

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Detekce sacharidových struktur v glykoproteinovém
profilu spermií**

Diplomová práce

**Bc. Tereza Němečková
Reprodukční biotechnologie**

RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Detekce sacharidových struktur v glykoproteinovém profilu spermií" 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 14. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a podporu při vedení této diplomové práce. Poděkování za podporu během studia patří i přítelovi a rodičům.

Detekce sacharidových struktur v glykoproteinovém profilu spermií

Souhrn

Během vývoje spermie dochází k molekulárním změnám nejen uvnitř, ale i na jejím povrchu. V plazmatické membráně se reorganizují a přestavují lipidy, proteiny a sacharidy. Tyto změny vedou k dozrávání spermií. Na proteiny nebo lipidy plazmatické membrány navazuje glykoproteinový obal spermie, který také prochází posttestikulárními změnami. Glykoproteiny se v reprodukci uplatňují v různých procesech. U samčích gamet se podílejí např. na spermatogenezi, maturaci spermií, ochraně spermie při průchodu samičím pohlavním traktem, kapacitaci nebo na rozpoznávání a vazbě spermií na ZP. Glykoproteiny mohou být během maturace spermie modifikovány či relokalizovány. Tyto změny lze detekovat pomocí lektinů – bílkovin, které mají schopnost se specificky vázat na cukerné zbytky.

Cílem této diplomové práce bylo detekovat vybrané sacharidové typy vazeb v glykoproteinech izolovaných ze spermií kančů a jejich porovnání v rámci individuality jedinců. Pro tyto experimenty byly využity celkem tři lektiny s různou vazebnou specifitou, byly to MAA, WGA a sWGA.

K vizualizaci vazby lektinu WGA a sWGA na spermie byla využita nepřímá fluorescenční mikroskopie. Na fixovaných spermiích aceton-metanolem byly nalezeny 3 vzory vazby lektinů: po celé hlavičce, po jejím obryse nebo jen v akrozomální oblasti. Nejčastěji se objevovaly spermie se signálem po obryse hlavičky. U spermií v suspenzi byl k těmto vzorům navíc objeven další, a to signál po celé hlavičce mimo akrozomální oblast. Tento typ byl však nalezen pouze u jednoho kance. V tomto experimentu byla zjištěna nejčastější lokalizace sacharidových struktur rozpoznávaných WGA a sWGA lektiny po celé hlavičce spermie.

K detekci vazby lektinů na glykoproteiny v lyzátech ejakulovaných spermií byla využita metoda Western blot, během které byly použity tři lektiny – MAA, WGA a sWGA. Po provedené denzitometrické analýze byl nalezen jediný signifikantní rozdíl v síle signálu vazby lektinu WGA mezi dvěma kanci. Navíc byly cíleně izolovány proteiny z povrchu spermií a v nich detekovány glykoproteiny rozpoznávané WGA a sWGA lektiny. Bylo nalezeno 9 skupin glykoproteinů, které byly při použití obou lektinů velmi podobných molekulových vah. Lektin WGA se navíc navázal na 2 skupiny glykoproteinů o velikosti 209 a 42 kDa.

Z výsledků vyplývá, že kančí spermie během svého vývoje a maturace získává struktury, které obsahují sialovou kyselinu v multivalentní nebo α 2-6 vazbě a N-acetylglukosamin. Zároveň je ale přítomnost a rozložení některých z těchto glykanových struktur na spermiích do určité míry individuální a mohou představovat nové molekulární markery pro hodnocení případně selekci spermií.

Klíčová slova: glykoprotein, spermie, lektin, Western blot, kanec

Detection of saccharide structure in sperm glycoprotein profile

Summary

During the sperm development, molecular changes take place not only inside, but also on their surface. Lipids, proteins and carbohydrates are reorganized and rebuilt within the plasma membrane. These changes lead to the maturation of sperm. Proteins or lipids of the plasma membrane are followed by the glycoprotein coat of the sperm, which also undergoes posttesticular changes. Glycoproteins are involved in reproduction in various processes. In male gametes, they participate in e.g. spermatogenesis, sperm maturation, protection of sperm during passage through the female genital tract, capacitation, sperm-ZP recognition and binding. Glycoproteins can be modified or relocalized during sperm maturation. These changes can be detected using lectins - proteins that have a specific ability to bind to sugar residues.

The aim of this diploma thesis was to determine selected types of carbohydrate bonds in glycoproteins isolated from boar sperm and their comparison within the individuality of boars. A total of three lectins with different binding specificities were used for these experiments, they were MAA, WGA and sWGA.

Indirect fluorescence microscopy was used to visualize WGA and sWGA lectin binding to sperm. On acetone-methanol fixed spermatozoa, 3 patterns of lectin binding were found: on the entire head, along its outline or only in the acrosomal region. Sperm with a signal following the outline of the head appeared most often. For spermatozoa in suspension, another one was discovered in addition to these patterns, namely a signal on the entire head apart from the acrosomal region. This type was found in only one boar. In this experiment, the most frequent localization of carbohydrate structures recognized by WGA and sWGA lectins was detected throughout the sperm head.

To detect the binding of lectins to glycoproteins in ejaculated sperm lysates, the Western blot method was used, during which three lectins - MAA, WGA and sWGA - were employed. After densitometric analysis, the only significant difference was found in the WGA lectin binding signal between the two boars. In addition, proteins were isolated from the sperm surface and glycoproteins recognized by WGA and sWGA lectins were detected. Nine groups of glycoproteins were found, which were of very similar molecular weights using both lectins. Moreover, WGA lectin bound to two groups of glycoproteins of size 209 and 42 kDa.

The results show that boar spermatozoa during their development and mature gain structures that contain sialic acid in a multivalent or α 2-6 bond and N-acetylglucosamine. Together with these findings, the presence and distribution of some of these glycan structures appear to be individual and may represent new molecular markers for the evaluation or selection of spermatozoa.

Keywords: glycoprotein, sperm, lectin, Western blot, boar

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Vývoj a morfologie spermie	10
3.1.1 Posttestikulární maturace spermií.....	11
3.2 Glykokalyx spermie	13
3.2.1 Posttranslační modifikace proteinů – glykosylace	14
3.2.2 Glykosylace proteinů během spermatogeneze a maturace	15
3.2.3 Role glykanů v reprodukci.....	16
3.3 Významné proteiny a glykoproteiny spermie	18
3.4 Detekce změn glykosylace proteinů	21
4 Metodika	23
4.1 Příprava vzorků spermií	23
4.1.1 Příprava vzorků z nativního ejakulátu	23
4.2 Izolace povrchových proteinů	23
4.3 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	24
4.3.1 Příprava vzorků spermií pro SDS elektroforézu.....	24
4.3.2 Příprava gelů pro SDS elektroforézu	25
4.3.3 SDS elektroforéza	25
4.4 Metoda Western blot	25
4.5 Vazba biotinem značených lektinů na proteiny na nitrocelulóзовé membráně 26	
4.5.1 Denzitometrická analýza a výpočet molekulových hmotností	27
4.6 Fluorescenční mikroskopie	27
4.6.1 Fixace spermií aceton-metanolem	27
4.6.2 Detekce sacharidových struktur na spermiích v suspenzi	28
5 Výsledky	29
5.1 Lokalizace sacharidových struktur na spermiích po fixaci aceton-metanolem 29	
5.1.1 Vazba lektinu WGA	29
5.1.2 Vazba lektinu sWGA	31
5.2 Loalizace sacharidových struktur na spermiích v suspenzi	33
5.2.1 Vazba lektinu WGA	34
5.2.2 Vazba lektinu sWGA	36
5.3 Vazba lektinů na glykoproteiny v lyzátech ejakulovaných spermií	37
5.3.1 Detekce glykoproteinů spermií pomocí MAA lektinu	37
5.3.2 Detekce glykoproteinů spermií pomocí WGA lektinu	39

5.3.3	Detekce glykoproteinů spermií pomocí sWGA lektinu.....	40
5.3.4	Detekce povrchových glykoproteinů spermií pomocí WGA lektinu	42
5.3.5	Detekce povrchových glykoproteinů spermií pomocí sWGA lektinu.....	43
6	Diskuze.....	45
7	Závěr	49
8	Literatura	51
9	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Během svého vývoje savčí spermie prochází řadou změn. Tyto změny jak na extracelulární, tak intracelulární úrovni jsou pro spermie důležité k získání schopnosti oplodnit vajíčko (Cooper, 2007). Během vývoje a zrání spermií dochází především k přestavbě ve složení lipidů, proteinů a sacharidů (Tulsiani, 2005). Změny prodělává také glykokalyx, což je vrstva sacharidových struktur na povrchu spermií, která jim dodává mnoho potřebných vlastností (Schröter et al. 1999). Základem povrchových glykoproteinů jsou peptidové řetězce s větvenými oligosacharidy (Teclé & Gagneux 2015), které mohou být tvořeny a modifikovány během maturace v nadvarleti, později i při kontaktu se semennou plazmou, a i v samičích reprodukčních orgánech (Brewis & Gadella, 2010). Sledovat změny ve složení glykokalyxu spermie může být zajímavé proto, že mezi funkce glykoproteinů patří např. ochrana před imunitními složkami, inhibice předčasné kapacitace, vazba spermií na *zona pellucida* vajíčka nebo umožnění mezibuněčné komunikace. Soulad mezi těmito funkcemi je důležitý pro úspěšné oplození (Xin et al., 2022).

Změny týkající se sacharidových struktur lze sledovat za pomoci rozmanité skupiny bílkovin – lektinů. Ty lze najít u široké řady organismů (Santos et al., 2013). Využívané jsou pro jejich schopnost specificky rozpoznat jak izomery a větvení cukrů, tak vazby na terminální řetězce složitých glykanů (Accogli et al. 2017). Zároveň nemají vůči rozpoznávaným sacharidům enzymatickou aktivitu (Loris, 2002). Proto, aby bylo možné je detekovat pomocí imunocytochemie, imunohistochemie nebo průtokovou cytometrií, se značí např. enzymy, biotinem nebo fluorescenčními barvami (Xin et al., 2016).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Pro tuto diplomovou práci byla stanovena hypotéza, která předpokládá rozdíl v detekci sacharidových struktur spermií kanců pomocí vybraných lektinů u jedinců stejného plemene.

Cílem práce byla detekce vybraných sacharidových typů vazeb v glykoproteinech spermií se zaměřením na izolaci proteinů z jejich povrchu. Navíc byla zjišťována rozdílná lokalizace glykanů spermií, která byla porovnávána v rámci individuality jednotlivých kanců.

3 Literární rešerše

3.1 Vývoj a morfologie spermie

Spermatogeneze je proces probíhající ve varlatech, který zahrnuje vývoj a zrání spermií. Začíná s nástupem pohlavní zralosti a probíhá až do smrti jedince (Kachlík, 2018).

Regulace průběhu vývoje spermií začíná v hypotalamu, kde se produkuje GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone), který je odtud transportován do adenohipofýzy. Zde se poté začne produkovat LH (Luteinizační hormon) a FSH (Folikuly stimulující hormon) (McLachlan, 2000). LH stimuluje tvorbu testosteronu Leydigovými buňkami, FSH stimuluje Sertoliho buňky (Coward & Wells, 2013).

Primordiální pohlavní buňky, které do varlete migrují během fetálního vývoje, prodělávají mitózu a mění se na spermatogonie (De Kretser et al., 1998). Ty jsou uloženy v prohlubních Sertoliho buněk, které jim zajišťují potřebnou výživu nutnou a podporu pro další vývoj (Hafez et Hafez, 2000). Ze spermatogonií dalším dělením vznikají dvě různé populace buněk. První, tzv. spermatogonie A, slouží jako rezerva spermatogonií. Druhé, tzv. spermatogonie B, se diferencují v diploidní primární spermatocyty, které vstupují do meiózy. Tím vznikají dva diploidní sekundární spermatocyty (De Jonge & Barrat, 2006), které jsou již uloženy v blízkosti lumina semenotvorného kanálku (Hafez et Hafez, 2000).

Sekundární spermatocyty rychle přechází do druhého meiotického dělení, během kterého vznikají dvě haploidní spermatidy (Holstein et al., 2003). Z jednoho primárního spermatocytu tak vznikají 4 spermatidy (Mulhall et al., 2013), které prochází dalšími změnami v procesu spermiogeneze a mění se na spermie. Tento proces spolu se spermatogenezí trvá dle savčího druhu 41 (kanci) až 74 (lidé) dní (Griswold, 2016), avšak u většiny savců je k přeměně primordiálních pohlavních buněk ve spermie potřebná doba 30-40 dní (Clermont, 1972).

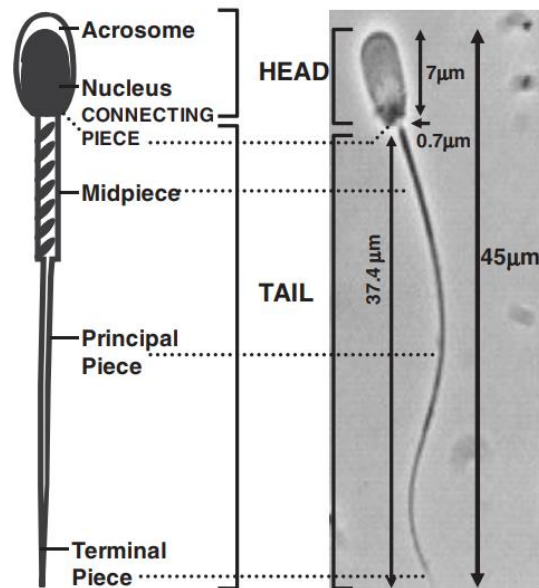
Změny při zrání spermie zahrnují protažení spermatidy, množení mitochondrií, vytvoření akrozomu a bičíku (Mulhall et al., 2013). Také dojde k vyloučení části cytoplazmy, která je poté vstřebána Sertoliho buňkami (Sklípka & Tonar, 2019). Nepohyblivé spermie jsou poté vytlačeny do lumen semenotvorných kanálků a další jejich dozrávání probíhá v nadvarlatech (Mulhall et al., 2013).

Stavba zralé spermie odpovídá jejímu poslání, tedy schopnosti oplodnit vajíčko. Lze ji rozdělit na dvě hlavní části: hlavičku a bičík (Bonet et al., 2013). Velikost a tvar hlavičky je proměnlivá, obecně má oválný až hruškovitý tvar (Sklípka & Tonar, 2019). Obsahuje haploidní jádro s buněčnou DNA a akrozom spolu s molekulami, které spermiím umožňují rozpoznat oocyty a následně s nimi splynout (Bonet et al., 2013). Akrozom je útvar, který obsahuje hydrolytické enzymy a pokrývá asi 2/3 hlavičky spermie, označené jako akrozomální oblast. Vzniká z Golgiho komplexu, hraje roli při akrozomové reakci (AR) a umožňuje proniknutí spermie do vajíčka (Plant & Zeleznik, 2015). Obklopuje ho akrozomální membrána rozdělená na vnitřní (IAM) a vnější (OAM), které se v ekvatoriálním segmentu hlavičky spojují (Bonet et al., 2013).

Mezi hlavičkou a bičíkem je krátký spojovací úsek – krček dlouhý asi 1–1,5 μm (Vajner, Uhlík, 2018). Bičík je nejdelsí část spermie a zajišťuje pohyblivost spermií. Obsahuje mitochondrie, které generují energii potřebnou k pohybu (Bonet et al., 2013). Všechny jeho části – mitochondriální, hlavní a koncová část, jsou propojeny axonemou – svazkem

mikrotubulů (De Jonge & Barrat, 2006), kdy je centrálně uložen jeden pár mikrotubulů a v kruhu kolem něj je uspořádáno devět dalších párů (Porter & Sale, 2000).

Protože je tato diplomová práce zaměřena na kančí spermie, následuje její stručný popis. Kančí spermie je buňka dlouhá 43–45 μm . Hlavička je oválná, z obou stran zploštělá a má 7 μm na délku, 3,7 μm v nejširším místě a 0,4 μm na tloušťku. Mitochondriální část bičíku je 9 μm dlouhá a má 0,7 μm v průměru. Hlavní část je dlouhá 26,2 μm a má průměr 0,4 μm . Koncová část bičíku má 2,2 μm na délku a průměr 0,2 μm (Bonet et al., 2013). Schematický náčrt kančí spermie je zobrazen na obrázku 1..



Obr. 1. Schematický náčrt kančí spermie. Znázornění hlavních částí zralých kančích spermií a jejich typické rozměry. Hlavička obsahuje jádro a akrozom. Bičík lze rozdělit na 3 části – mitochondriální, hlavní a koncová část. (Bonet et al., 2013)

3.1.1 Posttestikulární maturace spermií

Po opuštění varlat je spermie neschopná pohybu, a tedy i přirozeného oplodnění vajíčka (Yanagimachi, 1994). Aby tuto schopnost získala, musí projít maturací, která se odehrává v nadvarlatech (Hafez et Hafez, 2000). Nadvarle lze anatomicky rozdělit do tří hlavních částí: hlavu, tělo a ocas. Průchod spermie všemi oblastmi u kance trvá asi 12-15 dní (Cooper, 1998). Mezi další funkce nadvarlete patří mimo dozrávání spermií i jejich transport z varlat do chámovodů a jejich skladování až do ejakulace (Bonet et al., 2013).

Během maturace prochází změnou i plazmatická membrána (PM) spermie. Dochází ke změnám, které zahrnují přestavbu membrány a modifikaci glykanových skupin na jejím povrchu (Tulsiani, 2005). Tyto změny ve složení a modifikaci povrchu spermií vedou k jejich dozrávání (Cheon & Kim, 2015).

V nadvarlatech jsou spermie vystaveny působení epidydimální tekutiny, která obsahuje mimo jiné i různé proteiny (Tulsiani & Haila, 2012). Některé z těchto proteinů přispívají k tvorbě maturačního prostředí, další se na spermie navazují. Naopak proteiny přítomné po vývoji ve varlatech mohou z jejich povrchu odcházet. Dochází tedy ke změnám v rozmístění,

k nahrazení, úpravě nebo maskování intramembránových proteinů nebo glykoproteinů získaných ve varlatech, čímž vznikají receptory pro interakci s vajíčkem (Tulsiani & Haila, 2012).

Enzymy přítomné v epididymální tekutině modifikují membránové sacharidové zbytky, proteiny i lipidy (Bonet et al., 2013). Mezi enzymy modifikující glykany se řadí glykosyltransferázy, které přidávají cukerné zbytky. Jejich štěpení naopak zajišťují glykohydrolázy (glykozidázy) (Teclé & Gagneux, 2015). Změny lipidů spočívají ve změnách jejich fyzikálních a chemických vlastností (Bonet et al., 2013).

Redistribuce membránových glykoproteinů a lipidů vede ke vzniku nových domén (Bassols, 2006). Ty spolu s novou antigenní identitou později umožňují rozpoznání spermií buňkami vejcovodů, ZP a plazmatickou membránou (oolemma) vajíčka. Navíc tyto modifikace poskytují spermiím větší odolnost vůči vystavení osmotickým šokům (Bonet et al., 2013). Roste i záporný náboj na povrchu spermií, který ji pomáhá chránit před mikroorganismy a imunitním systémem (Cheon & Kim, 2015). Změnami prochází i schopnost povrchu vázat lektiny (Fàbrega et al. 2011).

Zároveň u spermií nastává vývoj jejich motility (Coward & Wells, 2013). Během průchodu nadvarletem se vzorec pohybu postupně mění. V hlavě nadvarlete se spermie pohybují nepravidelně. V těle je pohyb neprogresivní a kruhový. V ocasu se pak mění na progresivní a lineární (Pruneda, 2006; Bonet et al., 2013). Při vývoji motility dochází ke zpevňování bičků spermií na úrovni cytoskeletálních struktur pomocí disulfidických vazeb, tím získá větší tuhost a odolnost vůči ohybu, motilita je indukována forward motility proteinem přítomným v epididymální tekutině (Bonet et al, 2013).

Během maturace nastávají také změny v mitochondriích, které jsou označovány ubiquitinem pro jejich pozdější degradaci. Mimo jiné dochází i ke změnám v akrozomu a jádře, kde se kompaktuje chromatin (Flesch et al., 2000) Akrozom je na počátku cesty spermie nadvarletem vypouklý, ale při jeho průchodu se postupně zmenšuje, až je patrný pouze v apikální oblasti (Bonet et al., 2012). Ke kondenzaci jaderného chromatinu dochází prostřednictvím tvorby disulfidických vazeb mezi protaminovými cysteiny (Pruneda, 2006).

Hlavní morfologickou změnou při průchodu nadvarletem je migrace cytoplazmatické kapky. Během přechodu z hlavy do těla nadvarlete kapka „klouže“ ze základny hlavičky na konec střední části bičku a pak se dle druhu vyloučí buď v kaudální tekutině nebo při/po ejakulaci (Gatti et al., 2004).

Spermie se poté v samičím reprodukčním traktu zdržují v oviduktálním rezervoáru, kde prochází kapacitací, tedy řadou membránových změn. Ty zahrnují i zvýšení toku vápníku, což vede ke zvýšení jeho intracelulárních hladin a cAMP, zvyšuje se fluidita membrán a dosažení hyperaktivace pohybu (Coward & Wells, 2013). Hyperaktivace motility spermie, ke které dochází v raných fázích kapacity, se vyznačuje mohutnými ohyby bičku s vysokou amplitudou a kruhovým nebo nepravidelným pohybem (Gómez-Torres et al., 2012). Tento pohyb usnadňuje uvolňování spermií z rezervoáru jejich průchod hlenem v lumen vejcovodu a penetraci *cumulus oophorus* obklopující ovulovaný oocyt (Suarez, 2008).

Procesy, které napomáhají reorganizaci a modifikaci molekul plazmatické membrány, jsou aktivovány tzv. kapacitačními faktory (Flesch & Gadella, 2000). Během těchto procesů nastávají další zásadní změny v glykokalyxu spermie. Jsou uvolňovány glykokonjugáty (především proteinů ukotvených pomocí GPI (glykosylfosfatidylinositolu) kotvy a beta-

defensinů) a štěpeny sialové kyseliny. Děje zahrnují i redistribuci glykokonjugátů, např. gangliositů (jsou spojené s lipidovými rafty) a enzymů, které modifikují glykany (hyaluronidáza PH-20/adhezní molekula 1 - SPAM1) na povrchu spermie, což je potřebné, aby byla kapacitovaná spermie schopna oplodnit vajíčko (Teclé & Gagneux, 2015).

U prasečích spermií také mizí obal z agregovaných spermadhezinů, který brání předčasné AR. Zbylé molekuly spermadhezinů fungují jako primární vazebné proteiny na zona pellucida (ZP) vajíčka (Töpfer-Petersen et al., 1998). Výsledkem kapacitace jsou tedy spermie, které jsou schopné vázat se na ZP, protože došlo k odhalení k tomu potřebných receptorů, které se mohou vázat na její sacharidové struktury. Dále projít AR a následně i fúzi s vitelinní membránou oocytu (Zhang et al., 2023).

