

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Podíl spermadhesinů v proteinovém profilu ejakulátu
kanců**

Diplomová práce

**Bc. Michaela Sedláčková
Reprodukční biotechnologie**

RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Podíl spermadhesinů v proteinovém profilu ejakulátu kanců" 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 především vedoucí mé diplomové práce RNDr. Pavle Postlerové, PhD. za její odborné vedení této diplomové práce, ochotu, trpělivost, přístup, cenné rady při práci v laboratoři a při psaní celé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům z Katedry veterinárních disciplín za ochotu a odbornou pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé svojí rodině za podporu a trpělivost po dobu celého mého studia a při zpracování této diplomové práce.

Podíl spermadhesinů v proteinovém profilu ejakulátu kanců

Souhrn

Kančí ejakulát je složen ze spermií a semenné plazmy (SP). SP je tekutina pocházející z přídatných pohlavních žláz samců a spermie se s ní dostávají do kontaktu během ejakulace. SP má za úkol zajišťovat ochranu, výživu a transport spermií při jejich pobytu v samičím reprodukčním traktu. Významnou složkou SP jsou proteiny, které se během ejakulace spermií adherují na jejich povrch a mohou hrát roli jako dekapacitační faktory, jelikož zabraňují předčasné kapacitaci spermií.

Významný podíl proteinů SP kanců tvoří spermadhesiny, které hrají klíčovou roli v následných dějích vedoucích k úspěšnému oplození. Tvoří především ochranný obal na povrchu spermií a zprostředkovávají vazbu spermií do ovidukálního rezervoáru samice. Navíc se pravděpodobně účastní také interakce spermie s oocytem. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda se množství spermadhesinů, a to konkrétně AQN a AWN spermadhesinů, v ejakulátu jednotlivých kanců bude lišit, a proto byl sledován proteinový profil SP a spermií včetně cílené izolace proteinů z jejich povrchu u vybraných jedinců s následnou detekcí AQN a AWN spermadhesinů pomocí protilátek.

Výskyt spermadhesinů v SP kanců byl potvrzen v molekulové hmotnosti kolem 11-19 kDa ve vzorcích SP, lyzátech spermií i povrchových proteinech spermií. Navíc byla prokázána i přítomnost jejich agregovaných forem. Mezi jednotlivými kanci byly zjištěny individuální rozdíly, jelikož u poměru síly signálu protilátky proti AQN k naměřené koncentraci proteinů v SP byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Stejně tak byl zjištěn u relativní optické denzity poměru signálu protilátky proti AQN i AWN spermadhesinu vztažené ke koncentraci spermií. V případě neprokázání statisticky významného rozdílu pomocí denzitometrické analýzy byla však mezi kanci vidět také určitá individualita v množství detekovaných proteinů.

Pomocí imunofluorescenční mikroskopie byly spermadhesiny lokalizovány na kančích ejakulovaných spermiích fixovaných aceton/metanolem především v oblasti akrozomální čepičky, krčku a střední části bičíku, zatímco spermadhesiny na ejakulovaných spermiích připravených v suspenzi byly pomocí protilátky lokalizovány na povrchu celé hlavičky i bičíku spermie.

I když u vzorků jednotlivých kanců byla v množství navázaných AQN a AWN spermadhesinů patrná individualita mezi nimi, je nutné se do budoucna zaměřit na detailnější popis funkčních parametrů spermií, aby byla jasně prokázána souvislost mezi množstvím spermadhesinů v ejakulátu kanců a jejich fertilizační schopností.

Klíčová slova: semenná plazma, protilátka, povrchové proteiny, Western blot

Distribution of spermadhesins in the protein profile of boar ejaculate

Summary

Boar ejaculate is composed of sperm and seminal plasma (SP). SP is a fluid that comes from the male accessory glands, and spermatozoa come into contact with it during ejaculation. SP has the task of ensuring the protection, nutrition and transport of spermatozoa during their stay in the female reproductive tract. An important component of SP are proteins that adhere to the surface of sperm during ejaculation and can play a role as decapacitation factors, as they prevent premature capacitation of sperm.

A significant portion of boar SP proteins are spermadhesins, which play a key role in subsequent events leading to successful fertilization. They primarily form a protective coating on the sperm surface and mediate the binding of sperm to the oviductal reservoir of the female. In addition, they participate in the sperm-oocyte interaction. The aim of this thesis was to find out whether the amount of spermadhesins, specifically AQN and AWN spermadhesins, in the ejaculate of individual boars will differ, and therefore the protein profile of SP and sperm was monitored, including the targeted isolation of proteins from their surface in selected individuals with subsequent detection of AQN and AWN of spermadhesins using antibodies.

The occurrence of spermadhesins in boar SP was confirmed at a molecular weight of around 12-18 kDa in SP samples, sperm lysates and sperm surface proteins. In addition, the presence of their aggregated forms was also proven. Individual differences were found between individual boars, as a statistically significant difference ($p < 0.05$) was found in the ratio of the antibody signal against AQN to the measured protein concentration in the SP. It was also found in the relative optical density of the signal ratio of the antibody against AQN and AWN spermadhesin related to sperm concentration. In the case of not showing a statistically significant difference using densitometric analysis; however, a certain individuality in the amount of detected proteins was also seen between the boars.

Using immunofluorescence microscopy, spermadhesins were localized on boar ejaculated spermatozoa fixed with acetone/methanol mainly in the region of the acrosomal cap, the neck and the midpiece of the flagellum, while spermadhesins on ejaculated spermatozoa prepared in suspension were localized using an antibody on the surface of the entire sperm head and flagellum.

Even though in the samples of individual boars the amount of bound AQN and AWN spermadhesins showed individuality between them, in the future it is necessary to focus on a more detailed description of the functional parameters of sperm in order to clearly demonstrate the connection between the amount of spermadhesins in the ejaculate of boars and their fertilization ability.

Keywords: seminal plasma, antibody, surface proteins, Western blot

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Ejakulát kance	11
3.1.1 Spermie	11
3.1.1.1 Hlavička	12
3.1.1.2 Bičík	13
3.2 Semenná plazma	14
3.2.1 Přídavné pohlavní žlázy.....	15
3.2.1.1 Měchýřkovité žlázy.....	15
3.2.1.2 Bulbouretrální žlázy.....	16
3.2.1.3 Prostata.....	16
3.2.2 Semenná plazma kanců.....	17
3.2.2.1 Proteiny kančí semenné plazmy.....	18
3.2.2.2 Další složky kančí semenné plazmy	19
3.2.3 Mezidruhové rozdíly semenné plazmy	20
3.3 Spermadhesiny	21
3.3.1 Struktura spermadhesinů.....	21
3.3.2 Funkce a vlastnosti spermadhesinů.....	22
3.4 Proteomika spermií	23
3.5 Uchovávání ejakulátu a vliv složek SP	25
3.5.1 Krátkodobé uchovávání ejakulátu	25
3.5.2 Kryokonzervace	26
4 Materiál a metody	28
4.1 Použité vzorky	28
4.2 Zpracování ejakulátu	29
4.2.1 Precipitace proteinů ze semenné plazmy pro SDS elektroforézu.....	29
4.2.2 Zpracování spermií pro celkové lyzáty.....	29
4.2.3 Izolace proteinů z povrchu spermií.....	30
4.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)	31
4.4 Western blot analýza	32
4.4.1 Elektropřenos proteinů.....	32
4.4.2 Imunodetekce proteinů na membráně.....	33
4.4.3 Detekce vzorků	33
4.4.4 Denzitometrická analýza a odečet molekulových hmotností	33
4.5 Imunofluorescenční mikroskopie	34

4.5.1	Příprava vzorků pro imunofluorescenci.....	34
4.5.2	Příprava vzorků spermií fixovaných aceton/metanolem na mikroskopickém sklíčku	34
4.5.3	Příprava vzorků spermií v suspenzi	35
4.5.4	Mikroskopické hodnocení vzorků	36
5	Výsledky	37
5.1	Koncentrace proteinů semenné plazmy	37
5.2	Detekce AQN a AWN spermadhesinů v SP a spermiích kanců	37
5.2.1	Detekce AQN a AWN spermadhesinů na povrchu kančích spermií	47
5.3	Lokalizace AQN a AWN spermadhesinů ve spermiích pomocí nepřímé imunofluorescence.....	50
6	Diskuze.....	54
7	Závěr	58
8	Literatura	59
9	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Ejakulát všech savců, včetně kance je složený ze dvou složek. První složkou je semenná plazma (SP) a druhou samotné spermie. Kančí ejakulát se dále rozděluje na tři frakce, kterými jsou prespermiová, spermiová a postspermiová frakce. Až 80 % spermií se nachází právě ve frakci spermiové, která obsahuje také sekret z epididymu, sekrety prostaty a měchýřkovitých žláz. Ejakulát je zkoumán z důvodu upřesnění reprodukčních procesů a procesů vedoucích k oplodnění. Důležitá je identifikace jednotlivých složek ejakulátu, a to z důvodu pochopení jejich funkce, lokalizace a vylepšení reprodukčních biotechnologií v budoucnosti.

SP je produktem přídatných pohlavních žláz a obsahuje velice důležité komponenty, jako jsou proteiny, sacharidy, lipidy, vitamíny, minerály a další složky. Biomolekuly SP hrají klíčovou roli ve funkci spermií, především v jejich motilitě, a udržení jejich fertilizační schopnosti (Morgan et Watkins 2020; Töpfer-Petersen et al. 2005).

Jednou z nejdůležitějších složek SP jsou proteiny, které jsou nezbytné pro normální funkci spermií. Poskytují ochranné prostředí pro spermie (Flowers et al. 2016) a přispívají k počátečním a centrálním krokům fertilizace, jako například vytvoření rezervoáru spermií ve vejcovodu, modulaci kapacity a interakci gamet (Töpfer-Petersen et al. 2005). Většina proteinů SP má schopnost vázat se na plazmatickou membránu spermií, a tím ovlivňovat některé jejich vlastnosti. Nejvíce zastoupenými proteiny SP kanců jsou především proteiny z Awn, Aqn a Psp (z angl. porcine seminal plasma) rodiny řadící se mezi spermadhesiny (Töpfer-Petersen et al. 1998, Haase et al. 2005, Töpfer-Petersen et al. 2005), které byly nalezeny také na povrchu spermií (Jonáková et al. 2000, Töpfer-Petersen et al. 2005, Maňásková et al. 2008).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cíle práce vychází z hypotézy, že množství spermadhesinů v semenné plazmě (SP) jednotlivých kanců se bude lišit. Proto bude sledován proteinový profil SP a spermií u vybraných jedinců s následnou detekcí těchto proteinů pomocí protilátek.

3 Literární rešerše

3.1 Ejakulát kance

Ejakulát kance je mléčně neprůhledná, bílá až šedobílá tekutina, nevýrazného nebo slabě specifického pachu. Jedná se o tekutinu skládající se ze dvou složek, semenné plazmy a buněčných elementů. Mezi buněčné elementy se řadí především zralé spermie, kterých v případě kance je kolem 25 000-30 000 v jednom mililitru (Gamčík a Kozumplík 1984). Spermie se dostanou do kontaktu se semennou plazmou během ejakulace. Semenná plazma spermii poskytuje ochranu, přičemž těmto ochranným faktorům se souhrnně říká dekapacitační faktory, jelikož zabraňují předčasné kapacitaci spermii (Zigo et al. 2020).

Objem kančího ejakulátu se pohybuje v rozmezí 200-250 ml (Rodríguez-Martinez et al. 2005), avšak Höffner et al. (2020a) uvádějí, že objemy kančích ejakulátů mohou přesáhnout i 500 ml. Podle této studie totiž vysokoobjemové ejakuláty bývají spojovány s nízkou koncentrací spermii a velkým množstvím semenné plazmy (SP). Kvalita ejakulátu se mění také v průběhu ročních období, kdy bývá nejnižší v létě (Smital, 2009).

Ejakulát kanců se skládá ze třech frakcí, jelikož kanci ejakulují ve třech fázích. Složení se liší díky různému obsahu tekutin z přídatných pohlavních žláz a koncentraci spermii (Akçay et al. 2006). První frakcí je takzvaná prespermiová frakce obsahující sekret z prostaty s velice málo spermii, přičemž tato frakce tvoří 5 až 20 % celkového objemu ejakulátu. Druhou frakcí je frakce spermiová, ve které se nachází nejvíce spermii (až 80 % z celku), dále sekret z epididymu a také v nižším množství sekrety prostaty a měchýřkovitých žláz. Druhá frakce tvoří až 50 % z celkového objemu ejakulátu a pro reprodukci samečů je také nejdůležitější. Poslední třetí frakcí je frakce postspermiová, v níž se nachází zbytek spermii a ve větší míře sekret měchýřkovitých žláz a sekret ze žláz bulbouretrálních neboli Cowperových (Smital 2000). Koncentrace spermii ve spermiové frakci se blíží $6-10 \times 10^8$ spermii na mililitr, přičemž v konečné koncentraci je nižší vzhledem k objemu frakce prespermiové a postspermiové (Hafez et Hafez 2000).

3.1.1 Spermie

Spermie jsou zralé samčí pohlavní buňky, které mají v porovnání s ostatními buňkami ojedinělou stavbu, jenž je podmíněna jejím specifickým posláním, což je schopnost samostatného, aktivního pohybu a schopnost oplozovací (Marvan 2011). Plně zformované spermie jsou prodloužené buňky, které můžeme dle struktury rozdělit na dvě hlavní části, a to hlavičku a bičík (Obrázek č. 1). Hlavičku tvoří převážně akrozom s koncentrovaným jádrem (Hafez et Hafez 2000).

Savčí spermie se uvolňují z varlat do vývodů epididymu už jako haploidní a vysoce diferenciované buňky, které však postrádají schopnost interakce s oocytem. Schopnost oplodnit oocyt získají až během složitého procesu, který se nazývá posttestikulární maturace spermii. Podstatným rysem posttestikulární maturace je remodelace povrchu spermii díky proteinům a glykoproteinům, které jsou přítomny v reprodukčních tekutinách. Zráním spermii je zahájeno v momentě, kdy spermie procházejí epididymem a následují ho změny, ke kterým dochází

během ejakulace. V samičím reprodukčním traktu musí spermie projít dalším procesem, a tím je zrání označované jako kapacitace, a právě ta umožňuje spermii dostat se do místa oplození ve správnou chvíli a interagovat s ovulovaným oocytem (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Většina spermií, které jsou v ejakulátu však nikdy nedosáhnou vejcovodu a ve skutečnosti pouze několik málo desítek se oocytu přiblíží a pouze jedna se nakonec samotného oplození zúčastní (Reece 2011).

Spermie kance se podobá spermii sudokopytníků a od býčí spermie se například liší především tím, že je kratší a akrozom zaujímá větší plochu hlavičky. Spermie kanců má celkovou délku v průměru 50 μm , přičemž hlavička je 8,5 μm dlouhá a 4,25 μm široká. Střední část bičíku je u kanců 10 μm dlouhá a hlavní oddíl bičíku je dlouhý 30 μm (Kliment a kol. 1983). Velikost hlavičky spermie se mění v závislosti na pohlavním vývoji kance. Spermie u kanců nad 18 měsíců mají hlavičku delší, avšak širší, plochu a obvod mají menší než mladší kanci (Quintero-Moreno et al 2009).

3.1.1.1 Hlavička

Hlavička kančí spermie se skládá z plazmatické membrány, akrozomu, jádra, cytoskeletárních struktur a cytoplazmy (Tichý 2004). Spermie má v hlavičce mimo plazmatické membrány další dvě membrány, těmi jsou vnější a vnitřní akrosomální membrána a vnitřní jaderná membrána (Obrázek č. 1) (Morel 2008). Hlavička je téměř pravidelně oválná, ze stran má zploštělý útvar s širším apikálním koncem a v místě spojení s bičíkem se zužuje. Zploštělý tvar hlavičky přináší určitou výhodu pro pohyb. Hlavička spermie se skládá z nukleoplazmy, struktur nukleárního původu, akrosomálního systému a postakrosomální čepičky. Díky lokalizaci dědičného materiálu v nukleoplazmě v hlavičce spermie má právě díky tomu hlavička nezastupitelné místo v procesu oplodnění (Kliment a kol. 1983, Hafez et Hafez 2000).

Jádro hraje hlavní klíčovou roli celé spermie a především hlavičky, jelikož se v něm nachází kondenzovaný chromatin, což je nositel genetické informace (Chłopik et Wysokińska 2019). Chromatin je tvořen z jedné poloviny deoxyribonukleovou kyselinou (DNA) a z druhé proteiny (Hafez et Hafez 2000).

Akrozom je strukturou pod plazmatickou membránou a je umístěn v přední části hlavičky spermie (Hafez et Hafez 2000). Je obklopen vnější a vnitřní akrosomální membránou, přičemž se tyto membrány spojují v ekvatoriálním segmentu hlavičky (Varner et Johanson 2007). Je to struktura vytvořena z Golgiho aparátu při přeměně ze spermatidy (Chłopik et Wysokińska 2019). Zadní část akrozomu je identická společně s ekvatoriálním segmentem a se střední částí hlavičky spermie (Kliment a kol. 1983). Akrozom je jakýsi váček obsahující enzymy, jako například akrosin, glykosidázy a kyselinu fosforečnou (Chłopik et Wysokińska 2019).

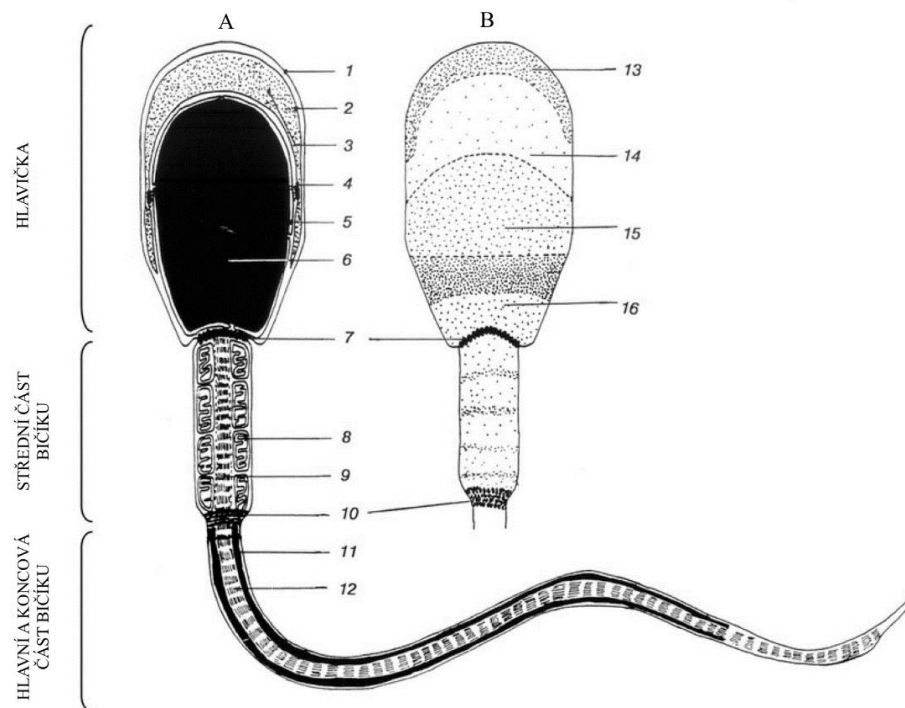
Akrozomová reakce je velice důležitým procesem pro vazbu spermie na *zona pellucida* (ZP) oocyty (Chłopik et Wysokińska 2019). Akrozom totiž umožňuje proniknutí spermie do oocyty díky svým enzymům. Zralý oocyt má zevní obal zvaný corona radiata tvořený z buněk, které jsou k sobě pevně připojeny kyselinou hyaluronovou. Díky akrozomové reakci depolarizuje akrosomální hyaluronidáza kyselinou hyaluronovou, oddělí tím buňky corona radiata a spermie poté může proniknout k ZP. Následně se spermie dostane přes ZP pomocí

akrozinu a pokud dojde k poškození akrozomu, tak ztrácí spermie svou fertilizační schopnost i přes to, že spermie si uchová svůj aktivní pohyb (Kliment 1983).

