

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Tyrosinová fosforylace býčích spermií ve vztahu k jejich
kryokonzervaci**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Hana Baťková

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: Ing. Ondřej Šimoník

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Tyrosinová fosforylace býčích spermií ve vztahu k jejich kryokonzervaci" 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 13. 4. 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ondrovi Šimoníkovi za cenné rady, odborné vedení a vynaložený čas při zpracování této diplomové práce.

Tyrosinová fosforylace býčích spermií ve vztahu k jejich kryokonzervaci

Souhrn

K oplození schopnosti býčích spermií je nezbytné, aby podstoupily kapacitaci a s ní spojené biochemické a biofyzikální dráhy probíhající na plazmatické membráně a uvnitř spermie. Mezi tyto dráhy patří tyrosinová fosforylace (PTP), akrozomová reakce a hyperaktivace. Tyrosinová fosforylace je jeden z nejvyužívanějších a nejlepších markerů kapacity. Pro spuštění tyrosinové fosforylace je nezbytný influx extracelulárního vápníku a hydrogenuhličitanu a eflux cholesterolu z plazmatické membrány. Vápník a hydrogenuhličitan spustí dráhu přes rozpustnou adenyl cyklázu (sAC), cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), protein kinázu A (PKA) až po fosforylaci tyrosin kynázy za pomoci ATP a NO. Takto probíhají dráhy vedoucí ke kapacitaci za fyziologických podmínek. Pokud spermie vystavíme kryokonzervaci, jsou především narušeny struktury na plazmatické membráně a následně spuštěny chybné procesy a může být také zahájena předčasná kapacitace. Kryokapacitace je nežádoucí, protože spermie poté mají sníženou životaschopnost a fertilizaci. Obsahem této práce je literární rešerže popisující stavbu býčí spermie, proces kapacity a kryokonzervaci a její vlivy na spermie. Cílem experimentální části práce bylo zjistit rozdíly v tyrosinové fosforylaci mezi nativními spermii a po kryokonzervaci. Byl stanoven předpoklad, že kryokonzervace bude ovlivňovat výši PTP jako jednoho z markerů kapacity.

Ejakulát byl odebírán šesti býkům standardním způsobem na inseminační stanici. Nativní ejakulát i kryokonzervovaný byl následně použit pro nepřímou imunofluorescenční metodu stanovení TyrP a k extrakci proteinů. Extrahované proteiny byly pročištěny přes hustotní gradient a následně použity do SDS-elektroforézy.

U každého vzorku byla provedena kontrola motility, která potvrdila dostatečnou kvalitu spermií pro experiment. Naše výsledky potvrzují, že spermie vykazují tyrosinovou fosforylaci neprodleně po rozmražení. Nepřímá imunofluorescenční metoda prokázala vysokou tyrosinovou fosforylaci ve středním stupni u kryokonzervovaných býčích spermií. Kontrolní skupina kapacitovaných spermií nám ověřila normálně probíhající kapacitaci, kde byly vyšší hodnoty u všech pozorovaných stupňů tyrosinové fosforylace. Zjištěné hodnoty intenzity proteinů pomocí kalibračních křivek z membrány nebyly pro všechny vzorky shodné.

Z celkových výsledků je možné inferovat, že jsou přítomny rozdíly mezi býčími spermii v nativním stavu a po kryokonzervaci. Kryokonzervace má vliv na spuštění tyrosinové fosforylace a na kapacitaci předčasně probíhající na spermiích.

Klíčová slova: kapacitace, fosforylace, spermie

Tyrosine phosphorylation in bovine spermatozoa in relation to their cryopreservation

Summary

In order to be fertile it is necessary for bull sperms to undergo capacitation and related biochemical and biophysical paths going in plasmatic membrane and inside of sperm. Tyrosine phosphorylation (PTP), acrosome reaction and hyperactivation belong among these paths. Tyrosine phosphorylation is one of the most used and best markers of capacitation. In order to trigger tyrosine phosphorylation is necessary to influx extracellular calcium and hydrogencarbonate and eflux of cholesterol from plasmatic membrane. Calcium and hydrogencarbonate trigger the path across soluble adenylyl cyclase (sAC), cyclic adenosinmonofosfat (cAMP), protein kinase A (PKA) up to phosphorylation of tyrosine kinase with help of ATP and NO. This is the process of the paths leading to capacitation under physiologic conditions. The structures of plasmatic membrane might be disrupted if the sperms are exposed to cryopreservation, which could subsequently trigger faulty processes and early capacitation. Cryocapacitation is not desirable as the sperms might have decreased vitality and fertilization. The thesis contains literal research describing structure of bull sperm, process of capacitation and cryopreservation and their influences on sperm. The goal of the experimental part of the thesis is to find out the differences in tyrosine phosphorylation between native sperms and sperms after cryopreservation. An assumption has been set that cryopreservation will influence the amount of PTP as one of the markers of capacitation.

The ejaculate was taken out of six bulls by standard method at insemination station. Both native and cryopreservation ejaculate were then used for indirect immunofluorescence method to determine PTP and to protein extraction. Extracted proteins were cleaned through density gradient and used for SDS electrophoresis afterwards.

Each sample has been checked for motility to confirm sufficient quality of the sperms. Our records confirm that the sperms show tyrosine phosphorylation immediately after defrosting. Indirect immunofluorescence method proved high tyrosine phosphorylation at medium level in cryopreservation bull sperms. The control group of capacitated sperms have verified the standard process of capacitation, where we obtained higher values at all observed levels of tyrosine phosphorylation. The values of protein intensity found out using calibration curves from the membrane were not identical for all of the samples.

Out of the final results we can identify existing differences between bull sperms in native condition and after cryopreservation. The cryopreservation has an influence on triggering tyrosine phosphorylation and on early capacitation going on the sperms.

Keywords: capacitation, phosphorylation, sperm.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Hypotézy a cíle.....	2
3	Přehled literatury.....	3
3.1	Spermie a její struktura	3
3.2	Kapacitace.....	8
3.2.1	Hyperaktivace	13
3.2.2	Akrozomová reakce	15
3.3	Kryokonzervace.....	17
4	Materiály a metody.....	22
4.1	Odběr a zpracování ejakulátu	23
4.2	Nepřímé imunofluorescenční stanovení PTP	23
4.2.1	Nativní ejakulát	23
4.2.2	Kryokonzervované spermie	24
4.2.3	Příprava sklíček se vzorky	25
4.2.4	Hodnocení imunofluorescence.....	25
4.3	Pročištění vzorků pomocí hustotního gradientu Bovi Pure a extrakce proteinů ze spermií	26
4.4	SDS-elektroforéza extrahovaných proteinů v polyakrylamidovém gelu podle Laemmliho a Wester Blotting.....	28
4.4.1	Přenos proteinů rozdělených SDS-elektroforézou na membránu (Western Blot) 29	
4.4.2	Detekce proteinu pomocí Ponceau	30
4.4.3	Blokování nespecifického vázání protilátek na membránu, inkubace s primární a sekundární protilátkou	31
4.4.4	Hodnocení membrány	32
5	Výsledky	33
5.1	Hodnocení vlivu kryokonzervace pomocí nepřímé imunofluorescenční metody 33	
5.1.1	Hodnocení tyrosinové fosforylace z pohledu stupně kapacitace.....	33
5.1.2	Hodnocení tyrosinové fosforylace podle lokalizace signálu.....	35
5.2	Vliv kryokonzervace na profil fosforylovaných proteinů spermií.....	36
6	Diskuze	41
7	Závěr	45
8	Seznam literatury.....	46
9	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	55

10 Seznam obrázků, tabulek a grafů	56
11 Samostatné přílohy	58

1 Úvod

Spermie musí po ejakulaci prodělat řadu změn tak, aby získaly fertilizační schopnost před navázáním se na oocyt a během vazby na něj. Tyto změny jsou regulovány aktivací intracelulárních signálních drah, které řídí fosforylaci spermií. Zvýšená fosforylace tyrosinu je spojena s kapacitací, hyperaktivací motility, vazbou na zonu pellucidu, akrozomovou reakci a vazbou spermií a oocytu a jejich fúze.

Kapacitace se vyznačuje strukturální a morfologickou modifikací spermií. Kapacitace býčích spermií je doprovázena změnou koncentrace intracelulárních iontů, fluidity plazmatické membrány, koncentrace intracelulárního volného vápníku a fosforylace tyrosinu na proteinech. Hlavní faktory, které zprostředkovávají tento proces, jsou akceptory sterolu, hydrogenuhličitan a vápník. Společně tyto signální molekuly aktivují dráhy proteinkinázy A (PKA) a proteinové tyrosinkinázy (PTK), které kontrolují fosforylaci proteinů.

Umělá inseminace je velice rozšířená biotechnologická metoda v reprodukci skotu. S touto metodou je úzce spjata kryokonzervace ejakulátu, která umožňuje uchovávání spermií v podstatě po neomezeně dlouhou dobu. I přes pokroky v úspěšnosti kryokonzervace, je stále tato metoda spojena s negativním vlivem na přežitelnost a fertilizační schopnost spermií. Celý proces kryokonzervace spermií (ředění, chlazení, zmrazení a rozmrazení) mohou způsobit funkční a strukturální poškození spermií přičemž primárně poškozená je plazmatická membrána. Její poškození vede k ovlivnění funkce vápníkových kanálů a influxu extracelulárního vápníku. Influx Ca^{2+} , způsobení kryokonzervací, iniciuje signální dráhy vedoucí k tzv. kryokapacitaci prostřednictvím tyrosinové fosforylace. Tyrosinová fosforylace indukovaná kryokonzervací výrazně snižuje vazebnou schopnost spermií na zona pellucida. Je tedy otázkou, zda kryokonzervace býčích spermií bude ovlivňovat výši tyrosinové fosforylace jako jednoho z markerů kapacitace.

2 Hypotézy a cíle

Byly stanoveny hypotézy: Pro ověření hypotéz byl určen cíl vycházející ze stanovení rozdílů v tyrosinové fosforylaci jako jednoho z markerů kapacity spermií v jejich nativním stavu a po kryokonzervaci.

Pro ověření hypotézy byl určen cíl: Cílem práce je pomocí specifických protilátek detekovat úrovně a místa tyrosinové fosforylace na býčích spermiích před a po kryokonzervaci.

3 Přehled literatury

3.1 Spermie a její struktura

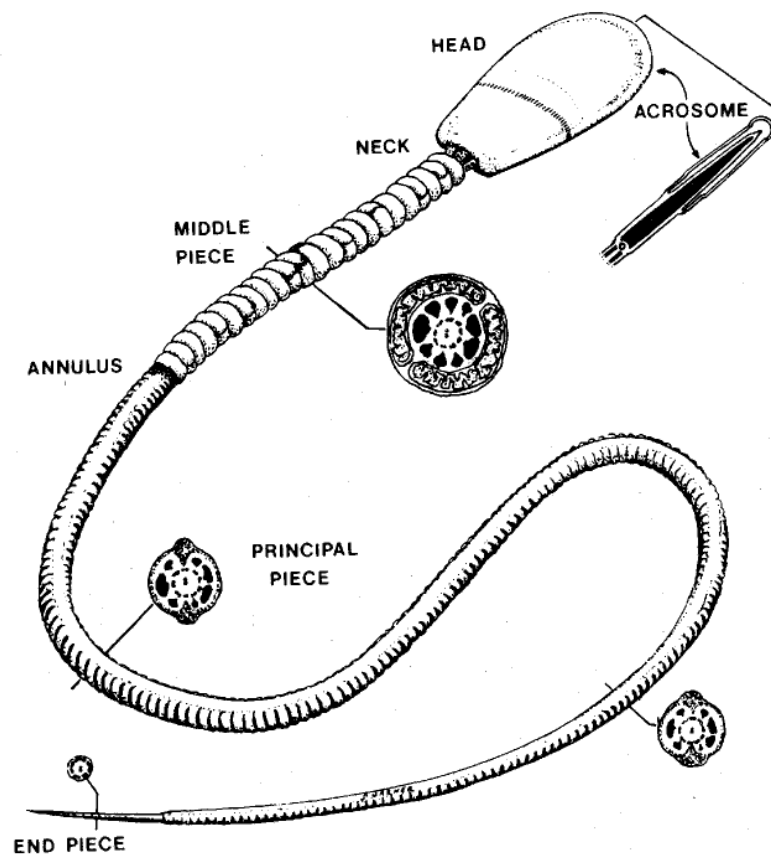
Semen nebo také ejakulát je nejčastěji bílá nebo šedavá viskózní tekutina, skládající se z části buněčné (spermie) a tekuté (semenná plazma)(Gamčík and Kozumplík, 1984). Spermie tvoří nejdůležitější složku ejakulátu a tvoří se v semenotvorných kanálcích varlat.

Tyto kanálky obsahují kompletní řadu vyvíjejících se zárodečných buněk (Chenoweth and Lorton, 2014; Jelínek and Koudela, 2003; Hafez and Hafez, 2000). Složitý proces, při kterém se kmenové buňky v semenotvorných kanálcích přeměňují na jedinečně tvarované spermie s plně vyvinutým akrozomem, se nazývá spermatogeneze (Abou-Haila and Tulsiani, 2000; Artur et al., 2001; Chenoweth and Lorton, 2014). Spermatogeneze začíná na bazální straně kanálku spermatogonií A a pokračuje přes stádia spermatocytů, spermatyd až po spermie směrem do lumenu. Jedna z prvních struktur vytvářejících se při spermatogenezi z Golgiho aparátu je akrozom obsahující enzymy, které rozpouštějí zonu pellucidu (Flesch and Gadella, 2000). Golgiho komplex v počátečním stadiu spermatogeneze (kruhový spermatid) sestává z prominentního systému těsně uzavřených tubulů a vezikul lokalizovaných v blízkosti jednoho z pólů jádra. Některé z těchto vezikul se zvětšují a naplňují hustými, jemnými zrnitými složkami, které migrují a vyprazdňují obsah bohatý na glykoproteiny do formujícího se akrozomatického systému (Abou-Haila and Tulsiani, 2000). Současně vzniká bičík z distálního centriolu. Distální centriol se přikládá k buněčné membráně a z něho začínou vyrůstat osová vlákna bičíku (Hafez and Hafez, 2000). Mitochondrie, které byly volně rozptýlené v cytoplazmě, se začínají prodlužovat a ukládat se cirkulárně okolo vláken bičíku. Tím se vytváří mitochondriální oddíl bičíku (Neill et al., 2006). U většiny savců, včetně býka, jsou spermatické buňky plně zralé, když dosáhnou konce ocasu nadvarlete (Flesch and Gadella, 2000).

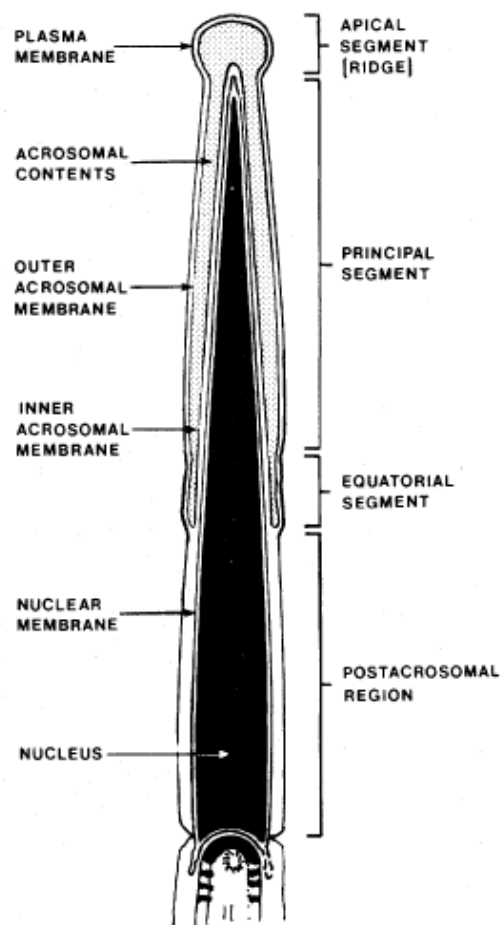
Zralá spermie má tři vysoce specializované oblasti (Obr. 1). První je hlavička, která je oválná a plochá, obsahující DNA neboli deoxyribonukleovou kyselinu. Ta je velice důležitá pro interakci spermií a oocytů, ale je transkripčně neaktivní (Chenoweth and Lorton, 2014; Gadella et al., 2001). Býčí spermatická hlavička měří 8-10,0 μm , šířka je 4-4,5 μm a tloušťka 1-1,5 μm (Arthur et al., 2001). Přední část jádra s DNA pokrývá akrozom. Akrozom nebo také akrozomální čepička je struktura s dvojitou stěnou umístěnou mezi plazmatickou membránou a jadernou membránou a pokrývá celou přední část hlavičky (Hafez and Hafez, 2000; Sutovsky and Manandhar, 2006). Dvojitá membrána akrozomu je dělena na vnitřní a vnější membránu.

Vnější akrozomální membrána se nachází pod plazmatickou membránou spermie a vnitřní leží směrem k jádru (Chenoweth and Lorton, 2014). Akrozomální čepičku můžeme dělit na apikální, hlavní a ekvatoriální segment (Hafez and Hafez, 2000). Ekvatoriální segment nese receptorové molekuly zapojené do počáteční vazby mezi hlavičkou spermie a membránou oocyty ve chvíli, kdy spermie pronikne zonou pellucidou (Hafez and Hafez, 2000; Sutovsky and Manandhar, 2006). Akrozom obsahuje matrici s enzymy proteáz a glykosidáz (Abou-Haila and Tulsiani, 2000; Tulsiani et al. 1998). Mezi glykosidázy patří hyaluronidáza a do proteáz zahrnujeme akrosin. Hyaluronidáza je enzym, který štěpí kyselinu hyaluronovu v *cumulus oophorus*, což umožňuje průchod spermii skrz kumulární matrix (Chenoweth and Lorton, 2014; Hafez and Hafez, 2000). Akrosin je v akrosomu přítomen jako neaktivní proakrosin (Chenoweth and Lorton, 2014) a v průběhu akrozomové reakce je štěpen na enzymaticky aktivní akrosin. Proakrosin je prekurzorem proteolytického enzymu akrosinu (Hafez and Hafez, 2000). Akrosin je enzym podobný trypsinu, funguje tedy tak, aby umožňoval proniknutí spermie přes zona pellucida během fertilizace (Chenoweth and Lorton, 2014; Tulsiani et al. 1998). V akrosomu jsou přítomny další enzymy, jako jsou esterázy, neuramidázy, fosfolipázy kolagenázy a další, ale přesné působení těchto enzymů ještě není zcela objasněno (Chenoweth and Lorton, 2014). Postakrozomální oblast je část hlavičky spermie obalující část jádra, kterou nepokrývá akrozom. Sahá od ekvatoriálního segmentu po bázi hlavičky. Tato oblast spermie se považuje za nesoucí komplex signálních proteinů, které spouští signální dráhu vedoucí k aktivaci oocyty (Sutovsky and Manandhar, 2006). Další důležitá část spermie je bičík, který se skládá z krčku, středního oddílu s mitochondriální pochvou, hlavního a koncového oddílu (Chenoweth and Lorton, 2014; Hafez and Hafez, 2000; Sutovsky and Manandhar, 2006) a u býka je dlouhý přibližně 44-53 μm (Hopper, 2014). Bazální část hlavičky je prohloubená v podobě implantační jamky, do níž se vkládá hlavice bičíku, která slouží ke spojení bičíku s hlavičkou, tzv. krček (Arthur et al., 2001). Bičíkem prochází osová vlákna – axonema, kterou obklopuje spirálovitá mitochondriální pochva. Axonemu tvoří kruh devíti dvojic mikrotubulů s dvěma centrálními mikrotubuly uspořádaných 9+2 (Obr. 3). Jednotlivé dvojice z kruhu jsou navzájem spojeny dyneinem, který funguje jako molekulární motor a umožňuje zakřivení bičíku při pohybu (Arthur et al., 2001; Hafez and Hafez, 2000). Střední oddíl bičíku s mitochondriální pochvou se podílí na produkci energie a je to oblast bičíku mezi krkem a Jensenovým prstencem (Sutovsky and Manandhar, 2006). Tento segment bičíku je bohatý na fosfolipidy (Hafez and Hafez, 2000). Mitochondrie jsou uspořádány helikálně kolem podélných vláken ocasu a jsou zdrojem energie potřebné pro motilitu spermii (Hafez and Hafez, 2000). Jedna mitochondrie tvoří asi $\frac{3}{4}$ závitů spirály a celá mitochondriální pochva tvoří asi 65 – 75

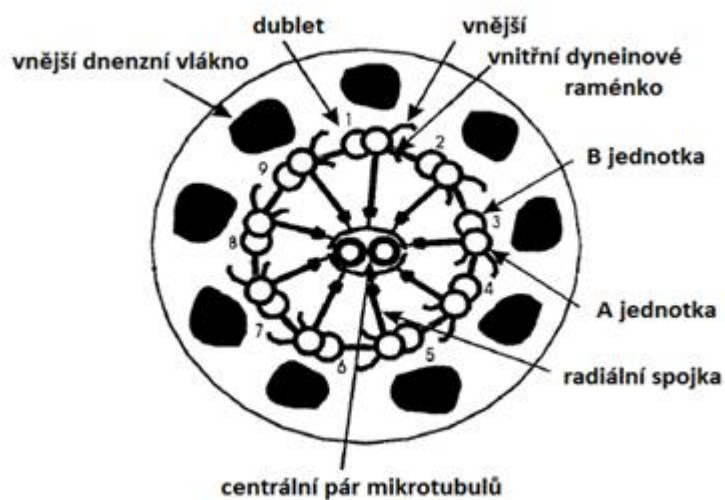
závitů (Gamčík and Kozumplik, 1984). Hlavní oddíl bičíku, který zajišťuje motilitu, je pokryt vláknitým pláštěm, který zajišťuje stabilitu kontrakčních prvků bičíku (Chenoweth and Lorton, 2014; Flesch and Gadella, 2000; Gadella et al., 2001; Sutovsky and Mannandhar, 2006). Zdá se, že proteiny ve vláknitém plášti uzavírají proteinové kinázy nezbytné pro proces kapacitace spermií a hyperaktivace před oplodněním (Sutovsky and Mannandhar, 2006). Poslední koncová část bičíku obsahuje pouze terminální segment axonemy a je pokryt buněčnou membránou (Chenoweth and Lorton, 2014).