3.2 Glykokalyx spermie

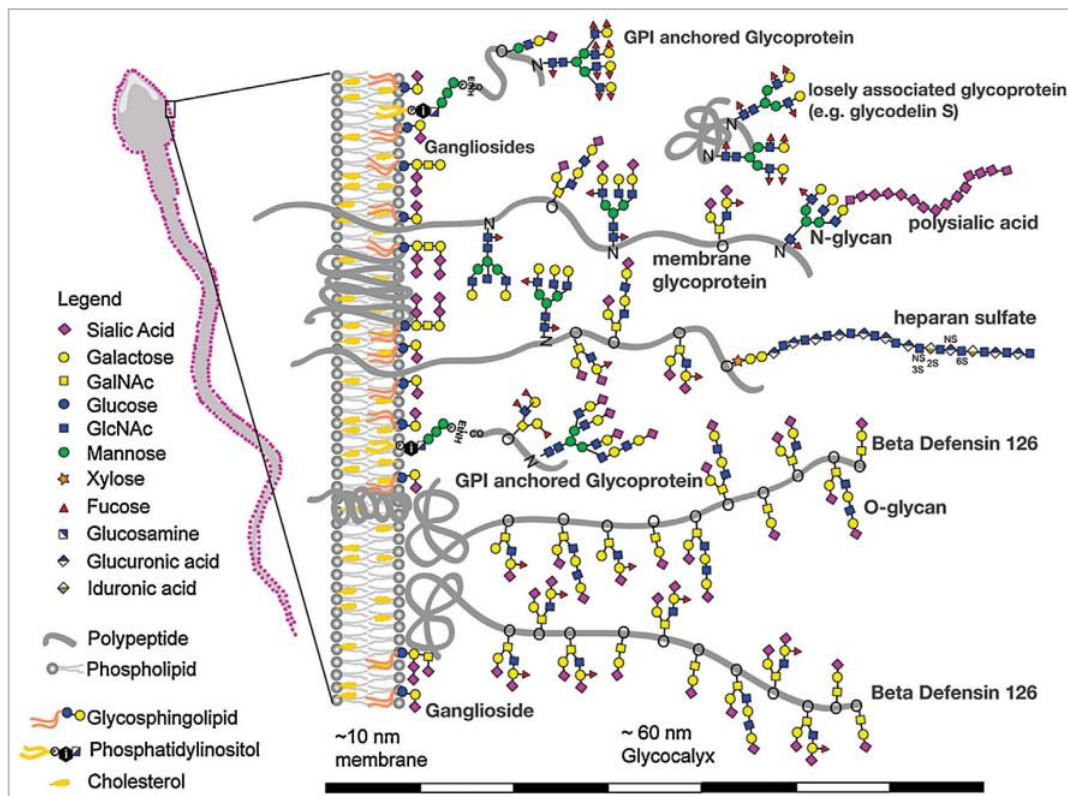
Jak již bylo zmíněno výše, tak velmi důležitou molekulární strukturou na povrchu buněk je jejich glykokalyx. U gamet jsou součástí glykokalyxu i molekuly, které se účastní aktivit spojených s oplodněním (Teclé & Gagneux, 2015).

Glykokalyx spermie je vrstva silná asi 20-60 nm, která se skládá z různých glykoproteinů, glykolipidů a GPI ukotvených glykoproteinů a nachází se na povrchu buňky (Teclé & Gagneux, 2015). Některé z těchto glykokonjugátů si spermie syntetizuje sama, některé jsou původem od somatických buněk (Schröter et al., 1999). Glykokalyx navazuje na proteiny (glykoproteiny) nebo lipidy (glikolipidy) PM a jde o primární rozhraní mezi spermií a jejím okolím. Tato vrstva prochází značnými změnami při maturaci spermií během jejich průchodu nadvarletem (Peláez et al., 2011), při kontaktu s SP a později i v samičích reprodukčních orgánech (Brewis & Gadella, 2010).

V porovnání se ZP vajíčka je struktura glykokalyxu spermie mnohem komplikovanější. Zatímco ZP je složena ze 3-4 glykoproteinů, na povrchu lidské spermie je přítomno nejméně 300 proteinů a předpokládá se, že většina jich je glykosylována (Diekman, 2003). Vyvíjející se spermie si glykany tvoří samy, protože je u nich přítomno funkční endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. Po dokončení spermatogeneze již spermie nejsou schopné si glykany tvořit *de novo* (Bonet et al., 2013). Po jejich vývoji ve varlatech prochází jejich glykokalyx postestikulární modifikací (Teclé & Gagneux, 2015).

Během průchodu přes nadvarle se další glykokonjugáty spojují s povrchem spermií. Stejně tak jsou již přítomné povrchové glykany enzymaticky měněny glykosidázami a glykosyltransferázami. Další glykany se do glykokalyxu přidávají při kontaktu s SP. Změnami glykoproteinový obal prochází i v samičím reprodukčním traktu. Po kapacitaci je povrch spermií modifikovaný tak, aby byl připraven na AR a oplodnění (Diekman, 2003). Hlavní skupiny glykanů a glykokonjugátů na spermií shrnuje obrázek 2.

V samičím pohlavním traktu zastává glykokalyx na spermii několik funkcí. Patří mezi ně průchod cervikálním hlenem, ochrana před imunitními složkami, inhibice předčasné kapacitace, tvorba ovidukálního rezervoáru, zakrývání proteinů spermií, které se uplatňují během oplodnění (Teclé & Gagneux, 2015), umožňuje mezibuněčnou komunikaci gamet a účastní se časných kroků při rozpoznávání gamet (Bonet et al., 2013).



Obr. 2. Hlavní skupiny glykanů a glykokonjugátů na spermii. Převzato od Teclé & Gagneux (2015).

3.2.1 Posttranslační modifikace proteinů – glykosylace

Běžnou, i když velmi různorodou, posttranslační úpravou proteinů je glykosylace (Apweiler et al., 1999) – enzymatický proces připojující glykany nebo sacharidy k proteinům, lipidům nebo jiným organickým molekulám (Cheon & Kim, 2015). Glykoproteiny se často nacházejí na povrchu buněk a nesou krátké sacharidové řetězce, které vyčnívají z buňky (glykany) a mohou být důležitým faktorem při rozpoznávání buněk (Clark, 2009). Většina cukerných zbytků je napojena na proteiny, které jsou buď integrované v membráně, nebo jsou s ní jinak spojené (Schröter et al., 1999).

Glykosylace hraje roli v různých biologických procesech a buněčných aktivitách (např. adheze, interakce, funkční a strukturální regulace). Glykosylaci lze rozdělit na více typů, a to hlavně N-glykosylace, O-glykosylace a vzácně i jiné typy (Xin et al., 2022). Podstatou N-glykosylace je připojení cukrů k atomu dusíku aminokyselin asparaginu nebo argininu. Během O-glykosylace se cukry připojují k hydroxy skupině serinových nebo threoninových zbytků. Tento typ glykosylace je běžný například u povrchových proteinů (adhesiny) (Charbonneau et al., 2007) nebo u bičků (Logan, 2006).

Glykosylace proteinů může být druhově, tkáňově nebo buněčně specifická (nebo i jejich kombinace). Struktura a funkce glykoproteinů je závislá na kombinaci monosacharidů, protože to pak určuje místa větvení, délku řetězce, vazby, typ anomerie (α , β) a/nebo kovalentní připojení modifikujících skupin (např. sulfát, fosfát, acetyl) (Cheon & Kim, 2015).

Glykosylace je důležitou součástí celého života spermie od spermatogeneze, přes zrání, kapacitaci, rozpoznání vajíčka až po samotné oplodnění (Xin et al., 2022). Ke glykosylaci spermií dochází v nadvarletech a později i v samičím reprodukčním traktu. Původní lokalizace membránových proteinů a lipidů ve specifických oblastech spermií vzniklá během spermiogeneze musí projít změnou a pro uchování fertility je důležité, aby redistribuce probíhala správně. Hodnocení glykosylace je čím dál důležitější nástroj v oblasti diagnostiky a léčby neplodnosti. Z pohledu spermie jsou nejdůležitější O- a N- glykosylace (Cheon & Kim, 2015). Glykosidové vazby mezi aminokyselinami a sacharidy v těchto typech jsou popsány na obrázku 3.

Enzymy jsou biokatalyzátory, které urychlují biochemické reakce v živých organismech (Robinson, 2015). Mezi enzymy, které se účastní změn sacharidových složkách glykokalyxu patří především glykosyltransferázy a glykosidázy. Glykosyltransferázy jsou enzymy, které katalyzují přenos cukerných zbytků z dárce nukleotidového cukru na cukerné řetězce na glykoproteinech a glykolipidech. Glykosidázy naopak štěpí koncové cukerné zbytky z existujících glykokonjugátů (Tulsiani et al., 1993).

Type of linkage	Linkage amino acid	Carbohydrate (Monosaccharide code)	
N	Arginine	Glucose (Glc)	
		Asparagine	Glucose (Glc)
			N-Acetylgalactosamine (GalNAc)
			N-Acetylglucosamine (GlcNAc)
O	5-Hydroxylysine	Mannose (Man)	
		L-Rhamnose (Rha)	
	4-Hydroxyproline	Galactose (Gal)	
		N-Acetylglucosamine (GlcNAc)	
	Serine	L-Arabinose (Ara)	
		Galactose (Gal)	
		N-Acetyl-fucosamine (FucNAc)	
		Glucose (Glc)	
	Threonine	Xylose (Xyl)	
		N-Acetylglucosamine (GlcNAc)	
		L-Fucose (Fuc)	
		Galactose (Gal)	
		Glucose (Glc)	
		Mannose (Man)	
Serine/Threonine	N-Acetylgalactosamine (GalNAc)		
	N-Acetylglucosamine (GlcNAc)		
	DiActrideoxyhexose		
	Fucose (Fuc)		
	Galactose (Gal)		
	Mannose (Man)		
Tyrosine	Pseudaminic acid (Pse)		
	Galactose (Gal)		
	β -D-Glucopyranose (β -D-glc)		
	Glucose (Glc)		

Obr. 3. Glykosidové vazby mezi aminokyselinami a sacharidy (Cheon & Kim, 2015)

3.2.2 Glykosylace proteinů během spermatogeneze a maturace

I když se membránové a akrozomální proteiny spermií distribují už během spermatogeneze, takto vzniklé rozmístění by nestačilo k tomu, aby spermie byla schopna oplodnit vajíčko (Tulsiani, 2005). Tuto schopnost získá při dozrání během průchodu nadvarletem. Pro dozrání je důležité, aby se odehrálo několik biochemických změn. Patří mezi ně i modifikace sacharidových struktur na povrchových glykoproteinech spermie. Základem pro tyto modifikace jsou glykosyltransferázy a glykosidázy. V lumenu nadvarlete jsou v epididymální tekutině přítomny oba typy (Tulsiani et al., 1993).

Glykoproteiny, které jsou pro spermii esenciální, se syntetizují už během spermatogeneze (Teclé & Gagneux, 2015). Příkladem může být membránový O-glykosylovaný protein equatorin, který je spojen s akrozomem. Ten se uplatňuje až při samotné AR, avšak není nutný pro samotnou tvorbu akrozomu, jak se ukázalo při pokusech na myších. Při dalších

experimentech se ukázalo, že by mohl reagovat se složkami SNARE komplexu (SNAP25, anti-Syntaxin1a a anti-SNAP25), který hraje důležitou roli ve fúzi membrán při AR (Hao et al, 2014). Další skupinou glykoproteinů, které jsou syntetizovány během spermatogeneze, jsou imunitně aktivní membránové glykoproteiny. Patří sem například CD9 (tetraspanin zapojený do fúze gamet), CD46 (regulační protein komplementu) a CD47 (inhibitor endocytózy makrofágy) (Teclé & Gagneux, 2015).

Jak již bylo zmíněno, v epididymální tekutině jsou přítomny enzymy, které různě modifikují přítomné sacharidové struktury. Tyto změny jsou často předmětem studií, které k jejich detekci využívají např. lektiny (viz kapitola 3.4). Stejně tak jsou studovány změny během kapacity a po AR. Tyto experimenty vedly ke zjištění, že různé lektiny (s různou vazebnou specifitou) se na spermie, odebraných z různých částí nadvarlete (příp. i na ejakulovaných spermích), navazují v jiných vzorech. To znamená, že ke změnám dochází postupně během průchodu nadvarletem (nebo i v samičím reprodukčním traktu) a že ne všechny sacharidové struktury jsou upravovány ve stejné fázi maturace spermie (Fàbrega et al., 2011; Marangee et al., 1988; Navaneetham et al., 1996).

Jedním z enzymů upravujících N-glykany je alfa-manozidáza IIx, která je vysoce exprimována nejen v Sertoliho a Leydigových buňkách, ale i ve spermatocytech a kulatých spermatidách (Teclé & Gagneux, 2015). Během experimentů, kdy k expresi manozidázy nedocházelo, byly myši neplodné. Pokud chyběla, spermatocyty nebyly schopné přilnout k Sertoliho buňkám, což vedlo k jejich uvolňování z varlat a v nadvarletu se tedy vyskytovaly nezralé zárodečné buňky (Fukuda & Akama, 2002).

Mezi významné glykosidázy patří hyaluronidáza, která štěpí kyselinu hyaluronovou (hyaluronan), polysacharid nacházející se v extracelulární matrix buněk (Gmachl et al., 2003). Hyaluronidáza (PH20/SPAM1) spermíí, u které bylo prokázáno, že hraje roli ve vazbě spermíí na ZP vajíčka (Gmachl et al., 2003), má dvě různé proteinové domény, které umožňují její aktivitu jak v kyselém, tak neutrálním pH. Neutrální enzymová aktivita je nezbytná pro průnik spermíí extracelulárním matrix kumulárních buněk okolo ovulovaného oocyty, které jsou bohaté na kyselinu hyaluronovou (HA). Enzymová aktivita při kyselém pH je funkční během AR spermíí. U primátů se jeví, že hyaluronidázová aktivita spermíí může mít větší význam než u myši. Zatímco u člověka je to jediná přítomná hyaluronidáza, myši mají 4 izoformy tohoto enzymu, proto u nich SPAM1 není pro oplození nezbytný (Evans et al., 2003). Součástí glykanu uvnitř nebo i na terminálním konci povrchového SPAM1 je manóza. Přítomnost fukózy nebo kyseliny sialové prokázány nebyly. Deglykosylace tohoto enzymu může vést k úplné ztrátě hyaluronidázové aktivity (Cheon & Kim, 2015).

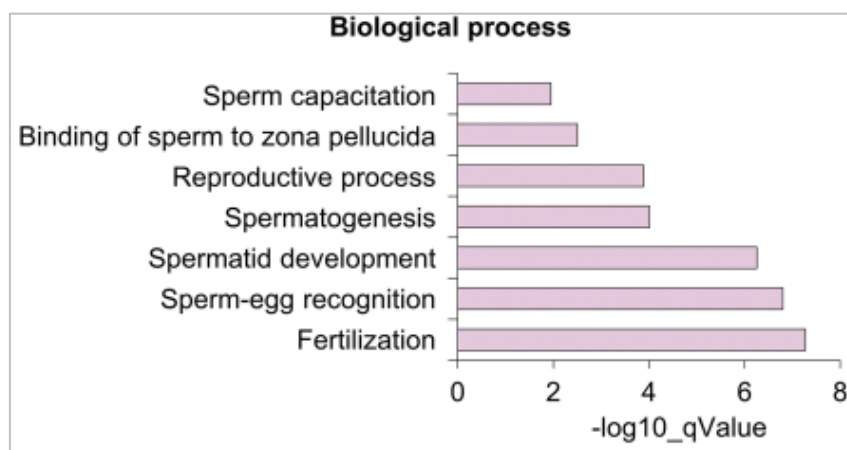
3.2.3 Role glykanů v reprodukci

Ve spermích se mohou vyskytovat tři třídy N-glykanů: s vysokým obsahem manózy, hybridní a komplexní N-glykany. Všechny tři třídy jsou důležitou součástí glykokalyx a jsou nepostradatelné při skládání proteinů v endoplazmatickém retikulu nebo Golgiho aparátu, protože zajišťují správnou interakci s chaperonovými proteiny (Teclé & Gagneux, 2015). Mohou být napojeny jak na proteiny, tak lipidy membrány (Bonet et al., 2013).

N-glykany jsou velmi flexibilní molekuly s vysokým stupněm rotace a rozsahem pohybu kolem každé glykosidické vazby. Je u nich přítomna i značná mikroheterogenita, tedy na stejné molekule hlavního řetězce se mohou N-glykany lišit jak délkou řetězce, tak ve větvení a složení monosacharidů (Schröter, 1999).

Glykoproteiny mají v reprodukci široké uplatnění (obr. 4). U spermií se podílejí na spermatogenezi, vývoji spermatid, regulaci kapacitace vazbě spermií na ZP (Xin et al., 2022), rozpoznávání gamet a oplodnění (Clark, 2009; Gómez-Torres et al., 2012) nebo i na ochraně spermií při průchodu samičím pohlavním traktem a zachytávání spermií na stěnách vejcovodů (Tulsiani, 2006).

Studie Pang et al. (2007) na spermiích detekovala tři hlavní třídy N-glykanů. První skupinou jsou N-glykany s vysokým obsahem manózy, další biantennární (půlící typ) a poslední jsou biantennární, triantennární a tetraantennární oligosacharidy zakončené sekvencemi Lewis^x a Lewis^y. Glykoproteiny s Lewis^y sekvencí se u normálních spermií vyskytují v akrozomu, u defektních spermií na povrchu PM. Hlavní N-glykany spojovali s inhibicí specifické i nespecifické imunity jak v samčím, tak samičím reprodukčním traktu (Pang et al., 2007).



Obr. 4. Účast glykoproteinů na biologických procesech. Převzato od Xin et al., 2022

Spermiie se v isthmu oviduktu navazují na jeho epitel, čímž vzniká tzv. oviduktální rezervoár. Tím se zpomaluje průběh kapacitace a prodlužuje se doba, kdy jsou spermiie schopné oplození, zároveň dochází k jejich selekci (Suarez 1998). Na tvorbě rezervoáru se u různých druhů podílejí různé sacharidové struktury – glykanové řetězce ve vejcovodech jsou schopné zachytávat vstupující spermiie. Stejně tak se na rezervoáru podílejí proteinové receptory na povrchu jejich hlavičky (Suarez 2001). Oviduktální rezervoár je místem kapacitace a dochází zde i k hyperaktivaci motility (Suarez 1998). Tyto procesy vedou k postupnému uvolňování spermií, které je zapříčiněno odstraněním povrchových proteinů zodpovědných za vazbu spermií k epitelu nebo po odštěpení sacharidových zbytků epitelu glykolytickými enzymy, které jsou během ovulace přítomny v oviduktální tekutině (Carrasco et al. 2008; Töpfer-Petersen et al. 2008).

U všech savců je PM přední části hlavičky spermiie prvním místem, které interaguje se ZP oocyty (Kongmanas et al., 2014). Vazba spermiie na ZP vajíčka je zprostředkována interakcí protein-sacharid mezi lektiny na spermiích a glykanovými strukturami glykoproteinového

obalu vajíčka (Töpfer-Petersen, 1998) Vybrané glykoproteiny, které se účastní vazby na ZP, případně i fúze membrán jsou v přehledu na obrázku 5.

Protein	Defects or antibody	
	ZP binding ability	Sperm-egg fusion
ADAM1a	Impaired	-
ADAM2	Impaired	-
ADAM3	Impaired	-
Angiotensin-converting enzyme	Impaired	-
Amyloid-precursor-like protein 2	-	Impaired
β1,4-galactosyltransferase I	Impaired	-
CD9	-	Impaired
CD52	-	Impaired
CD81	-	Impaired
Fertilin	Impaired	Impaired
GLIPR1L1	Impaired	-
HAP2	-	Impaired
HSPD1	Impaired	-
Izumo1	-	Impaired
M29 and M37	-	Impaired
M5 and M42	Impaired	Impaired
PH20	Impaired	-

ZP je glykoproteinový obal vajíčka savců, který se začíná tvořit už v primární fázi vývoje oocyty. Má podobu jemné sítě, ve které se nachází póry. Její glykoproteinové složení se druhově liší, zatímco lidská ZP se skládá ze čtyř glykoproteinů (ZP1-4), myši pouze ze tří (ZP1-3). ZP hraje významnou roli během oogeneze, v druhově specifickém rozpoznání a vazbě spermií na oocyt, při indukci AR spermií jako nezbytném procesu pro oplodnění, v prevenci proti polyspermii a po oplození chrání embryo (Coward & Wells, 2013; Gupta, 2021). Vazebné molekuly na spermii pro ZP zahrnují i různé enzymy (glykosyltransferázy, glykosidázy a hexokinázy), integrální proteiny PM spermie a periferně připojené složky (Töpfer-Petersen, 1998).

Obr. 5. Některé glykoproteiny spermií, které se účastní vazby spermie na ZP nebo fúzi membrán spermie a vajíčka (Cheon & Kim, 2015).

3.3 Významné proteiny a glykoproteiny spermie

Protože spermie nemá po opuštění varlat aktivní syntézu proteinů, získávání, translokace nebo modifikace proteinů probíhá různými způsoby během jejich posttestikulární maturace jak v samčím, tak samičím reprodukčním traktu (Coward & Wells, 2013; Myles & Primakoff, 1997). Významnou součástí proteomu spermie jsou také glykoproteiny. Do přehledu významných (glyko)proteinů spermií byly vybrány takové, které jsou významné z pohledu fertilizace. Jejich krátký přehled je v tabulce 1.

Tab. 1. Glykoproteiny, které se postupně vážou na PM spermií během jejich průchodu samčím reprodukčním traktem. Modifikováno dle Schröter et al., 1999.

Glykoprotein	Původ	Velikost/hmotnost	Typ glykosylace	Lokalizace na spermii	Funkce
PH 20	varlata	455 AMK/ 64 kDa	7 N-glycosylačních míst >20 O-glycosyl.	E a K: akrozomální oblast (IAM)	hyaluronidázová aktivita, sekundární vazba na ZP
CD59	varlata	103 AMK/ 19 kDa	1 N-glykosylační místo, 9 O-glycosyl.	celý povrch spermií	ochrana spermie
CD52	tělo nadvarlete	12 AMK	1 N-glykosylační místo	celý povrch spermií	zvýšení stability PM, imunosuprese
ARP	vývodné kanálky varlete	230 AMK/30kDa	1 N-glykosylační místo	PA na hlavičce spermií	fúze gamet (podobný AEG)

Jedním z důležitých proteinů spermie je SPAM1 (PH-20), GPI vázaný protein o velikosti 64 kDa (Sabeur et al., 1997), který se vyskytuje u savčích spermií různých druhů, včetně myši, potkanů, křečků, skotu, makaků a lidí (Lathrop, 1990). Tento protein je tvořen ve varlatech a je ukotven v PM a IAM. Během průchodu spermie nadvarletem dochází k translokaci tohoto

proteinu. Ve varlatech je po celém povrchu spermie, po průchodu je dle druhu buď na celé ploše nebo na posteriorní straně hlavičky spermie. Například u spermie morčat se nachází na zadní straně hlavičky spermie a po AR se přesouvá do akrozomální membrány (Gmachl et al., 2003). Další změny v jeho lokalizaci nastávají při AR, kdy se odhalí i SPAM1 na IAM (Schröter et al., 1999). U primátů bylo prokázáno, že SPAM1 během oplození hraje několik rolí. Například umožňuje spermii s neporušeným akrozomem penetrovat kumulus oocyty a poté se navázat na jeho ZP. Také hraje roli při exocytóze akrozomu (Evans et al., 2003; Myles & Primakoff, 1997).

Dalším GPI-ukotveným glykoproteinem do PM spermií je CD59 (protektin) o velikosti 19 kDa. Imunohistochemií bylo prokázáno, že se objevuje na celém povrchu jak ejakulovaných a kapacitovaných spermií, tak spermií po AR. Proto se předpokládá, že se účastní ochrany samčích gamet před imunitní odpovědí při průchodu samičím pohlavním traktem. Mimo to je možné, že se podílí na adhezi gamet během oplodnění (Schröter et al., 1999).