3.1.1.2 Bičík

Krček je část spermie spojující hlavičku a bičík, jenž je rozdělen na střední, hlavní a koncovou část (Hafez et Hafez 2000). Krček nasedá kapitulem na implantační jamku tvořenou jadernou membránou. V krčku se nachází dvě centrioly, a to proximální a distální (Gage 1998).

Bičík je velice důležitá část spermie zajišťující pohyb. Uvnitř celého bičíku se nachází axonema složená z tubulinových vláken. Ve střední části bičíku se nachází mitochondrie zodpovědné za oxidativní fosforylaci, produkci energie a homeostázu vápníku. Mitochondrie jsou typické pro existenci jejich vlastní DNA, a pokud se počet kopií této mtDNA zvýší, tak tím dochází ke snížení kvality ejakulátu (Chłopik et Wysokińska 2019).



Obrázek č. 1: Schématické znázornění kančí spermie (Gadella et al 2008).

(A) Řez spermii: 1 - plazmatická membrána, 2 - vnější akrozomální membrána, 3 - akrozomální matrix, 4 - vnitřní akrozomální membrána, 5 - obal jádra, 6 - jádro, 7 - krček spermie, 8 - mitochondrie, 9 - střední část bičíku, 10 - prstenec, 11 - vláknité pouzdro, 12 - axonema

(B) Povrch hlavičky spermie a střední část bičíku: 13 - apikální část akrozomu, 14 - hlavní část akrozomu, 15 - ekvatoriální segment, 16 - postakrozomální oblast

3.2 Semenná plazma

Semenná plazma (SP) je tekutá směs sekretů přídatných pohlavních žláz, primárně ampully, prostaty, měchýřkovitých a bulbouretrálních žláz a představuje více než 90 % objemu semene (Maxwell et al. 2007, Reece 2011). Obsahuje také biochemické složky, mezi které řadíme například proteiny, lipidy, enzymy a další (Ari et Daskin 2010). Biomolekuly SP hrají klíčovou roli ve funkci spermií jako je například motilita. Dále při fertilizaci, a dokonce při vývoji embrya (Morgan et Watkins 2020), kdy bylo zjištěno, že se složky SP také přímo podílejí na regulaci imunitního prostředí dělohy, které usnadňují vývoj embryí prasnic. Za jistých podmínek může u prasnic ovlivňovat ovulaci (Waberski et al. 2018). Například podle studie Töpfer-Petersen (1999) kombinace účinků jednotlivých komponent SP podporuje spermie v přežití v samičím reprodukčním traktu a tím zaručuje, že se funkčně kompetentní spermie mohou dostat k ovulovanému vajíčku do místa fertilizace včas. Právě z tohoto důvodu se v současné době zkoumají jednotlivé komponenty SP jako potencionální biomarkery samčí neplodnosti (Loveland et al. 2017, Samanta et al. 2018).

SP obsahuje jak proteinové, tak neproteinové složky, mezi které patří například ionty či organické sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností. Mezi tyto organické sloučeniny řadíme třeba volné aminokyseliny, monosacharidy, lipidy, polyaminy, prostaglandiny či steroidní hormony. Prostaglandiny působí i na samičí organismus a tím zlepšují proces fertilizace (Töpfer-Petersen et al. 2005). V SP se vyskytují také biologicky aktivní látky jako jsou estrogény a androgeny nebo i řada antigenů, z nichž se některé váží na povrch spermií při styku SP se spermiemi a antigenní vlastnosti byly zjištěny i u spermií samotných (Gamčík a Kozumplík 1984). Všechny součásti SP hrají velice důležitou roli během všech fyziologických procesů a funkcí, kterými spermie procházejí (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Část SP, jenž pochází z epididymu (nadvarlat) podporuje spermie v jejich oplozovací schopnosti, která je tlumena dekapacitačními faktory. V epididymu dochází především ke strukturálním změnám plazmatické membrány spermií pomocí působení organických a anorganických složek epididymální plazmy. Proteiny z epididymu dodávají spermiím schopnost pohybu, fertilizační schopnost či ochranu proti bakteriím (Maxwell et al. 2007).

Složky pocházející ze SP vázající se během ejakulace na spermie ovlivňují dobu kapacitace a hrají velice důležitou roli při fertilizaci. Jedná se hlavně o membránové váčky neboli vezikuly, které pocházejí z přídatných pohlavních žláz. Vezikuly obsahují tzv. dekapacitační faktory oddalující kapacitační proces do té správné chvíle, přičemž tuto funkci vykonávají pomocí potlačení signálu ke kapacitaci, případně maskují vazebná místa pro ZP oocyty. Po procesu kapacitace je nutné jejich částečné odstranění a proti těmto dekapacitačním faktorům existují v samičím pohlavním traktu naopak faktory podporující kapacitaci, jenž obsahují lipoproteiny s vysokou hustotou a také například glukosaminoglykany (Maxwell et al. 2007).

Tvorba SP v přídatných pohlavních žlázách není plynulá, protože se tvoří a uvolňuje reflektoricky. Za fyziologických podmínek je SP vhodným prostředím pro život, energetickým zdrojem aktivního pohybu spermií a má pufrovací schopnosti. Mezi další funkce SP je ochrana spermií, udržení jejich vnitřního napětí (Kliment 1983).

Složení SP je druhově specifická věc a rozdíly ve složení SP jsou i mezi jedinci, jelikož jsou ovlivněny například sezónou, výživou a velice důležitý aspekt je také stres zvířete (Höffner et al. 2020a).

3.2.1 Přídavné pohlavní žlázy

Přídavné pohlavní žlázy jsou žlázy produkující sekrety, které jsou vyprazdňovány do pánevní části močové trubice poblíž těchto žláz. Přídavné pohlavní žlázy jsou odlišné jak tvarem, tak druhově a některé z nich u některých živočišných druhů dokonce i chybí (Obrázek č. 2). Tyto mezidruhové rozdíly mají vliv na objem i na složení semenné plazmy. Při ejakulaci se sekrety přídavných pohlavních žláz, které se označují jako semenná plazma se smísí se spermii a tekutinou nadvarlete a vytváří tak ejakulát (Reece 2011).

Mezi přídavné pohlavní žlázy řadíme ampuly chámovodu, měchýřkovité žlázy, prostatu a bulbouretrální žlázy. U kance najdeme tři přídavné pohlavní žlázy, a to měchýřkovité žlázy, prostatu a bulbouretrální žlázy (Reece 2011). Například právě kanec má veliké bulbouretrální žlázy, měchýřkovité žlázy i prostatu, zatímco u berana a býka jsou měchýřkovité žlázy také velké, avšak bulbouretrální žlázy a prostata jsou poměrně malé nebo roztroušené. Rozdíly ve velikostech existují proto, že objem a koncentrace spermií v ejakulátu závisí na místě ukládání ejakulátu v samičím traktu a na délce páření. Kanec během své dlouhé ejakulace vloží velký objem ejakulátu s nízkou koncentrací spermií do objemné dělohy prasnice, zatímco býk a beran okamžitě ejakulují malý objem vysoce koncentrovaných spermií do samičí pochvy (Maxwell 2007).

3.2.1.1 Měchýřkovité žlázy

Měchýřkovité žlázy jsou párové žlázy ústící do pánevní části močové trubice společně s chámovody a jimž se také říká semenné váčky, avšak se nevyskytují u všech živočišných druhů a chybí například u psa (Reece 2011). Tyto žlázy jsou velké zhruba 7,5 cm a jsou tvořeny stočenými kanálky. Nachází se mezi rektem a zadní částí močového měchýře a ústí do ejakulačního vývodu, což je společný vývod pro měchýřkovité žlázy a chámovod. Sekret těchto žláz je nažloutlá zásaditá tekutina, jelikož význam zásaditého charakteru spočívá v neutralizaci kyselého pH pochvy (Aumüller et Riva 1992).

Mezi hlavní složky sekretů měchýřkovitých žláz se řadí fruktóza, proteiny, prostaglandiny, fibrinogen, kyselina askorbová, flaviny a další (Aumüller et Riva 1992). Ze sacharidů se v sekretu nachází především fruktóza jejíž hladina v měchýřkovitých žlázách závisí na hormonální aktivitě varlat. Této aktivity se využívá k nepřímému hodnocení androgenní aktivity jedinců, avšak nejčastěji se využívá ve spojení s jinými testy jako je například test hladiny kyseliny citrónové nebo test hladiny kyselých fosfatázy (Gamčík a Kozumplík 1984).

Nejdůležitější funkcí měchýřkovitých žláz je především poskytnutí energie pro spermie právě prostřednictvím produkce fruktózy. Fruktóza slouží jako substrát pro tvorbu ATP během glykolýzy, přičemž produkce ATP je nezbytná pro motilitu spermií. Prostaglandin těchto žláz ovlivňuje stahy hladké svaloviny a v SP ovlivňuje nejen tyto stahy v samčím pohlavním traktu

během ejakulace, ale má také vliv na svalový tonus dělohy a pochvy, a tím podporuje pronikání spermií hlouběji do samičího reprodukčního traktu (Aumüller et Riva 1992).

Tyto žlázy produkují proteiny, jakými jsou například spermadhesiny, které jsou velice důležité především u prasat, ale také u koní (Maxwell et al. 2007).

3.2.1.2 Bulbouretrální žlázy

Bulbouretrální žlázy jsou uloženy nejkaudálněji ze všech přídatných pohlavních žláz. Těmto žlázám se někdy také říká Cowperovy žlázy a nevyskytují se u všech druhů, například u psa zcela chybí (Reece 2011). U různých druhů savců se značně liší vývoj, sekrece i složení bulbouretrálních žláz (Dyce et al. 1999).

Sekret bulbouretrálních žláz je hustý a mléčně zakalený, má bílkovinný charakter a ve styku se sekretem zbytku přídatných pohlavních žláz vytváří želatinové hrušky ucpávající děložní krček prasnice a tím zamezí zpětnému výtoku ejakulátu (Kliment 1983).

Tyto žlázy produkují velmi malou část sekretu semenné plazmy (Amann 2011), ale například u kanců jsou bulbouretrální žlázy velmi vyvinuté a jejich sekret se podílí až z 10-25 % na celkovém množství objemu ejakulátu (Dyce et al. 1999). U kanců tvoří sekret bulbouretrálních žláz jakousi želatinovou zátku v děložním čípku samice, aby se zabránilo zpětnému toku ejakulátu a odchází tudíž při ejakulaci jako poslední (Dyce et al. 1999).

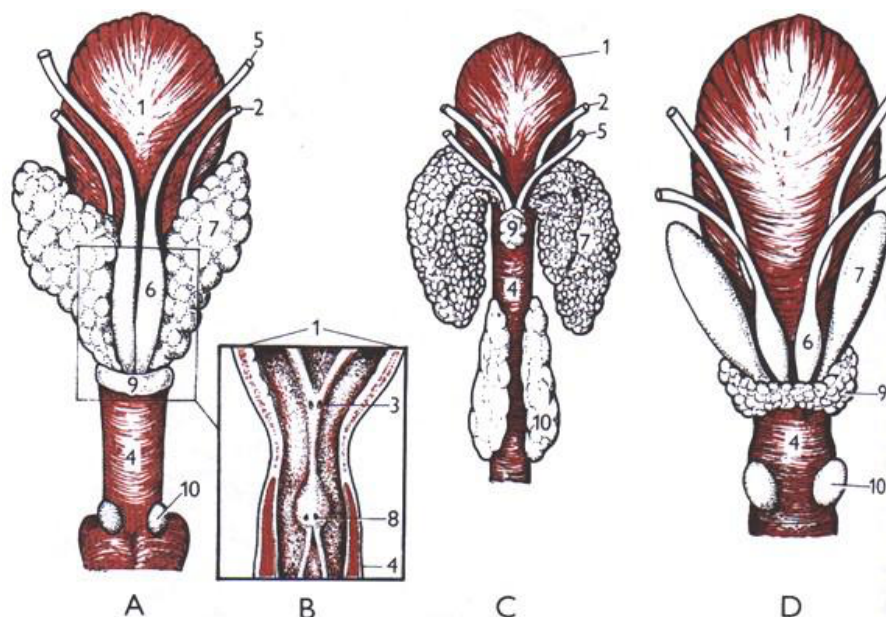
Bulbouretrální žlázy sekretují glykoproteiny účastníci se ochrany a lubrikace močové roury. Mohou se podílet při regulaci metabolické aktivity spermií a při zachování strukturální integrity akrozomové a cytoplazmatické membrány (Badia et al. 2005).

3.2.1.3 Prostata

Prostata neboli předstojná žláza je jedna z přídatných pohlavních žláz, kterou mají všechny druhy živočichů a je velice nápadná například u psa (Reece 2011). Je to uzlíkovitá, nepárová žláza tvořena dvěma laloky, které jsou spojeny tenkým krčkem obklopující močovou trubici a její pravděpodobnou funkcí je vyčištění močové trubice během ejakulace (Amann 2011). Nasedá na krček močového měchýře a obklopuje část močové trubice, a kromě tuboalveolárních žláz je prostata tvořena také vazivem a hladkou svalovinou.

Sekret je alkalický a obsahuje hodně proteinů, kyseliny citrónové a zinku. Sekrece prostaty probíhá především v průběhu první a poslední kontrakce močové trubice (Morel et al. 2008). Dle Klimenta (1983) sekret prostaty obsahuje kyselou fosfatázu, volné aminokyseliny, mucinázu, transaminázu, fibrinogen a další. Je dále zdrojem přítomnosti adrenalinu a prostaglandinu v ejakulátu, čímž ovlivňuje děložní kontrakce (Kliment 1983).

Hodnota celkového pH sekretu prostaty se u kance pohybuje v rozmezí 7-8 a na celkovém objemu ejakulátu se podílí asi z 30 % (Gamčík a Kozumplík 1984).



Obrázek č. 2: Schéma přídatných pohlavních žláz různých druhů hospodářských zvířat (Marvan 2011).

(A) přídatné pohlavní žlázy býka, (B) vyústění močovodů a ejakulačních vývodů býka z ventrální strany, (C) přídatné pohlavní žlázy kance, (D) přídatné pohlavní žlázy hřebce

1 - močový měchýř, 2 - močovod, 3 - vyústění močovodu do močového měchýře, 4 - močová trubice, 5 - chámovod, 6 - ampula chámovodu, 7 - měchýřkovité žlázy, 8 - vyústění ejakulačního vývodu do močové trubice na semenném hrbolku, 9 - prostata, 10 - bulbouretrální žláza

3.2.2 Semenná plazma kanců

SP u kanců se podílí na celkovém objemu ejakulátu až z 98 % (Kliment 1983). Nejpočetnější zastoupení v SP kanců mají proteiny, u kterých se uvádí množství přibližně 40 mg/ml (Höffner et al. 2020a).

Molekuly na povrchu spermií a v SP působí společně, aby stimulovaly či inhibovaly nástup a progresi kapacitace (Suzuki et al. 2002, Poliakov et al. 2009). Předpokládá se, že dekapacitační faktory na membránách spermií a v SP stabilizují membránu a udržují spermie v nekapacitovaném stavu, do té doby, dokud nejsou během kapacitace odstraněny. Bylo zjištěno, že přidáním SP kance či berana ke spermiím zlepšilo životaschopnost a pohyblivost a snížilo změny podobné kapacitace během skladování spermií. Z tohoto důvodu je nutné identifikovat složky kančí SP, které pomáhají udržovat funkci spermií během skladování spermií *in vitro* (Huo et al. 2002, Mendoza et al. 2013, Du et al. 2016).

V kančí SP se také nachází membránové vezikuly nazývané se exosomy, tyto 30-120 nm velké vezikuly jsou produkovány samčích reprodukčním traktem, včetně epididymu a prostaty. Exosomy kančí SP regulují fyziologické procesy ejakulátu, včetně kapacitace, akrozomové reakce a antioxidantace (Piehl et al. 2013).

3.2.2.1 Proteiny kančí semenné plazmy

Semenná plazma (SP) je složena převážně z proteinů, které mají vliv třeba na kvalitu spermií, kapacitaci spermií a fúzi spermie-oocyt (Maxwell et al. 2007, Muino-Bianco et al. 2010, Rodríguez-Martínez et al. 2011, Maldera et al. 2014). Proteiny SP jsou nezbytné pro normální funkci spermií a pro plodnost kance, protože poskytují nutriční podporu a ochranné prostředí pro spermie (Flowers et al. 2016). Bylo také prokázáno, že proteiny SP přispívají k počátečním a centrálním krokům fertilizace, jako například vytvoření rezervoáru spermií ve vejcovodu, modulaci kapacity a interakci gamet. Proteiny v SP mohou ovlivňovat také přežití spermií při kryokonzervaci a následném rozmrazení, anebo bránit kapacitacím změnám, ke kterým může dojít během těchto procesů (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Proteiny SP jsou sekreční proteiny procházející především z nadvarlete a přidavných pohlavních žláz. Podílejí se na změnách povrchu spermií při průchodu samčím reprodukčním traktem a poté během ejakulace. Během tohoto procesu nesoucího souhrnný název post-testikulární maturace získávají spermie schopnost oplodnění (Töpfer-Petersen et al. 2005). Proteiny SP jako koloidy přispívají k udržení osmotického tlaku v chámovodu a dodávají ochranu spermiím proti nepříznivé činnosti elektrolytů SP, anebo se zúčastňují stabilizace pH ejakulátu jako pufrů (Kliment 1983). Skupina proteinů identifikovaných v SP je velmi různorodá a sahá od různých hormonů, enzymů, inhibitorů proteáz, růstových faktorů až po proteiny a glykoproteiny, u kterých stále není jasná jejich povaha a funkce (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Z hlediska molekulární funkce jsou v SP hojně zastoupeny enzymy, z nichž se nejčastěji jedná o proteázy či peptidázy, tj. enzymy štěpící proteiny nebo peptidy. Důležitou součástí SP jsou enzymy chránící spermie před poškozením reaktivními formami kyslíku, mezi které se řadí superoxid dismutáza, glutathion reduktáza, glutathion peroxidáza, kataláza a další. Řada proteinů SP se účastní metabolismu sacharidů, tj. pentózofosfátové dráhy, glykolýzy, glukoneogeneze a metabolismu fruktózy (Gilany et al. 2015).

