

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Míra ubiquitinace proteinů kančích spermíí během
post-testikulární maturace**

Diplomová práce

Bc. Jitka Kudláčková

Reprodukční biotechnologie

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

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Míra ubiquitinace proteinů kančích spermií během post-testikulární 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 neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 23. 7. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za pomoc při sestavování celé diplomové práce, za odbornou pomoc v praktické části, i za velkou podporu v průběhu celého procesu tvorby diplomové práce. Také bych ráda poděkovala MVDr. Romaně Krejčířové a Ing. Kateřině Havlíkové za ochotu a pomoc s praktickou částí v laboratoři. Velké poděkování patří i mé rodině a blízkým přátelům, kteří mi byli po celou dobu studia velkou oporou.

Míra ubiquitinace proteinů kančích spermii během post-testikulární maturace

Souhrn

V průběhu post-testikulární maturace dochází k různým změnám na povrchu spermií i ve vnitřní stavbě buňky. Spermatická buňka získává řadu nových proteinů během maturace v epididymis a následně ze semenné plasmy, ale také některé proteiny ztrácí především v průběhu kapacitace. Za pomoci ubiquitin-proteazomového systému jsou z buňky odstraňovány proteiny, které spermatická buňka již nepotřebuje. K tomu, aby byl nepotřebný protein rozpoznán, musí být ubiquitinován, tj. musí se na protein navázat polyubiquitinový řetězec o čtyřech molekulách ubiquitinu. Cílem práce bylo zjistit, zda se míra ubiquitinace proteinů kančích spermii mění v průběhu epididymální maturace a v průběhu *in vitro* kapacitace a v kterých částech spermatické buňky ke změnám dochází. Další část práce byla zaměřena na lokalizaci proteazomu ve spermii. Pro detekci ubiquitinovaných proteinů byly použity spermiie z caput a cauda epididymis, ejakulované spermiie a izolované povrchové proteiny spermii kapacitovaných *in vitro*. Pro lokalizaci ubiquitinovaných proteinů byly použity subcelulární frakce spermii z cauda epididymis a subcelulární frakce z ejakulovaných spermii. Lokalizace proteazomu byla provedena na vzorcích epididymálních a ejakulovaných spermii. Na veškerých vzorcích byla provedena imunodetekce mono-/polyubiquitinovaných proteinů separovaných pomocí SDS elektroforézy. Výsledky byly zpracovány denzitometrickou analýzou, která ukázala nárůst ubiquitinace mezi spermii z caput a cauda epididymis. Naopak u kapacitovaných spermii se prokázalo snížení ubiquitinace v závislosti na délce kapacitace. K ubiquitinaci proteinů docházelo především v cytosolické a v cytoskeletální frakci spermii. Pravděpodobně se jednalo o ubiquitinaci cytoskeletálních proteinů jako například tubulinu, aktinu či spektrinu. Ubiquitinace byla prokázána i v membránové frakci, což nejspíše souvisí s degradací povrchových proteinů. Podjednotky proteazomu byly detekovány převážně v cytosolické frakci spermii. Naše výsledky ukazují, že ke změnám míry ubiquitinace proteinů v průběhu post-testikulární maturace spermii dochází, přičemž ubiquitinované proteiny byly nalezeny ve všech částech spermatické buňky.

Klíčová slova: ubiquitin, proteazom, kančí spermiie, epididymální maturace, kapacitace

Ubiquitination rate of boar sperm proteins during post-testicular maturation

Summary

Several changes on the sperm surface and in the inside structure of the cell occur during the post-testicular maturation. The sperm cell gains several new proteins during the epididymal maturation and subsequently from the semen plasma but also loses some proteins during the capacitation process. The proteins which the sperm cell does not need anymore, are removed from the cell by the ubiquitin-proteasome system. For the unneeded protein to be identified, it must be ubiquitinated, which means that the polyubiquitin chain from four molecule ubiquitin has to bind to the protein. The aim of this thesis was to find out, if the rate of ubiquitination of the boar sperm proteins changes during the epididymal maturation and during the *in vitro* capacitation, and in which part of the sperm cell the changes occur. The next part of the thesis was focused on the localization of the proteasome in the sperm cell. For the ubiquitinated proteins detection the sperms from the caput and cauda epididymis, ejaculated sperms and isolated surface *in vitro* capacitated sperm proteins were used. For the ubiquitinated proteins localization the subcellular fractions of the cauda epididymis sperms and the subcellular fraction of the ejaculated sperms were used. The localization of the proteasome was done on the samples of the epididymal and ejaculated sperms. On all the samples the immunodetection of the mono-/polyubiquitinated proteins separated by the SDS electrophoresis was done. The results were evaluated by the densitometric analysis which showed the increase of the ubiquitination depending on the length of the capacitation. The ubiquitination of the proteins occurred mostly in the cytosolic and cytoskeletal sperm fraction. Probably it was the ubiquitination of the cytoskeletal proteins, such as tubulin, actin or spectrin. Ubiquitination was proved in the membrane fraction as well, which most probably relates to the surface protein degradation. The subunits of the proteasome were detected mostly in the cytosolic sperm fraction. Our results show that the level of the protein ubiquitination changes occur during the post-testicular sperm maturation and that the ubiquitinated proteins were found in all parts of the sperm cell.

Keywords: ubiquitin, proteasome, boar spermatozoa, epididymal maturation, capacitation

Obsah

1 Úvod	1
2 Hypotéza a cíl práce.....	2
3 Literární rešerše.....	3
3.1 Morfologie spermie	3
3.1.1 Hlavička spermie	3
3.1.2 Bičík spermie	4
3.2 Spermatogeneze.....	5
3.2.1 Spermatocytogeneze	5
3.2.2 Spermiohistogeneze	6
3.3 Proteiny spermií	7
3.4 Ubiquitin-proteazomový systém (UPS).....	10
3.4.1 Proteazom 26S	10
3.4.1.1 20S proteazom.....	11
3.4.1.2 19S proteazom.....	11
3.4.2 Degradace proteinů pomocí ubiquitin-proteazomového systému UPS	13
3.4.3 Inhibice 26S proteazomu	14
3.5 Post-testikulární maturace spermií a role proteazomu	14
3.5.1 Epididymální maturace	14
3.5.2 Kapacitace.....	18
3.5.3 Akrozomální reakce.....	21
4 Metodika	24
4.1 Materiál.....	24
4.2 Metodika	24
4.2.1 Příprava vzorků spermií.....	24
4.2.1.1 Subcelulární frakcionace buněk	24
4.2.1.2 Precipitace pomocí acetonu.....	25
4.2.1.3 Kapacitace spermií <i>in vitro</i>	27
4.2.1.4 Izolace povrchových proteinů spermií	28
4.2.2 Vyhodnocení vzorků.....	29

4.2.2.1	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	29
4.2.2.2	Western blot.....	30
4.2.2.3	Imonudetekce	31
4.2.2.4	Nepřímá imunofluorescence.....	32
5	Výsledky	34
5.1	Sledování míry ubiquitinace proteinů	34
5.1.1	Detekce ubiquitinovaných proteinů v epididymálních spermích	34
5.1.2	Detekce ubiquitinovaných proteinů ejakulovaných spermí.....	38
5.1.3	Sledování míry ubiquitinace povrchových proteinů u kapacitovaných spermí 42	
5.1.4	Detekce proteazomu v epididymálních a ejakulovaných spermích.....	44
6	Diskuze	47
7	Závěr.....	51
8	Literatura.....	52

1 Úvod

Samčí gameta neboli spermie má za úkol oplodnit samičí pohlavní buňky a tím předat genetickou informaci novému jedinci. Vývoj spermie začíná ve varleti. Po morfologické výstavbě ve varleti musí spermie dále projít řadou složitých fyziologických a biochemických změn. Veškeré změny se odehrávají při post-testikulární maturaci, do níž mohou být zařazeny děje uskutečněné během průchodu nadvarletem a procesy spojené s kapacitací v samičím pohlavním traktu. Pokud všechny změny na spermii proběhnou správným způsobem a ve správný čas, spermie je schopna oplodnit oocyt, a tím předat otcovskou genetickou informaci.

Zásadní změny, které probíhají během post-testikulární maturace, jsou především v proteinovém složení spermii. Dochází ke změnám ve struktuře proteinů, některé proteiny jsou degradovány, některé jsou navázány na povrch spermie a některé jsou do buňky přímo vnořeny pomocí epididymosomů. Proteinové složení se mění jak uvnitř, tak i na povrchu spermii. Změny v proteinovém složení mohou být regulovány ubiquitin-proteazomovým systémem.

Ubiquitin-proteazomový systém (UPS) je složitý komplex, který je zapojen do četných procesů v organismu. Důležitou roli hraje především v regulaci proteinového složení buněk. Za pomoci proteinu ubiquitin jsou označeny defektní či nepotřebné proteiny, které mají být degradovány. Takto označené proteiny jsou následně rozpoznány proteazomem 26S, který je svou činností schopen označený protein zlikvidovat.

První izolace proteazomu byla provedena již v roce 1968 a od té doby byla provedena řada experimentů, které se zabývaly jeho funkcí. Průlomovým okamžikem, za který byla udělena i Nobelova cena za chemii v roce 2004, byl objev UPS a výzkum objasňující jeho funkci. Objevení UPS rozšířilo možnosti dalších studií, díky kterým bylo například prokázáno, že je UPS důležitý pro správný průběh post-testikulární maturace spermii. Mezi nejdůležitější změny spermii, které jsou zprostředkované pomocí ubiquitin-proteazomového systému, se dá zařadit například výměna histonů v DNA za protaminy, remodelace akrozomu či odstranění spermadhezinů z povrchu spermii.

Pro kompletní pochopení změn proteinového složení spermii během post-testikulární maturace je dobré vědět, v jakém kroku je UPS do maturace zapojen více a kdy méně. Podle této informace se následně dají určit například kritické momenty maturace, které musí proběhnout, aby byla spermie plně kompetentní k fertilizaci oocytu. UPS má svoje využití i v moment oplození a při vývoji zárodku.

2 Hypotéza a cíl práce

Cíl práce vychází z hypotézy, že míra ubiquitinovaných proteinů spermií se bude měnit během jejich epididymální maturace a během kapacitace *in vitro*. Pomocí cílené izolace proteinů z jednotlivých částí spermatické buňky bude sledována přesná lokalizace ubiquitinovaných proteinů v kančích spermích a míra jejich ubiquitinace během epididymální maturace a kapacitace *in vitro*.

3 Literární rešerše

3.1 Morfologie spermie

Spermie je samčí gameta. Oproti somatické buňce je to vysoce diferencovaná a složitá buňka. Obsahuje jednu sadu chromozomů, je tedy haploidní. Hlavním úkolem spermie je předat parentální DNA budoucímu potomkovi. Nedílnou součástí tohoto úkolu je také přenos potřebných proteinů ke správnému procesu oplození a RNA (Toshimori 2009; Champroux et al. 2016). Samotná spermie se rozděluje na dvě části, je to hlavička a bičík.

3.1.1 Hlavička spermie

Hlavička spermie se u různých druhů zvířat může značně lišit. U hospodářských zvířat má spermie u většiny druhů zploštělý oválný tvar. Liší se do jisté míry i velikostí. Jsou známy značně rozdílné tvary, například hlavička potkaních spermií má tvar háčku (Toshimori 2009).

Hlavička spermie obsahuje dvě hlavní části, a to jádro a akrozom. Meziprostor je poté vyplněn malým množstvím cytoplazmy a perinukleární thékou. Celá hlavička je obalena plazmatickou membránou (Sutovsky & Manandhar 2006).

Plazmatická membrána hlavičky spermie se dá rozdělit do dvou oblastí. Těmi jsou akrozomální segment a postakrozomální segment. Akrozomální segment je na proximální straně hlavičky a obsahuje apikální neboli přední část a ekvatoriální segment. Ekvatoriální segment napomáhá při samotné fúzi membrán spermie a oocytu. Postakrozomální oblast je vymezena od ekvatoriálního segmentu až po krček spermie (Sutovsky & Manandhar 2006; Toshimori 2009).

Jádro spermie obsahuje parentální DNA v podobě extrémně kondenzovaného chromatinu, nukleových proteinů, histonů a protaminů (Toshimori 2009). Celé jádro je obaleno dvojitou jadernou membránou (Sutovsky & Manandhar 2006).

Druhou důležitou součástí hlavičky tvoří akrozom, který pokrývá proximální část hlavičky spermie. Má tvar podobný čepičce. Je to vysoce specializovaný lysosom přetvořený z Golgiho aparátu (Olson et al. 2002; Sutovsky & Manandhar 2006). Akrozom je tvořený vnitřní akrozomální membránou a vnější akrozomální membránou. Uvnitř akrozomu se nachází hustá akrozomální matrix, která obsahuje různé hydrolytické enzymy (proteázy a glykozidázy) pro štěpení *zona pellucida* (ZP) oocytu (Toshimori 1998; Sutovsky & Manandhar 2006; Pesch & Bergmann 2006). V případě, že dojde k vazbě spermie na oocyt, dochází k fúzi vnější akrozomální membrány a plazmatické membrány spermie a obsah matrix se uvolní. Vnitřní akrozomální membrána zůstává po oplození nenarušená (Sutovsky & Manandhar 2006; Toshimori & Eddy 2015).

Další komponentou hlavičky je perinukleární théka, což je tuhá obálka tvořená převážně strukturálními proteiny, které jsou mezi sebou stabilizovány disulfidickou vazbou. Její funkce spočívá především v ochraně jádra. Perinukleární théku lze rozdělit do tří částí, které přiléhají na tři hlavní segmenty hlavičky. První z nich je subakrozomální vrstva. Tato vrstva se nachází pod akrozomem. Nasedá na vnitřní akrozomální membránu a splývá s ní. Slouží k ukotvení

akrozomu, zároveň stabilizuje receptory, které se nacházejí ve vnitřní akrozomální membráně. Zmíněné receptory napomáhají sekundární vazbě hlavičky spermie na plazmatickou membránu oocyty po akrozomální exocytóze (Sutovsky & Manandhar 2006; Zimmerman & Sutovsky 2009). Třetí částí je postakrozomální část. V této části je uložen komplex signálních proteinů tzv. SOAF (sperm-borne oocyte-activating factor). Po fúzi spermie s oolemou dojde k uvolnění některých molekul z komplexu SOAF, které se rozptýlí a spustí signální dráhu, která provede aktivaci oocyty. Tímto se zabrání prostupu další spermie a zabrání se polyspermii. Ostatní molekuly z komplexu zůstanou u jádra a vytvoří samčí prvojádru (Sutovsky & Manandhar 2006).

3.1.2 Bičík spermie

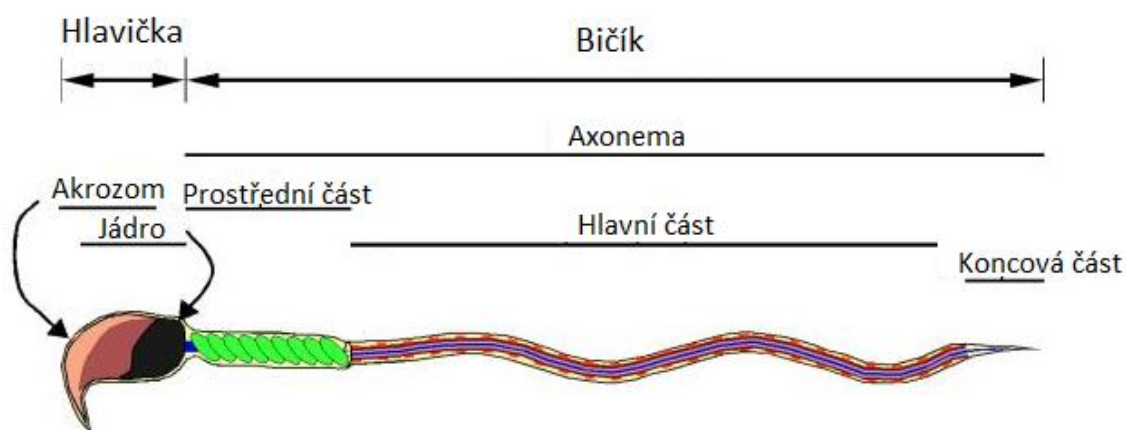
Bičík je velice důležitou součástí spermie. Zajišťuje spermii pohyblivost, energii a sílu. Pohyblivost je zajištěna díky jedinečnému uspořádání mikrotubulů. Celým bičíkem probíhá axonema neboli osová vlákno, které slouží jako základ. Axonema je složena z jednoho centrálního dubletu mikrotubulů a po celé svojí délce je obklopena dalšími devíti mikrotubulárními páry. Mikrotubulární páry jsou složeny z rovných segmentovaných sloupců, které jsou propojené rameny. Dublety jsou uspořádány do kruhu kolem 2 centrálních mikrotubulů, s kterými jsou spojeny pomocí radiálních paprsků (Toshimori & Ito 2003; Pesch & Bergmann 2006; Toshimori & Eddy 2015; Lehti & Sironen 2017). Celý bičík je stejně jako hlavička pokryta plazmatickou membránou (Lehti & Sironen 2017).

Bičík spermie se dá rozdělit do 4 částí. První z nich je spojovací část. Nasedá přímo na hlavičku, s kterou je spojena v implantační jamce a pokračuje až ke střední části. (Toshimori & Ito 2003; Sutovsky & Manandhar 2006; Ounjai et al. 2012; Lehti & Sironen 2017).

Na spojovací část přímo nasedá střední část. Složení střední části je stejné jako u předchozí části s tím rozdílem, že je pokryta mitochondriální pochvou. Pochva obsahuje 75 - 100 mitochondrií, které jsou uspořádány do spirály. Úkolem mitochondrií je zajišťovat dostatečné množství energie pro bičík. Zároveň s sebou mitochondrie nesou otcovskou mitochondriální DNA, která je však po fúzi likvidována v oocyty (Sutovsky & Manandhar 2006).

Mezi prostřední částí a hlavní částí se nachází Jensenův prstenec, který tyto dvě části odděluje. Strukturu hlavní části opět tvoří axonema. Hlavní část disponuje navíc ochranným pláštěm, který se nazývá fibrózní pochva. Je složena ze dvou podélných sloupců, které jsou uloženy rovnoběžně s vnějšími hustými vlákny (Afzelius 1959; Sutovsky & Manandhar 2006; Lehti & Sironen 2017).

Poslední částí bičíku je koncová část. Základ stále tvoří axonema, ale už bez vnějších hustých vláken. Axonema je obalena pouze vláknitým pláštěm (Lehti & Sironen; 2017). Schéma spermie a jejího rozdělení je ukázáno na obrázku 1.



Obrázek 1. Schéma myší spermie. Průvodce strukturami: mitochondrie (zelené), axonema (modrá), vnější hustá vlákna (fialová), cytoplazma (žlutá) (upraveno z Buffone et al. 2012).

3.2 Spermatogeneze

Spermatogeneze zahrnuje celý proces tvorby spermie. Popisuje kompletní transformaci spermatogoniálních kmenových buněk na samotné spermie. Proces se odehrává ve varleti v semenotvorných kanálcích za podpory Sertoliho buněk (Tulsiani & Abou-Haila 2012). Spermatogeneze je ovlivněna řadou faktorů, mezi ně patří hlavně endokrinní a parakrinní mechanismy (Kretser et al. 1998). Obecně lze rozdělit spermatogenezi na dvě fáze. První z nich je spermatocytogeneze, při které dochází k namnožení buněk, které pak podstupují řadu změn a dochází k redukci počtu chromozomů z diploidního typu buněk na haploidní. V druhé fázi, která se nazývá spermatohistogeneze (také jako spermiogeneze), podstupuje buňka řadu transformačních událostí zahrnujících mnoho morfologických změn (Phillips et al. 2010; Berndtson 2014). Po dokončení spermatogeneze se nezralé spermie uvolní do lumen semenotvorných kanálků a odchází vývodními kanálky do nadvarlete, kde podstupují zrání (Roosen-Runge 1977; Sakkas et al. 1999; Berndtson 2014; Li et al. 2016).

3.2.1 Spermatocytogeneze

Na počátku celého procesu stojí spermatogoniální kmenové buňky. Kmenové buňky migrují během fetálního vývoje do varlat. Zde zůstávají v bazální části semenotvorných kanálků a jsou v kontaktu s bazální membránou kanálků (Roosen-Runge 1977; Kretser et al. 1998; Hofmann 2008). Jedná se o nediferencované buňky. Při jejich dělení mohou nastat dvě situace. První z nich je situace, kdy dělení slouží pouze k jejich vlastní obnově a buňky zůstávají v bazální části. V druhém případě z kmenové buňky vznikají 2 spermatogonie (Hofmann 2008; Fayomi & Orwig 2018). Další průběh spermatocytogeneze rozdělil Kretser et al. (1998) do tří fází: (i) namnožení a proliferace spermatogonií a diferenciace na primární spermatocyty, (ii) diferenciace primárních spermatocytů na sekundární spermatocyty během prvního meiotického

dělení a (iii) fáze, při níž vznikají ze sekundárních spermatocytů v průběhu druhého meiotického dělení haploidní spermatidy.

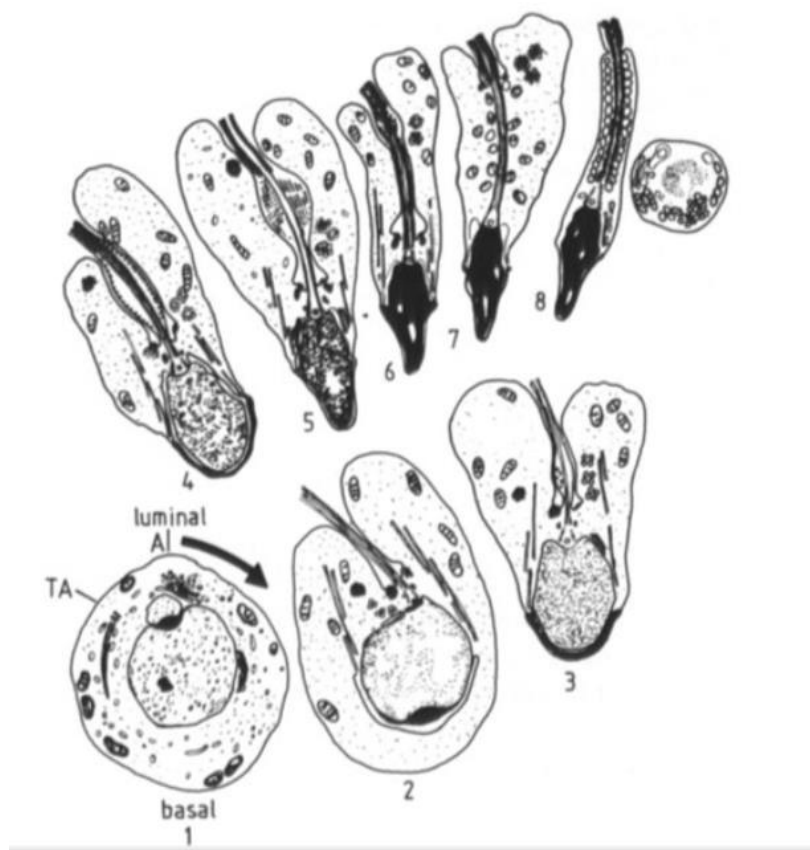
V první fázi hrají hlavní roli spermatogonie, což jsou primitivní diploidní buňky, které jsou lokalizovány při bazální membráně semenotvorných kanálků. Jejich činnost spočívá v jejich namnožení a diferenciaci v různé typy spermatogonií. Byly popsány celkem 3 typy spermatogonií, a to A typ, intermediální typ a B typ. Typ A je nejméně diferencovaná spermatogonie. Pomocí mitózy se diferencuje ještě na další podtypy A1, A2, A3, A4. Z posledního typu (A4) vzniká intermediální typ. Z něho se vytváří typ B. Ze spermatogonií typu B následně vzniká další typ zárodečné buňky, a tím je spermatocyt (Kretser et al. 1998; Sutovsky & Manandhar 2006; Hofmann 2008; Phillips et al. 2010; Berndtson 2014; Fayomi & Orwig 2018).

Spermatocyty jsou již více diferencované zárodečné buňky. Oproti spermatogoniím spermatocyty nepodstupují mitózu, ale účastní se meiózy. Existují dva typy spermatocytů, a těmi jsou primární a sekundární spermatocyty. Primární spermatocyty jsou připravené pro replikaci DNA. Jsou diploidní a v jádru obsahují 2 chromozomy, které jsou tvořeny dvojicí totožných chromatid. Při prvním meiotickém dělení vznikají z primárního spermatocytu dvě buňky sekundárních spermatocytů. Sekundární spermatocyt již obsahuje jen jeden chromozom tvořený dvěma chromatidami. Sekundární spermatocyt podstupuje druhé meiotické dělení a stává se z něho spermatida, která je haploidní a obsahuje jeden chromozom s jednou chromatidou. Z jednoho primárního spermatocytu tedy vznikají 4 haploidní spermatidy. Spermatida se již dále nedělí, ale podstupuje mnoho transformačních dějů (Sutovsky & Manandhar 2006; Hofmann 2008; Phillips et al. 2010; Tulsiani & Abou-Haila 2012; Berndtson 2014; Champroux et al. 2016; Fayomi & Orwig 2018).