Obr. 1: Schéma celé býčí spermie bez plazmatické membrány (Hafez and Hafez, 2000)



Obr. 2: Sagitální část hlavičky býčí spermie (Hafez and Hafez, 2000)



Obr. 3: Schématické znázornění průřezu hlavního oddílu bičíku savčí spermie (Mortimer, 2000).

Celá spermie, jak hlavička, tak celý bičík, je pokryt plazmatickou membránou (Hafez and Hafez, 2000; Sutovsky and Mannandhar, 2006). Plazmatická membrána spermií je velmi důležitá struktura, která chrání spermie proti extracelulárnímu poškození a reaguje na fyziologické vlivy. Hraje zásadní roli při kapacitaci spermií, interakci mezi spermii a vajíčkem a oplodněním (Tapia et al., 2012). Díky ztrátě většiny buněčných organel a ukončení transkripce DNA, spermie nemají proteinovou expresi a vezikulární transport. To znamená, že plazmatická membrána je stabilní a metabolicky inertní struktura, protože proteiny, fosfolipidy, cholesterol a další složky plazmatické membrány nemohou být syntetizovány. Uvolněné spermie ze semenotvorných kanálků nejsou plně zralé, až během průchodu přes nadvarle se plazmatická membrána mění například uvolněním, modifikací a adsorpcí proteinů a lipidů (Flesch and Gadella, 2000, Gadella et al., 2001). Tyto modifikace jsou pečlivě koordinovány v různých částech epididymu a nepřímo ovlivňují intracelulární membrány, organely, a dokonce i nukleoprotein (Jones, 1997). Lipidové složení plazmatické membrány savčích spermií je relativně odlišné od somatických buněk. Jsou přítomny neutrální mastné kyseliny, fosfolipidy a glykolipidy. Nejčastější složkou jsou glycerofosfolipidy a mezi nimi fofatidylcholin a fosfatidylethanolamin (Parks and Lynch 1992; Tapia et al., 2012). Glycerofosfolipidy se vyznačují glycerolovým hlavním řetězcem hydroxylovými skupinami na C1, C2 esterifikovaný na mastné kyseliny a C3 hydroxyl glycerolu se esterifikuje na fosfát (Tapia et al., 2012). Poměrně vysoký podíl těchto fosfolipidů se však skládá z plazmalogeny, které obsahují jednu mastnou esterifikovanou kyselinu glycerolem a nenasyceným esterem s dlouhým uhlíkovým řetězcem. Plazmalogeny pravděpodobně mají schopnost eliminovat volné radikály. Tyto plazmalogeny se významně vyskytují ve spermiích přežvýkavců (Lenzi et al., 2000). Hlavní rozdíl ve složení a hlavně ve stupni nasycení fosfolipidů v membránách představují mastné kyseliny mezi různými druhy savců. Ve fosfolipidové membráně spermií býků se nejčastěji vyskytuje mastná kyselina dokosahexaenová C22:6n3 (Schiller et al., 2003). Spermie vykazují vysoké hladiny nenasycených acylových řetězců, zejména dokosahexanoylových (22:6) a dokosa-pentaenoylových zbytků (22:5). Tyto vysoce nenasycené acylové řetězce poskytují spermii dobrou fluiditu a pružnost, díky které spermie odolávají změnám objemu (Tapia et al., 2012). Kromě fosfolipidů je cholesterol jednou z nejdůležitějších složek plazmatické membrány a je nejhojnější lipid (Cross, 1998; Flesch and Gadella, 2000). Býk patří mezi druhy savců s vysokým obsahem cholesterolu, stejně jako člověk. Cholesterol má mnoho vlivů na membránové vlastnosti a hraje různé role, jako je stabilizace membrány, regulaci objemu a usnadňuje interakci mezi buňkami zprostředkované změnami fázového přechodu fosfolipidových dvojvrstev (Flesch and Gadella, 2000). Změny

hladin cholesterolu ve spermiích nebo fosfolipidů by mohly sloužit ke změně molárního poměru membránového cholesterolu podléjícího se na kapacitaci spermií (Moce et al., 2010a). Nicméně cholesterol není jediný sterol přítomný v membráně spermií. Naopak, zvláštností spermiových buněk v jejich sterolovém složení je vysoký podíl desmosterolu. Fyziologický význam tohoto vysokého podílu desmosterolu v savčích spermiích není dosud znám, ačkoli bylo navrženo, že by se mohl podílet na regulaci motility nebo by se mohl podílet na regulaci kapacity spermií stejně jako cholesterol (Saez et al., 2011; Tapia et al., 2012).

Spermie využívají iontové kanály a transportéry k udržení gradientu koncentrace iontů přes plazmatickou membránu a na to vynakládají významnou část svých energetických zdrojů. Tyto uložené zdroje slouží k dekódování informací z jejich okolí a jejich vnitřního prostředí (Hille, 2001). Díky těmto energetickým zdrojům mohou být otevřeny iontové kanály, které umožňují tok milionů iontů za sekundu přes membránu po jejich elektrochemickém gradientu fosforylačními změnami, signalizačními událostmi, malými konformačními změnami indukovanými napětím, ligandy a membránovým tlakem (Visconti et al., 2011). Iontové kanály u spermií při iontovém transportu hrají důležitou roli v různých aspektech fyziologie spermie, například pohyb iontů je spojován s motilitou spermií, fosforylací na tyrosinu a regulaci intracelulárních poslů (Sutovsky and Mannandhar, 2006). Díky iontovým kanálům se udržuje iontový gradient napříč plazmatickou membránou, protože u epididymálních spermií je intracelulární koncentrace draselných iontů zpočátku vysoká (120 mM), zatímco intracelulární koncentrace sodných iontů je nízká (14nM). Během kapacity se ovšem iontové prostředí mění, zvyšuje se intracelulární koncentrace vápníku, bikarbonátu a sodíku, v důsledku čehož se zvyšuje i intracelulární pH, naopak se snižuje koncentrace intracelulárních iontů draslíku, chloridu a zinku (Sutovsky and Mannandhar, 2006; Visconti et al., 2011).

3.2 Kapacitace

Metabolické dráhy, které se vyskytují u zralých spermií, usnadňují jejich existenci ve dvou odlišných typech prostředí, tj. v mužském a ženském reprodukčním traktu (Naresh and Atreja, 2015). Po páření se v samičím reprodukčním traktu ukládají miliony spermií. Velká většina uložených buněk je eliminována, nicméně malé procento spermií rychle vstoupí do děložního čípku s hlenem, který slouží k zamezení vstupu semenné plazmy do dělohy, vyloučení morfologicky abnormálních spermií, zachycení potenciálně infekčních mikrobů a k uložení spermií (Neill et al., 2006). Doba pobytu spermií v samičím reprodukčním traktu je velmi důležitým obdobím v životním cyklu spermií. Během této doby se spermie podrobují mnoha biochemickým a fyziologickým změnám, které vedou k jedinečnému jevu nazývanému

kapacitace (Naz et al., 2004; Naresh and Atreja, 2015; Parrish, 2014). Kapacitace je definována jako proces, který vede ke schopnosti spermie oplodnit oocyt (Gadella, 2008) a tento proces zahrnuje zvýšení membránové tekutosti, eflux cholesterolu, iontové toky vedoucí ke změně potenciálu spermiové membrány, zvýšenou tyrosinovou fosforylaci proteinů, indukci hyperaktivace a akrozomovou reakci (Naz et al., 2004). Kapacitace začíná v děloze a je dokončena v isthmu (McGeady et al., 2006), což je část vejcovodu, také nazývaný ovidukální rezervoár, kde jsou spermie navázány na epitel (Tulsiani et al., 2007). Spermie nekapacitují všechny najednou, ale postupně. Celý proces je ve frakcích, čímž se docílí rozdělení velkého množství kapacitovaných a oplození schopných spermií. Tímto mechanismem je zajištěn postupný přísun zralých spermií k oocyту (Neil, 2006).

Změny probíhající na povrchu ejakulované spermie při kapacitaci v *in vivo* podmínkách zahrnují odstranění adsorbovaných proteinů a glykoproteinů ze semenné plazmy, modifikace (např. metylace fosfolipidů) a reorganizaci povrchových molekul plazmatické membrány spermií během průchodu samičím reprodukčním traktem, jehož působením se odhalí receptory na spermii důležitých pro rozpoznání a vazbu na vajíčko (Abou-haila and Tulsiani, 2009; Tulsiani et al. 2007). Výsledek během kapacitace je kombinovaný účinek vícečetných molekulárních změn v proteinech a glykoproteinech PM spermií a sterolu (hlavně cholesterolu), který modifikuje plazmalemu (Jones et al., 2010; Neill et al., 2006; Sutovsky and Mannandhar, 2006). Eflux cholesterolu mění membránový potenciál, zvyšuje membránovou propustnost a tekutost umožňující přítok iontů Ca^{2+} a HCO_3^- . Tyto ionty s reaktivními formami kyslíku (ROS) aktivují intracelulární druhé posly (Abou-haila and Tulsiani, 2009; Gadella et al., 2001; Naresh and Atreja, 2015; Tapia et al., 2012; Tulsiani et al. 2007). Spuštěna signální kaskáda (obr. 4) zahrnující aktivaci adenyl cyklázy (AC) a produkci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), stimulaci proteinkinázy A (PKA), tyrozinovou fosforylaci skupiny molekul spermie a hyperaktivaci spermií (Abou-haila and Tulsiani, 2009; Naz et al., 2004). Pro spuštění efluxu cholesterolu z plazmatické membrány je zapotřebí albumin. Tento protein, akceptor cholesterolu, se nachází v sekretech samčího reprodukčního traktu a je důležitou složkou během kapacitace, jelikož iniciuje eflux sterolů (obr. 4) (Abou-haila and Tulsiani, 2000; Abou-haila and Tulsiani, 2009; Fraser, 2010; Sutovsky and Mannandhar, 2006).

Influx vápníku je jedním z důležitých biochemických událostí, ke kterým dochází během kapacitace (Naz et al., 2004), a bylo prokázáno, že vápník působí paralelně s hydrogenuhličitanem, čímž spouští sAC (rozpuštnou adenyl cyklózu) (Tapia et al., 2012; Visconti et al., 2011). Potenciální oblast ukládání vápníku, který se podílí na kapacitaci je v akrozomu, redundantním jaderným obalu (RNE) s receptory IP3 lokalizovaný v oblasti krčku

a mitochondriální pochvě (Ren and Xia, 2010). Ve spermiích bylo prokázáno velké množství iontových kanálů propustných pro vápník. Jedná se o kanály selektivní vápník aktivované změnou napětí (CaVs), TRP kanály, kanály s cyklickým nukleotidem (CNG) a kanály CatSper (Tapia et al., 2012). CatSper kanál je nová třída Ca^{2+} kanálů, která se ukázala jako nezbytná pro hyperaktivaci motility spermií. Kanál je tvořen 4 podjednotkami, je konstitutivně aktivní, slabě závislý na napětí, selektivní na vápník a silně potenciován intracelulární alkalizací (Visconti et al., 2011).

Koncentrace bikarbonátu v nadvarletí, v místě uložení spermií, je velmi nízká a v samičím pohlavním traktu je hladina HCO_3^- mnohem vyšší (Flesh and Gadella, 2000). Tyto změny v koncentraci hydrogenuhličitanu v samčím a samičím reprodukčním traktu by mohly hrát důležitou roli při potlačení kapacitace v epididymis a podpoře tohoto procesu v *in vivo* podmínkách samičího pohlavního traktu (Naz et al., 2004). Transmembránový pohyb HCO_3^- je spojen se zvýšením intracelulárního pH (pHi) během kapacitace (Sutovsky and Mannandhar, 2006). Influx HCO_3^- do spermií je umožněn $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ iontovou pumpou nebo difúzí jako oxid uhličitý (Flesh and Gadella, 2000; Sutovsky and Mannandhar, 2006). Zvýšená hladina hydrogenuhličitanu indukuje také tyrosinovou fosforylaci na proteinu nejpravděpodobněji tím, že bikarbonát je schopen se vázat přímo na specifickou AC a tím aktivuje produkci cAMP. Zvýšená hladina cyklického adenosinmonofosfátu aktivuje cAMP dependentní protein kinázu A, která indukuje fosforylaci tyrosinu (Abou-haila and Tulsiani, 2009; Fraser, 2010; Flesh and Gadella, 2000; Naz et al., 2004; Sutovsky and Mannandhar, 2006).

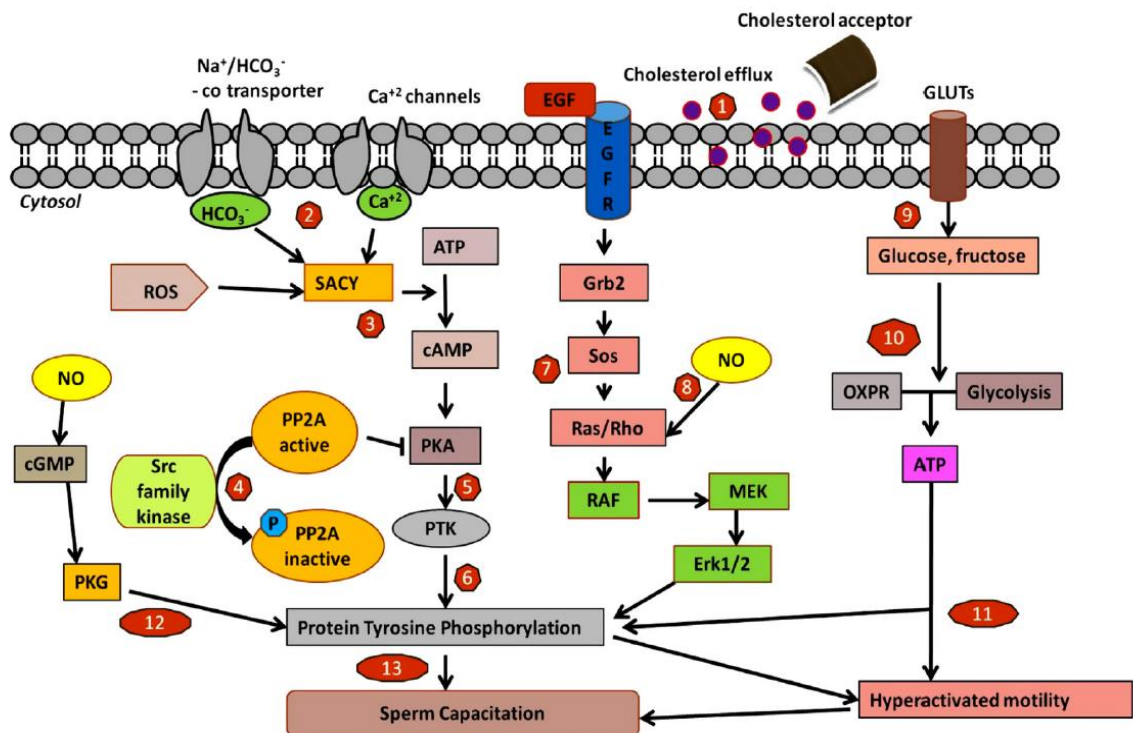
Reaktivní druhy kyslíku (ROS) hrají klíčovou roli nejen při zprostředkování patologických následků oxidativního stresu (Sutovsky and Mannandhar, 2006), ale také se podílejí na regulaci kapacitace spermií a tyrosinové fosforylaci (Naz et al., 2004). ROS zahrnuje volné radikály, jako je superoxidový anion, peroxid vodíku (H_2O_2) nebo hydroxylový radikál. ROS mohou také být silné oxidanty, do kterých patří například oxid dusnatý (NO) (Sutovsky and Mannandhar, 2006) a superoxidový anion, který indukuje hypermotilitu spermií a vede k afinitě se zonou pellucidou (Flesh and Gadella, 2000). Ovšem ROS má také negativní účinky na spermie (Naz et al., 2004). Plazmatická membrána je velice citlivá na oxidativní stres kvůli vysokému obsahu polynenasycených mastných kyselin a relativně slabé ochraně antioxidantů (Flesh and Gadella, 2000; Sutovsky and Mannandhar, 2006).

Fosforylace proteinů je posttranslační modifikace, která působí jako jeden z buněčných regulačních mechanismů pro řízení různých procesů (Pawson, 2004) jako je buněčný růst, regulace buněčného cyklu, tvorba cytoskeletu, modulace iontového proudu a regulace receptorů (Naresh and Atreja, 2015; Sutovsky and Mannandhar, 2006). Tato modifikace je jedním

z nejběžnějších mechanismů regulace aktivity proteinu přidání a/nebo odstranění fosfátových skupin ze serinových, treoninových nebo tyrosinových zbytků proteinových skupin. Zralé spermie jsou diferencované a specializované buňky (Naresh and Atreja, 2015) a jsou vysoce členěné na jednotlivé části, ale postrádají významnější transkripční a translační aktivitu. Z tohoto důvodu je možné zdůvodnit význam posttranslačních modifikací, mezi které patří proteinová fosforylace/defosforylace při regulaci důležitých jevů, jako je kapacitace spermií, hyperaktivace a akrozomová reakce (Naz et al., 2004; Visconti, 2009). Fosforylační/defosforylační stav fosfoproteinů je řízen aktivitou protein kináz a fosfatáz. Primárním indikátorem kapacitace spermií je fosforylace tyrosinu (Naz et al., 2004; Visconti, 2009), přestože fosforylace může probíhat na serinových, treoninových a tyrosinových zbytcích proteinů (Naresh and Atreja, 2015).