Klasifikace proteinů SP je vcelku problematická, jelikož způsob klasifikace se liší druh od druhu. Proteiny v rámci tříd se navíc mohou navzájem prolínat. Například právě u kance se můžeme setkat s rozdělením proteinů na tzv. heparin vázající proteiny (heparin binding proteins, HBP) a heparin nevážící proteiny (non-heparin binding proteins, non-HBP) (Jonáková et al. 1998, Maňásková et al. 1999). Hlavní kančí proteinovou složku tvoří především proteiny, které se řadí mezi spermadhesiny (Höffner et al. 2020b) a je jim věnována zvláštní kapitola.

U kanců byl v SP nalezen protein odlišný od spermadhesinů, a to povrchový protein DQH, jenž byl popsán jako protein vázající heparin (Jonáková et al. 1998). DQH protein je homologní s bovinními proteiny SP (BSP) a s hřebčím HSP-1 a 2 (Calvete et al. 1995). Zajímavostí je, že protein DQH se zcela odlišnou strukturou vykazuje podobné vazebné vlastnosti jako spermadhesiny. Jeho vazebná aktivita na fosforylcholin je nejspíše zodpovědná za vazbu proteinu přes cholinfosfolipidy na plazmatickou membránu spermií při ejakulaci, podobně jako proteiny ze SP jiných druhů zvířat (Manjunath et Thérien 2002). DQH se může účastnit vazby spermií do oviduktního rezervoáru a je také schopen interagovat s ligandy přítomnými v tekutině vejcovodu a podílet se na iniciačních procesech kapacity. Navíc u něj

byla zjištěna možná role ve vazbě spermie na oocyt (Tichá et al. 1998, Jonáková et al. 2000, Maňásková et al. 2007).

U několika druhů savců včetně kance byl popsán prostatický sekreční protein β -mikroseminoprotein (MSP). MSP kančí SP vykazuje pouze 50-52% homologii s lidským či opičím MSP (Jeng et al. 2001). MSP je relativně malý neglykosylovaný a hlavní protein sekretu kančí prostaty (Maňásková et al. 2002a, 2002b). Ve studii Maňásková-Postlerová et al. (2011) byl MSP nalezen nejen v prostatě, ale také v ostatních reprodukčních tkáních (Maňásková-Postlerová et al. 2011).

Identifikace proteinů SP prasat souvisejících s plodností by mohla být velmi užitečná pro selekci kanců pro účely umělé inseminace, jako je tomu u skotu (Karunakaran et al. 2015). Pérez-Patio et al. (2018) poukázali na to, že vyšší koncentrace proteinů v SP konkrétně u kanců plemene Landrace je spojena s vyšší mírou zabřezávání, porodností a celkovým počtem vrhů. Některé proteiny SP tedy přímo ovlivňují míru zabřezávání a velikost vrhů, což může ukazovat na potenciál proteinů SP sloužit jako biomarkery související s reprodukcí. Identifikace proteinů je proto vědecky i ekonomicky velice důležitá pro vývoj nových metod pro detekci spermií schopných fertilizace (Pérez Patio et al. 2018). S podobnou studií, avšak u plemene Duroc přišli Mills et al. (2020), kteří zjistili, že šest proteinů rozlišovalo kance podle plodnosti. Kanci s vysokou mírou plodnosti měli vyšší množství superoxiddismutázy (SOD1), kančího semenného proteinu I (PSP-1) a inositol-1-monofosfatázy (IMPA1). Naopak kanci s nízkou mírou plodnosti měli vyšší zastoupení hemoglobinové podjednotky beta (HBB) a Golgiho membránového proteinu 1 (GOLM1) (Mills et al. 2020).

Další proteiny v kančí SP identifikovali Novak et al. (2010) pomocí techniky Western blot, a to osteopontiny (OPN-70, OPN-12 a OPN-9). Přidání osteopontinu během *in vitro* fertilizace u prasat snižovalo míru polyspermie a zlepšovalo vývoj embrya po oplození (Hao et al. 2006).

3.2.2.2 Další složky kančí semenné plazmy

Látky, jakými jsou například prostaglandiny ($\text{PGF}_2\alpha$ a PGE), estrogény a oxytocin usnadňují v SP transport spermií zvýšením kontraktility dělohy u lidí a prasat (Willenburg et al. 2004, Okazaki et al. 2014). Prostaglandiny byly původně spojovány pouze s prostatou, avšak produkují je i například měchýřkovité žlázy (Euler 1983). V SP pomáhají při oplození tak, že reagují s hlenem sliznice děložního krčku a tím usnadňují průchod spermiím (Reece 2011). Dle Maxwell et al. (2007) umělé zvýšení jejich hladiny nezlepšuje oplozovací schopnost spermií či pravděpodobnost oplození.

Jednou ze složek SP jsou extracelulární vezikuly (EV) (Alghamdi et al. 2009, Druart et de Graaf 2018). EV jsou buňkami sekretované struktury, které se zapojují do mezibuněčné komunikace. EV mohou obsahovat proteiny, lipidy, nukleové kyseliny, miRNA a membránové receptory. Po uvolnění do extracelulárního prostoru, jsou EV transportovány do SP, kde interagují s cílovými buňkami, v tomto případě spermiemi (Zaborowski et al. 2015, Alves et al. 2020).

Iontové a prvkové složení a jejich koncentrace mají v SP své nezastupitelné místo (Pesh et al. 2006). Různé studie dokázaly, že koncentrace prvků v SP, jako je vápník (Ca), měď (Cu), železo (Fe), hořčík (Mg), mangan (Mn), selen (Se) a zinek (Zn) ovlivňují kvalitu ejakulátu

všech savců včetně člověka. Například Cu je nezbytná pro spermatogenezi, jelikož je důležitým prvkem, pro řadu enzymů podílejících se na energetickém nebo antioxidačním metabolismu (Wong et al. 2001, Pesch et al. 2006, Villaverde et al. 2014). Ve studii Wong et al. (2001) zjistili pozitivní korelaci mezi koncentrací Cu v krevní plazmě a motilitou spermií (Wong et al. 2001). Cu v cytosolu se váže především na proteiny, avšak nabytečné množství Cu ve své iontové formě (Cu^{2+}) způsobuje toxicitu pro různé buňky, a to včetně spermií. Výzkum Wu et al. (2019) zkoumající ejakulát kanců plemene Duroc ukázal, že nadměrné množství Cu či nepřítomnost Fe a Mn může snižovat kvalitu ejakulátu a toxický neesenciální prvek kadmium (Cd) v SP způsobuje kvalitu také (Wu et al. 2019).

U Zn byl zjištěn pozitivní vliv na kvalitu spermií, protože souvisí s jejich mitochondriální aktivitou (Pipan et al. 2017). Nadbytek Zn v ejakulátu kanců však způsobuje poškozování DNA spermií (García-Contreras et al. 2011).

Dle výzkumu Usuga et al. (2017) vysoké koncentrace vitamínu E, Cu, Fe a Zn zlepšují integritu plazmatické membrány spermií a vitalitu spermií v čerstvém ejakulátu.

Je známo, že Fe je velice nezbytný prvek pro syntézu nukleových kyselin a proteinů, buněčnou respiraci, proliferaci a diferenciaci (Lieu et al. 2001), což souvisí se spermatogenezí a metabolismem spermií (Wise et al. 2003). Fe v reprodukčním traktu samců se většinou vyskytuje buď váže na transferin, který je produkován Sertoliho buňkami, či se váže na haptoglobin, jenž je produkován Sertoliho, Leydigovými a zárodečnými buňkami. Tyto proteiny obsahující katalyticky inaktivní železo kvůli zamezení extenzivní oxidace (Pesch et al. 2006). Nízká koncentrace železa v ejakulátu byla v pozitivní korelaci s vitalitou a integritou membrány spermií, zatímco vysoká koncentrace pozitivně korelovala s výsledky celkové a progresivní motility (Usuga et al. 2017). Dle studie Wu et al. (2019) vyšší koncentrace Fe může zvyšovat celkovou fyziologii spermií (Wu et al. 2019).

Mezi další prvky ovlivňující kvalitu ejakulátu se řadí také mangan (Mn) jehož vysoká koncentrace snižuje procento abnormálních spermií (Wu et al. 2019) nebo selen (Se), který ovlivňuje metabolismus spermií a další (Maringuzman et al. 2000).

3.2.3 Mezidruhové rozdíly semenné plazmy

Proteiny kopytnatců se dají dělit na tři rodiny obsahující proteinové moduly. Rodiny se nazývají Fn-2, CRISP a spermadhesiny. U většiny druhů, mimo hřebců se nachází především Fn-2 a spermadhesiny, zatímco u hřebců se vyskytuje pouze jeden protein z rodiny spermadhesinů (HSP-7) a většina ostatních je z rodin Fn-2 a CRISP (Töpfer-Petersen et al. 2005, Calvete et Sanz 2007). Fn-2 proteiny jsou charakteristické dvěma či čtyřmi tandemově uspořádanými jednotkami fibronektinu typu 2 (Fn-2). CRISP neboli cystein rich secretory proteins jsou, jak již vyplývá z jejich názvu, proteiny bohaté na cystein a účastní se procesů fúze spermie a oocyty a blokády průchodu iontů přes membránu (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Obsah proteinů v SP hřebců je relativně nízký, a to kolem 10 mg/ml, na rozdíl od jiných savců, u kterých se obsah proteinů SP pohybuje v rozmezí 20-60 mg/ml (Töpfer-Petersen et al. 2005). U hřebců v SP se nachází proteiny, které jsou označovány jako HSP 1-8 (horse seminal plasma proteins). Calvete et al. (1994) právě tyto proteiny izolovali a popsali, že mají nízkou molekulovou hmotnost v rozmezí 14-30 kDa a tvoří většinu proteinů v SP hřebců. Všechny tyto proteiny mimo HSP-4 byly objeveny na povrchu spermií, což naznačuje jejich případnou roli

při fertilizaci. Všechny proteiny mimo tedy HSP-4, který je podobný kalcitoninu, mají schopnost vázat se na spermie a mohou být izolovány z ejakulovaných spermií (Töpfer-Petersen et al. 2005). HSP-7 váže sacharidy a dále také se váže na ZP, což dokazuje jeho roli v interakci spermie a vajíčka (Reinert et al. 1996). HSP-7 se vyskytuje již na spermatogoniích a spermiích odebraných z varlat (Töpfer-Petersen et al. 2005). HSP-7 je velice příbuzný s kančím Awn spermadhesinem, který je podrobněji popsán v samostatné kapitole. Protílátka rozpoznávající kančí Awn dokáže reagovat s hřebčím HSP-7, což vyplývá i z 98 % shody sekvence jejich aminokyselin (Reinert et al. 1997, Calvete et al. 2004). U hřebce se tento spermadhesin nachází výhradně v ekvatoriálním segmentu spermie (Reinert et al. 1997).

V semenné plazmě skotu se nejčastěji vyskytují BSP (bovine seminal plasma proteins) proteiny, což je skupina proteinů vázajících fosfolipidy. BSP proteiny podle novější nomenklatury z angl. Binder Sperm Protein (Plante et Manjunath 2015) obsahují dvě homologní domény typu Fn-2. Tyto proteiny jsou produktem měchýřkovitých žláz, které se při ejakulaci váží na membránu spermií (Manjunath et Sairam 1987, Manjunath et al. 1987, 1988,). U skotu nalezneme v SP také například již zmíněné spermadhesiny, především SFP (SPADH1) a Z13 (SPADH2) (Haase et al. 2005).

V SP beranů tvoří 30 % BSP proteiny, které se někdy označují jako RSP nebo RSVP protein (Manjunath et al. 2007). Vysoce zastoupenými proteiny jsou v SP beranů BSP1 a BSP5 a dále také proteiny rodiny spermadhesinů, především bodhesin2, přičemž všechny tyto proteiny pocházejí z měchýřkovitých žláz (Soleihavoup et al. 2014).

3.3 Spermadhesiny

Proteiny řadící se mezi spermadhesiny tvoří hlavní proteinovou složku SP kanců a je to rodina velice multifunkčních 12-16 kDa glykoproteinů, a právě v kančí SP tvoří až 75-90 % celkového objemu (Töpfer-Petersen et al. 1998, Höffner et al. 2020a). Spermadhesiny jsou nejvíce prozkoumané proteiny v SP u kanců s velmi dobře popsanými sekvencemi aminokyselin (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002). N-terminální aminokyselinová sekvence všech členů AQN a Awn rodiny začíná buď Ala-Gln-Asn (AQN) nebo Ala-Trp-Asn (Awn). Prase obsahuje pět blízce příbuzných genů, které kódují spermadhesiny Awn, Aqn-1, Aqn-2, Aqn-3, PSP-I a PSP-II (Töpfer-Petersen et al. 1998, Haase et al. 2005, Töpfer-Petersen et al. 2005).

3.3.1 Struktura spermadhesinů

Spermadhesiny se vyskytují u kanců hlavně jako heterodimery především PSP-I a PSP-II, ale mohou se také vyskytovat u jiných druhů zvířat jako homodimery což je příklad již zmíněného SFP neboli bovinního spermadhesinu. Tvorba dimerů je tedy nejspíše specifická pro jednotlivé spermadhesiny (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002). Po objasnění krystalové struktury obou nekovalentních dimerních komplexů byla odhalena struktura CUB domény (Romero et al. 1996, 1997, Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002). Spermadhesiny totiž zahrnují 110-133 aminokyselin, přičemž sekvence aminokyselin je u všech spermadhesinů z 40–60 % shodná (Töpfer-Petersen et al. 2005, Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002). Tyto aminokyseliny obsahují jedinou doménu, kterou je právě doména CUB. CUB je zkratka pro první písmena tří prvních popsaných proteinů obsahujících tuto doménu, mezi které patří složky komplementu

C1r/C1s, Uegf (embryonální proteiny ježovky) a Mbp1 (kostní morfogenní protein 1). Domény CUB byly nalezeny od prokaryot až po člověka ve funkčně odlišných proteinech a je známo, že fungují primárně při interakci protein-protein (Bork et Beckmann 1993).

CUB doména se stabilizuje pomocí dvou disulfidických můstků se sousedními cysteinovými zbytky. Pomocí krystalové struktury tří členů (komplex PSP-I/PSP-II a sSFP) byla odhalena struktura CUB domény skládající se z β -sendviče tvořeného dvěma β -listy (Romero et al 1997). Každý list CUB domény s β -listy obsahuje dva paralelní a čtyři antiparalelní β -řetězce. Disulfidické můstky mezi cysteinovými zbytky jsou konzervované ve všech známých molekulách spermadhesinů (viz obrázek č. 3) (Calvete et al. 1995a).



Obrázek č. 3: Znárodnění struktury PSP-I zobrazující CUB doménu (Varela et al 1997).

Disulfidové můstky mezi nejbližšími sousedními cysteinovými zbytky jsou znázorněny jako červené kuličky a jako zelené tyčinky. Poloha glykosylovaných zbytků PSP-I a PSP-II jsou značeny modrou kuličkou.

3.3.2 Funkce a vlastnosti spermadhesinů

Spermadhesiny jsou multifunkční proteiny vykazující schopnost vázat různé ligandy. Jak již bylo výše popsáno, tak některé spermadhesiny, např. AQN (1-3) a AWN, jsou schopny vázat heparin (Assreuy et al. 2002). Kromě heparinu vykazují také vazbu k jiným sacharidům, inhibitorům proteináz a fosfolipidům (Töpfer-Petersen et al. 1998). Mezi nejdominantnější proteiny vázající sacharidy se řadí AQN-1, AQN-3 a AWN, a právě díky své vazebné afinitě k sacharidům se podílejí na krocích vedoucích k oplodnění (Wagner et al. 2002, Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005, Sabeur et Ball 2007). Při fertilizaci mohou spermadhesiny mít různé role, jelikož se účastní procesů jako je kapacitace a tvorba ovidukálního rezervoáru (Jonáková et al. 2000, Töpfer-Petersen et al. 2005).

Spermadhesiny v kančí SP převažují v agregovaných formách nad jejich monomerními formami. Agregované formy se umí vázat na fosforylcholin a tato vazba poukazuje na interakci spermadhesinů s fosfolipidy na plazmatické membráně spermií (Jonáková et al. 2000). Tendence tvorby spermadhesinových komplexů s vyšší molekulovou hmotností byla pozorována u AQN a AWN, ale přesto existuje výjimka a tou je spermadhesin AQN-1, jelikož AQN-1 se totiž mnohem méně podílí na vzájemných interakcích (Maňásková et al. 2003).

Komplexy AQN a AWN interagují s cholesterolem, což může mít význam při procesu kapacitace (Thérien et al. 1998). Epididymální spermie váží spermadhesinové komplexy mnohem silněji než spermie ejakulované (Jonáková et al. 2000).

Spermadhesiny se řadí také mezi tzv. dekapacitační faktory, což jsou stabilizační proteiny (Maxvell et al. 2007) vážící se na plazmatickou membránu spermie přes dvě vrstvy. Tou první je vrstva monomerní formy spermadhesinů AWN-1 a AQN-3 navázaných přes fosfolipidy. Na tuto vrstvu se váží agregované formy těch samých spermadhesinů a tato druhá vrstva plní stabilizační funkci (Dostálová et al. 1995, Caballero et al. 2008).

AWN je velice hojný ve frakci bohaté na spermie, jenž tvoří hlavní frakci ejakulátu (Rodríguez-Martínez et al. 2009) a ve spermiích kanců lokalizován po celé akrozomální čepičce, a tudíž se spermadhesin AWN váže na povrch spermie (Reinert et al. 1997). Na hlavičce spermie se nachází i spermadhesin AQN-1, který zprostředkovává vazbu na stěnu vejcovodu a účastní se vazby na oviduktální rezervoár, a tím ovlivňuje dobu kapacitace. Po začátku kapacitace se koncentrace AQN-1 snižuje, čímž se snižuje i schopnost spermií vázat se na stěnu oviduktu a díky tomu jsou spermie z oviduktálního rezervoáru uvolněny (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005).

Například proteiny AQN díky spojení s povrchem spermie při ejakulaci přispívají k tvorbě oviduktálního rezervoáru pomocí interakce s glykokonjugáty epitelu čímž má velkou škálu navazujících sacharidů, zatímco spermadhesin AWN váže pouze galaktózu (Wagner et al. 2002, Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005, Sabeur et Ball 2007).

Spermadhesiny AWN a AQN3 se váží na povrch spermií pomocí interakce s fosfolipidy v plazmatické membráně spermie a tím zabraňují předčasné akrozomové rakci (Dostálová et al. 1995). Během kapacitace se část spermadhesinů z povrchu spermií uvolňuje a část na povrchu zůstává a je zapojena do vazby spermií na ZP oocyty (Dostálová et al. 1994, Ensslin et al. 1995, Töpfer-Petersen et al. 1998).

