance, křečka i člověka. Je to selenoprotein podléjící se na ochraně biomembrán před oxidativním stresem (Esworthy et al. 1994).

Imunodetekce proteinů fosforylovaných na tyrozinu byla provedena i na vzorku spermií odebraných ze zmrazených nadvarlat. V těchto vzorcích bylo nalezeno 8 proteinů s tyrozinovou fosforylací o přibližných molekulových hmotnostech 95, 61, 51, 49, 40, 37 a 29 kDa. Ve studii Fàbrega et al. (2011) byl u epididymálních spermií detekován na tyrozinu fosforylovaný protein o molekulové hmotnosti 93 kDa. Pravděpodobně může jít o stejný protein, který jsme my určili jako protein o molekulové hmotnosti 95 kDa. Dále Fàbrega et al. (2011) v epididymálních spermiích našli proteiny o molekulových hmotnostech 66 a 45 kDa, což opět poměrně odpovídá našim výsledkům. Jelikož se jedná jen o přibližné molekulové hmotnosti, je možné, že se jedná o některé stejné proteiny, které byly objeveny i ve vzorcích z ejakulovaných spermií.

Naším dalším cílem byla detekce fosforylace na serinových zbytcích proteinů a vyhodnocení její změny. *In vitro* navození kapacitace a AR bylo i v tomto případě provedeno stejně jako v případě tyrozinové fosforylace. Kapacitace byla navozena inkubací spermií v médiu TL-HEPES PVA s přidavkem BSA a AR přidáním kalcium ionoforu. Serinová fosforylace byla zkoumána nepřímou imunofluorescencí a denzitometrickou analýzou. Pro nepřímou imunofluorescenci byla použita stejná metoda fixace jako v případě detekce tyrozinové fosforylace, tedy fixace 2% formaldehydem s 2% BSA ve vodě.

Za použití metody nepřímé imunofluorescence byly opět vyhodnocovány vzorky ejakulovaných a kapacitovaných spermií a spermií po AR. Na ejakulovaných spermiích jsme

zaznamenali přítomnost několika fosforylačních vzorů. Nejvíce byly zastoupeny vzory, kdy byl značen bičík i hlavička. Bičík byl značen s různou intenzitou v jednotlivých částech, nejsilnější signál byl přítomný v krčku a střední části bičíku, na hlavní části byl signál slabší. Na hlavičce byla fosforylace přítomná na celé ploše hlavičky, nebo v oblasti ekvatoriálního segmentu. Na některých spermii bylo značení pozorovatelné jen na krčku a střední části bičíku, tento vzor byl na ejakulovaných spermii zastoupen minimálně.

Ve spermii, u kterých byla indukována kapacitace, byly pozorovány různorodé serinové fosforylační vzory. Nejvíce byl zastoupen vzor, kdy byl značen celý bičík s různou intenzitou na jeho jednotlivých částech a dále byla značena spermie po celém povrchu. Vyskytovaly se ale opět spermie s fosforylací na ekvatoriálním segmentu nebo bez značení hlavní části bičíku.

Spermie po indukované akrozomální reakci vykazovaly stejné vzory jako kapacitované spermie.

Spermie vykazovaly obecně poměrně často serinovou fosforylací na bičíku. Podle Fujinoki et al. (2004) se v bičíku kančí spermie vyskytuje protein AKAP, který je fosforylován na Tyr, ale tato fosforylace je řízena pomocí Ser/Thr fosforylační kaskády. Tato fosforylace má souvislost s motilitou spermie a s hyperaktivací motility (Fujinoki et al. 2004). Ve studii Jha et al. (2006), která byla provedena na myši, bylo dokázáno, že se během kapacitace objevuje prolinem řízená fosforylace na serinu. Tato fosforylace byla přítomná na hlavní části bičíku a na anteriorní části hlavičky.