Na povrch hlavičky spermií se po kapacitaci díky zatím nevyjasněným mechanismům přesouvají akrosin a akrosin vázající protein (ACRBP) (Kongmanas et al., 2014). Akrosin je exprimován již ve varlatech (Nayernia et al. 1996). Ve spermatidách byla prokázána přítomnost jeho neaktivní formy, proakrosinu (Baba et al. 1989). Biochemicky ho lze detekovat jako proakrosin (~53–55 kDa), intermediární formy (~45–49 kDa), zralý akrosin (~35 kDa) a další formy. Působí jako zonální lysin během pronikání zón, ale jeho přesná funkce při průniku ZP oocyty zatím není zcela objasněná. Nicméně bylo posláno, že nepřítomnost tohoto proteinu na spermiích u různých druhů může ovlivňovat jejich fertilitu. Zatímco u myši a krys s deficitem tohoto proteinu k oplodnění dochází, u křečka zlatého tomu tak není. Je možné, že během interakcí spermie se ZP, dokážou jiné, zatím nedefinované, proteázy nebo proteiny kompenzovat jeho absenci. Ve spermiích se vyskytuje ve dvou formách, a to volně v matrix akrozomu a vázaný na IAM (Zhang et al., 2023). Mimo hlavičku spermie je ve formě zymogenu zastoupen i v proteomu bičíku (Zhang et al., 2022).

Původ ve varlatech má i zonadhezín - transmembránový protein se třemi doménami (D1, D2, D3), který funguje jako vazebný protein v interakci spermie se ZP. Ve varlatech je syntetizován jako prekurzorový protein, který následně prochází úpravami. V plné délce (243 kDa) je přítomný ve varlatech. Po průchodu nadvarletem jsou však dokončeny jeho úpravy a zbývají z něj štěpené fragmenty, označené jako p97 (97 a 85 kDa, sekvence D2–D3), p43 (43 kDa, D1 sekvence) a p58 (58 kDa, D4 a C-koncová sekvence) (Lea et al., 2001).

Mezi transmembránové proteiny patří genová rodina, která se označuje jako ADAM. Obsahují dezintegrin a metaloproteázu. Zástupci byli nalezeni napříč různými druhy od *Drosophila* až k člověku (Myles & Primakoff, 1997). Biologické procesy, se kterými jsou ADAM funkčně spojeny, zahrnují fertilizaci, diferenciaci buněk v nervovém systému, migraci buněk, vedení axonů, vývoj svalů a různé aspekty imunity (Edwards et al., 2008). Jsou přítomny např. na PM spermií a podílejí se na fúzi spermie a vajíčka (Myles & Primakoff, 1997; Schröter et al., 1999).

Jedním ze zástupců ADAM proteinové rodiny je fertilin (PH-30), což je α/β heterodimer složený ze dvou velmi příbuzných transmembránových proteinů. Je nezbytný pro migraci spermií vejcovodem, pro vazbu na ZP a pro účinnou vazbu na PM vajíčka (Blobel, 2000). Přiřazuje se mu role i ve fúzi gamet na základě druhově specifického rozpoznávání (Schröter

et al., 1999). Prekurzor α fertilinu je tvořen ve varlatech a k jeho zpracování probíhá při průchodu spermie nadvarletem (Myles & Primakoff, 1997).

Významným glykopeptidem, který spermie získává při průchodu nadvarletem, je CD52 (u prasat může být označován jako SWC1). Ten je neobvykle krátký, vysoce glykosylovaný a jeho sacharidové řetězce tvoří hlavní složku glykokalyx spermie (Kirchhoff & Schröter, 2001; Koyama et al., 2007; Leitner et al., 2012). Skládá se z peptidu o 12 aminokyselinách, na kterém jsou N-vázané glykany na glykosylačním místě v poloze 3 a z GPI kotvy napojené na C-konci polypeptidového řetězce. Některé glykoformy jsou rozpoznávány imunitními složkami v samičím reprodukčním traktu, které imobilizují spermie (Koyama et al., 2007).

Glykoprotein, který se značně podílí na tvorbě glykokalyx spermie je multifunkční a vysoce sialylovaný β -defensin 126 (DEFB126). Skládá se z konzervovaného β -defensinového jádra a C-koncového glykosylovaného peptidového konce s 20 O-glykosylačními místy spojujícími oligosacharidy. Secernován je buňkami těla a ocasu nadvarlete. Bylo zjištěno, že je důležitý pro efektivní postup spermií do horní části samičího reprodukčního traktu (průnik cervikálním hlenem), dále chrání spermie před rozpoznáním imunitním systémem samice a usnadňuje pronikání spermií do cervikálního hlenu a zapojuje se při připojení spermií ke stěně vejcovodu (Cheon & Kim, 2015; Xin et al., 2016). Jeho předpokládaná hmotnost je 10 kDa, ale jeho purifikované formy vykazují velikost 34-36 kDa. To je pravděpodobně způsobeno rozsáhlou O-glykosylací. Jeho karboxy-terminální konec obsahuje glykany, které jsou bohaté na α 2-3 a α 2-6 vázanou sialovou kyselinu (Teclé & Gagneux, 2015).

CRISP je označení pro rodinu proteinů, která je charakteristická přítomností 16 konzervovaných cysteinových zbytků. Zástupci této rodiny se nacházejí v sekretech reprodukčního traktu a slinných žlázách, včetně toxinů jedu z několika druhů hadů a ještěrek. Každý protein má dvě domény: aminoterminální doména podobná patogenezin (PR) a karboxylová koncová doména bohatá na cystein (CRD) (Roberts et al., 2006). U savců se rodina skládá ze čtyř členů (tj. CRISP1-4), exprimovaných hlavně v samčím traktu, přítomných ve spermiích. Každý ze členů se pravděpodobně díky schopnosti regulovat různé signální dráhy spermií účastní více než jedné fáze interakce gamet, (tj. penetrace kumulu, vazby spermie na ZP, penetrace ZP nebo fúze gamet), a to buď interakcemi ligand-receptor, nebo regulací několika událostí souvisejících s kapacitací (tj. fosforylace na tyrosinu, akrozomální reakce, hyperaktivace motility spermií atd.). Experimenty na myších potvrdily jejich nezbytnost pro samčí plodnost, právě kvůli jejich širokému uplatnění v reprodukci, protože se podílejí nejen na interakci gamet, ale také v předchozích a následujících procesech (např. transport spermií v samičím traktu a časný vývoj embrya) (Gonzalez et al., 2021).

Důležitou skupinou proteinů spermií u prasat, koní nebo býků jsou spermadheziny, které jsou hlavními produkty semenné plazmy o velikosti 12-16 kDa (Haase et al. 2005), které se periferně napojují na povrch spermií (Reinert et al., 1996). Struktura a funkce spermadhezínů byla nejvíce zkoumána u prasat (Ekhlesi-Hundrieser et al. 2002). Vyskytuje se u nich několik členů této proteinové rodiny, jsou to: AWN-1, AWN-2, AQN-1, AQN-2, PSP-I a PSP-II a jejich glykosylované isoformy (Haase et al. 2005). Jsou to multifunkční proteiny, u kterých byla prokázána schopnost vázat ligandy, např. fosfolipidy, sacharidy, glykosaminoglykany a inhibitory proteáz. To naznačuje, že se mohou podílet na více krocích oplodnění. Během průchodu spermií nadvarletem se na jejich povrch díky interakcím s jejich fosfolipidovou membránou pevně vážou AQN-3 a AWN (Töpfer-Petersen et al., 1998). Při ejakulaci se ze

spermadhezinů tvoří ochranný obal kolem akrozomální části hlavičky spermie, tím se ochraňuje akrozom a brání se předčasné AR. Během kapacitace však tento obal mizí. AQN-3 a AWN-1 se také podílí na rozpoznání gamet a prvotní vazbě na ZP vajíčka (Dostálová et al., 2004). AQN-3 dle experimentů potlačuje i motilitu spermií a po jeho odstranění, spolu s dalšími faktory během kapacitace, spermie tuto schopnost získává. (Töpfer-Petersen et al., 1998).

Dalším proteinem kančích spermií je DQH povrchový protein vázající heparin. Je homologní s proteiny býčí a hřebčí semenné plazmy (SP). Je přítomný v SP kance a prokazuje afinitu k fosforylcholinu, kyselým polysacharidům, epitelu vejcovodu a glykoproteinům ZP. Od spermadhezinů se liší proteinovou strukturou. Jeho relativní molekulová hmotnost je 13 kDa. Na spermie se váže během ejakulace, poté se podílí na tvorbě ovidukálního rezervoáru spermií a má roli i v primární vazbě spermie se ZP oocyty (Tichá et al. 1998, Jonáková et al. 2000, Maňásková et al. 2007).

Dalším významným proteinem spermií je β -mikroseminoprotein (MSP), který byl původně izolován z lidské semenné plazmy, později však byl detekován napříč různými druhy (např. tamarin, potkan, myš nebo pštros) včetně prasete. Označuje se také jako prostatický sekreční protein s 94 aminokyselinami (PSP94) o molekulové hmotnosti 12kDa (Maňásková-Postlerová et al., 2011; Wang et al., 2003).

Významnou molekulou spermií je Izumo (1-4) s jednou Ig doménou, která je nezbytná pro fúzi membrány oocyty a spermie a jednou N-terminální doménou. Izumo 1-3 představují transmembránové proteiny, které se exprimují specificky ve varlatech a Izumo 4 je rozpustný protein exprimovaný ve varlatech i jiných tkáních. Během různých studií se ukázalo, že s Izumo 1 jsou spojeny další proteiny. Předpokládá se tedy, že tvoří multiproteinový membránový komplex. Pravděpodobně se podílí na organizaci nebo stabilizaci tohoto komplexu, který je nezbytný pro správnou funkci mechanismů fúze membrán a na prevenci polyspermie (Ellerman et al., 2009; Cheon & Kim, 2015).

3.4 Detekce změn glykosylace proteinů

Pojmem lektiny se označuje velká rozmanitá skupina proteinů, která byla izolována u celé řady organismů, od virů, přes bakterie a rostliny, až po živočichy (Santos et al., 2013). Lektiny zprostředkovávají řadu různých biologických procesů, například interakce typu buňka-buňka, hostitel-patogen nebo vrozené imunitní reakce (např. antivirové, antibakteriální nebo protizánětlivé reakce) (Silva et al., 2012).

Tyto proteiny jsou schopné se vázat a specificky rozpoznávat cukerné řetězce (Sklípka & Tonar, 2018), přičemž vazba je reverzibilní. Od ostatních proteinů schopných vázat sacharidy je odlišuje jejich schopnost aglutinovat buňky (Chettri et al., 2021). Vůči rozpoznávaným sacharidům nevykazují žádnou enzymovou aktivitu (Loris, 2002), což je spolu s tím, že dokážou rozpoznat jak izomery a větvení cukrů, tak vazby a terminální řetězce složitých glykanů důvod, proč se hojně využívají pro analýzu glykosylace povrchů buněk a tkání (Accogli et al. 2017).

První lektiny byly izolované ze semen rostlin, od té doby se ale ukázalo, že v přírodě jsou všudypřítomné (Chandra et al., 2006). Dnes je pro specifické techniky k dispozici mnoho lektinů s různou sacharidovou specifičností (Santos et al., 2013). Rostlinné lektiny mají i afinitu

k monosacharidům, ta je nicméně mnohem vyšší ke složitějším glykanům (van Damme et al., 2008).

Aby bylo možné lektiny detekovat pomocí imunocytochemie, imunohistochemie nebo průtokovou cytometrií, lze je značit různými konjugáty. K tomu se využívají například enzymy, biotin nebo fluorescenční barvy. Jednou z vysoce účinných metod jsou lektinové mikročipy, metoda známá od roku 2005. Pro její rychlost, přesnost a citlivost se využívá při analýze povrchového glykomu bakterií, hub, virů i savčích buněk (Xin et al., 2016).

V této práci byly použité rostlinné lektiny MAA, WGA a sWGA. Lektin MAA (*Maackia amurensis agglutinin*) se specificky váže na α -2,3 vázanou sialovou kyselinu. Na sialovou kyselinu v multivalentní vazbě spolu s N-acetylglukosaminem se váže lektin WGA (Wheat germ agglutinin). Oproti tomu sWGA (sukcinylovaný WGA) interaguje pouze s N-acetylglukosaminem (Calvo et al. 2000). WGA patří do skupiny lektinů s heveinovou doménou vázající chitin a interagují s různými typy živočišných glykoproteinů. Vysokou afinitu mají k N-glykanům s vysokým obsahem manózy a/nebo glykanům komplexním, které obsahují oligomery N-acetylglucosaminu (van Damme et al., 2008).

4 Metodika

Veškeré experimenty probíhaly v laboratoři na Katedře veterinárních disciplín České zemědělské univerzity v Praze.

4.1 Příprava vzorků spermií

Vzorky kančího ejakulátu používané v této diplomové práci pocházely od kanců plemene Duroc z inseminační stanice Skršín (LIPRA PORK, a.s.). Vzorky byly do laboratoře KVD ČZU, kde probíhalo veškeré další zpracování, dovezeny ve stejný den jako byl proveden odběr. Přeppravovány byly v plastových zkumavkách uložených v polystyrenové krabici, aby se předešlo teplotnímu šoku. Takto byly uloženy až do doby zpracování. Vzorky byly zpracovávány taktéž v den odběru.

4.1.1 Příprava vzorků z nativního ejakulátu

Celé zpracování probíhalo za laboratorní teploty. Po jemném protřepání byl z ejakulátu do zkumavky odebrán 1 ml vzorku, který se následně stočil v centrifuze (LC-8 5000, Benchmark Scientific, USA) při $300 \times g$ po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl odpipetován supernatant. Následovalo promytí vzorku. K peletě spermií byl přidán 1 ml promývacího roztoku PBS (0,01 M Phosphate-buffered saline, 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA) a usazené spermie v něm byly opatrně resuspendovány. Vzorek byl poté $3 \times$ stočen v centrifuze při $300 \times g$, po dobu 5 minut. Po každém stočení byl odebrán supernatant a vzorek doředěn do 1 ml roztokem PBS a spermie resuspendovány.

Po posledním stočení byl rozsuspendovaný vzorek rozpipetován po 200 μ l do zkumavek. Poté byly vzorky za stejných podmínek znovu stočeny a byl odebrán supernatant. Takto vzniklé pelety spermií byly buď zamrazeny, nebo byly ihned využity pro další zpracování.

4.2 Izolace povrchových proteinů

Během izolace povrchových proteinů byla využita sada Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Pro izolaci byl odebrán 1 ml vzorku zpracovaný z nativního preparátu, který byl stočen při $280 \times g$ po dobu 10 minut. Po stočení byl supernatant odstraněn a bylo dle návodu od výrobce soupravy přidáno 10 ml biotinylačního činidla (12 mg Sulfo-NHS-SS-Biotinu v 48 ml PBS) a peletka spermií byla rozsuspendována. Vzorky byly poté za účelem vazby biotinu na proteiny na povrchu spermií dány na 30 minut do lednice při teplotě 4 °C a po asi 10 minutách byly jemně promíchány.

Po vyjmutí z lednice byly vzorky stočeny při $500 \times g$ po dobu 3 minut. Vzniklý supernatant byl odstraněn a vzorky byly $2 \times$ promyty v 10 ml TRIS pufru (Tris buffered saline, 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,8; ThermoFisher, USA), při $500 \times g$ po dobu 3 minut. Supernatant byl odstraněn, vzorek doředěn do 1 ml TRIS pufrům a peletka rozsuspendována. Vzorky byly přeneseny do 1,5 ml mikrozkušavek a znovu stočeny při $500 \times g$ po dobu 3 minut. Znovu byl odstraněn supernatant a ke vzorku bylo ze sady přidáno 500 μ l lyzačního pufru

s inhibitory proteáz (Lysis Buffer) a vzorek spermií byl následně rozsuspendován. Vzorky byly vortexovány a poté vloženy na 30 minut na led, každých 10 minut byly znovu vortexovány. Lyzáty byly poté znovu odstředěny v nachlazené centrifuze (Hettich Mikro 22R, Německo) při $10\,000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 minuty. Supernatant byl přepipetován do nových mikrozkuumavek. Takto byly vzorky buď zmrazeny, nebo rovnou dále zpracovávány.

Dále byly ze sady připraveny 2 kolonky (Columns), které byly označeny a poté vloženy do stejně označených sběrných mikrozkuumavek (Collection Tubes). Do každé kolonky bylo přidáno 500 μl imobilizovaného avidinu (Immobilized neutrAvidin Gel), který byl v zásobní lahvi nejprve jemně promíchán. Po odlomení jejich koncových částí byly kolonky vloženy do příslušných sběrných mikrozkuumavek a následně proběhla centrifugace při $1000 \times g$, 1 minutu. Supernatant byl odstraněn a do kolonek bylo přidáno 500 μl promývacího pufru ze sady (Wash Buffer) a následně opět proběhlo stočení při $1000 \times g$ 1 minutu. Takto byly kolonky promyty celkem dvakrát.

Kolonky byly poté vyjmuty ze sběrných mikrozkuumavek a byly uzavřeny zátkou. Následně byl do každé z nich přidán celý vzorek lyzátu spermií a po uzavření byly takto biotinylované proteiny ponechány 45 minut inkubovat s avidinem na rotační třepačce (MX-T6-Pro, DLAB Scientific, USA).

Po uplynutí doby byla z kolonky nejprve sejmuta zátk a pak byly znovu vloženy do sběrných mikrozkuumavek, takto byly poté stočeny při $1000 \times g$ 1 minutu. Supernatant se jako kontrola přelil do nových mikrozkuumavek a zamrazil. Kolonky s gelovými kuličkami s navázanými biotinylovanými proteiny byly 3 \times promyty v 500 μl promývacího pufru (Wash buffer) při $1000 \times g$ 1 minutu. V 50 μl destilované vody bylo rozpuštěno 50 μg DTT (dithiotreitol) z kitu, roztok byl poté přidán k 1 ml neredukujícího vzorkového pufru pro SDS elektroforézu (Sample Buffer; 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 – Bio-Rad, USA; glycerol, 2% SDS, 0,05% bromfenolová modř – Sigma-Aldrich, USA).

Do každé kolonky bylo připipetováno 250 μl vzorkového pufru s DTT a kolonka byla zazátkována. Takto byly navázané proteiny na avidinu ponechány 30 minut inkubovat na rotační třepačce. Na závěr byly kolonky stočeny při $1000 \times g$ po dobu 2 minut. Obsah sběrné mikrozkuumavky byl přepipetován do nové mikrozkuumavky, označen a zmrazen až do použití pro SDS elektroforézu.

4.3 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza je metoda rozdělávání proteinů v elektrickém poli dle jejich molekulové hmotnosti. Aby to bylo možné, ke vzorkům proteinů je přidáván detergent – dodecylsulfát sodný (SDS), který proteinům dodává záporný náboj.

4.3.1 Příprava vzorků spermií pro SDS elektroforézu

K peletě spermií zpracovaných z nativního ejakulátu bylo přidáno 150 μl vzorkového neredukujícího pufru (0,5 M Tris-HCl (Bio-Rad, USA), pH 6,8; glycerol 2% SDS; 0,05% bromfenolová modř). Tato suspenze byla poté zvortexována. Následovala lyzace buněk na ledu po dobu 30 minut za střídavého intenzivního protřepání pomocí Vortexu. Vzorek byl následně vložen do termobloku (TS-100, BioSan, Litva), kde byl 5 minut při soustavném třepání povařen při $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následovala centrifugace při $10\,000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a po dobu 2 minut. Po stočení byl do

nové mikrozkušavky odpipetován supernatant, který byl následně dál využit pro SDS elektroforézu.

4.3.2 Příprava gelů pro SDS elektroforézu

Pro experiment byl vytvořen separační a zaostřovací gel. Separační gel o hustotě 12 % byl připraven smícháním 3,5 ml destilované vody, 2,5 ml pufru B (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; Bio-Rad, USA), 4 ml roztoku akrylamidu (30% akrylamid/bis akrylamid; Bio-Rad), 100 μ l 10% SDS (Bio-Rad) a těsně před aplikací gelu se přidalo 70 μ l 10% APS (persíran amonný, Amersham Biosciences, Švédsko) a 4,5 μ l TEMEDu (Pharmacia Biotech, Švédsko). Příprava 4% zaostřovacího gelu byla následovná: Bylo smícháno 1,52 ml destilované vody, 0,625 ml pufru C (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; Bio-Rad), 0,325 ml roztoku akrylamidu, 0,025 ml 10% SDS. Těsně před aplikací gelu bylo přidáno 3,8 μ l TEMEDu a 50 μ l 10% APS.

4.3.3 SDS elektroforéza

Pro SDS elektroforézu byl využit systém Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Aparatura byla složena podle návodu, se skly uloženými ve stojánku.

Separační gel byl nalit po cca 5 ml mezi skla a převrstven až po okraj destilovanou vodou. Takto byl ponechán 30 minut tuhnout. Po ztuhnutí byla voda vylita a separační gel byl převrstven gelem zaostřovacím, do kterého byly ihned opatrně zasazeny hřebínky pro tvorbu jamek, a gel byl ponechán alespoň 10 minut tuhnout.

Skla byla poté vložena mezi elektrody a přemístěna do aparatury na elektroforézu. Vše bylo zalito elektrodovým pufrem (pH 8,3: 15 g Tris (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 72 g glycinu (Sigma-Aldrich, USA), 5 g dodecylsulfátu sodného (SDS; Bio-Rad), destilovaná voda do 1 litru, pak ředěno 1:4 destilovanou vodou). Poté byly hřebínky opatrně vyndány z gelu. Do vzniklých jamek byly po 3 μ l naneseny proteinové molekulové standardy Dual Color (Bio-Rad, USA) a po 10 μ l, v případě, že šlo o vzorky pro detekci povrchových proteinů po 12 μ l, vzorky připravené na elektroforézu. Zároveň bylo zapsáno pořadí, ve kterém se vzorky nanášely.

Následně byla aparatura připojena ke zdroji elektrického proudu a spuštěna elektroforéza – prvních 20 minut při konstantním napětí 80 V a poté asi 1 hodinu při 150 V. Průběh elektroforézy byl sledován a čas byl případně upraven podle potřeby. Po ukončení elektroforézy byl gel vyndán a vložen do nádoby s destilovanou vodou.

V případě izolace povrchových proteinů byl gel s rozdělenými proteiny obarven pro pozdější denzitometrické hodnocení. Barvení bylo provedeno pomocí kitu Pierce Silver Stain Kit (Thermo SCIENTIFIC, USA) dle návodu výrobce.

4.4 Metoda Western blot

Nejprve byl připraven transferový pufr. 3,03 g Tris (Sigma-Aldrich, USA) a 14,4 g glycinu (Sigma-Aldrich, USA) bylo rozpuštěno v 200 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 200 ml metanolu (VWR, BDH Chemicals, Francie) a roztok byl doplněn destilovanou vodou do 1000 ml. Dále byly pro Western blot potřeba 4 ks chromatografického filtračního papíru (Whatman chromatography paper, GE Healthcare, USA; 8,5 \times 10 cm), 2 houbičky

a nitrocelulózová (NC) membrána (Amersham Protran, GE Healthcare, USA). Vše bylo na 10 minut namočeno do transferového pufru.

Následně byly jednotlivé komponenty vloženy do kazety na Western blot (aparatura od firmy Bio-Rad). Pořadí vkládání do kazety (od černé) bylo následující: houbička, 2 ks filtračního papíru, gel se separovanými proteiny po elektroforéze, NC membrána, 2 ks filtračního papíru a houbička. Kazeta byla poté uzavřena, vložena do rámu a ten pak do vaničky s transferovým pufrem. Vše bylo poskládáno tak, aby nitrocelulózová membrána byla směrem ke kladné elektrodě. Vzduchové bubliny mezi gelem a membránou byly nežádoucí, proto byly opatrně vytlačeny. Celá vanička byla poté umístěna do nádržky, do které byl nasypán led a nalita studená voda za účelem chlazení. Poté byla aparatura zapojena do zdroje a nastaven konstantní elektrický proud na 500 mA. Elektropřenos probíhal 1–1,5 h.

4.5 Vazba biotinem značených lektinů na proteiny na nitrocelulózové membráně

Po ukončení elektropřenosu byla kazeta vyjmuta a rozebrána. Membrána byla vložena do misky s destilovanou vodou. Po vylití vody byla membrána zalita roztokem Ponceau (Sigma-Aldrich, USA) k vizualizaci proteinů na membráně. Barvení probíhalo asi 1 minutu a poté byla membrána odbarvena destilovanou vodou a kontrolně vyfocena.