PSP proteiny řadící se mezi heparin nevázející proteiny jsou spermadhesiny, které obalují spermie, podílejí se na kapacitaci spermií a jsou součástí procesu rozpoznávání a vazby gamet (Kwok et al. 1993b, Calvete et al. 1995a). PSP jsou svou strukturou podobné lidskému glykodelinu, jenž má imunopresivní účinky. To je zajišťováno terminálními sialovanými strukturami. Oligosacharidy nesoucí sialované struktury LacNAc či LacdiNAc vykazují imunopresivní účinek tím, že blokují adhezivní a aktivační děje zprostředkované CD22 neboli lidským receptorem spojeným s B-buňkami. Kančí semenné proteiny tyto imunopresivní účinky vykazují také, přičemž tato aktivita je spojena s proteiny o velikosti 14 kDa (Veselsky et al. 1996, Nimtz et al. 1999, Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002).

3.4 Proteomika spermií

Proces oplodnění vyžaduje ty spermie, které jsou schopné provést řadu po sobě jdoucích a nezbytných procesů vedoucích k životaschopnému embryu. Všechny tyto procesy úzce souvisejí se změnami v expresi nebo konfiguraci proteinů na membráně spermie, které mohou interagovat s proteiny v reprodukčních tekutinách během zrání spermie (Dacheux et al. 2012, Druart et de Graaf 2018).

Proteomika zahrnuje rozsáhlé studie proteinů, včetně kvantitativní exprese, posttranslačních modifikací (PTM) a proteinových interakcí (Wright et al. 2012). PTM jsou

modifikace ve strukturách a funkcích proteinů, ke kterým dochází po jeho syntéze a jsou považovány za klíčové události pro funkci spermií a potenciální fertilitu (Brohi et Huo 2017).

Spermie jsou již při průchodu nadvarletem vystaveny tekutině, jež obsahuje velké množství různých proteinových složek, jakými jsou například adhezivní molekuly, enzymy a jejich inhibitory a další. Veškeré tyto složky poté ovlivňují posttestikulární zrání spermií (Dacheux et al. 2009). Některé proteiny z epididymální tekutiny se mohou vázat na povrch spermií a hrát roli v dalších krocích reprodukčního procesu či ovlivnit zrání spermií. Proteinové složky vázající se na povrch spermií jsou během zrání zpracovány pomocí enzymů, a to především proteinázami, glykosyltransferázami a glykosidázami (Dacheux et al. 2003).

V extraktu savčích spermií tvoří výnamný proteinový podíl proteináza akrosin, která je exprimována již ve varlatech (Nayernia et al. 1996). Akrosin se již podle svého názvu nachází v akrozomu spermií (Moreno et Barros 2000). Ve spermatidách byl nalezen jako zymogen neboli neaktivní forma, které se říká proakrosin, jež pomocí zvýšení intraakrozomálního pH během procesu kapacitace změní na svojí aktivní formu, kterou je akrosin (Baba et al. 1989). Akrosin se účastní akrozomové reakce, vazby spermie na ZP oocyty a pomáhá k penetraci spermie skrze ni (Mao et Yang 2013).

Přestože jsou spermadhesiny popisovány jako hlavní proteiny kančí SP, tak jejich přítomnost je popsána i na membráně spermií. Jejich možné účinky na spermie jsou od motility až po interakci s oocytem (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005, Maňásková et Jonáková 2008). Spermadhesiny jsou lokalizovány v akrozomální části hlavičky spermie, kam se stejně jako protein DQH váží během ejakulace (Töpfer-Petersen et al. 1998, Maňásková et al. 2007, Maňásková et Jonáková 2008). Spermadhesiny svou vazbou na povrch spermií vytváří proteinové obalové vrstvy a také se účastní různých typů interakcí v dalších krocích reprodukčního procesu (Maňásková et Jonáková 2008), jak již bylo pospáno v předchozí kapitole věnované této proteinové rodině.

Již zmíněný MSP protein se nachází i na spermiích, přítomnost MSP proteinu u kanců byla prokázána pomocí imunofluorescence nejen na povrchu spermií, ale také v akrozomu. Funkce MSP není zcela objasněna, je však možné, že MSP ovlivňuje vývoj a zrání spermií, či se účastní interakce spermie se ZP jako sekundární vazebný receptor (Maňásková-Postlerová et al. 2011).

Na plazmatické membráně spermie v apikální oblasti hlavičky byl lokalizován periferní protein lactadherin (p47). Protein p47 se váže na spermie již při jejich vývoji ve varlatech (Ensslin et al. 1998). Během kapacitace se p47 dostává z apikální oblasti hlavičky do celé akrozomální oblasti spermie (Petrunina et al. 2003). Předpokladem je, že se redistribuce a degradace kančího proteinu p47 účastní během kapacitace také ubiquitin-proteasomový systém (UPS). Pomocí UPS během degradace proteinu dochází k ubiquitinaci p47 a k jeho následné degradaci 26S proteasomem na kančích spermiích (Zigo et al. 2019, Tumova et al. 2020).

Mezi hlavními proteinové složky ve spermiích patří také α - a β -tubuliny jako součást mikrotubulů. (Oakley 2000, Kierszenbaum 2002). Ze studie Audebert et al. (1999) vyplývá, že inhibice β -tubulinu snižuje frekvenci kmitání bičíku přerušením interakce tubulin s dyneinem. Toto zjištění naznačuje, že β -tubulin je zodpovědný za udržování hyperaktivace spermií potřebné pro kapacitaci (Audebert et al. 1999).

3.5 Uchovávání ejakulátu a vliv složek SP

Konzervace ejakulátu má za úkol co nejvíce prodloužit vitalitu spermií a zároveň také zachovat jejich fertilizační schopnost. Uchování vitality spermií a jejich fertilizační schopnosti je možné pouze ve stavu takzvané anabiózy. Při stavu anabiózy se velmi silně utlumí všechny životní pochody, především metabolismus a pohyblivost. Pokud se odstraní podmínky, které vyvolají stav anabiózy, tak se obnoví životní pochody v plném rozsahu (Gamčík a Kozumplík 1984).

S postupným zlepšováním biotechnologií asistované reprodukce roste poptávka po genetickém materiálu těch nejlepších plemenů. Pokrytí neustále více rostoucí poptávky vyžaduje využívání inseminačních dávek (ID) umožňující produkce více mláďat na plemena za rok (Panarace et al. 2014). Uchovávání ID je možné krátkodobě či dlouhodobě (Kayser et al. 1992, Hernández et al. 2018).

Inseminační dávky musí být z nativního či z velice dobře konzervovaného ejakulátu, takže ejakulát musí být uchováván v dokonalém médiu k zachování jeho kvality. V souladu s tím je nutné vyvinout kvalitní ředidla ejakulátu, které se využívají k uchování ejakulátu, ať už během chlazení či během kryokonzervace (Raheja et al. 2018, Santos et al. 2018). Ředidla chrání spermie, zachovávají jejich motilitu a fertilizační schopnost. Dále také poskytují spermii energetické substráty a zabraňují škodlivým účinkům změn pH a osmolarity (Foote et Leonard 1964).

Existují individuální rozdíly mezi jednotlivými kanci, pokud jde o zachování kvality ejakulátu během skladování *in vitro* (Kommisrud et al. 2002). Tuto skutečnost lze z části připsat citlivosti spermií specifické pro kance s vyšší koncentrací SP během skladování po dobu 144 hodin (Höfner et al. 2020b).

3.5.1 Krátkodobé uchovávání ejakulátu

V posledních desetiletí bylo v rámci rozvíjejících se reprodukčních biotechnologií provedeno mnoho studií, které se zabývaly úlohou SP. Proteiny SP jsou schopny chránit spermie před chladovým šokem (Watson 2000) nebo destabilizací plazmatické membrány (Maxwell et Johnson 1999). U kanců bylo prokázáno, že přítomnost SP zlepšuje kvalitu a fertilizační schopnost skladovaných spermií tím, že chrání spermii před chladem a poškozením (Okazaki et al. 2009). Existuje skutečnost, že se složení SP liší nejen mezi různými druhy, samci v rámci druhu, a dokonce i ejakuláty stejného jedince, ale také podle ejakulované frakce (Pena et al. 2006, Dziekońska et al. 2017). Spermie získané z frakce bohaté na spermie (SRF) totiž odolávají skladování a kryokonzervaci lépe než ty, které byly vystaveny SP připravenému z celého ejakulátu, protože jsou vystaveny především epididymálními tekutinám a sekretům prostaty, avšak ne sekretům měchýřkovitých a bulbouretrálních žláz bohatých na proteiny (Rodriguez-Martinez et al. 2009, Alkmin et al. 2014, Li et al. 2018).

Podle studie Dziekońska et al. (2017) byly využity dvě frakce, tou první byla celá frakce SRF (F1) a druhá obsahovala jen část SRF a z větší části frakci postspermiovou (F2). Spermie z F1 zůstávají mnohem více vystaveny tekutině z *cauda epididymis* a jejím specifickým proteinům, jako jsou lipokaliny včetně prostaglandin D syntázy lipokalinového typu související s plodností. Navíc spermie z F1 jsou vystaveny menšímu množství bikarbonátu, zinku či

fruktózy, a hlavně spermadhesinu PSP-I (Dziekońska et al. 2017). Podobně Zasiadczyk et al. (2015) odhalili, že hlavním zdrojem proteinů v F2 jsou měchýřkovité žlázy. Tyto sekrety obsahují proteiny, převážně spermadhesiny představujících více než 90 % kančích SP proteinů, které interagují se spermii a mají různé účinky a funkce (Rodriguez-Martinez et al. 2011, Zasiadczyk et al. 2015), jak bylo již popsáno v předchozích kapitolách. Životaschopnost a motilita spermií jsou určeny právě přítomností spermadhesinů. Předpokládá se tedy, že rozdíly mezi F1 a F2 vyplývají z přítomnosti těchto proteinů a z jejich koncentrace (Centurion et al. 2003). Výsledky ukázaly, že frakce ejakulátu, využití ředidlo, kanec, den skladování a interakce mezi těmito faktory významně ovlivňují kvalitu spermií při krátkodobém skladování v tekutém stavu. To by mohlo být způsobeno právě přítomností proteinů SP. Ředidla pro dlouhodobé skladování obsahující proteiny SP byly účinnější v ochraně spermií před poškozením než ředidla pro krátkodobé skladování, bez ohledu na frakci ejakulátu (Dziekońska et al. 2017).

I přes pokročilé technologie, jako je kryokonzervace, nebo třídění spermií podle pohlaví, zůstává skladování spermatu v kapalině velmi široce využíváno v umělém chovu domácích hospodářských zvířat, a to zejména u prasat. Podle Waberski et al. (2019) v 99 % inseminačních dávek využívaných pro umělý odchov se kančí ejakulát skladuje při 17 °C (Waberski et al. 2019). Zpracování ejakulátu pro konzervaci v tekutém stavu je pro ejakulát méně škodlivé ve srovnání se zmrazením ejakulátu, a to kvůli absenci mechanických sil, šoku z chladu a extrémně vysokému ředění. Existuje však obava, že tento takzvaný „efekt ředění“ ovlivňuje oplodnění snížením motility spermií (Maxwell et al. 1997).

Obvykle se skladují a zpracovávají celé ejakuláty, aby se optimalizovala dostupnost spermatu pro inseminační dávky (Luther et Waberski 2019). U kance, ale i jiných druhů zvířat, se mohou využít ředidla ejakulátu, přičemž většina komerčně dostupných ředidel postrádá mléko nebo jiné živočišné bílkoviny (Höffer et al. 2020a). Ejakuláty odebrané pro umělou inseminaci jsou ředěny, aby byl získán větší počet inseminačních dávek, přičemž požadovaný počet spermií pro umělou inseminaci druhově kolísá. Například u skotu se blíží 10 milionům, u ovcí 125 milionům a u prasat a koní dokonce až ke 2 miliardám (Reece 2011).

3.5.2 Kryokonzervace

Kryokonzervace ejakulátu dobrých plemenů je velmi důležitou a velmi žádanou reprodukční biotechnologií, jenž umožňuje skladování cenných genetických materiálů po nekonečně dlouhou dobu pro jejich další využití v chovu či národních programech genetické ochrany zvířat (Pursel et Johnson 1975, Fahy 1986, Hammerstedt et Graham 1992, Yeste 2016).

Kvalita ejakulátu kanců a jeho mrazitelnost se velice liší mezi jednotlivými plemeny, zvířaty a také je ovlivněna ročním obdobím (Jovičić et al. 2020). Kryokonzervovaný ejakulát může pomoci kontrolovat zavlečení patogenů do chovu (Knox 2015, Yeste 2017). Mimo to je díky tomu možné snížit počet kanců na farmách, což usnadňuje vytvoření genofondu, genetickou výměnu a pokroky v genetické selekci v chovech (Knox 2015, Waberski et al. 2019).

Přestože využití kryokonzervovaného kančího ejakulátu přináší mnoho výhod, tak této biotechnologické metody využívá méně než 1 % umělých inseminací (Waberski et al. 2019), jelikož kryokonzervace může kančí spermie poškodit. Poškození spermií má za následek nižší

míru přežitelnosti. Míra přežitelnosti spermií je mnohem významnější u kanců než u jiných druhů hospodářských zvířat, u nichž je kryokonzervace běžně využívanou metodou (Mazur et al. 2008, Techakumphu et al. 2013). Proces kryokonzervace hraje důležitou roli v kvalitě mraženého a rozmraženého ejakulátu kance tím, že životaschopnost spermií je po zmrazení snížena na více než 50 %, což má za následek nízkou míru zabřeznutí a malou velikost vrhu po umělé inseminaci (Almlid et Hofmo 1996, Eriksson et al. 2002).

Důvodem nižší fertility některých plemeníků může být například osmotický stres, kterým spermie prochází po přidávání různých kryoprotektantů před samotným zmražením, jelikož používaný glycerol je toxický pro spermie zvířat (Fahy 1986, Hammerstedt et Graham 1992). Koncentrace kryoprotektantů patří mezi hlavní faktory, které mohou ovlivnit kvalitu ejakulátu při procesu zmrazování, dále se mezi tyto hlavní faktory řadí použití vhodného ředidla, systém plnění pejet a rychlost zmrazování. Kryoprotektanty mají snižovat rozsah chemického poškození spermií, k němuž může dojít během zmrazování. Pokud by se kryoprotektiva nepoužívala, tak by docházelo ke zvyšování intracelulární koncentraci iontů, a to by dále vedlo k chemickému poškození spermií (Rubinsky et al. 2005).

Přidané složky v ředidlech používaných při kryokonzervaci pomáhají spermii překonat chladový šok. Tato dlouhodobá ředidla obsahují komplexní pufovací činidla (tj. HEPES, Tris a další) a také antioxidanty (beta-karoten, cystein, taurin, vitamín E či kyselinu askorbovou) (Alvarez et Storey 1995, Gadea 2003).

Plazmatická membrána spermií je vysoce dynamickou strukturou regulující nejen extracelulární výměny, ale také proces fertilizace (Flesch et Gadella 2000). Rozdíly v lipidovém složení plazmatické membrány spermií byly navrženy jako klíčový faktor v různé zmrazitelnosti spermií (Parks et Lynch 1992). Specifické lipidové složení uděluje plazmatické membráně spermií větší tekutost na základě mnoha dvojných vazeb (Erickson 1998). Na základě výskytu mnoha dvojných vazeb může tato specifická fyzikální změna dát membránám lepší odolnost proti poškození vznikajícímu tvorbou ledových krystalků (Penny et al. 2000, Rooke et al. 2001). Tyto krystalky zvyšují koncentraci rozpuštěných látek v ředidle a vytvářejí osmotický gradient na membráně spermií, což má za následek buněčnou dehydrataci (Hammerstedt et al. 1990, Watson 2000).

Bubeníčková et al. (2020) zkoumali účinky vybraných skupin proteinů SP u hřebce, které by mohly hrát důležitou roli při snižování škodlivých účinků na hřebčí spermie během kryokonzervace. Výsledky ukázaly, že přidání těchto frakcí výrazně neovlivňuje integritu plazmatické membrány a kapacitační stav spermií hřebců a účinek SP proteinů na funkci spermií je závislý na koncentraci (Bubeníčková et al. 2020).

4 Materiál a metody

Pro tuto diplomovou práci byly použity nativní ejakuláty (spermiová frakce) od kanců plemene Duroc z inseminační stanice LIPRA PORK, a.s. Skršín, které byly převezeny do laboratoře v polystyrenovém boxu. Nativní ejakuláty byly zpracovány v laboratoři v den jejich odběru na Katedře veterinárních disciplín na České zemědělské univerzitě v Praze.

4.1 Použité vzorky

Tabulka č. 1: Využité vzorky semenné plazmy se jmény jednotlivých kanců, datem jejich odběru, zpracování spolu s jejich objemy a koncentracemi.

Jméno kance	Datum odběru a zpracování vzorků											
	6.6.2022		13.6.2022		20.6.2022		27.6.2022		6.9.2022		20.9.2022	
	Obj.	Konc.	Obj.	Konc.	Obj.	Konc.	Obj.	Konc.	Obj.	Konc.	Obj.	Konc.
	ml	10 ⁶ /ml	ml	10 ⁶ /ml	ml	10 ⁶ /ml	ml	10 ⁶ /ml	ml	10 ⁶ /ml	ml	10 ⁶ /ml
Jeep	162	485					146	647				
Chlór	124	853					160	1110				
Larva			104	619								
Igor			198	947								
Grál					149	494						
Jura					132	1010			216	531	170	403
Krysa									174	356		

Obj.= Objemy, které jsou v tabulce udávány v ml v levých sloupcích.

Konc.= Koncentrace, které jsou šedě vyznačeny v pravých sloupcích a jsou uvedeny v 10⁶/ml.

Tabulka č. 2: Využité vzorky spermií se jmény jednotlivých kanců, datem jejich odběru, zpracování spolu s jejich objemy a koncentracemi.

Jméno kance	Datum odběru a zpracování vzorků									
	6.6.2022		20.6.2022		27.6.2022		6.9.2022		20.9.2022	
	Obj.	Konc.	Obj.	Konc.	Obj.	Konc.	Obj.	Konc.	Obj.	Konc.
	ml	10 ⁶ /ml	ml	10 ⁶ /ml	ml	10 ⁶ /ml	ml	10 ⁶ /ml	ml	10 ⁶ /ml
Jeep	162	485			146	647				
Chlór	124	853			160	1110				
Jura			132	1010			216	531	170	403
Krysa							174	356		

Obj.= Objemy, které jsou v tabulce udávány v ml v levých sloupcích.

Konc.= Koncentrace, které jsou šedě vyznačeny v pravých sloupcích a jsou uvedeny v 10⁶/ml.

Tabulka č. 3: Využité vzorky pro izolaci proteinů z povrchu spermií se jmény jednotlivých kanců, datem jejich odběru, zpracování spolu s jejich objemy a koncentracemi.