Po statistickém vyhodnocení výsledků jsme došli k závěru, že neexistuje statistická závislost mezi fází maturace a výskytem jednotlivých fosforylačních vzorů. Byl ale prokázán vliv původu spermii, tedy zda byl vzorek připraven z inseminační dávky či z nativního ejakulátu. Pokud byl vzorek připraven z inseminační dávky, vyskytoval se u něj ve větším zastoupení vzor, kdy byla detekována fosforylace pouze na bičíku a byla přítomná silnější fluorescence v oblasti krčku a střední části bičíku, oproti vzorku připravenému z nativního ejakulátu. Inseminační dávky jsou již ředěny na požadovanou koncentraci spermii. Při přípravě inseminační dávky dochází k promývání spermii od semenné plazmy a jsou do nich přidávány energetické zdroje pro spermie. Jelikož jsou spermie promyty od semenné plazmy, může dojít k odstranění dekapacitačních faktorů a může u nich dojít k předčasné kapacitaci (Luno et al. 2013). Je tedy možné, že se ve skutečnosti nejedná o závislost výskytu konkrétního fosforylačního vzoru (výrazná fosforylace v krčku a střední části bičíku a slabá fosforylace v hlavní části bičíku) a původu spermie (z nativního ejakulátu, nebo inseminační dávky). Je možné, že se v inseminační dávce ve vzorku, který jsme zpracovávali jako ejakulované spermie, vyskytuje již velké množství kapacitovaných spermii. Mohlo by se tedy jednat i o závislost mezi výskytem výše zmíněného vzoru a proděláním kapacitace. Pro vyhodnocení této možnosti jsme neměli dostatek dat a již nebyl dostatek času na další vyhodnocení. Bylo by ale zajímavé zjistit, zda se opravdu nejedná o závislost mezi výskytem vzoru a maturační fází.

Serinovou fosforylací se nám podařilo sledovat metodou nepřímé imunofluorescence i ve spermii odebraných ze zmrazeného nadvarlete. Tento pokus jsme ale provedli pouze jednou, což nebylo dostačující pro statistické vyhodnocení. Pozorovali jsme fosforylací na serinu ve spermii z hlavy, těla i ocasu nadvarlat. Ve spermii z hlavy nadvarlat jsme nejčastěji zaznamenali fluorescenční značení celé hlavičky spermie a dále také lehký fluorescenční signál na bičíku spermie. Ve spermii odebraných z oblasti těla nadvarlete jsme navíc detekovali

ještě vzor, kdy byla spermie značená celá. U spermií odebraných z ocasu nadvarlat jsme pozorovali jen slabý signál na bičíku spermie. Aparacio (2007) uvádí, že během průchodu nadvarlaty se zvyšuje serinová fosforylace na GSK3 (glykogen syntáz-kináze-3). GSK3 se vyskytuje v hlavičce a bičíku spermií. Spermie během průchodu nadvarlaty získávají schopnost motility a zároveň je motilita opět potlačena při uskladnění spermií v ocasu nadvarlat. GSK3 je kinázou a fosforyluje proteiny na serinových a treoninových zbytcích, čímž se podílí na inhibici motility. PKA tento enzym fosforyluje na serinu, tím je inhibována jeho kinázová funkce (Aparacio 2007). Je tedy možné, že fosforylace, kterou jsme v epididymálních spermiích našli, měla souvislost právě s tímto enzymem, ať už se jednalo o fosforylaci na něm samotném, nebo fosforylaci jeho aktivitou. Je nutné podotknout, že naše výsledky vycházejí z pozorování spermií ze zmrazeného nadvarlete. Podle značení akrozomů lektinem PNA bylo možno pozorovat, že spermie byly poškozené nízkými teplotami. Pro přesné vyhodnocení bylo nutné pokus provést opakovaně na čerstvě preparovaných nadvarlatech.

Výsledky nepřímé imunodetekce jsme podpořili denzitometrickým měřením. Byla hodnocena změna relativní optické denzity proteinů fosforylovaných na serinu. Pomocí protilátky proti fosfoserinu AB1603 bylo detekováno 12 proteinů o přibližných molekulových hmotnostech 112, 72, 60, 52, 49, 45, 41, 38, 32, 30, 28 a 21 kDa. Není velké množství prací, které by se věnovaly serinové fosforylaci na proteinech kančích spermiích (Signorelli et al. 2012). Serinová fosforylace byla ale například zkoumána ve studii Naz (1999), kde však byly experimenty prováděny s lidskými spermiemi. V této studii byla serinová fosforylace detekována na proteinech o molekulových hmotnostech cca 43–55, 94, 110 a 190 kDa. My jsme objevili více proteinových pruhů, z nichž se některé vyskytovaly v oblasti s podobnou molekulovou hmotností jako u Naz (1999). Ve studii Fujinoki et al. (2004) jsou zmiňovány 4 proteiny, které vykazují serinovou fosforylaci u křečka. Byly to proteiny o molekulových hmotnostech 90, 38, 32 a 10 kDa. Protein 90 kDa byl fosforylován během aktivace motility. Během hyperaktivace byl stupeň fosforylace na tomto proteinu zachován, nebo i vzrůstal. Proteiny 38, 32 a 10 kDa byly fosforylovány až během hyperaktivace (Fujinoki et al. 2004). My jsme našli proteiny o podobných molekulových hmotnostech, a detekovali jsme je u kapacitovaných spermií a spermií po AR.