Tento proces je lokalizován především v akrozomální čepičce a subekvatoriálním segmentu (Dubé et al., 2005), a díky této lokalizaci je zřejmá spojitost s akrozomální reakcí (Flesch and Gadella, 2000). Tyrosinová fosforylace bičíku souvisí se získáním hyperaktivované motility, která je nezbytná pro penetraci kumulu a zony pellucidy oocyty (Naz et al., 2004). Zvýšená fosforylace na tyrosinových proteinech (PTP) během kapacitace je regulována cAMP dependentní dráhou zahrnující proteinkinázu A (PKA) u spermií různých druhů savců, včetně býka (Galantino-Homer et al., 2004; Sutovsky and Mannandhar, 2006) a dalšími faktory ovlivňujícími PTP jsou cholesterolový eflux, influx HCO_3^- a Ca^{2+} , ROS a progesteron (Naresh and Atreja, 2015). Ubikvitární a hlavní druhý posel je cAMP (Naz et al., 2004). Tvoří se na vnitřní straně plazmatické membrány a aktuální koncentrace závisí především na aktivitě adenylátcyklázy (Koolman and Röhm, 2012). U spermií je prokázáno, že cAMP aktivuje PKA, která reguluje fosforylací proteinového tyrosinu (Naz et al., 2004). Adenylátcykláza (AC) je enzym katalyzující syntézu cAMP (Fraser, 2010; Koolman and Röhm, 2012). Izoforma AC důležitá pro správnou fyziologii spermií se nazývá rozpustná AC (sAC – soluble adenylly cyclase). Rozpustná AC je exprimována hlavně ve varlatech a je aktivována vápníkem a hydrogenuhličitanem, avšak nikoliv pomocí G-proteinů jako jiné izoformy AC (Fraser, 2010; Visconti et al., 2011). Signální transdukční dráhu AC/cAMP moduluje angiotensin II (AII), který je přítomen v semenné plazmě. AII významně stimuluje produkci cAMP s přidruženým zvýšením PTP. Receptory angiotensinu (AT1) u bovinních spermií jsou lokalizovány na hlavičce a bičíku (Gur et al., 1998). PKA je tetramerní enzym složený ze dvou regulačních a dvou katalytických podjednotek. Aktivita PKA závisí na aktivitě adenylátcyklázy a fosfodiesterázy. Ve spermatických buňkách je PKA rozdělena na dvě části a zajišťuje tak specifitu funkce vazbou své regulační podjednotky na rodinu bílkovin AKAP (kináza

ukotvující faktor A) (Breitbart and Naor, 1999). PKA je serin/treonin kináza, která indukuje a způsobuje zvýšení fosforylace tyrosinu na spermiích nepřímou aktivací tyrosinkináz (Naz et al., 2004; Sutovsky and Mannandhar, 2006). U spermií byla prokázána přítomnost tyrosinkináz a to receptorových tyrosinkináz (RTK) i nereceptorových tyrosinkináz (PTK). Tyto tyrosinkinázy zahrnují EGF receptory a jsou přítomny jak u býčích spermií tak i lidských (Naz et al., 2004). Receptor IGF-1 (insulin-like growth factor), který byl identifikován u býčích spermií má aktivitu tyrosinkinázy a jeho ligand IGF-1 je přítomen v semenné plazmě (Henricks et al., 1998). Fosforylaci tyrosinového proteinu a kapacitaci také podporují exogenní nikotinamidadenindinukleotid (NADH) a nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) (Rivlin et al., 2004). NADPH působí jako koenzym pro oxidázu spermií, která generuje superoxidový anion, který později dismutuje na H₂O₂ superoxid dismutázy (Naz et al., 2004). Bylo také zjištěno, že zvýšená hladina oxidu dusnatého během kapacitace moduluje cAMP dráhu, která reguluje tyrosinovou fosforylaci. U nekapacitovaných spermií je hladina NO nízká, zatímco za kapacitačních podmínek se zvyšuje syntéza NO (Herrero and Gagnon, 2001). Účinky progesteronu na spermie jsou zprostředkovávány prostřednictvím vazebných míst progesteronu/receptor progesteronu na akrozomové membráně. Ve spermiích progesteron stimuluje tyrosinovou fosforylaci, což způsobuje hyperaktivaci se zvýšením hladiny cAMP. Progesteron rovněž zvyšuje fluiditu membrány spermií, což je důležitý děj kapacitace a fosforylace tyrosinu (Calogero et al., 2000). I přestože tyrosinová fosforylace je jednou z nejdůležitější reakcí při kapacitaci, jsou reakce a dráhy, které nejsou dodnes zcela objasněny. Například pozitivní vliv stimulace dráhy cAMP/PKA na PTP. U této dráhy chybí identifikovat několik částí (Naz et al., 2004).

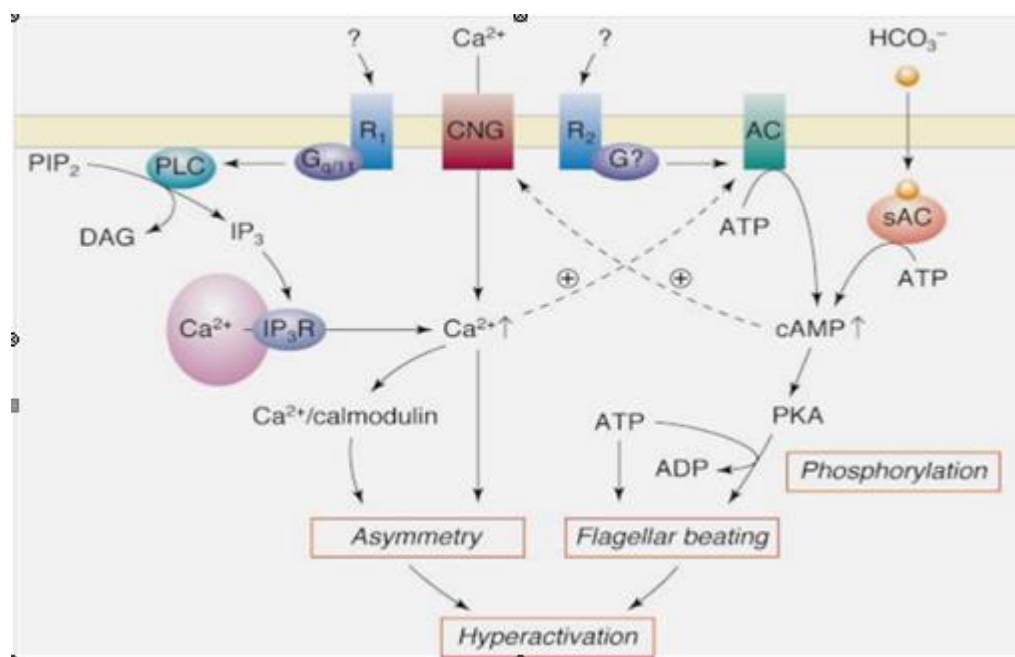


Obr.4: Schematické znázornění molekulárního mechanismu fosforlyce tyrosinu během kapacitace spermií. Odstranění cholesterolu z plazmatické membrány akceptory cholesterolu zvyšuje fluiditu membrány (1), která vede k přílivu HCO₃⁻ a Ca²⁺ přes Na⁺/ HCO₃⁻ kontraspportéry a vápníkové kanály (2). PKA fosforylace závisí na inaktivaci fosfatázy fosforylací na C-termínálním konci PP2A pomocí kináz z rodiny Src (4). Počátek aktivace TK (5) s následnou fosforylací proteinu tyrosinu (6). Epidermální růstový faktor a receptor EGF (EGF-EGFR) aktivuje dráhu ERK, která zvyšuje PTP (7). NO může aktivovat intermediární Ras/Rho protein (8) v dráze ERK. GLUT transportují glukózu a fruktózu do spermií (9) a ty jsou užitečné při generování ATP pomocí glykolázy a OXPR (10). Poté se ATP využívá pro hyperaktivaci motility spermií a PTP (11). Vysoká hodnota NO může také regulovat cestu cGMP/PKG (12). Tyto sekvenční kroky, jako je PTP a hyperaktivace dále vedou ke kapacitaci spermií (13). (Naresh and Afreja, 2015).

3.2.1 Hyperaktivace

Během kapacitace je zjevně indukována hyperaktivace spermií v samičím genitálním traktu (Schmidt and Kamp, 2004; Sutovsky and Mannandhar, 2006), ale oba procesy jsou regulovány nezávislými mechanismy (Abou-haila and Tulsiani, 2009). Hyperaktivní spermie

byly charakterizovány silným a nelineárním pohybem způsobeným zvýšenou amplitudou flagelárních kmitů (Fraser, 2010; Yanagimachi, 1994), na kterých se také podílí fosforylace proteinového tyrosinu na bičíku (Abou-haila and Tulsiani, 2009). Mechanický tlak způsobený hyperaktivní motilitou je nezbytný pro uvolňování spermií, které jsou přichycené k oviduktálnímu epitelu v rezervoáru, pro lepší proniknutí kumulárních buněk oocyty, penetraci zony pellucidy a akrozomovou reakci (Abou-haila and Tulsiani, 2009; Naresh and Atreja, 2015; Schmidt and Kamp, 2004; Sutovsky and Mannandhar, 2006). Silný asymetrický pohyb hyperaktivované spermie vyžaduje vstup Ca^{2+} iontů do bičíku pomocí CatSper (vápníkový kanál aktivovaný alkalickými podmínkami a citlivý na změny membránového potenciálu) (Qi et al., 2007). Po stimulaci signálu jsou aktivovány dráhy vedoucí ke zvýšení Ca^{2+} a cAMP (viz. Obr. 5). Dosud ještě neznámé fyziologické signály aktivují fosfolipázu C (PLC) přes G-protein s připojeným receptorem a produkují IP_3 (Inositoltrifosfát). Vazba IP_3 na receptory IP_3 (IP_3R) způsobuje zvýšení cytoplazmatického Ca^{2+} . Aktivace adenyl cyklázy (AC), která je spojená s membránou a bikarbonát spouštějící rozpustnou formu adenyl cyklázy (sAC) zvyšují intracelulární cAMP. Zvýšená cAMP se mohou vázat na kanály s cyklickými nukleotidy (CNG), které indukují infix Ca^{2+} a aktivuje proteinkinázu A k fosforylaci axonemálních nebo fibrózních bílkovin membrány bičíku. Pro asymetrický pohyb bičíku, který je charakteristický pro hyperaktivaci, jsou zodpovědný vápník a komplex vápníku a kalmodulinu (Ho and Suarez, 2001; Luconi and Baldi, 2003).



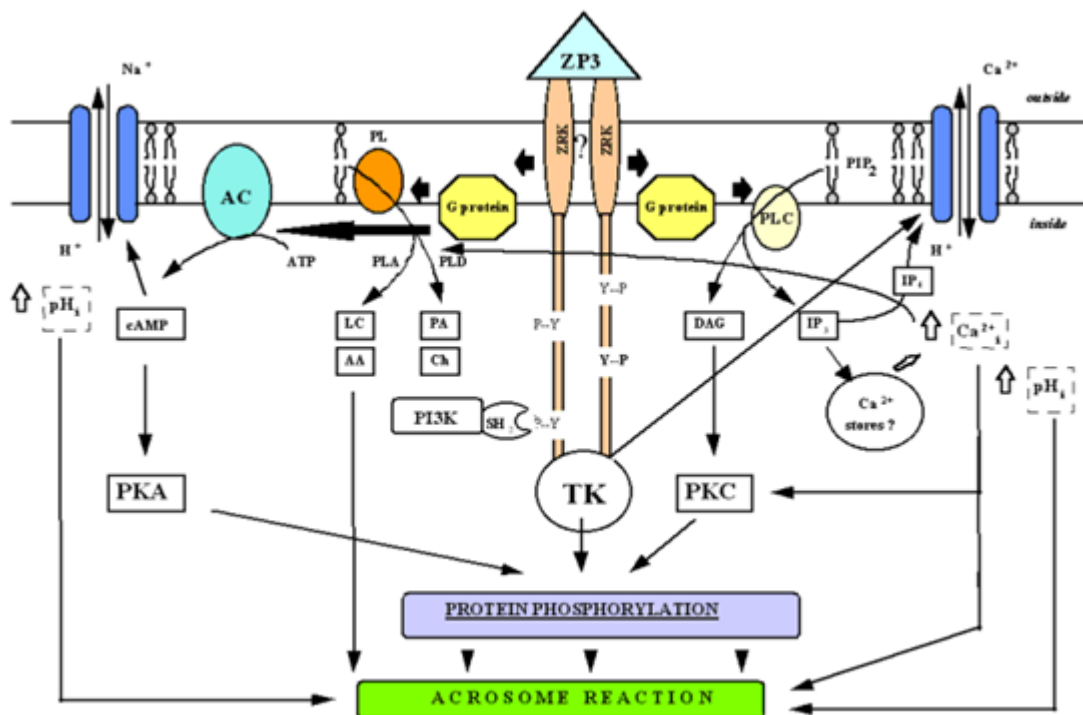
Obr. 5: Hypotetický model mechanismu regulujících hyperaktivaci (Ho and Suarez, 2001)

3.2.2 Akrozomová reakce

Po kontaktu kapacitované savčí spermie s extracelulárními obaly vajíčka dochází ve spermii k aktivaci velkého množství proteinů a signálních kaskád, což má za následek celou sérii nereverzibilních změn (Florman et al., 2008). V důsledku těchto změn později dochází k exocytóze akrozomálního váčku, neboli k akrozomální reakci (AR) (Naresh and Atreja, 2015). Během akrozomové reakce jsou hydrolytické a proteolytické enzymy, aby uvolňovaly, hydrolyzovaly a rozpouštěly matrix ZP lokálně v bezprostředním směru pronikající spermie, což nakonec zajišťuje vstup spermie do prostoru perivitelní prostor (Flesch and Gadella, 2000). Akrozomální reakce je jeden z klíčových procesů během oplození a funguje jako behaviorální přepínač, který konvertuje spermii na stav, ve kterém je schopna interagovat s oocytem (Naresh and Atreja, 2015). Protože pokud spermie nedokončí úspěšně akrozomální reakci, není ani schopna proniknout skrze zonu pellucidu a ani se navázat na plazmatickou membránu oocytu. Celý proces musí být přísně regulován a koordinován prostorově i časově s oocytem (Florman et al., 2008). Kapacitace a akrozomová reakce jsou dva procesy, které jsou postupově a funkčně propojeny tak, že několik událostí zapojených do zprostředkování intracelulární signalizace aktivované AR začne být připravováno již během kapacitace. Například zvýšená hladina intracelulárního vápníku a fosforylace tyrosinu (Baldi et al., 2000). Zona pellucida nejpravděpodobněji poskytuje primární místa ligandu pro receptory přítomných na plazmatické membráně v oblasti akrozomální čepičky kapacitované spermie (Abou-haila and Tulsiani, 2009). Ligand považující se za spouštěč akrozomální reakci je ZP3 (zona pellucida protein 3), který je součástí extracelulárního obalu oocytu – zony pellucidy (Baldi et al., 2000). Oocyty i po ovulaci mají okolo sebe 2-3 vrstvy kumulárních buněk tvořící extracelulární obal, který sekretuje do svého extracelulárního prostoru progesteron (Abou-haila and Tulsiani, 2009). Během průchodu spermie skrze kumulus oophorus dochází k navázání progesteronu na receptory, které se nacházejí na plazmatické membráně spermie a spouští signální dráhu vedoucí k alkalizaci cytosolu hlavičky spermie (Flesch and Gadella, 2000). Je tedy možné, že progesteron, který je navázán na PM spermie, způsobuje influx Ca^{2+} a proteinové fosforylaci tyrosinu (Abou-haila and Tulsiani, 2009; Flesch and Gadella, 2000). Progesteron také rychle stimuluje influx sodíku a přítomnost Na^+ v extracelulárním prostoru je nutný pro indukci AR (Patra et al., 2000). Navázání jak progesteronu, tak ZP3 na receptory přítomné v plazmatické membráně spermie vede k jejich agregaci. To vede k autofosforylaci receptoru a aktivaci tyrosin kináz (TK), které zvyšují fosforylaci tyrosinu (Baldi et al., 2000). Gainovy nukleotidové vazebné proteiny (G-proteiny) přenáší signál interagující s enzymy vázajícími se na membránu

(Flesch and Gadella, 2000), jako je fosfolipáza C (PLC) a adenylátcykláza (AC) (Baldi et al., 2000; Roldan and Shi, 2007). PLC hydrolyzuje fosfatidylinositol bisfosfát (PIP₂) za vzniku inositol trifosfátu (IP₃) a diacylglycerolu (DAG) (Florman et al., 2008). Aktivace AC vede ke zvýšené tvorbě druhého posla cAMP. Důsledkem nárůstu druhých poslů je aktivace proteinových kináz, jako jsou kinázy PKA (cAMP-dependentní kináza) a PKC (vápník a fosfolipid-dependentní kináza), se zvýšenou fosforylací proteinů (Abou-haila and Tulsiani, 2009). Cyklický adenosinmonofosfát též způsobuje influx sodíku a IP₃ zvyšuje intracelulární Ca²⁺ uvolněním iontů z intracelulárních zásob vápníku. Vápníkové ionty jsou považovány za nejčastější nefyziologický induktor AR. Přičemž zvýšení intracelulárního Ca²⁺ v důsledku aktivace receptorů ZP3 je zcela zapříčiněno influxem vápníku z extracelulárního prostoru a to pomocí Cav3 kanálů, které jsou závislé na aktivaci G-proteinů (Baldi et al., 2000; Florman et al., 2008). Influx vápníku přes vápníkové kanály Cav3 je doprovázen efluxem vodíkových iontů, díky čemuž narůstá intracelulární pH (pHi) (Florman et al., 2008). Intracelulární pH je také regulováno výměnou iontů Na⁺/ H⁺. Vápníkový influx je také částečně podporován aktivovanou tyrosin kinázou (Baldi et al., 2000). AR indukované ionofory a progesteronem vedou také k aktivaci fosfolipázy A a tato aktivace je spojena s tvorbou metabolitů lipidů, jako je kyselina arachidonová (AA) a lyzofosfolipidy. Fosfatidylcholin, lyzofosfolipidy a nenasycené mastné kyseliny, jako je kyselina arachidonová, jsou silnými induktory AR a mohou se účastnit procesu fúze, který nastává během akrozomové reakce (Obr. 6) (Abou-haila and Tulsiani, 2009).

Nedílnou součástí signálních drah a procesů řídících akrozomální reakci a kapacitaci je cytoskelet, který je bohatý na aktin (Brener et al., 2003). U kapacitovaných spermií se předpokládá, že protein je přítomen ve filamentární formě (F-aktin), který poskytuje podporu, aby se fosfolipáza C udržela navázaná na PM a poskytla fyzickou bariéru, která brání fúzi PM a vnější akrozomální membrány (Abou-haila and Tulsiani, 2009). V reakci na zvýšení Ca²⁺ a zvýšené hodnoty pHi se F-aktin depolymeruje za vzniku rozpustného monomerního neboli globulárního aktinu (G-aktin), který způsobí přiblížení PM a OAM. Současně fosfolipáza A štěpí mastné kyseliny z fosfolipidů za vzniku lysofosfolipidů, které podporují membránovou fúzi (Abou-haila and Tulsiani, 2009; Brener et al., 2003).



Obr. 6: Schéma znázorňující hlavní dráhy přenosu signálu aktivované během procesu akrozomové reakce v reakci na oblast protein 3 (ZP3) (Baldi et al., 2000)

3.3 Kryokonzervace

Kryokonzervace býčích spermií je důležitou technikou pro umělou inseminaci (AI) (Naresh and Atreja, 2015), která umožňuje získávání a transport gamet s vynikající genetikou po celém světě (Chakrabarty et al., 2007; Hu et al., 2010; Mostek et al., 2017). Konzervování spermií je složitý proces a zahrnuje odběr spermatu, ředění a přidání kryoprotektantů, postupné ochlazování, ekvilibraci, mrazení a následné skladování v kapalném dusíku (Anger et al., 2003).