Membrána byla odbarvována po dobu asi 10 minut 20 ml PBS-T (PBS s 0,1% Tweenem) na třepačce (MX-T6-Pro, DLAB Scientific, USA). K blokaci volných míst na membráně byla využita 2% želatina (Gelatin from cold water fish skin, Sigma-Aldrich). Se želatínou byla membrána inkubována přes noc při 4 °C a další zpracování vzorku probíhalo až následující den.

Druhý den byla membrána za účelem odmytí nespecifických vazeb promyta PBS-T na třepačce asi po dobu 10 minut. Po promytí byly membrány vhodně nastříhány a vloženy do falkony. Jedna membrána sloužila jako negativní kontrola, která byla inkubována v 5 ml Hepes pufru (10 mM HEPES, 0,1 mM CaCl₂, pH 7,5). U ostatních proběhla inkubace s biotinem značenými lektiny, které byly ředěny v Hepes pufru následovně:

MAA (Biotinylated maackia amurensis lectin) 5 µl/5ml
WGA (Biotinylated wheat germ agglutinin) 2 µl/5ml
sWGA (Sukcinylovaný WGA) 5 µl/5ml

Inkubace probíhala ve falkonách na rotační třepačce po dobu 1 hodiny. Následně byla membrána 4 × promyta po 5 minutách v přibližně 20 ml PBS-T. Poté následovala inkubace všech membrán včetně negativní kontroly s avidinem konjugovaným s křenovou peroxidázou (Sigma-Aldrich, USA) o koncentraci 1 µg/ml v PBS. Inkubace opět probíhala asi 1 hodinu na rotační třepačce. Stejně tak byla membrána 4 × promyta po 5 minutách v přibližně 20 ml PBS-T.

Pro vyhodnocení byl použit přístroj Azure c300 (Azure Biosystems, USA). Na určené místo byla vložena membrána, která byla převrstvena chemiluminiscenčním substrátem SuperSignal West Pico (Thermo SCIENTIFIC, USA) připraveným dle pokynů výrobce. Pomocí kamery přístroje byly pořízeny snímky vhodné pro další vyhodnocování.

4.5.1 Denzitometrická analýza a výpočet molekulových hmotností

K denzitometrické analýze byl využit program Image Studio Lite Ver 5.2 (LI-COR Biotechnology, USA). Získané výsledky představovaly průměr \pm střední chybu průměru (SEM) a byly dále zpracovány ve statistickém programu GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego California, USA), ve kterém byl proveden jednovýběrový test analýzy rozptylu (ANOVA). Výsledky byly sjednoceny v programu MicrosoftExcel (Microsoft Office Professional Plus 2021). Normalizace byla v rámci všech experimentů a membrán vztažena ke kanci CH (Chlor).

K určení molekulových hmotností byly využity logaritmy molekulových hmotností standardů vztažených k dráze proteinů od začátku gelu/membrány. Poté byly v programu MicrosoftExcel vytvořeny bodové grafy s lineárními spojnicemi trendu. Tím byly získány rovnice, ze kterých byly počítány molekulové hmotnosti detekovaného proteinového proužku (viz příloha 1, 2, 3).

4.6 Fluorescenční mikroskopie

Při fluorescenční mikroskopii byl využit fluorescenční mikroskop (Nikon Eclipse E600, Japonsko). Snímky byly pořizovány kamerou (Nikon Digital Sight DS-Fi 1, Japonsko) při 40 \times zvětšení a ukládány prostřednictvím programu NIS Elements (Nikon, Japonsko).

4.6.1 Fixace spermií aceton-metanolem

Na podložní sklička byla pomocí hydrofobní fixy (PAN liquid rocker; Sigma-Aldrich, USA) nakreslena vždy 2 kolečka o stejné velikosti. Každé sklíčko bylo popsáno pro snadnou identifikaci vzorků. Z mikrozkušavky s 200 μ l vzorku spermií vzniklého po zpracování z nativního ejakulátu bylo odpipetováno 25 μ l do nové mikrozkušavky. Následně bylo přidáno 750 μ l PBS. Hustota vzorku byla zkontrolována pod světelným mikroskopem. Do každého kolečka bylo napipetováno 20 μ l vzorku spermií, které byly poté fixovány 50 μ l vymraženého acetonu s metanolem (poměr 1:1).

Po 5 minutách inkubace byly preparáty opláchnuty ve fyziologickém roztoku (0,9% NaCl) a ponechána oschnout. Následně byla do všech koleček nanášeno 150 μ l blokovacího média SuperBlock (Blocking Buffer in PBS; Thermo Fisher Scientific, USA) a vzorky byly ponechány 15 minut inkubovat ve vlhké komůrce. Poté byly preparáty opláchnuty fyziologickým roztokem. Do Hepes pufru byl v poměru 1:100 přidán vybraný lektin. Do každého kolečka bylo přidáno 100 μ l tohoto roztoku, na kontrolní sklíčko bylo přidáno stejné množství čistého Hepes pufru. Inkubace s lektinem probíhala přes noc v lednici ve vlhké komůrce.

Po inkubaci byly preparáty opláchnuty fyziologickým roztokem. Do každého kolečka bylo poté přidáno 100 μ l Streptavidinu konjugovaného s FITC (ThermoFisher Scientific, USA) ředěného v poměru 1:300 ve fyziologickém roztoku. Takto byly preparáty ponechány inkubovat 30 minut v temnu. Poté byly znovu opláchnuty fyziologickým roztokem.

Do levých koleček bylo poté napipetováno 100 μ l PNA lektinu konjugovaného s rhodaminem (Rhodamin Peanut Agglutinin, Vector Laboratories, USA) ředěného v poměru 1:1000 ve fyziologickém roztoku pro vizualizaci akrozomů. Do pravých koleček bylo

napipetováno 100 μ l čistého fyziologického roztoku. Následovala inkubace po dobu 20 minut a poté opláchnutí fyziologickým roztokem a na závěr i destilovanou vodou. Po osušení bylo do každého kolečka přidáno asi 8 μ l montovacího média s DAPI (VectaShield Antifade Mounting Medium, Vector Laboratories, USA). Preparáty byly přikryty krycím sklíčkem (a případně zalakovány) a vyhodnocovány pomocí fluorescenčního mikroskopu.

4.6.2 Detekce sacharidových struktur na spermích v suspenzi

200 μ l vzorku vzniklého po zpracování z nativního ejakulátu bylo rozpipetováno po 25 μ l do nových mikrozkuvek. Následně byly vzorky stočeny po dobu 5 minut při $280 \times g$. Supernatant byl odstraněn a byly přidány biotinem značené lektiny ředěné 1:100 v Hepes pufru. Následně byly spermie ponechány inkubovat 2 hodiny ve vyhřívané třepačce (TS-100, BioSan, Litva) při teplotě 37 °C. Následovalo stočení v centrifuze na $300 \times g$ po 5 minut. Poté byly vzorky 3 \times promyty v 500 μ l fyziologického roztoku, vždy po dobu 5 minut při $300 \times g$. Po posledním stočení byl odsáto tolik supernatantu, aby ve zkumavce zbylo 100 μ l, ve kterých byla peletka spermii rozsuspendována. Tato suspenze byla po 20 μ l napipetována do jednotlivých koleček označených na mikroskopických sklech. Poté byly spermie fixovány přímo na skle 50 μ l vymraženého acetonu s metanolem (poměr 1:1) a ponecháno 5 minut inkubovat. Poté byla sklíčka opláchnuta fyziologickým roztokem. Následně bylo do každého kolečka přidáno 150 μ l blokovacího média SuperBlock (Blocking Buffer in PBS; ThermoFisher Scientific, USA). Poté byly vzorky vloženy do temné vlhké komůrky a ponechány blokovat při 4 °C přes noc.

Po inkubaci byla sklíčka opláchnuta fyziologickým roztokem. Do každého kolečka bylo poté přidáno 100 μ l Streptavidinu konjugovaného s FITC (ThermoFisher Scientific, USA) ředěného v poměru 1:300 ve fyziologickém roztoku. Takto byly vzorky pochoány inkubovat 30 minut v temnu. Poté byly znovu opláchnuty fyziologickým roztokem.

Do levých koleček bylo poté napipetováno 100 μ l PNA lektinu ředěného v poměru 1:1000 ve fyziologickém roztoku pro vizualizaci akrozomů. Do pravých koleček bylo napipetováno 100 μ l čistého fyziologického roztoku, tyto vzorky sloužily jako negativní kontroly. Následovala další inkubace po dobu 20 minut a poté opláchnutí fyziologickým roztokem a na závěr i destilovanou vodou. Po osušení bylo do každého kolečka přidáno asi 8 μ l montovacího média s DAPI (VectaShield Antifade Mounting Medium, Vector Laboratories, USA) pro vizualizaci jader spermii. Vzorky byly přikryty krycím sklíčkem, případně zalakovány pro pozdější hodnocení a připraveny tak pro vyhodnocování pomocí fluorescenčního mikroskopu.

5 Výsledky

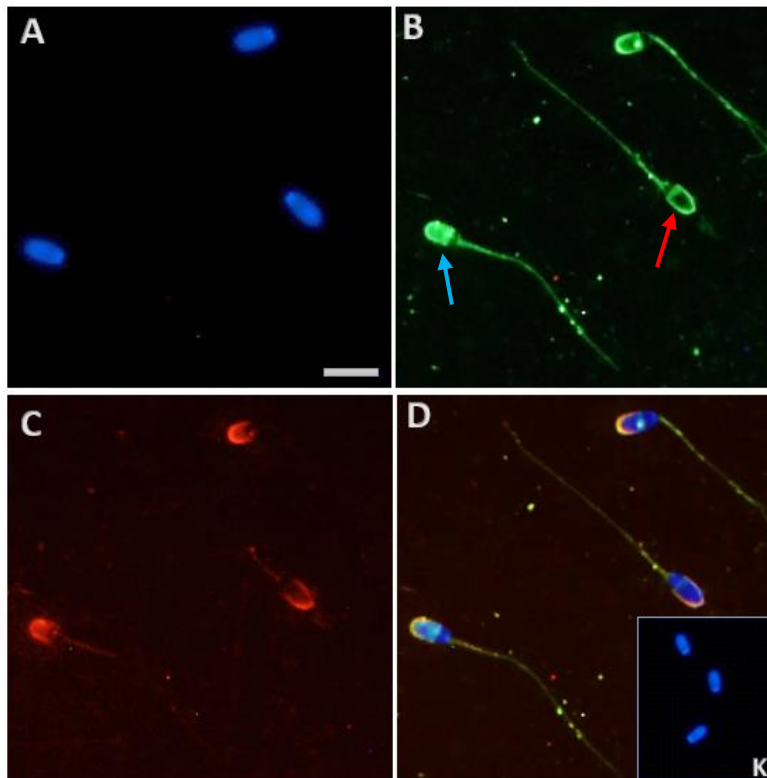
5.1 Lokalizace sacharidových struktur na spermích po fixaci aceton-metanolem

Vizualizace detekce sacharidových struktur na základě vazby biotinylovaných lektinů WGA a sWGA byla provedena pomocí streptavidinu konjugovaného s fluorescenční značkou FITC (zelené značení), akrozomy byly značeny lektinem PNA konjugovaným s rhodaminem (červené značení) a ke značení jader bylo využito DAPI (modré značení) v montovacím médiu. U jednotlivých experimentů byla vždy provedena negativní kontrola bez inkubace s lektinem.

Celkově bylo u tohoto typu fixace napočítáno po 250 spermích ke každému lektinu a byly hodnoceny 3 různé kanci. Protože při vazbě lektinů na spermie po fixaci aceton-metanolem byl signál stabilně přítomný na bičících, byly hodnoceny pouze změny ve vzorech vazby na hlavičce spermí. Byly vyhodnocovány pouze spermie s nepoškozeným akrozomem. Tyto experimenty probíhaly na kancích: Chlor (CH), Jysk (JY), Kuna (KU), Krysa (KR) a Jura (JU).

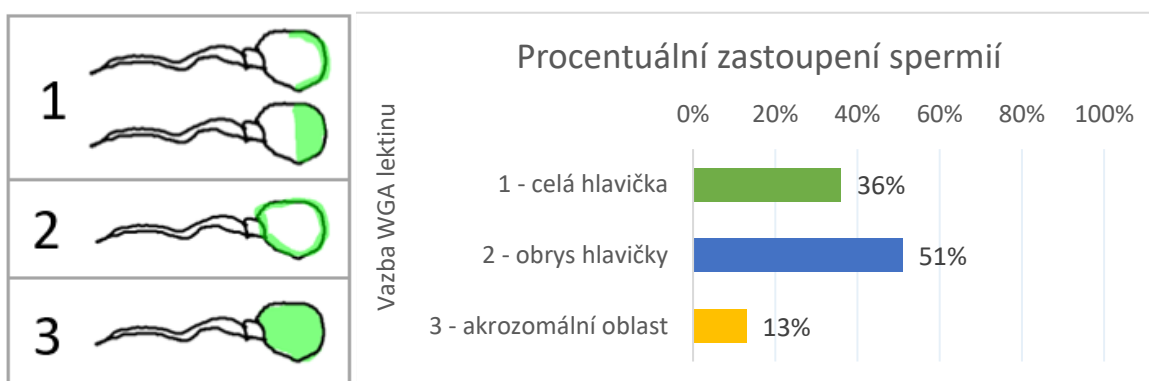
5.1.1 Vazba lektinu WGA

Vzory typické pro vazbu s lektinem WGA při fixaci spermí aceton-metanolem jsou zachyceny na obrázku 6. Detekce signálu byla zaznamenána na bičiku i na hlavičce. Na obrázku lze vidět spermie se signálem po celé hlavičce (modrá šipka) nebo po jejím obvodu (červená šipka), což byly dva nejčastěji nalezené vzory.



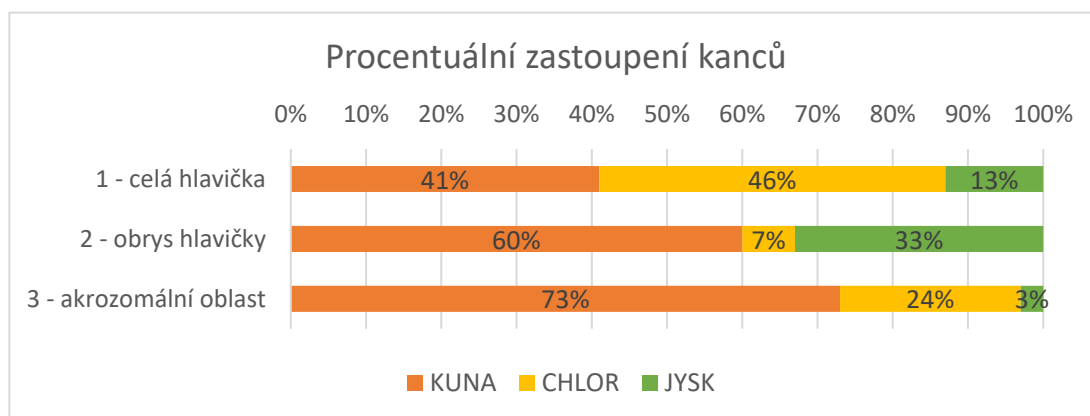
Obr. 6. Detekce multivalentní sialové kyseliny a N-acetylglukosaminu na spermích fixovaných acetonmetanolem: A – DAPI značená jádra (modře), B – pozitivní reakce s WGA lektinem (zeleně), C – PNA značené akrozomy (červeně), D – složený obrázek (DAPI, WGA, PNA), K – negativní kontrola. Zvětšení 400×, měřítko 10 μm. Modrá šipka – signál po celé hlavičce, červená šipka – signál po obrysu hlavičky.

Na obrázku 7 lze vidět procentuální zastoupení jednotlivých vzorů značení WGA lektinu rozpoznávající multivalentní sialové kyseliny a N-acetylglukosamin. Nejvíce zastoupena byla skupina spermí se signálem po obvodu hlavičky (vzor 2), a to 51 %. Další významnou skupinou byly spermie se signálem po celé hlavičce (vzor 1), kdy bylo napočítáno 36 % takto značených spermí. Nejmenší skupina (vzor 3), pouze 13 % spermí, byla detekována vazba WGA lektinu pouze v oblasti akrozomu.



Obr. 7. Porovnání celkového procentuálního zastoupení jednotlivých vzorů při vazbě WGA lektinu na spermie fixované acetonmetanolem.

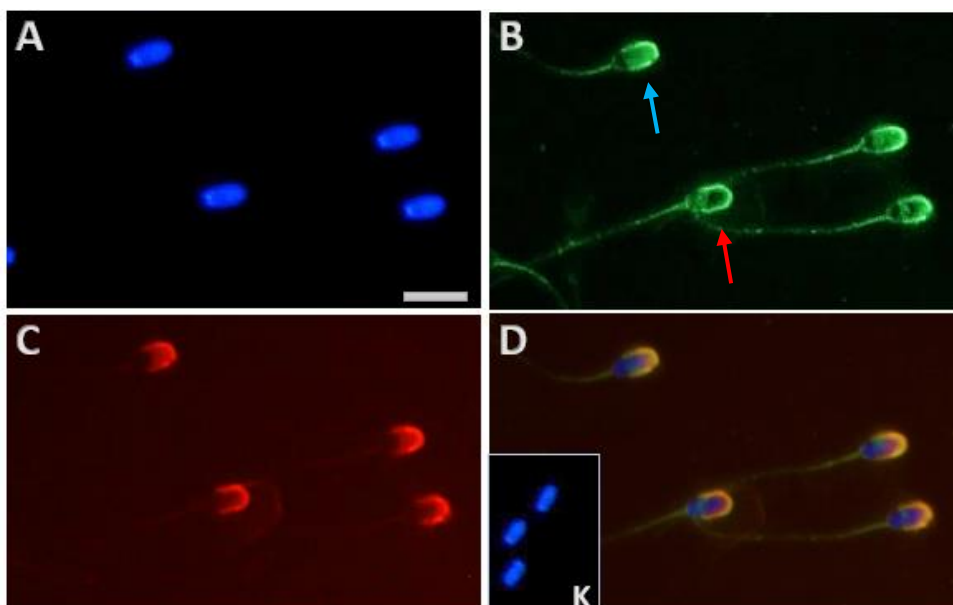
Obrázek 8 představuje procentuální podíl jednotlivých kanců na celkovém zastoupení vzorů vazby WGA lektinu na ejakulovaných spermích. Signál po celé hlavičce spermíí byl nejvíce zastoupen na spermích kance CH a představoval 46 % z celkového podílu značených spermíí. 41 % představoval u kance KU a nejméně, 13 %, na spermích kance JY. Obrys hlavičky spermíí byl nejvíce značen WGA lektinem v případě kance KU, představoval 60 % všech spermíí s tímto signálem. Ze 33 % byl zastoupen u kance JY. Nejmenší podíl měl v tomto případě kanec CH pouze se 7 %. Signál WGA lektinu v akrozomální oblasti byl ze 73 % zastoupen kancem KU, z 24 % se na něm podílel kanec CH a pouze ze 3 % kanec JY.



Obr. 8. Procentuální podíl jednotlivých kanců na celkovém zastoupení vzorů vazby WGA lektinu na fixované ejakulované spermie.

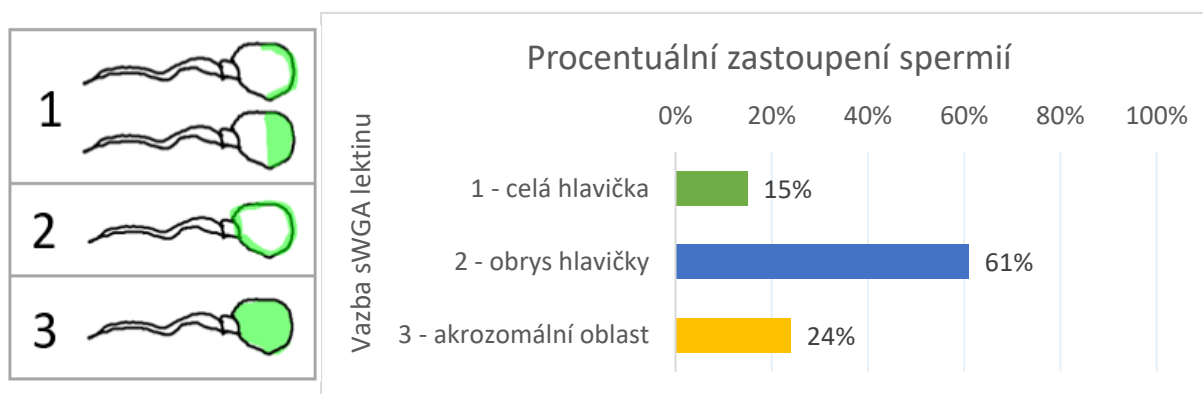
5.1.2 Vazba lektinu sWGA

Vzory typické pro vazbu s lektinem sWGA při fixaci spermíí aceton-metanolem jsou zachyceny na obrázku 9. Detekce signálu byla zaznamenána na bičíku i na hlavičce spermíí. Na obrázku lze vidět spermie se signálem po celé hlavičce (modrá šipka) nebo po jejím obvodu (červená šipka), což byly nejméně a nejvíce zastoupené vzory značení sWGA.



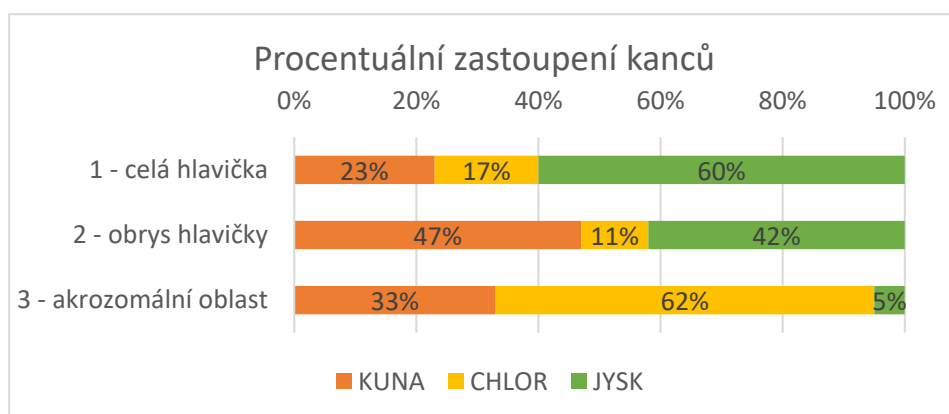
Obr. 9. Detekce N-acetylglukosaminu na spermiích fixovaných aceton-metanolem: A – DAPI značená jádra (modře), B – pozitivní reakce s sWGA lektinem (zeleně), C – PNA značené akrozomy (červeně), D – složený obrázek (DAPI, sWGA, PNA), K – negativní kontrola. Zvětšení 400×, měřítko 10 μm. Modrá šipka – signál po celé hlavičce, červená šipka – signál po obrysu hlavičky.

Na obrázku 10 lze vidět procentuální zastoupení jednotlivých vzorů vazby lektinu sWGA rozpoznávajícího N-acetylglukosamin na kančí ejakulované spermie. Nejvíce byla zastoupena (61 %) skupina spermií se signálem po obvodu hlavičky (vzor 2). S 24 % byly druhou největší skupinou (vzor 3) spermie se signálem v oblasti akrozomu. O něco méně bylo spermií se značením sWGA po celé hlavičce (vzor 1), a to 15 % spermií.



Obr. 10. Porovnání celkového procentuálního zastoupení jednotlivých vzorů při vazbě sWGA lektinu na spermie fixované aceton-metanolem.