3.2.2 Spermiohistogeneze

Spermiohistogeneze neboli spermiogeneze je souhrnné označení pro morfologické, chemické a biochemické změny, které podstupuje spermatida. Je to dozrávající proces buňky, který se uskutečňuje v blízkosti lumen semenotvorných kanálků (Guraya 1987; Berndtson 2014). Nejdůležitějšími událostmi, ke kterým dochází v průběhu spermiogeneze, jsou jaderná kondenzace a posun jádra na kraj buňky, vytvoření akrozomu, který přilne k proximální části buňky. Dále je to formace bičíku, ve kterém se vytváří jádra mikrotubulů a axonema, a v neposlední řadě je spermatida zbavena přebytečné cytoplazmy, která se uvolní z buňky a je pohlcena okolními Sertoliho buňkami. Všechny výše uvedené události probíhají současně. Avšak někteří autoři rozdělují spermiogenezi do 4 samostatných fází, které se nazývají (i) Golgiho stádium, (ii) stádium akrozomové čapky, (iii) stádium kaudální manžety a (iv) stádium maturace (Guraya 1987; Kretser et al. 1998; Champroux et al. 2016).

Po dokončení veškerých změn dochází k uvolnění buněk do lumen semenotvorných kanálků a v tu chvíli jsou buňky považovány za spermie. Spermie jsou dále pomocí tekutiny odplaveny vývodními kanálky do nadvarlete, kde podstupují další zrání (Berndtson 2014). Spermiohistogeneze je schematicky znázorněna na obrázku 2.



Obrázek 2. Schematický nákres lidské spermatidy při spermiogenezi. Podle vývoje akrozomu, kondenzace jádra a vývoje bičíku lze rozpoznat 8 stádií vývinu (Guraya 1987).

3.3 Proteiny spermií

Celkově Parrilla et al. (2019) identifikoval přes 2000 různých proteinů spermie. Každý protein má svůj vlastní úkol, kterým se zapojuje do procesu oplození. Proteiny regulují klíčové aspekty funkčnosti spermií, jako je obrana před oxidačním stresem, integrita plazmatické membrány, pohyblivost spermií, energetický metabolismus, kapacitace a fúze spermií s oocytem.

Povrch spermie obsahuje mnoho důležitých proteinů, které mají různou funkci. Funkce těchto proteinů spočívá především v interakcích s prostředním, ve kterém se spermie nachází, při procesech během ejakulace a při průchodu samičím reprodukčním traktem. Do této oblasti se řadí i interakce s oviduktním epitelem a interakce spermie s oocytem, což zahrnuje především průchod kumulárním komplexem oocytu, vazba a průchod ZP a vazba/fúze s oolemou oocytu (Evans 2002; Parrilla et al. 2019). Kategorizace spermatických proteinů ukazuje, že 26 % proteinů je zapojena do procesu metabolismu a produkci energie, 11 % proteinů má strukturní funkci a tím ovlivňuje pohyblivost spermie a 24 % proteinů ovlivňuje metabolismus lipidů spermie (Li et al. 2016).

Jednou z nejdůležitějších skupin povrchových proteinů kančích spermií jsou spermadheziny. Spermadheziny jsou adhezivní proteiny, které se během epididymální maturace

a ejakulace vážou na povrch spermie. Jsou to především proteiny rodiny AQN, AWN a PSP (Parrilla et al. 2019; Zigo et al. 2019a; Zigo et al. 2020). Proteiny, které se vyskytují na povrchu kančích spermií, jsou pak například proteiny AQN 1, AQN 3, AWN, PSP-I, PSP-II, pB1/DQH, Zonadhesin, APz (adhezivní protein z) sp38, p47 (lactadherin/MFGE8) a p68 (arylsulfataza A). Všechny vyčtené povrchové proteiny mají za úkol napomoci vazbě spermie na *zona pellucida* (Ensslin et al. 1998; Li et al. 2016; Zigo et al. 2020). Přičemž v review Zigo et al. (2020) byly proteiny AQN1, AWN, PSP-I, PSP-II a DQH detekovány v molekulárních velikostech v rozmezí od 11 kDa až do 17 kDa. Dalšími skupinami povrchových proteinů jsou proteiny vykazující proteinasovou inhibici.

V různých částech spermatické buňky bylo identifikováno mnoho dalších proteinů. Některé z nich jsou zapojeny v ochraně proti oxidačnímu stresu při průchodu epididymem a v situacích, kdy spermie interaguje se samičím traktem, nebo v ochraně proti poškození volnými radikály, např. protein GPX5 nebo Glutathion-S-transferáza. Důležitá činnost spermatických proteinů je i eliminace nepotřebných proteinů nebo dokonce eliminace celých vadných spermií. Tuto činnost zařizuje protein ubiquitin. Některé z výše uvedených proteinů by mohly být cíleně ubiquitinovány na defektních spermiích, aby byly nápomocné mechanismy (jako je zabránění oxidačnímu stresu) narušeny (Sutovsky et al. 2001; Sutovsky 2003; Sullivan et al. 2007; Li et al. 2016). Přehled vybraných proteinů kančích spermií je uveden v tabulce 1. Proteiny, které jsou zapojeny do ubiquitinace, jsou popsány dále v následující kapitole.

Dalšími podstatnými proteiny jsou například akrosin, mitochondriální proteiny a cytoskeletální proteiny. Kromě proteinů, které jsou lokalizovány v hlavičce spermie, obsahuje gameta i velké množství proteinu v bičíku, tubulinu, který se podílí na jeho struktuře (Li et al. 2016).

Většina proteinů, které spermie získává až při post-testikulární maturaci, je navázána z prostředí, ve kterém se spermie zrovna nachází. Biosyntéza nových proteinů ve spermií je značně omezena (Dacheux et al. 1989). Proteiny rodin AQN, AWN a PSP jsou například vylučovány hlavně semennými vajíčky, ale také prostatou a epididymis (Töpfer-Peterson et al. 1998).

Tabulka 1. Přehled vybraných proteinů vyskytujících se ve spermiích kance a jejich role (Dacheux et al. 2005; Inoue 2005; Dacheux et al. 2012; Zigo et al. 2013; Li et al. 2016; Gervasi & Visconti 2016; Kerns et al. 2016; Zigo et al. 2019a; Zigo et al. 2019b; Zigo et al. 2020).

Protein	Funkce
rodina ADAM	Tvorba oviduktálního rezervoáru
MFGE8	Tvorba oviduktálního rezervoáru, vazba spermie na ZP
AQN1, AQN3	Vazba spermií na epitelové buňky oviduktu, primární vazba spermie na ZP
AWN	Vazba spermií na epitelové buňky oviduktu, primární vazba spermie na ZP
PSP-I, PSP-II	Vazba spermií na epitelové buňky oviduktu, stimulace imunitní odpovědi dělohy
GPX5	Obrana proti oxidačnímu stresu
Glutathion-S-transferáza	Obrana proti oxidačnímu stresu
IZUMO1	Fúze plazmatických membrán gamet
Laktoferrin	Transport železa, nespecifický imunitní systém – antibakteriální, antimykotické, antivirové a protizánětlivé aktivity
HE 2, HE 4	Antimikrobiální účinky
HE1	Vazba cholesterolu
Clusterin	Ochrana buňky
SPINK2	Inhibitor akrosinu
Sp32 (ACRBP)	Součástí akrozomální matrix, vazba akrosinu
Tubulín	Cytoskeletální protein

3.4 Ubiquitin-proteazomový systém (UPS)

Ubiquitin-proteazomový systém je komplex jednotlivých částí, které se podílí na mnohých procesech v organismu. Svou činností se například zapojuje do regulace buněčného cyklu, kontroly nově syntetizovaných proteinů či regulace genové exprese. V současné době je již potvrzeno, že se také podílí na procesu oplození (Matějíková 2013; Kerns et al. 2016; Saez & Sullivan 2016; Zigo et al. 2019b).

Součástí UPS je ubiquitin, což je protein, který je složený ze 76 aminokyselin. Ubiquitin s hmotností 8,5 kDa je chaperonový protein, který se kovalentně váže na e-aminoskupinu svého substrátu na zbytcích lysinu daného substrátu, aby označil defektní nebo nepotřebné proteiny pro proteolytickou degradaci proteazomem 26S. Pokud se tedy ubiquitin naváže na protein, označí ho tím a tím dává signál 26S proteazomu, že má být daný protein degradován (Zwickl et al. 1999; Sutovsky et al. 2001; Sutovsky 2003; Baska et al. 2008; Zigo et al. 2019b).

K ubiquitinaci je zapotřebí tři druhů enzymů E1, E2 a E3. Prvním krokem procesu je aktivace ubiquitinu pomocí enzymu E1 (Yi et al. 2012; Matějíková et al. 2013; Sutovsky 2018; Zigo et al. 2019b). Tento enzym musí projít nejprve fosforylací, aby se stal aktivním. Potom je enzym postupně uvolňován a nahrazován enzymem E2. Ve chvíli, kdy je enzym E2 navázán na ubiquitin, začíná vyhledávat proteinový substrát, který má být ubiquitinován. Když ho vyhledá, naváže se ubiquitin na proteinový substrát za pomoci ubiquitin ligázy E3 (Sutovsky 2011; 2018). První molekula ubiquitinu se naváže na lyzinový zbytek proteinového substrátu a vznikne tím izopeptidová vazba. Další molekuly ubiquitinu, které vytvoří následně multi-ubiquitinový řetězec, tandemově navazují na první molekulu. Aby mohl být ubiquitinovaný substrát rozpoznán 26S proteazomem, musejí být v ubiquitinovém řetězci navázány alespoň 4 molekuly ubiquitinu (Yi et al. 2012).

3.4.1 Proteazom 26S

Proteazom 26S je vícejednotková proteáza, která má za úkol degradovat v organismu nepotřebné proteiny (Zimmerman & Sutovsky 2009). Tento intracelulární komplex se nachází u prokaryot i eukaryot. Liší se však svým složením (Matějíková et al. 2013). Informace uvedené níže se vztahují k eukaryotnímu 26S proteazomu.

Proteazom je v buňce hojně umístěn v cytosolu a v jádře. Největší koncentrace proteazomu se objevuje hlavně u buněk, které vykazují vysokou aktivitu (Zwickl et al. 1999; Matějíková et al. 2013). O umístění proteazomu ve spermatické buňce je zatím pouze omezené množství informací. Mnohé studie zatím potvrdily, že se proteazom nachází v akrozomu a na povrchu savčích spermií v oblasti akrozomu (Zimmerman & Sutovsky 2009). Proteazom se nachází na vnitřní a vnější akrozomální membráně, a je tudíž schopný přímo interagovat se *zona pellucida* oocyty při procesu oplození (Sutovsky 2011).

26S proteazom je komplex, který se dá rozdělit do dvou částí. První z nich je 20S proteazom, kde probíhá hlavní proteolýza. Druhá část se nazývá 19S proteazom a plní funkci regulační partikule (Zimmerman & Sutovsky 2009). Celý proces proteolýzy začíná na 19S proteazomu, kam se naváže ubiquitinovaný protein. V regulační partikuli se ubiquitinový řetězec odštěpí a holý protein přechází do druhé části 20S proteazomu. Zde dochází

k proteolýze pomocí různých podjednotek proteazomu (Matějíková et al. 2013). Schéma stavby 26S proteazomu je ukázáno na obrázku 3.

3.4.1.1 20S proteazom

20S proteazom je tvořen dvěma typy prstenců. Vnitřek proteazomu tvoří dva beta prstence. Prostřední část ohraničují po obou stranách alfa prstence (Zimmerman & Sutovsky 2009). Dohromady tedy 20S proteazom tvoří čtyři prstence, které utváří sudovitý tvar proteazomu. Duté jádro proteazomu je pak vhodné místo pro proteolýzu proteinů (Sutovsky 2011).

Alfa prstence

Každý alfa prsteneček se skládá ze sedmi podjednotek α 1-7. Prstence alfa regulují vstup proteinů, které jsou určeny k degradaci, do beta prstenců (Zimmerman & Sutovsky 2009). Pokud alfa podjednotky rozpoznají ubiquitínovaný protein neboli proteinový substrát, dojde ke konformační změně v jejich struktuře, při které se odstraní blokáda vstupní brány N-konci aminokyselinových zbytků alfa podjednotek (Matějíková et al. 2013). Alfa podjednotky zároveň beta prstence stabilizují. Z vnější strany jsou prstence přímo navázané k 19S proteazomu (Zimmerman & Sutovsky 2009).

Beta prstence

Vnitřní beta prstence jsou také tvořeny ze sedmi podjednotek β 1-7. Důležité jsou především tři podjednotky, a to β 1, β 2 a β 5 (Zimmerman & Sutovsky 2009; Sutovský 2011). Jednotlivé podjednotky mají specifické účinky. β 1 vykazuje aktivitu, která je podobná kaspázám, tedy štěpí polypeptidový řetězec za kyselou aminokyselinou. Podjednotka β 2 má trypsinové účinky a podjednotka β 5 se vyznačuje svojí aktivitou podobnou chymotrypsinu (Matějíková et al. 2013).

3.4.1.2 19S proteazom

19S proteazom formuje z jedné nebo z obou stran 20S proteazomu čepičku, která ohraničuje vchod do nitra 20S proteazomu (Yi et al. 2010). Role 19S proteazomu je především rozpoznat a navázat na sebe ubiquitínované proteiny. Proteazom rozpozná takový protein díky schopnosti identifikovat ubiquitínový řetězec (Sutovsky 2011). 19S proteazom obsahuje izopeptidázy, oxidoreduktázy a ATPázy, které napomáhají k rozpoznání a navázání proteinového substrátu (Glickman & Ciechanover 2002; Zimmerman & Sutovsky 2009). Regulační partikule je schopna regulovat množství přichozích substrátů určených k degradaci. Zabraňuje tím nekontrolovatelné a nadbytečné degradaci proteinů (Matějíková et al. 2013). 19S proteazom se skládá z jednotlivých sekcí, kterými jsou báze a víko.

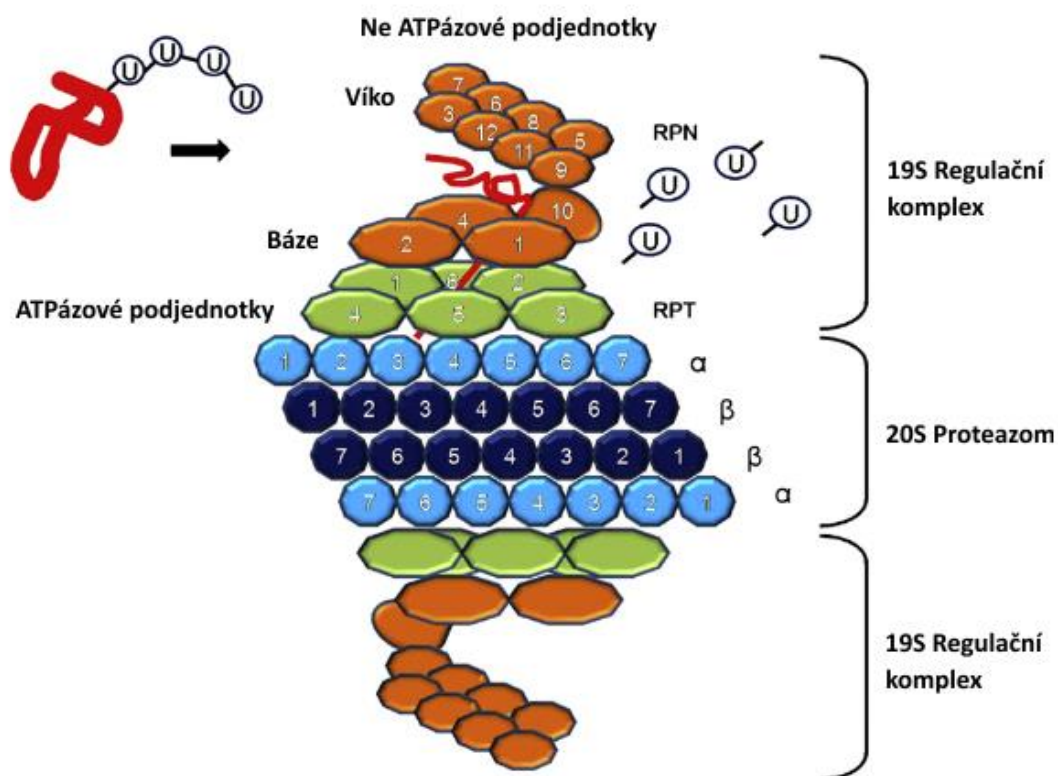
Víko

Víko je komplex, na který se váže polyubiquitínový řetězec proteinu (Matějíková et al. 2013). Tento komplex je složený z devíti ne-ATPázových podjednotek, konkrétně z Rpn3-9 (Regulatory particle non-ATPase) a Rpn11-12. Tyto podjednotky hrají důležitou roli v celém

procesu. Mohou uvolňovat ubiquitin z ubiquitovaných proteinů, který slouží pouze k označení proteinu, který se má degradovat. Proces, při kterém se odštěpí ubiquitin, se nazývá deubiquitinace. Když se z proteinu odštěpí ubiquitin, projde protein do báze, kde podstoupí další úpravy. Odštěpené molekuly ubiquitin se mohou znovu použít při dalších procesech ubiquitinace (Zimmerman & Sutovsky 2009).

Báze

Báze je vícejednotkový systém, který obsahuje ATPázové podjednotky Rpt1-6 (Regulatory particle triple-ATPase). Dále je tvořen ne-ATPázovými jednotkami Rpn1, Rpn2, Rpn10 a Rpn13. Ne-ATPázové podjednotky Rpn10 a Rpn13 mají obdobnou funkci jako ne-ATPázové podjednotky víka, tedy rozpoznat ubiquitinový řetězec na proteinu. ATPázové podjednotky se podílejí na rozbalování proteinů. Rozbalený protein bez ubiquitinového řetězce může v takové podobě pokračovat dále do jádra proteazomu a projít degradací (Zimmerman & Sutovsky 2009; Kerns et al. 2016). Báze je přímo napojená na vnější α prsteneц 20S proteazomu (Sutovsky 2011).



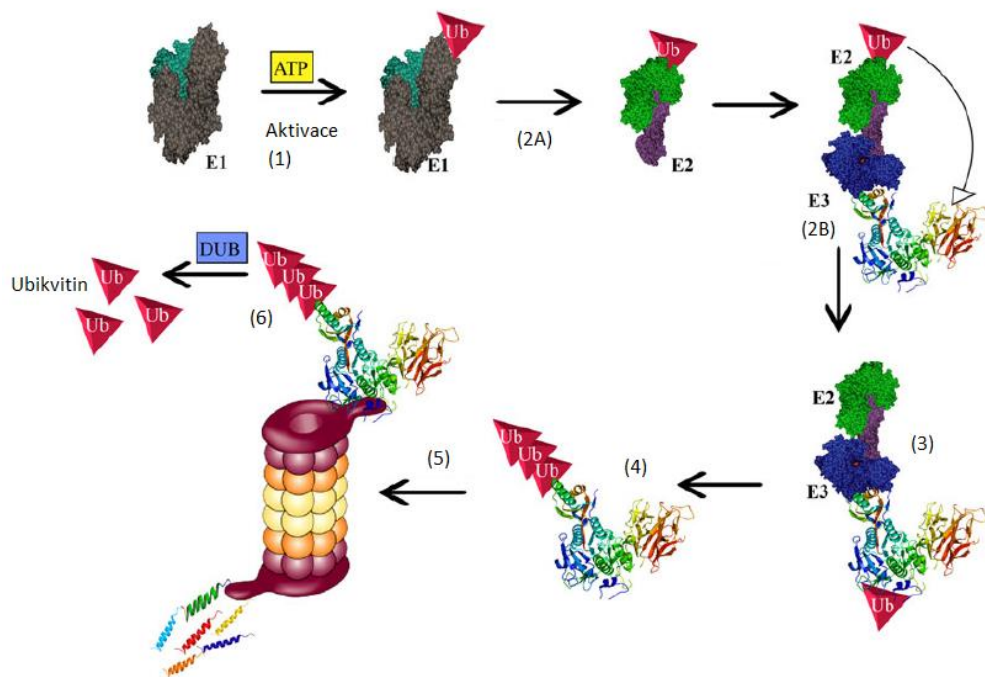
Obrázek 3. Stavba 26S proteazomu, který se skládá z 19S regulačního komplexu a 20S proteazomu. 20S proteazom obsahuje dva α a dva β prstence. Každý prsteneц je složen ze sedmi podjednotek. Na obou koncích 20S proteazomu jsou 19S regulační partikule. Tento komplex se skládá z báze, která obsahuje ATPázové podjednotky Rpn1-6 a ne-ATPázové podjednotky Rpn1-2, Rpn10 a Rpn13. Další součástí je víko, které se skládá z ne-ATPázových podjednotek Rpn 3-9 a Rpn11-12 (Převzato ze Zimmerman & Sutovsky 2009).

3.4.2 Degradace proteinů pomocí ubiquitin-proteazomového systému UPS

Pokud došlo k ubiquitinaci správnou vazbou, 19S proteazom rozpozná ubiquitinovaný proteinový substrát pomocí ubiquitinových receptorů a vpustí substrát dovnitř do komplexu. Před samotným vstupem do lumen proteazomu prochází substrát jistými úpravami, např. rozbalení do primární struktury. Tyto procesy zajišťují podjednotky Rpt1-6 (Matějíková et al. 2013).

Po vstupu se ze substrátu uvolní ubiquitinový řetězec pomocí podjednotky Rpn11. Řetězec se dostává do cytosolu, kde je štěpen na jednotlivé molekuly ubiquitinu za pomoci deubiquitinačních enzymů. Samotný vstup substrátu je pak regulován konkrétně za pomoci podjednotky Rpt2 (Matějíková et al. 2013; Sutovsky 2018).

Po vstupu substrátu do lumen 20S proteazomu je protein štěpen na krátké peptidy. Malé peptidy jsou uvolňovány z proteazomu a jsou následně degradovány cytosolickými endopeptidázami (Sutovsky 2011). Proces degradace proteinů se opakuje tak dlouho, dokud nejsou výsledné oligopeptidové produkty natolik malé, aby byly schopné difundovat z proteazomu ven. Následně jsou jednotlivé peptidy využity k výstavbě nových proteinů (Matějíková et al. 2013). Celý proces degradace pomocí UPS je schematicky ukázán na obrázku 4.



Obrázek 4. Schéma ubiquitinace a degradace proteinu pomocí 26S proteazomu. Krok 1: aktivovaný enzym E1 aktivuje samostatnou molekulu ubiquitinu. Krok 2A: E1 je nahrazen enzymem E2. Krok 2B: proteinový substrát je zachycen ubiquitin ligázou E3. Krok 3A: Ubiquitin ligáza E3 spojí dohromady proteinový substrát a molekulu ubiquitinu. Krok 4: Navázáním dalších molekul ubiquitinu vznikne polyubiquitinový řetězec. Krok 5: Ubiquitinový řetězec je rozpoznán 19S proteazomem. Krok 6: Substrátový protein je deubiquitován, rozbalen a přesunut do vnitřku 20S proteazomu. Zde je pak rozštěpán na malé peptidy, které jsou uvolněny z 20S proteazomu (Upraveno z Brohi & Huo 2017).

3.4.3 Inhibice 26S proteazomu

Protilátky, peptidy a mutantní ubiquitin (ubiquitin, který prošel nestandardní posttranslační úpravou) kompletně nebo částečně inhibují správnou funkci 26S proteazomu, a tím mají špatný dopad na oplození u savců. Mnoho látek může své účinky projevit hlavně při *in vitro* fertilizaci. Je to například mutantní ubiquitin UBB+1, který inhibuje především *in vitro* fertilizaci u prasat. Dalšími látkami mohou být protilátky, které působí hlavně na 19S proteazom, např. protilátky působící specificky na Rpn10. Naopak některé protilátky se mohou projevit i pozitivně. Příkladem jsou protilátky proti Rpn12. Svými účinky dokážou oplození naopak pomoci (Sutovsky 2011). Yi et al. (2010) potvrzuje, že inhibice podjednotky Rpn12 zvýšila rychlost vazby spermie na ZP, a tím docházelo k urychlení i akrozomové exocytózy. Ve své studii však dodává, že s inhibicí Rpn12 se zvýšila polyspermie.

Známým inhibitorem proteazomu je také MG132. Tento peptid je silným inhibitorem aktivit zprostředkovaných 20S proteazomem, především pak chymotrypsinové aktivity. Tím snižuje plodnost u savců. Tento problém bývá nejvíce spojován s *in vitro* kapacitací spermií domestikovaných prasat (Sutovsky 2011). Pokud je MG132 přidáno do kapacitačního média, které se použije pro kapacitaci kančích spermií, jsou takto kapacitované spermie neschopné penetrovat přes celistvou *zona pellucida*, a tím nejsou schopny oplození. Pokud je však *zona pellucida* odstraněna, spermie dokáže oocyt oplodnit (Sutovsky et al. 2004). Blokaci chymotrypsinové aktivity proteazomu může způsobovat také epoximicin (Kerns et al. 2016). Lactacystin je další inhibitor, který ovlivňuje enzymatické aktivity 20S proteazomu (Sutovsky 2011).