Jméno kance	Datum odběru a zpracování vzorků					
	26.7.2022		3.10.2022		14.11.2022	
	Obj.	Konc.	Obj.	Konc.	Obj.	Konc.
	ml	10 ⁶ /ml	ml	10 ⁶ /ml	ml	10 ⁶ /ml
Jura	164	374	214	507		
Kuna	194	684			196	445
Chlór			136	952	168	950

Obj.= Objemy, které jsou v tabulce udávány v ml v levých sloupcích.

Konc.= Koncentrace, které jsou šedě vyznačeny v pravých sloupcích a jsou uvedeny v 10⁶/ml.

4.2 Zpracování ejakulátu

Ejakuláty kanců byly vloženy do vodní lázně vyhřáté na 37 °C. Do mikrozkuřavky bylo vždy odměřeno po 1 ml ejakulátu a stočeno na centrifuze (LC-8 5000, Benchmark Scientific, USA) na 300 x g 10 min při laboratorní teplotě. Po skončení centrifugace byl odebrán supernatant do nových mikrozkuřavek a následovalo opětovné stočení na centrifuze při 1000 x g a 10 min. Takto stočený supernatant v mikrozkuřavkách byl dán do chlazené centrifugy (Hettich Mikro 22R, Německo) na 4 °C a odstředěn při 10 000 x g během 5 minut. Po stočení byl odebrán supernatant obsahující semennou plazmu do nových mikrozkuřavek a uložen při -20 °C.

Stanovení množství proteinů v semené plazmě získané z jednotlivých ejakulátů bylo provedeno pomocí přístroje Qubit dle návodu výrobce (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_dsDNA_HS_Assay_UG.pdf).

4.2.1 Precipitace proteinů ze semenné plazmy pro SDS elektroforézu

Pro precipitaci proteinů ze semenné plazmy pro využití pro SDS elektroforézu bylo odebráno 100 µl zpracované semenné plazmy a přidáno 600 µl vymraženého acetonu. Proteiny byly alespoň na 1 hodinu precipitovány při -20 °C.

Mikrozkuřavky po precipitaci byly centrifugovány při 5000 x g při 4 °C po dobu 5 minut. Následně byl supernatant odstraněn a k proteinům bylo přidáno 150 µl neredukujícího vzorkového pufru (0,5 M Tris-HCl (Bio-Rad, USA), pH 6,8; glycerol 2% SDS; 0,05% bromfenolová modř) a zvortexováno. Následovalo povaření vzorků v termobloku (TS-100, BioSan, Litva) při teplotě 100 °C po dobu 5 minut. Připravené vzorky proteinů semenné plazmy byly dále separovány pomocí SDS elektroforézy.

4.2.2 Zpracování spermií pro celkové lyzáty

Ejakuláty kanců byly vloženy do vodní lázně vyhřáté na 37 °C. Do mikrozkuřavky bylo vždy odměřeno po 1 ml ejakulátu a stočeno na centrifuze (LC-8 5000, Benchmark Scientific, USA) na 300 x g 10 min při laboratorní teplotě stejně jako zpracování SP. Po skončení

centrifugace byl odstraněn supernatant a vzorek doředen 1 ml promývacího roztoku PBS (0,01 M Phosphate-buffered saline, 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7; Sigma-Aldrich, USA) a opatrně rozsuspendován. Následovalo opětovné stočení na centrifuze při 300 x g a 5 min, které spolu s promytím PBS bylo zopakováno celkem třikrát. Takto připravený vzorek byl rozpipetován po 200 µl do mikrozkušavek a opět stočen při 300 x g a 5 min. Po stočení byl odebrán supernatant obsahující spermie do nových mikrozkušavek a uložen při -20 °C, nebo ihned využit k dalšímu zpracování.

K 200 µl připraveného vzorku z nativního ejakulátu bylo přidáno 200 µl vzorkového neredukujícího pufru a rozsuspendováno. Poté proběhla lyzace vzorků na ledu po dobu 20-30 minut a zvortexováno. Následovalo povaření vzorků v termobloku (TS-100, BioSan, Litva) při teplotě 100 °C po dobu 5 minut a takto stočené vzorky v mikrozkušavkách byly dány do chlazené centrifugy (Hettich Mikro 22R, Německo) na 4 °C a odstředěn při 10 000 x g během 2 minut. Posledním krokem bylo odebrání supernatantu po centrifugaci do nových mikrozkušavek. Připravené vzorky spermií byly dále separovány pomocí SDS elektroforézy.

4.2.3 Izolace proteinů z povrchu spermií

K izolaci proteinů z povrchu spermií byly použity ejakulované vzorky spermií z nativního ejakulátu s pomocí soupravy Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

Od každého kance bylo odebráno do větší falkony po 1 ml nativního ejakulátu, naředěno 5 ml PBS a odstředěno při 300 x g 10 minut. Spermie byly promyty 3x 5 ml PBS centrifugací při 300 x g 10 minut. K peletě spermií bylo přidáno celkem 10 ml biotinylačního činidla (Sulfo-NHS-SS-Biotin) dle návodu výrobce soupravy. Proběhla inkubace 30 minut při 4 °C, přičemž každých 10 minut byly vzorky jemně promíchány. Následovala centrifugace při 500 x g po dobu 3 minut a poté byl supernatant odstraněn. Vzorky spermií byly 2x promyty v 10 ml TBS pufru (Tris buffered saline, 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,8). Mezi promytími byly vzorky centrifugovány při 500 x g po dobu 3 minut. Supernatant byl opět odstraněn a vzorky doředěny do 1 ml TBS pufrů. Obsah byl rozsuspendován a přepipetován do nových mikrozkušavek a následně stočen na centrifuze na 500 x g po dobu 3 minut. Supernatant byl opět odstraněn a k peletě spermií bylo přidáno 500 µl lyzačního pufru z kitu s inhibitory proteáz, spermie byly rozsuspendovány, zvortexovány a dány na 30 minut do ledu, přičemž po každých 5 minutách byly vortexovány. Následovala centrifugace na 10 000 x g při 4 °C po dobu 2 min, supernatant s extrahovanými proteiny odebrán do nových mikrozkušavek a zamražen.

Následující den byly z kitu (Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit) připraveny a složeny dvě kolonky (Column Accessory Pack). Do vrchní části kolonky bylo přidáno 500 µl imobilizovaného avidinu (Immobilized NeutrAvidin™ Gel). Kolonky byly vloženy do příslušných mikrozkušavek a zcentrifugovány 1 minutu při 1000 x g. Dále byl supernatant ve spodních mikrozkušavkách odstraněn a vrchní část obsahující imobilizovaný avidin byla dvakrát promyta v 500 µl promývacího pufru (Wash Buffer). Mezi promytími proběhla centrifugace na 1000 x g po dobu 1 minuty a supernatant byl vždy odstraněn. Následně byly kolonky ve spodní části uzavřeny a byl přidán připravený lyzátní roztok spermií. Celá tato vrchní část

kolonky byla vložena do větší falkony a na 45 minut dána na rotační třepačku. Po inkubaci byly kolonky vráceny do mikrozkušavek, spodní část otevřena a proběhla centrifugace na 1000 x g po dobu 1 minuty. Supernatant byl uschován v mikrozkušavkách při -20 °C pro následnou precipitaci proteinů. Imobilizovaný avidin s navázanými proteiny v horní části kolonky byl 3x promyt 500 µl promývacího pufru (Wash Buffer) a mezitím vždy zcentrifugován na 1000 x g po dobu 1 minuty. Dále byl z kitu rozpuštěn v 50 µl destilované vody dithiotreitol (DTT) a takto vzniklý roztok přidán k 1 ml neredukujícího vzorkového pufru pro SDS elektroforézu. Do každé kolonky bylo přidáno 250 µl takto připraveného vzorkového pufru s DTT a následně opět vloženo do větší falkony a dáno na rotační třepačku na 30 minut. Poté proběhla centrifugace na 1000 x g po dobu 2 minut, supernatant obsahující izolované povrchové proteiny byl odebrán a zmražen pro separaci proteinů pomocí SDS elektroforézy a následném elektropřenosu na nitrocelulóзовou membránu.

4.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Elektroforéza s přidavkem dodecylsulfátu sodný (SDS), detergentem, jenž všem proteinům dodává záporný náboj, je metoda rozdělující proteiny podle molekulové hmotnosti v elektrickém poli.

Pro tuto práci byla použita aparatura pro vertikální elektroforézu (Mini-PROTEAN Tetra, Bio-Rad, USA). Skla pro vytvoření gelu byla vložena do stojanu a byl připraven 15% akrylamidový separační gel.

15% akrylamidový separační gel se skládal z:

- 2,5 ml Resolving gel buffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, Bio-Rad)
- 5 ml 30% akrylamid/bis-akrylamid (Bio-Rad)
- 2,5 ml destilované H₂O
- 100 µl 10% SDS (Bio-Rad)

Těsně před aplikací bylo přidáno 4,5 µl TEMED (Pharmacia Biotech, Švédsko) a 70 µl 10% APS (persíran amonný, Amersham Biosciences, Švédsko).

Tento akrylamidový separační gel byl napipetován mezi skla a následně převrstven 1 ml destilované vody. Gel při laboratorní teplotě ztuhl po uplynutí asi 30 minut a mezitím byl připraven roztok pro 4% zaostřovací gel.

4% zaostřovací gel se skládal z:

- 1,52 ml destilované H₂O
- 0,625 ml Stacking gel buffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, Bio-Rad)
- 0,325 ml 30% akrylamid/bis-akrylamid (Bio-Rad)
- 0,025 10% SDS (Bio-Rad)

Těsně před aplikací bylo přidáno 3,8 µl TEMED (Pharmacia Biotech) a 50 µl 10% APS (Amersham Biosciences).

Po ztuhnutí separačního gelu byla odlita destilovaná voda z jeho povrchu a na ztuhlý separační gel byl napipetován gel zaostřovací, do kterého byly ihned umístěny hřebínky tvořící jamky pro vzorky. Jakmile zaostřovací gel také ztuhl, tak byla skla ze stojanu přemístěna do aparatury na elektroforézu. Celá nádoba byla naplněna elektrodovým pufrem, jenž se skládal z:

- 15 g Tris (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- 72 g glycinu (Sigma-Aldrich)
- 5 g SDS (Bio-Rad)

Tyto tři komponenty byly rozpuštěny v 1 litru destilované vody a ředěny v poměru 1:4.

Následně byly vyjmuty z gelu hřebínky a do jednotlivých jamek v zaostřovacím gelu byly nanесeny vzorky semenné plazmy pomocí Hamiltonovy stříkačky po 5 μ l v případě desetijamkového hřebínku a po 3 μ l v případě hřebínku patnáctijamkového. K těmto vzorkům byly do gelu nanесeny po 3 μ l také molekulové standardy (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad). Pokud byla elektroforéza použita pro detekci vzorků po izolaci proteinů z povrchu, tak do každé jamky bylo napipetováno po 12 μ l. Po nanесení vzorků do jamek byla elektroforéza spuštěna na přibližně 30 minut při konstantním napětí 80 V a po uplynutí této doby bylo napětí zvýšeno na 150 V po dobu asi 1 hodiny.

Barvení proteinů v gelu rozdělených pomocí SDS elektroforézy za účelem denzitometrického hodnocení bylo provedeno pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25 g Coomassie Blue R-250 (Sigma-Aldrich), 45 ml metanolu, 9 ml kyseliny octové do 100 ml destilované vody).

4.4 Western blot analýza

4.4.1 Elektropřenos proteinů

Po skončení elektroforézy následoval Western blot (aparatura od firmy Bio-Rad), tedy elektropřenos proteinů z gelu na nitrocelulózovou (NC) membránu. Nejprve byl připraven transferový pufr, jenž se skládal z:

- 3,03 g Tris (Sigma-Aldrich)
- 14,4 g glycinu (Sigma-Aldrich)
- 200 ml metanolu

Tris a glycin byly rozpuštěny ve 200 ml destilované vody, následně byl přidán metanol a vše bylo doplněno destilovanou vodou do 1 litru. Do tohoto roztoku byl namočen alespoň na 10 minut veškerý materiál pro elektropřenos.

Kazeta pro elektropřenos byla připravena v následujícím pořadí od černé strany kazety k červené:

1. Houbička
2. 2 chromatografické papíry (Whatman chromatography paper, GE Healthcare, USA)
3. Gel se separovanými proteiny
4. NC membrána (Amersham Protran, GE Healthcare, USA)
5. 2 chromatografické papíry (Whatman chromatography paper)
6. Houbička

Takto poskládaná kazeta byla vložena do celé aparatury pro elektropřenos a zalita transferovým pufrem. Celá tato aparatura byla chlazená zvenku ledem, přičemž elektropřenos probíhal kolem 60 minut při konstantním elektrickém proudu 500 mA. Po uplynutí této doby byla kazeta rozebrána za účelem vyndání membrány, která byla opláchnuta v destilované vodě a následně

obarvována pomocí roztoku Ponceau S (Sigma-Aldrich) přibližně 1 minutu. Po obarvení byla již vidět přítomnost přenesených proteinů. Poté byla membrána odbarvována pomocí destilované vody a PBS s 0,1% Tweenem (PBS-T) a následovala blokace membrány z důvodu deaktivace volných míst na membráně. Blokace trvala přes noc do následujícího dne při 4 °C v předem připraveném roztoku 5% sušeného mléka (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad) v PBS. Po blokaci byla membrána druhý den promyta v PBS-T z důvodu odmytí nespecifických vazeb.

4.4.2 Imunodetekce proteinů na membráně

Membrána po obarvení a následném promytí byla rozstříhnutá na tři části pro inkubaci s primárními polyklonálními protilátkami proti AQN (anti-BHB3, králičí protilátka vyrobená v Laboratoři biochemie reprodukce, Ústav molekulární genetiky, AV ČR, Praha; Jonáková et al. 1998) a AWN (anti-BHB7, králičí protilátka vyrobená v Laboratoři biochemie reprodukce, Ústav molekulární genetiky, AV ČR, Praha; Jonáková et al. 1998) spermadhesinu a ředěny v PBS v poměru 1:10 000, přičemž poslední část membrány sloužila jako negativní kontrola, ke které bylo přidáno pouze čisté PBS. Každá část membrány byla poté vložena do samostatné falkony a dána na rotační třepačku (MX-T6-Pro, DLAB Scientific, USA) na přibližně jednu hodinu. Po 1 hodině byly membrány promyty 20 ml PBS-T po dobu 5 minut na rotační třepačce. Tento postup byl zopakován celkem 5x.

Poté byla membrána inkubována se sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům (Blotting Grade Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Horseradish Peroxidase Conjugate; Bio-Rad) v ředění 1:6000 v PBS. Sekundární protilátka byla rozdělena do falkonek po 2 ml a opět se takto membrány inkubovaly na rotační třepačce 1 hodinu. Po inkubaci následovalo opět promývání membrán v PBS-T 5x po 5 minutách. Poté následovala samotná detekce takto inkubovaných vzorků.

4.4.3 Detekce vzorků

Před samotnou detekcí NC membrán bylo zapotřebí připravit chemiluminiscenčního substrátu (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo SCIENTIFIC, USA) smícháním jeho dvou složek v poměru 1:1 v celkovém množství 2 ml. Tento roztok byl nanášen na membránu. Proteiny na membráně byly poté zanalyzovány na přístroji Azure c300 Gel Imaging System (Azure Biosystems, Dublin, California, USA).

4.4.4 Denzitometrická analýza a odečet molekulových hmotností

U detekovaných proteinů byla provedena denzitometrická analýza pomocí programu Image Studio Lite Ver 5.2 (LI-COR Biotechnology, USA). Všechny výsledky této analýzy byly poté hodnoceny v programu Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Plus 2021). Normalizace dat byla vztažena k celkové nanášce proteinů v jamce či ke koncentraci proteinů v SP. V rámci všech experimentů na všech membránách byla normalizace dat vztažena ke kanci jménem Chlór. Data z denzitometrické analýzy jsou prezentována jako průměr ± střední chyba

průměru (SEM) a statisticky vyhodnocena pomocí jednovýběrového testu analýzy rozptylu (ANOVA) v programu Microsoft Excel a v případě srovnání průměrné relativní optické denzity síly signálu protilátky proti AQN a AWN spermadhesinům a jejich koncentrace proteinů v SP u dvou vybraných kanců byl použit dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů také v programu Microsoft Excel.

Pro výpočet molekulových hmotností byly použity logaritmy vzdáleností molekulových hmotností standardů, vytvořeny bodové grafy s lineárními spojnicemi trendu a vytvořením rovnice, ze které byla vypočítána molekulová hmotnost daného proteinového proužku pomocí programu Microsoft Excel.

4.5 Imunofluorescenční mikroskopie

Pomocí imunofluorescenční mikroskopie byla provedena lokalizace sledovaných proteinů AQN a AWN v kančích ejakulovaných spermích. Pro imunofluorescenční mikroskopii byly připraveny vzorky buď metodou vlhké fixace spermií na mikroskopické sklíčko s následnou inkubací protilátky na sklíčko, či inkubací s protilátkou v suspenzi spermií.

4.5.1 Příprava vzorků pro imunofluorescenci

Pro imunofluorescenci byly připraveny vzorky ejakulovaných spermií. Od kanců bylo vždy odebráno po 1 ml nativního ejakulátu (koncentrace spermií se pohybovala mezi 4 a 9 x 10⁸ buněk/ml), ke kterému bylo přidáno 5 ml PBS a následně zcentrifugováno na 300 x g po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn a vzorky 3x promyty v 5 ml PBS a mezi promytími vždy dány do centrifugy opět na 300 x g na 10 minut. Po promytí byly vzorky doředy PBS do 1 ml, rozsuspendovány a rozděleny po 200 µl do nových mikrozkušavek. Z těchto mikrozkušavek se vždy využila pouze jedna, která byla rozdělena po 25 µl.

4.5.2 Příprava vzorků spermií fixovaných aceton/metanolem na mikroskopickém sklíčku

Pro přípravu vlhké fixace na mikroskopické sklíčko bylo ke vzorku 25 µl z předešlé přípravy přidáno 750 µl PBS (nejprve 500 µl a poté 250 µl) dle hustoty spermií ve vzorku. Pro každého kance bylo vždy připraveno 5 sklíček s vyznačenými kolečky pomocí hydrofobní fixy (PAN Pen liquid blocker, Sigma-Aldrich). Do každého kolečka bylo napipetováno 20 µl ze vzorku a dále byly všechny vzorky ještě zakápnuty 50 µl vymraženého acetonu s metanolem v poměru 1:1. Po inkubaci trvající 5 minut byly preparáty opláchnuty PBS, osušeny a vloženy do krabičky do lednice při 4 °C.