Obrázek 11 představuje v procentech vyjádřený podíl jednotlivých kanců na celkovém zastoupení vzorů vazby sWGA lektinu na ejakulovaných spermích. Signál po celé hlavičce spermíí byl nejvíce zastoupen spermii kance JY, které představovaly 60 % z celkového podílu. 23 % představovaly spermie kance KU a nejméně, 17 %, kance CH. Signál na obryse hlavičky byl ze 47 % zastoupen kancem KU, což byla největší část všech spermíí s tímto vzorem. Z 42 % se podílel kanec JY a pouze z 11 % kanec CH. Na signálu z akrozomální oblasti se nejvíce podílel kanec CH, představoval 62 % všech spermíí s tímto signálem. 33 % představovaly spermie kance KU. Nejmenší podíl měl kanec JY, pouze se 5 %.



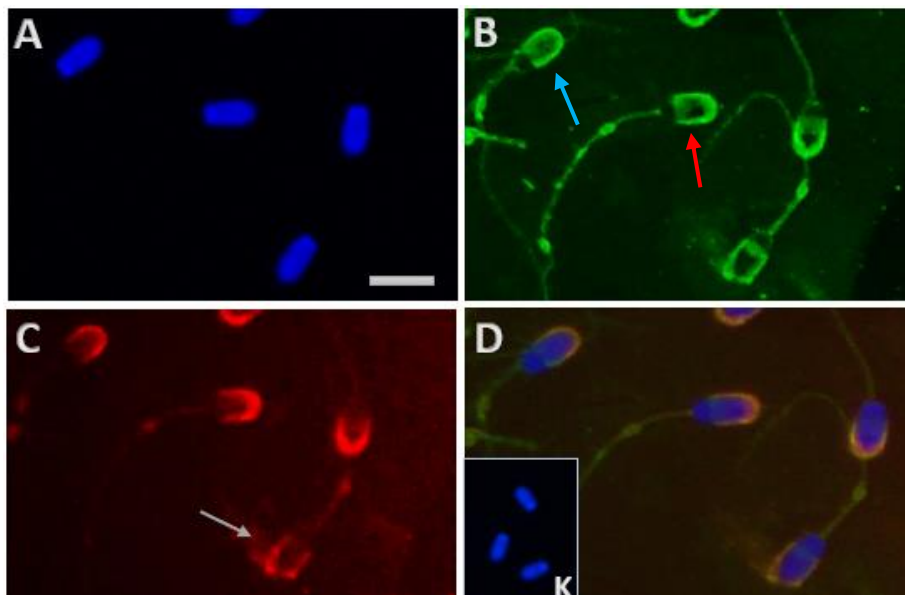
Obr. 11. Procentuální podíl jednotlivých kanců na celkovém zastoupení vzorů vazby sWGA lektinu na fixované ejakulované spermie.

5.2 Loalizace sacharidových struktur na spermích v suspenzi

V těchto experimentech, kdy byl přidáván lektin přímo k suspenzi spermíí a nedošlo k permeabilizaci membrány buněk fixativem, bylo pro každý lektin napočítáno vždy 500 spermíí. Během hodnocení byly vyřazeny spermie, které měly poškozený akrozom. Protože i v suspenzi byl signál stabilně přítomný na bičících, byly hodnoceny pouze změny ve vazbě lektinů na hlavičkách spermíí.

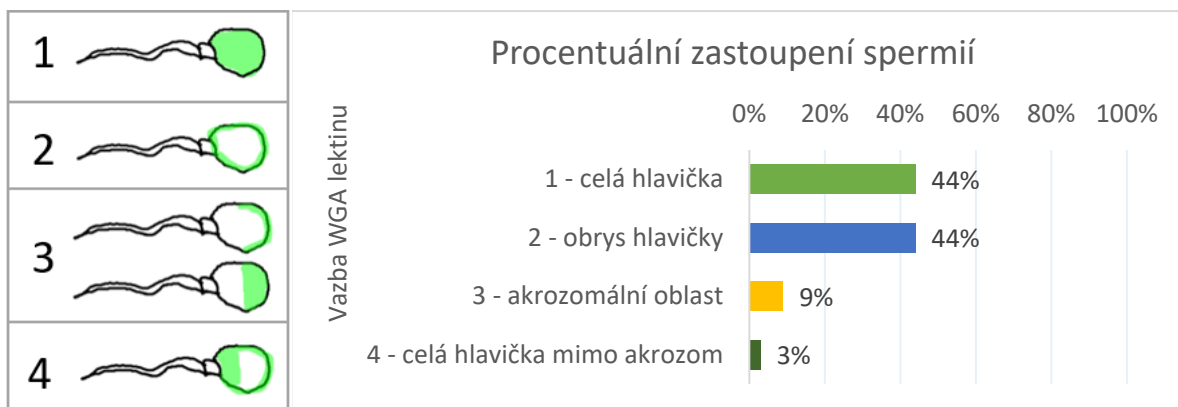
5.2.1 Vazba lektinu WGA

Vzory typické pro vazbu s lektinem WGA v suspenzi spermií jsou zachyceny na obrázku 12. Detekce signálu byla zaznamenána na bičíku i na hlavičce. Na obrázku lze vidět nejčastěji se objevující se vzory, tedy spermie se signálem po celé hlavičce (modrá šipka) nebo po jejím obvodu (červená šipka).



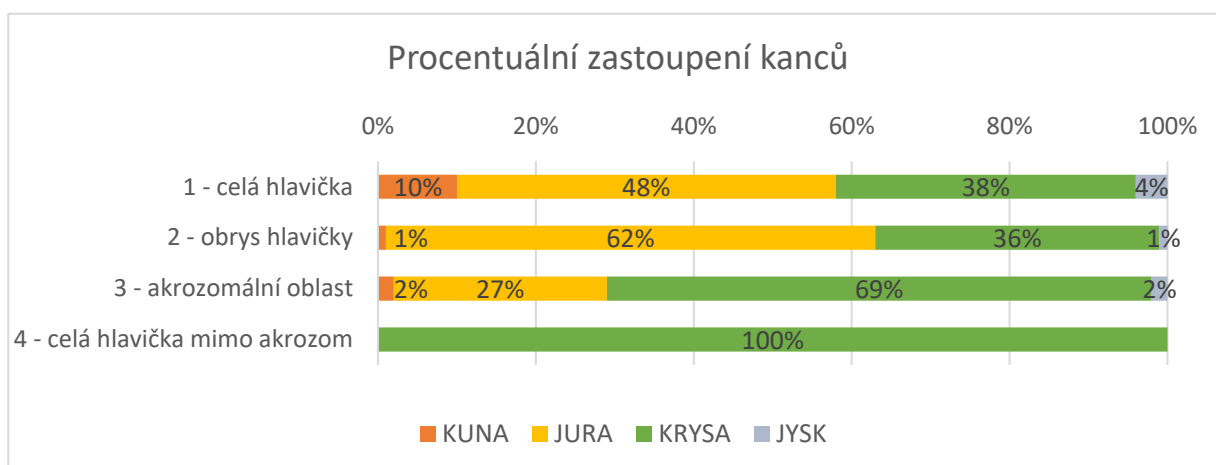
Obr. 12. Detekce multivalentní sialové kyseliny a *N*-acetylglukosaminu v suspenzi spermií: A – DAPI značená jádra (modře), B – pozitivní reakce s WGA lektinem (zeleně), C – PNA značené akrozomy (červeně), D – složený obrázek (DAPI, WGA, PNA), K – negativní kontrola. Zvětšení 400 \times , měřítko 10 μ m. Šedá šipka – poškozený akrozom, modrá šipka – signál po celé hlavičce, červená šipka – signál po obrysu hlavičky.

Na obrázku 13 lze vidět procentuální zastoupení jednotlivých vzorů ve vazbě lektinu WGA na kančí ejakulované spermie. Se stejným zastoupením 44 % byly dvě skupiny. První skupinou byly spermie se signálem po celé hlavičce (vzor 1) a druhou spermie se signálem po jejím obvodu (vzor 2). 9 % spermií bylo se signálem v oblasti akrozomu (vzor 3). Na rozdíl od spermií fixovaných aceton metanolem se objevoval i další vzor, na kterém chyběl signál v oblasti akrozomu (vzor 4). Do této skupiny byla zařazena 3 % spermií.



Obr. 13. Porovnání celkového procentuálního zastoupení jednotlivých vzorů při vazbě WGA lektinu na spermie v suspenzi.

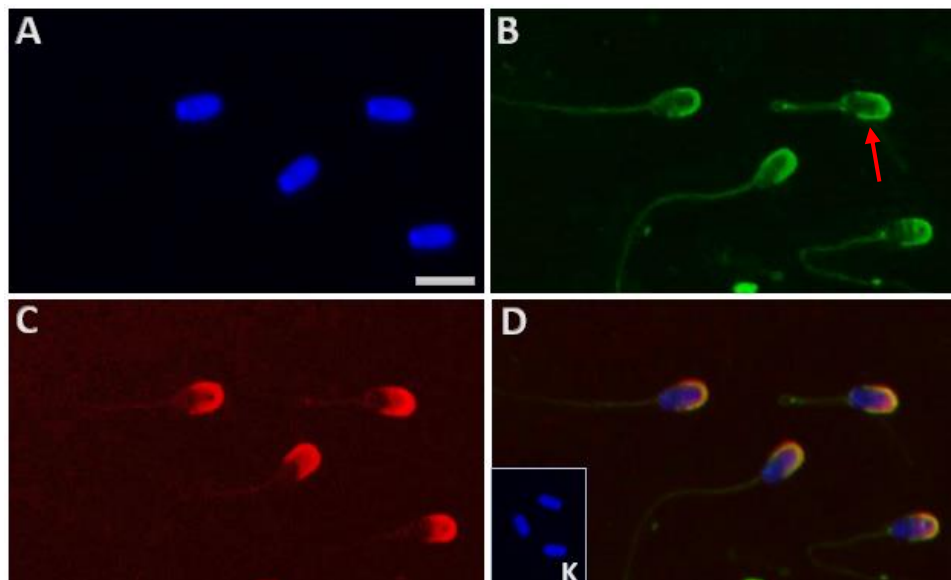
Obrázek 14 představuje procentuální zastoupení jednotlivých kanců na celkovém zastoupení vzorů při vazbě WGA lektinu v suspenzi spermií. Na celkovém zastoupení signálu po celé hlavičce se 48 % podílely spermie kance JU, 38 % kance KR. Nejméně byl tento vzor zastoupen na spermích kance KU, jehož spermie představovaly 10 % a u kance JY zastupovaly pouze 4 %. Na obryse hlavičky měl největší podíl kanec JU, představoval 62 % spermií s tímto vzorem. 36 % bylo zastoupeno kancem KR. Po 1 % byli zastoupeni kanci KU a JY. Ti se nejméně podíleli i na spermích se signálem v akrozomální oblasti. Každý zastupoval 2 %. Naopak nejvíce spermií s tímto vzorem bylo napočítáno u kance KR, který představoval 62 % v této skupině. Signál po celé hlavičce mimo akrozomální oblast byl nalezen pouze u spermií kance KR.



Obr. 14. Procentuální podíl jednotlivých kanců na celkovém zastoupení vzorů vazby WGA lektinu na spermích v suspenzi.

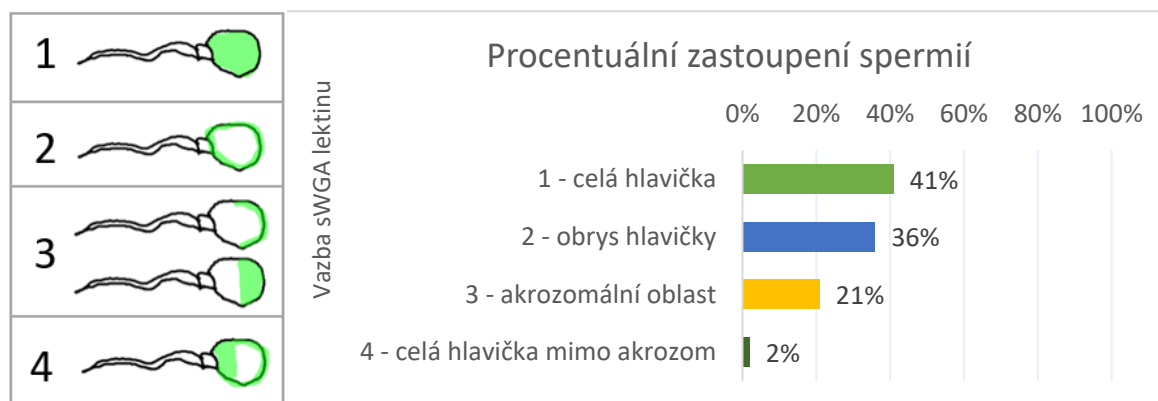
5.2.2 Vazba lektinu sWGA

Vzory typické pro vazbu s lektinem sWGA v suspenzi spermií jsou zachyceny na obrázku 15. Detekce signálu byla zaznamenána na bičíku i na hlavičce. Na obrázku lze vidět spermie se signálem po obvodu hlavičky, což byl druhý nejčastěji nalezený typ vazby.



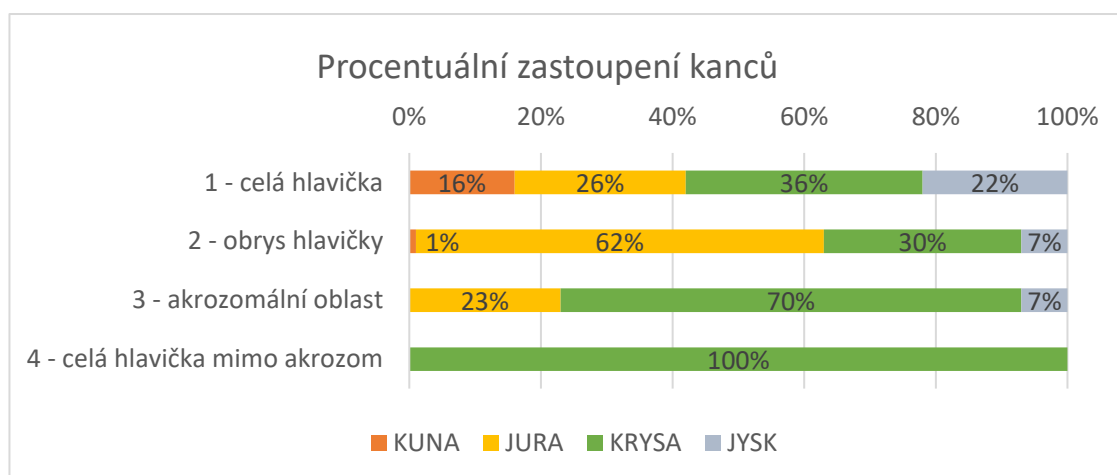
Obr. 15. Detekce N-acetylglukosaminu v suspenzi spermií: A – DAPI značená jádra (modře), B – pozitivní reakce s sWGA lektinem (zeleně), C – PNA značené akrozomy (červeně), D – složený obrázek (DAPI, WGA, PNA), K – negativní kontrola. Zvětšení 400×, měřítko 10 μm. Červená šipka – signál po obrysu hlavičky.

Na obrázku 16 lze vidět procentuální zastoupení jednotlivých vzorů vazby lektinu sWGA na kančí ejakulované spermie. Největší skupinou byly spermie se signálem po celé hlavičce spermie (vzor 1), bylo jich 41 %. O něco méně, 36 %, bylo spermií se signálem po obvodu hlavičky (vzor 2). Další skupinou byly spermie se signálem vazby lektinu sWGA v oblasti akrozomu (vzor 3), takových bylo 21 %. Následovala nejmenší skupina se 2% zastoupením, byly to spermie se signálem mimo oblast akrozomu (vzor 4).



Obr. 16. Porovnání celkového procentuálního zastoupení jednotlivých vzorů při vazbě sWGA lektinu na spermie v suspenzi.

Obrázek 17 představuje v procentech vyjádřený podíl jednotlivých kanců na celkovém zastoupení vzorů vazby sWGA lektinu na spermiu v suspenzi. Signál po celé hlavičce byl 36 % zastoupen spermiemi kance KR. 26 % se podílely spermie kance JU, 22 % kance JY. Nejmenší podíl, 16 %, představoval kanec KU. Podílem 70 % se na signále v akrozomální části podílely spermie kance KR. 23 % všech napočítaných spermií s tímto signálem představoval kanec JU. Kanec JY představoval 7 % a u kance KU nebyly spermie s tímto vzorem vazby nalezeny vůbec. Čtvrtý vzor, který představoval spermie se signálem po celé hlavičce mimo akrozomální oblasti byl nalezen pouze u kance KR.



Obr. 17. Procentuální podíl jednotlivých kanců na celkovém zastoupení vzorů vazby sWGA lektinu na spermiu v suspenzi.

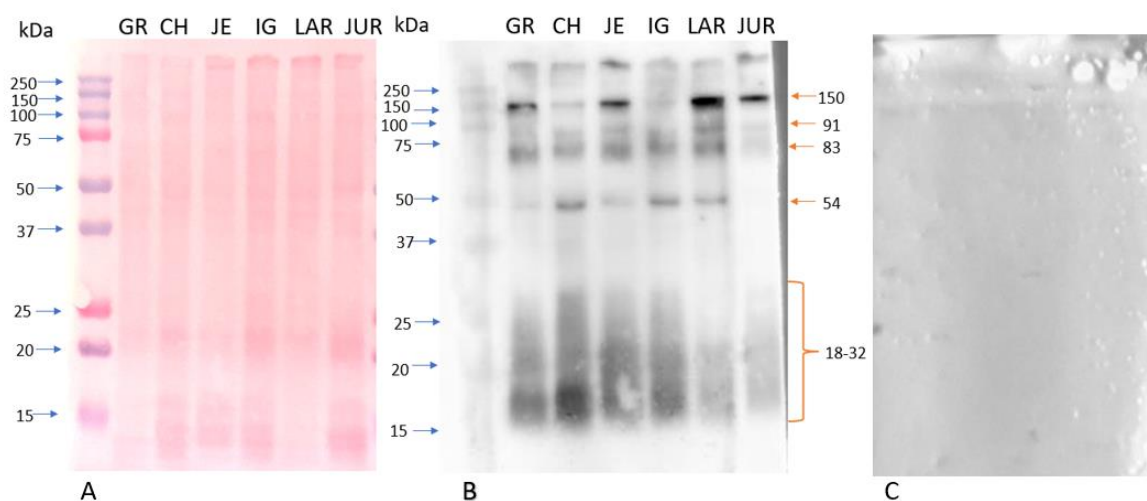
5.3 Vazba lektinů na glykoproteiny v lyzátech ejakulovaných spermií

Detekce proteinů spermií z nativních ejakulátů byla provedena pomocí SDS-elektroforézy. Při izolaci povrchových proteinů byl gel po elektroforetickém rozdělení vzorků spermií za účelem vizualizace proteinů obarven. Dále byly proteiny přeneseny na membránu, k čemuž byla využita metoda Western blot. Na proteiny na nitrocelulóзовé membráně poté proběhla vazba lektinů. U jednotlivých experimentů byla vždy provedena negativní kontrola bez inkubace s lektinem. Po další inkubaci s avidinem konjugovaným s křenovou peroxidázou byly membrány vyhodnoceny pomocí stroje Azure c300. Následovala denzitometrická analýza získaných dat. Tyto experimenty probíhaly na kancích: Grál (GR), Chlor (CH), Jeep, (JE), Igor (IG), Larva (LAR), Jura (JUR), Krysa (KR), Kuna (KUN) a Jysk (J).

5.3.1 Detekce glykoproteinů spermií pomocí MAA lektinu

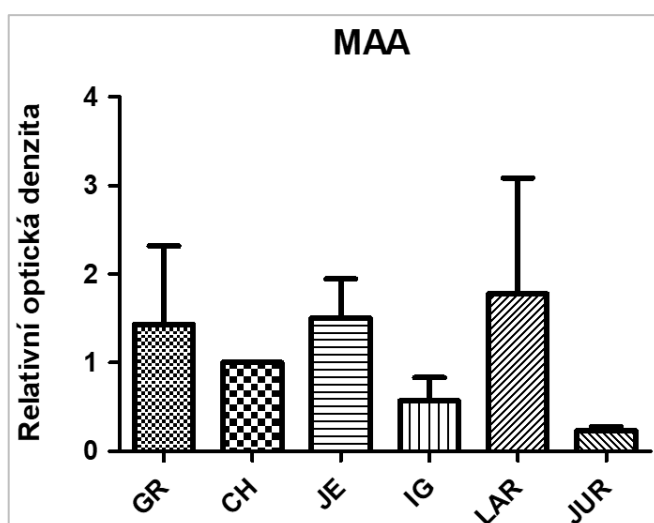
Detekce α -2,3 vázané sialové kyseliny v glykoproteinech spermií byla provedena pomocí lektinu *Maackia amurensis* (MAA). Celkem byly vždy minimálně dvakrát testovány vzorky spermií šest kanců - GR, CH, JE, IG, LAR a JUR. Obrázek 18A ukazuje nitrocelulóзовou membránu barvenou na proteiny. Lze na ní vidět celkovou nanášku proteinů v jednotlivých lyzátech spermií. Obrázek 18B představuje membránu, na které je zaznamenána detekce glykoproteinů pomocí lektinu MAA. Nejvýraznější proužky byly s glykoproteiny o molekulové hmotnosti 150 kDa. Dále se objevily rozlišitelné signály vazby MAA u glykoproteinů

s molekulovými hmotnostmi 91, 83 a 54 kDa. V rozmezí 18-32 kDa byla detekována skupina glykoproteinů, mezi kterými se neobjevily jasně rozlišitelné proužky. Provedená kontrola bez lektinů byla negativní (obr. 18C).



Obr. 18. Detekce sialových kyselin v lyzátech kančích ejakulovaných spermii. A – nitrocelulózová membrána s celkovou nanáškou, B – membrána s glykoproteiny detekovanými pomocí biotnylovaného lektinu MAA, C – negativní kontrola; GR, CH, JE, IG, LAR, JUR označuje lyzáty spermii od různých kanců.

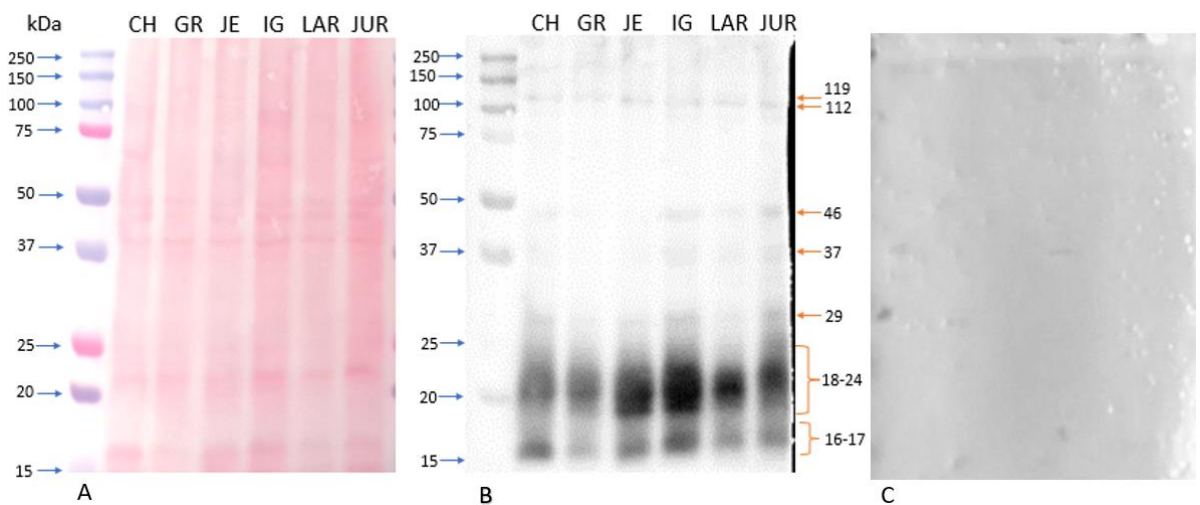
Na obrázku 19 lze vidět graf s výsledky denzitometrické analýzy. Ta byla použita k vyhodnocení síly signálu vazby lektinu MAA na glykoproteiny spermii jednotlivých kanců. U tohoto lektinu byly nejnižší průměrné hodnoty signálu u kance JUR, nejvyšší pak u kance LAR. V rámci experimentu byly výsledky vztahovány ke kanci CH. Po statistickém vyhodnocení bylo zjištěno, že při vazbě lektinu MAA nebyl mezi jednotlivými kanci u poměru síly signálu a celkové nanášky proteinů zjištěn statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$).