Pouze protein fosforylovaný na serinu o molekulové hmotnosti 72 kDa byl nalezen u ejakulovaných a kapacitovaných spermií a u spermií po AR. Ostatní proteiny byly objeveny jen u kapacitovaných spermií a spermií po AR. Mezi relativními optickými denzitami proteinu o molekulové hmotnosti 72 kDa byl pozorován výrazný rozdíl mezi ejakulovanými spermiemi a kapacitovanými a také mezi ejakulovanými a spermiemi po AR. Je tedy možné předpokládat, že zvýšená serinová fosforylace na tomto proteinu má souvislost s kapacitací. U ostatních proteinů nebyl nalezen signifikantně významný rozdíl mezi jejich detekcí u kapacitovaných spermií a spermií po AR. Mezi jednotlivými kanci byly značné rozdíly, a tak v jednotlivých maturačních stádiích byl velký rozptyl hodnot. Nebylo proto jasné, zda se jedná o statistickou závislost, nebo zda se jedná o specifitu jednotlivých kanců. Z denzitometrické analýzy tedy vyplynulo, že v ejakulovaných spermiích se nachází velmi málo proteinů fosforylovaných na serinu v porovnání s kapacitovanými spermiemi a spermiemi po AR. Naz (1999) udává, že se serinová fosforylace u lidských spermií zvyšuje s kapacitací, což odpovídá našemu pozorování na kančích spermiích.

Denzitometrie serinové fosforylace byla provedena i na vzorcích epididymálních spermií. Byly porovnávány extrakty spermií odebraných z jednotlivých úseků zmraženého nadvarlete. V těchto extraktech byly detekovány tři proteiny fosforylované na serinu o přibližných molekulových hmotnostech 91, 75 a 49 kDa. Protein o molekulové hmotnosti 49 kDa byl nalezen pouze v ocasu nadvarlat. Protein o molekulové hmotnosti 91 kDa se vyskytoval v podobném množství ve všech třech částech nadvarlat. Protein o molekulové hmotnosti 75 kDa vykazoval vysokou relativní optickou denzitu v oblasti těla nadvarlete. Tomuto tématu se věnuje jen malý počet studií a bylo by zajímavé zjistit více o změně serinové fosforylace během maturace spermie. Naše výsledky ukazují, že se serinová fosforylace v různých stádiích vývoje spermie vyskytuje a mění se.

Na závěr můžeme říct, že jsme detekovali fosforylaci na tyrozinu i serinu a že se míra fosforylace v průběhu maturace mění. Bylo potvrzeno, že fosforylace je velmi důležitým mechanismem vedoucím ke kapacitaci spermie.

7 Závěr

Při hodnocení změny tyrozinové fosforylace pomocí metody nepřímé imunofluorescence jsme identifikovali signifikantní rozdíl v zastoupení fosforylačního vzoru (fluorescence v EqSS a v bičíku) mezi ejakulovanými spermii a následujícími maturačními stádii. Potvrdili jsme, že se tyrozinový fosforylační vzor, kdy je fosforylace přítomná na akrozomální oblasti, EqSS a bičíku, začíná signifikantně více objevovat během kapacitace. Z našich výsledků také vyplývá, že pro správnou detekci tyrozinové fosforylace je důležitá optimalizovaná doba kultivace spermií s primární protilátkou, jelikož změna metodiky zásadně mění výsledné pozorování.

Změnu tyrozinové fosforylace se nám podařilo dokázat i denzitometrickou analýzou, kdy jsme u většiny detekovaných proteinů našli zvyšující se fosforylaci během maturace. Na ejakulovaných, kapacitovaných spermii a spermii po AR jsme detekovali celkem 10 proteinů fosforylovaných na Tyr o přibližných molekulových hmotnostech 201, 110, 79, 55, 50, 39, 35, 27, 24 a 17 kDa. Denzitometrickou analýzou jsme detekovali tyrozinovou fosforylaci i v extraktech epididymálních spermii. Jelikož se nejednalo o opakované pozorování, není možné na základě tohoto výsledku vyvozovat obecné závěry.