Připravené vzorky po skladování v lednici byly opláchnuty fyziologickým roztokem (0,9% NaCl) a opatrně osušeny. Na každý vzorek bylo nanášeno 150 µl blokovacího média SuperBlock (Blocking Buffer in PBS, Thermo Fisher Scientific) a ve vlhké komůrce inkubováno 15-20 minut. Následovalo opláchnutí fyziologickým roztokem a osušení. Na sklíčko bylo nanášeno po 100 µl primární polyklonální králičí protilátky proti AQN či AWN

spermadhesinu (anti-BHB3, anti-BHB7) ředěné v poměru 1:200 ve fyziologickém roztoku a na sklíčka určená pro negativní kontrolu bylo napipetováno pouze 100 μ l fyziologického roztoku. Po hodinové inkubaci ve vlhké komůrce byla sklíčka omyta fyziologickým roztokem a osušena. Dále bylo na sklíčka napipetováno 100 μ l sekundární protilátky proti králičím imunoglobulinům (anti-rabbit) konjugovaná s Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen, USA). Sekundární protilátka byla ředěna v poměru 1:500, po 30 minutách inkubace ve vlhké komůrce opět byla sklíčka omyta fyziologickým roztokem a osušena. Do pravých koleček bylo nanášeno 100 μ l fyziologického roztoku a do levých bylo nanášeno pro kontrolu integrity akrozomu 100 μ l PNA lektinu konjugovaného s rhodaminem (Rhodamin Peanut Agglutinin, Vector Laboratories, USA) ředěného ve fyziologickém roztoku v poměru 1:1000. Po 15 minutách inkubace ve vlhké komůrce byly vzorky opět omyty fyziologickým roztokem a na závěr ještě destilovanou vodou a osušeny. Poté bylo na každé kolečko nanášeno 8 μ l montovacího média s DAPI (Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, USA) pro označení jader buněk. Následovalo překrytí krycími sklíčky a zalakování preparátů. Poté byly vzorky připravené k vyhodnocení pod fluorescenčním mikroskopem.

4.5.3 Příprava vzorků spermií v suspenzi

Pro přípravu vzorku spermií v suspenzi byly vzorky o objemu 25 μ l z předešlé přípravy doředěny do 100 μ l PBS. Do 100 μ l suspenze bylo přidáno dalších 100 μ l PBS s 1 μ l primární polyklonální králičí protilátky proti AQN či AWN spermadhesinu (ředění 1:200), přičemž do mikroskopavky sloužící poté jako negativní kontrola nebyla přidána žádná protilátka. Mikroskopavky byly vloženy do vyhřívané třepačky (TS-100, BioSan, Litva) na 2 hodiny při teplotě 37 °C a následně stočeny v centrifuze na 300 x g po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn a vzorky 3x promyty v 500 μ l fyziologického roztoku (0,9% NaCl) a mezitím stočeny na centrifuze při 300 x g a 5 minutách. V každé mikroskopavce bylo necháno 100 μ l a následně rozsuspendováno. Takto připravená a hotová suspenze byla napipetována po 20 μ l do vyznačených koleček na sklíčkách a zafixována 50 μ l acetonu s metanolem v poměru 1:1.

Po fixaci byla sklíčka po 5 minutách omyta fyziologickým roztokem a na každý vzorek bylo nanášeno 150 μ l blokovacího média SuperBlock (Blocking Buffer in PBS, Thermo Fisher Scientific). Vzorky byly dány do temné vlhké komůrky s navlhčenou buničinou a ponechány blokovat přes noc v lednici při 4 °C.

Následující den byly vzorky po blokaci omyty ve fyziologickém roztoku, osušeny a následovala inkubace se sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům (anti-rabbit) konjugovaná s Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen). Sekundární protilátka byla na vzorky napipetována po 100 μ l v poměru ředění 1:500, přičemž inkubace trvala 30 minut. Po půl hodině byly vzorky omyty, osušeny a do pravých (kontrolních) koleček bylo nanášeno 100 μ l fyziologického roztoku. Do levých koleček bylo nanášeno pro kontrolu integrity akrozomu 100 μ l PNA lektinu konjugovaného s rhodaminem (Rhodamin Peanut Agglutinin, Vector Laboratories, USA) ředěného ve fyziologickém roztoku v poměru 1:1000. Po 15 minutách inkubace ve vlhké komůrce byly vzorky opět omyty fyziologickým roztokem, osušeny a na závěr omyty destilovanou vodou a znovu osušeny. Poté bylo na každé kolečko nanášeno 8 μ l

montovacího média s DAPI (Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories) pro označení jader buněk. Následovalo překrytí sklíčky a zalakování preparátů. Poté byly vzorky připraveny k vyhodnocení pod fluorescenčním mikroskopem.

4.5.4 Mikroskopické hodnocení vzorků

Připravené a zalakované preparáty byly hodnoceny pod fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E 600 (Nikon, Japonsko) při 400x zvětšení, zdokumentovány pomocí kamery Nikon Digital Sight DS-Fi1 (Nikon, Japonsko) a počítačového softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements (Nikon, Japonsko).

5 Výsledky

V této diplomové práci bylo využito celkem sedm různých kanců, kterým byly odebrány a zpracovány ejakuláty během období červen až listopad (viz Tabulky č. 1-3). Podařilo se získat ejakuláty od těchto kanců Chlór, Jeep, Jura, Krysa, Igor, Grál, Larva, přičemž někteří z nich byli odbráni opakovaně.

Pro detekci spermadhesinů v SP byli využiti podle plánovaných experimentů a možné dostupnosti kanci Chlór, Jeep, Jura, Krysa, Igor, Grál a Larva. Pro spermie Chlór, Jeep, Jura a Krysa a pro detekci spermadhesinů na povrchu proteinů byli využiti kanci Chlór, Jura a Kuna.

5.1 Koncentrace proteinů semenné plazmy

Koncentrace proteinů byly naměřeny po zpracování SP získané z jednotlivých ejakulátů (viz kapitola 4.2).

Koncentrace byly přepočítány na množství proteinů v 3 μ l a 5 μ l (viz Tabulka č. 4), dle toho, jestli se využil desetijamkový či patnáctijamkový hřebínek (viz kapitola 4.3).

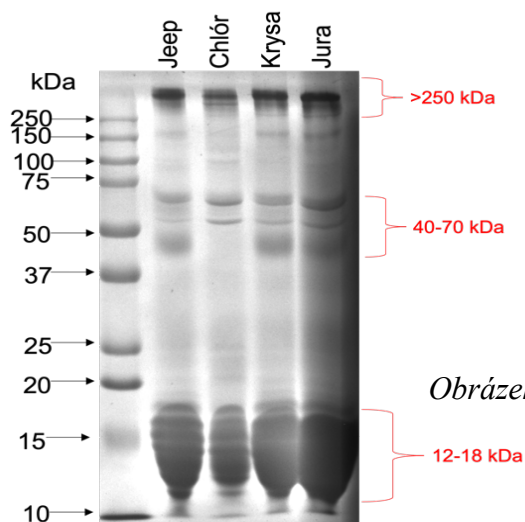
Tabulka č. 4: Vzorky SP se jmény jednotlivých kanců, datem jejich odběru, zpracování spolu se změřenými koncentracemi proteinů v jednotlivých ejakulátech.

Jméno kance	Datum odebrání a zpracování	Koncentrace proteinů v SP (mg/ml)	Množství proteinů ve 3 μ l	Množství proteinů v 5 μ l
Chlór	6.6.2022	1,20	0,0360	0,0600
Chlór	27.6.2022	1,06	0,0318	0,0530
Chlór	20.9.2022	1,73	0,0519	0,0865
Chlór	3.10.2022	1,41	0,0423	0,0705
Jura	6.9.2022	1,89	0,0567	0,0945
Jura	20.9.2022	1,68	0,0504	0,0840
Jura	3.10.2022	1,26	0,0378	0,0630
Jeep	6.6.2022	1,99	0,0597	0,0995
Jeep	27.6.2022	2,05	0,0615	0,1025
Krysa	6.9.2022	2,06	0,0618	0,1030

5.2 Detekce AQN a AWN spermadhesinů v SP a spermích kanců

AQN a AWN spermadhesiny byly detekovány ze zpracovaných nativních ejakulátů (viz kapitola 4.2) a pro separaci proteinů SP byla použita SDS elektroforéza (viz kapitola 4.3), Vzorky SP byly elektroforeticky rozděleny a gel byl obarven pro vizualizaci proteinů (viz kapitola 4.3). Výsledky barvení gelu SP jsou zobrazeny na obrázku č. 4, kde je zobrazen proteinový profil SP jednotlivých kanců. Nejvíce proteinů bylo zaznamenáno v molekulové hmotnosti mezi 12-18 kDa, kde předpokládáme výskyt spermadhesinů. Další proteiny jsou

slabě viditelné mezi 20 a 30 kDa, které jsou zastoupeny ve velmi malé míře. V rozmezí molekulových hmotností mezi 40 a 70 kDa a také >250 kDa pak byly nalezeny výraznější proteinové proužky.

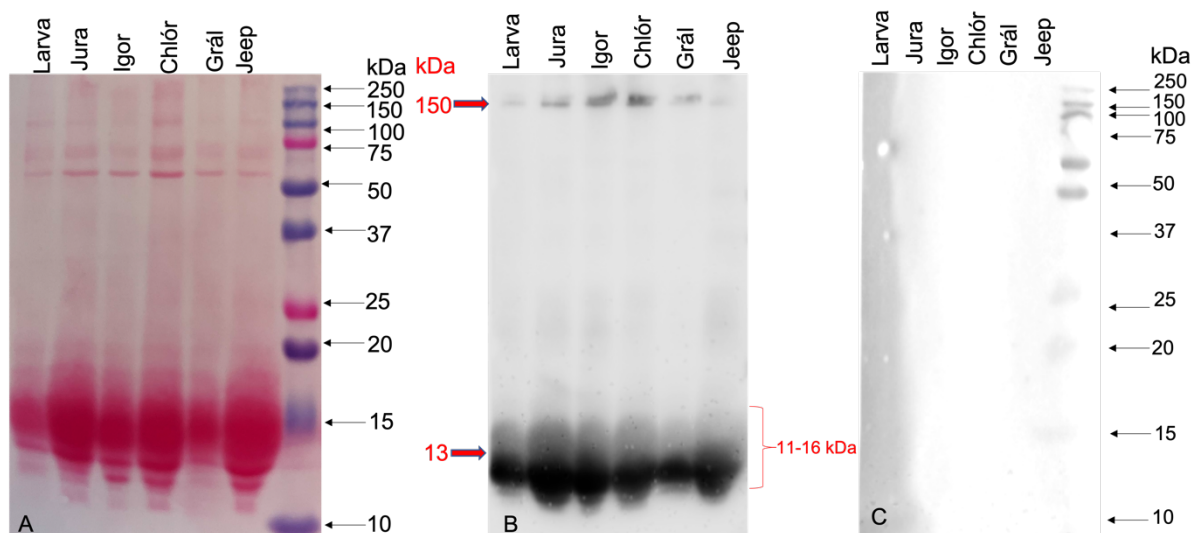


Obrázek č. 4: Vizualizace proteinů SP pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 získaných od různých kanců.

Elektroforeticky rozdělené proteiny byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu metodou Western blot (viz kapitola 4.4) a následně byla provedena detekce AQN a AWN spermadhesinů pomocí specifických protilátek (viz kapitola 4.4.2). Pro detekci celkové nanášky proteinů ve vzorcích SP pro detekci AQN proteinu byly membrány reverzibilně barveny na proteiny (Obr. č. 5A). V proteinovém profilu SP nebyly mezi vzorky jednotlivých kanců zřetelné žádné výraznější rozdíly.

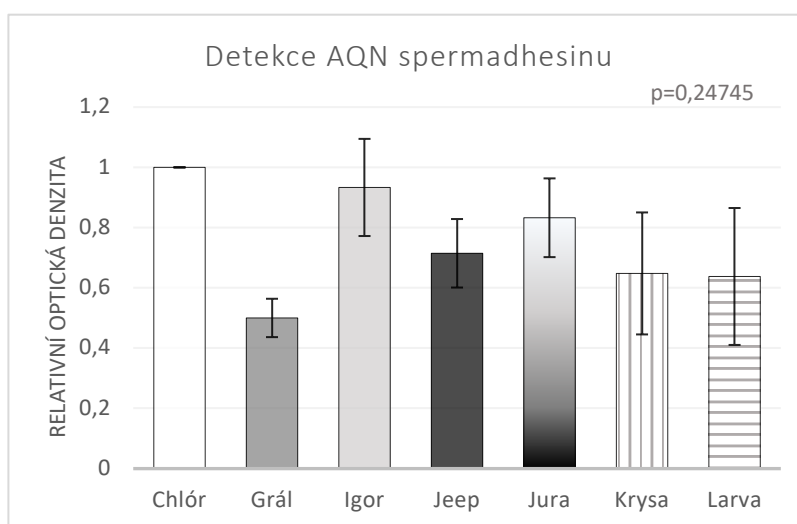
Detekce AQN spermadhesinu v SP proběhla celkem na osmi membránách a reprezentativní výsledek detekce je zobrazen na obrázku č. 5B. Protilátkou proti AQN spermadhesinu byl detekován výrazný proteinový proužek o molekulové hmotnosti 13 kDa (Obr. č. 5B), nicméně tento proužek není zcela homogenní a detekce spermadhesinu AQN v kančí SP odhalila, že molekulová hmotnost tohoto proteinu se pohybuje v rozmezí 11-16 kDa. Dalším výraznějším proteinovým proužkem při detekci spermadhesinu AQN, je pruh o molekulové hmotnosti kolem 150 kDa, který se vyskytuje u všech vzorků. Stanovené molekulární hmotnosti jsou označeny na obrázku č. 5B šipkami a popisky.

Membrány, které sloužily pro negativní kontrolu, byly inkubovány pouze se sekundární protilátkou bez protilátky primární. Na membránách nebyla zaznamenána žádná pozitivní reakce (Obr. č. 5C).



Obrázek č. 5: Vizualizace proteinů SP kanců pomocí Ponceau na NC-membráně (A), imunodetekce AQN spermadhesinu (B) a negativní kontrola po inkubaci pouze se sekundární protilátkou (C).

Pro vyhodnocení zastoupení spermadhesinů AQN a AWN v SP jednotlivých kanců byla provedena denzitometrická analýza (viz kapitola 4.4.4). Výsledek denzitometrické analýzy u AQN spermadhesinu je zobrazen na Grafu. č. 1. Na tomto grafu je zřetelná individualita relativní optické denzity míry signálu protilátky proti spermadhesin AQN mezi SP jednotlivých kanců. U spermadhesinu AQN nejnižší průměrné hodnoty detekce vykazoval kanec Grál a nejvyšší Chlór, ke kterému jsme výsledky vztahovaly v rámci všech experimentů. U ostatních kanců byly výsledky podobné.

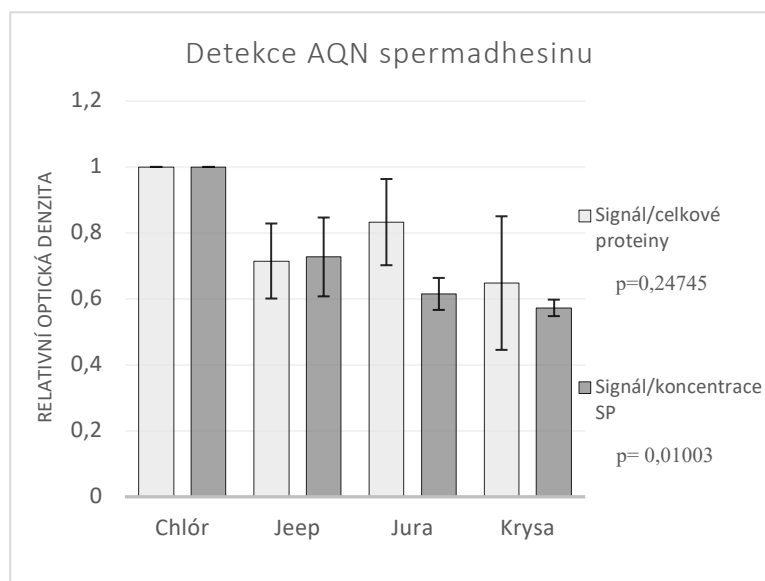


Graf č.1: Průměrná relativní optická denzita poměru síly signálu protilátky proti AQN a celkové nanášky proteinů stanovené denzitometricky u jednotlivých vzorků proteinů SP společně s jejich \pm SEM, přičemž výsledky jsou vztaheny ke kanci jménem Chlór. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p=0,24745$).

Data byla statisticky vyhodnocena (viz kapitola 4.4.4, viz příloha tabulka P1) a u poměru síly signálu a celkové nanášky proteinů nebyl u AQN spermadhesinu zjištěn statisticky významný rozdíl ($p>0,05$).

Na Grafu č. 2 bylo u čtyř kanců, u nichž byla změřena koncentrace proteinů v jejich SP provedeno porovnání poměru síly signálu protilátky proti AQN spermadhesinu k celkové nanášce proteinů zjištěné denzitometricky a poměru síly signálu k naměřené koncentraci proteinů v SP (viz tabulka č. 4). Nejvyšších hodnot nabýval kanec Chlór, ke kterému jsou výsledky vztaženy, zatímco u ostatních kanců byly výsledky nižší a ukazující na srovnatelné množství AQN spermadhesinu.

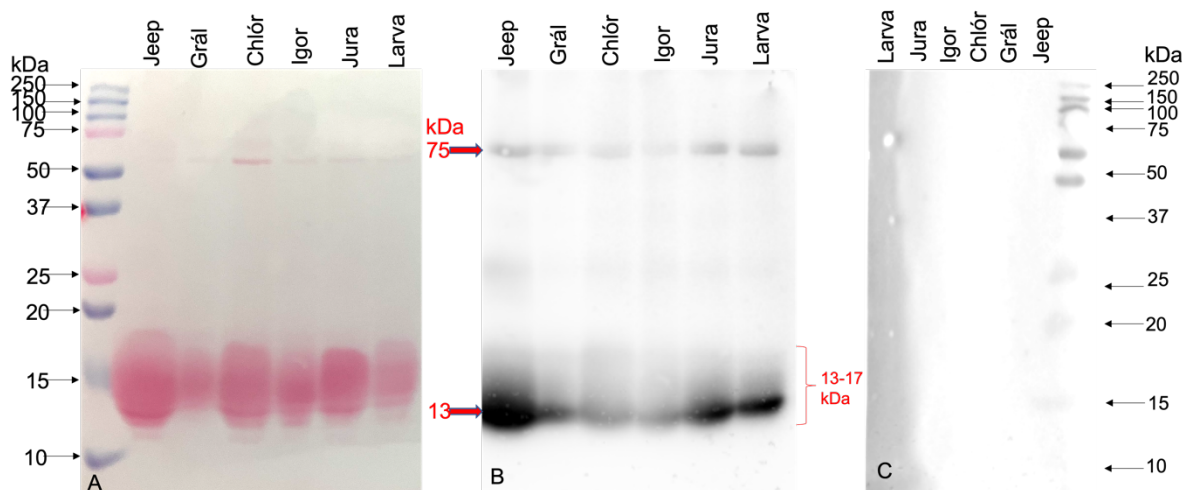
Poměru síly signálu detekovaného AQN spermadhesinu vztažený k celkové nanášce proteinů nebyl statisticky významně rozdílný mezi kanci, zatímco u poměru síly signálu protilátky proti AQN k naměřené koncentraci proteinů v SP byl statisticky významný rozdíl zjištěn ($p < 0,05$).