Obr. 19. Průměr intenzity signálu lektinu MAA ($n=4$) s vazbou na α -2,6 vázanou sialovou kyselinu v glykoproteinech kančích spermii. Výsledky vztaheny ke kanci CH. V grafu jsou vyznačeny \pm SEM. Mezi kanci nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p = 0,2554$).

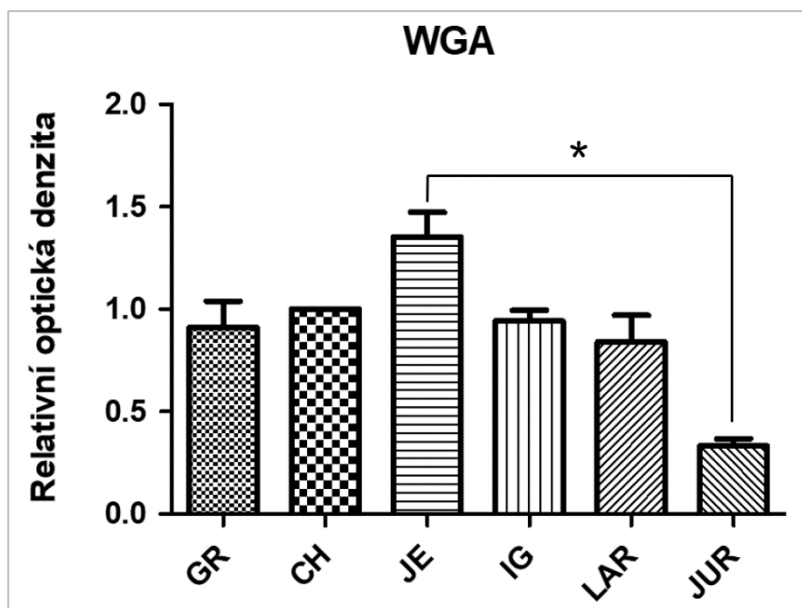
5.3.2 Detekce glykoproteinů spermií pomocí WGA lektinu

Detekce sialové kyseliny v multivalentní vazbě zároveň s N-acetylglukosaminem byla provedena pomocí lektinu *Triticum vulgaris* (WGA). Provedena byla alespoň dvakrát na vzorkách spermií šesti kanců - CH, GR, JE, IG, LAR a JUR. Obrázek 20A představuje nitrocelulózovou membránu barvenou na proteiny. Lze na ní vidět celkovou nanášku proteinů ve vzorkách. Na obrázku 20B je zobrazena reprezentativní membrána, na které jsou vidět glykoproteiny detekované pomocí lektinu WGA. Slabé proužky značící glykoproteiny byly u všech kanců v různé intenzitě zaznamenány v molekulové hmotnosti 112 a 119 kDa. V lyzátech většiny kanců byly zaznamenány glykoproteiny o molekulové hmotnosti 46 a 37 kDa. Ve spermiích všech kanců byl detekován proužek o 29 kDa a skupina glykoproteinů o molekulových hmotnostech v rozmezí 18-24 kDa a 16-17 kDa. Provedená kontrola bez lektinu byla negativní (obr. 20C).



Obr. 20. Detekce sialové kyseliny v multivalentní vazbě a N-acetylglukosaminu v lyzátech kančích ejakulovaných spermií. A – nitrocelulózová membrána s celkovou nanáškou, B – membrána s glykoproteiny detekovanými pomocí lektinu WGA, C – negativní kontrola; CH, GR, JE, IG, LAR, JUR označuje lyzáty spermií od různých kanců.

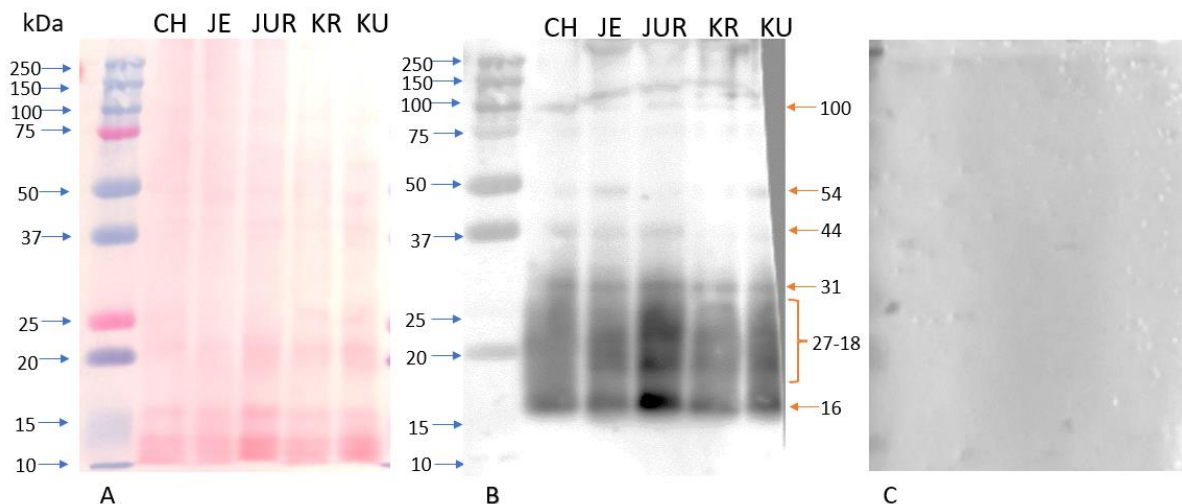
Denzitometrická analýza byla provedena také pro vazbu lektinu WGA na glykoproteiny spermií jednotlivých kanců. Výsledná data jsou shrnuta v grafu (obr. 21). Výsledky se i v tomto experimentu vztahovaly ke kanci CH. Nejnížší průměrné hodnoty signálu byly u kance JUR. Nejvyšší u kance JE a ostatní hodnoty byly podobné kanci CH. Po vyhodnocení se ukázal statisticky významný rozdíl mezi kanci LAR a JUR ($p < 0,05$).



Obr. 21. Průměr intenzity signálu lektinu WGA ($n=5$) s vazbou na multivalentní vázanou sialovou kyselinu a N-acetylglukosamin. Výsledky vztaheny ke kanci CH. V grafu jsou vyznačeny \pm SEM. Statisticky významný rozdíl mezi kanci JE a JUR ($p = 0,05$).

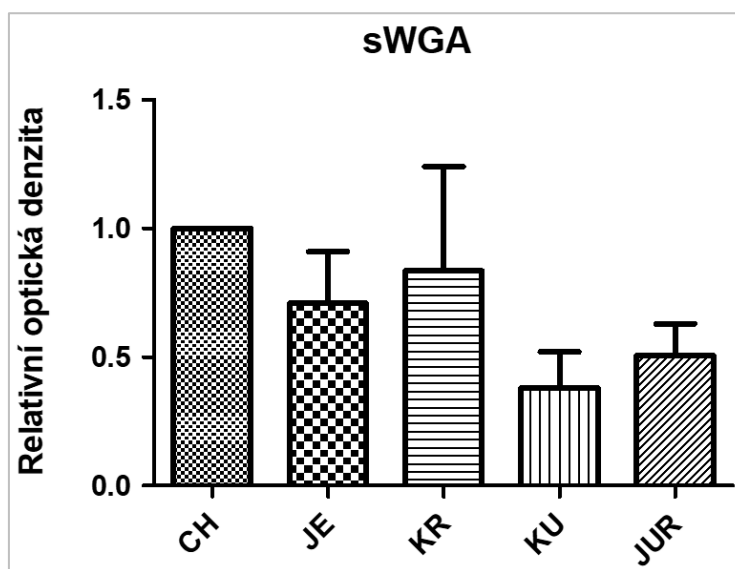
5.3.3 Detekce glykoproteinů spermií pomocí sWGA lektinu

Detekce N-acetylglukosaminu v glykoproteinech spermií byla provedena vždy čtyřikrát na vzorcích celkem od pěti kanců - CH, JE, JUR, KR, KUN. Bylo při ní využito lektinu sWGA a vedla k následujícím výsledkům. Obrázek 22A ukazuje nitrocelulózovou membránu barvenou na proteiny. Lze na ní vidět celkovou nanášku proteinů v jednotlivých lyzátech spermií. Obrázek 22B představuje reprezentativní membránu, na které lze vidět glykoproteiny detekované pomocí lektinu WGA. Velmi slabý proužek se u vzorků spermií všech kanců objevil v úrovni 100 kDa. Další rozlišitelné signály vazby sWGA byly zaznamenány u glykoproteinů s molekulovými hmotnostmi 54, 44 a 31 kDa. V rozmezí 27-18 kDa byla detekována skupina glykoproteinů, ve které se neobjevovaly jasně rozlišitelné proužky. Nejmenší detekované glykoproteiny byly o molekulové hmotnosti 16 kDa. Kontrola provedená bez lektinů byla negativní (obr. 22C).



Obr. 22. Detekce *N*-acetylglukosaminu v lyzátech kančích ejakulovaných spermii. A – nitrocelulázová membrána s celkovou nanáškou, B – membrána s glykoproteiny detekovanými pomocí lektinu sWGA, C – negativní kontrola; CH, JE, KUR, KR, KU označuje lyzáty spermii od různých kanců.

Na obrázku 23 lze vidět výsledky denzitometrické analýzy v intenzitě signálu vazby lektinu sWGA na glykoproteiny vybraných kanců. Výsledky byly opět vztaženy ke kanci CH, který zároveň měl i nejvyšší průměrné hodnoty signálu. Nejnižší hodnoty byly zaznamenány u kance KU. U všech ostatních kanců byly hodnoty relativní optické denzity mezi těmito hodnotami. Po statistickém vyhodnocení bylo zjištěno, že při vazbě lektinu sWGA na lyzáty spermii nebyl mezi jednotlivými kanci u poměru síly signálu a celkové nanášky proteinů zjištěn signifikantní rozdíl ($p > 0,05$).

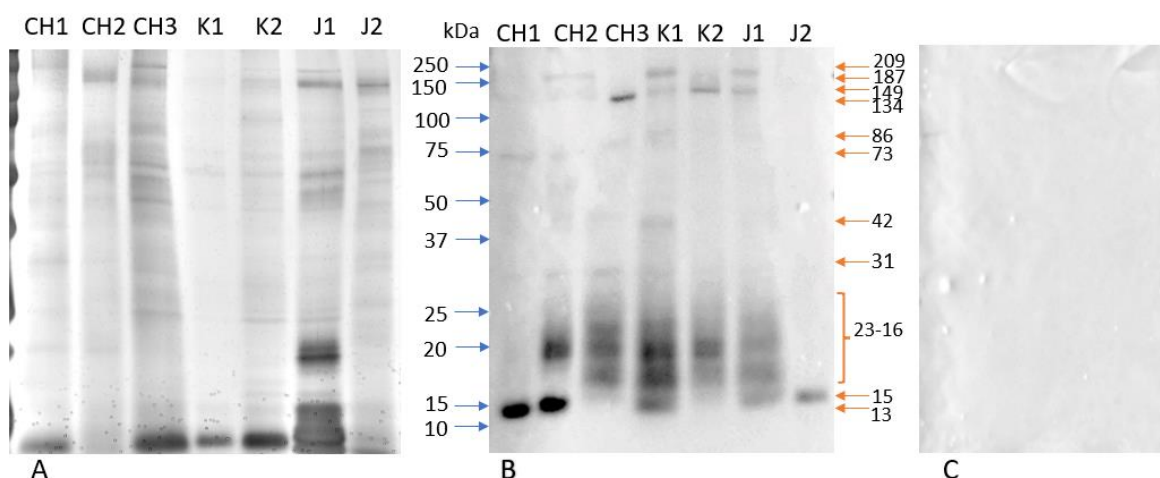


Obr. 23. Průměr intenzity signálu lektinu sWGA ($n=4$) s vazbou na *N*-acetylglukosamin v lyzátech spermii. Výsledky vztaženy ke kanci CH. V grafu jsou vyznačeny \pm SEM. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p = 0,3978$).

5.3.4 Detekce povrchových glykoproteinů spermií pomocí WGA lektinu

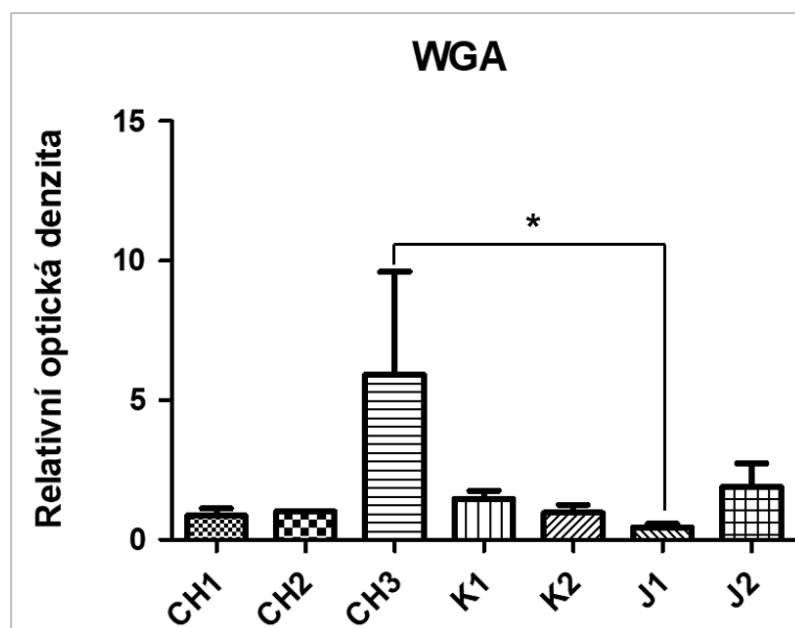
Detekce multivalentní sialové kyseliny a N-acetylglukosaminu provedená pomocí lektinu *Triticum vulgare* (WGA) vedla k následujícím výsledkům. Obrázek 24A ukazuje gel s celkovou nanáškou povrchových proteinů spermií barvených stříbrem. Obr. 24B představuje reprezentativní membránu, na které lze vidět povrchové glykoproteiny detekované pomocí lektinu WGA. Vzorky byly odebrány celkem od tří kanců, na obrázku značení písmeny CH, K a J (JUR). Číslo za každým z písmen označuje vzorky získané v odlišných dnech během doby testování. Účinnost izolace proteinů byla oproti té v lyzátech spermií odlišná. Probíhala pouze izolace povrchových proteinů spermie, v lyzátech spermií bylo detekováno celkové proteinové složení.

U vzorků K1 a J1 byl přítomný proužek značící glykoproteiny o velikosti 209 kDa. U vzorku CH2 dále proužek o molekulové hmotnosti 187 kDa. U vzorků CH3 a K1 byl dále proužek značící velikost 86 kDa. U vzorků CH1 a CH2, tedy jen u jednoho kance byly přítomny glykoproteiny o velikosti 73 kDa. Proužek na úrovni 42 kDa se objevil u kanců CH3 a K1. Mezi všemi kanci byl detekován sdílený proužek, který představoval glykoproteiny o velikosti 31 kDa. Neobjevil se pouze ve vzorku J2. Dále se u všech vzorků kromě CH1 a J2 objevovala skupina glykoproteinů o molekulových vahách 23-16 kDa. U vzorku J2 byl přítomen jediný detekovaný proužek značící glykoproteiny o velikosti 15 kDa. O této velikosti se vyskytovaly proteiny i u vzorků K1 a J1. Glykoproteiny s nejnižší molekulovou vahou, asi kolem 13 kDa, se objevily u vzorků CH1 a CH2. Provedená kontrola bez lektinů byla negativní (obr. 24C).



Obr. 24. Detekce sialové kyseliny v multivalentní vazbě a N-acetylglukosaminu v extraktech povrchových proteinů kančí ejakulované spermie. A – gel barvený stříbrem s celkovou nanáškou, B – membrána s glykoproteiny detekovanými pomocí lektinu WGA, C – negativní kontrola.

Výsledky denzitometrické analýzy intenzity signálu vazby WGA lektinu na povrchové glykoproteiny spermií vybraných kanců lze vidět na obrázku 25. Výsledky jsou vztaženy ke kanci CH2. Nejnižší průměrné hodnoty byly zaznamenány u kance J, při experimentu 1 (J). CH3 se průměrnou hodnotou, která byla v tomto měření nejvyšší, nejvíce odlišoval od všech ostatních. Zbytek se pohyboval v hodnotách kolem hodnot kance CH2. Statistickým hodnocením bylo zjištěno, že při vazbě lektinu na povrchové glykoproteiny byl signifikantní rozdíl mezi kanci CH3 a J1.

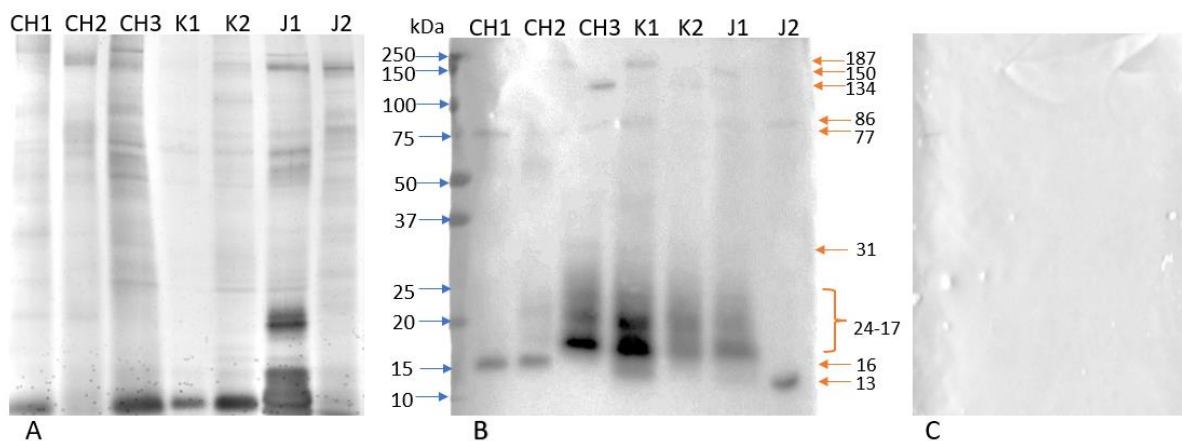


Obr. 25. Průměr intenzity signálu lektinu WGA ($n=3$) s vazbou na *N*-acetylglukosamin na povrchové glykoproteiny spermií. Výsledky vztaženy ke kanci CH2. V grafu jsou vyznačeny \pm SEM. Statisticky významný rozdíl mezi kanci CH3 a J1 ($p=0,0461$).

5.3.5 Detekce povrchových glykoproteinů spermií pomocí sWGA lektinu

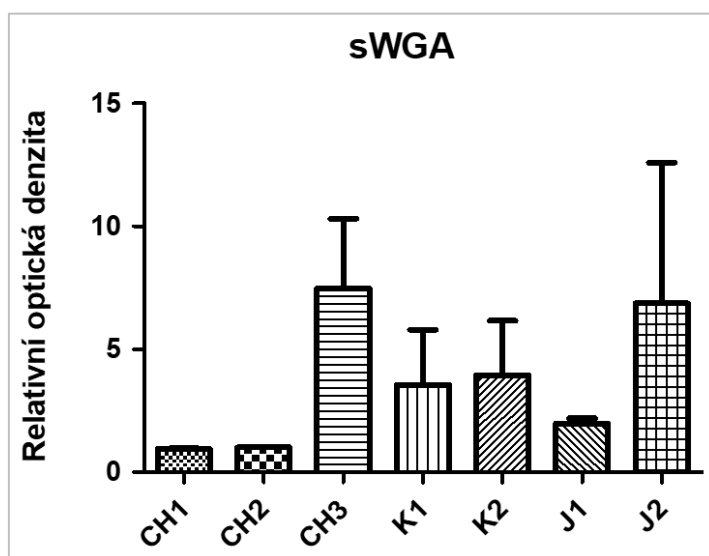
Detekce *N*-acetylglukosaminu byla provedena i pomocí lektinu sWGA a byly získány následující výsledky. Obrázek 26A ukazuje gel s celkovou nanáškou povrchových proteinů spermií barvených stříbrem. Na obrázku 26B lze vidět membránu, na které je zachycena detekce povrchových glykoproteinů. Vzorky byly odebrány od celkem tří kanců, na obrázku značení písmeny CH, K a J (JUR). Číslo za každým z písmen označuje vzorky získané v odlišných dnech během doby testování.

Stejně jako při detekci pomocí WGA lektinu, i zde se u CH2, spolu s K1, objevil proužek značící glykoproteiny o molekulové váze 187 kDa. O velmi podobné velikosti 150 kDa, v porovnání s WGA (149 kDa), se objevil i proužek u vzorku J1. Stejně tak se také u vzorků CH3 a K1 objevily glykoproteiny o 134 kDa. Dále byly u všech kanců, konkrétně CH3, K1, J1 a J2, přítomny glykoproteiny o molekulové váze 86 kDa, tato hodnota se vyskytovala i při vazbě lektinu WGA. Proužek na úrovni 77 kDa byl zaznamenán jen u jednoho vzorku – CH1. Glykoproteiny o velikosti 31 kDa, které byly při vazbě WGA přítomné u všech kanců, byly nyní pouze u dvou vzorků, a to u CH3 a K1. Dále se u všech vzorků mimo J2 vyskytovaly glykoproteiny v hodnotách mezi 24-17 kDa. Na úrovni 16 kDa byly nalezen proužky u vzorků CH 1, CH2, K1 a J1. Nejnižší detekované glykoproteiny se objevily u vzorku J2, jejich velikost odpovídala přibližně 13 kDa. Provedená kontrola bez lektinů byla negativní (obr. 26C).



Obr. 26. Detekce *N*-acetylglukosaminu v extraktech povrchých proteinů kančí ejakulované spermie. A – gel barvený stříbrem s celkovou nanáškou, B – membrána s glykoproteiny detekovanými pomocí lektinu *s*WGA, C – negativní kontrola.

Na obrázku 27 lze vidět výsledky denzitometrické analýzy v intenzitě signálu vazby lektinu *s*WGA na povrchové glykoproteiny vybraných kanců. Výsledky byly vztaženy ke kanci CH2, který představoval druhou nejnižší hodnotu. Kanec CH zastupoval dvě nejnižší hodnoty (CH1,2), zároveň však i tu nejvyšší (CH3). Kanec K měl hodnoty vyrovnané. U kance J byl rozdíl mezi průměrnými hodnotami větší. Statistické hodnocení neprokázalo žádný statisticky významný rozdíl ($p=0,1773$).



Obr. 27. Průměr intenzity signálu lektinu *WGA* ($n=3$) s vazbou na *N*-acetylglukosamin na povrchové glykoproteiny spermii. Výsledky vztaženy ke kanci CH2. V grafu jsou vyznačeny \pm SEM. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p= 0,1773$).