Po odběru je nutné zahájit ředění ejakulátu co nejdříve (Ball and Peters, 2004). Ředění se provádí ředidlem, které má stejnou teplotu jako odebraný vzorek, aby spermie nebyly vystaveny chladovému šoku (Layek et al., 2016). Ředidla chrání spermie před osmotickým stresem a změnou v membránové tekutosti a propustnosti, dále poskytují spermím zdroj energie pro metabolické procesy a udržují správnou osmolaritu (Layek et al., 2016; Mutalik et al., 2014). Pokud se rozdíl osmolarity stanou nesnesitelnými, spermie ztrácejí motilitu, což je nevratný proces (Tasdemir et al., 2013). Zpomalení metabolických procesů ve spermích je způsobeno nízkou teplotou, která je v tekutém dusíku -196°C (Bailey et al., 2000). Pro

kryokonzervaci býčích spermií je k dispozici řada ředidel, která mají metabolizovatelný substrát pro spermie a téměř neutrální pH s vhodným pufrům (Amirat et al., 2004). Typická ředidla ke kryokonzervaci obsahují především nepenetrující kryoprotektanty působící extracelulárně (mléko nebo mléčné výrobky s lipoproteiny s nízkou hustotou nebo fosfolipidy), penetrující kryoprotektanty plazmatickou membránou (nejčastěji u býků je glycerol a vaječný žloutek), organický pufr, jeden nebo více cukrů jako energetický substrát (glukóza, fruktóza, laktóza, sacharóza a další), roztoky pro úpravu pH a osmolarity (citrát sodný, kyselina citronová) a antibiotika (penicilin, streptomycin) (Layek et al., 2016; Singh et al., 2012). Kryoprotektanty snižují tvorbu ledových krystalů ve spermiích, které poškozují membránu během kryokonzervace a zároveň je chrání před chladovým šokem (Bailey et al., 2000; Layek et al., 2016; Tasdemir et al., 2013). Použití vysoké koncentrace glycerolu, může být poškozena osmóza spermií, protože glycerol prochází plazmatickou membránou pomaleji, než jiné kryoprotektanty a eflux vody je rychlejší než infix glycerolu do spermie. I přes tato rizika je glycerol nejrozšířenější ředidlo, neboť snižuje mechanické poškození spermií během zmrazení (Tasdemir et al., 2013). Ředidla na bázi vaječného žloutku pomáhají spermiím odolávat vůči chladovému šoku a udržovat jejich fertilizační schopnost (Amirat et al., 2004; Hu et al., 2010). Proces kryokonzervace a následného rozmrazování indukuje kryokapacitaci, která je zodpovědná za horší oplozovací schopnost kryokonzervovaných spermií. V rámci kryokapacitace probíhá i tyrosinová fosforylace na různých částech spermií rozhodujících pro správnou fertilizaci. Tyrosinová fosforylace způsobená mrazením a rozmrazením se liší od indukované PTP in vitro. Kryokapacitaci a PTP lze snížit přidáním ředidla na bázi vaječného žloutku do kryokonzervačních médií (Naresh and Atreja, 2015). Hlavní složky vaječného žloutku ochraňující spermie při kryokonzervaci jsou fosfolipidy a LDL (low-density lipoprotein), který se skládá převážně z lipidů a také z bílkovin (Hu et al., 2010). LDL může mít několik vlastností během kryokonzervace a jednou z nich je, že během procesu zmrazování a rozmrazování přilne k buněčné membráně a zachovává její integritu (Hu et al., 2010) nebo vychytává škodlivé proteiny přítomné v semenné plazmě (Amirat et al., 2004). Díky LDL v ředidle spermie vykazují motilitu, mitochondriální a akrozomální aktivitu a integritu DNA (Hu et al., 2010). Ředidla na bázi vaječného žloutku, jakož živočišného původu, mohou představovat riziko v možné přítomnosti patogenů. Místo vaječného žloutku je možné použít sójová ředidla, která obsahují sójový lecitin a ten má též kryoprotektivní účinky na býčí spermie (Layek et al., 2016).

Po naředění ejakulátu nastává proces chlazení, při kterém se spermie adaptují na snížení jejich metabolismu (Watson, 2000). Zchlazení spermií musí probíhat postupně z 34°C na 4°C,

přičemž ve 4°C teplotě jsou uchovávány nejčastěji po dobu 2 hodin (Moussa et al., 2002). V případě rychlého zchlazení dochází k porušení buněk a následné smrti z důvodu ztráty zásob energie a následně i motility. Tento stav se nazývá chladový šok (Mostek et al., 2017). Aby inseminační dávky mohly být kryokonzervovány, musí projít takzvanou ekvilibrací, při které jsou spermie v kontaktu s glycerolem, a glycerol po tento čas vyrovnává extracelulární a intracelulární koncentrace látek. Tento proces ovlivňuje fertilizaci a životaschopnost po rozmražení inseminační dávky (Ferero-Gonzalez et al., 2012). Pro dlouhodobé uchovávání inseminačních dávek je nutno pejety zamrazit. Pro zamrazení se často využívá metoda pomalého programovatelného mrazení, při kterém se teplota snižuje postupně. Díky této metodě je možno kontrolovat tvorbu ledových krystalů, protože je založena na řízeném teplotním gradientu (Holt, 2000).

Molekulární modifikace kapacitace zahrnuje snížení záporného náboje, odstranění faktorů spojených se spermatem ze semenné plazmy a/nebo epididymálních sekretů, efluxu membránového cholesterolu, změnou propustnosti membrány a zvýšení influxu vápníkových iontů (Cormier et al., 1997; Visconti et al., 1995). Postupy, které se používají ke kryokonzervaci spermatu (ředění, chlazení, zmrazení a rozmrazení), však mohou způsobit funkční a strukturální poškození spermií a jejich plazmatické membrány (Cormier et al., 1997; Bailey et al., 2000), což vede k subletálnímu poškození a modifikacím odpovědným za zkrácenou životaschopnost spermií (Bailey et al., 2000). Poškození membrány může také způsobit otok a následné popraskání membrány, ztrátu membránové selektivní permeability, změny membránové fluidity a enzymatické aktivity, eflux a agregaci fosfolipidů a proteinů (Cormier et al., 1997). Po rozmražení bovinní spermie vykazují sníženou schopnost regulace intracelulárního vápníku a aktivitu fosfolipázy A2. Zvýšená propustnost vápníku může být způsobena dvěma souvisejícími jevy, fázovými přechody membránových fosfolipidů a zvýšenou membránovou fluiditou, vyvolanými během kryokonzervace. Zchlazení a zmrazení spermií z velké části poškozuje specifické vápníkové kanály v membráně bovinních spermií (Parks and Graham, 1992). V případě, že vápníkové kanály zůstanou otevřené kvůli přechodům fosfolipidové části v membráně indukovaný kryokonzervací, nastane influx extracelulárního vápníku. Vzrůstající intracelulární vápník, který souvisí s kryokonzervací, iniciuje signální dráhy vedoucí ke kapacitaci (Visconti et al., 1995). Zároveň teplotně indukované modifikace plazmatické membrány ovlivňují schopnost spermií vytlačit intracelulární vápník (Cormier et al., 2003). Jelikož jak vápník, tak fosfolipáza A2 hrají důležitou roli během kapacitace a akrozomové reakci (Fraser and McDermott, 1992), jakákoliv změna jejich regulace nebo struktura

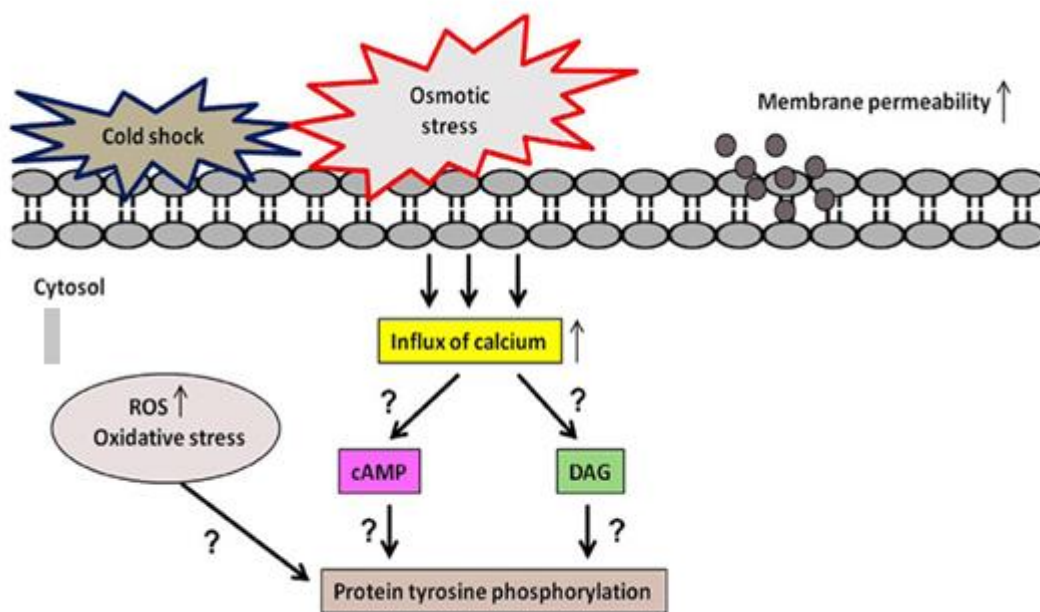
kryokonzervačními postupy může souviset se sníženou plodností zmrazeným-rozmrazených spermií býků (Pommer et al., 2003; Cormier et al., 1997).

Kryokonzervací se zmenšuje velikost hlavičky spermie, což způsobuje trvalou modifikaci membránové struktury a následně naruší schopnost spermií normálně interagovat s oocyty. Ultrastrukturální poškození membrány v důsledku zmrazení a rozmrazení spermie destabilizuje a předurčuje je k morfologickým defektům, jako jsou chybějící nebo abnormální akrozomy (Bailey et al., 2000). Fázové přechody a další ultrastrukturální modifikace plazmatické membrány během ochlazování a opětovaného zahřívání mohou způsobit reorganizaci membránových lipidů, což narušuje interakci lipid-lipid a lipid-protein potřebnou pro fyziologickou funkci membrány (Bailey et al., 2000; Hu et al., 2010).

Kryokonzervace může indukovat změny na spermiích (Naresh and Aterja, 2015). Pojem kryokapacitace, nebo také předčasná kapacitace, je nežádoucí proces, protože předčasně kapacitované spermie prochází spontánní akrozomovou reakcí a mají významně nižší penetraci do oocytů a změněnou motilitu, což vede ke snížené kvalitě kryokonzervovaného spermatu (Mostek et al., 2017). Kapacitace způsobená kryokonzervací a změny ji doprovázející však nejsou většinou kompletně dokončeny a ovlivňují negativně fyziologickou kapacitaci *in vivo* podmínkách. Většina kryokapacitovaných spermií ztrácí fertilizační schopnost dříve, než se navážou na ovidukální rezervoár a dosáhnou místa oplození (Bailey et al., 2000). Kryokonzervace vede ke kolísání teploty a dehydrataci spermií, které indukuje přeskupování membránových lipidových složek, ztrátu polynenasycených mastných kyselin a cholesterolu (Chakrabarty et al., 2007). Vnímavost plazmatické membrány k přeskupování lipidových složek během chlazení je nepřímo závislé na podílu přítomného cholesterolu v PM (Bailey et al., 2000). Toto počáteční poškození membrány postačí k nastartování kapacitace (Chakrabarty et al., 2007). Influx Ca^{2+} aktivuje AC se zvýšenou tvorbou cAMP a DAG, což vede ke kapacitaci spermií prostřednictvím tyrosinové fosforylace. Tyrosinová fosforylace indukovaná kryokonzervací výrazně snižuje vazebnou schopnost spermií na zona pellucida u býčích spermií. Vytváření chladového šoku během kryokonzervace je spojeno s vysokým množstvím reaktivních druhů kyslíku, což také vede k oxidativnímu stresu a tyrosinové fosforylaci. Přesné dráhy v těchto procesech jsou zatím nejasné (Obr. 7) (Naresh and Aterja, 2015). Zvýšené hladiny ROS díky kryokonzervaci vedou k vyšším hladinám karbonylových proteinů, což je index celkové oxidace (Mostek et al., 2017). Chladový šok také ničí selektivní propustnost plazmatické membrány spermií na vápník, což vede k nadměrným intracelulárním hladinám, které snižují motilitu a vedou k nekróze spermií (Bailey et al., 2000).

Oxidativní a osmotický stres během procesu zmrazování a rozmrazování mění složení lipidů a bílkovin plazmatické membrány, které snižuje motilitu, poškozuje mitochondrie, bičík spermie a zvyšuje fragmentaci DNA (Bailey et al., 2000; Mostek et al., 2017; Naresh and Atreja, 2015). K osmotickému stresu převážně dochází při přidávání a odstraňování kryoprotektantů (Sieme et al., 2015). Spermie jsou obzvláště citlivé na poškození způsobené oxidačním stresem, protože plazmatická membrána je bohatá na polynenasycené mastné kyseliny, které snadno podstupují peroxidaci a tvoří sekundární produkty, které mohou oxidovat spermie (Bailey et al., 2000; Mostek et al., 2017). Následky peroxidace nenasycených mastných kyselin jsou významné, od poškození membrány, inhibice dýchání až k efluxu intracelulárních enzymů (Bailey et al., 2000).

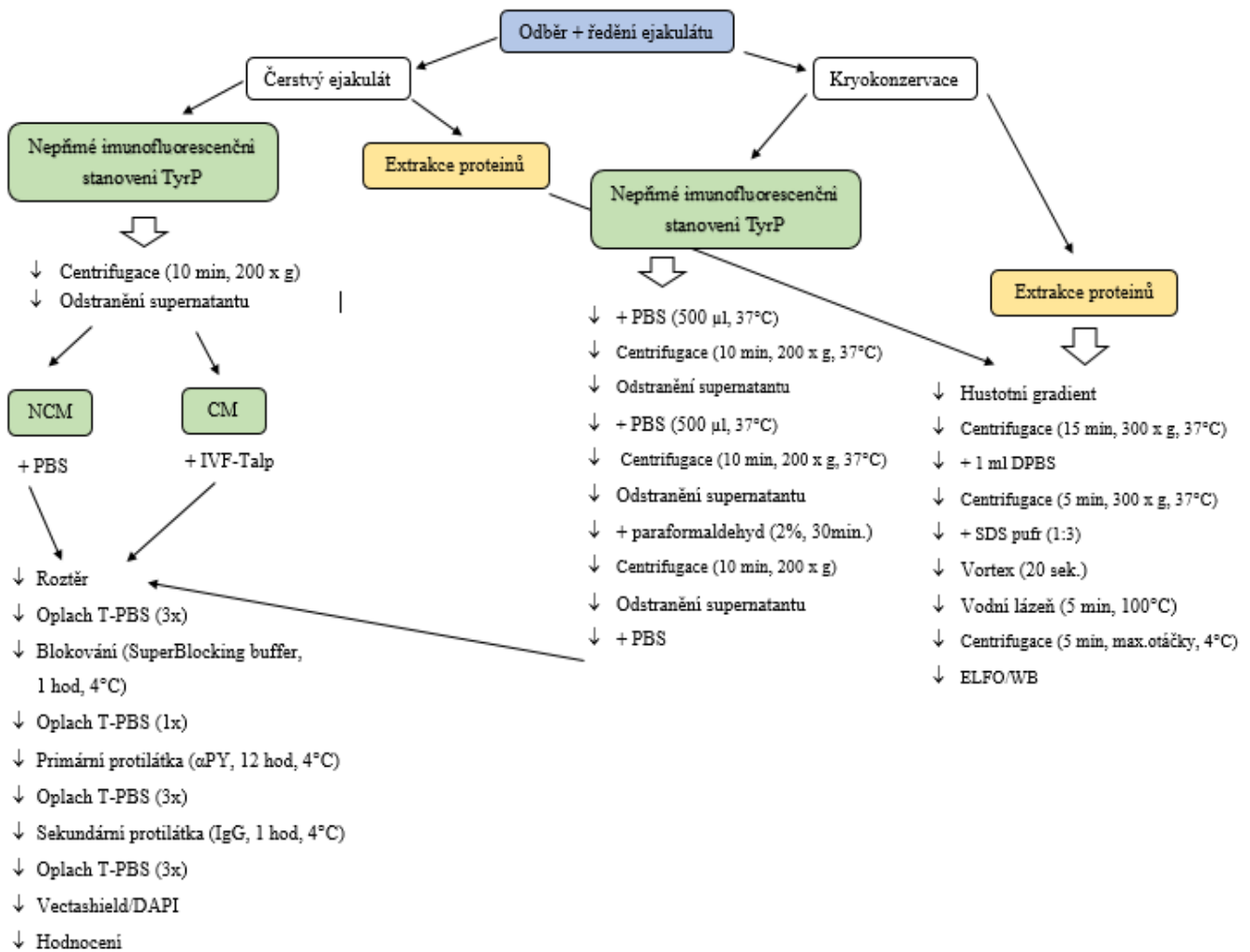
Během mrazení a rozmazování dochází především k ohrožení plazmatické membrány, akrozomu a hlavně jeho vnější akrozomální membrány, a také k mitochondriální struktuře mající vliv na motilitu spermií (Layek et al., 2016). Teplotní a osmotický stres způsobuje též mechanické poškození spermií (Singh et al., 2012). Kryokonzervované spermie jsou citlivější na změny vnějšího prostředí, které by mohly vysvětlit jejich omezenou délku života ve srovnání s čerstvými spermii (Pommer et al., 2003).



Obr. 7: Schéma znázorňující kapacitační změny při kryokonzervaci (Naresh and Atreja, 2015).

4 Materiály a metody

Experiment byl založen na zjištění stupně kapacitace spermií před a po kryokonzervaci pomocí nepřímého imunofluorescenčního stanovení PTP a SDS gelové elektroforézy. Imunofluorescenční metodou se zkoumaly fosforylované části na hlavičce spermie. Pomocí elektroforézy a následné imunoblotovací analýzy byla zjišťována úroveň celkové tyrosinové fosforylace.



Obř. 8: Schéma znázorňující pracovní postup při zpracování ejakulátu k získání vzorků.

4.1 Odběr a zpracování ejakulátu

Ejakulát byl odebrán 6 býkům standardním způsobem na inseminační stanici (CRV Czech Republic, spol. s.r.o., Zásnuky, Česká republika). Každý ejakulát prošel standardní kontrolou kvality prováděnou kvalifikovaným laborantem. Bylo hodnoceno: objem ejakulátu, koncentrace spermií a procento pohyblivých spermií. K pokusu byl použit pouze ejakulát, který splňoval limity pro objem (1,25 ml), pohyblivost spermií ($\geq 70\%$) a koncentraci spermií ($\geq 0,7 \times 10^9 / \text{ml}$).

Poté byl ejakulát rozdělen na poměrné díly podle počtu experimentálních variant (viz. Obr. 8). Část ejakulátu určená ke kryokonzervaci byla naředěna v ředidle Optixcell (IMV Technologies, Francie) na finální koncentraci $120 \times 10^6 / \text{ml}$, naplněna do PVC pejet o objemu 0,25 ml a ekvilibrován při teplotě 5°C po dobu 2 hodin. Po ekvilibraci byly pejety zmrazeny nad parami tekutého dusíku po dobu 15 min a poté přímo vloženy do tekutého dusíku (-196°C). Hodnocení vzorků vždy probíhalo s minimálním odstupem jednoho týdne od kryokonzervace.

4.2 Nepřímé imunofluorescenční stanovení PTP

4.2.1 Nativní ejakulát

Naředěný nativní ejakulát po přivezení z inseminační stanice byl centrifugován $200 \times g$ 10 minut při pokojové teplotě. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a peletka rozdělena do 3 mikrozkušavek podle stupně kapacitace. Do vzorku připraveného pro nekapacitované spermie byl přidán roztok PBS v poměru 1:2 (spermie:PBS) a do zbylých dvou mikrozkušavek byl přidán roztok IVF-Talp s pH 7,3 (Tab. 1) na kapacitaci ve stejném poměru (Obr. 8). Mikrozkušavky s otevřeným víčkem s IVF-Talp (Tab. 2) byly kapacitovány v inkubátoru při $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$.

Komponenty	Objem
IVF-TL stock	20 ml
BSA-FAF (6%)	0,12 g
Na Pyruvát	200 μl
Gentamicin	100 μl
Heparin	100 μl

Tab. 1: Komponenty pro přípravu 20 ml roztoku IVF-Talp.