Při pozorování serinové fosforylace nepřímou imunofluorescencí ve spermii jsme detekovali několik fosforylačních vzorů, nebylo však statisticky prokázáno, zda je některý z nalezených vzorů typický pro konkrétní maturační stádium. V těchto pozorováních se zdálo, že vliv na výskyt jednotlivých vzorů má spíše původ vzorku, tedy zda byly vzorky spermií připraveny z nativního ejakulátu nebo z inseminační dávky. Pozorovali jsme také fosforylační vzory ve spermii z jednotlivých úseků nadvarlat. Zjistili jsme, že se zastoupení jednotlivých vzorů v nadvarlatech liší. Pokus však nebylo možno statisticky vyhodnotit, tudíž není možné z našich výsledků usuzovat, zda se jedná o závislost mezi výskytem vzorů a úsekem nadvarlat, nebo zda se jedná jen o náhodné pozorování.

Změna ve fosforylaci na serinu byla sledována za využití denzitometrické analýzy. Detekovali jsme pouze jeden protein o přibližné molekulové hmotnosti 72 kDa, který se vyskytoval u ejakulovaných a kapacitovaných spermii a spermii po AR. U tohoto proteinu byla detekována statisticky větší relativní optická denzita u kapacitovaných spermii a spermii po AR oproti ejakulovaným spermii. U ostatních detekovaných proteinů o přibližných molekulových hmotnostech 112, 60, 52, 49, 45, 41, 38, 32, 30, 28 a 21 kDa nebyl statisticky významný rozdíl mezi relativní optickou denzitou proteinů kapacitovaných spermii a spermii po AR.

Do budoucna by bylo zajímavé zaměřit se více na změnu serinové fosforylace během maturace u kančích spermii a podrobněji prostudovat změny odehrávající se ve spermii během jejich průchodu nadvarlaty. Bylo by také zajímavé zaměřit se na to, zda má na výskyt jednotlivých tyrozinových i serinových fosforylačních vzorů vliv to, z jakých spermii jsou vzorky připravovány (z nativního ejakulátu nebo z inseminační dávky).

Bylo by jistě také přínosné provést analýzu přítomnosti a změny fosforylace na treoninových zbytcích kančích spermatických proteinů.

8 Literatura

- Akbarsha MA, Faisal K, Radha A. 2015. The Epididymis: Structure and Function. *Mammalian Endocrinology and Male Reproductive Biology* DOI: 10.1201/b18900-7.
- Aparicio IM, Bragado MJ, Gil MC, Garcia-Herreros M, Gonzalez-Fernandez L, Tapia JA, Garcia-Marin LJ. 2007. Porcine sperm motility is regulated by serine phosphorylation of the glycogen synthase kinase-3 α . *Reproduction* **134**: 435–444.
- Ashrafzadeh A, Karsani, SA, Nathan S. 2013. Mammalian sperm fertility related proteins. *International journal of medical sciences* **10**:1649–1657.
- Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ. 2004. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *Journal of cell science* **117**: 3645-3657.
- Awda BJ, Buhr MM. 2010. Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) pathway and reactive oxygen species regulate tyrosine phosphorylation in capacitating boar spermatozoa. *Biology of reproduction* **83**: 750-758.
- Bianchi E, Wright GJ. 2014. Izumo meets Juno: preventing polyspermy in fertilization. *Cell cycle* **13**: 2019-2020.
- Breitbart H, Naor Z. 1999. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reviews of Reproduction* **4**: 151–159.
- Breitbart H. 2003. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol. Biol* **49**: 321–327.
- Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S. 2005. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* **129**: 263–268.
- Caballero J, Frenette G, Sullivan R. 2011. Post Testicular Sperm Maturation Changes in the Bull: Important Role of the Epididymosomes and Prostatosomes. *Veterinary Medicine International* DOI:10.4061/2011/757194.
- Cohen P. 2000. The regulation of protein function by multisite phosphorylation—a 25 year update. *Trends in biochemical sciences* **25**: 596–601.
- Černá P. 2019. Fixační metody pro sledování fosforylovaných proteinů v kančích spermiích pomocí imunofluorescenční mikroskopie [MSc. Thesis]. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Dacheux JL, Belleannée C, Guyonnet B, Labas V, Teixeira-Gomes AP, Ecroyd H, Druart X, Gatti JL, Dacheux F. 2012. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **58**:4:197–210. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/19396368.2012.663233>.
- Ded L, Dostalova P, Dorosh A, Dvorakova-Hortova K, Peknicova J. 2010. Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology* **8**: 87–98.