6 Diskuze

Během dozrávání spermií dochází k přestavbě jejich plazmatické membrány, což vede k dozrávání a získání fertilizační schopnosti spermií. Změnami tak prochází i sacharidové struktury přítomné v glykoproteinech a glykolipidech, které lze detekovat pomocí lektinů, což jsou proteiny schopné specificky se vázat na cukerné zbytky. Možnost detekovat vzory vazby lektinu na glykoproteiny či glykolipidy spermií může pomoci odhalit případné rozdíly v individualitě kanců, případně i změny během maturace u jednoho jedince. Glykoproteiny se v reprodukci podílí na řadě funkcí, přičemž jejich přítomnost je často nezbytná (Schröter et al., 1999; Tecle & Gagneux, 2015). V naší studii jsme k těmto účelům využili celkem dva lektiny. WGA lektin k detekci multivalentní sialové kyseliny a N-acetylglukosaminu a sWGA, který se váže pouze na N-acetylglukosamin. Mimo lokalizaci těchto sacharidových struktur na spermii byla provedena i vazba lektinu na separované glykoproteiny v lyzátech spermií. V těchto experimentech byl využit i lektin MAA se specifickou vazbou na α -2,3 vázanou sialovou kyselinu.

Při lokalizaci sacharidů u lektinu WGA a sWGA proběhly experimenty na spermiiích fixovaných aceton-metanolem, během kterých byly objeveny 3 typy vzorů vazby lektinů a experimenty na spermiiích v suspenzi, u těch byly objeveny 4 vzory.

Oba lektiny se ve fluorescenčních experimentech na fixovaných spermiiích mohou vázat na sacharidové struktury přítomné jak na proteinech, tak lipidech celé buňky, a to jak na jejich povrchu, tak uvnitř. Nejčastěji se vázal na glykanové struktury po obrysu hlavičky, poté po celé hlavičce a nejméně v oblasti akrozomu. Vazba lektinu WGA na spermie značí přítomnost zbytků N-acetylglukosaminu a kyseliny sialové ve spermii. Naše výsledky jsou částečně podpořeny studií Jimenez et al., 2003, ve které došli k závěru, že WGA se u ejakulovaných spermií nejvíce navazoval po obrysu celé spermie. Ve zmíněné studii sledovali změny v distribuci glykanů kančích spermií také po kapacitaci a AR. Naše studie se však zaměřovala pouze na ejakulované spermie před kapacitací a vyhodnocovány byly spermie s neporušeným akrozomem. Při porovnávání individuality mezi kanci je zajímavé, že jeden kanec má nejvíce zastoupený vzor vazby v akrozomální oblasti, u druhého je to naopak nejméně zastoupený vzor.

Na fixovaných spermiiích se lektin sWGA nejčastěji vázal na struktury po obvodu hlavičky, což je stejný výsledek, jako při použití lektinu WGA. Tato vazba ukazuje na detekci N-acetylglukosaminu na povrchu spermií. U vazby sWGA se lišila četnost druhého a třetího vzoru. Druhou největší skupinou byly spermie se signálem detekovaným v oblasti akrozomu a nejméně bylo těch, u kterých se lektin vázal na glykoproteiny v oblasti celé hlavičky. Mezi vazbou WGA a sWGA je pokles v detekovaném signále po celé hlavičce spermie. Vzhledem k ostatním vzorům to naznačuje, že v postakrozomální oblasti by mohly být přítomné struktury se sialovou kyselinou v multivalentní vazbě, které lektin sWGA nedetekoval.

K individualitě kanců je zajímavé, že u spermií jednoho kance převažuje detekce signálu po celé hlavičce (nebyl k dispozici pro denzitometrické vyhodnocení), zatímco u druhého výrazně převažuje detekce v oblasti akrozomu, tento kanec měl také nejvyšší průměrné hodnoty při denzitometrickém vyhodnocení po vazbě lektinu na lyzáty spermií. Třetí kanec měl naopak nejčastěji zastoupen vzor po obrysu hlavičky a měl průměrné hodnoty naopak nejnižší.

Při lokalizaci sacharidových struktur na spermiích v suspenzi byl objeven další, čtvrtý vzor – celá hlavička mimo akrozom. Tento vzor byl však nalezen jen u jednoho kance. Je možné, že tyto spermie byly již částečně kapacitované, a proto nedocházelo k vazbě na akrozomální oblast. Nejčastější vzor vazby lektinu WGA byl vyrovnaně po celé hlavičce a po jejím obryse. Méně spermií bylo se signálem v oblasti akrozomu a nejméně s novým vzorem nalezeným pouze u jednoho kance. Každý kanec měl i jiný nejčastější vzor vazby WGA, tedy odlišnou lokalizaci sacharidových struktur. Studie Desantis et al. (2010) naopak ukázala, že lektin WGA se váže na oblast akrozomu, popřípadě méně nebo vůbec na postakrozomální oblast.

K modifikaci struktur na plazmatické membráně dochází i během průchodu nadvarletem (Tulsiani, 2005). K výsledku, že tomu tak je i u povrchových glykoproteinů, které lze detekovat pomocí WGA došla studie Madhumita et al. (1991) prováděná na spermiích kozla. Oproti naší studii však byla detekce výrazněji v oblasti akrozomu a méně na zbytku spermie. Ve zmíněné práci byl zaznamenán nárůst intenzity fluorescence mezi vzorky z těla a ocasu nadvarlete. I námi detekované glykoproteiny mohou mít tedy původ v nadvarleti.

Za použití lektinu sWGA byl poměr mezi prvními dvěma vzory také téměř vyrovnaný. Nejčastěji se opět objevoval signál po celé hlavičce spermií, jen o něco méně bylo spermií s vazbou po obryse hlavičky. Stejně jako u WGA lektinu následovaly spermie se signálem detekovaným v oblasti akrozomu a nejméně bylo spermií s novým vzorem. Zajímavé je, že u spermií jednoho kance, nebyl nalezen vzor vazby na akrozomální oblast, pouze po celé a po obvodu hlavičky. Při denzitometrickém hodnocení povrchových proteinů měl však vyrovnané hodnoty jako spermie kance, které byly zastoupeny ve všech vzorech.

Při porovnání zastoupení jednotlivých vzorů vazby lektinu na spermie v suspenzi, se odráží individualita kanců. Zastoupení jednotlivých vzorů se u jednotlivých kanců lišilo, bohužel nemohli být testováni všichni kanci na obě metody zároveň.

Kanec, u jehož spermií byl objeven nový vzor, nebyl k dispozici na detekci povrchových proteinů, protože byl v době průběhu experimentu vyrazen chovnou stanicí z plemnitby. Bylo by zajímavé sledovat, zda by se nový vzor projevil při vazbě lektinu na povrchové glykoproteiny spermií jako nový proužek a/nebo jako změna intenzity signálu, protože při detekci povrchových proteinů byla individualita mezi kanci zřetelnější než při použití lyzátů. To by ale mohlo být způsobeno i rozdílnou účinností izolace proteinů v experimentech, která je limitována přístupností biotinylačního činidla (Zigo et al., 2013). Individualitu jedinců by mohl podpořit fakt, že u jednoho z kanců byly objeveny glykoproteiny o relativních molekulových hmotnostech 187, 73 a 13 kDa při vazbě WGA lektinu, které nebyly nalezeny u ostatních, a také, že mezi ním a dalším kancem byl objeven i statisticky významný rozdíl v průměrných hodnotách denzitometrického hodnocení. Kanec, u kterého byly detekovány WGA lektinem další ojedinělé glykoproteiny, naopak bohužel nebyl k dispozici pro hodnocení vzorů vazby pomocí fluorescenční mikroskopie.

Vazba lektinu na glykoproteiny v lyzátech spermií nám umožnila zjistit glykoproteinovou složku spermií, kdy se lektiny navazovaly pouze na glykany proteinů a už ne na glykolipidy nebo volné sacharidové struktury, jako tomu bylo u metod využívajících fluorescenci. Využity byly celkem 3 lektiny. Stejně jako v předchozích experimentech WGA a sWGA a navíc i MAA, který je specifický pro sialovou kyselinu. Při jeho použití bylo detekováno 5 skupin glykoproteinů.

Při použití lektinu WGA byly u všech spermií kanců zaznamenané signály v různé intenzitě. Celkem bylo takto detekováno 7 skupin glykoproteinů. V porovnání s vazbou lektinu MAA se v rozmezí od 37-250 kDa objevovaly rozdíly v detekovaných glykoproteinech, a to jak v přibližných molekulových hmotnostech, tak ve výraznosti proužků. Glykoproteiny větší než 50 kDa v přibližně stejných hodnotách jako v naší studii detekovali pomocí MAA Schöter et al. (1999) na lidských spermiích, nicméně detekce v rozmezí 18-32 kDa byla v této studii negativní, což ukazuje na druhově specifické glykoproteiny na spermiích. Kyselina sialová ve vazbě α -2,3 by tedy mohla být více přítomná na glykoproteinech s vyšší relativní molekulovou hmotností. V rozmezí 18-32 kDa je detekce u obou lektinů zčásti obdobná. Lišila se výrazností proužků, která byla menší u MAA. Lektin WGA navíc značil skupinu proteinů v rozmezí 16-17 kDa. Stejně tak byla nejnižší hodnota 16 kDa i ve studii Kasekarn et al. (2012). Na lyzátech ejakulovaných spermií kance detekovali celkem 9 skupin glykoproteinů v rozmezí 16-77 kDa (sledované rozmezí). Mezi hodnotami 30-70 kDa však detekovali glykoproteiny, které se během naší studie neukázaly. Rozdíly mohou být způsobeny i odlišnou separací proteinů během elektroforetického dělení.

Porovnání vazby lektinů sWGA s WGA ukázalo, že sukcinylovaný lektin detekoval o jednu skupinu glykoproteinů méně – celkem jich detekoval 6. Chybějící skupina byla v oblasti 100 kDa, tyto glykoproteiny měly tedy ve struktuře sialovou kyselinu, ale ne N-acetylglukosamin. sWGA se však výrazněji navazoval na glykoproteiny o 31 kDa, detekované proužky byly více definované a zřetelnější. Naopak skupina proteinů v rozmezí 18-24 kDa byla zřetelnější u lektinu WGA. Mohlo by to být způsobeno tím, že WGA kromě N-acetylglukosaminu detekuje i sialovou kyselinu a tím má možnost se navázat na větší skupinu glykoproteinů. Nejmenší detekované glykoproteiny byly o molekulové hmotnosti 16 kDa, stejně jako při vazbě WGA lektinu.

V naší studii byla provedena i detekce sacharidových struktur v extraktu izolovaných povrchových proteinů spermií. Tato metoda byla provedena pouze na 3 kancích. Pro detekci glykanů byly využity lektiny WGA a sWGA.

Při použití WGA byla naznačena větší míra individuality než při vazbě lektinu v lyzátech spermií. Detekce se lišila nejen mezi jedinci, ale i u stejného kance mezi odběry z různých dní. Individualita mohla být způsobena již zmíněnými důvody, tedy rozdílnou účinností izolace proteinů při použitých metodách. Glykanové struktury také nejsou na rozdíl od proteinů kódované v genomu. Jejich podoba je upravována glykosidázami a transferázami, jejichž aktivita závisí na souboru dostupných donorů nukleotidů a sacharidů (Teclé & Gagneux, 2015). Je tedy možné, že u těchto kanců se tento soubor mírně liší. Glykany jsou navíc dále modifikovány při kontaktu se SP (Teclé & Gagneux, 2015). SP je ovlivňována řadou faktorů. Složení může být obecně přímo ovlivněno např. věkem nebo plemem. Nepřímé faktory podílející se na složení mohou být frekvence ejakulace, způsob odběru, výživa, sezóna nebo tepelný stres, ale i individualita v rámci plemene (Ben Moula & El Amiri 2022). Mimo to je různými faktory dle Schröter et al. (1999) ovlivňována i specifická lektinu, která může být ovlivňována mimo jiné i sekundární nebo terciární strukturou konkrétních glykanů, která může silně zvýšit interakci s odpovídajícím lektinem. Pokud by se tedy již zmíněné soubory glykoproteinů mezi kanci lišily, mohlo by se lišit i množství navázaného lektinu, a proto by některé detekované proužky v lyzátu spermií u jednoho kance mohly být výraznější než u druhého.

Ze SP pochází skupina glykoproteinů spermadheziny, které mají relativní molekulovou váhu 12-16 kDa a navazují se na povrch spermie (Haase et al. 2005; Töpfer-Petersen et al., 2005). Protože během námi provedené detekce sacharidových struktur v extraktu izolovaných povrchových proteinů spermií byly u všech kanců detekovány glykoproteiny mezi těmito hodnotami, mohlo by jít mimo jiné právě i o tyto proteiny, které jsou v kančích spermiích velmi významné (Töpfer-Petersen et al., 1998).

Při detekci vazby lektinu sWGA bylo detekováno celkem 9 (skupin) glykoproteinů. To je o 2 méně než při detekci vazby WGA. Chyběli glykoproteiny o relativních molekulových hmotnostech 209 kDa a 42 kDa. U některých kanců vymizely i další proužky. Tyto glykoproteiny mají tedy pravděpodobně na své struktuře navázanou sialovou kyselinu v multivalentní vazbě.

Jak při detekci v lyzátech spermií, tak při detekci povrchových proteinů při použití lektinu sWGA chyběly glykoproteiny o relativních hmotnostech vyšší než 40 kDa, ve dvou případech ze tří vyšší než 115 kDa. Porovnávat vazbu mezi WGA a sWGA může být zajímavé proto, že pouze WGA značí sialovou kyselinu. Ta hraje roli např. v motilitě spermií nebo při jejich vazbě na ovidukální rezervoár a ZP vajíčka (Kadirvel et al. 2012; Lassalle & Testart 1994). Metody založené na detekci rozdílnosti ve vazbě těchto dvou lektinů by mohly být využité pro další upřesňování glykoproteinů a jejich funkcí během reprodukce.

7 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na detekci sacharidových struktur v glykoproteinovém profilu spermií. Cílem práce byla detekce vybraných sacharidových typů vazeb v glykoproteinech izolovaných ze spermií kanců a jejich porovnání v rámci individuality jedinců.

Glykoproteinové struktury jsme detekovali na spermiích v suspenzi a po fixaci aceton metanolem, přičemž byly použity lektiny WGA (vazba na sialovou kyselinu v multivalentní vazbě, N-acetylglukosamin) a sWGA (vazba na N-acetylglukosamin). Při fixaci spermií aceton-metanolem byly u obou lektinů nalezeny 3 různé vzory jejich vazeb na glykoproteiny na spermiích. Vazba byla buď po celé hlavičce, po jejím obryse nebo jen v akrozomální oblasti. Při použití jak WGA lektinu, tak sWGA, byla nejčastěji zastoupenou skupinou vazba po obrysu hlavičky (51 % WGA, 61 % sWGA). Druhou nejpočetnější skupinou u WGA byla vazba po celé hlavičce (36 %) a nejméně byly zastoupeny spermie se signálem pouze v akrozomální části (13 %). Naproti tomu u sWGA lektinu byly tyto dvě skupiny zastoupeny v opačném poměru, s 24 % byly druhou největší skupinou spermie s vazbou v oblasti akrozomu. Nejméně pak bylo 15 % spermií se signálem po celé hlavičce.

Při lokalizaci sacharidových struktur na spermiích v suspenzi byl k již zmíněným třem vzorům vazby objeven další, a to signál po celé hlavičce mimo akrozomální oblast. Tento typ vazby byl nalezen pouze u jednoho (KR) ze čtyř (KU, JU, KR, JY) testovaných kanců. Použity byly stejné lektiny jako při fixaci aceton-metanolem. U obou lektinů byly nejvíce zastoupeny vzory vazby po celé hlavičce spermií (WGA 44 %, sWGA 41 %) a po obrysu hlavičky (WGA 44 %, sWGA 36 %). V obou případech byly nejméně zastoupeny spermie se signálem v oblasti akrozomu, i když u sWGA to bylo podílově více spermií (WGA 9 %, sWGA 21 %).

Detekce glykoproteinů pomocí metody Western blot byla provedena za použití tří lektinů – MAA, WGA a sWGA. Lektin MAA byl použit pro detekci α -2,3 vázané sialové kyseliny u šesti různých kanců. Nejvyšší relativní molekulová hmotnost byla detekována MAA lektinem, a to 150 kDa. Dále byly u všech lektinu detekovány glykoproteiny kolem 50 kDa a skupiny proteinů v oblasti 18-32 kDa. Glykoprotein o 16 kDa byl navíc zaznamenán u vazby s lektiny WGA a sWGA.

Po provedené denzitometrické analýze ve výsledcích nebyl mezi kanci nalezen žádný statisticky významný rozdíl v síle signálu. Detekce sialové kyseliny (multivalentní vazba) a N-acetylglukosaminu byla provedena pomocí lektinu WGA. Testováno bylo celkem šest kanců. Po zhodnocení se v síle signálu ukázal jediný statisticky významný rozdíl mezi kanci JE a JUR. Dále byl využit lektin sWGA k detekci N-acetylglukosaminu. Ani u tohoto lektinu nebyl mezi jednotlivými kanci nalezen signifikantní rozdíl v množství detekovaných specifických sacharidových struktur. V tomto případě bylo testováno celkem pět kanců.

Dále byla provedena detekce glykanů v proteinových extraktech izolovaných z povrchu spermií s využitím lektinů WGA a sWGA. U obou lektinů bylo nalezeno celkem 9 (skupin) glykoproteinů, které měly buď stejné, nebo velmi podobné molekulové váhy. Se stejnou velikostí to byly glykoproteiny o 187, 134, 86, 31, skupina o 23-16 kDa a 13 kDa. Velmi podobné byly velikosti 149 (WGA) a 150 kDa (sWGA), 73 (WGA) a 77 kDa (sWGA), 23 (WGA) a 24 kDa (sWGA) a nakonec 15 kDa (sWGA). U lektinu WGA navíc byly detekovány proužky v úrovni 209 a 42 kDa, které za použití lektinu sWGA přítomny nebyly. Celkem tedy

bylo detekováno 11 různých (skupin) glykoproteinů u lektinu WGA a 9 za použití sWGA. Detekce glykanů vedla ke zjištění, že mezi jedinci je přítomná určitá míra individuality jak v rozložení, tak přítomnosti některých glykoproteinů, která může být způsobena různými faktory. Tyto výsledky lze použít jako základ pro detekci a vyhodnocování dalších změn těchto struktur v následujících maturačních stádiích spermií.

8 Literatura

- Accogli G, Lacalandra GM, Aiudi G, Cox SN, Desantis S. 2017. Differential surface glycoprofile of buffalo bull spermatozoa during mating and non-mating periods. *Animal: an international journal of animal bioscience* **11**:1807.
- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. 1999. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta* **1473**(1):4-8.
- Baba T, Kashiwabara S, Watanabe K, Itoh H, Michikawa Y, Kimura K, Takada M, Fukamizu A, Arai Y. 1989. Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. *Journal of Biological Chemistry* **264**:11920–11927.
- Bassols J, Kádár E, Briz M, Pinart E, Sancho S, García-Gil N, Badia E, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Casas I, Bonet S. 2006. Migration of the cytoplasmic droplet in epididymal cultures of *sus scrofa*. *Reprod Domest Anim* **41**(4):3.
- Ben Moula A, El Amiri B. 2022. Factors influencing seminal plasma composition and its relevance to succeed sperm technology in sheep. *Small Ruminant Research* **215**:106759,
- Blawut B, Wolfe B, Moraes CHR, Premanandan CH, Ludsins SA, Schuenemann G, da Silva MAC. 2021. Changes to the spermatozoa glycocalyx and its role in fertilization in Sauger (*Sander canadensis*). *Aquaculture* **539**:736635.
- Blobel CP. 2000. Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. *Reviews of Reproduction* **5**(2):75-83.
- Bonet S, Briz M, Yeste M. 2012. A proper assessment of boar sperm function may not only require conventional analyses but also others focused on molecular markers of epididymal maturation. *Reprod Domest Anim* **47**(3):52–64.
- Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M. 2013. *Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends*. Springer, London.
- Brewis IA, Gadella BM. 2010. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Molecular human reproduction* **16**(2): 68–79.
- Briz M, Bonet S, Pinart E, Camps R. 1996. Sperm malformations throughout the boar epididymal duct. *Anim Reprod Sci* **43**:221–239.
- Buer CS, Muday GK, Djordjevic MA. 2007. Flavonoids Are Differentially Taken Up and Transported Long Distances in Arabidopsis. *Plant Physiology* **145**:478–490.
- Burnett LA, Washburn CA, Sugiyama H, Xiang X, Olson JH, Al-Anzi B, Bieber AL, Chandler DE. 2012. Chapter one - Allurin, an Amphibian Sperm Chemoattractant Having Implications for Mammalian Sperm Physiology. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press **295**:1-61.
- Desantis S, Ventriglia G, Zizza S, Nicassio M, Valentini L, Di Summa A, Lacalandra GM. 2010. Lectin-binding sites on ejaculated stallion sperm during breeding and non-breeding periods. *Theriogenology*, **73**(8):1146-1153.

- Calvo A, Pastor LM, Bonet S, Pinart E, Ventura M. 2000. Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis. *J Reprod Fert* **120**:325–335.
- Carrasco LC, Romar R, Aviles M, Gadea J, Coy P. 2008. Determination of glycosidase activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle. *Reproduction*. **136**:833-842.
- Clark DP. 2009. *Molecular Biology*. Elsevier Science & Technology, Burlington.
- Clermont Y. 1972. Kinetics of Spermatogenesis in Mammals. *Physiology Rev* **52**: 198–204.
- Cooper TG. 2007. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian journal of andrology* **9**(4): 533–539.
- Cooper TG. 1998. Epididymis. In: Neill JD, Knobil E (eds) *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, San Diego.
- Coward K, Wells D. 2013. *Textbook of clinical embryology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- De Jonge CJ, & Barratt C. 2006. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press, Cambridge.
- De Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Human Reproduction* **13**:1–8.
- Diekman AB. 2003. Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg? *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **60**:298-308.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1994. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta* **1200**(1): 48-54.
- Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. 2008. The ADAM metalloproteinases. *Molecular Aspects of Medicine* **29**(5):258-289.
- Ekhlesi-Hundrieser M, Sinowatz F, Greiser De Wilke I, Waberski D, Töpfer-Petersen E. 2002. Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Molecular Reproduction* **61**:32-41.
- Ellerman DA, Pei J, Gupta S, Snell WJ, Myles D, Primakoff P. 2009. Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. *Molecular reproduction and development* **76**(12):1188–1199.
- Evans E, Zhang H, Martin-Deleon P. 2003. SPAM1 (PH-20) protein and mRNA expression in the epididymides of humans and macaques: Utilizing laser microdissection/RT-PCR. *Reproductive biology and endocrinology* **1**(1):54.
- Fernlund P, Granberg LB, Roepstorff P. (1994). Amino acid sequence of beta-microseminoprotein from porcine seminal plasma. *Archives of biochemistry and biophysics*, **309**(1):70–76.