Graf č.2: Průměrná relativní optická denzita síly signálu protilátky proti AQN a celkové nanášky proteinů, kde statisticky významný rozdíl zjištěn nebyl ($p = 0,24745$) v porovnání s průměrnou relativní denzitou celkového signálu a koncentrace proteinů v SP stanovené denzitometricky u jednotlivých vzorků SP kanců, kde byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p = 0,01003$). Výsledky jsou zobrazeny společně s jejich \pm SEM a vztaženy ke kanci jménem Chlór.

Celková nanáška proteinů pro detekci AWN spermadhesinu ve vzorcích SP byla kontrolována barvením membrán na proteiny (Obr. č. 6A).

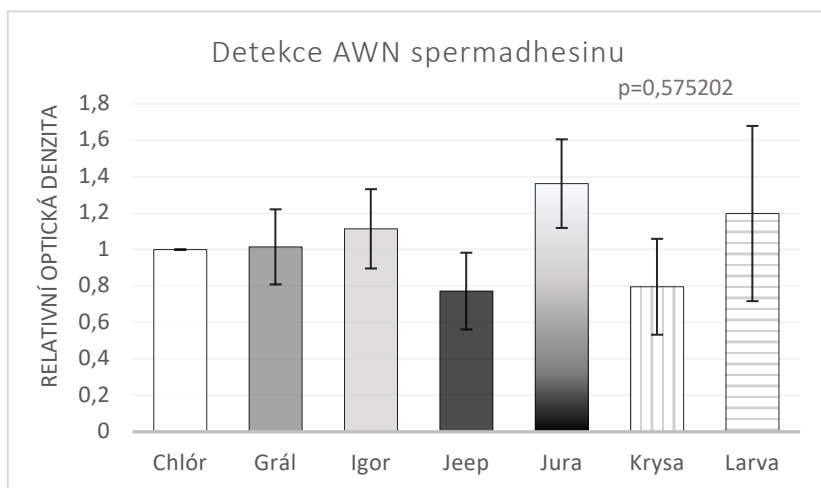
Signál protilátky proti AWN spermadhesinu v SP proběhl stejně jako u AQN spermadhesinu celkem na osmi membránách, přičemž jedna z jeho detekcí je zobrazena na obrázku č. 6B. Protilátkou proti AWN spermadhesinu byl detekován výrazný proteinový proužek o molekulové hmotnosti 13 kDa (Obr. č. 6B). Detekce spermadhesinu AWN (Obr. č. 6B) v kančí SP odhalila, že molekulová hmotnost tohoto proteinu se pohybuje v rozmezí 13-17 kDa. Dalším výraznějším proteinovým proužkem na detekci spermadhesinu AWN, je pruh o molekulové hmotnosti kolem 75 kDa, který se vyskytuje u všech vzorků. Stanovené molekulární hmotnosti jsou označeny na obrázku č. 6B šipkami a popisky. Membrány, které sloužily pro negativní kontrolu, byly inkubovány pouze se sekundární protilátkou bez protilátky primární. Na membránách nebyla zaznamenána žádná detekce (Obr. č. 6C).



Obrázek č. 6: Vizualizace proteinů SP kanců pomocí Ponceau na NC-membráně (A), imunodetekce AWN spermadhesinu (B) a negativní kontrola po inkubaci pouze se sekundární protilátkou (C).

Výsledek denzitometrické analýzy u AWN spermadhesinu je zobrazen na Grafu. č. 3 Na tomto grafu je zřetelná individualita relativní optické denzity míry signálu protilátky proti spermadhesinu AWN mezi SP jednotlivých kanců společně s jejich velkými odchylkami.

U spermadhesinu AWN nejnižší průměrné detekované množství proteinu na podobné úrovni vykazovali kanci Jeep a Krysa, zatímco nejvyšší vykazoval kanec Jura. Největší variabilitu v \pm SEM v detekovaném množství vykazoval kanec Larva. Výsledky byly vztaženy ke kanci jménem Chlór.



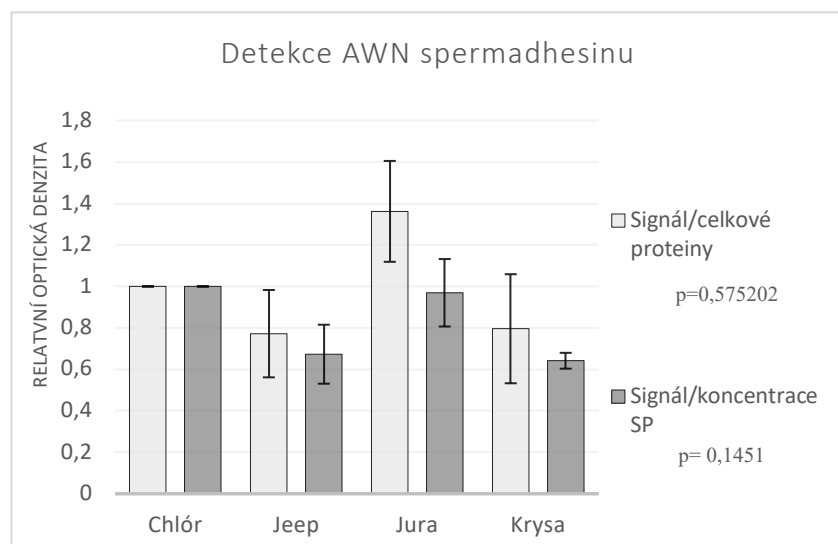
Graf č.3: Průměrná relativní optická denzita poměru síly signálu protilátky proti AWN a celkové nanášky proteinů u jednotlivých vzorků proteinů SP společně s jejich \pm SEM, přičemž výsledky jsou vztaženy ke kanci jménem Chlór. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p=0,575202$).

Data byla vyhodnocena (viz kapitola 4.4.4, viz příloha tabulka P2) a u poměru síly signálu k celkové nanášce proteinů zjištěné denzitometricky nebyl u AWN spermadhesinu stejně jako tomu bylo u spermadhesinu AQN zjištěn statisticky významný rozdíl ($p>0,05$).

Na Grafu č. 4 bylo u čtyř kanců, u nichž byla změřena koncentrace proteinů v jejich SP provedeno porovnání poměru síly signálu protilátky proti AWN spermadhesinu a celkové nanášky proteinů stanovené denzitometrickou analýzou a poměru síly signálu vztaženého ke koncentraci proteinů v SP. Největší rozdíl v průměrných hodnotách obou měření vykazoval

kanec Jura, zatímco u ostatních kanců byly výsledky srovnatelné. Výsledky byly opět vztaženy ke kanci Chlórovi, u kterého byl proveden největší počet opakovaných experimentů.

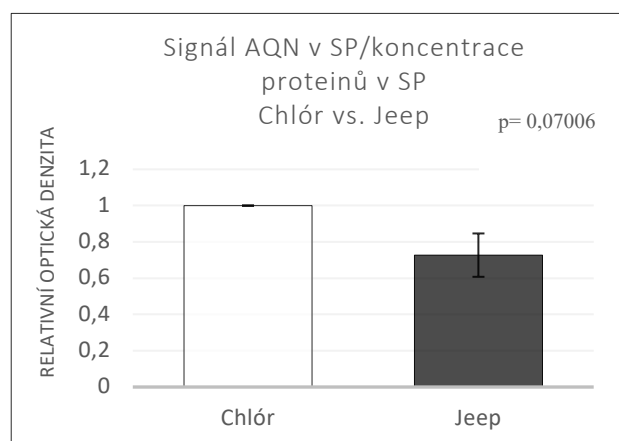
Stejně jako výsledků vyhodnocení poměru síly signálu a celkové nanášky proteinů u detekce AWN spermadhesinu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl, tak u poměru síly signálu protilátky vztaženému ke koncentraci proteinů v SP statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$) nebyl také nalezen.



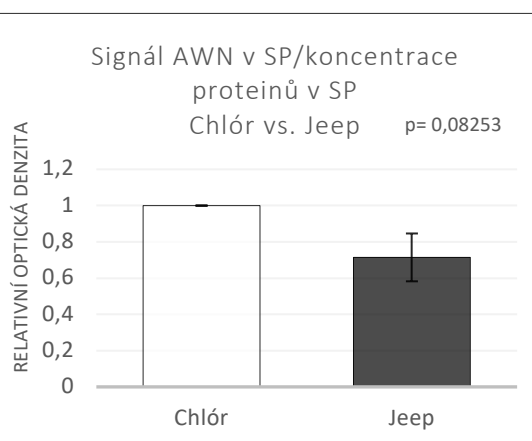
Graf č.4: Průměrná relativní optická denzita síly signálu protilátky proti AWN a celkové nanášky proteinů, kde statisticky významný rozdíl zjištěn nebyl ($p = 0,575202$) v porovnání s průměrnou relativní denzitou celkového signálu a koncentrace proteinů v SP stanovené denzitometricky u jednotlivých vzorků SP kanců, kde nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl

($p = 0,1451$). Výsledky jsou zobrazeny společně s jejich \pm SEM a vztaženy ke kanci jménem Chlór.

Ze všech kanců byly vybrány dva, a to konkrétně Jeep a Chlór, z důvodu nejvíce opakovaných experimentů detekce. U těchto dvou kanců byla porovnána průměrná relativní optická denzita síly signálu protilátky proti AQN a AWN spermadhesinům vztažená k celkové koncentraci proteinů v SP (viz Graf č.5 a Graf č.6).

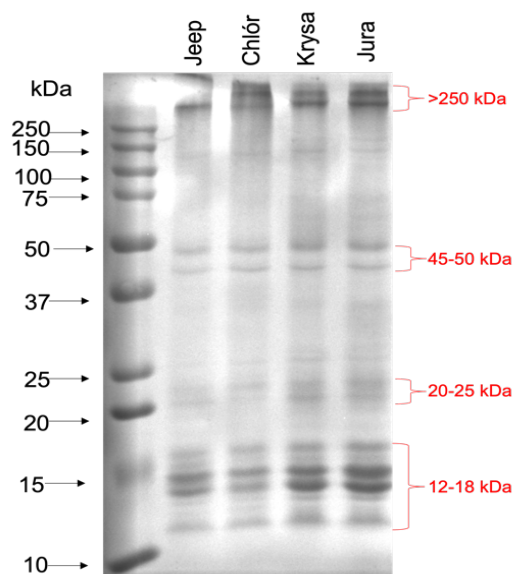


Graf č.5: Průměrná relativní optická denzita síly signálu protilátky proti AQN spermadhesinu a jeho koncentrace proteinů v SP společně s jejich \pm SEM u dvou vybraných kanců. Statisticky významný rozdíl zjištěn nebyl ($p = 0,07006$).



Graf č.6: Průměrná relativní optická denzita síly signálu protilátky proti AWN spermadhesinu a jeho koncentrace proteinů v SP společně s jejich \pm SEM u dvou vybraných kanců. Statisticky významný rozdíl nebyl zjištěn ($p = 0,08253$).

Stejně jako u SP byly AQN a AWN spermadhesiny detekovány v lyzátech spermií ze zpracovaných nativních ejakulátů (viz kapitola 4.2) a pro separaci proteinů spermií byla použita SDS elektroforéza (viz kapitola 4.3). Vzorčky lyzátní spermií byly elektroforeticky rozděleny a gel byl obarven pro vizualizaci proteinů (viz kapitola 4.3). Výsledky barvení gelu proteinů spermií jsou zobrazeny na obrázku č. 7, kde jsou zřetelné proteiny v oblasti o molekulové hmotnosti mezi 12-18 kDa se silnějšími detekovanými proužky jsou proužky kolem 14 kDa a 15 kDa a předpokládáme zde výskyt spermadhesinů. Další proteinové proužky jsou jasně viditelné mezi 20 a 25 kDa, kolem 45 kDa a 50 kDa a také >250 kDa.



Obrázek č. 7: Vizualizace proteinů spermií pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 získaných od různých kanců.

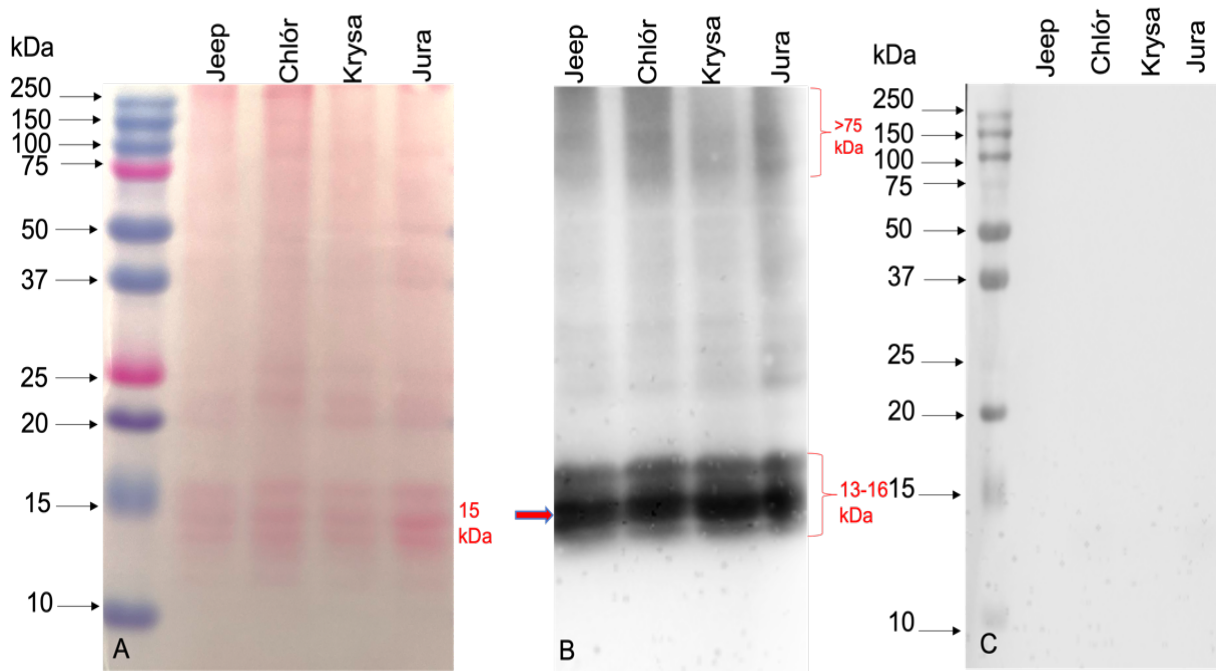
Rozdělené proteiny spermií byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu metodou Western blot (viz kapitola 4.4) a následně byla provedena detekce AQN a AWN spermadhesinů (viz kapitola 4.4.2).

Pro zjištění celkové nanášky proteinů ve vzorcích spermií byly membrány barveny na proteiny (Obr. č. 8A).

Detekce AQN spermadhesinu ve spermiích kanců pomocí specifické protilátky proběhla celkem na čtyřech membránách a na obrázku 8B je zobrazena jedna z těchto detekcí.

Protilátkou proti AQN spermadhesinu byl detekován výrazný proteinový proužek o molekulové hmotnosti 15 kDa (Obr. č. 8B). Nicméně je celkově viditelná detekce v rozmezí 13-16 kDa. Navíc byl zaznamenán slabý signál protilátky také v oblasti >75 kDa. Tyto hmotnosti jsou vyznačeny na obrázku č. 8B šipkami s popisky.

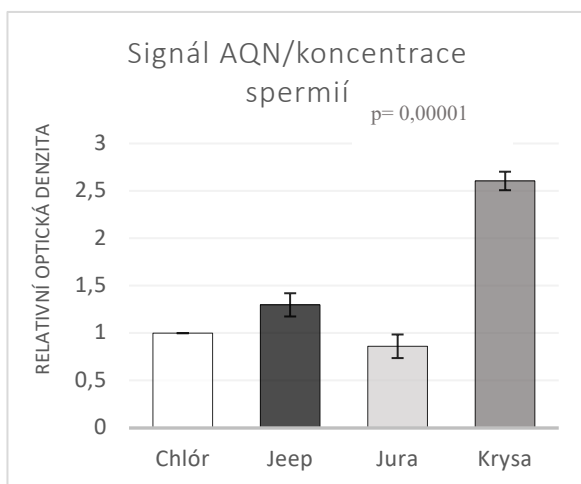
Membrány, které sloužily pro negativní kontrolu, byly inkubovány pouze se sekundární protilátkou bez protilátky primární. Na těchto membránách nebyla zaznamenána žádná pozitivní reakce s protilátkou (Obr. č. 8C).



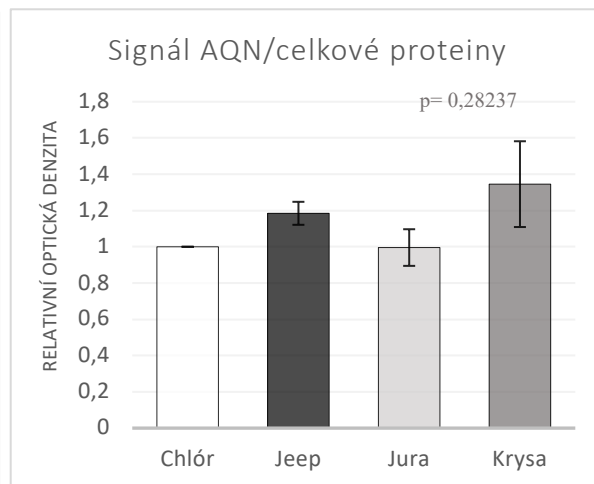
Obrázek č. 8: Vizualizace proteinů kančích spermií pomocí Ponceau (A), imunodetekce AQN spermadhesinu (B) a negativní kontrola po inkubaci pouze se sekundární protilátkou (C).

Pro vyhodnocení zastoupení spermadhesinů AQN a AWN ve spermiích u jednotlivých kanců byla provedena denzitometrická analýza (viz kapitola 4.4.4). Na grafu č. 7 je zřetelná individualita poměru relativní optické denzity míry signálu protilátky proti AQN spermadhesinu a koncentrací spermií jednotlivých kanců. Nejvyšších naměřených hodnot vykazuje kanec Krysa a tento rozdíl byl statisticky vyhodnocen (viz kapitola 4.4.4, viz příloha tabulka P3) jako významný ($p < 0,00001$). U dalších kanců byly stanovené hodnoty množství AQN spermadhesinu ve spermiích srovnatelné. Naměřené hodnoty optické denzity byly opět vztahovány ke kanci jménem Chlór.

Na grafu č. 8 je vidět individualita poměru relativní optické denzity míry signálu protilátky proti spermadhesinu AQN vztaženého k celkové nanášce proteinů u jednotlivých kanců, nicméně průměr stanovených hodnot je velmi vyrovnaný mezi všemi čtyřmi kanci. Po statistickém vyhodnocení výsledků (viz kapitola 4.4.4, viz příloha tabulka P4) nebyl nalezen významný rozdíl ($p > 0,05$) v množství AQN spermadhesinu v lyzátech spermií jednotlivých kanců.



Graf č.7: Relativní optická denzita poměru signálu protilátky proti AQN a koncentrace spermií společně s jejich \pm SEM. Statisticky významný rozdíl zjištěn byl ($p=0,00001$).