3.5 Post-testikulární maturace spermií a role proteazomu

Ve chvíli, kdy spermie projde celým procesem spermatogeneze, je vystavena četným procesům, které se souhrnně označují jako post-testikulární maturace. Spermie v průběhu maturace získá schopnost pohyblivosti a následně schopnost oplodnit oocyt. U spermie také dochází k reorganizaci její struktury. Mezi procesy, které musí spermie podstoupit, aby došlo k oplození oocytu, se řadí epididymální maturace, kapacitace a následně akrozomální reakce (Yanagimachi 1981; Caballero et al. 2011; Nixon et al. 2014; Souza et al. 2017).

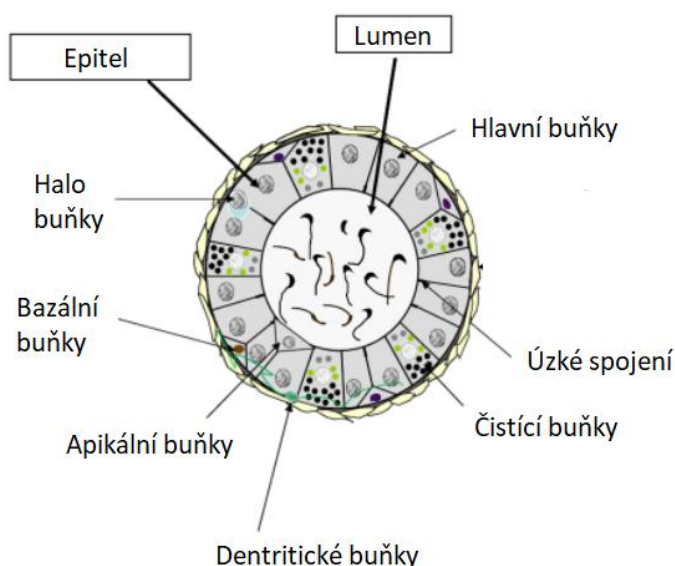
3.5.1 Epididymální maturace

Prvním zráním, které spermie musí podstoupit po dokončení morfologických změn v semenotvorných kanálcích varlete, je epididymální maturace. V průběhu epididymální maturace dochází u spermií k různým morfologickým i biochemickým změnám. Díky těmto změnám získává spermie schopnost pohybu a oplozovací schopnost. Proto je epididymální maturace nezbytná v procesu oplození. Bylo zjištěno, že epididymální maturací musí projít spermie všech savců (Yanagimachi 1981; Dacheux et al. 1989; Frenette & Sullivan 2001; Sutovsky 2003; Brewis & Gadella 2010; Krutskikh et al. 2012; Robaire & Hinton 2015; Souza et al. 2017).

Spermie savců přechází z varlete do dlouhého trubicovitého orgánu nazývaného nadvarle neboli epididymis. Spermie putuje nadvarletem po dobu 1 - 2 týdnů. V této době je spermie vystavená různým prostředím, která se postupně mění (Sutovsky 2003; Souza et al. 2017).

Různé prostředí, které se objevuje v epididymis, je zapříčiněno odlišnou strukturou jednotlivých segmentů epididymis. Celé nadvarle se dělí na čtyři části – na počáteční segment, hlavu (caput), tělo (corpus) a ocas (cauda) (Jenkins et al. 1980; Sullivan et al. 2007). Některé zdroje rozdělují epididymis na 10 regionů – eferentní kanál, proximální, střední a distální caput, proximální, střední a distální corpus, proximální a distální cauda, deferentní kanál (Dacheux et al. 2005). Každá oblast se chová odlišně a nezávisle na dalších částech epididymu (Sutovsky et al. 2001; Sullivan et al. 2007; Souza et al. 2017).

Hlavním důvodem odlišného chování různých částí epididymu je přítomnost různých typů buněk, které aktivním vylučováním a absorbcí molekul (např. glykoproteinů), mění samotné prostředí epididymu. V epididymu se nachází celkem 7 typů buněk. Prvním typem jsou apikální buňky, které se nacházejí především v proximální části epididymu. Dále jsou to hlavní buňky, čisticí buňky, makrofágy, dentrické buňky, bazální buňky a halo buňky. Struktura epitelu epididymu s buňkami je popsána na obrázku 5. Buňky jsou propojeny úzkými spoji. Každý typ buněk vytváří a reguluje jedinečné složení luminální tekutiny, která následně vytváří vhodné prostředí pro shromažďování, rané a pozdní zrání a skladování samčích gamet. Luminální tekutinou je udržována vhodná teplota, potřebné množství kyslíku, pH nebo dostatek energie. Další nezbytnou vlastností, kterou musí splňovat prostředí, je vytvářet vhodné podmínky, ve kterých jsou spermie schopné přežít. Jakékoli narušení sekrece mění prostředí, a tím je bezprostředně ovlivněna schopnost fertilizace (Frenette & Sullivan 2001; Dacheux et al. 2005; Sullivan et al. 2007; Caballero et al. 2011; Tulsiani & Abou-Haila 2012; Krutskikh et al. 2012; Souza et al. 2017).



Obrázek 5. Schematický obrázek organizace hlavních typů buněk na řezu epididymis (Upraveno z Robaire & Hinton 2015).

Složení epididymální tekutiny se postupně od počátečního segmentu až po cauda epididymis mění. Koncentrace sodíku se průchodem snižuje, naopak koncentrace draslíku se zvyšuje. Chloridové ionty postupně klesají. V corpus epididymis dochází k nárůstu hladiny iontů hořčíku a síry. Jejich navýšení právě v této části nadvarlete souvisí s faktem, že se hořčík podílí na získání pohyblivosti a schopnosti oplození. A právě v corpus epididymis samčí gamety tyto schopnosti získávají (Jenkins et al. 1980; Gatti et al. 2004).

Hlavní funkce epididymu tedy spočívají ve vývoji schopnosti oplození spermií. Dalšími důležitými úkoly jsou transport spermií, vývoj motility spermií, modifikace složení plazmatické membrány a skladování spermií (Jones 1999; Robaire & Hinton 2015).

Transport spermií spočívá pouze v přesunu spermií epididymem. V průběhu transportu nedochází k žádné resorbci spermií a bylo prokázáno, že není rozdíl v rychlosti transportu mezi jednotlivými segmenty epididymu (Robaire & Hinton 2015).

Pro to, aby mohla samčí gameta dosáhnout samičí gamety, potřebují spermie získat pohyblivost. Na počátku epididymální maturace, tedy v hlavě nadvarlete, mají spermie jen omezený pohyb, který spočívá v asymetrickém mrskání bičíku. Po přesunu gamet do těla nadvarlete již vykazují jednoznačný pohyb v podobě symetrických vln na každé straně bičíku. Pohyb stále není progresivní. Až v ocasu nadvarlete získávají spermie progresivní pohyb za hlavičkou a spermie je schopná řádného pohybu (Jenkins et al. 1980; Souza et al. 2017).

Mezi klíčové faktory, které jsou důvodem vzniku progresivního pohybu u spermií, mohou být zařazeny molekuly hydrogenuhličitanů HCO_3^- a intracelulární vápenaté ionty Ca^{2+} , u kterých se předpokládá, že řídí koncentraci intracelulárního cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Při průchodu nadvarletem se postupně hladina cAMP ve spermiích navyšuje. Společně s ním také roste produkce ATP, a to zejména při průchodu corpus epididymis až po cauda epididymis. Zároveň hodnoty intracelulárního vápníku ve spermiích klesají. Pokud by došlo k navýšení vápenatých iontů, objevila by se u spermií předčasná hyperaktivace, což je nežádoucí (Jenkins et al. 1980; Robaire & Hinton 2015; Souza et al. 2017).

Pohyb může ovlivnit i změna v pohybovém aparátu. V samotném bičíku se soustřeďuje proteozom ve střední části, kde se předpokládá, že napomáhá degradaci strukturálních proteinů v bičíku, konkrétně proteinů vnějších hustých vláken, během epididymální maturace (Mochida et al. 2000). Další jednotka proteozomu se nachází také ve spojovací části, kde hraje roli v uvolnění bičíku od hlavičky po průniku spermie do oocyty (Rawe et al. 2008; Saez & Sullivan 2016).

Další změny probíhají přímo na plazmatické membráně. Plazmatická membrána má schopnost adsorpce molekul na povrch účinkem povrchových přitažlivých sil (Yanagimachi, 1981). Aby došlo ke stabilizaci plazmatické membrány, je do ní včleněno velké množství cholesterolu, který dále hraje klíčovou roli v procesu kapacitace (Martínez & Morros 1996; Bailey 2010; Whitfield et al. 2015).

Průchodem nadvarletem postupně dochází k modifikacím i dalších proteinů (především glykoproteinů) na povrchu spermií. Do procesu se zapojují i proteolytické složky, které jsou příčinou ztráty některých proteinů, další proteiny jsou naopak získány. Za pomoci apokrinní sekrece produkují hlavní buňky nadvarlete epididymosomy, což jsou extracelulární

mikrovezikuly, které se vyznačují velmi vysokým poměrem cholesterolu, fosfolipidu a sfingomyelinu. Epididymosomy dodávají do spermií skrz luminální tekutinu miRNA a lipidy. Tím tak bezprostředně ovlivňují lipidové složení povrchu spermií (Martínez & Morros 1996; Saez et al. 2003; Tulsiani & Abou-Haila 2012; Toshimori & Eddy 2015; Souza et al. 2017). Modifikací prochází zároveň i intraakrozomální složky spermie, například β -D-galaktosidáza. Dále dochází k aktivaci enzymaticky inaktivního prekursoru proakrosin, který je lokalizován na vnitřní i vnější akrozomální membráně, ale i v matrix akrozomu, na akrosin (Tulsiani & Abou-Haila 2012).

Dále epididymosomy zásobují spermie proteiny. Proteom epididymální tekutiny čítá přes 200 proteinů. Obvykle se tyto proteiny označují jako potahové proteiny, jelikož jsou to proteiny, které se z větší části vážou na plazmatickou membránu spermie. Část z nich se však zabudovává i do subcelární vrstvy spermie prostřednictvím elektrostatických interakcí. Díky epididymosomům se v tekutině objevují různé koncentrace proteinů. Také svými interakcemi se spermiemi v lumen epididymu modifikují již stávající proteiny za pomoci posttranslačních úprav a přidavkem různých složek (Frenette & Sullivan 2001; Sutovsky et al. 2001; Saez et al. 2003; Sutovsky 2003; Dacheux et al. 2005; Sullivan et al. 2007; Gadella 2014; Whitfield et al. 2015; Souza et al. 2017).

Segmenty epididymu jsou částečně separovány. Je to z důvodu různé exprese genů. Při průchodu jednotlivými částmi spermie reagují na různost prostředí. V proximální části dochází k více modifikacím než v dalších částech. Je pravděpodobné, že důvodem je smíchání sekretů, které přicházejí z varlat, společně s luminální tekutinou epididymis (Sullivan et al. 2007; Tulsiani & Abou-Haila 2012; Parrilla et al. 2019). Koordinovaná sekrece a endocytóza buněk vedou k intenzivní změně profilu proteinů epididymální tekutiny, čímž je navozena modulace fyziologických vlastností spermií (Souza et al. 2017).

Mezi proteiny epididymu vládne velký polymorfismus, především v molekulární váze. Hlavním důvodem této heterogenity jsou posttranslační modifikace. Sekreční aktivita epididymis je nejvyšší v přední části epididymis a postupně klesá. Uvádí se, že v caput epididymis je sekretováno 83 %, v corpus ep. 16 % a v cauda ep. pouze 1 % z celkového objemu (Dacheux et al. 2005). Identifikované proteiny v luminální tekutině epididymu kance jsou například proteiny rodiny ADAM (2, 3, 7), CRISPR 1 a 4, laktoferrin, mannosidáza, prostaglandin D2 syntáza, albumin, HEX, HE1 nebo laktoferrin (Gadella 2014; Whitfield et al. 2015; Souza et al. 2017). Za další proteiny může být zmíněn také GPX5, který zabraňuje oxidačnímu stresu při průchodu epididymem. V neposlední řadě je to samozřejmě ubiquitin, který disponuje důležitou vlastností, a tím je schopnost eliminace vadných spermií. (Sutovsky et al. 2001; Sutovsky 2003; Sullivan et al. 2007).

Studie uvádějí, že ubiquitin-proteazomový systém se zapojuje do procesu epididymální maturace především při degradaci defektních spermií. Abnormální spermie jsou v průběhu maturace a skladování rozpoznávány a označovány ubiquitinem. Samotný ubiquitin je vylučován do epididymální lumen pomocí hlavních buněk epitelu. Ubiquitin se váže především na povrch spermie. Tento systém degradace defektních spermií se dá popsat jako aktivní molekulární mechanismus pro kontrolu kvality spermií. Právě to, že výskyt spermií s morfologickými defekty je nižší v proximální části než v distální části epididymu, potvrzuje

pravdivost této teorie. Likvidace abnormálních spermií tímto způsobem byla popsána u kanců, býků, hřebců, potkanů, myší i lidí (Sutovsky et al. 2001; Sutovsky 2003; Baska et al. 2008). Studie Sutovského (2001) prokázala, že ubiquitonované spermie vykazovaly viditelné defekty, například abnormality hlaviček či axonemy, nebo měly spermie zdvojené hlavičky či bičíky.

Samotná likvidace abnormálních spermií je následně realizována rozpuštěním spermií, nebo jsou spermie fagocytovány epiteliálními buňkami epididymu. Fagocytóza probíhá z větší části ještě před vstupem spermií do cauda epididymis. Likvidace by tedy měla snižovat míru ubiquitinace od caput ke cauda epididymis, což bylo i prokázáno ve studiích Sutovského (Sutovsky et al. 2001; Sutovsky 2003). Studie Basky (2008) poskytuje důkaz, že aktivita ubiquitinového systému není omezena na intracelulární prostředí, což přispívá k lepšímu porozumění procesu zrání spermií během epididymálního průchodu.

UPS v epididymu se dále zapojuje při odstraňování otcovské mitochondriální DNA. Již ve varleti při spermatogenezi dochází z navázání ubiquitinu na otcovské mitochondrie spermií, a následně je dokáže epididymální UPS rozpoznat. Rozpoznané mitochondrie jsou degradovány pomocí UPS, což vede k zániku otcovské mitochondriální DNA a podporuje se tím dědičnost pouze mateřské mitochondriální DNA (Sutovsky 2003).

Posledním úkolem epididymu je skladování maturovaných spermií, které jsou pohyblivé a plně kompetentní k fertilizaci (Jones 1999; Tulsiani & Abou-Haila 2012). Uchování probíhá v poslední části, tedy v cauda epididymis, kde je udržována stálá teplota. Buňky epididymálního epitelu (především čistící buňky) odstraňují přebytečnou vodu z prostředí, čímž dochází ke zvýšení koncentrace spermií. Zároveň dochází k acidifikaci prostředí, které je vhodné pro skladování spermií. Zde spermie čekají až do chvíle ejakulace do samičího pohlavního traktu (Dacheux et al. 2005; Tulsiani & Abou-Haila 2012; Robaire & Hinton 2015; Souza et al. 2017).

3.5.2 Kapacitace

Po ejakulaci jsou spermie chráněny semennou plazmou. Ta obsahuje dekapacitační faktory, které obalují a stabilizují povrch spermie. Slouží tedy jako ochrana proti předčasné kapacitaci. Proteomické studie zatím odhalily 536 proteinů v semenné plazmě kanců, kde dominovaly především spermadheziny – proteiny o velikosti 12-16 kDa. Po ejakulaci spermatu do samičího traktu podstupují spermie další změny (Zaneveld & Jonge 1991; Bailey 2010; Nixon et al. 2014; Zigo et al. 2019a, Zigo et al. 2020). Do změn je zahrnuto například odstranění extracelulárního glykoproteinového obalu spermie a další remodelace spermie pomocí sekretu dělohy a vejcovodu. U kančích spermií dochází především k lipidové modifikaci v plazmatické membráně (Gadella 2014; Nixon et al. 2014). Nejdůležitější změny však nastávají až ve chvíli, kdy spermie pomocí pasivního pohybu, který je realizován svalovými stahy samice a tekutinou samičího traktu, doputuje přes dělohu až k vejcovodu (Gervasi & Visconti 2016).

V této oblasti se nachází funkční rezervoár spermií. Přesné místo rezervoáru je druhově specifické. U prasnic se rezervoár vyskytuje v utero-tubálním spoji a v isthmu vejcovodu. Zde dochází k přímému kontaktu s buňkami epitelu vejcovodu (Bailey 2010). Zároveň zde probíhá určitá selekce, kdy ne všechny spermie podstoupí kapacitaci (Gervasi & Visconti 2016). Dojde k navázání spermií na buňky epitelu, což vede k inhibici motility samotných spermií a zároveň

i k prodloužení jejich životaschopnosti (Bailey 2010; Gervasi & Visconti 2016). V navázání spermií na epitelové buňky vejcovodu hrají důležitou roli spermadheziny. U prasat jsou to hlavně AQN 1 a 3 a AWN (Zigo et al. 2019a). V důsledku interakcí spermií s buňkami samičího reprodukčního traktu dochází k různým biochemickým, fyziologickým a funkčním změnám (Arcelay et al. 2008; Bailey 2010; Tulsiani & Abou-Haila 2012; Ferramosca & Zara 2014; Gervasi & Visconti 2016). Samičí trakt může podpořit, ale i naopak zabrzdit průběh kapacitace. Hlavním důvodem zapojení samičího traktu do kapacitace je správné načasování příchodu spermií, tak aby kapacitovaná spermie dorazila ve správnou chvíli k ovulovanému oocytu (Bailey 2010; Caballero et al. 2011).

Iniciace kapacitace nastává ve chvíli, kdy dojde k odstranění semenné plazmy a následně k degradaci výše zmíněných dekapacitačních faktorů, které jsou navázány na povrchu spermie. Plazmatická membrána podstupuje reorganizaci struktury a dochází v ní k mnohonásobným enzymatickým aktivitám. Dojde k odtoku cholesterolu z plazmatické membrány. Tento proces se nazývá cholesterolový eflux. Eflux podporuje změny v plazmatické membráně, především membránový potenciál a dojde ke zvýšení její permeability a její fluidity. Takto propustná membrána umožňuje přítok Ca^{2+} (vápníkový influx) a HCO_3^- . Influx navodí aktivaci rozpustné adenylcyclázy a souběžně s aktivací dojde k navýšení produkce cAMP. Produkce cAMP umožňuje aktivaci proteinkinázy A (PKA), která je nutná k aktivaci proteinové tyrosinkinázy (PTK). Proteinová tyrosinkináza má za úkol fosforylaci tyrosinových zbytků na proteinech spermie jak v hlavičce, tak i v bičíku. Fosforylace je hlavním nástrojem posttranslačních modifikací proteinů, které jsou důležité k regulaci několika buněčných aktivit. V důsledku toho dojde k redistribuci proteinů, k tvorbě komplexů proteinů vázajících se na ZP a lipidů v membráně. Plazmatická membrána je po kapacitaci považována za nestabilní, a to právě z důvodu ztráty vysokého množství cholesterolu (Spungin et al. 1995; Martínez & Morros 1996; Bailey 2010; Tulsiani & Abou-Haila 2012; Florman & Fissore 2015; Moura & Memili 2016; Leemans et al. 2019; Zigo et al. 2019b).

Změny v plazmatické membráně spermie se projeví i na vnější akrozomální membráně a v akrozomální matrix. Dochází k prvotní přípravě na akrozomální exocytózu. Aby nedošlo k předčasné akrozomální reakci, udržuje si většina savčích spermií vnitřní prostředí s kyselým pH. Kyselé pH totiž udržuje proteázu proakrosin v inaktivovaném stavu. V průběhu kapacitace se však pH zvyšuje až na zásadité, což změní proteázu na aktivní formu, tedy akrosin. Tím se zahájí proteolýza v akrozomální matrix. U kančích spermií se tento mechanismus také uplatňuje (Zimmerman & Sutovsky 2009; Kerns et al. 2016). Struktura vnější akrozomální membrány je v průběhu kapacitace modifikována pomocí enzymu UBA1 (Ubiquitin-like modifier activating enzyme 1) tak, aby byla schopna následné fúze s plazmatickou membránou spermie. Aktivita enzymu UBA1 se projevuje zvýšenou přítomností polyubikvitinovaných proteinů. Proteozomální aktivita tedy přispívá k remodelaci plazmatické membrány spermie, což potvrzuje i studie, kdy byly spermie kapacitovány s inhibitory proteazomu *in vitro*. U takových spermií nedošlo k remodelaci OAM na plazmatické membráně (Yi et al. 2012; Kerns et al. 2016; Zigo et al. 2019a; Zigo et al. 2019b).

Do procesu kapacitace se zapojuje řada aktivit ubiquitin-proteazomového systému. Jsou to především aktivity ubiquitinem aktivovaných enzymů (UBE), aktivity mnohočetných proteozomálních podjednotek, aktivity proteinů obsahujících valosine, které napomáhají 26S

proteazomu rozpoznat ubiquitinovaný substrát. Různé chování těchto podjednotek může být pozorováno v akrozomu a v hlavní části bičíku, kde se proteozomální aktivity vyskytují. Aktivita bývá i druhově specifická, kdy například u lidí dochází v průběhu kapacitace k navýšení chymotrypsinové aktivity 20S podjednotky (Kong et al. 2009; Sutovsky 2011). Předpokládá se, že proteazom hraje důležitou roli při odstraňování proteinů vázaných na membránu spermie v průběhu kapacitace. Míra ubiquitinace by měla tedy s postupem kapacitace růst. Bylo prokázáno, že inhibice proteazomu může změnit samotný průběh celé kapacitace (Kong et al 2009; Zigo et al. 2019b).

U kančích spermii dochází k ubiquitinaci a následné degradaci za pomoci UPS například u proteinů rodiny AQN, AWN, PSP a také proteinu DQH. Následkem jejich degradace získají spermie schopnost uvolnit se z oviduktálního rezervoáru. Inhibice proteazomu značně ovlivní celý proces uvolnění spermie. Dalším příkladem zapojení proteazomu může být i studie, při níž byl inhibován enzym E1. Kvůli nefunkčnímu enzymu E1 nedojde ke ztrátě AQN1, a tím se sníží schopnost oplození spermie. Až 75 % proteinů rodiny AQN a 90 % rodiny AWN je degradováno v průběhu kapacitace za pomoci UPS. Zapojení UPS do kapacitace je prokázáno také u proteinu MFGE8, ADAM5, SPINK2 a Sp32 (Zigo et al. 2019a; Zigo et al. 2019b). Bylo zjištěno, že během kapacitace dochází ke změně až 52 proteinů (Li et al., 2016).

Výsledkem všech kapacitačních změn je navýšení intracelulárního pH, vyšší fluidita buněčných membrán, celkové zlepšení motility, přičemž se objevuje nový vzorec pohybu, a iniciace signální dráhy dependentní cAMP. Při kapacitaci dochází ke korelaci s cAMP, která navyšuje tyrosinovou fosforylaci. Protein, který prochází v průběhu kapacitace tyrosinovou fosforylaci, je například u kance SP32 (protein vázající akrosin) (Naz & Rajesh 2004; Arcelay et al. 2008; Florman et al. 2008; Gervasi & Visconti 2016; Kerns et al. 2016).

Takové spermie jsou schopny uvolnit se z rezervoáru na základě fyziologických změn ve spermii, které způsobují hyperaktivaci spermii. Největší změna spojována s počátkem a udržení hyperaktivace je přítok Ca^{2+} do cytosolu bičíku spermie. U savčích spermii pak musí být otevřené kanály CatSper. Tyto kanály jsou permeabilní právě pro vápníkové ionty a jsou tedy důležité i pro další akce, které vyžadují přítok vápníkových iontů. Hyperaktivace je doprovázena zvýšením amplitudy pohybu bičíku, což napomáhá spermii plavat skrz hlen vejcovodu a pronikat skrz ZP (Baker 2012; Ferramosca & Zara 2014). Spermie, které prošly hyperaktivací, mohou pro následnou orientaci využít systém chemotaxe. Ovulovaný oocyt je vyhledán spermii za pomoci chemoatraktantů, což je signál, který oocyt vysílá. Využitím chemotaktických mechanismů spermie může usměrnit pohyb správným směrem, a tím se lépe dostat k oocytu (Florman et al. 2008; Gervasi & Visconti 2016). Hyperaktivace je následně potřebná i pro průchod spermie vejcovodem a k pronikání kumulárním komplexem a ZP. Dalším faktorem, který může pomoci uvolnění spermie z rezervoáru, je činnost proteazomu. Pravděpodobně je uvolnění spermii ovlivněno i samotnou ovulací. (Zimmerman & Sutovsky 2009; Bailey 2010; Tulsiani & Abou-Haila 2012; Gervasi & Visconti 2016; Leemans et al. 2019).