Komponenty	Molekulární váha	g/100 ml
NaCl	58,45	0,666 g
KCl	74,55	0,023 g
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	138,00	0,041 g
Na Laktát	112,06	84,9 µl
CaCl ₂ •H ₂ O	147,00	0,029 g
MgCl ₂ •6H ₂ O	203,31	0,0101 g
Hepes	238,30	0,238 g
NaHCO ₃	84,00	0,21 g

Tab. 2: Komponenty pro přípravu 100 ml roztoku IVF-TL stock.

4.2.2 Kryokonzervované spermie

Pejety byly rozmrazeny standardním způsobem 30s/ 37°C a po rozmražení pejety Všechny vzorky splňovaly všeobecný standard (tzn. Procento motilních spermií bylo více jak 30 %).

Do rozmraženého ejakulátu v mikrozkuhavce byl přidán vytemperovaný roztok PBS (solný roztok fosfátem pufrovaný) na teplotu 37 °C o objemu 500 µl (Obr. 8). Poté následovala centrifugace 200 x g, 10 min, 37 °C, čímž vznikla na dně mikrozkuhavky peletka a nad ní supernatant. Supernatant byl opatrně odsát pipetou tak, aby na dně zůstala neporušená peletka, ke které bylo opět přidáno 500 µl PBS a mikrozkuhavka byla opět centrifugována na 200 x g po dobu 10 min při 37 °C. Po odsátí supernatantu byl k peletce přidán 2% paraformaldehyd na 30 min, který způsobil zafixování spermií. Po fixaci paraformaldehydem byla mikrozkuhavka centrifugována 200 x g po dobu 10 min při pokojové teplotě. Po centrifugaci se odsál supernatant a peletka byla naředěna na optimální koncentraci pomocí PBS a celá suspenze byla dobře promíchána (Obr. 8).

4.2.3 Příprava sklíček se vzorky

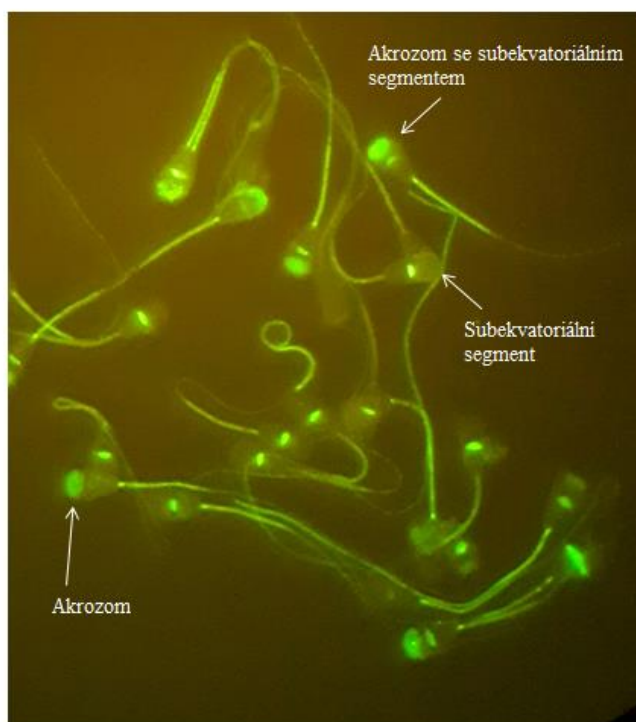
Z připravené suspenze ze spermií a PBS (IVF-TL), řádné a šetrné homogenizaci, byl proveden roztěr standardní technikou, kdy bylo použito 30 μ l suspenze na jeden roztěr na podložním sklíčku. Udělaný roztěr byl nechán při pokojové teplotě na vzduchu zaschnout bez použití vyhřevné desky. Po zaschnutí byl na roztěr vytvořena kruhová plocha o podobné velikosti krycího sklíčka pomocí hydrofobní fixy PAP-pen liquid blocker (Sigma Aldrich, Německo). Kruhové plochy na sklíčku byly opláchnuty třikrát po 1 ml T-PBS (solný roztok fosfátem pufovaný s přidavkem tweenu). Blokování opláchnutých sklíček probíhalo ve vlhké komůrce jednu hodinu při 4 °C v lednici pomocí SuperBlocking buffer (100 μ l). Vlhká komůrka byla složena z velké Petriho misky vyložená buničinou namočenou destilovanou vodou, na které byla naskládána sklíčka se vzorky a celá Petriho miska byla přikryta aluminiovou fólií. Po uplynutí blokování byla sklíčka jednou opláchnuta T-PBS.

Následně sklíčka se suspenzí byla inkubována po dobu 12 hodin při 4°C s monoklonální anti-fosfotyrosinovou protilátkou ve vlhké komůrce (α PY)(4G10, Millipore, Temecula, USA), která byla naředěna 1: 300 v DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline). Po zhruba dvanácti hodinách inkubace byla sklíčka opláchnuta T-PBS roztokem a byla nanesena sekundární protilátka Goat antimouse IgG, která byla naředěna 1:400 v DPBS. Vzorky byly vloženy do vlhké komůrky k inkubaci při 4 °C v lednici jednu hodinu. Po opláchnutí T-PBS byla na sklíčka přidělena krycí sklíčka s montovacím médiem Vectashield/DAPI (Vector Laboratories, USA). Takto zakrytá pole se nechala 5 minut sednout pod světlo nepropustným poklopem a následně byla zafixována lakem a skladována ve 4 °C bez přístupu světla v lednici.

4.2.4 Hodnocení imunofluorescence

Sklíčka se vzorky byla hodnocena s využitím fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E600 (Nikon, Tokyo, Japonsko) a objektiv Plan Fluor Oil se zvětšením 100x. Na každém podložním sklíčku bylo hodnoceno 200 spermií. Na základě signálu v hlavičce spermií byla hodnocena tyrosinová fosforylace. Spermie pouze s viditelným akrozomem, spermie s akrozomem a subekvatoriálním segmentem a pouze s ekvatoriálním segmentem (viz. Obr. 9). Experiment ukázal procentuální zastoupení tyrosinové fosforylace jednotlivých částí na hlavičce spermie a tyto hodnoty byly zpracovány do grafů. Klasifikovala se míra tyrosinové fosforylace na akrozomu a subekvatoriálním segmenty a podle toho byly spermie rozděleny na stupně kapacitace a do 3 kategorií.

Nízký stupeň kapacitace – spermie byly bez fluorescenčního signálu v subekvatoriálním segmentu, se signálem nebo bez signálu v oblasti akrozomu. Střední stupeň – spermie vykazovaly signál v subekvatoriálním segmentu. Vysoký stupeň kapacitace – spermie se signálem v subekvatoriálním segmentu a akrozomu (Viz obr. 13).



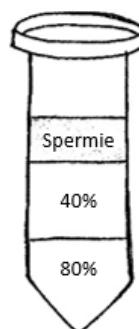
Obr. 9: Ilustrační fotografie z fluorescenčního mikroskopu.

4.3 Pročištění vzorků pomocí hustotního gradientu Bovi Pure a extrakce proteinů ze spermíí

Kryokonzervované pejety byly rozmrazeny standardním způsobem ve 37 °C vodní lázni 30 sekund. Vzorky o objemu 0,25 ml byly napipetovány na vrstvu 500 μl 80% a 500 μl 40% roztoku ze Sperm-TALP a Bovi Pure (Nidacón, USA) v 1,5 ml mikrozkuřavce (Obr. 10). 40% a 80% roztok byl připraven dle manuálu výrobce s použitím Bovi Pure a Sperm-TALP (Tab. 3). Výsledná koncentrace spermíí odpovídala minimálně 5 x 10⁶ v mm³. Všechny komponenty v mikrozkuřavce se musely nanášet tak, aby vrstvy zůstaly neporušené a nedošlo k jejich promíchání.

Komponenty	Objem
Sperm-TL stock	40 ml
BSA (6%)	0,25 g
Na Pyruvát	2104 μ l
Gentamicin	200 μ l

Tab. 3: Komponenty pro přípravu 40 ml roztoku Sperm-TALP



Obr. 10: Hustotní gradient.

Všechny složky pro Sperm-TALP byly smíchány v kádince, zahřáty a míchány do úplného rozpuštění BSA. Pro výrobu 100 ml Sperm-TALP stock bylo použito:

Komponenty	Molekulární váha	g/100 ml
NaCl	58,45	0,666 g
KCl	74,55	0,023 g
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	138,00	0,0041 g
Na Laktát	112,06	84,9 μ l
CaCl ₂ •H ₂ O	147,00	0,029 g
MgCl ₂ •6H ₂ O	203,31	0,0101 g
Hepes	238,30	0,238 g
NaHCO ₃	84,00	0,21 g

Tab. 4: Komponenty pro přípravu 100 ml Sperm-TALP stock.

Mikrozkumavka s navrstvenými spermii na 80% a 40% roztoku byla centrifugována na 300 x g 15 minut při pokojové teplotě. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a ke zbylé

peletce přidán 1 ml DPBS (Obr. 8). Peletka s DPBS byla centrifugována 5 minut na 300 x g a poté byl odstraněn supernatant. Do centrifugované mikrozkušavky s peletkou a odstraněným supernatantem byl přidán redukující vzorkový SDS pufr vytemperovaný na pokojovou teplotu v poměru 1:3 (vzorek:pufr).

Destilovaná H ₂ O	3,8 ml
Tris-HCl (pH 6,8; 0,5 M)	1,0 ml
Glycerol	0,8 ml
10% SDS	1,6 ml
Bromfenolová modř 0,05%	0,4 ml
Merkaptoethanol	0,4 ml

Tab. 5: Komponenty pro přípravu SDS vzorkového pufru.

Vzorek se vzorkovacím pufrům byl vortexován přibližně 20 sekund a vložen do 100°C vodní lázně na 5 minut. Po vodní lázni byl vzorek v mikrozkušavce vortexován 20 sekund a poté centrifugován na maximální otáčky 5 minut při 4 °C. Následně byl odsát supernatant a skladován při -80°C v mrazicím boxu.

4.4 SDS-elektroforéza extrahovaných proteinů v polyakrylamidovém gelu podle Laemmliho a Wester Blotting

Pro elektroforetické rozdělení proteinů byl použit 10% polyakrylamidový separační gel.

Příprava 10% separačního gelu:

- 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
- 4,16 ml destilované H₂O
- 3,33 ml roztoku akrylamidu (tj. 29,2% akrylamid a 0,8% BIS)
- 100 µl 10% SDS

Těsně před nalitím gelu mezi skla bylo do roztoku separačního gelu přidáno:

- 4,5 µl TEMED
- 35 µl 10% APS.

Připravený roztok na separační gel byl nalit mezi uchycené plastové desky ve stojanu tak, aby gel nepodtekl a převrstven destilovanou vodou. Gel byl nechán polymerovat asi 1 hodinu.

Pro elektroforetické rozdělení proteinů býčích spermií a jejich následnou imunodetekci byl připraven 4% zaostřovací gel:

- 625 μ l 0,5M Tris-HCl (pH 6,8)
- 1,52 ml destilované H₂O
- 325 μ l roztoku akrylamidu (tj. 29,2% akrylamid a 0,8% BIS)
- 25 μ l 10% SDS

Těsně před nalitím gelu mezi skla bylo do roztoku zaostřovacího gelu přidáno:

- 3,8 μ l TEMED
- 35 μ l 10% APS.

Z povrchu separačního gelu byla odsáta voda a byla nanесena vrstva zaostřovacího gelu. Do zaostřovacího gelu byl okamžitě zasunut hřeben pro tvorbu jamek. Gel byl nechán polymerovat asi 20 minut.

Byla sestavena aparatura pro elektroforézu Mini PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad, USA). Do katodového i anodového prostoru byl nalit stejný elektroodový pufr (0,025M Tris, 0,192M glycin, 0,1% SDS, pH 8,3). Po odstranění hřebenu bylo do jamek nanесeny vzorky pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky. Objem nanášených vzorku byl 12 μ l na jamku.

Molekulová hmotnost separovaných proteinů byla určena podle barvených molekulových proteinových standardů Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad, USA). Vzorky proteinů pro elektroforetické rozdělení byly extrakty spermií připravené pomocí vzorkového pufru (viz. Kapitola 3.3.1).

Jako zdroj stejnosměrného proudu byl použit Power Pac 1000 (Bio-Rad, USA). Zpočátku elektroforéza probíhala při napětí 80 V 30 minut a po přechodu proteinů do separačního gelu bylo nastaveno napětí na 140 V 60 min.

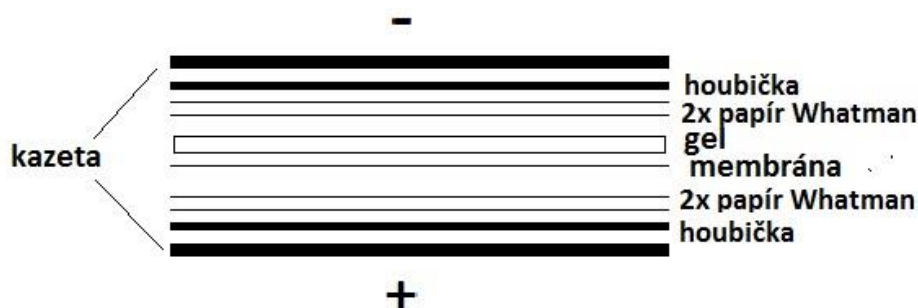
4.4.1 Přenos proteinů rozdělených SDS-elektroforézou na membránu (Western Blot)

Před elektropřenosem proteinů z polyakrylamidového gelu byla PVDF-membrána (Merck Millipore, USA) nejprve promyta 100% metanolem, poté destilovanou vodou a následně inkubována 15 minut v blotovacím pufru. Na jeden litr blotovacího pufru bylo použito:

- 3,0285 g 0,025 M Tris

- 14,414 g 0,192 M Glycin
- 200 ml 20% metanol
- 800 ml destilované vody

Při použití nitrocelulosové membrány (NC) byla membrána před použitím inkubována 15 minut v blotovacím pufru. Do blotovacího pufru byly také ponořeny, na jednu membránu, na 10 minut dvě houbičky a 4 filtrační papíry Whatman. Poté polyakrylamidový gel spolu s membránou, filtračními papíry a houbičkami vloženy do kazety (Obr. 11). Před uzavřením kazety s navrstvenými houbičkami, filtračními papíry, gelem a membránou bylo nutné vytlačit přítomné bublinky pomocí skleněné zkumavky.



Obr. 11: Schéma sestavení kazety s gelem a membránou pro elektropřenos.

Uzavřená kazeta byla vložena do přístroje pro elektropřenos Mini Protean 3 Cell (Bio-Rad, USA) spolu s chladícím bločkem a zalita po rysku blotovacím pufrům. Celý přístroj byl ponořen do ledové tříště.

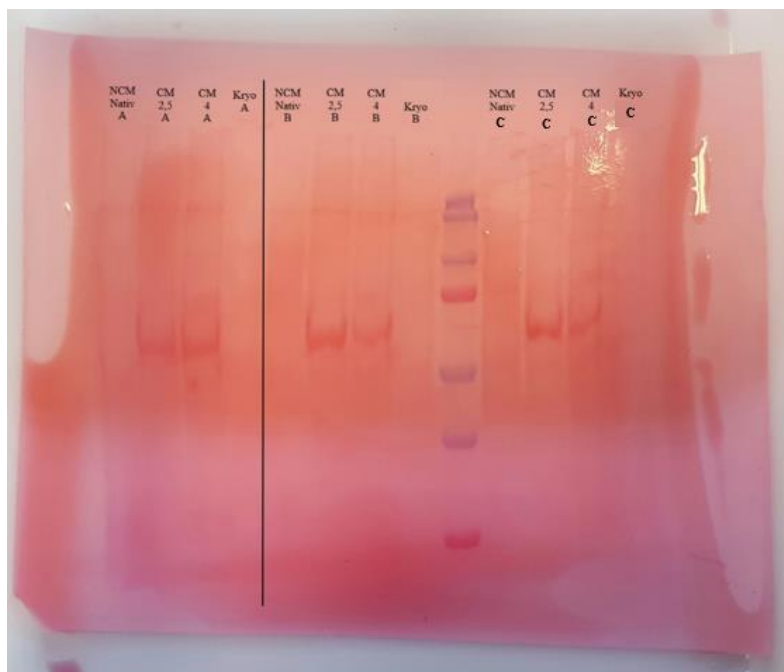
Elektrody byly připojeny ke zdroji Power Pac 1000 (Bio-Rad, USA). Elektropřenos probíhal 90 minut při 500 mA.

Po ukončení přenosu byla membrána opatrně vyjmuta z kazety a promyta destilovanou vodou.

4.4.2 Detekce proteinu pomocí Ponceau

Po opláchnutí membrány destilovanou vodou, byla na membránu použita barva Ponceau S red, která omývala membránu přibližně jednu minutu. Obarvením byla docílena vizualizace celkových proteinů, protože byly obarveny přítomné proteiny na membráně. Tímto způsobem

byly zjištěny informace o celkovém množství nanesených proteinů v jednotlivých vzorcích a o přibližné molekulární váze detekovaných proteinů. Obarvená membrána byla vyfocena (příloha č. 1) a následně omývaná PBS-T do vymizení barvy z membrány (přibližně 15 minut).



Obr. 12: Zviditelnění celkových proteinů na membráně pomocí barvy Ponceau S red.

4.4.3 Blokování nespecifického vázání protilátek na membránu, inkubace s primární a sekundární protilátkou

Po patnácti minutách byl na membráně vyměněn PBS-T za SuperBlock™ (PBS) Blocking Buffer (ThermoFisher Scientific, USA), se kterým byla membrána inkubována v termostatu 40 minut. Následně byla membrána dvakrát propláchnuta PBS-T a aplikována na membránu primární protilátka Anti-Phosphotyrosine, klon 4G10 (EMD Millipore, USA) naředěna 10 000x v PBS a inkubována minimálně 12 hodin při 4 °C. Na jednu membránu bylo použito 10 ml PBS-T s primární protilátky. Po inkubaci membrány s primární protilátkou byla membrána 6x propláchnuta po 5 minutách v PBS-T na třepačce. Po posledním proplachu PBS-T byla membrána ošetřena sekundární protilátkou GaM-IgG-HRP (Bio-Rad, USA), která byla ředěna 3 000x v PBS-T a nechána na membráně působit jednu hodinu (příloha č. 2). Na jednu membránu bylo použito 10 ml PBS-T se sekundární protilátkou. Po inkubaci membrány v sekundární protilátce byla membrána propláchnuta 4x v PBS-T a 2x v PBS po 10 minutách.

4.4.4 Hodnocení membrány

Po oplachu v PBS byla membrána vložena do folie a ošetřena chemiluminiscenčním substrátem SuperSignal West Pico (ThermoFisher Scientific, USA). Ošetřená membrána ve folii byla skenována v přístroji Azure Biosystem c600.

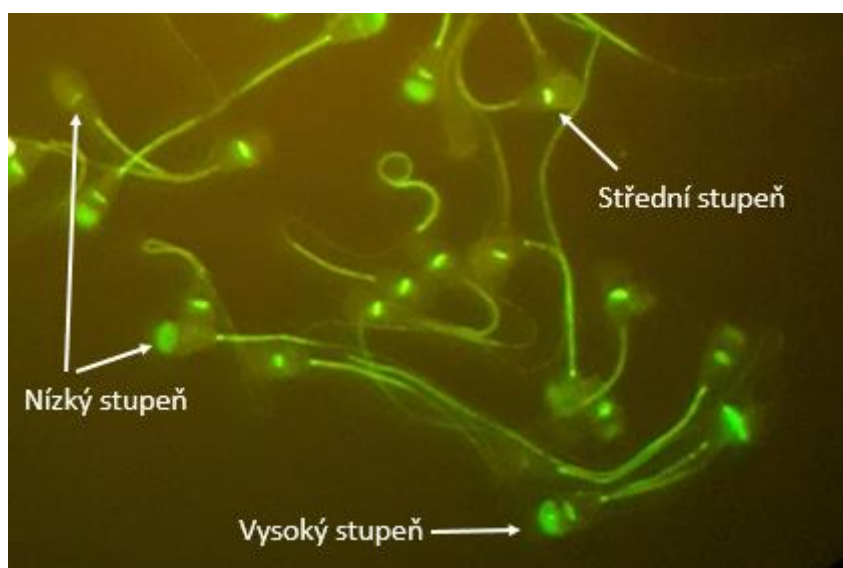
Naskenovaná membrána byla vyhodnocována v programu Image Studio Digits 4.0. Bylo provedeno denzitometrické měření a normalizace nanášky pomocí signálu detekovaného Tubulinu. Kromě stanovení molekulové hmotnosti byla v denzitometrickém programu na analýzu blotů zjištěna intenzita specifických bendů za účelem změření úrovně exprese proteinů. Byly vybrány bendy jednotlivých vypočtených proteinů od všech použitých vzorků. Intezity vybraných bendů byly přeneseny do programu excel a následně z těchto hodnot byly vygenerovány sloupcové grafy (Graf 3. – 5.).