- Filippi A, Petrusa E, Braidot E. 2016. Flavonoid facilitated/passive transport: Characterization of quercetin microsomal uptake by a DPBA-dependent assay. *Biochimica et Biophysica Acta* **1857**:64.
- Fàbrega A, Guyonnet B, Dacheux JL, Gatti JL, Puigmulé M, Bonet S, Pinart E. 2011. Expression, immunolocalization and processing of fertilins ADAM-1 and ADAM-2 in the boar (*Sus domesticus*) spermatozoa during epididymal maturation. *Reproductive biology and endocrinology* **9**:96.
- Fàbrega A, Puigmulé M, Dacheux JL, Bonet S, Pinart E. 2012. Glycocalyx characterisation and glycoprotein expression of *Sus domesticus* epididymal sperm surface samples. *Reproduction, Fertility and Development* **24**:61 Peláez 9-630.
- França LR, Cardoso FM. 1998. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. *Tissue Cell* **30**(5):573-582.
- Frangne N, Eggmann T, Koblichke C, Weissenbock G, Martinoia E, Klein M. 2002. Flavone Glucoside Uptake into Barley Mesophyll and Arabidopsis Cell Culture Vacuoles. Energization Occurs by H⁺-Antiport and ATP-Binding Cassette-Type Mechanisms. *Plant Physiology* **128**:726–733.
- Flesch MF, Gadella BM. 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.
- Fukuda MN, Akama TO. 2002. In vivo role of alpha-mannosidase IIx: Ineffective spermatogenesis resulting from targeted disruption of the Man2a2 in the mouse. *Biochim Biophys Acta* **1573**:382-387.
- Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Métayer S, Thimon V, Dacheux JL. 2014. Post-testicular sperm environment and fertility **82**(83):321-339.
- Gmachl M, Sagan S, Ketter S, Kreil G. 1993. The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. *FEBS Letters* **336**(3):545-548.
- Gómez-Torres MJ, Avilés M, Girela JL, Murcia V, Fernández-Colom PJ, Romeu A, De Juan J. 2012. Characterization of the lectin binding pattern in human spermatozoa after swim-up selection. *Histology and histopathology* **27**:1621-1628.
- Gonzalez SN, Sulzyk V, Muñoz WM, Cuasnicu, PS. 2021. Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISP) are Key Players in Mammalian Fertilization and Fertility. *Frontiers in cell and developmental biology* **9**:800351.
- Griswold MD. 2016. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological reviews* **96**(1):1-17.
- Gupta SK. 2021. Human Zona Pellucida Glycoproteins: Binding Characteristics With Human Spermatozoa and Induction of Acrosome Reaction. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**:619-868.
- Haase B, Schlötterer C, Ekhlesi-Hundrieser M, Kuiper H, Distl O, Töpfer-Petersen E, Leeb T. 2005. Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene* **352**:20-29.

- Hao J, Chen M, Ji S, Wang X, Wang Y, Huang X, Yang L, Wang Y, Cui X, Lv L, Liu Y, Gao F. 2014. Equatorin is not essential for acrosome biogenesis but is required for the acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **444**(4):537-542.
- Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animal*. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology Endocrinology* **1**:107.
- Chandra NR, Kumar N, Jeyakani J, Singh DD, Gowda SB, Prathima MN. 2006. Lectindb: a plant lectin database. *Glycobiology* **16**(10):938–946.
- Charbonneau ME, Girard V, Nikolakakis A, Campos M, Berthiaume F, Dumas F, Mourez M. 2007. O-Linked Glycosylation Ensures the Normal Conformation of the Autotransporter Adhesin Involved in Diffuse Adherence. *Journal of Bacteriology* **189**(24):8880-8889.
- Cheon Y, Kim C. 2015. Impact of glycosylation on the unimpaired functions of the sperm. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* **42**:77-85.
- Chettri D, Boro M, Sarkar L, Verma AK. 2021. Lectins: Biological significance to biotechnological application. *Carbohydrate Research* **506**. Cheon YP, Kim CH. 2015. Impact of glycosylation on the unimpaired functions of the sperm. *Clin Exp Reprod Med*. **42**(3):77-85.
- Jeandet P, Hébrard C, Deville MA, Cordelier S, Dorey S, Aziz A, Crouzet J. 2014. Deciphering the Role of Phytoalexins in Plant-Microorganism Interactions and Human Health. *Molecules* **19**:18033–18056.
- Jiménez I, González-Márquez H, Ortiz R, José JA, García A, Betancourt M, Fierro R. 2003. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* **59**(5–6):1171-1180. Jonáková V, Kraus M, Veselský L, Cechová D, Bezouska K, Tichá M. 1998. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility* **114**:25-34.
- Jonáková V, Manásková P, Kraus M, Liberda J, Tichá M. 2000. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Molecular reproduction and development* **56**(2):275–277.
- Kadirvel G, Machado SA, Korneli C, Collins E, Miller P, Bess KN, Aoki K, Tiemeyer M, Bovin N, Miller DJ. 2012. Porcine sperm bind to specific 6-sialylated biantennary glycans to form the oviduct reservoir. *Biology of reproduction* **87**:147-141.
- Kachlík D. 2018 *Anatomie Pro Nelékařské Zdravotnické Obory*, Karolinum Press.
- Kasekarn W, Kanazawa T, Hori K, Tsuchiyama T, Lian X, Garénaux E, Kongmanas K, Tanphaichitr N, Hiroshi Yasue H, Chihiro Sato CH, Kitajima K. 2012. Pig sperm membrane microdomains contain a highly glycosylated 15–25-kDa wheat germ agglutinin-binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **426**(3):356-362.

- Kirchhoff C, Schröter S. 2001. New Insights into the Origin, Structure and Role of CD52: A Major Component of the Mammalian Sperm Glycocalyx. *Cells Tissues Organs* **168**:93-104.
- Kongmanas K, Kruevaisayawan H, Saewu A, Sugeng C, Fernandes J, Souda P, Angel JB, Faull KF, Aitken RJ, Whitelegge J, Hardy D, Berger T, Baker MA, Tanphaichitr N. 2015. Proteomic Characterization of Pig Sperm Anterior Head Plasma Membrane Reveals Roles of Acrosomal Proteins in ZP3 Binding. *J. Cell. Physiol* **230**:449-463.
- Koyama K, Ito K, Hasegawa A. 2007. Role of male reproductive tract CD52 (mrt-CD52) in reproduction. *Society of Reproduction and Fertility supplement* **63**:103–110.
- Lassalle B, Testart J. 1994. Human zona pellucida recognition associated with removal of sialic acid from human sperm surface. *Reproduction* **101**:703-711.
- Lathrop WF, Carmichael EP, Myles DG, Primakoff P. 1990. cDNA cloning reveals the molecular structure of a sperm surface protein, PH-20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals. *J Cell Biol* **111**:2939– 2949.
- Lea IA, Sivashanmugam P, O’Rand MG. 2001. Zonadhesin: Characterization, Localization, and Zona Pellucida Binding. *Biology of Reproduction* **65**(6):1691–1700.
- Leitner J, Reutner K, Essler SE, Popow I, Gerner W, Steinberger P, Saalmüller A. 2012. Porcine SWC1 is CD52-final determination by the use of a retroviral cDNA expression library. *Veterinary immunology and immunopathology* **146**(1):27–34.
- Logan SM. 2006. Flagellar glycosylation - a new component of the motility repertoire? *Microbiology* **152**:1249–1262.
- Loris R. 2002. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1572**:198–208.
- Madhumita S, Majumder GC, Chatterjee T. 1991. Goat sperm membrane: lectin-binding sites of sperm surface and lectin affinity chromatography of the mature sperm membrane antigens. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* **1070**(1):198-204.
- Maňásková P, Pěkníková J, Elzeinová F, Tichá M, Jonáková V. 2007. Origin, localization and binding abilities of boar DQH sperm surface protein tested by specific monoclonal antibodies. *Journal of Reproductive Immunology* **74**:103-113.
- Maňásková-Postlerová P, Davidová N, Šulc M, Philimonenko A, Hozák P, Jonáková V. 2011. Reproductive tissue expression and sperm localization of porcine beta-microseminoprotein. *Cell and Tissue Research* **344**(2):341-353.
- McLachlan RI. 2000. The endocrine control of spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **14**:345– 362.
- Mulhall JP, Applegarth LD, Oates RD. 2013. *Fertility Preservation in Male Cancer Patients*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Myles DG, Primakoff P. 1997. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biology of reproduction* **56**(2):320–327.

- Nayernia K, Adham I, Kremling H, Reim K, Schlicker M, Schlüter G, Engel W. 1996. Stage and developmental specific gene expression during mammalian spermatogenesis. *The International Journal of Developmental Biology* **40**:379–383.
- Pang PC, Tissot B, Drobnis EZ, Sutovsky P, Morris HR, Clark GF, Dell A. 2007. Expression of bisecting type and Lewisx/Lewisy terminated N-glycans on human sperm. *The Journal of biological chemistry*, **282**(50), 36593–36602.
- Pawlak-Sprada S, Stobiecki M, Deckert J. 2011. Activation of phenylpropanoid pathway in legume plants exposed to heavy metals. Part ii. Profiling of isoflavonoids and their glycoconjugates induced in roots of lupine (*Lupinus luteus*) seedlings treated with cadmium and lead. *Acta Biochimica Polonica* **58**:217–223.
- Porter ME, Sale WS. 2000. The 9 + 2 Axoneme Anchors Multiple Inner Arm Dyneins and a Network of Kinases and Phosphatases That Control Motility. *J Cell Biol* **151**(5):37–42.
- Pruneda A, Pinart E, Bonet S, Yeung CH, Cooper TG. 2006. Concentration of glucose, sorbitol and fructose in the epididymal fluid of boars. *Reprod Domest Anim* **41**(4):322–323.
- Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Topfer-Petersen E. 1996. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Eur J Biochem* **242**:636-640.
- Roberts KP, Ensrud KM, Wooters JL, Nolan MA, Johnston DS, Hamilton DW. 2006. Epididymal secreted protein Crisp-1 and sperm function. *Molecular and Cellular Endocrinology* **250**(1–2):122-127.
- Robinson PK. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry* **59**:1–41.
- Sabeur K, Cherr GN, Yudin AI, Primakoff P, Li MW, Overstreet JW. 1997. The PH-20 protein in human spermatozoa. *Journal of andrology*, **18**(2):151–158.
- Santos A, Napoleão TH, Bezerra RF, Carvalho EVMM, Correia M, & Paiva PMG, Coelho, LC. 2013. Strategies to Obtain Lectins from Distinct Sources. *Advances in Medicine and Biology* 63.
- Schröter S, Osterhoff C, McArdle W, Ivell R. 1999. The glycocalyx of the sperm surface. *Human Reproduction Update* **5**(4):302–313.
- Silva MCC, Santana LA, Mentele R, Ferreira RS, de Miranda A, Silva-Lucca RA, Sampaio MU, Correia MTS, Oliva MLV. 2012. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. *Process Biochemistry* **47**(7):1049-1059.
- Sklípka J, Tonar Z. 2019. *Základy Embryologie*. Karolinum Press.
- Suarez SS. 1998. The Oviductal Sperm Reservoir in Mammals: Mechanism of Formation. *Biology of Reproduction* **58**:1105-1107.
- Suarez SS. 2001. Carbohydrate-Mediated Formation of the Oviductal Sperm Reservoir in Mammals. *Cells Tissues Organs* **168**:105-112.

- Suarez SS. 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* **14**:647–57.
- Teclé E, Gagneux P. 2015. Sugar-coated sperm: unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Molecular reproduction and development* **82**:635-650.
- Tichá M, Kraus M, Čechová D, Jonáková V. 1998. Saccharide-binding properties of boar AQN spermadhesins and DQH sperm surface protein. *Folia Biologica* 15–21.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Animal reproduction science* **89**(1-4):159-70.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela P, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete J. 2009. Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* **30**:217-224.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Tsoleva M. 2008. Glycobiology of fertilization in the pig. *The International journal of developmental biology* **52**:717-736.
- Tulsiani DRP. 2006. Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology* **250**(1–2):58-65.
- Tulsiani DR, Abou-Haila A. 2012. Biological Processes that Prepare Mammalian Spermatozoa to Interact with an Egg and Fertilize It. *Scientific (Cairo)* **12**:1-12
- Tulsiani DRP, Skudlarek MD, Holland MK, Orgebin-Crist M-C. 1993. Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biology of reproduction* **48**:417-428.
- Van Damme EJM, Lannoo N, Peumans WJ. 2008. Plant Lectins. *Advances in Botanical Research* **48**:107-209.
- Vajner L, Uhlik J. 2018. *Lékarská histologie ii. mikroskopická anatomie*. Karolinum Press.
- Varki A, Esko JD, Colley KJ, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. 2009. Cellular organization of glycosylation. *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor, NY.
- Villegas M, Sommarin M, Brodelius PE. 2000. Effects of sodium orthovanadate on benzophenanthridine alkaloid formation and distribution in cell suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**:233–241.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. 2016. *Fundamentals of biochemistry*. 5th ed., John Wiley & Sons, NY.
- Wagner A, Ekhlasi-Hundrieser M, Hettel Ch, Petrunkina A, Waberski D, Nimtz M, Topfer Petersen E. 2002. Carbohydrate-Based Interactions of Oviductal Sperm Reservoir Formation Studies in the Pig. *Molecular reproduction and development*. 61:249-257
- Wang I, Yu TA, Wu SH, Chang WCH, Chen CH. 2003. Disulfide pairings and secondary structure of porcine β -microseminoprotein, *FEBS Letters* 541.
- Xin A, Cheng L, Diao H, Wu Y, Zhou S, Shi CH, Sun Y, Wang P, Duan S, Zheng J, Wu Bin, Yuan Y, Gu Y, Chen G, Sun X, Shi H, Tao S, Zhang Y. 2016. Lectin binding of human

sperm associates with DEFB126 mutation and serves as a potential biomarker for subfertility. *Scientific Reports* **6**:20249.

Xin M, You S, Xu Y, Shi W, Zhu B, Shen J, Wu J, Li C, Chen Z, Su Y, Shi J, Sun S. 2022. Precision Glycoproteomics Reveals Distinctive N-Glycosylation in Human Spermatozoa. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **21**(4):100214.

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

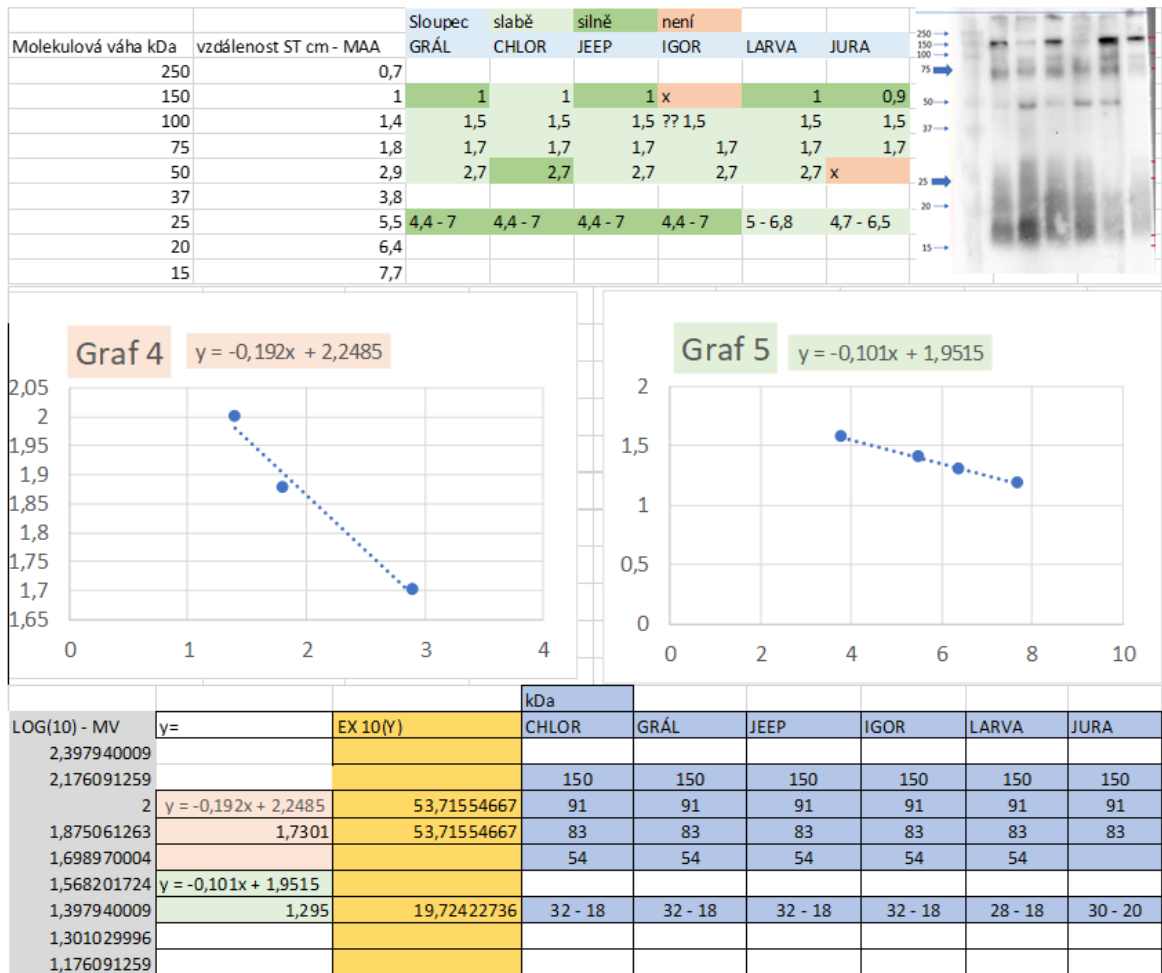
Ye Y, Ding Y, Jiang Q, Wang F, Sun J, Zhu C. 2017. The role of receptor-like protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants. *Plant Cell Reports* **36**:235–242.

Zhang M, Chiozzi RZ, Skerrett-Byrne DA, Veenendaal T, Klumperman J, Heck AJR, Nixon B, Helms JB, Gadella BM, Bromfield EG. 2022. High Resolution Proteomic Analysis of Subcellular Fractionated Boar Spermatozoa Provides Comprehensive Insights Into Perinuclear Theca-Residing Proteins. *Cell and Developmental Biology* **10**.

Zhang M, Chiozzi RZ, Bromfield EG, Heck AJR, Helms JB, Gadella BM. 2023. Characterization of acrosin and acrosin binding protein as novel CRISP2 interacting proteins in boar spermatozoa. *Andrology* 1-12.

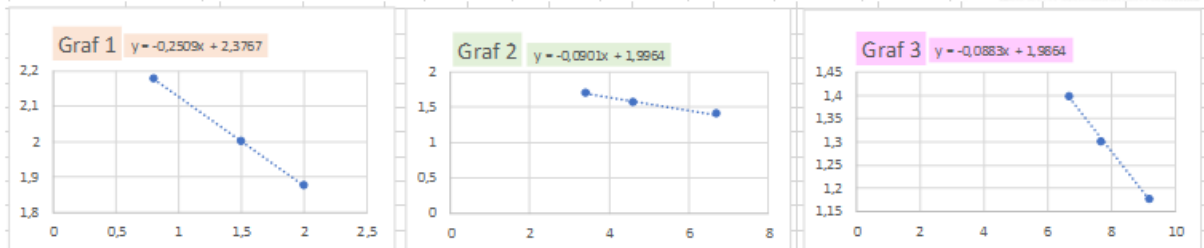
Zigo M, Jonáková V, Šulc M, Maňásková-Postlerová P. 2013. Characterization of sperm surface protein patterns of ejaculated and capacitated boar sperm, with the detection of ZP binding candidates. *International journal of biological macromolecules* **61**:322-328.

9 Samostatné přílohy



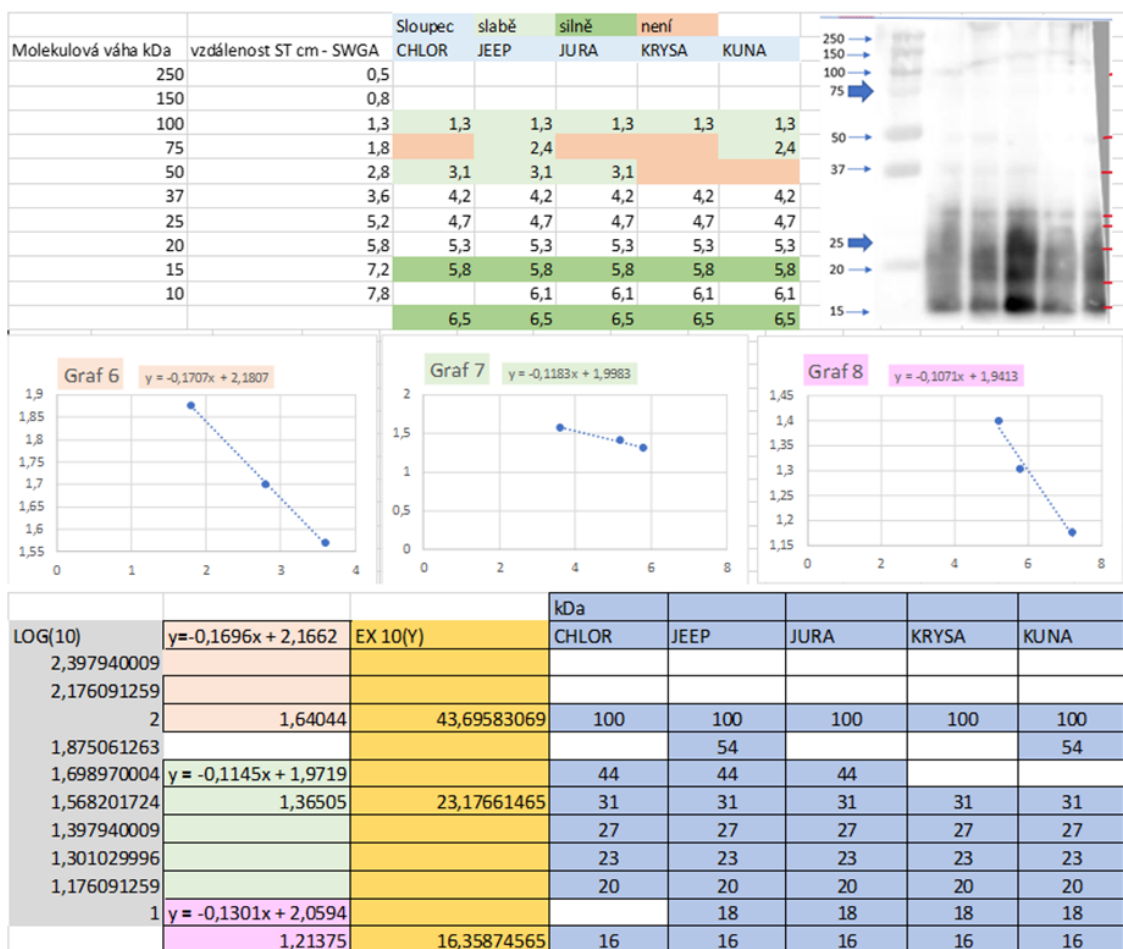
Příloha 1. Výpočet molekulových hmotností po detekci vazby lektinu MAA na glykoproteiny spermií.

Molekulová váha kDa	vzdálenost ST cm - WGA	Sloupec					LARVA	JURA	
		CHLOR	slaběji GRÁL	silněji JEEP	není IGOR				
250	0,4								
150	0,8								
100	1,5	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3		
75	2								
50	3,4	3,7			3,7	3,7	3,7		
37	4,6				4,6		4,6		
25	6,7	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9		
20	7,7	6,9-8	6,9-8	6,9-8,15	6,9-8,1	6,9-7,9	6,8-7,7		
15	9,2	8,8	8,8	8,7	8,7	8,5	8,5		



LOG(10) - ST, MV	$y = -0,2509x + 2,3767$	E 10(Y)	CHLOR	GRÁL	JEEP	IGOR	LARVA	JURA
2,397940009	2,07562	119,0200148	119 kDa	119 kDa	112 kDa	112 kDa	112 kDa	112 kDa
2,176091259	2,05053	112,3388568						
2								
1,875061263	$y = -0,0901x + 1,9964$							
1,698970004	1,66303	46,02883681	46 kDa			46 kDa	46 kDa	46 kDa
1,568201724						37 kDa	37 kDa	37 kDa
1,397940009	1,46481	29,16150945	29 kDa	29 kDa	29 kDa	29 kDa	29 kDa	29 kDa
1,301029996	$y = -0,0883x + 1,9864$	16,1942187	23,5 - 19 kDa	23,5 - 19 kDa	23,5 - 18	23,5 - 18, 5	23,5 - 19	24 - 20 kDa
1,176091259	1,20936		16	16	16,5	16,5	17	17

Příloha 2. Výpočet molekulových hmotností po detekci vazby lektinu WGA na glykoproteiny spermií.



Příloha 3. Výpočet molekulových hmotností po detekci vazby lektinu sWGA na glykoproteiny spermií.