Kapacitace spotřebovává velké množství energie. Management energie je tedy pro spermii velice důležitý. Metabolická aktivita vytváří energii za pomoci glykolýzy, oxidací

energetických substrátů a fosforylaci proteinů, které jsou zařazeny do signální kaskády (Ferramosca & Zara 2014; Leemans et al. 2019).

Energie je zásadní komponentou v procesu motility. Motilita je totiž následně udržována pomocí ATP, která je vytvářena v procesu glykolýzy a mitochondriální oxidace, dále pak pomocí Ca^{2+} a HCO_3^- , které jsou přítomny v semenné plazmě a indukují pohyblivost spermie zvýšením syntézy cAMP (Ferramosca & Zara 2014; Gervasi & Visconti 2016; Leemans et al. 2019).

Výsledkem kapacitace jsou tedy spermie, které jsou hyperaktivované a mají schopnost se navázat na *zona pelucida* oocyty, dále dokážou podstoupit akrozomální reakci a následně mohou fúzovat se samotným oocytem. Všechny tyto procesy jsou nezbytné v procesu oplození (Arcelay et al. 2008; Bailey 2010; Tulsiani & Abou-Haila 2012; Florman & Fissore 2015).

3.5.3 Akrozomální reakce

Akrozomální reakce (AR) je nevratný řízený proces, jehož hlavním dějem je exocytóza. Akrozom je intracelulární membrána, která obaluje jádro buňky. Vápníkem řízená exocytóza (obrázek 6) je spuštěna navázáním spermie na *zona pellucida* oocyty. Vazba spermie je uskutečněna přes specifické receptory. Ty jsou lokalizovány především na přední straně hlavičky spermie, kde interagují s proteinem ZP3, který je lokalizovaný na ZP oocyty. Akrozomální exocytóza je definována jako osvobození akrozomálního obsahu, který je součástí akrozomální matrix, při kterém dochází i k odhalení molekul, které jsou umístěny na vnitřní akrozomální membráně (Zaneveld & Jonge 1991; Morales & Llanos 1996; Zimmerman & Sutovsky 2009; Bailey 2010; Tulsiani & Abou-Haila 2012; Leemans et al. 2016).

Expozice molekul vnitřní akrozomální membrány je velice důležitá pro pozdější fúzi gamet. Jedním z proteinů je IZUMO1, který se v průběhu AR přemístí z vnitřní akrozomální membrány do oblasti ekvatoriálního segmentu a následně je vystaven vnějšímu prostředí. Role IZUMO1 spočívá ve spolupráci s glykoproteinovým receptorem oocyty (JUNO). Jejich spolupráce napomáhá k rozpoznání oocyty a spermie mezi sebou a umožňuje tak fúzi plazmatických membrán gamet (Inoue 2005; Gervasi & Visconti 2016).

Spermie musí prodělat AR, aby byla schopna penetrovat ZP a navázat se na plazmatickou membránu oocyty. Pokud k akrozomální reakci nedojde, nebo k ní dojde předčasně, fertilizace neproběhne. Spermie, která má být oplození schopná, musí mít akrozom neporušený až do chvíle, kdy dojde k setkání obou gamet. Proto musí být AR striktně regulována tak, aby v době akrozomální exocytózy bylo vajíčko dostupné. Mechanismy, které se starají o regulaci, jsou velice komplexní a zahrnují i cesty spojené s vápníkovými ionty (Florman et al. 2008; Gervasi & Visconti 2016). Oproti tomu byly vydány studie, které na myších modelech potvrzují, že k oplození došlo i spermii, které AR prodělaly již během průchodu skrz kumulární komplex oocyty (Jin et al. 2011).

Důležité pro iniciaci akrozomální reakce je tedy vyžadováno zvýšení koncentrace volného intracelulárního vápníku (Morales & Llanos 1996; Sutovsky 2011). Pro vstup Ca^{2+} do spermie je zapotřebí hyperpolarizace kanálů pro Ca^{2+} na plazmatické membráně, která probíhá již při kapacitaci. Hyperpolarizace je docíleno buď uzavřením kanálů pro Na^+ , nebo otevřením

kanálů pro K⁺. Třetí možností je působení obou dvou způsobů najednou (Gervasi & Visconti 2016). Dalšími mechanismy, které se podílejí na iniciaci a řízení akrozomální reakce u prasat, jsou kanálové receptory neurotransmiterů, které jsou přítomny v membránách spermií. Byl prokázán výskyt především dvou receptorů, a to glycinového receptoru a nikotin acetylcholinového receptoru (Melendrez & Meizel 1995). Studie koňských spermií naznačují, že by dalším faktorem v řízení akrozomální reakce mohl být progesteron v oviduktální tekutině samice (Cheng 1998). Pro iniciaci AR je také důležité zapojení UPS, který je zodpovědný za remodelaci OAM a některých proteinů, které jsou lokalizovány právě v akrozomu (např. MFGE8) během kapacitace. Provede-li se kapacitace spermií s inhibitory proteazomu *in vitro*, dojde k zabránění AR (Oliva et al. 2009; Zigo et al. 2019b).

Dalším důležitým krokem v průběhu akrozomální reakce je fúze plazmatické membrány spermie s vnější akrozomální membránou. Morfologické změny je docíleno právě zvýšenou koncentrací vápníkových iontů, která mění složení membrán, především přítomných lipidových složek. Tato fúze dává vzniknout smíšeným vezikulům neboli váčkům, které obsahují směs komponent obou membrán (Zaneveld & Jonge 1991; Morales & Llanos 1996; Tulsiani & Abou-Haila 2012; Leemans et al. 2019).

Při fúzi je uvolněna řada hydrolytických enzymů, hlavně akrosin, který má podobnou aktivitu jako trypsin. Tyto enzymy jsou schopny lokálně rozpouštět ZP, a tím tak napomáhají k penetraci ZP (Spungin et al. 1995; Leemans et al. 2019). Společně s enzymy dojde k expozici nových membránových domén, které jsou nezbytné pro další fázi oplození (Spungin et al. 1995). Je změněna samotná struktura membrány, která má po fúzi vlásenkovou strukturu. Takto změněná membrána je schopna se navázat na oolemu oocyty a může dojít k fúzi obou gamet a následně i k aktivaci oocyty (Kerns et al. 2016; Leemans et al. 2019). K narušení ZP napomáhá i přítomnost UPS s proteazomálními jednotkami, který degraduje některé proteiny na ZP (Sutovsky 2003; Sutovsky et al. 2004).

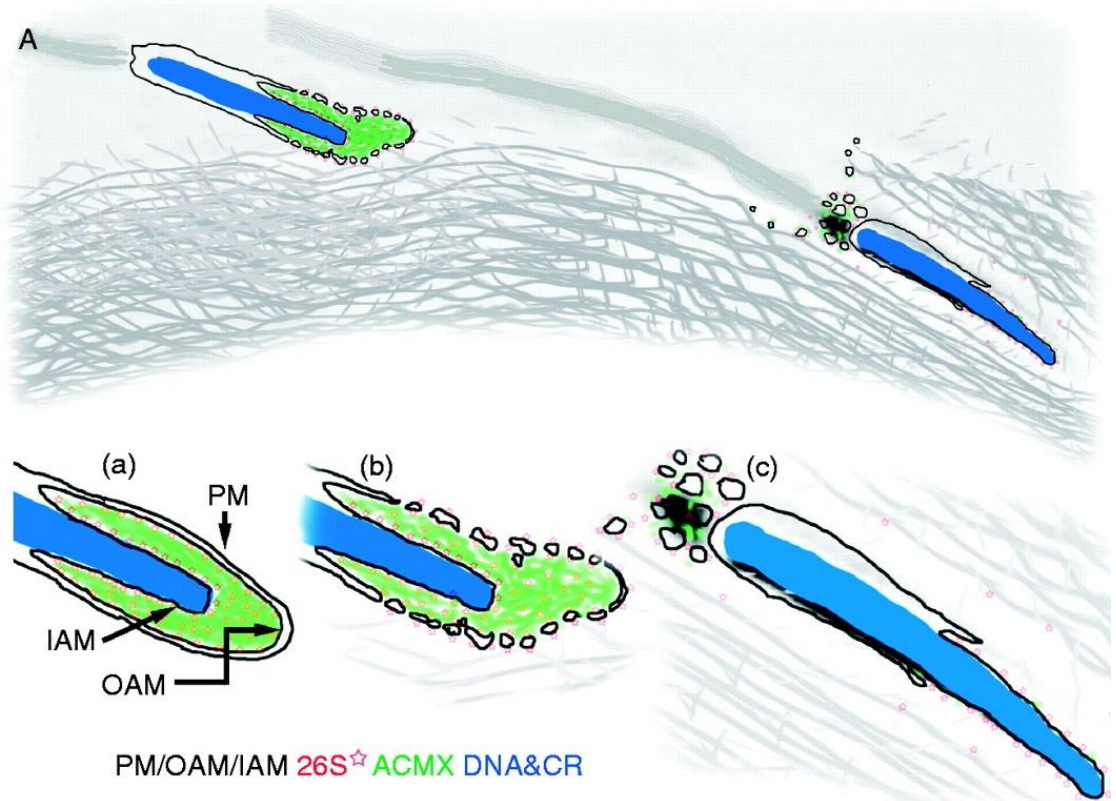
Ačkoliv jsou AR a kapacitace na sobě nezávislé děje, pokud neproběhne jeden z nich, k oplození nedojde. Akrozomální reakce i kapacitace jsou tedy kritickými body pro oplození (Morales & Llanos 1996; Gervasi & Visconti 2016).

Proteazom hraje v procesu akrozomální reakce velice důležitou roli. Proteazom je u savčích spermií lokalizován v samotné akrozomální matrix, ale i na vnější a vnitřní akrozomální membráně (Yi et al. 2010; Sutovsky 2011; Kerns et al. 2016). Zimmerman & Sutovsky (2009) rozděluje proteazom do dvou populačních skupin. První z nich je populace proteazomu před exocytózou, která se nachází na vnější akrozomální membráně. Druhou populací je proteazom po exocytóze, který je lokalizován na vnitřní straně akrozomální membrány. Zde napomáhá sekundární vazbě a pomocí proteolytických aktivit usnadňuje proces penetrace spermie skrz ZP oocyty.

Jak již bylo výše uvedeno, proteazom je součástí procesu vazby spermie na *zona pellucida* oocyty. Účastní se i samotné akrozomální reakce. Proteiny akrozomu jsou totiž aktivně ubiquitinovány a degradovány pomocí akrozomálního proteazomu ještě před samotnou vazbou gamet. Tím je usnadněna akrozomální exocytóza ve chvíli, kdy spermie dosáhne kontaktu se ZP oocyty (Zimmerman & Sutovsky 2009; Sutovsky 2011; Kerns et al. 2016).

Bylo prokázáno, že inhibice ubiquitinace proteinů přímo blokuje oplození. Inhibice proteazomální proteolýzy mění průběh akrozomální reakce, blokuje penetraci ZP, ale nemění míru vazby spermie na ZP (Sutovsky et al. 2004).

Jak již bylo výše zmíněno, enzym UBA1 je schopný modifikovat vnější akrozomální membránu. Následně byla jeho přítomnost prokázána i v jádře spermie pomocí imunofluorescence. Jeho přítomnost naznačuje, že se účastní i samotné akrozomální reakce (Yi et al. 2010; Zimmerman & Sutovsky 2012).



Obrázek 6. Schéma akrozomální exocytózy. V neporušeném akrozomu (a) jsou proteazomy (červené hvězdy) vázány na vnitřní i vnější akrozomální membráně. Jsou také rozptýleny v akrozomální matrici (ACMX - zelená). Při vazbě spermie na *zona pellucida* (b) se vytvoří vezikuly z vnější akrozomální membrány (OAM) a plazmatické membrány (PM), které jsou potažené proteazomy. Společně s akrozomální matrix vytvářejí akrozomální plášť, což je přechodná stabilní jednotka. Během penetrace (c) zbytky akrozomálního pláště obklopují spojovací část bičíku, zatímco část proteazomů zůstává spojena s vnitřní akrozomální membránou (IAM) (Sutovsky 2011).

4 Metodika

4.1 Materiál

Pokud není uvedeno jinak, byly použity chemikálie od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Ejakulované kančí spermie byly použity v podobě inseminačních dávek od firmy ProAgro Nymburk (CZ) od plemene Landrace. Epididymální spermie byly izolovány pomocí injekční jehly a stříkačky z nadvarlete dospělého kance miniprasete chovaného v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Liběchově.

Inseminační dávky i epididymální spermie byly přepravovány při teplotě 17 °C. Experimenty byly provedeny ve školní laboratoři KVD ČZU s běžnou pokojovou teplotou a osvětlením. V případě práce s luminiscenčními přípravky bylo osvětlení ztlumeno.

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava vzorků spermií

Do zkumavky typu Falcon bylo odměřeno 10 ml inseminační dávky kančích spermií. Obsah zkumavky byl odstředěn na centrifuze (LC-8 5000, Benchmark Scientific Inc., USA) při 300 x g po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant byl odebrán a vyhozen. Peleta byla doplněna PBS (0,01 M Phosphate buffered Saline; 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl; pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA) do celkového objemu 10 ml. Směs byla resuspendována za pomoci jemného nasávání pipetou. Suspenze byla znovu odstředěna pomocí centrifugy při 300 x g po dobu 10 minut. Supernatant byl opět odebrán a vyhozen. Promytí pomocí PSB bylo zopakováno ještě dvakrát. Následně byla zkontrolována koncentrace spermií v Bürkerově komůrce a v případě větší nebo menší koncentrace, došlo k úpravě na koncentraci 2,5 – 5 x 10⁷ spermií na mililitr.

4.2.1.1 Subcelulární frakcionace buněk

Subcelulární frakcionace buněk je určena pro diferenciální extrakci proteinů ze savčích buněk podle jejich subcelulární lokalizace. Pro subcelulární frakcionaci byla použita souprava od firmy Calbiochem (San Diego, USA). Pomocí extrakčního pufry I se uvolňují cytosolické proteiny = frakce I. Následně jsou membrány a membránové orgány solubilizovány extrakčním pufrem II, aniž by byla narušena integrita jádra a cytoskeletu = frakce II. Dále jsou nukleové proteiny obohaceny extrakčním pufrem III = frakce III. Komponenty cytoskeletu jsou nakonec solubilizovány extrakčním pufrem IV = frakce IV.

Pro frakcionaci byly použity promyté pelety ejakulovaných spermií a pelety spermií z kauda epididymis o objemu 50 µl (přibližný počet buněk 10⁸), které byly uloženy v plastových mikrozkušavkách Eppendorf®. Extrakční pufry I-III a Benzonase® nukleáza byly po celou dobu extrakce uchovávány také na ledu. Extrakční pufr IV A i koktejl inhibitorů proteáz (Protease Inhibitor Cocktail, Calbiochem, San Diego, USA) byly ponechány při pokojové teplotě.

Byla připravena směs 1 ml chlazeného extrakčního pufru I, který byl před použitím důkladně promíchán na vortexu (Vornado, Benchmark Scientific, USA), a 5 μ l koktejlu inhibitorů proteáz. Tento roztok byl okamžitě přidán k peletám spermií a vše bylo řádně promícháno na vortexu. Vzorek byl ponechán inkubovat po dobu 10 minut na ledu za občasného promíchání na vortexu. Po 10 minutách byly mikrozkuhavky přesunuty do centrifugy (Mikro 22R Hettich Zentrifugen, DJB Labcare, UK), kde byly odstředěny při 4 °C a 1 000 x g po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant byl přesunut do nové mikrozkuhavky bez porušení pelety. Tím byla získána frakce I. Frakce I. byla dále uchovávána na ledu.

Extrakční pufr II byl řádně promíchán na vortexu, z něho byl odebrán 1 ml a smíchán s 5 μ l koktejlu inhibitorů proteáz. Roztok byl ihned přidán ke zbylé peletě. Vzorek byl rozmíchán na vortexu a ponechán na ledu inkubovat po dobu 30 minut za občasného promíchání na vortexu. Po inkubaci byl vzorek odstředěn na centrifuze při 4 °C a 6 000 x g po dobu 10 minut. Supernatant byl odebrán do čisté mikrozkuhavky a označen jako frakce II. Frakce II. byla ponechána spolu s frakcí 1 na ledu.

Následovalo použití extrakčního pufru III. Po promíchání bylo použito množství 500 μ l, které bylo smícháno s 5 μ l koktejlu inhibitorů proteáz a 1,5 μ l Benzonase® nukleázy. Roztok byl ihned přimíchán k původní peletě. Peleta byla resuspendována pomocí pipety. Vzorek byl inkubován opět na ledu po dobu 10 minut za občasného promíchání na vortexu. Po 10 minutách byl inkubovaný vzorek odstředěn pomocí centrifugy při 4 °C a 6 800 x g po dobu 10 minut. Odebráním supernatantu do prázdné mikrozkuhavky byla získána třetí frakce. Frakce III. byla umístěna na led k ostatním frakcím.

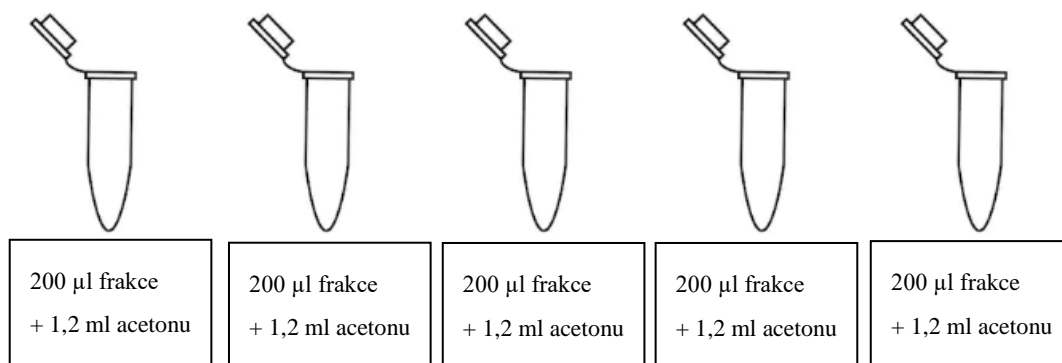
Poslední frakce byla získána za pomoci extrakčního pufru IV. Bylo použito 500 μ l pufru a 5 μ l koktejlu inhibitorů proteáz. Roztok byl okamžitě přidán ke stávající peletě. Peleta byla resuspendována pomocí pipety. Vzorek byl inkubován na ledu po dobu 10 minut za občasného promíchání pomocí vortexu. Po inkubaci následovalo odstředění vzorku na centrifuze při 4 °C a 10 000 x g po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant byl odebrán do nové mikrozkuhavky a tím byla získána čtvrtá frakce. Frakce IV. byla uložena na ledu. Zbylá peleta byla ponechána a označena jako Zbytek.

Při dalších subcelulárních frakcionacích byl použit obměněný postup. Při použití extrakčního pufru I bylo nejprve k peletě přidáno množství 1 ml. Peleta byla společně s extrakčním pufrem I resuspendována pipetou. Následovalo rozdělení směsi do dvou mikrozkuhovek o stejném objemu a do každé mikrozkuhavky bylo přidáno dalších 250 μ l extrakčního pufru I, který byl smíchán s 5 μ l koktejlu inhibitorů proteáz. Z jedné pelety bylo tímto způsobem získáno větší množství vzorku. Následný postup byl stejný.

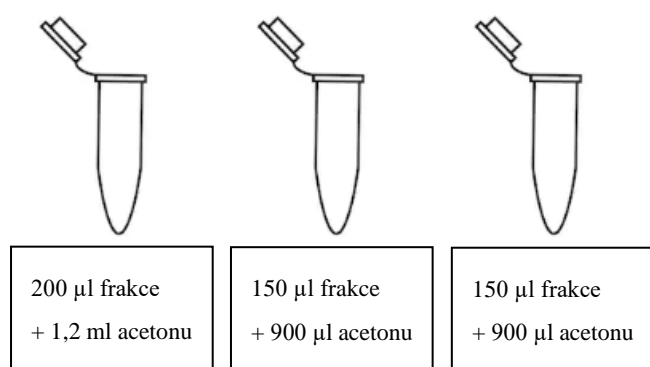
4.2.1.2 *Precipitace pomocí acetonu*

Mikrozkuhavky s jednotlivými frakcemi byly dále zpracovány. Frakce byly rozděleny následujícím způsobem (obrázek 7) do dalších mikrozkuhovek. Do každé mikrozkuhavky pak bylo přidáno 6násobné množství acetonu podle objemu frakce.

1., 2. frakce (objem po 1 ml)



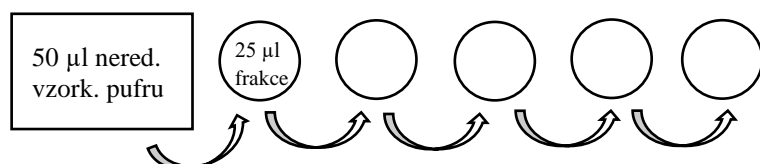
3., 4. frakce (objem po 0,5 ml)



Obrázek 7. Množství jednotlivých frakcí v mikrozkuřavkách spolu s množstvím přidaného acetonu.

Jednotlivé mikrozkuřavky s frakcemi byly uchovávány na ledu minimálně po dobu 1 hodiny. Poté byly frakce promíchány na vortexu a odstředěny na centrifuze při 4 °C a 5 000 x g po dobu 10 minut. Po odstředění byl odstraněn vzniklý supernatant a byla ponechána pouze peleta. Mikrozkuřavky byly ponechány otevřené na ledu k tzv. vydýchání po dobu 10 minut.

Do jedné mikrozkuřavky od každé frakce bylo přidáno 50 µl neredukujícího vzorkového pufru. Množství neredukujícího vzorkového pufru bylo vypočteno podle poměru objemu pelety a vzorkového pufru 1:2. Obsah mikrozkuřavky byl promíchán na vortexu. Celý obsah mikrozkuřavky byl přenesen k další peletě stejné frakce, směs byla resuspendována pomocí pipety a promíchána na vortexu. Stejným způsobem se pokračovalo až do chvíle, kdy od jedné frakce zbyla vždy jedna mikrozkuřavka s koncentrátem.



Koncentrát byl povařen při 100 °C po dobu 5 minut na vyhříváné třepačce (TS-100 BioSan, Latvia). Poté byl obsah mikrozkuřavky promíchán na vortexu a byl odstředěn pomocí centrifugy při 4 °C a 10 000 x g po dobu 3 minut. Vzniklý supernatant byl odebrán do nové mikrozkuřavky a byl zamrazen.

Obsah mikrozkušavky s názvem Zbytek byl zpracován obdobně. Obsah byl rozpuštěn v neredukujícím vzorkovém pufru v poměru 1:2. Směs byla promíchána pomocí vortexu a povařena při 100 °C po dobu 5 minut. Po vaření byl vzorek odstředěn na centrifuze při 4 °C a 10 000 x g po dobu 3 minut. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky a zamrazen.

4.2.1.3 Kapacitace spermií *in vitro*

Pro přípravu kapacitačního média byly použity následující složky (Tabulka 2), které byly odváženy pomocí váhy (EMB 200-2, Kern, CZ).

Tabulka 2. Složky kapacitačního média

Složka	Množství
Basic TL-Hepes	50 ml
Glukóza (11 mM)	0,099 g
Pyruvát (5 mM)	0,0275 g
BSA (2 %)	1,00 g
NaHCO ₃	0,0084 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O (2mM)	0,0147 g

Basic TL-Hepes byl připraven z následujících látek: 6,6634 g NaCl; 0,2386 g KCl; 0,0408 g NaH₂PO₄; 1,4 ml laktátu sodného; 0,1018 g MgCl₂*6H₂O; 2,383 g Hepes; 0,0220 g pyruvátu sodného; 2,186 g sorbitolu; 0,025 g gentamicinu; 0,065 g penicilinu; 0,1 g PVA (Polyvinyl alkohol) v 1 litru destilované vody.

K promyté peletě ejakulovaných kančích spermií bylo přidáno kapacitační medium do celkového objemu 10 ml. Zkušavka byla přenesena na do CO₂ inkubátoru (MCO-19AIC, Sanyo Electric, Japonsko), který vytváří podmínky pro navození kapacity. Inkubace byla rozdělena na tři časové intervaly: 30 minut, 60 minut a 90 minut. Po dosažení každého časového intervalu byly ze zkušavky odebrány 3 ml vzorku do nové zkušavky.

Každý vzorek byl doplněn do 10 ml PSB, ve kterém byl promyt. Směs byla opět odstředěna na centrifuze při 300 x g po dobu 5 minut. Po odstředění byl odebrán supernatant a vyhozen. Zkušavka s peletou byla opět doplněna do 10 ml PBS a promyta tímto způsobem ještě dvakrát.

4.2.1.4 Izolace povrchových proteinů spermií

Kapacitované a promyté vzorky spermií byly použity pro izolaci povrchových proteinů za pomoci soupravy Pierce® Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Dále byly použity vzorky promytých ejakulovaných spermií.