5 Výsledky

V následující kapitole budou uvedeny výsledky experimentů a jejich popis. Výsledky budou posuzovány z pohledu vlivu kryokonzervace na tyrosinovou fosforylaci spermií jako jednoho z markerů kapacity. Ke zpracování výsledků byly použity programy Image Studio Digits 4.0, statistická 12.0 Start a Microsoft Office Excel.

5.1 Hodnocení vlivu kryokonzervace pomocí nepřímé imunofluorescenční metody

Byla zjišťována míra tyrosinové fosforylace u býčích spermií čerstvých nekapacitovaných, kapacitovaných a kryokonzervovaných. V experimentu byly spermie shromažďovány, zpracovávány, analyzovány a klasifikovány podle stupně tyrosinové fosforylace (Tardif et al., 2001). Fosforylace proteinů spermií byla detekována v akrozomální oblasti a subekvatoriálním segmentu.



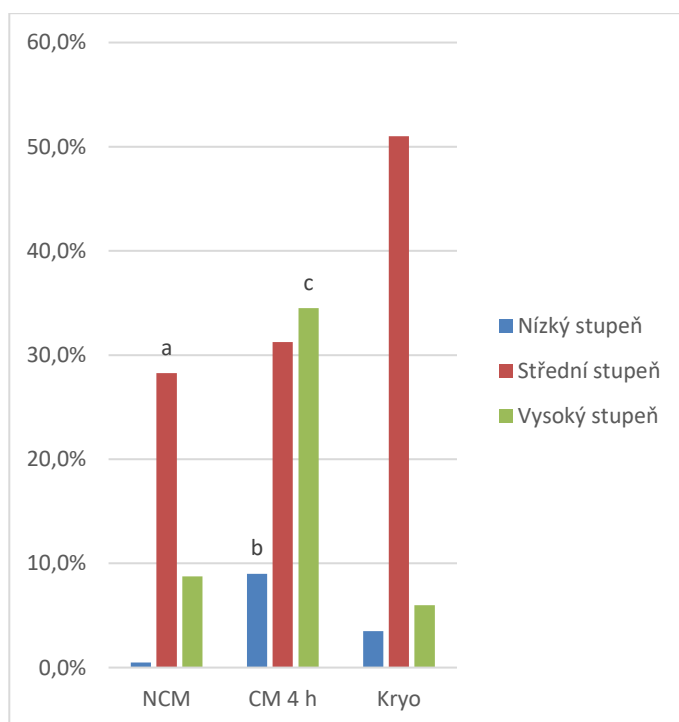
Obr. 13: Stupně tyrosinové fosforylace zviditelněná pomocí nepřímé imunofluorescence.

5.1.1 Hodnocení tyrosinové fosforylace z pohledu stupně kapacity

Lokalizace a relativní distribuce proteinů obsahujících fosfotyrosin na čerstvých nebo kryokonzervovaných spermích je znázorněn na obrázku 9 a 13.

Nízký stupeň kapacity, který se projevuje signálem v akrozomální oblasti nebo bez signálu v celé hlavičce byl u všech kategorií přítomen zřídka ve srovnání se středním a vysokým stupněm. I přesto byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi nekapacitovanými a kapacitovanými spermii (ANOVA, $p < 0,05$). Střední stupeň charakteristický signálem v subekvatoriálním segmentu vykazuje signifikantní rozdíl v PTP mezi skupinou kapacitovaných spermii a nekapacitovaných a také mezi kapacitovanými a kryokonzervovanými spermii (ANOVA, $p < 0,05$). U poslední – vysokého stupně kapacity, kde se vyskytoval signál na subekvatoriálním segmentu i na akrozomu, experiment ukázal signifikantní rozdíl mezi kryokonzervovanými a kapacitovanými spermii (ANOVA, $p < 0,05$).

Z celkového hlediska největší výskyt fosforylace na tyrosinu u spočítaných spermii byl u kapacitovaných vzorků po dobu 4 hodin. Ale nemalá část tyrosinové fosforylace je i patrná u kryokonzervovaných spermii a to konkrétně ve středním stupni kapacity (Graf 1.).

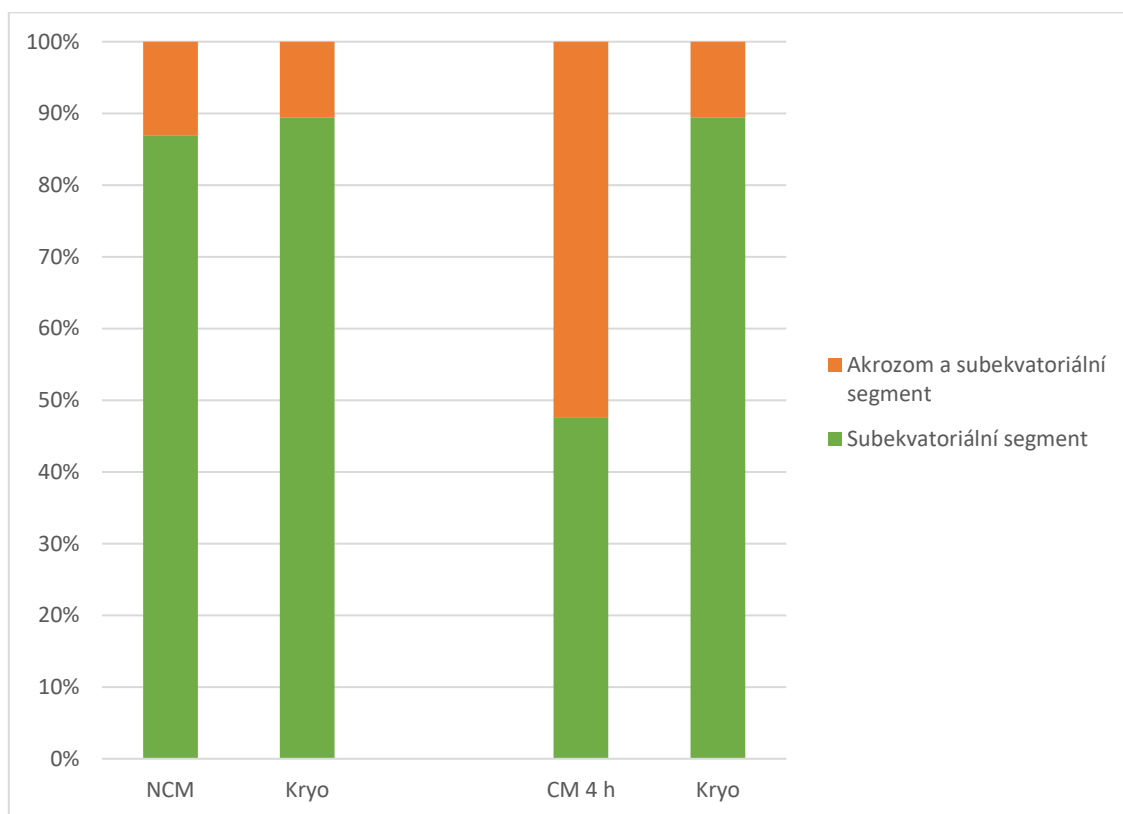


Graf 1: Procentuální zastoupení tyrosinové fosforylace na jednotlivých částí hlavičky ve stupních kapacity.

^{a, b, c} Hodnoty označené různými indexy v rámci stupně kapacity mezi skupinami se statisticky významnými rozdíly (ANOVA, $p < 0,05$)

5.1.2 Hodnocení tyrosinové fosforylace podle lokalizace signálu

Většina nekapacitovaných spermií vykazovala imunofluorescenci v subekvatoriálním segmentu ve srovnání s kapacitovanými spermiemi, které vykazovaly značnou tyrosinovou fosforylaci také v akrozomální oblasti. U kryokonzervovaných spermií byl významněji fosforylován protein obsahující tyrosin v oblasti subekvatoriálního segmentu bez signálu na akrozomu v porovnání s kapacitovanými spermiemi. Nekapacitované spermie projevovaly fluorescenci pouze v subekvatoriálním segmentu více než v oblasti akrozomu a subekvatoriálním segmentu najednou. Podobně tomu bylo u kryokonzervovaných spermií. Kapacitované spermie po dobu 4 hodin měly přibližně podobné procentuální zastoupení v lokalizaci fosforylace na tyrosinu (Graf 2.).



Graf 2: Lokalizace proteinů obsahující fosfotyrosin u čerstvých nativních spermií, kapacitovaných 4 hodiny a kryokonzervovaných ve stupni kapacitace středním a vysokém.

5.2 Vliv kryokonzervace na profil fosforylovaných proteinů spermií

Pro odhalení fosforylovaných proteinů obsahujících byla použita imunoblotovací analýza s použitím monoklonální protilátky Anti-PY a sekundární protilátky Goat anti-Mouse IgG (Thermo Fisher, USA) ředěné v PBS.

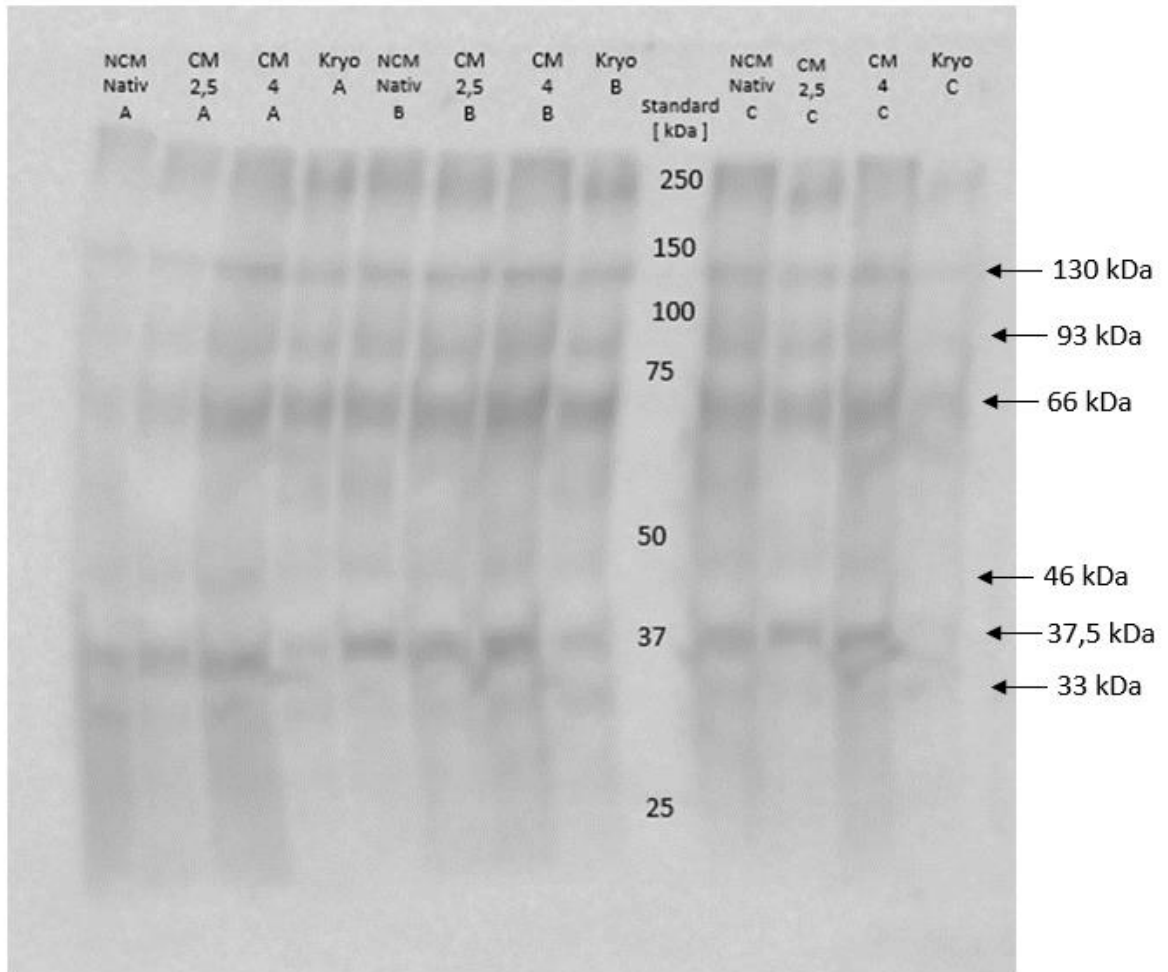
Na obrázku 12 je znázorněn profil proteinů obsahující fosfotyrosín u nativních spermií, kapacitovaných po 2,5 hodinách a 4 hodinách a spermií po kryokonzervaci. Vzorky na extrakci proteinů, které byly následně použity, byly pročištěny pomocí hustotního gradientu Bovi Pure. Pročištění vzorků přes hustotní gradient bylo z důvodu lepšího vyhodnocení membrány. Membrána s nepročištěnými vzorky obsahovala mnoho nečistot (příloha 3). Pomocí kalibračních křivek (příloha č. 3) byly vypočítány molekulové váhy proteinů, které byly detekovány. Konkrétní hodnoty byly vypočteny u šesti proteinů o váze 130 kDa, 93 kDa, 66 kDa, 46 kDa, 37,5 kDa a 33 kDa.

U vzorku A je možné sledovat nižší intenzitu všech proteinů u kryokonzervovaných spermií v porovnání s nekapacitovanými nebo kapacitovanými spermie. Nejnižší intenzita se projevila u proteinů s molekulovou váhou 46 kDa a 33 kDa. Nejvyšší intenzita byla naměřena u vzorku A proteinu o váze 66 kDa kapacitovaných spermií 4 hodiny a u proteinu 37,5 kDa nekapacitovaných spermií (Graf 3.)

Intenzita proteinů u vzorku B je vyšší u kryokonzervovaných spermií než u nekapacitovaných nebo kapacitovaných spermií, a to konkrétně u proteinů o molekulové váze 130 kDa, 66 kDa a 46 kDa. U proteinů 93 kDa a 33 kDa je vyšší intenzita pouze v porovnání mezi kapacitovanými a kryokonzervovanými spermii. Nejintenzivněji se projevilo u vzorku B protein o váze 66 kDa kryokonzervovaných spermií (Graf 4.).

Všechny proteiny kryokonzervovaných spermií u vzorku C vykazovaly vyšší intenzitu než u nekapacitovaných nebo kapacitovaných spermií. Největší rozdíl v intenzitě mezi kryokonzervovanými a nekapacitovanými nebo kapacitovanými byl naměřen u proteinu p46. U proteinu s molekulovou hmotností 66 kDa byla zjištěna největší intenzita mezi skupinami u vzorku C (Graf 5.).

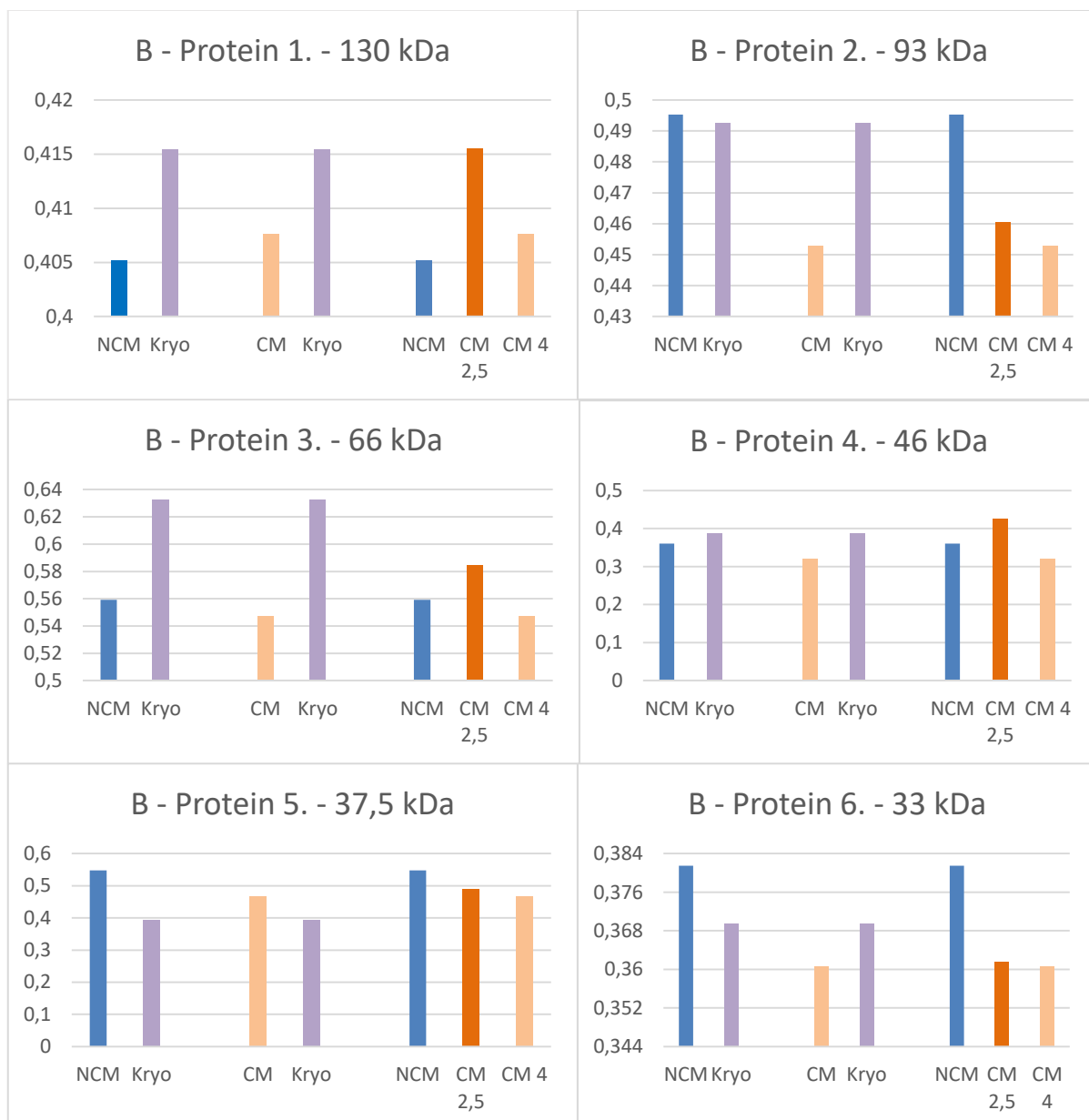
Vzorky B a C vykazují shodnější tendence v intenzitě proteinů oproti vzorku A. Vyšší intenzita mezi nekapacitovanými/kapacitovanými a kryokonzervovanými spermii byla vyhodnocena u vzorku B a C. Jako kontrola byly použity skupiny nekapacitovaných, kapacitovaných 2,5 hodiny a 4 hodiny.