- Dubé Ch, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Guillemette Ch, Bailey JL. 2004. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology* **62**: 874–886.
- Eddy EM. 2006. The Spermatozoon. Pages 3-55 in Neill JD, Challis JRG, Pfaff DW, Plant TM, Kretser DM, Richards JS, Wassarman PM, editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier Academic Press, San Diego, ISBN: 9780123977694.
- Esworthy R, Doan K, Doroshov J, Chu F. 1994. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a human testis phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Gene* **144**: 317–318.
- Fawcett DW. 1970. A Comparative View of Sperm Ultrastructure. *Biology of Reproduction* **2**: 90-127.
- Fàbrega A, Puigmulé M, Yeste M, Casas I, Bonet S, Pinart E. 2011. Impact of epididymal maturation, ejaculation and in vitro capacitation on tyrosine phosphorylation patterns exhibited of boar (*Sus domesticus*) spermatozoa. *Theriogenology* **76**: 1356–1366.
- Flesh FM, Wijnand E, Van de Lest CHA, Colenbrander B, Van Golde LMG, Gadella BM. 2001. Capacitation Dependent Activation of Tyrosine Phosphorylation Generates Two Sperm Head Plasma Membrane Proteins With High Primary Binding Affinity for the Zona Pellucida. *Molecular Reproduction and Development* **60**:107–115.
- Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. 2008. Regulating the acrosome reaction. *The International Journal of Developmental Biology* **52**: 503–510.
- Fujinoki M, Ishimoda-Takagi T, Ohtake H. 2004. Serine/threonine phosphorylation associated with hamster sperm hyperactivation. *Reproductive Medicine and Biology* **3**: 223–230.
- Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *The International Journal of Developmental Biology* **52**: 473–480.
- Gadella BM, Luna C. 2014. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology* **81**: 74–84.
- Gage MJG. 1998. Mammalian sperm morphometry. *The Royal Society* **265**: 97–103.
- Han Y, Haines CJ. 2007. Role(s) of the Serine/Threonine Protein Phosphatase 1 on Mammalian Sperm Motility. *Archives of Andrology: Journal of Reproductive Systems* **53**:169–177.
- Harayama H, Nakamura K. 2008. Changes of PKA and PDK1 in the principal piece of boar spermatozoa treated with a cell-permeable cAMP analog to induce flagellar hyperactivation. *Molecular reproduction and development* **75**: 1396–1407.
- Hunter T. 1995. Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling. *Cell* **80**: 225–236.
- Hunter T. 2009. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Current Opinion in Cell Biology* **21**:140–146.
- Jankovičová J, Michalková K, Sečová P, Horovská L, Maňásková-Postlerová P, Antalíková J. 2018. Evaluation of protein phosphorylation in bull sperm during their maturation in the epididymis. *Cell Tissue Research* **371(2)**: 365–373.

- Jha KN, Salicioni AM, Arcelay E, Chertihin O, Kumari S, Herr JC, Visconti PE. 2006. Evidence for the involvement of proline-directed serine/threonine phosphorylation in sperm capacitation. *Molecular Human Reproduction* **12**: 781–789.
- Jones R, James PS, Oxley D, Coadwell J, Suzuki-Toyota F, Howes EA. 2008. The Equatorial Subsegment in Mammalian Spermatozoa Is Enriched in Tyrosine Phosphorylated Proteins. *Biology of Reproduction* **79**:421–431.
- Kelsey KM, Zigo M, Thompson WE, Kerns K, Manandhar G, Sutovsky M, Sutovsky P. 2020. Reciprocal surface expression of arylsulfatase A and ubiquitin in normal and defective mammalian spermatozoa. *Cell and Tissue Research* **379**: 561–576.
- Krishnamoorthy T, Chen X, Govin J, Cheung WL, Dorsey J, Schindler K, Winter E, Allis CD, Guacci V, Khochbin S, Fuller MT, Berger SL. 2006. Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes & Development* **20**: 2580–2592.
- Lewis B, Aitken RJ. 2001. Impact of Epididymal Maturation on the Tyrosine Phosphorylation Patterns Exhibited by Rat Spermatozoa. *Biology of Reproduction* **64**: 1545–1556.
- Lu Q, Sun QY, Breitbart H, Chen DY. 1999. Expression and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases during spermatogenesis and epididymal sperm maturation in mice. *Archives of Andrology* **43**: 55–66.
- Luno V, López-Úbeda R, García-Vázquez FA, Gil L, Matás C. 2013. Boar sperm tyrosine phosphorylation patterns in the presence of oviductal epithelial cells: in vitro, ex vivo, and in vivo models. *Reproduction* DOI: 10.1530/REP-13-0159.
- Mann M, Jensen ON. 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology* **21**: 255–261.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**: 1912–1934.
- Mustelin TM. 2007. A brief introduction to the protein phosphatase families. *Methods in molecular biology* **365**: 9–22.
- Naz RK. 1999. Involvement of Protein Serine and Threonine Phosphorylation in Human Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction* **60**: 1402–1409.
- Naz RK, Rajesh PB. 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology* DOI: 10.1186/1477-7827-2-75.
- Petrunkina AM, Friedrich J, Drommer W, Bicker G, Waberski D, Topfer-Petersen E. 2001. Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca²⁺ concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. *Reproduction* **122**: 469–480.
- Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Society of Reproduction and Fertility supplement* **65**: 245–260.