Jedna lahvička (12 mg) Sulfo-NHS-SS-Biotinu byla rozpuštěna v 48 ml vychlazeného PSB. Ke každému vzorku bylo následně přidáno 3 ml tohoto roztoku. Zkumavky se vzorky byly inkubovány v lednici po dobu 30 min za občasného jemného promíchání. Po inkubaci byly do každé zkumavky přidány 3 ml TBS (25 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,8). Obsah byl resuspendován pomocí pipety. Směs byla odstředěna na centrifuze (LC-8 5000, Benchmark Scientific Inc., USA) při 500 x g po dobu 3 minut. Vzniklý supernatant byl odebrán a vyhozen. Ke zbylé peletě byly přidány 3 ml TBS a znovu byla směs promíchána, následně odstředěna na centrifuze se stejnými parametry a supernatant byl opět odebrán a vyhozen.

200 µl lyzačního pufru (Lysis Buffer, Thermo Fisher Scientific, USA) bylo přidáno k odstředěným vzorkům a suspenze byla důkladně promíchána. Poté byly vzorky rozděleny do mikrozkuvek s objemem 1,5 ml a inkubovány na ledu po dobu 30 minut. Každých 5 minut byl obsah rozmíchán pomocí vortexu. Po inkubaci byly vzorky odstředěny na centrifuze při 4 °C a 10 000 x g po dobu 2 minut. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkuvky a tím byl získán lyzát.

Před použitím gelových kuliček s imobilizovaným avidinem (Immobilized NeutrAvidin Gel, Thermo Fisher Scientific, USA) byla suspenze kuliček v pufru jemně promíchána. Poté bylo odebráno 300 µl gelu a byl přidán do speciální kolonky. Kolonky byly nasazeny do sběrné mikrozkuvky (obrázek 8). Obsah byl odstředěn za pomoci centrifugy při 4 °C a 1000 x g po dobu 1 minuty. Obsah, který protekl do sběrných mikrozkuvek, byl vyhozen.



Obrázek 8. Speciální kolonka se sběrnou mikrozkuvkou (Thermo Fisher Scientific, USA).

Do kolonky bylo přidáno 500 µl promývacího pufru (Wash Buffer, Thermo Fisher Scientific, USA). Obsah byl jemně resuspendován pomocí pipety a kolonka byla opět centrifugována po dobu 1 minuty při 1000 x g. Supernatant, který protekl do sběrné mikrozkuvky, byl vyhozen. Tento krok byl zopakován ještě dvakrát.

Na spodní část kolonky byla přidána čepička tak, aby obsah kolonky nemohl vytékat do sběrné mikrozkuvky. Ke gelovým kuličkám do kolonky byl přidán lyzát spermií a horní víčko bylo uzavřeno. Obsah byl inkubován po dobu 60 min na rotační třepačce (MX-T6-Pro, dLab Scientific, USA).

Po inkubaci bylo otevřeno horní víčko a odstraněna čepička. Kolonka byla zpět nasazena do sběrné mikrozkušavky. Bylo provedeno odstředění obsahu kolonky na centrifuze při 1000 x g po dobu 1 minuty. Obsah, co protekl do sběrné mikrozkušavky, byl vyhozen.

V 10 ml promývacího pufru byla rozpuštěna 1 tableta inhibitorů proteáz. Ke každé kolonce bylo přidáno 500 µl roztoku. Následovalo odstředění směsi pomocí centrifugy při 1000 x g po dobu 1 minuty. Obsah, který protekl do sběrné mikrozkušavky, byl vyhozen. Promytí pomocí promývacího pufru bylo provedeno ještě jednou. Do kolonky bylo opět přidáno 500 µl promývacího pufru a celý obsah byl přenesen do mikrozkušavky Eppendorf® o objemu 1,5 ml. Obsah byl odstředěn na centrifuze se stejnými hodnotami a supernatant byl vyhozen.

Pro vytvoření 50 mM dithiotreitolu DTT bylo přidáno 47,4 µl DTT solution do 900 µl vzorkového pufru pro SDS elektroforézu. Do každé mikrozkušavky se vzorkem bylo přidáno 150 µl vzorkového pufru s DTT. Vzorek byl povařen při 95 °C po dobu 5 minut odstředěn při 1000 x g po dobu 2 minut. Vzniklý supernatant byl odebrán do nové mikrozkušavky a připraven pro SDS elektroforézu.

Tímto způsobem byly získány vzorky, které obsahovaly povrchové proteiny ejakulovaných spermií a spermií, které prošly kapacitací po dobu 30, 60 a 90 minut.

4.2.2 Vyhodnocení vzorků

4.2.2.1 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Byla provedena elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí sodium dodecylsulfátu (SDS). Byla použita aparatura pro vertikální elektroforézu (Mini-PROTEAN Tetra, Bio-Rad, USA).

Nejprve byla sestavena aparatura elektroforézy. Poté byl připraven 12% akrylamidový separační gel. Gel byl připraven z následujících složek: 3,5 ml destilované vody, 2,5 ml 1,5 M Tris. HCl pH 8,8 (Bio-Rad, Hercules, USA), 4,0 ml 30% akrylamid/bis-akrylamid (Bio-Rad, USA), 100 µl 10 % SDS, 4,5 µl TEMED, 70 µl 10% persíranu amonného. Z výše uvedeného množství byly připraveny dva gely. Připravený gel byl pomocí pipety nalit mezi skla aparatury a vrchní část byla převrstvena destilovanou vodou. Polymerace gelu trvala 30 minut.

Následovala příprava 4% zaostřovacího gelu, který byl smíchán z následujících složek: 1,52 ml destilované vody, 0,625 ml 0,5 M Tris. HCl pH 6,8 (Bio-Rad, USA), 0,325 ml 30% akrylamid/bis-akrylamid (Bio-Rad, USA), 0,025 ml 10% SDS, 3,8 µl TEMED, 50 µl 10% persíranu amonného. Destilovaná voda, která byla nalita mezi skly, byla odlita. Místo ní byl mezi skla nalit pomocí pipety připravený zaostřovací gel. Ihned po nalití byly do gelu vloženy hřebínky pro tvorbu jamek. Gel byl ponechán polymerovat po dobu 10 minut.

Připravený gel ve sklech byl přenesen do aparatury elektroforézy (Mini-Protean Tetra System, Bio-Rad, USA). Nádoba byla zalita elektrodovým pufrům. Elektrodový pufr, který byl 5x koncentrovaný, byl připraven z 15 g Tris, 72 g glycinu, 5 g SDS, 1 l destilované vody. Pufr byl naředěn v poměru 1:4. Po nalití pufru byly hřebínky z gelu vyndány. Nejprve byly naneseny do prvních jamek 3 µl proteinového molekulového standardu (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad, USA), poté byly do jamek naneseny připravené vzorky (tabulka 3).

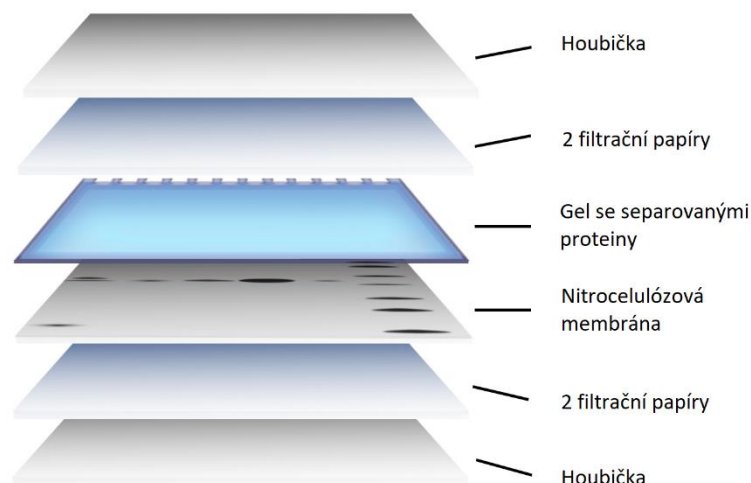
Tabulka 3. Množství nanesených vzorků do jamek gelu: C (celkové proteiny), I (frakce I), II (frakce II), III (frakce III), IV (frakce IV), Zb (zbytek proteinů), Ej (ejakulované), kap. 30' (kapacitované po dobu 30 minut), kap. 60' (kapacitované po dobu 60'), kap. 90' (kapacitované po dobu 90').

Frakce ejakulované	10 μ l C	20 μ l I	20 μ l II	20 μ l III	20 μ l IV	10 μ l Zb
Frakce epididymální	10 μ l C	20 μ l I	20 μ l II	20 μ l III	20 μ l IV	10 μ l Zb
Epididymální spermie	15 μ l Ep I			15 μ l Ep II		
Povrchové proteiny spermií	15 μ l Ej	15 μ l kap. 30'	15 μ l kap. 60'	15 μ l kap. 90'		

Připravená aparatura s nanesenými vzorky byla zapojena ke zdroji elektrické energie. Na přístroji bylo nastaveno nejprve 80 V, po 30 minutách bylo napětí zvýšeno na 140 V. Při takovém nastavení byla elektroforéza ponechána přibližně další hodinu, dokud nebyly proteiny v gelu zcela rozděleny. Po skončení elektroforézy byly gely vyndány do misky, kde byly promyty v destilované vodě.

4.2.2.2 Western blot

Pro elektropřenos proteinů z gelu na membránu byla použita metoda Western blot. Pro metodu bylo potřeba sestavení kazety, kam byl uložen gel se separovanými proteiny z SDS elektroforézy a nitrocelulózová membrána (Hybond C, Amersham Biosciences, UK). Sestavení kazety bylo provedeno následujícím způsobem (Obrázek 9). Další komponenty, které byly použity, byly filtrační papíry Whatman (Chromatography paper, GE Healthcare, USA) a houbičky. Všechny výše uvedené komponenty byly ponořeny v transferovém pufru, který byl složen z 3,03 g Tris, 14,4 g glycinu, 200 ml metanolu, 800 ml destilované vody, po dobu 15 minut.



Obrázek 9. Složení kazety pro Western blot (upraveno z <https://www.biolegend.com/en-us/western-blot>).

Připravené kazety byly následně vloženy do aparatury pro elektropřenos. Aparatura byla zapojena do zdroje elektrického napětí, který byl nastaven na 0,5 A. Samotný přenos trval 1 hodinu a 15 minut. Po přenosu byla kazeta vyjmuta z aparatury a z ní byla membrána přenesena do misky, ve které byla membrána promyta destilovanou vodou. Následně bylo k membráně přidáno barvivo Ponceau S po dobu 1 minuty. Tím bylo provedeno barvení přenesených proteinů. Membrána byla poté znovu omyta destilovanou vodou a následně i pomocí roztoku PBS s přídatkem 0,1 % Tween 20 (Merck, Německo) (PBS-T).

4.2.2.3 Imonudetekce

Na připravené membráně byly nejprve deaktivována volná místa pomocí 5 % sušeného mléka (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad, USA) rozpuštěného v PBS. Membrány byly inkubovány při pokojové teplotě na lineární třepačce (SK-L180E, dLab, Scientific, Inc, USA) po dobu 1 hodiny. Poté byla membrána promyta v PBS-T.

Byly připraveny primární protilátky proti ubiquitinovaným proteinům. Byly použity celkem dvě protilátky FK2 (Mono- and polyubiquitinated conjugates monoclonal antibody, Enzo Life Sciences, USA) a PA2 (Poly-Ubiquitin Polyclonal Antibody, Thermo Fisher Scientific, USA). Dále byla použita protilátka proti proteazomu anti-Proteazom (Proteasome 20S core subunits polyclonal antibody, Enzo Life Sciences, USA). FK2, PA2 byly ředěny v poměru 1:250 s PBS, anti-Proteazom v poměru 1:250 a 1:500 s PBS. Protilátky byly nanášeny na membrány a inkubace proběhla přes noc v lednici.

Po inkubaci byly membrány přeneseny do zkumavky typu Falcon a byly promývány v PBS-T na rotační třepačce (MX-T6-pro, dLab Scientific, USA) po dobu 10 minut celkem 3x kvůli odstranění případných nespecifických interakcí. Poté byly připraveny sekundární protilátky. Pro FK2 byla připravena GAM (goat anti-mouse IgG (L+H), Horseradish Peroxidase-Linked, Bio-Rad, USA) ředěná s PBS v poměru 1:3000. Pro PA2 a protilátku proti proteazomu byla připravena GAR (goat anti-Rabbit IgG (L+H) s křenovou peroxidázou, Bio-Rad, USA) ředěná ve stejném poměru. Membrána byla inkubována při laboratorní teplotě na

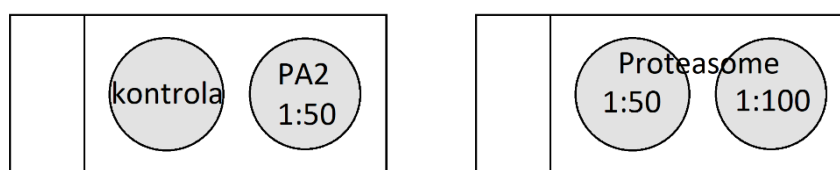
rotační třepače po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byly membrány promývány v PBS-T na rotační třepače po dobu 5 minut celkem 6x.

Membrány byly následně použity pro vizualizaci specifické detekce proteinu protilátkou za pomoci chemiluminiscenčního substrátu (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific, USA; SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific, USA). Vyhodnocení proběhlo na přístroji Azure (Azure, c300, Azure Biosystems, USA). Byla provedena denzitometrická analýza detekovaných proteinů za pomoci programu Image Studio Lite Verze 5.2 (LI-COR Biosciences, USA). V programu Microsoft Excel (2016) byly vytvořeny kalibrační křivky k detekovaným proteinům, podle kterých byly odhadnuty molekulární váhy daných proteinů.

4.2.2.4 Nepřímá imunofluorescence

Pro imunofluorescenci byly použity roztěry epididymálních spermií odebrané z caput epididymis a cauda epididymis, které byly připraveny vlhkou fixací pomocí vymrazeného acetonu a metanolu v poměru 1:1. 20 μ l suspenze spermií bylo zakápnuto 50 μ l fixačního roztoku a po 5 minutách byl preparát opláchnut PBS. Po osušení byla skla se vzorky spermií skladována ve 4 °C.

Byla připravena vlhká komůrka, která obsahovala navlhčenou buničinu. Skla se vzorky byla nejprve opláchnuta pomocí PBS a vysušena filtračním papírem. Poté byla přenesena do komůrky. Na každý vzorek bylo naneseno 150 μ l blokovacího roztoku SuperBlock (Blocking Buffer in PBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Komůrka byla zavřena a vzorky byly inkubovány po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla sklíčka promyta PBS a osušena na filtračním papíru. Sklíčka byla vrácena do komůrky, kde na ně bylo přidáno 50 μ l primární protilátky. Byla použita protilátka proti ubiquitinovaným proteinům PA2 a protilátka proti proteazomu anti-Proteazom. PA2 bylo ředěno s PBS v poměru 1:50 a anti-Proteazom v poměru 1:50 a 1:100. Pro kontrolu bylo použito 50 μ l PBS. Rozmístění primárních protilátek a PBS na vzorky bylo následující (Obrázek 10).



Obrázek 10. Rozmístění primárních protilátek na preparátech spermií pro nepřímou imunofluorescenci.

Tímto způsobem připravené vzorky byly inkubovány přes noc v lednici. Druhý den byly vzorky promyty PBS a osušeny pomocí filtračního papíru. Byly připraveny sekundární protilátky GAR 488 (Alexa Fluor 488 goat anti-Rabbit IgG (H+L), Thermo Fisher Scientific, USA), která má pod fluorescenčním mikroskopem zelenou barvu. GAR bylo naředěno PBS v poměru 1:300. Sekundární protilátky byly přidány ke vzorkům po 100 μ l ke každému a byly inkubovány v zavřené komůrce 45 minut.

Po inkubaci byly vzorky promyty v PBS a osušeny o filtrační papír. Ke vzorkům bylo přidáno 100 µl PNA lektinu (Rodamin Peanut agglutinin, Vector Laboratories, USA), který byl naředěný s PBS v poměru 1:500. Vzorky byly inkubovány opět v zavřené komůrce po dobu 30 minut. PNA lektin označil na spermiích vnější akrozomální membránu, která pod mikroskopem svítila červenou barvou.

Inkubované vzorky byly opět promyty v PBS a následně také v destilované vodě. Vzorky byly řádně osušeny filtračním papírem. Na sklíčka bylo nanášeno 10 µl DAPI (Antifade Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, USA) ke každému vzorku, označující jádro, které je vizualizováno pod mikroskopem modrou barvou. Vzorky byly následně přikryty krycími sklíčky a výsledky byly vyhodnoceny pod fluorescenčním mikroskopem (Nikon, Japonsko).

5 Výsledky

5.1 Sledování míry ubiquitinace proteinů

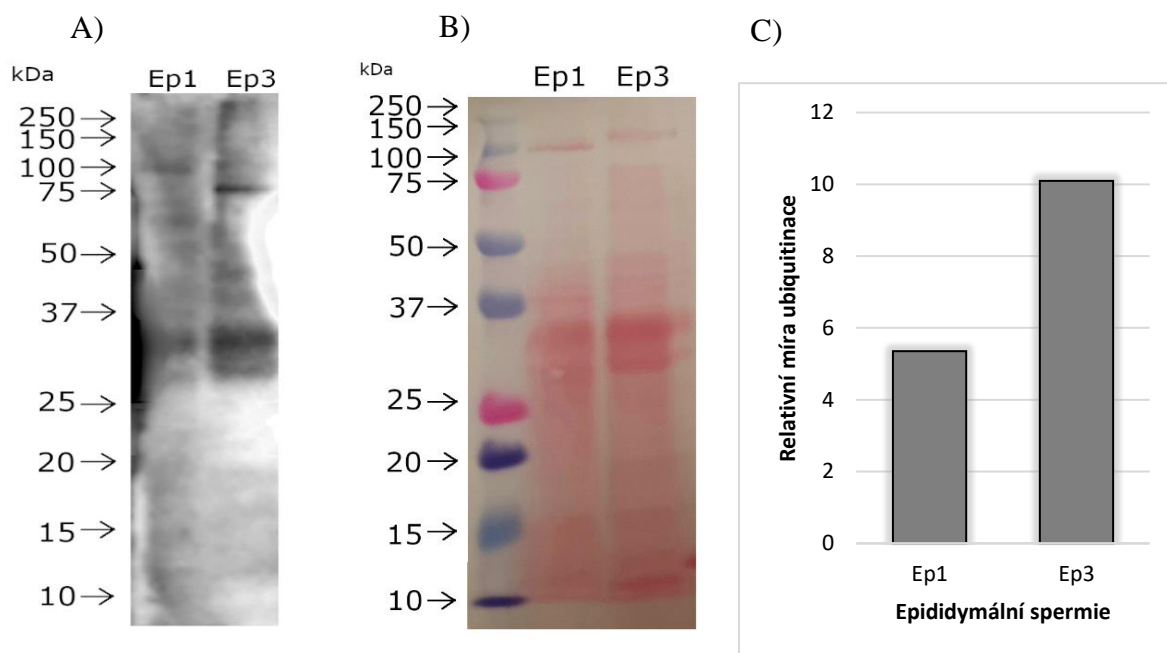
Pro zjištění míry ubiquitinace v proteinech kančích spermii byly cíleně izolovány proteiny ze subcelulárních frakcí ejakulovaných spermii a spermii z cauda epididymis (kap 4.2.1.1). Dále byly izolovány proteiny z ejakulovaných spermii a spermii z caput epididymis a cauda epididymis a proteiny z povrchu ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermii (kap 4.2.1.3). Ubiquitované proteiny ve vzorcích spermii byly detekovány pomocí dvou vybraných protilátek, a to FK2 a PA2. Navíc byla zjišťována přítomnost proteazomu v proteinech spermii.

5.1.1 Detekce ubiquitovaných proteinů v epididymálních spermích

Detekce ubiquitovaných proteinů v epididymálních spermích v průběhu jejich maturace byla provedena po elektroforetické separaci proteinů (kap 4.2.2.1) s následnou Western blot imunodetekcí (kap. 4.2.2.3). Pro imunodetekci byly použity vzorky proteinů epididymálních spermii z caput epididymis a cauda epididymis (obrázek 11A). Značení ubiquitinace proteinů proběhlo pomocí primární protilátky FK2.

Imunodetekce prokázala vyšší výskyt ubiquitovaných proteinů ve spermích z cauda epididymis. Denzitometrická analýza, která byla vztažena k množství nanesených proteinů, potvrdila, že více ubiquitovaných proteinů se nachází ve spermích z cauda epididymis (obrázek 11C).

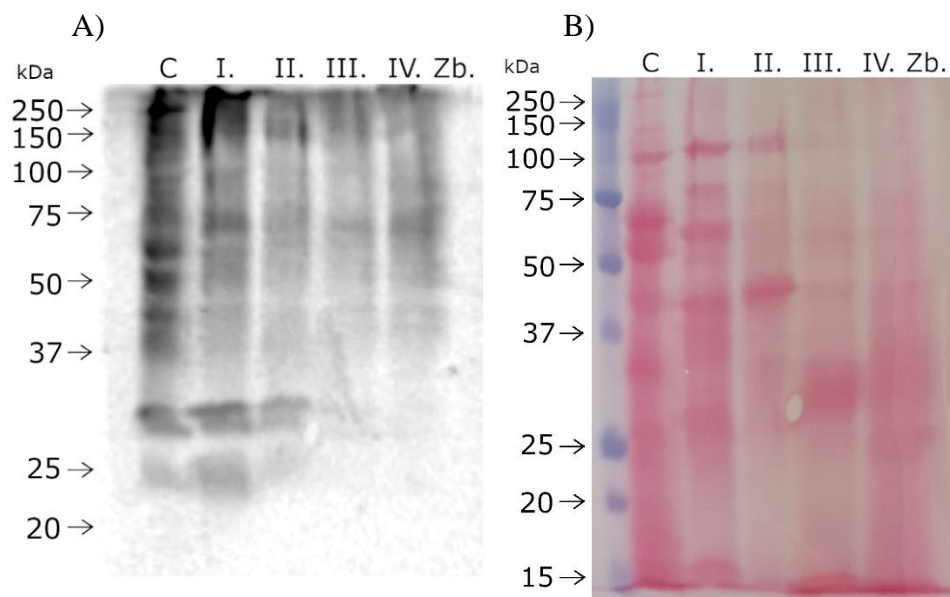
Největší navýšení ubiquitinace bylo prokázáno v obou vzorcích spermii v přibližné molekulové váze 35 kDa. Ve spermích z caput epididymis bylo detekováno zvýšené množství také v molekulové váze 100 kDa. Spermie z cauda epididymis vykazovaly zvýšenou ubiquitinaci ještě u proteinů v molekulové váze 75, 45, 40 a 30 kDa.



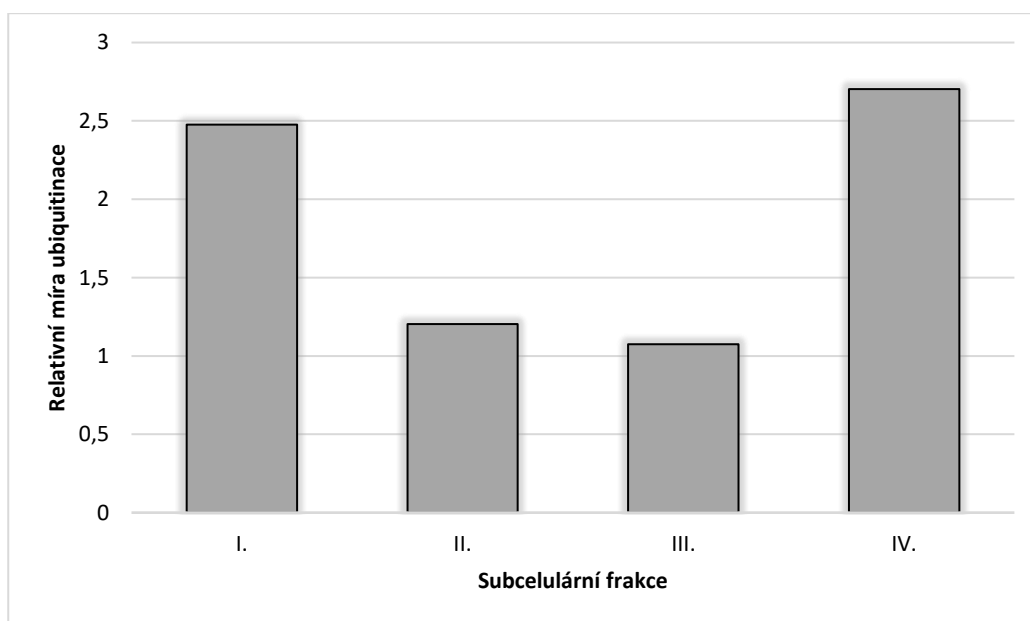
Obrázek 11. Imunodetekce ubiquitovaných proteinů epididymálních spermií pomocí primární protilátky FK2 (A), vizualizované proteiny epididymálních spermií na membráně, která byla použita pro imunodetekci (B), relativní míra ubiquitinace proteinů epididymálních spermií vycházející z denzitometrické analýzy (C); Ep1 – spermie z caput epididymis, Ep3 – spermie z cauda epididymis.