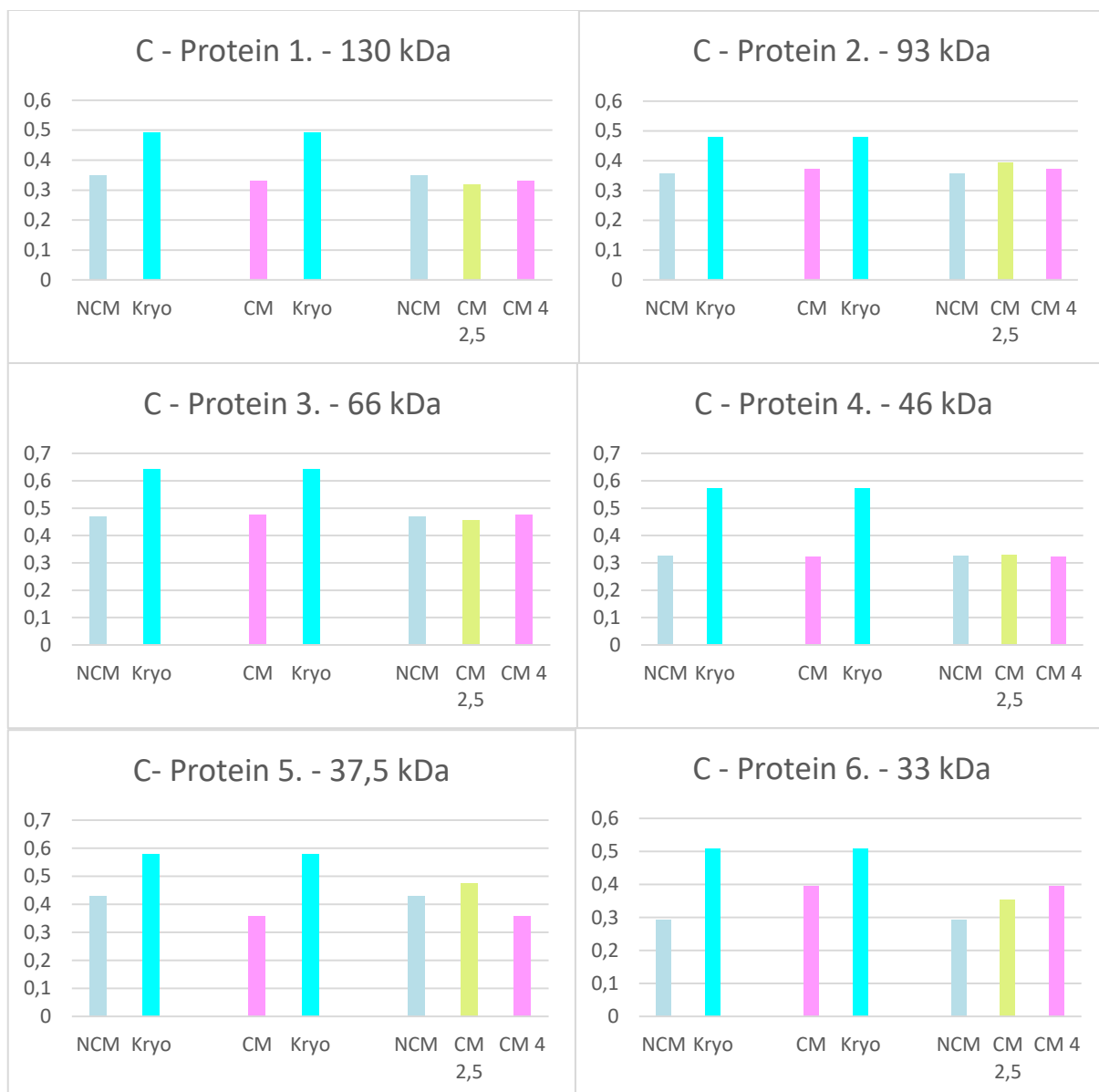
Obr. 14: Profil proteinů obsahující fosfotyrosin spojený s kapacitací bovinních spermií a kryokonzervací spermií. Ejakulované spermie od různých býků byly zpracovány tak, jak je popsáno v materiálech a metodách, inkubovány v IVF médiu 2,5 a 4 hodiny. Proteiny spermií byly extrahovány po inkubaci 2,5 hodin a 4 hodin a separovány. Tyrosin fosforylované proteiny byly detekovány imunoblotovou analýzou s použitím monoklonální protilátky Anti-PY a imunoreaktivita byla objevena za použití sekundární protilátky GaM-IgG-HRP. Molekulové hmotnosti standardu jsou značeny čísla 250-25 mezi vzorky.



Graf 3: Intenzity jednotlivých proteinů u ejakulátu A pro nekapacitované (NCM), kapacitované (CM) a kryokonzervované spermie (Kryo).



Graf 4: Intenzity jednotlivých proteinů u ejakulátu B pro nekapacitované (NCM), kapacitované (CM) a kryokonzervované spermie (Kryo).



Graf 5: Intenzity jednotlivých proteinů u ejakulátu C pro nekapacitované (NCM), kapacitované (CM) a kryokonzervované spermie (Kryo).

6 Diskuze

Kapacitace, která představuje konečné kroky dozrávání, činí býčí spermie schopné interagovat s oocytem. Může probíhat v *in vivo* podmínkách v samičím genitálním traktu v oviduktu nebo v *in vitro* pomocí kapacitačních medií (Tardif et al., 2001). Během kapacitace probíhá řada událostí na plazmatické membráně spermií a uvnitř spermií. Mezi molekulární změny patří například aktivace specifických iontových kanálů, influx vápníku, tvorba cAMP a tyrosinová fosforylace (Naz et al., 2004).

Důležitá biotechnologická metoda umožňující uchovávání gamet v tekutém dusíku po neomezeně dlouhou dobu patří kryokonzervace. Kryokonzervace je nejvíce využívána u spermií býků, ale tato metoda s sebou nese řadu negativních dopadů na strukturu spermií a na biochemické a biofyzikální procesy plazmatické membrány (Mostek et al., 2017). Právě plazmatická membrána je primární strukturou poškozenou při kryokonzervaci (Bailey et al., 2000; Yeste, 2016). Složení plazmatické membrány je popisováno jako tekutá mozaika, ve které jsou proteiny vloženy do lipidové dvojvrstvy (Tapia et al., 2012). Fosfolipidy poskytují základní strukturální uspořádání membrány, membránové proteiny umožňují specifické funkce. Přímou umístěné proteiny v plazmatické membráně jsou tzv. transmembránové proteiny, mezi které patří iontové kanály nebo receptory. Transmembránové proteiny se podílejí na regulaci signalizačních procesů, které umožňují spermii reagovat na vnější signály nebo účastnit se selektivního transportu molekul přes membránu (Tapia et al., 2012). Transport vápníku probíhá pomocí vápníkových kanálů a sodíko-draslíkových pump vyměňující intracelulární sodík za extracelulární hydrogenuhličitan. Tyto molekuly dále spouštějí kaskádu přes rozpustnou adenyl cyklázu, cyklický adenosinmonofosfát, proteinkinázu A, PTP, která finálně spouští kapacitaci (Naz et al., 2004). Lipidová dvojvrstva zahrnuje fosfolipidy, cholesterol a glykolipidy. Procentuální zastoupení jednotlivých složek se liší mezidruhově, mezi jedinci stejného druhu, ale také mezi odebranými ejakulátu od jednotlivých býků (Gadella et al., 2001). Cholesterol je ve vysokém množství v hlavičce spermie, kde reguluje fluiditu membrány a hraje důležitou roli při kapacitaci. Cholesterol je vyvazován z plazmatické membrány proteiny s vysokou molekulární hmotností, jako je albumin přítomný v oviduktální tekutině. Eflux cholesterolu z plazmatické membrány spermie je spojen s aktivací signálních transdukčních drah vedoucích ke kapacitaci a koreluje se zvýšením tyrosinové fosforylace (Naz et al., 2004; Visconti et al., 2011). Jak je uvedeno výše v textu, plazmatická membrána je primární struktura poškozená při kryokonzervaci. Kryokonzervace vede k teplotní fluktuaci a dehydrataci buněk, která indukuje přeskupování membránových lipidových složek, ztrátu polynenasycených mastných kyselin a

cholesterolu (Bailey et al., 2000; Naresh and Atreja, 2015). Membránová destabilizace ovlivňuje fluiditu plazmatické membrány a zapříčinila ji propustnější, čímž je umožněn volný influx vápníku do spermie a nastartování kapacitačních změn a spuštění tzv. kryokapacitace (Cormier and Bailey, 2003; Breininger et al., 2010). Tato předčasná kapacitace způsobená během chlazení, mrazení a rozmrazení spermií snižuje jejich oplozeníschpnost spermie i přes jejich životaschopnost (Naresh and Atreja, 2015).

Influx vápníku aktivuje sAC se zvýšenou tvorbou cAMP a DAG, což vede ke kapacitaci prostřednictvím tyrosinové fosforylace. Tyrosinová fosforylace je považována za marker kapacitace a díky tyrosinové fosforylaci (PTP) spermie získají hyperaktivní motilitu a podstupují akrozomovou reakci (Naresh and Atreja, 2015; Naz et al., 2004). PTP indukovaná kryokonzervací významně snižuje spermiím schopnost se vázat na zonu pellucidu a je jednou z příčin snížené oplozeníschpnosti rozmrazených spermií u býků (Naresh and Atreja, 2015).

Přesný molekulární mechanismus indukované kapacitace během kryokonzervace není doposud zcela objasněn, ale dosavadní studie uvádějí, že kryokonzervace indukuje degradaci bílkovin u spermií různých savců jako je například býk, buvol, kanec nebo kuň (Naresh and Atreja, 2015). Zjištění molekulové váhy proteinů v tomto experimentu, které byly tyrosin fosforylovány, byla použita SDS-elektroforéza extrahovaných proteinů na membránu a kalibrační křivky. Molekulová váha fosforylovaných proteinů na tyrosinu byla stanovena z celých býčích spermií a jedná se tedy o celkovou fosforylaci. Naresh and Atreja (2015) zaznamenaly zvýšení tyrosinové fosforylace na býčích spermiích po kryokonzervaci u proteinů o molekulové váze 56 kDa a u japonských černých býků byly vyhodnoceny proteiny o váze 35 a 41 kDa. U buvol, zvířat spadající do stejné podčeledi jako je býk, byla zjištěna zvýšená PTP u nativního ejakulátu a kryokonzervovaného. PTP u čerstvých bůvolích spermií byla stanovena u dvou proteinů (p72 a p86). Ejakulát po rozmrazení vykazoval zvýšenou tyrosinovou fosforylaci v devíti proteinech (p20, p30, p32, p38, p49, p56, p72 a p86), kvůli zvýšeným hladinám intracelulárních signalizačních molekul, jako je cAMP, vápník a DAG způsobených negativními vlivy kryokonzervace (Kumar and Atreja, 2011). Galantino-Homer et al., (1997) publikovali, že po aplikaci anti-fosfotyrosinové protilátky zaznamenali u čerstvých spermií na blotu signály u proteinu o molekulové váze 53 kDa a nižší intenzita signálu u proteinu p32. Po zamrazení a rozmrazení Galantino-Homer et al. (1997) naměřili zvýšenou intenzitu u proteinu p45 a též potvrzují domněnku, že kapacitace je zprostředkována též signalizační cestou cAMP/PKA. Výsledky získané ve studii (Cormier and Bailey, 2003) ukazují, že kapacitace býčích spermií vyvolána fyziologicky nebo kryokonzervací vykazuje rozdílný profil fosforylovaných proteinů na tyrosinu, resp. u kryokapacitovaných spermií není identický profil

proteinů, které byly fosforylovány na tyrosinu. Tato práce uvádí, že signál bendů má klesající tendenci u některých fosforylovaných proteinů po pěti hodinové inkubaci oproti nekapacitovaným spermím. Ale potvrzují, že zmrazení a rozmrazení způsobuje tyrosínovou fosforylaci a následnou kryokapacitaci. Stanovili protein o molekulové váze 56 kDa, u kterého proběhla tyrosinová fosforylace. Tento protein byl detekován u čerstvých spermíi býka po inkubaci i u spermíi, které byly rozmrazeny. Experiment byl potvrzen imunoblotovací metodou s použitím stejného ejakulátu od jednoho býka. Naproti tomu, vykazující protein p35 byl detekován pouze u spermíi po kryokonzervaci bezprostředně po rozmrazení. Stejně vysoká intenzita tyrosinové fosforylace proteinu p35 nebyla pozorována u nativních nekapacitovaných spermíi i po inkubaci (Cormier and Bailey, 2003). Publikace Roy and Atreja, (2009) potvrzují přítomnost fosforylovaného proteinu na tyrosinu o molekulové váze 32 kDa u kapacitovaných spermíi, který se též objevuje u kančích spermíi (Naresh and Atreja, 2015; Roy and Atreja, 2009; Tardif et al., 2001). U výše zmíněných publikací je určitá shoda mezi sebou a s výsledky experimentu naší práce. V naší práci byly naměřeny vyšší intenzity tyrosinové fosforylace u proteinů 33, 37,5, 46, 66, 93 a 130 kDa. Tyto proteiny byly naměřeny jak u nativních spermíi, tak u spermíi po kryokonzervaci. Výsledky mezi těmito skupinami se lišily v intenzitě signálů jednotlivých bendů. Experiment naší práce vykazuje podobné výsledky u proteinů 33, 37,5 a 46 kDa jako výše zmíněné publikace (Cormier and Bailey, 2003; Kumara and Atreja, 2011; Naresh and Atreja, 2015). Mírné odchylky od molekulové váhy mohou být způsobeny pracovním postupem během extrakce proteinů u jednotlivých pokusů. Naš experiment, podobně jako Tardif et al. (2001), použil k pročištění vzorků hustotní gradient Percoll, kterým se eliminovaly spermie mrtvé, či po spontánní akrozomové reakci. V případě, že spermie nejsou pročištěny přes hustotní gradient a do vzorku jsou použity spermie se spontánní akrozomovou reakcí, je možné, že se vylévají do extracelulárního prostředí proteiny z vezikul a ty poté ovlivňují detekci proteinů na membráně po Western blotu (Kalab et al., 1998). Dalšími faktory ovlivňující výsledky mohou být individuální rozdíly býků (Yeste, 2016), použití jiné protilátky nebo poškozené akrozomy u použitých spermíi (Roy and Atreja, 2009).

Pro zjištění tyrosinové fosforylace proteinů lokalizovaných na hlavičce spermíi byla použita metoda nepřímé imunofluorescence. Cormier and Bailey (2003) popisují ve své studii pomocí nepřímé imunofluorescence, že spermie po kryokonzervaci vykazovaly signál v hlavičce naznačující jistou úroveň kapacitace nazývanou kryokapacitace. Metoda nepřímé imunofluorescence odhalila, že většina kryokonzervovaných spermíi má charakteristickou distribuci proteinů s tyrosinovou fosforylací identickou s nativními kapacitovanými spermii v oblasti subekvatoriálním segmentu a akrozomu. Podobné výsledky jako publikoval Cormier

and Bailey (2003) vyšly v experimentu této práce. Náš výzkum ukázal, že existuje signifikantní rozdíl tyrosinové fosforylace v oblasti akrozomu nekapacitovaných od kapacitovaných spermií. U spermií, kde probíhala PTP pouze na subekvatoriálním segmentu, byl pozorován signifikantní rozdíl kapacitovaných spermií od nekapacitovaných a kapacitovaných od kryokonzervovaných. Signifikantní rozdíl byl také zjištěn u kryokonzervovaných spermií od kapacitovaných. Studie Tardief et al., (2001) potvrdili pomocí nepřímé imunofluorescence PTP na hlavičce spermií (Tardief et al., 2001), kde též prokázali PTP v oblasti subekvatoriálním segmentu a akrozomu po kapacitaci. Ukazuje se, že PTP specificky na hlavičce projevuje určitý stupeň kapacitace spermií. Nízký stupeň vykazuje signál pouze v akrozomu. Střední stupeň kapacitace je klasifikovaný výskytem PTP pouze v subekvatoriálním segmentu. PTP v akrozomu i subekvatoriálním segmentu je zařazena do vysokého stupně (Tardif et al., 2001). V naší práci byla vysoká existence středního stupně kapacitace u kryokonzervovaných spermií. Kapacitované spermie vykazovali PTP ve středním i vysokém stupni. Přítomnost tyrosinové fosforylace v oblasti subekvatoriálního segmentu a akrozomu souvisí s reorganizací plazmatické membrány a cytoskeletární struktury vztahující se ke kapacitaci a kryokonzervaci (Cormier and Bailey, 2003).

Výsledky naší studie dokazují, že kryokonzervace býčích spermií vyvolává změny podobné fyziologické kapacitaci (kryokapacitace) v samičí pohlavní soustavě, jako je redistribuce fosfolipidů, eflux cholesterolu, destabilizace membrány a influx vápníku. Kryokapacitace je také označována jako předčasná kapacitace a je brána jako nežádoucí proces, protože předčasně kapacitované spermie mohou procházet spontánní akrozomovou reakcí dříve než se vyskytují v místě fertilizace a vykazují tím sníženou schopnost penetrace do oocyty (Mostek et al., 2017; Naresh and Atreja, 2015). Spermie jsou velmi citlivé na změny extracelulárního prostředí (teplota, osmolarita), ke kterým dochází právě v průběhu kryokonzervace. Pokud se rozdíl osmolality stanou pro spermie netolerovatelnými, ztrácejí svoji motilitu, což je nereverzibilní proces. Právě motilita je jeden z důležitých faktorů pro oplození schopnost spermií, která mimo jiné udává informace o energetických zdrojích spermií (Tasdemir et al., 2013). Ovšem ani zjištěná dobrá motilita po rozmražení ejakulátu nemusí představovat kvalitní ejakulát. I motilní spermie mohou mít sníženou životaschopnost a fertilizaci způsobenou kryokonzervací (Bailey et al., 2000). Toto je nutné brát na vědomí při hodnocení kvality spermií býků. Pro zvýšení kvality inseminačních dávek v chovech býků je tedy nutné zabývat se jak modifikací kryokonzervačních protokolů tak detailněji analyzovat ejakulát používaný ke kryokonzervaci a pro následnou inseminaci.

7 Závěr

Při hodnocení tyrosinové fosforylace pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie u býčích spermií v nativním stavu a po kryokonzervaci byl prokázán signifikantní rozdíl v intenzitě signálu v akrozomu mezi nekapacitovanými a kapacitovanými spermiemi. Kryokonzervované spermie vykazovaly signifikantní rozdíl v tyrosinové fosforylaci subekvatoriálního segmentu od kapacitovaných spermií. Byl zjištěn významný rozdíl v tyrosinové fosforylaci v akrozomu i v subekvatoriálním segmentu mezi kryokonzervovanými a kapacitovanými spermiemi.

Prostřednictvím imunoblotové analýzy byly zjištěny proteiny v celých čerstvých i kryokonzervovaných spermiích, které byly fosforylovány na tyrosinu. Naše výsledky ukázaly PTP u proteinů s molekulovou hmotností 33 kDa, 37,5 kDa, 46 kDa, 66 kDa, 93 kDa a 130 kDa. Imunoblotová analýza tedy potvrdila kapacitační změny kryokonzervovaných spermií. Kryokonzervace tedy způsobuje předčasnou kapacitaci, která má negativní vliv na životaschopnost a fertilizaci spermií.

Jelikož doposud nebyl objeven přesný mechanismus kryokapacitace, je do budoucna vhodné experimenty spojené s hodnocením vlivu kryokonzervace doplnit například o proteomické hodnocení změn v jednotlivých strukturách spermií pomocí subcelulárních extrakčních kitů, použití 2D elektroforézy či spektrometrii pro přesnější identifikaci fosforylovaných proteinů. Vzhledem k navyšující se poptávce o inseminační dávky skotu by byl vhodný další výzkum ke stanovení markeru pro určení fertilizačních schopností spermií po kryokonzervaci.

Pro odhalení mechanismu působení kryokonzervace na kapacitační změny na spermiích je do budoucna třeba udělat další experimenty s vyšším počtem opakování a vyšším počtem zvířat.

8 Seznam literatury

Abou-Haila, A., Tulsiani, D. R. 2000. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 379(2). 173-182.

Abou-haila, A., & Tulsiani, D. R. 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 485(1). 72-81.

Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J. L., Anton, M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61(5). 895-907.

Anger, J. T., Gilbert, B. R., Goldstein, M. 2003. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J. Urol.* 170. 1079 –1084.

Arthur, G. H., Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. 2001. *Arthur's Veterinary Reproduction and obstetrics*. Eighth edition. Saunders. London. p. 868. ISBN: 0-7020-2556-9.

Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl.* 21. 1-7.

Ball, P. J. H., Peters, A. R. 2004. *Reproduction in cattle*. 3rd ed. Blackwell Publishing. UK. p. 853. ISBN: 1-4051-1545-9.

Breining, E., Cetica, P. D., Beconi, M. T. 2010. Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm. *Theriogenology*. 74(6). 1036-1049.