- Signorelli J, Diaz ES, Morales P. 2012. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell and tissue research* **349**: 765–782.
- Silveira JC, Ávila ACFCM, Garrett HL, Bruemmer JE, Winger QA, Bouma GJ. 2018. Cell-secreted vesicles containing microRNAs as regulators of gamete maturation. *Journal of Endocrinology* DOI: 10.1530/JOE-17-0200.
- Somanath PR, Jack SL, Vijayaraghavan S. 2004. Changes in Sperm Glycogen Synthase Kinase-3 Serine Phosphorylation and Activity Accompany Motility Initiation and Stimulation. *Journal of Andrology* **25**: 605–617.
- Suarez SS, Ho HC. 2003. Hyperactivated Motility in Sperm. *Reproduction in Domestic Animals* **38**: 119–124.
- Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE, Schatten G. 2001. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *Journal of Cell Science* **114**: 1665–1675.
- Talbot P, Summers RG, Hylander BL, Keough EM, Franklin LE. 1976. The role of calcium in the acrosome reaction: An analysis using ionophore A23187. *Reproductive Biology* **198**: 383–392.
- Teijeiro JM, Marini PE. 2012. The effect of oviductal deleted in malignant brain tumor 1 over porcine sperm is mediated by a signal transduction pathway that involves pro-AKAP4 phosphorylation. *Reproduction* **143**: 773–785.
- Tumova L, Zigo M, Sutovsky P, Sedmikova M, Postlerova P. 2021. Ligands and Receptors Involved in the Sperm-Zona Pellucida Interactions in Mammals. *Cells* DOI: <https://doi.org/cells10010133>.
- Urner F, Leppens-Luisier G, Sakkas D. 2001. Protein Tyrosine Phosphorylation in Sperm During Gamete Interaction in the Mouse: The Influence of Glucose. *Biology of Reproduction* **64**: 1350–1357.
- Urner F, Sakkas D. 2003. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction* **125**: 17–26.
- Visconti PE. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *PNAS* **106**: 667–668.
- Wassarman PM. 1999. Mammalian Fertilization: Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis, and Fusion. *Cell* **96**: 175–183
- White D, Weerachayanukul W, Gadella B, Kamolvarin N, Attar M, Tanphaichitr N. 2000. Role of Sperm Sulfogalactosylglycerolipid in Mouse Sperm-Zona Pellucida Binding. *Biology of Reproduction* **63**:147–155.
- Witze ES, Old WM, Resing KA, Ahn NG. 2007. Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nature methods* **4**: 798–806.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. Knobil, E & Neill, JD, pp. 189–317. New York: Raven Press.

- Yi YJ, Zimmerman SW, Manandhar G, Odhiambo JF, Kennedy C, Jonáková V, Maňásková-Postlerová P, Sutovsky M, Park CS, Sutovsky P. 2012. Ubiquitin-activating enzyme (UBA1) is required for sperm capacitation, acrosomal exocytosis and sperm–egg coat penetration during porcine fertilization. *International Journal of Andrology* **35**: 196–210.
- Zigo M, Maňásková-Postlerová P, Zuidema D, Kerns K, Jonáková V, Tůmová L, Bubeníčková F, Sutovsky P. 2020. Porcine model for the study of sperm capacitation, fertilization and male fertility. *Cell and Tissue Research* **380**: 237–26