Dále byla provedena detekce ubiquitovaných proteinů pomocí primární protilátky FK2 v subcelulárních proteinových frakcích (kap. 4.2.1.1) izolovaných z epididymálních spermií z cauda epididymis. Výsledky detekce byly hodnoceny denzitometrickou analýzou (graf 1). Imunodetekce ukázala několik ubiquitovaných proteinů ve všech čtyřech frakcích (obrázek 12). Podle denzitometrické analýzy vztažené na celkové množství proteinů bylo nejvíce ubiquitovaných proteinů detekováno v cytoskeletální frakci (frakce IV.). Druhá nejvyšší míra ubiquitinace byla naměřena v první neboli cytosolické frakci. V druhé (membránové) frakci a ve třetí (jaderné) frakci ubiquitinace proteinů byla nižší (graf 1).

V cytosolické frakci bylo nalezeno nejvíce ubiquitovaných proteinů ve vysokomolekulární oblasti nad 150 kDa. Další ubiquitované proteiny byly zjištěny v přibližné molekulové váze 70 kDa, 50 kDa 30 kDa a 25 kDa. Podobně se v membránové frakci nachází větší množství ubiquitovaných proteinů v přibližné molekulové hmotnosti 150, 70, 30 a 25 kDa. V jaderné a cytoskeletální frakci bylo detekováno vyšší množství ubiquitovaných proteinů nad 150 kDa a kolem 70 kDa.



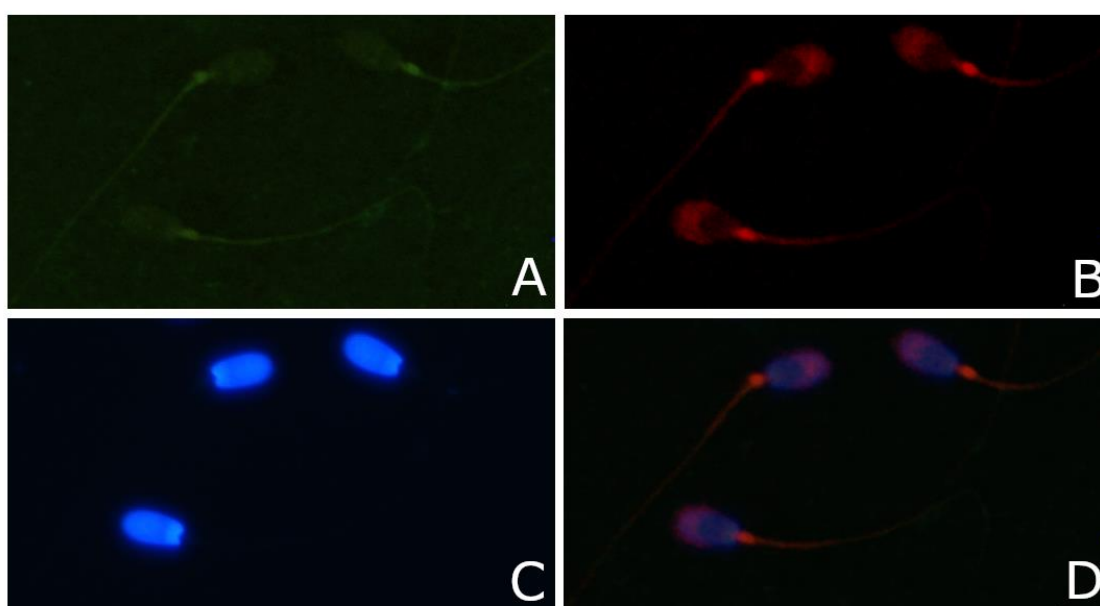
Obrázek 12. Imunodetekce ubiquitinovaných proteinů epididymálních spermií z cauda epididymis pomocí primární protilátky FK2 (A); vizualizované proteiny epididymálních spermií na membráně, která byla použita pro imunodetekci (B); C – celkové proteiny, I. – cytosolická frakce, II. – membránová frakce, III. – jaderná frakce, IV. – cytoskeletální frakce, Zb. – zbytkové proteiny.



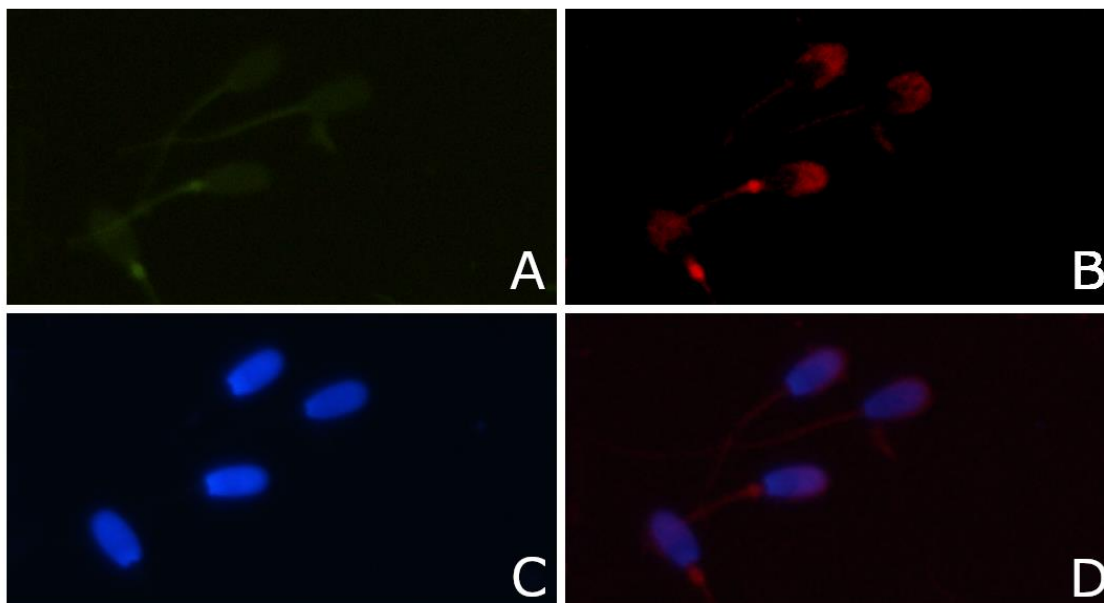
Graf 1. Relativní míra ubiquitinace proteinů epididymálních spermií z cauda epididymis vycházející z denzitometrické analýzy: I. – cytosolická frakce, II. – membránová frakce, III. – jaderná frakce, IV. – cytoskeletální frakce.

Lokalizace ubiquitinovaných proteinů byla pozorovaná i za pomoci nepřímé fluorescenční mikroskopie. Pro sledování byly použity preparáty spermií z caput a cauda epididymis, které byly připravené vlhkou fixací (kap. 4.2.2.4). Jako primární protilátka byla použita PA2 ředěná v poměru 1:50. Pro negativní kontrolu byly nářezy inkubovány pouze s PBS a sekundární protilátkou GAR 488 (zelená barva). Pro detekci akrozomu byl použit PNA lektin značený Rhodaminem (červená barva). Označení jádra bylo provedeno pomocí DAPI (modrá barva). Preparáty byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem.

U všech použitých preparátů bylo zjištěno, že použité primární protilátky nereagovaly s ubiquitinovanými proteiny. Lokalizaci ubiquitinovaných proteinů tedy nebylo možné provést ani u jedné skupiny epididymálních spermií. Jádro i akrozom spermií byly zbarveny. Na obrázku 13 je reprezentativní snímek preparátů spermií z cauda epididymis a negativní kontrola (obrázek 14).



Obrázek 13. Lokalizace ubiquitinovaných proteinů ve spermiích z cauda epididymis pozorovaná pod fluorescenčním mikroskopem. A – vazba protilátky PA2, která neoznačila žádné ubiquitinované proteiny, B – akrozomy označené lektinem PNA (červená), C – jádra označená barvivem DAPI (modrá), D – kombinovaný snímek pro celkový pohled. Zvětšení 400x.

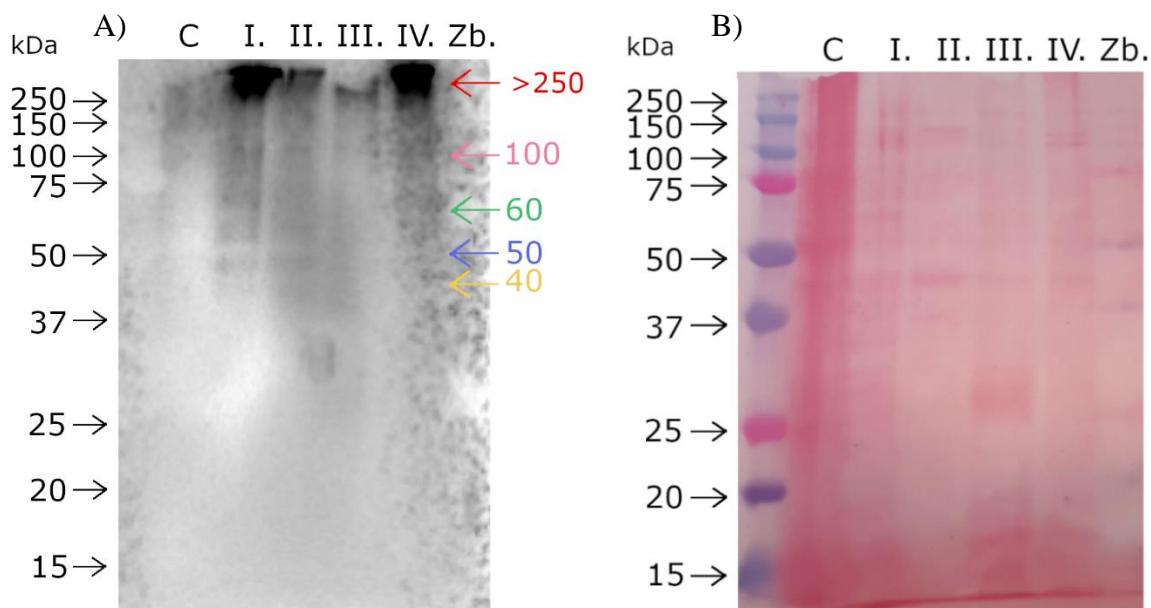


Obrázek 14. Negativní kontrola se sekundární protilátkou GAR 488. Spermie z cauda epididymis pozorované pod fluorescenčním mikroskopem. A – fluorescenční signál GAR 488 (zelená), B – akrozomy označené lektinem PNA (červená), C – jádra označená barvivem DAPI (modrá), D – kombinovaný snímek pro celkový pohled. Zvětšení 400x.

5.1.2 Detekce ubiquitovaných proteinů ejakulovaných spermií

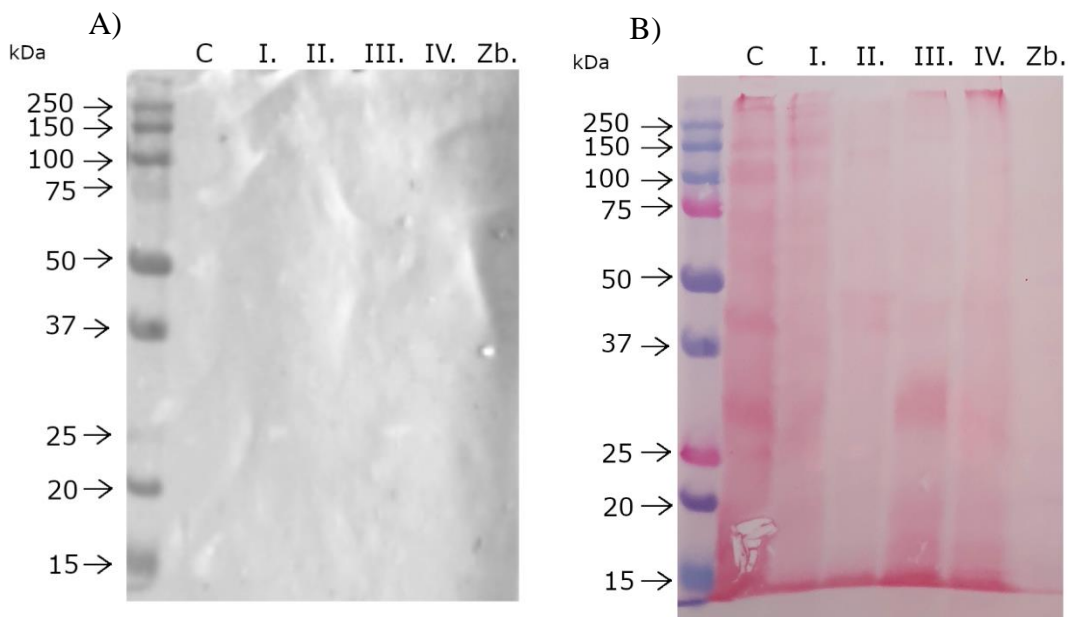
Byla zjišťována také míra ubiquitinace proteinů ejakulovaných spermií v subcelulárních frakcích. Detekce ubiquitovaných proteinů byla provedena pomocí primární protilátky FK2 (obrázek 15A). Velké množství ubiquitovaných proteinů bylo prokázáno ve vysokomolekulární oblasti nad 250 kDa ve všech čtyřech frakcích.

Nejbohatší frakce na ubiquitované proteiny byla cytoskeletální frakce a poté cytosolická frakce. V jaderné frakci bylo detekováno nejméně ubiquitovaných proteinů a v membránové frakci je viditelné mírné navýšení ubiquitinace. V tomto případě nebylo možné provést denzitometrické vyhodnocení z důvodu vysoké intenzity signálu ve vysokomolekulární oblasti.



Obrázek 15. Imunodetekce ubiquitovaných proteinů v ejakulovaných spermích pomocí primární protilátky FK2 (A), vizualizované proteiny ejakulovaných spermíí na membráně, která byla použita pro imunodetekci (B); C – celkové proteiny, I. – cytosolická frakce, II. – membránová frakce, III. – jaderná frakce, IV. – cytoskeletální frakce, Zb. – zbytkové proteiny.

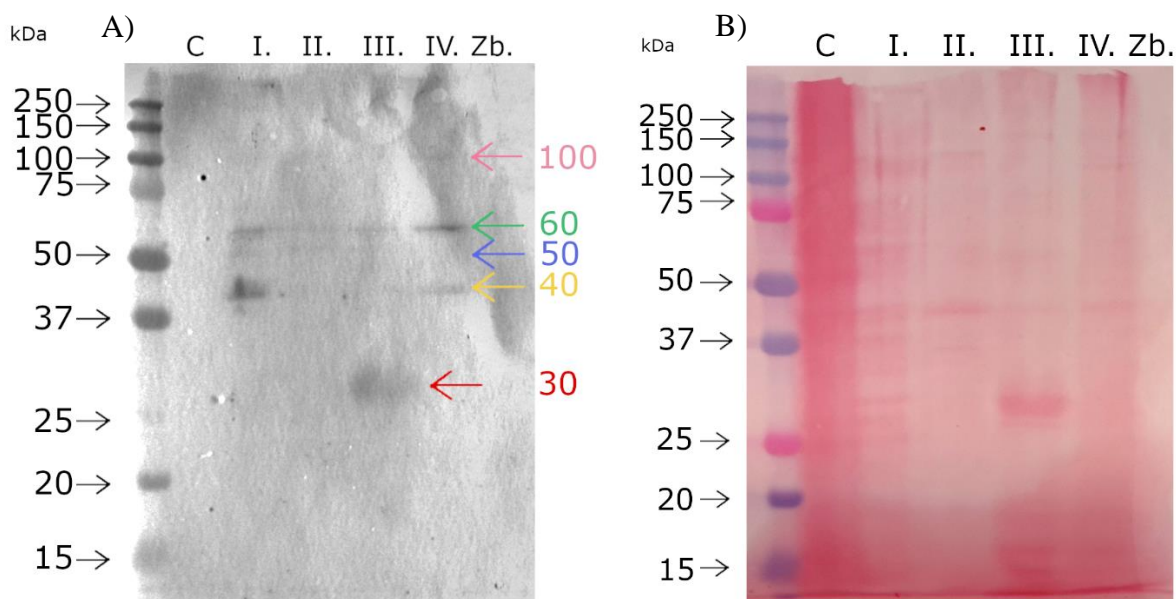
Byla provedena negativní kontrola sekundární protilátky GAM pomocí imunodetekce, kdy byly proteiny na membráně inkubovány pouze s PBS bez primární protilátky. Výsledek prokázal, že při imunodetekci nedochází k nespecifickým vazbám sekundární protilátky GAM-Px (obrázek 16A).



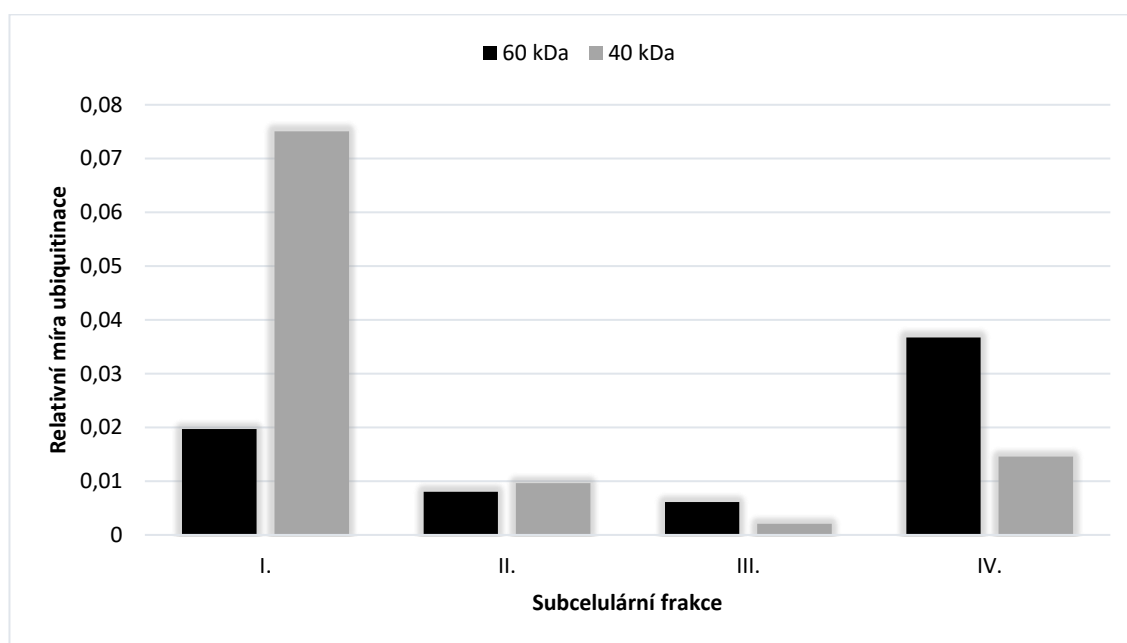
Obrázek 16. Výsledek negativní kontroly po inkubaci se sekundární protilátkou GAM-Px (A), vizualizované proteiny ejakulovaných spermií na membráně, která byla použita pro kontrolu (B); C – celkové proteiny, I. – cytosolická frakce, II. – membránová frakce, III. – jaderná frakce, IV. – cytoskeletální frakce, Zb. – zbytkové proteiny.

Detekce ubiquitovaných proteinů v subcelulárních frakcích ejakulovaných spermií byla provedena také pomocí primární protilátky PA2, která rozpoznává pouze polyubiquitinaci na proteinech. Výsledky detekce (obrázek 17A) prokázaly přítomnost ubiquitovaných proteinů. Pomocí kalibrační křivky byly určeny přibližné molekulové hmotnosti detekovaných proteinů. Ubiquitované proteiny se pohybovaly v přibližné molekulové váze 100 kDa, 60 kDa, 50 kDa, 40 kDa a 30 kDa. Ubiquitovaný protein o 30 kDa byl detekován pouze ve frakci jaderné (frakce III.), naopak 100 kDa protein byl nalezen převážně v cytoskeletální frakci IV. Protein detekovaný v mol. hm. 50 kDa chybí pouze v cytoskeletální frakci. Podobné ubiquitované proteiny byly detekovány také při použití primární protilátky FK2 (obrázek 15A).

Denzitometrickou analýzou bylo zjišťováno relativní zastoupení ubiquitovaných proteinů o molekulové váze 60 kDa a 40 kDa, které byly detekovány ve všech čtyřech subcelulárních frakcích (graf 2). Z analýzy je patrné, že nejsilnější signál vykazují proteiny v cytosolické a cytoskeletální frakci. Přičemž detekce proteinu o molekulové váze 60 kDa byla výrazně silnější v cytosolické frakci. Naopak protein o molekulární hmotnosti 40 kDa měl nejsilnější signál v cytoskeletální frakci.



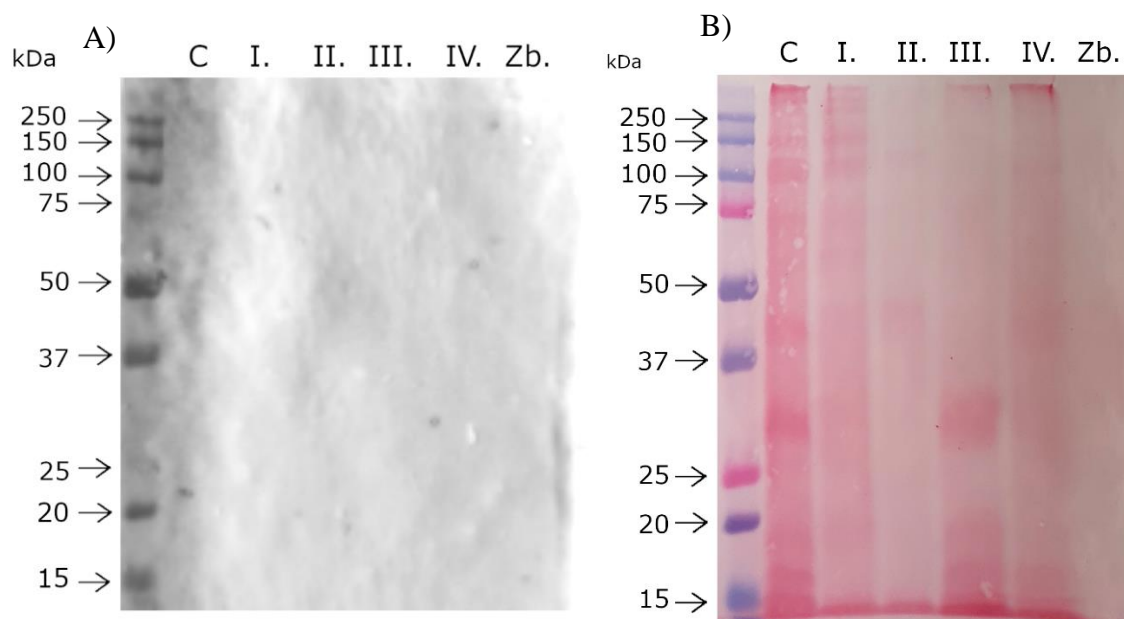
Obrázek 17. Imunodetekce ubiquitinovaných proteinů v ejakulovaných spermích pomocí primární protilátky PA2 (A), vizualizované proteiny ejakulovaných spermíí na membráně, která byla použita pro imunodetekci (B); C – celkové proteiny, I. – cytosolická frakce, II. – membránová frakce, III. – jaderná frakce, IV. – cytoskeletální frakce, Zb. – zbytkové proteiny.



Graf 2. Míra ubiquitinace proteinů detekovaných v molekulových hmotnostech 60 kDa a 40 kDa v jednotlivých subcelulárních frakcích ejakulovaných spermíí vycházející z denzitometrické analýzy. I. – cytosolická frakce, II. – membránová frakce, III. – jaderná frakce, IV. – cytoskeletální frakce.

Dále byla provedena negativní kontrola se sekundární protilátkou GAR-Px pomocí imunodetekce, kdy byly separované proteiny inkubovány pouze s PBS bez primární protilátky.

Výsledek prokázal, že při imunodetekci nedochází k nespecifickým vazbám sekundární protilátky GAR-Px (obrázek 18A).