Breitbart, H., Naor, Z. 1999. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reviews of Reproduction*. 4(3). 151-159.

Brener, E., Rubinstein, S., Cohen, G., Shternall, K., Rivlin, J., Breitbart, H. 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction*. 68(3). 837-845.

Calogero, A. E., Burrello, N., Barone, N., Palermo, I., Grasso, U., D'Agata, R. 2000. Effects of progesterone on sperm function: mechanisms of action. *Human Reproduction*. 15(1). 28-45.

Cormier, N., Bailey, J. L. 2003. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biology of reproduction*. 69(1). 177-185.

Cormier, N., Sirard, M. A., Bailey, J. L. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *Journal of Andrology*. 18(4). 461-468.

Cross, N. L. 1998. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biology of Reproduction*. 59(1). 7-11.

Chakrabarty, J., Banerjee, D., Pal, D., De, J., Ghosh, A., Majumder, G. C. 2007. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology*. 54(1). 27-35.

Chenoweth, P., Lorton, S. 2014. *Animal andrology: theories and applications*. ChenoVet Animal Andrology. London. p. 551. ISBN: 978-1-78064316-8.

Dubé, C., Leclerc, P., Baba, T., Reyes-Moreno, C., Bailey, J. L. 2005. The proacrosin binding protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm. *Journal of Andrology*. 26(4). 519-528.

Flesch, F. M., Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*. 1469(3). 197-235.

Florman, H. M., Jungnickel, M. K., Sutton, K. A. 2008. Regulating the acrosome reaction. *International Journal of Developmental Biology*. 52(5-6). 503-510.

Fraser, L. R. 2010. The “switching on” of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. *Molecular Reproduction and Development*. 77(3). 197-208.

Fraser, L. R., McDermott, C. A. 1992. Ca²⁺-related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca²⁺-ATPase. *Journal of reproduction and fertility*, 96(1), 363-377.

Gadella, B. M. 2008. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Animal Reproduction Science*. 107(3). 229-236.

Gadella, B. M., Rathi, R., Brouwers, J. F. H. M., Stout, T. A. E., Colenbrander, B. 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*. 68(3). 249-265.

Galantino-Homer, H. L., Florman, H. M., Storey, B. T., Dobrinski, I., Kopf, G. S. 2004. Bovine sperm capacitation: Assessment of phosphodiesterase activity and intracellular alkalinization on capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation. *Molecular Reproduction and Development*. 67(4). 487-500.

Gamčík, P., Kozumplík, J., Schvarc, F., Zibrín, M., Vlček, Z. 1984. *Andrológia a umělá inseminácia hospodárskych zvierat*. Priroda. Bratislava. 344 s.

Gur, Y., Breitbart, H., Lax, Y., Rubinstein, S., Zamir, N. 1998. Angiotensin II induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 275(1). E87-E93.

Jelínek, P., Koudela, K., Doskočil, J., Illek, J., Kotrbáček, V., Kovářů, F., Kroupová, V., Kučera, M., Kudláč, E., Trávníček, J., Valent, M. 2003. *Fyziologie hospodárskych zvierat*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno. 414 s. ISBN: 80-7157-644-1.

Jones, R. 1997. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement.* 53. 73-84.

Jones, R., Howes, E., Dunne, P. D., James, P., Bruckbauer, A., Klenerman, D. 2010. Tracking diffusion of GM1 gangliosides and zona pellucida binding molecules in sperm plasma membranes following cholesterol efflux. *Developmental Biology.* 339 (2). 398-406.

Hafez, B., Hafez, E. 2000. *Reproduction in farm animals.* 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 509 s. ISBN: 0683305778.

Henricks, D. M., Kouba, A. J., Lackey, B. R., Boone, W. R., Gray, S. L. 1998. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biology of Reproduction.* 59(2). 330-337.

Herrero, M. B., Gagnon, C. 2001. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *Journal of Andrology.* 22(3). 349-356.

Hille, B. 2001. *Ion channels of excitable membranes.* Sinauer Associates, Inc. Sunderland. pp. 788. ISBN: 0-87893-321-2.

Ho, H. C., Suarez, S. S. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction.* 122(4). 519-526.

Holt, W. V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science.* 62(1). 3-22.

Hopper, R. M. 2014. *Bovine Reproduction.* Wiley-Blackwell. 1rd. pp. 816. ISBN-13: 978-1-1184-7083-1.

Hu, J. H., Li, Q. W., Zan, L. S., Jiang, Z. L., An, J. H., Qang, L. Q., Jia, Y. H. 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science.* 117(1). 11-17.

Chakrabarty, J., Banerjee, D., Pal, D., De, J., Ghosh, A., Majumder, G. C. 2007. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology*. 54(1). 27-35.

Kaneto, M., Harayama, H., Miyake, M., Kato, S. 2002. Capacitation-like alternations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Animal Reproduction Science*. 73 (3-4). 197-209.

Koolman, J., Röhm, K.-H. 2012. *Barevný atlas biochemie*. 4. vydání. Grada Publishing, a.s. Praha. 512 s. ISBN: 978-80-247-2977-0.

Kumar, R., Atreja, S. K. (2012). Effect of Incorporation of Additives in Tris-Based Egg Yolk Extender on Buffalo (*Bubalus bubalis*) Sperm Tyrosine Phosphorylation During Cryopreservation. *Reproduction in domestic animals*. 47(3). 485-490.

Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., Parks, J. E. 2016. Cryopreservation of bull semen: evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*. 172. 1-9.

Lenzi, A., Gandini, L., Picardo, M., Tramer, F., Sandri, G., Panfili, E. 2000. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. *Front Biosci*, 5(1). 1-15.

Luconi, M., Baldi, E. 2003. How do sperm swim? Molecular mechanisms underlying sperm motility. *Cellular and Molecular Biology*. 49(3). 357-369.

McGeady, T. A., Quinn, P. J., FitzPatrick, E. S., Ryan, M. T. et al., 2006. *Veterinary embryology*. Oxford; Ames, Iowa:Blackwell Pub. 377 p. ISBN:140511147X.

Moce, E., Blanch, E., Tomas, C., Graham, J. K. 2010a. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reprod Domest Anim*. 45. 57-66.

Mortimer, S. T. 2000. CASA-practical Aspects. *Journal of Androogy*. 21 (4). 515-24.

Mostek, A., Dietrich, M. A., Slovińska, M., Ciereszko, A. 2017. Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins. *Theriogenology*. 92. 95-102.

Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 57(6). 1695-1706.

Mutalik, S., Salian, S. R., Avadhani, K., Menon, J., Joshi, H., Hegde, A. R., Adiga, S. K. 2014. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 60(3). 183-188.

Naz, R. K., Rajesh, P. B. 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2(1). 75.

Naresh, S., Atreja, S. K. 2015. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology*. 70(3). 211-216.

Neill, J. D., Challis, J. R. G., Kretser, D. M., Pfaff, D. W., Richards, J. S., Plant, T. M., Wassarman, P. M. 2006. *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*. Academic press. Amsterdam. 1726 s. ISBN: 9780125154000.

Parks, J. E., Graham, J. K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38(2). 209-222.

Parks, J. E., Lynch, D. V. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 29(2). 255-266.

Parrish, J. J. 2014. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*. 81(1). 67-73.

Patrat, C., Serres, C., Jouannet, P. 2000. Induction of a sodium ion influx by progesterone in human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 62(5). 1380-1386.

Pawson, T. 2004. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell*. 116(2). 191-203.

Pommer, A., C., Rutlant, J., Meyers, S. A. 2003. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biology of reproduction*. 68(4). 1208-1214.

Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Clapham, D. E. 2007. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(4). 1219-1223.

Roldan, E. R., Shi, Q. X. 2007. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci*. 12(1). 89-104.

Roy, S. C., Atreja, S. K. 2009. Capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation starts early in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa as compared to cattle. *Animal reproduction science*. 110(3-4). 319-325.

Ren D, Xia J. 2010. Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology (Bethesda)*. 25. 165–175.

Rivlin, J., Mendel, J., Rubinstein, S., Etkovitz, N., Breitbart, H. 2004. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of reproduction*. 70(2). 518-522.

Saez, F., Ouvrier, A., Drevet, J. R., 2011. Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian J Androl*. 13. 11-17.

Schiller, J., Muller, K., Suss, R., Amhokl, J., Grey, C., Hermann, A., Lessig, J., Amokl, K., Muller, P., 2003. Analysis of the lipid composition of bull spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry – a cautionary note. *Chem Phys Lipids*. 126. 85-94.

Schmidt, H., Kamp, G. 2004. Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction*. 128(2). 171-179.

Sieme, H., Oldenhof, H., Wolkers, W. F. 2015. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. *Reproduction in domestic animals*. 50(S3). 20-26.

Singh, A. K., Singh, V. K., Narwade, B. M., Mohanty, T. K., Atreja, S. K. 2012. Comparative Quality Assessment of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Semen Chilled (5° C) in Egg Yolk-and Soya Milk–Based Extenders. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(4). 596-600.

Singh, V. K., Atreja, S. K., Kumar, R., Chhillar, S., Singh, A. K. 2012. Assessment of Intracellular Ca²⁺, cAMP and 1, 2-Diacylglycerol in Cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) Spermatozoa on Supplementation of Taurine and Trehalose in the Extender. *Reproduction in domestic animals*. 47(4). 584-590.

Suarez, S. S., Ho, H. C. 2003. Hyperactivated motility in sperm. *Reproduction in Domestic Animals*. 38(2). 119-124.

Sutovsky, P., Manandhar, G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. 1-30.

Tapia, J. A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Peña, F. J., Aparicio, I. M. 2012. The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(s3). 65-75.

Taşdemir, U., Büyükleblebici, S., Tuncer, P. B., Coşkun, E., Özgürtaş, T., Aydın, F. N., Gürcan, İ. S. 2013. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology*. 66(1). 38-42.

Tardif, S., Dubé, C., Chevalier, S., Bailey, J. L. 2001. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biology of reproduction*. 65(3). 784-792.

Tulsiani, D. R., Abou-Haila, A., Loeser, C. R., Pereira, B. M. 1998. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Experimental Cell Research*. 240(2). 151-164.

Tulsiani, D. R., Zeng, H., Abou-Haila, A. 2007. Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signalling pathways. *Society of Reproduction and Fertility supplement*. 63. 257.

Yanagimachi, R. 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*. 2(4). 371-372.

Yeste, M. 2016. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*. 85(1). 47-64.

Visconti, P. E. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(3). 667-668.

Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G. S. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 121(4). 1129-1137.

Visconti, P. E., Krapf, D., De La Vega-beltrán, J. L., Acevedo, J. J., Darszon, A. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian Journal of Andrology*. 13(3). 395.

Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60. 481-492.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

AC – adenyl cykláza

AKAP – kináza ukotvující faktor A

AR – akrozomová reakce

AII – angiotenzin II

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CaVs – kanál selektivní vápník

CNG – cyklický nukleotid

DAG – diacylglycerol

IGF-1 – inzulinu podobný růstový faktor 1

IP₃ – inositoltrifosfát

NADH – nikotinamidadenindinukleotid

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

OAM – vnější akrozomová membrána

PIP₂ – fosfatidylinositol bifosfát

PKA – proteinkináza A

PLC – fosfolipáza C

PTP – tyrosinová fosforylace

ROS – reaktivní formy kyslíku

sAC – rozpustná adenyl cykláza

ZP – zona pellucida

ZP3 – zona pellucida protein 3

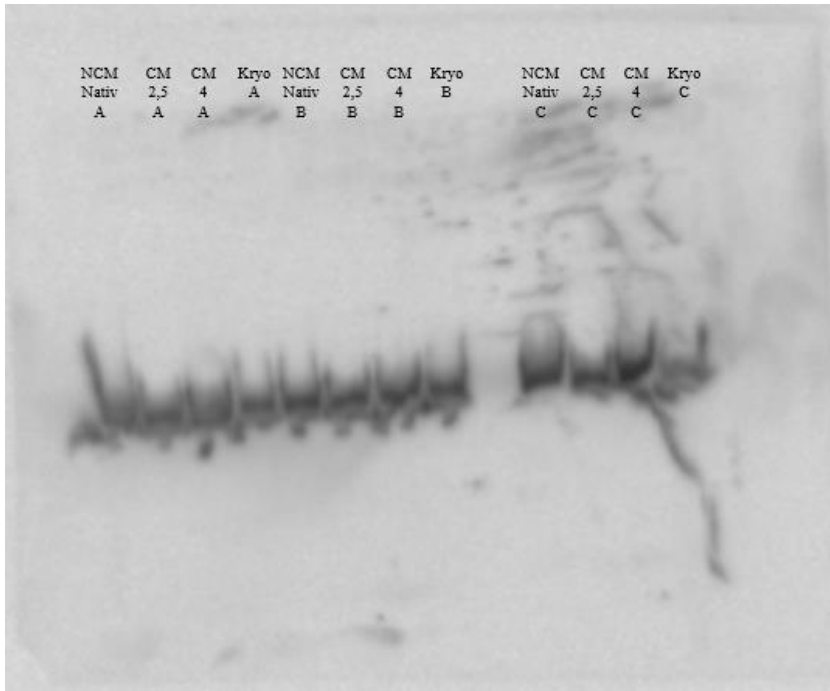
10 Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek 1: Schéma celé býčí spermie bez plazmatické membrány (Hafez and Hafez, 2000)	6
Obrázek 2: Sagitální část hlavičky býčí spermie (Hafez and Hafez, 2000)	7
Obrázek 3: Schematické znázornění průřezu hlavního oddílu bičíku savčí sperme (Mortimer, 2000).	7
Obrázek 4: Schematické znázornění molekulárního mechanismu fosforlyce tyrosinu během kapacitace spermií (Naresh and Afreja, 2015).	14
Obrázek 5: Hypotetický model mechanismů regulujících hyperaktivaci (Ho and Suarez, 2001)	15
Obrázek 6: Schéma znázorňující hlavní dráhy přenosu signálu aktivované během procesu akrozomové reakce v reakci na oblast protein 3 (ZP3) (Baldi et al., 2000)	18
Obrázek 7: Schéma znázorňující kapacitační změny při kryokonzervaci (Naresh and Atreja, 2015).	22
Obrázek 8: Schéma znázorňující pracovní postup při zpracování ejakulátu k získání vzorků	23
Obrázek 9: Ilustrační fotografie z fluorescenčního mikroskopu	27
Obrázek 10: Hustotní gradient	28
Obrázek 11: Schéma sestavení katety s gelem a membránou pro elektropřenos	31
Obrázek 12: Zviditelnění celkových proteinů na membráně pomocí barvy Ponceau S red.	32

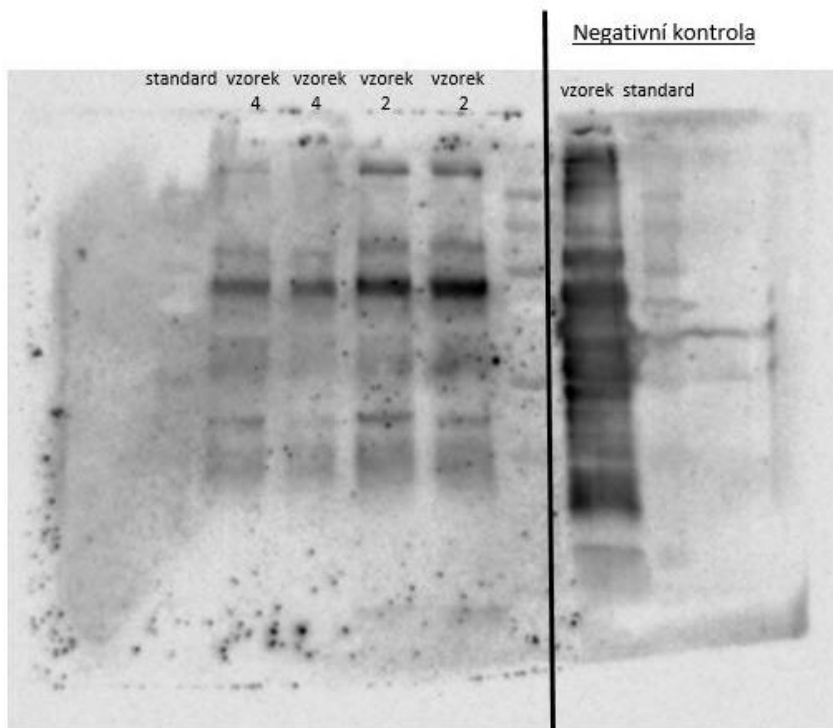
Obrázek 13: Stupně tyrosinové fosforylace zviditelněná pomocí nepřímé imunofluorescence.	34
Obrázek 14: Profil proteinů obsahující fosfotyrosin spojený s kapacitací bovinních spermií a kryokonzervací spermií.....	38
Tab. 1: Komponenty pro přípravu 20 ml roztoku IVF-Talp.....	24
Tab. 2: Komponenty pro přípravu 100 ml roztoku IVF-TL stock.....	25
Tab. 3: Komponenty pro přípravu 40 ml roztoku Sperm-TALP	27
Tab. 4: Komponenty pro přípravu 100 ml Sperm-TALP stock.....	28
Tab. 5: Komponenty pro přípravu SDS vzorkového pufru.	29
Graf 1.: Procentuální zastoupení tyrosinové fosforylace na jednotlivých částí hlavičky ve stupních kapacity	35
Graf 2.: Lokalizace proteinů obsahující fosforyrosin u čerstvých nativních spermií, kapacitovaných 4 hodiny a kryokonzervovaných ve stupni kapacity středním a vysokém	36
Graf 3.: Intenzity jednotlivých proteinů u ejakulátu A pro nekapacitované, kapacitované a kryokonzervované spermie	39
Graf 4.: Intenzity jednotlivých proteinů u ejakulátu B pro nekapacitované, kapacitované a kryokonzervované spermie	40
Graf 5.: Intenzity jednotlivých proteinů u ejakulátu C pro nekapacitované, kapacitované a kryokonzervované spermie	41

11 Samostatné přílohy

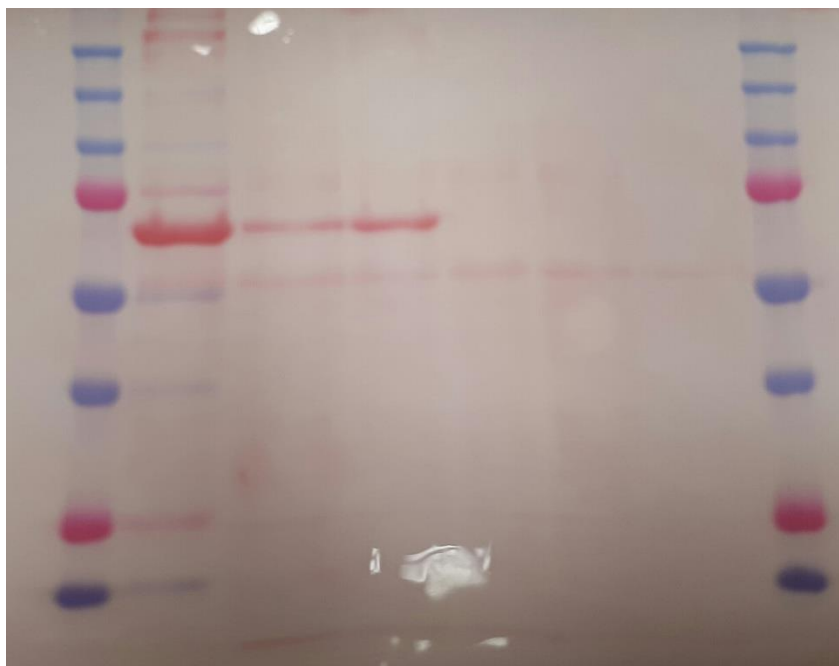
Příloha č. 1: Membrána ošetřena protilátkou proti tubulínu.



Příloha č. 2: Membrána s nepročištěnými vzorky přes hustotní gradient Bovi Pure.



Příloha č. 3: Membrána s pročištěnými vzorky přes hustotní gradient Bovi Pure a obarvena Ponceau



Příloha č. 4: Kalibrační křivky pro výpočet molární hmotnosti proteinů.