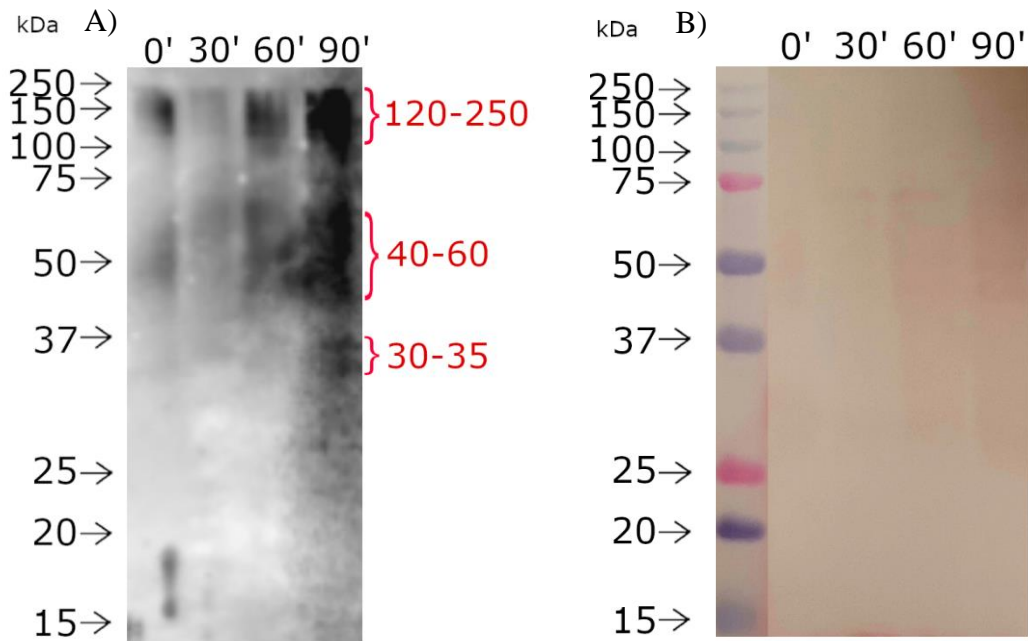


Obrázek 18. Výsledek negativní kontroly se sekundární protilátkou GAR-Px (A), vizualizované proteiny ejakulovaných spermií na membráně, která byla použita pro kontrolu (B); C – celkové proteiny, I. – cytosolická frakce, II. – membránová frakce, III. – jaderná frakce, IV. – cytoskeletální frakce, Zb. – zbytkové proteiny.

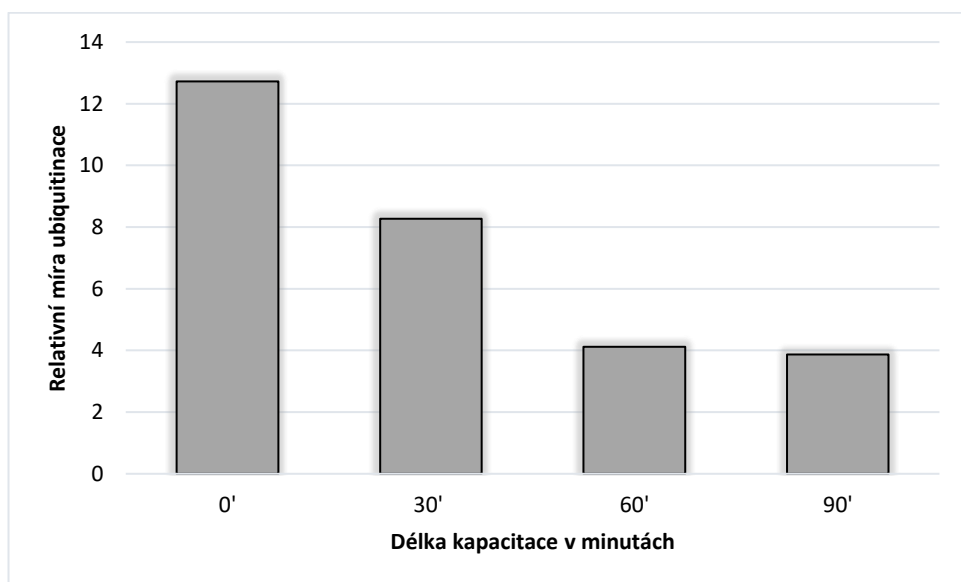
5.1.3 Sledování míry ubiquitinace povrchových proteinů u kapacitovaných spermií

V další experimentální části byla sledována míra ubiquitinace povrchových proteinů v průběhu kapacitace. Do experimentu byl zařazen vzorek ejakulovaných spermií označený jako spermie s časem kapacitace 0 minut. Dále pak spermie, které byly kapacitovány po dobu 30 minut, 60 minut a 90 minut (kap. 4.2.1.3). Ze spermií byly poté izolovány povrchové proteiny (kap. 4.2.1.4). Detekce mono- a polyubiquitinovaných povrchových proteinů kapacitovaných spermií byla provedena pomocí primární protilátky FK2. Výsledky imunodetekce (obrázek 19A) po provedení denzitometrické analýzy (graf 3) ukázaly, že míra ubiquitinace klesá společně s délkou kapacitace. Nejvíce ubiquitinovaných proteinů bylo ve vzorku ejakulovaných spermií před začátkem kapacitace. Skokově míra ubiquitinace klesla po prvních 30 minutách i po dalších 30 minutách (čas 60'). Po hodině kapacitace množství ubiquitinovaných proteinů v extraktech spermií dále klesalo pouze mírně.

Detekce ukázala, že nejvíce ubiquitinovaných povrchových proteinů se pohybovalo v rozmezí přibližné molekulové váze od 120 až po 250 kDa, dále v rozmezí mezi 40 a 60 kDa, 30 až 35 kDa (obrázek 19A).



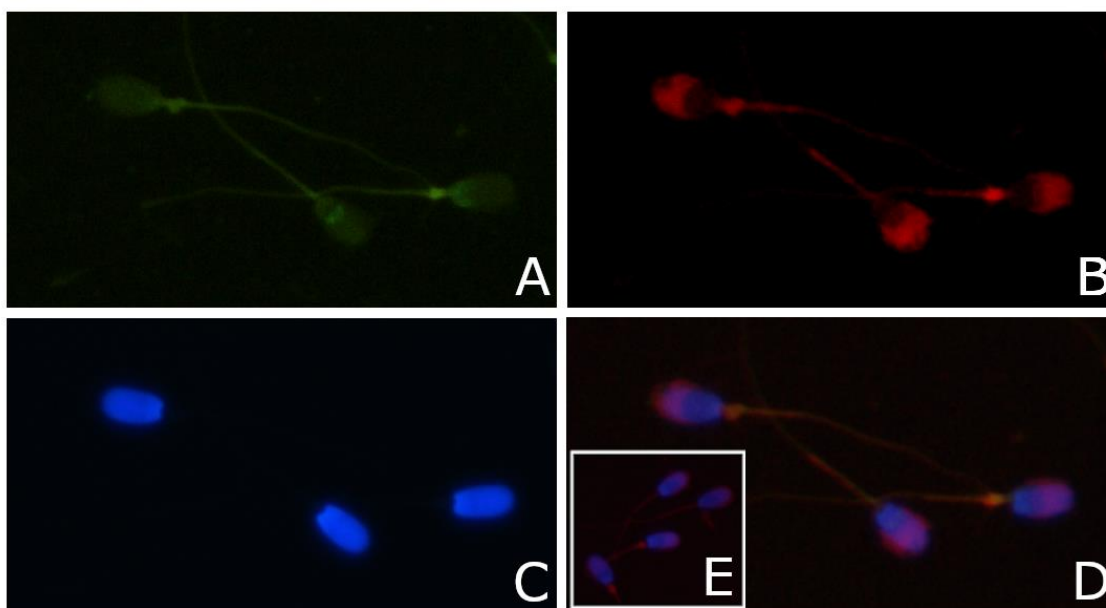
Obrázek 19. Imunodetekce ubiquitínovaných proteinů izolovaných z povrchu ejakulovaných a kapacitovaných spermií pomocí primární protilátky FK2 (A), vizualizované povrchové proteiny spermií na membráně, která byla použita pro imunodetekci (B); 0' – povrchové proteiny ejakulovaných spermií kapacitovaných 0 minut, 30' – povrchové proteiny spermií kapacitovaných po dobu 30 minut, 60' – povrchové proteiny spermií kapacitovaných po dobu 60 minut, 90' – povrchové proteiny spermií kapacitovaných po dobu 90 minut.



Graf 3. Míra ubiquitinace povrchových proteinů u kapacitovaných spermií v závislosti na délce kapacitace (0-90 min) vycházející z denzitometrické analýzy.

5.1.4 Detekce proteazomu v epididymálních a ejakulovaných spermích

Lokalizace proteazomu v epididymálních a ejakulovaných spermích byla sledována pomocí protilátky anti-Proteazom ředěné v poměru 1:50 a 1:100. V případě negativní kontroly byly nátěry inkubovány pouze s PBS a následně se sekundární protilátkou GAR 488 (zelená barva). Pro sledování přítomnosti akrozomu byl použit PNA lektin značený Rhodaminem (červená barva). Označení jádra bylo provedeno pomocí DAPI (modrá barva). Preparáty byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. V epididymálních ani ejakulovaných spermích se nepodařilo pomocí námi zvolené protilátky enzymy proteazomu lokalizovat. Na obrázku 20 je reprezentativní snímek detekce proteazomu na spermích izolovaných z cauda epididymis.



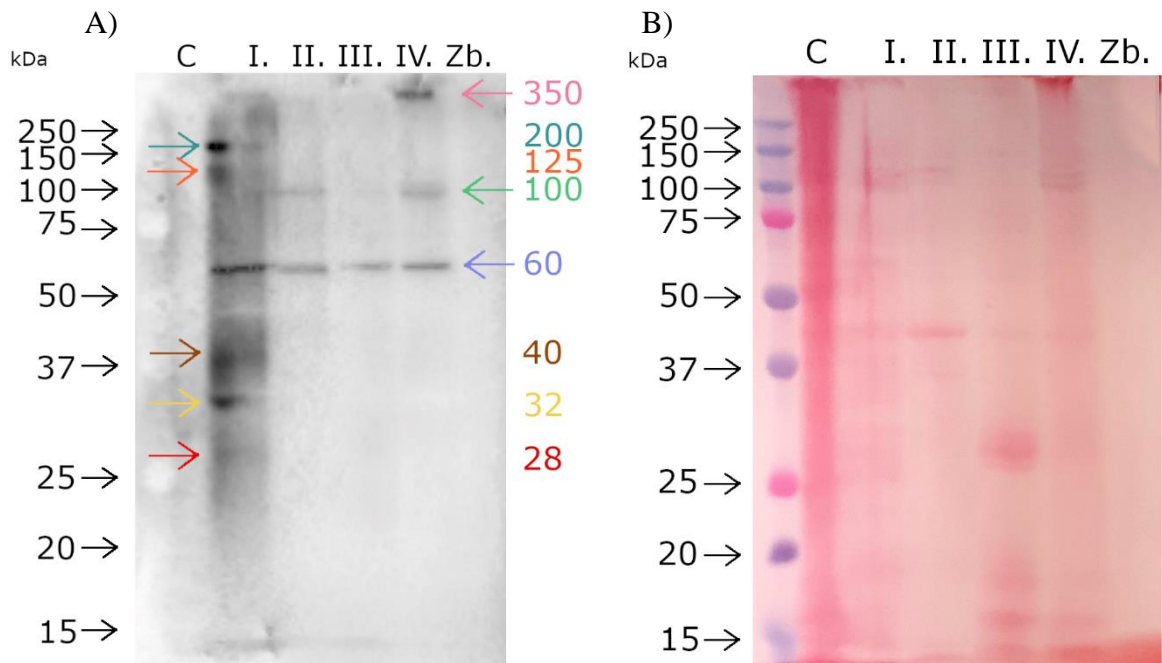
Obrázek 20. Lokalizace enzymů proteazomu ve spermích z cauda epididymis pozorovaná pod fluorescenčním mikroskopem. A – vazba protilátky anti-Proteazom ředěná v poměru 1:50, která neoznačila žádné enzymy proteazomu, B – akrozomy označené lektinem PNA (červená), C – jádra označená barvivem DAPI (modrá), D – kombinovaný snímek pro celkový pohled. E – negativní kontrola se sekundární protilátkou GAR 488. Zvětšení 400x.

Přítomnost proteazomu v ejakulovaných spermích byla sledována v subcelulárních frakcích pomocí imunodetekce. Imunodetekce byla provedena pomocí primární protilátky anti-Proteazom. Primární protilátka byla použita ve dvou koncentracích – ředění v poměru 1:250 a ředění v poměru 1:500 (obrázek 21A).

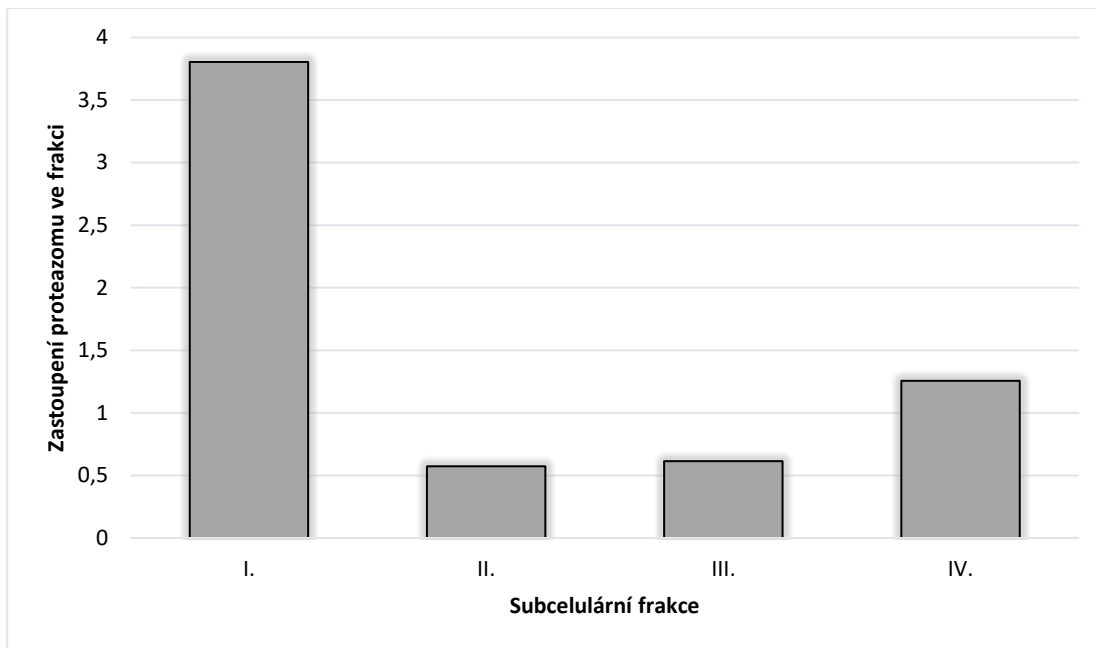
V obou případech byly v cytosolické frakci detekovány enzymy proteazomu v přibližné molekulové hmotnosti 200 kDa, 125 kDa, 100 kDa, 60 kDa, 40 kDa, 32 kDa a 28 kDa. V membránové frakci byl zachycen proteazom v přibližné molekulové váze 100 kDa a 60 kDa. V jaderné frakci byl detekován proteazom pouze v přibližné molekulové váze 100 kDa a 60 kDa.

kDa a v cytoskeletální frakci byly určeny tři proteiny proteazomu, a to o molekulové hmotnosti nad 250 kDa a dále pak ve 100 kDa a 60 kDa.

Zastoupení enzymů proteazomu v ejakulovaných spermích bylo vyhodnoceno denzitometrickou analýzou (graf 4). Nejvyšší výskyt proteazomu byl zjištěn v cytosolické frakci. V membránové a jaderné frakci byl detekován proteazom pouze v malém množství. V cytoskeletální frakci bylo zjištěno o větší množství proteazomu než u předchozích dvou frakcí.



Obrázek 21. Imunodetekce proteazomu v ejakulovaných spermích pomocí primární protilátky anti-Proteazom (ředěno 1:500) (A), vizualizované proteiny ejakulovaných spermí na membráně, která byla použita pro imunodetekci (B); C – celkové proteiny, I. – cytosolická frakce, II. – membránová frakce, III. – jaderná frakce, IV. – cytoskeletální frakce, Zb. – zbytkové proteiny.



Graf 4. Denzitometrická analýza detekce enzymů proteazomu v jednotlivých subcelulárních frakcích z ejakulovaných spermií. I. – cytosolická frakce, II. – membránová frakce, III. – jaderná frakce, IV. – cytoskeletální frakce.

6 Diskuze

Nezralé spermie musí projít složitými procesy maturace, při kterých se spermatická buňka přetváří, získává a ztrácí některé proteiny, připravuje se na akrozomální reakci a na splynutí s oocytem. V průběhu epididymální maturace a ejakulace se na spermatickou buňku váží nové proteiny. Některé z nich jsou nuceny podstoupit v průběhu kapacitace degradaci. K degradaci nepotřebných proteinů organismus využívá ubiquitin-proteazomový systém (UPS). Ten má za úkol rozpoznat nepotřebné proteiny a odstranit je. Proteiny, které mají být degradovány jsou označeny polyubiquitinovým řetězcem obsahující 4 molekuly ubiquitinu. Podle takového ubiquitinového řetězce je protein rozpoznán proteazomem a zpracován.

V průběhu posttestikulární maturace dochází k postupnému označování nežádoucích proteinů a následně k jejich degradaci za pomoci UPS. Tento proces naznačuje, že by v průběhu maturace mělo docházet ke změnám míry ubiquitinace proteinů. Otázkou zůstává, jakým způsobem se míra ubiquitinace mění v průběhu epididymální maturace, při ejakulaci a při samotné kapacitaci a na které proteiny je zaměřena.

Z našich výsledků vyplývá, že míra ubiquitinace ve spermii se během jejího průchodu epididymem navyšuje. To by mohlo znamenat, že v průběhu epididymální maturace dochází k označování více proteinů, které mají být později degradovány. Tento trend může poukazovat na to, že se v epididymu na spermatickou buňku navazují povrchové proteiny, které se z velké části mají degradovat při kapacitaci. Tímto způsobem se tedy spermie připravuje již na kapacitaci. Této skutečnosti odpovídají i naše výsledky, ve kterých je míra ubiquitinace nejvyšší právě ve spermích z cauda epididymis, kde jsou spermie uchovávány a vyčkávají na ejakulaci a následnou kapacitaci. Do výzkumu by bylo vhodné zařadit i detekci ubiquitinace pouze na povrchových proteinech buňky, avšak pro tyto účely již nebyl k dispozici potřebný biologický materiál.

Oproti našim výsledkům stojí jiné práce, které poukazují na opačný trend v míře ubiquitinace. Například v práci Sutovsky et al. (2001), která byla zaměřena na býčí spermie, bylo zjištěno, že průběhem epididymální maturace míra ubiquitinace klesá. Jev vysvětluje tím, že v epididymu dochází k selekci abnormálních spermií. Na začátku epididymální maturace, tedy v caput epididymis, je ubiquitinace nejvyšší. Nejvíce ubiquitinu bylo detekováno hlavně na povrchu spermie a na plazmatických kapkách bičíku. V caput epididymis byla ubiquitinace zjištěna i na mitochondriích. Prostupem epididymu dochází k degradaci některých takto označených spermií pomocí UPS a ubiquitin se uvolní. Tím pádem míra ubiquitinace postupně klesá v corpus epididymis a nejvíce pak v cauda epididymis. V práci je také popsáno, že i u normálních spermií byla nalezena ubiquitinace, a to uvnitř spermatické buňky. Vzhledem k takovým výsledkům by bylo dobré před naším experimentem selektovat defektní spermie a zjišťovat míru ubiquitinace jak na normálních, tak i na defektních spermích, a zjistit tak, zda se jedná o ubiquitinaci defektních spermií, nebo ubiquitinaci proteinů, které mají být v rámci přípravy na akrozomální reakci degradovány.

V práci Vernocchi et al. (2014), která byla zaměřena na změny ubiquitinace kocouřích spermií, uvádějí, že nejvíce ubiquitinovaných proteinů bylo detekováno v corpus epididymis a ve všech třech částech epididymu byly nalazeny odlišné proteiny označené ubiquitinem. Dále také potvrzují, že ubiquitinace byla detekována jak u normálních, tak i abnormálních spermií a

že v průběhu epididymální maturace ubývalo defektních spermií. Tuto skutečnost potvrdila i práce Axner et al. (1999).

Z detekce ubiquitinace v jednotlivých subcelulárních frakcích spermií z cauda epididymis je patrné, že ubiquitinace neprobíhá jen na povrchu, ale také v ostatních částech buňky, především v cytoskeletu. Odpovídají tomu naše výsledky, kdy změny ubiquitinace probíhaly v membránové frakci, což může souviset se změnami na povrchu buňky, ale také se změnami na membráně akrozomu. Změny ubiquitinace byly potvrzeny také přímo v cytoskeletální a v cytosolické frakci. Zjištěná ubiquitinace může souviset s přípravou buňky na akrozomální reakci, kdy dochází k označení proteinů, díky jejichž změně dochází k přestavbě akrozomu, a také k remodelaci samotného cytoskeletu. Vernocchi et al. (2014) ve své práci potvrzují, že ubiquitinace probíhala z velké části u proteinů, které jsou zapojeny do cytoskeletální stavby buňky. Dále detekovali ubiquitinované proteiny, které jsou důležité při přeměně plazmatické membrány a akrozomální části. Naše výsledky nejsou prokazatelné, jelikož nebyla provedena kontrola subcelulárních frakcí, které byly izolovány za pomoci komerčního kitu.

Přesnější lokalizace ubiquitinu ve spermii za pomoci imunofluorescence se bohužel nezdařila. Použitá primární protilátka PA2 na preparátech spermií neoznačila místo ubiquitinace. Důvodem může být nevhodná primární protilátka, ale také použití staršího biologického materiálu. Primární protilátka FK2, která se úspěšně vázala na ubiquitinované proteiny při imunodetekci, nebyla použita, jelikož její funkčnost při imunofluorescenci testovala již Ing. Hana Vonšovská ve své diplomové práci (2019), které se lokalizace ubiquitinu pomocí této protilátky nezdařila. Ve své práci použila protilátku NBP2 (Ubiquitin antibody NBP2-30132SS, Novus biologicals, UK), se kterou byla úspěšná. Imunofluorescenci s touto primární protilátkou by bylo vhodné zopakovat, ale protilátka již není k dispozici.

Ejakulované spermie vykazují také jistou míru ubiquitinace proteinů. Experiment byl zaměřen na zjištění, ve které části spermatické buňky ubiquitinace proteinů probíhá. Byly izolovány subcelulární frakce, ze kterých bylo zjištěno, že nejvíce ubiquitinu je soustředěno v cytoskeletální a cytosolické frakci. Výsledky naznačují, že ubiquitinace probíhá především na strukturních proteinech.

Pro porovnání byly použity dvě primární protilátky, a to FK2, která značí monoubiquitinované i polyubiquitinované řetězce, a PA2, která značí pouze polyubiquitinované řetězce. S jistotou můžeme říct, že FK2 označila proteiny s jednou molekulou ubiquitinu ve vysokomolekulární hmotnosti nad 150 kDa, jelikož při použití druhé protilátky PA2 nebyly v této oblasti detekovány žádné proteiny. Tudíž tyto označené proteiny nesouvisí s ubiquitinací za účelem degradace proteinů. Pokud by měl být protein degradován, musí mít na sobě navázány 4 molekuly ubiquitinu, aby jej proteazom rozpoznal. I když Horak & Wolf (2001) uvádějí, že monoubiquitinace proteinů u bakterií může být dostatečná k označení proteinového substrátu pro proteolýzu. Proteiny s polyubiquitinovým řetězcem mohou být v našich výsledcích v rozmezí od 100 kDa po 30 kDa, konkrétně 100 kDa, 60 kDa, 50 kDa, 40 kDa a 30 kDa. V tomto rozmezí jsou totiž detekovány proteiny pomocí PA2, tudíž proteiny s polyubiquitinovým řetězcem. Ostatní detekované proteiny, které jsou označeny pomocí protilátky FK2, mají pravděpodobně navázanou pouze jednu molekulu ubiquitinu.

Z výsledků vyplývá, že se jedná o cytoskeletální proteiny. Je však složité určit, zda se jedná o proteiny s jednou, dvěma, třemi nebo čtyřmi molekulami ubiquitinu, a proto nemůžeme určit s jistotou, o které proteiny se přesně se jedná. Další faktor, kvůli kterému je určení proteinů složité, je skutečnost, že detekované proteiny ve stejné molekulové váze v různých frakcích nemusí být vždy totožné proteiny. V práci Dvořáková et al. (2005) byly detekovány cytoskeletální proteiny spermií u několika druhů savců. Konkrétně se jednalo o α -tubulin, který byl zjištěn v molekulární hmotnosti 55 kDa, dále pak aktin, který byl detekován ve 42 kDa a následně spektrin (α a β) ve 240 a ve 220 kDa. V součtu s možnými připojenými molekulami ubiquitinu by mohly výše uvedené proteiny odpovídat detekovaným proteinům v naší práci. Můžeme tedy jen odhadovat, že námi nalezené ubiquitinové proteiny mohly být tubulin, aktin či spektrin.

V dalších pracích, které se zabývaly ubiquitinací proteinů ejakulovaných spermií, je ubiquitinace opět spojována s označením defektních spermií. Sutovsky et al. (2001) prokázal opět přítomnost ubiquitinu na povrchu zjevně abnormálních býčích spermií, které měly viditelné defekty hlaviček nebo axonemy nebo měly zdvojené hlavičky či bičíky. Práce Kustera et al. (2004) prokázala vyšší míru ubiquitinace u vzorků s vyšším podílem defektních kančích spermií (konkrétně spermií s distální protoplazmatickou kapkou) než u vzorku s normálními spermiemi. Sutovsky et al. (2001) navrhuje, že by míra ubiquitinace mohla být dobrým markerem při zjišťování infertility mužů, avšak problémem zůstává ubiquitinace i dobrých spermií.

Míru ubiquitinace jsme zjišťovali také u *in vitro* kapacitovaných spermií. Zkoumány byly pouze izolované povrchové proteiny spermií. Povrchové proteiny, které spermatická buňka získává průchodem epididymis a při ejakulaci, jsou označovány polyubiquitinovým řetězcem a jsou v průběhu kapacitace degradovány pomocí UPS (Matějíková et al. 2013). Jelikož UPS při své činnosti odstraňuje ubiquitin navázaný na proteiny, lze tedy usuzovat, že by ubiquitinace v průběhu kapacitace měla klesat. Toto tvrzení se v našich výsledcích potvrzuje.

V našem srovnání proteinů z povrchu ejakulovaných spermií s *in vitro* kapacitovanými spermiemi je vidět snižující se míra ubiquitinace. Čím déle kapacitace probíhá, tím více se ubiquitinace proteinů vytrácí. Největší rozdíly jsou patrné mezi ejakulovanými a spermiemi kapacitovanými po dobu 30 minut. Další skok je mezi 30 minutami a 60 minutami kapacitace. Po 60 minutách kapacitace již pokles ubiquitinu v buňkách není tak výrazný. Ubiquitinované proteiny jsou tedy v průběhu kapacitace zřejmě degradovány proteazomem.

O jaké proteiny se přesně jedná, je opět složité určit. Avšak v práci Zigo et al. (2019a) bylo prokázáno, že během kapacitace dochází k degradaci povrchových proteinů pocházejících především ze semenné plazmy - AQN, AWN, DQH a PSP. Tyto proteiny se pravděpodobně vyskytují ve formě větších komplexů (Maňásková et al. 2000) a bylo zjištěno, že během kapacitace dochází k jejich deagregaci (Zigo et al. 2019a). Proteiny semenné plazmy se pohybují v přibližné molekulové hmotnosti 12 až 16 kDa. Pokud se k takovým molekulovým vahám přičte váha čtyř molekul ubiquitinu, tedy 34 kDa, výsledná velikost by se pohybovala v rozmezí odpovídajícím našim detekovaným proteinům (40 – 60 kDa). V práci Yi et al. (2012) bylo potvrzeno, že dochází k ubiquitinaci AQN1 ještě před kapacitací a byla popsána

detekce AQN1 ubiquitovaného proteinu i ve vyšších molekulárních hmotnostech. To by mohlo vysvětlovat naši detekci proteinů ubiquitovaných proteinů povrchu spermií ve vysokomolekulární oblasti.

Zigo et al. (2019a) dále potvrzují, že role UPS v degradaci povrchových proteinů hrají důležitou roli. Degradace dále vede k akrozomální reakci a k uvolnění spermií z ovidukálního rezervoáru (Zimmerman & Sutovsky, 2009). To také bylo potvrzeno v další práci Ziga et al. (2019b), ve které byla činnost proteazomu inhibována. U spermií s nefunkčním proteazomem nedošlo k odstranění povrchových spermií, zpomalila se remodelace vnější akrozomální membrány, a tudíž nedošlo k akrozomální reakci. Tvrzení podporuje i práce Morales et al. (2004), kteří vysvětlují činnost proteazomu jako nedílnou součást kapacity, která vede k akrozomální reakci také u lidských spermií.

V další části práce jsme se snažili lokalizovat podjednotky proteazomu ve spermatické buňce. Imunodetekce zachytila proteiny o molekulární hmotnosti 350 kDa, 200 kDa, 125 kDa, 100 kDa, 60 kDa, 40 kDa, 32 kDa a 28 kDa. Tanahashi et al. (1993), Tanaka & Tsurumi (1997) a Hayter et al. (2005) se shodují, že podjednotky 20S proteazomu se pohybují v přibližné molekulové váze v rozmezí 21 – 32 kDa. V naší práci jsme v těchto hodnotách detekovali proteiny pouze v cytosolické frakci. Tanahashi et al. (1993) a Tanaka (2009) zhodnotili ve svých výzkumech molekulární váhu podjednotek 19S proteazomu. Podle jejich prací by se měla pohybovat v rozmezí 30 – 110 kDa. Sutovsky (2011) ve své práci zmiňuje alternativní víko PA200, který funguje jako aktivátor pro 20S proteazom v nepřítomnosti 19S proteazomu. Molekulární hmotnost PA200 se pohybuje okolo 200 kDa.

Primární protilátka, která byla použita v našem experimentu, by měla detekovat pouze podjednotky 20S proteazomu, tedy 21 – 32 kDa. V tomto rozmezí se přítomnost 20S proteazomu v našich výsledcích potvrdila. Otázkou zůstává, které proteiny jsou detekovány ve vyšších molekulárních hmotnostech. Nabízí se možnost, že použitá primární protilátka označila i podjednotky 19S proteazomu. Ovšem problém může být i s druhovou specifikou. Anti-Proteazom rozpoznává podjednotky proteazomu člověka, králíka, myši a křavy. Nemůžeme tedy s jistotou říct, že detekované proteiny byly skutečně podjednotky proteazomu. Protilátka anti-Proteazom byla použita i k lokalizaci proteazomálních proteinů ve spermii za pomoci imunofluorescence. Detekce nebyla úspěšná, nejspíše z důvodu použití nevhodné primární protilátky nebo použití staršího biologického materiálu.

Podle denzitometrické analýzy bylo nejvíce proteazomálních proteinů označeno v cytosolické frakci. Morales et al. (2004) detekovali proteazom na vnější i vnitřní membráně akrozomu a v matici akrozomu. Yi et al. (2010) se zaměřili na lokalizaci pouze podjednotek 19S proteazomu. Detekovali podjednotku Rpn12 na vnější i vnitřní akrozomové membráně a v matici akrozomu. Pro další experimenty zaměřené na lokalizaci proteazomu by bylo vhodné použít i specifickou primární protilátku pro podjednotky 19S proteazomu a porovnat se zjištěnými údaji.

7 Závěr

Základem práce byla hypotéza, že míra ubiquitinace proteinů spermií se bude měnit během jejich epididymální maturace a během *in vitro* kapacitace. Ověření hypotézy proběhlo pomocí imunodetekce primární protilátkou detekující ubiquitinové řetězce. Výsledky naší práce potvrdily, že se v obou případech ubiquitinace mění. Spermie izolované z caput epididymis vykazovaly menší míru ubiquitinace než spermie izolované z cauda epididymis. Nabízí se vysvětlení, že průchodem epididymis jsou ubiquitinovány proteiny, které mají být v průběhu kapacitace degradovány. U povrchových proteinů získaných z kapacitovaných spermií se prokázal opačný trend, a sice pokles míry ubiquitinace v průběhu času kapacitace. Pravděpodobným důvodem poklesu ubiquitinace je zpracování ubiquitinovaných proteinů pomocí UPS, který proteiny degraduje a uvolní z nich vázaný ubiquitin.

Cílem práce byla lokalizace ubiquitinovaných proteinů spermií za pomoci imunodetekce ubiquitinovaných řetězců v subcelulárních frakcích spermií. U epididymálních spermií byly nalezeny ubiquitinované proteiny především v cytoskeletální a cytosolické frakci. Takové výsledky ukazují na přípravu epididymálních spermií na remodelaci akrozomu a následně na akrozomovou reakci. Ubiquitinace se také prokázala v membránové frakci, což může souviset s označením povrchových proteinů, které podléhají degradaci v průběhu kapacitace. K upřesnění, zda se jedná skutečně o povrchové proteiny, by bylo vhodné provést detekci ubiquitinovaných proteinů na izolovaných povrchových proteinech epididymálních spermií. U ejakulovaných spermií byla prokázána vysoká míra ubiquitinace především v cytosolické frakci a částečně i v cytoskeletální frakci. Výsledky by mohly souviset s přípravou buňky na akrozomální reakci. Ubiquitinovány byly pravděpodobně cytoskeletální proteiny, a to tubulin, aktin nebo spektrin. U kapacitovaných spermií nebyla provedena subcelulární frakcionace buněk, ale byly izolovány pouze povrchové proteiny spermií, kde by mohly být ubiquitinovány proteiny pocházející ze semenné plazmy.

Součástí našich experimentů byla i lokalizace proteazomu v epididymálních a ejakulovaných spermiích pomocí protilátky detekující podjednotky 20S proteazomu. Pomocí námi zvolené protilátky se nepodařilo detekovat enzymy proteazomu na spermiích. Protilátka však značila enzymy proteazomu v subcelulárních frakcích získaných z ejakulovaných spermií. Podjednotky byly detekovány především v cytosolické frakci. Pro přesnější lokalizaci by bylo vhodné v dalších výzkumech použít specifickou protilátku vyhledávající i podjednotky 19S proteazomu. Všechny provedené experimenty by bylo dobré několikrát zopakovat pro získání více dat k statistickému vyhodnocení.

8 Literatura

- Afzelius B. 1959. Electron Microscopy of the Sperm Tail. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 5 (2): 269-278.
- Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE. 2008. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *The International of Development Biology* 52: 463-472.
- Axnér E, Linde-Forsberg C, Einarsson S. 1999. Morphology and Motility of Spermatozoa From Different Regions Of The Epididymal Duct in the Domestic Cat. *Theriogenology* 52: 767-778.
- Bailey JL. 2010. Factors Regulating Sperm Capacitation. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 56: 334-348.
- Baska KM, Manandhar G, Feng D, Agca Y, Tengowski MW, Sutovsky M, Yi Y-J, Sutovsky P. 2008. Mechanism of Extracellular Ubiquitination in the Mammalian Epididymis. *Journal of Cellular Physiology* 215: 684-696.
- Berndtson WE. 2014. Sperm Production and its Harvest. Pages 11-33 in: Chenoweth PJ, Lorton SP, editors. *Animal Andrology: theories and applications*. Wallingford, Oxfordshire.
- Brewis IA, Gadella BM. 2010. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Molecular Human Reproduction* 16(2): 68–79.
- Brohi RD, Huo L-J. 2017. Posttranslational Modifications in Spermatozoa and Effects on Male Fertility and Sperm Viability. *Journal of Integrative Biology* 21(5): 245-256.
- Buffone MG, Ijiri TW, Cao W, Merdiushev T, Aghajanian HK, Gerton GL. 2012. Heads or Tails? Structural Events and Molecular Mechanisms That Promote Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis and Motility. *Molecular Reproduction and Development* 79(1): 4-18.
- Caballero J, Frenette G, Sullivan R. 2011. Post Testicular SpermMaturational Changes in the Bull: Important Role of the Epididymosomes and Prostatosomes. *Veterinary Medicine International* 2011: 1-13.
- Champroux A, Torres-Carreira J, Gharagozloo P, Drevet JR, Kocer A. 2016. Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic and Clinical Andrology* 26(17): 1-22.
- Cheng FP, Fazeli AR, Voorhout WF, Tremoleda JL, Bevers MM, Colenbrander B. 1998. Progesterone in mare follicular fluid induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa and enhances in vitro binding to the zona pellucida. *International journal of andrology* 21: 57-66.
- Dacheux JL, Dacheux F, Paquignon M. 1989. Changes in Sperm Surface Membrane and Luminal Protein Fluid Content During Epididymal Transit in the Boar. *Biology of Reproduction* 40: 635-651.

- Dacheux JL, Castella S, Gatti JC, Dacheux F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 63: 319–341.
- 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: 197–210.
- Dvořáková K, Moore HDM, Šebková N, Paleček J. 2005. Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction* 130(1): 61-69.
- Ensslin M, Vogel T, Calvete JJ, Thole HH, Schmidtke J, Matsuda T, Töpfer-Petersen E. 1998. Molecular Cloning And Characterization Of P47, A Novel Boar Sperm-Associated Zona Pellucida-Binding Protein Homologous To A Family Of Mammalian Secretory Proteins. *Biology Of Reproduction* 58: 1057-1064.
- Evans JP. 2002. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Hum Reprod Update* 8(4): 297-311.
- Fayomi AP, Orwig KE. 2018. Spermatogonial Stem Cells and Spermatogenesis in Mice, Monkeys and Men. *Stem Cell Research* 29: 207-214.
- Ferramosca A, Zara V. 2014. Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2014: 1-8.
- Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. 2008. Regulating the acrosome reaction. *The International of Development Biology* 52: 503-510.
- Florman HM, Fissore RA. 2015. Fertilization in Mammals. Pages 149-196 in: Plant TM, Zeleznik AJ, editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, London.
- Frenette G, Sullivan R. 2001. Protasome-Like Particles are Involved in the Transfer of P25b from the Bovine Epididymal Fluid to the Sperm Surface. *Molecular Reproduction and Development* 59: 115-121.
- Gadella BM. 2014. Sperm Preparation for Fertilization. Pages 57-75 in: Chenoweth PJ, Lorton SP, editors. *Animal Andrology: theories and applications*. Wallingford, Oxfordshire.
- Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Métayer S, Thimon V, Dacheux JL. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science* 82: 321-339.
- Gervasi MG, Visconti PE. 2016. Chang's Meaning Of Capacitation: A Molecular Perspective. *Molecular Reproduction And Development* 83: 860-874.
- Glickman MH, Ciechanover A. 2002. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake Of Construction. *Physiological Reviews* 82: 373-428.
- Guraya SS. 1987. *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. ISBN 978-3-642-71638-6.
- Hayter JR, Doherty MK, Whitehead C, McCormack H, Gaskell SJ, Beynon RJ. 2004. The Subunit Structure and Dynamics of the 20S Proteasome in Chicken Skeletal Muscle. *Molecular & Cellular Proteomics* 4.9: 1370-1381.

- Hofmann M. 2008. Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Molecular and Cellular Endocrinology* 288(1-2): 95-103.
- Horak J, Wolf DH. 2001. Glucose-induced monoubiquitination of the *Saccharomyces cerevisiae* galactose transporter is sufficient to signal its internalization. *Journal of Bacteriology* 183: 3083–3088.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. 2005. The Immunoglobulin Superfamily Protein Izumo is Required for Sperm to Fuse with Eggs. *Nature* 434: 234-238.
- Jenkins AD, Lechene CP, Howards SS. 1980. Concentrations of Seven Elements in the Intraluminal Fluids of the Rat Seminiferous Tubules, Rete Testis, and Epididymis. *Biology of Reproduction* 23: 981-987.
- Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the *zona pellucida* during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Science* 108(12): 4892-1896.
- Jones RC. 1999. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *International Journal of Andrology* 22: 57-67.
- Kerns K, Morales P, Sutovsky P. 2016. Regulation of Sperm Capacitation by the 26S Proteasome: An Emerging New Paradigm in Spermatology. *Biology of Reproduction* 94(5): 1-9.
- Kong M, Diaz ES, Morales P. 2009. Participation of the Human Sperm Proteasome in the Capacitation Process and Its Regulation by Protein Kinase A and Tyrosine Kinase. *Biology Of Reproduction* 80: 1026–1035.
- Kretser de DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Human Reproduction* 13(1): 1-8.
- Krutsikh A, Poliandri A, Cabrera-Sharp V, Dacheux JL, Poutanen M, Huhtaniemi I. 2012. Epididymal protein Rnase10 is required for posttesticular sperm maturation and male fertility. *The FASEB Journal* 26: 4198-4209.
- Kuster CA, Hess RA, Althouse GC. 2004. Immunofluorescence Reveals Ubiquitination Of Retained Distal Cytoplasmic Droplets On Ejaculated Porcine Spermatozoa. *Journal Of Andrology* 25(3): 340-347.
- Li Ch-J, Wang D, Zhou X. 2016. Sperm proteome and reproductive technologies in mammals. *Animal Reproduction Science* 173: 1-7.
- Leemans B, Stout TAE, De Schauwer C, Heras S, Nelis H, Hoogewijs M, Van Soom A, Gadella BM. 2019. Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species? *Reproduction* 157: 181-197.
- Lehti MS, Sironen A. 2017. Formation and Function of Sperm Tail Structures in Association with Sperm Motility Defects. *Biology of Reproduction* 97(4): 522-536.

- Maňásková P, Liberda J, Tichá M, Jonáková V. 2000. Aggregated and monomeric forms of proteins in boar seminal plasma: characterization and binding properties. *Folia Biologica (Praha)* 46(4): 143-151.
- Matějčíková J, Kubiczková L, Sedlaříková L, Potáčová A, Hájek R, Ševčíková S. 2013. Degradace proteinů ubikvitin-proteazomovou dráhou. *Klin Onkol* 26(4): 251-256.
- Martínez P, Morros A. Membrane Lipid Dynamics During Human Sperm Capacitation. 1996. *Frontiers in Bioscience* 1: 103-117.
- Melendrez CS, Meizel S. 1995. Studies of Porcine and Human Sperm Suggesting a Role for a Sperm Glycine Receptor/Cl⁻ Channel in the Zona Pellucida-Initiated Acrosome Reaction. *Biology of Reproduction* 53: 676-683.
- Mochida K, Tres LL, Kierszenbaum AL. 2000. Structural Features of the 26S Proteasome Complex Isolated from Rat Testis and Sperm Tail. *Molecular Reproduction and Development* 57: 176-184.
- Morales P, Llanos M. 1996. Interaction Human Spermatozoa with the *Zona Pellucida* of Oocyte: Development of the Acrosome Reaction. *Frontiers in Bioscience* 1: 146-160.
- Morales P, Pizarro E, Kong M, Jara M. Extracellular localization of proteasomes in human sperm. *Molecular Reproduction and Development*. 2004 May;68(1):115-124
- Moura AA, Memili E. 2016. Functional aspects of seminal plasma and sperm proteins and their potential as molecular markers of fertility. *Animal Reproduction* 13(3): 191-199.
- Naz RN, Rajesh PB. 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2(75): 1-12.
- Nixon B, Ewen KA, Krivanek KM, Clulow J, Kidd G, Ecroyd H, Jones RC. 2014. Post-testicular sperm maturation and identification of an epididymal protein in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reproduction* 147: 265-277.
- Oliva R, Mateo de S, Estanyol JM. 2009. Sperm cell proteomics. *Proteomics* 9: 1004–1017.
- Olson GE, NagDas SK, Winfrey VP. 2002. Structural Differentiation of Spermatozoa During Post-Testicular Maturation. Pages 371-387 in Cheng CY, editor. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. Springer, Boston.
- Ounjai P, Kim KD, Lishko PV, Downing KH. 2012. Three-Dimensional Structure of the Bovine Sperm Connecting Piece Revealed by Electron Cryotomography. *Biology Of Reproduction* 87(3): 1-9.
- Parrilla I, Perez-Pati C, Li J, Barranco I, Padilla L, Rodriguez-Martinez H, Martinez EA, Roca J. 2019. Boar semen proteomics and sperm preservation. *Theriogenology* 137: 23-29.
- Pesch S, Bergmann M. 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respectto viability, fertility and cryopreservation. *Micron* 37: 597-612.
- Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society* 365: 1663-1678.

- Rawe VY, Díaz ES, Abdelmassih R, Wójcik C, Morales P, Sutovsky P, Chemes HE. 2008. The role of sperm proteasomes during sperm aster formation and early zygote development: implications for fertilization failure in humans. *Human Reproduction* 23 (3): 573-580.
- Robaire B, Hinton BT. 2015. The Epididymis. Pages 691-772 in: Plant TM, Zeleznik AJ, editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, London.
- Roosen-Runge EC. 1977. *The Process of Spermatogenesis in Animals*. Cambridge University Press. ISBN 0521212332.
- Saez F, Frenette G, Sullivan R. 2003. Epididymosomes and Prostatosomes: Their Roles in Posttesticular Maturation of the Sperm Cells. *Journal of Andrology* 24(2): 149-154.
- Saez F, Sullivan R. 2016. Prostatosomes, post-testicular sperm maturation and fertility. *Frontiers in Bioscience* 21: 1464-1473.
- Sakkas D, Mariethoz E, John JC. 1999. Abnormal Sperm Parameters in Humans Are Indicative of an Abortive Apoptotic Mechanism Linked to the Fas-Mediated Pathway. *Experimental Cell Research* 251: 350-355.
- Souza APB, Schorr-Lenz AM, Lucca F, Bustamante-Filho IC. 2017. The epididymis and its role on sperm quality and male fertility. *Animal Reproduction* 14(1): 1234-1244.
- Spungin B, Margalit I, Breitbart H. 1995. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *Journal of Cell Science* 8: 2525-2535.
- Sullivan R, Frenette G, Girouard J. 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian Journal of Andrology* 9(4): 483-491.
- 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.
- Sutovsky P. 2003. Ubiquitin-Dependent Proteolysis in Mammalian Spermatogenesis, Fertilization, and Sperm Quality Control: Killing Three Birds with One Stone. *Microscopy Research and Technique* 61: 88-102.
- Sutovsky P, Manandhar G, McCauley TC, Caamano JN, Sutovsky M, Thompson WE, Day BN. 2004. Proteasomal Interference Prevents Zona Pellucida Penetration and Fertilization in Mammals. *Biology of Reproduction* 71: 1625-1637.
- Sutovsky P, Manandhar G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. Pages 1-30 in: Jonge De Ch., Barratt Ch, editors. *The Sperm Cell*.
- Sutovsky P. 2011. Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction* 142: 1-14.
- Sutovsky P. 2018. Review: Sperm–oocyte interactions and their implications for bull fertility, with emphasis on the ubiquitin–proteasome system. *Animal* 12(S1): 121-132.
- Tanahashi N, Tsurumi C, Tamura T, Tanaka K. 1993. Molecular Structures of 20S and 26S Proteasomes. *Enzyme Protein* 47: 241-251.

- Tanaka K, Tsurumi C. 1997. The 26S proteasome: subunits and functions. *Molecular Biology Reports* 24: 3-11.
- Tanaka, K. 2009. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 85: 12-36.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete JJ. 1998. Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *ANDROLOGIA* 30: 217-224.
- Toshimori K. 1998. Maturation of Mammalian Spermatozoa: Modifications of the Acrosome and Plasma Membrane Leading to Fertilization. *Cell and Tissue Research* 293: 177-187.
- Toshimori K, Ito Ch. 2003. Formation and Organization of the Mammalian Sperm Head. *Archives of Histology and Cytology* 66(5): 383-396.
- Toshimori K. 2009. Dynamics of the Mammalian Sperm Head: Modifications and Maturation Events from Spermatogenesis to Egg Activation. *Advances In Anatomy, Embryology and Cell Biology*. Springer. ISBN 978-3-540-89978-5.
- Toshimori K, Eddy EM. 2015. The Spermatozoon. Pages 99-148 in: Plant TM, Zeleznik AJ, editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, London.
- Tulsiani DRP, Abou-Haila A. 2012. Biological Processes that Prepare Mammalian Spermatozoa to Interact with an Egg and Fertilize It. *Scientifica* 2012: 1-12.
- Vernocchi V, Morselli MG, Varesi S, Nonnis S, Maffioli E, Negri A, Tedeschi G, Luvoni GC. 2014. Sperm ubiquitination in epididymal feline semen. *Theriogenology* 82(4): 636-642.
- Vonšovská H. 2019. Vliv inhibice proteasomu na degradaci proteinů kančích spermií během in vitro kapacitace [MSc. Thesis]. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Whitfield M, Pollet-Villard X, Levy R, Drevet JR, Saez F. 2015. Posttesticular sperm maturation, infertility, and Hypercholesterolemia. *Asian Journal of Andrology* 17: 742-748.
- Yanagimachi R. 1981. Mechanisms of Fertilization in Mammals. Pages 81-182 in Cherr GN, Drobnis EZ, editors. *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. Springer, Boston.
- Yi YJ, Manandhar G, Sutovsky M, Jonakova V, Park Ch-S, Sutovsky P. 2010. Inhibition of 19S proteasomal regulatory complex subunit PSMD8 increases polyspermy during porcine fertilization in vitro. *Journal of Reproductive Immunology* 84: 154-163.
- Yi Y-J, Zimmerman S, 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.
- Zaneveld LJD, Jonge De J. 1991. Mammalian Sperm Acrosomal Enzymes and the Acrosome Reaction. Pages 63-79 in: Dunbar BS, O'Rand MG. *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*. Springer US, New York.

- Zigo M, Jonáková V, Šulc M, Maňásková-Postlerová P. 2013. Characterization of sperm surface protein patterns of ejaculated and capacitated boar sperm, with the detection of ZP binding candidates. *International Journal of Biological Macromolecules* 61: 322-328.
- Zigo M, Jonakova V, Manaskova-Postlerova P, Kerns K, Sutovsky P. 2019a. Ubiquitin-proteasome system participates in the de-aggregation of spermadhesins and DQH protein during boar sperm capacitation. *Reproduction* 157: 283-295.
- Zigo M, Manaskova-Postlerova P, Jonakova V, Kerns K, Sutovsky P. 2019b. Compartmentalization of the proteasome-interacting proteins during sperm capacitation. *Scientific Reports* 9: 1-18.
- 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* 2020: 1-26.
- Zimmerman S, Sutovsky P. 2009. The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization. *Journal of Reproductive Immunology* 83: 19-25.
- Zwickl P, Voges D, Baumeister W. 1999. The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 354: 1501-1511.