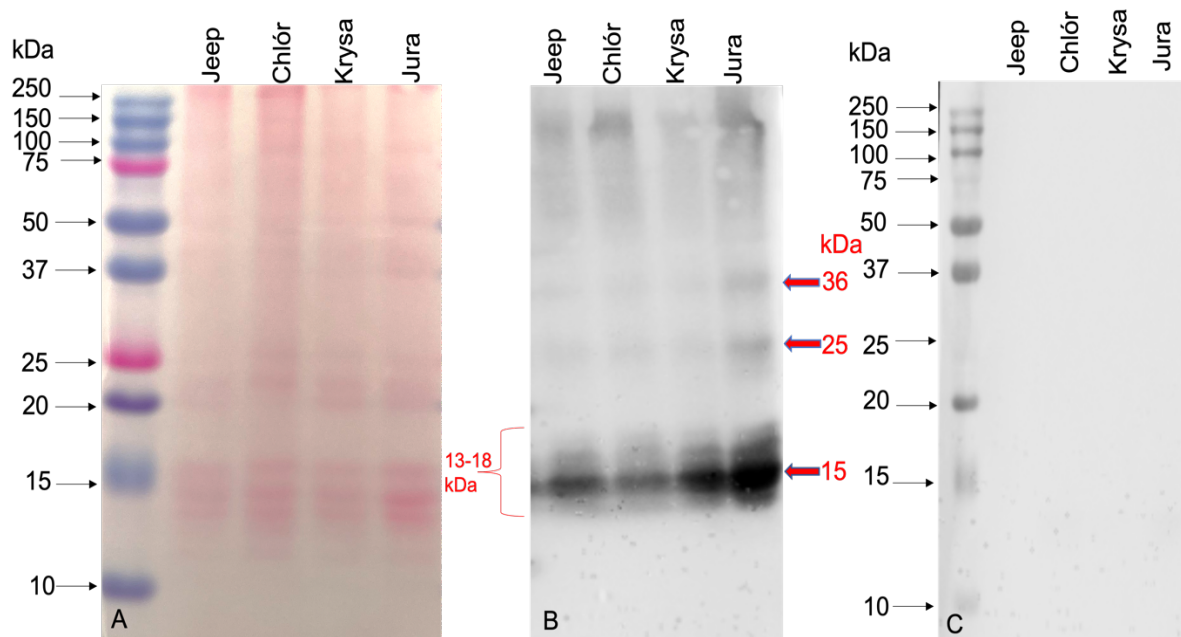
Graf č.8: Relativní optická denzita poměru signálu protilátky proti AQN a celkové nanášky proteinů společně s jejich \pm SEM. Statisticky významný rozdíl nebyl zjištěn ($p= 0,0,28237$).

Stejně jako u předchozích detekcí byly membrány pro stanovení celkové nanášky proteinů ve vzorcích spermií barveny na proteiny (Obr. č. 9A).

Detekce signálu protilátky proti AWN spermadhesinu ve spermiích kanců proběhla jako v předchozím experimentu celkem na čtyřech membránách a jedna z těchto detekcí je zobrazena na obrázku č. 9B.

Protilátkou proti AWN spermadhesinu byl detekován výrazný proteinový proužek o molekulové hmotnosti 15 kDa (Obr. č. 9B). Celková detekce AWN spermadhesinu ve spermiích ukázala, že protilátka značí v rozmezí molekulových hmotností 13-18 kDa několik forem tohoto proteinu. Dalšími výraznějším detekovanými proteinovými proužky byly proteiny molekulové hmotnosti kolem 25 kDa a 36 kDa, které jsou výrazněji viditelné především u kance Jury. Tyto hmotnosti jsou označeny na obrázku č. 9B šipkami a popisky.

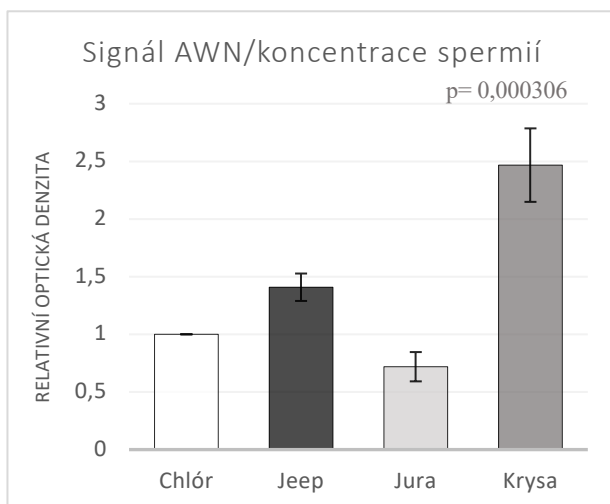
Membrány, které sloužily pro negativní kontrolu, byly inkubovány pouze se sekundární protilátkou bez protilátky primární. Na membráně nebyla zaznamenána žádná pozitivní reakce (Obr. č. 9C).



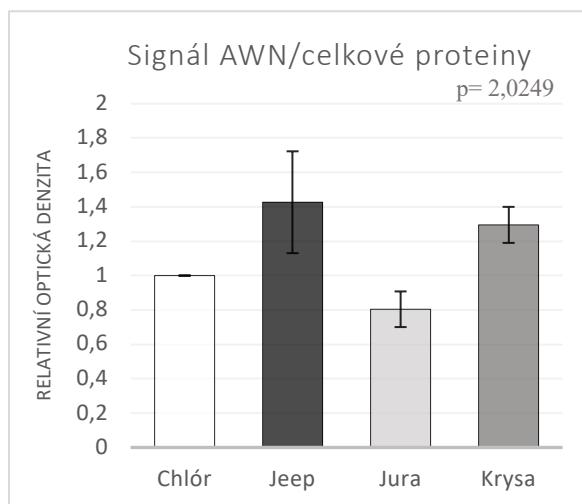
Obrázek č. 9: Vizualizace proteinů kančích spermií pomocí Ponceau (A), imunodetekce AWN spermadhesinu (B) a negativní kontrola po inkubaci pouze se sekundární protilátkou (C).

Na grafu č. 9 je vyhodnocení poměru relativní optické denzity míry signálu protilátky proti AWN spermadhesinu a koncentracemi spermií jednotlivých kanců. Je zde zřetelná individualita v množství AWN proteinu, kdy nejvyšší průměrné hodnoty optické denzity detekovaného proteinu dosáhl kanec Krysa stejně jako u AQN spermadhesinu. Průměrné hodnoty u dalších kanců jsou srovnatelné.

Zatímco na grafu č. 10 je vidět individualita poměru relativní optické denzity míry signálu protilátky proti spermadhesinu AWN a celkové nanášky proteinů u jednotlivých kanců. V tomto případě nejvyšších hodnot dosahoval kanec Jeep a nejnižší hodnoty měl opět kanec Jura. Kanec Chlór, ke kterému jsou výsledky vztahovány se přibližoval spíše k hodnotám kance Jury, zatímco kanec Jura se přibližoval k vyšším hodnotám kance Jeepa.



Graf č.9: Relativní optická denzita poměru signálu protilátky proti AWN a koncentrace spermií společně s jejich \pm SEM. Statisticky významný rozdíl zjištěn byl ($p=0,000306$).

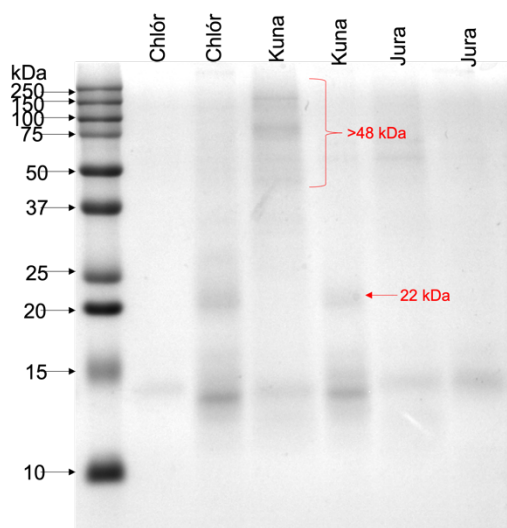


Graf č.10: Relativní optická denzita poměru signálu protilátky proti AWN a celkové nanášky proteinů společně s jejich \pm SEM. Statisticky významný rozdíl nebyl zjištěn ($p= 2,0249$).

Data byla vyhodnocena (viz kapitola 4.4.4, viz příloha tabulka P5) a stejně jako u spermadhesinu AQN nebyl u spermadhesinu AWN zjištěn statisticky významný rozdíl ($p>0,05$) v podílu signálu a celkové nanášky, zatímco v podílu signálu a koncentrace spermií u AWN spermadhesinu statisticky významný rozdíl ($p<0,05$) zjištěn byl (viz příloha tabulka P6).

5.2.1 Detekce AQN a AWN spermadhesinů na povrchu kančích spermií

Byly izolovány povrchové proteiny z kančích ejakulovaných spermií (viz kapitola 4.2.3) od 3 kanců po dvou různých odběrech. Povrchové proteiny byly elektroforeticky rozděleny a gel byl obarven pro vizualizaci izolovaných proteinů (viz kapitola 4.3). Výsledky barvení gelu spermií jsou zobrazeny na obrázku č. 9. Molekulové hmotnosti, v jakých předpokládáme spermadhesiny jsou slaběji viditelné u všech kanců kolem 14 kDa. Další proteiny jsou slabě viditelné u dvou vzorků okolo 22 kDa a u pár vzorků je viditelná forma >48 kDa.

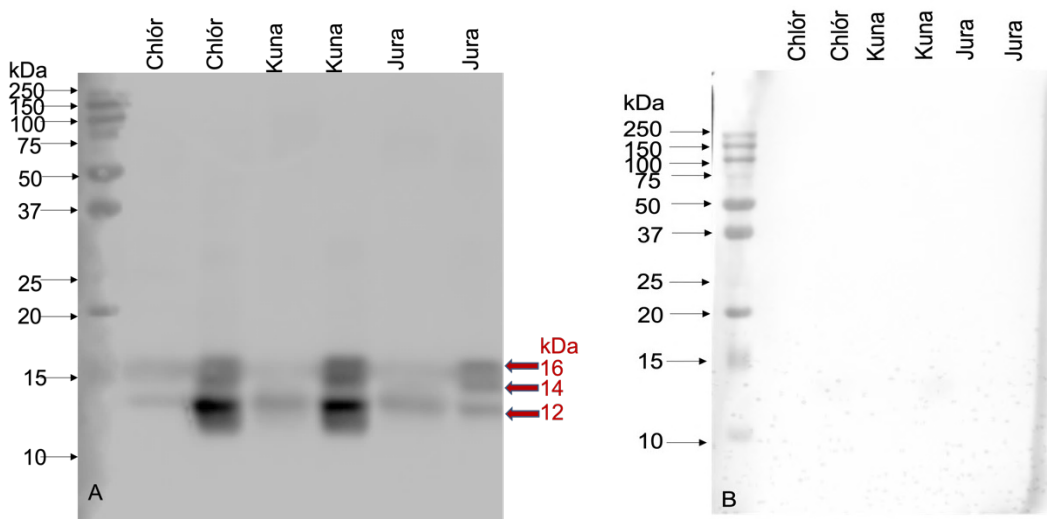


Obrázek č. 9: Vizualizace proteinů na povrchu kančích spermií pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 získaných od tří kanců.

Rozdělené proteiny povrchových proteinů spermií byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu metodou Western blot (viz kapitola 4.4) a provedena detekce AQN a AWN spermadhesinů pomocí protilátek (viz kapitola 4.4.2).

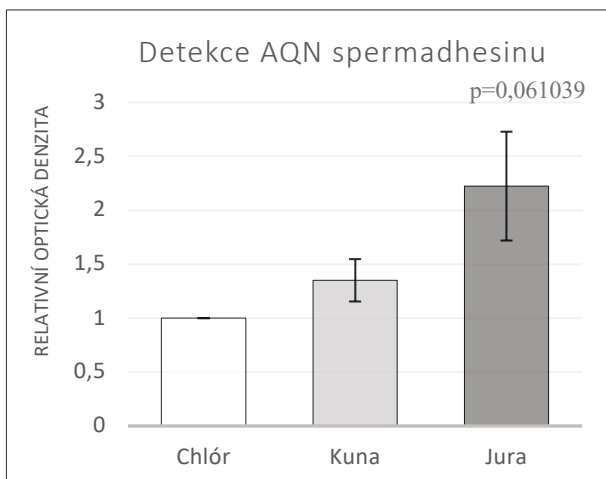
Detekce AQN spermadhesinu v proteinovém extraktu z povrchu spermií byla provedena celkem ve třech replikátech a jedna z těchto detekcí je zobrazena na obrázku č. 10A. Protilátkou proti AQN spermadhesinu byly detekovány tři výraznější proteinové proužky o molekulové hmotnosti kolem 12 kDa, 14 kDa a 16 kDa. U všech vzorků byla viditelná forma především o 12kDa. Zmíněné detekované formy jsou označeny na obrázku č. 10A šipkami a popisky, přičemž na první pohled je zcela jasná individualita mezi jednotlivými kancí.

Membrány, které sloužily pro negativní kontrolu, byly inkubovány pouze se sekundární protilátkou bez protilátky primární. Na membráně nebyla zaznamenána žádná pozitivní reakce (Obr. č. 10B).



Obrázek č. 10: Imunodetekce AQN spermadhesinu v extraktech proteinů izolovaných z povrchu kančích spermií (A) a negativní kontrola po inkubaci pouze se sekundární protilátkou (B).

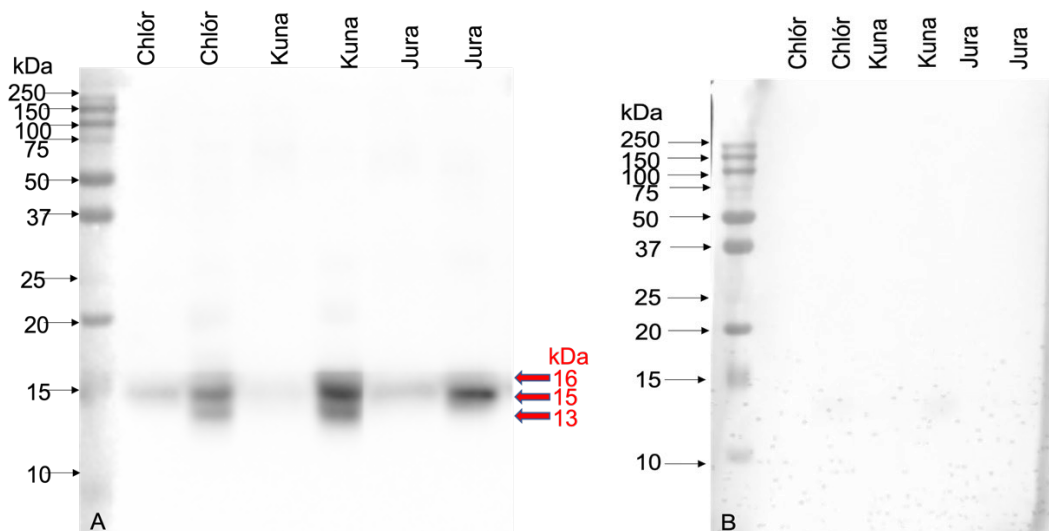
Pro vyhodnocení zastoupení spermadhesinů AQN a AWN na povrchu spermií jednotlivých kanců byla provedena denzitometrická analýza (viz kapitola 4.4.4, viz příloha tabulka P7). Výsledek denzitometrické analýzy u AQN spermadhesinu je zobrazen na Grafu. č. 11. Na tomto grafu je zřetelná individualita relativní optické denzity míry signálu protilátky proti spermadhesinu AQN v extraktu povrchových proteinů spermií jednotlivých kanců. U spermadhesinu AQN nejvyšších průměrných hodnot detekovaného AQN proteinu vykazoval kanec Jura a nejnižší Chlór, ke kterému jsme výsledky vztahovaly v rámci všech experimentů. Data byla statisticky vyhodnocena (viz kapitola 4.4.4) a u poměru síly signálu a celkové nanášky proteinů nebyl u AQN spermadhesinu zjištěn statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$).



Graf č.11: Průměrná relativní optická denzita síly signálu protilátky proti AQN u jednotlivých vzorků proteinů z povrchu proteinů společně s jejich \pm SEM, přičemž výsledky jsou vztaženy ke kanci jménem Chlór. Statisticky významný rozdíl zjištěn nebyl (0,061039).

Spermadhesin AWN byl detekován v proteinovém extraktu z povrchu spermií. Tato detekce byla provedena celkem třikrát a jedna z těchto detekcí je zobrazena na obrázku č. 11A. Protilátkou proti AQN spermadhesinu byly detekovány tři výraznější proteinové proužky o molekulové hmotnosti kolem 13 kDa, 15 kDa a 16 kDa, ale u všech vzorků byla zřetelná především 15 kDa forma. Tyto formy jsou zobrazeny na obrázku č.11 s šipkami a s popisky. Individualita mezi kanci je však naprosto viditelná.

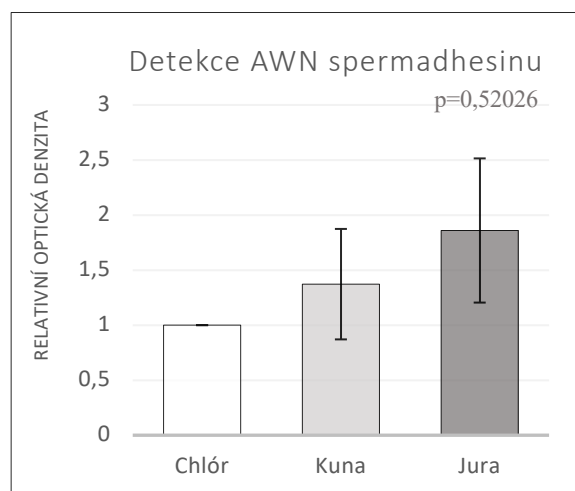
Membrány pro negativní kontroly, byly inkubovány jen s protilátkou sekundární bez protilátky primární. Na těchto membránách nebyla zaznamenána žádná pozitivní reakce (Obr. č. 11B).



Obrázek č. 11: Imunodetekce AWN spermadhesinu na povrchu kančích spermií (A) a negativní kontrola po inkubaci pouze se sekundární protilátkou (B).

Výsledek denzitometrické analýzy u AWN spermadhesinu je zobrazen na Grafu. č. 12. Na tomto grafu je viditelná individualita relativní optické denzity míry signálu protilátky proti spermadhesinu AWN vztažené k celkové nanášce proteinů v extraktu proteinů izolovaných z

povrchu spermií jednotlivých kanců. Nejvyšší průměrné hodnoty detekovaného AWN proteinu vykazoval kanec Jura a nejnižší Chlór, ke kterému byly výsledky vztahovány v rámci všech experimentů. Data byla statisticky vyhodnocena (viz kapitola 4.4.4, viz příloha tabulka P8) a u poměru síly signálu a celkové nanášky proteinů nebyl u AWN spermadhesinu zjištěn statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$).



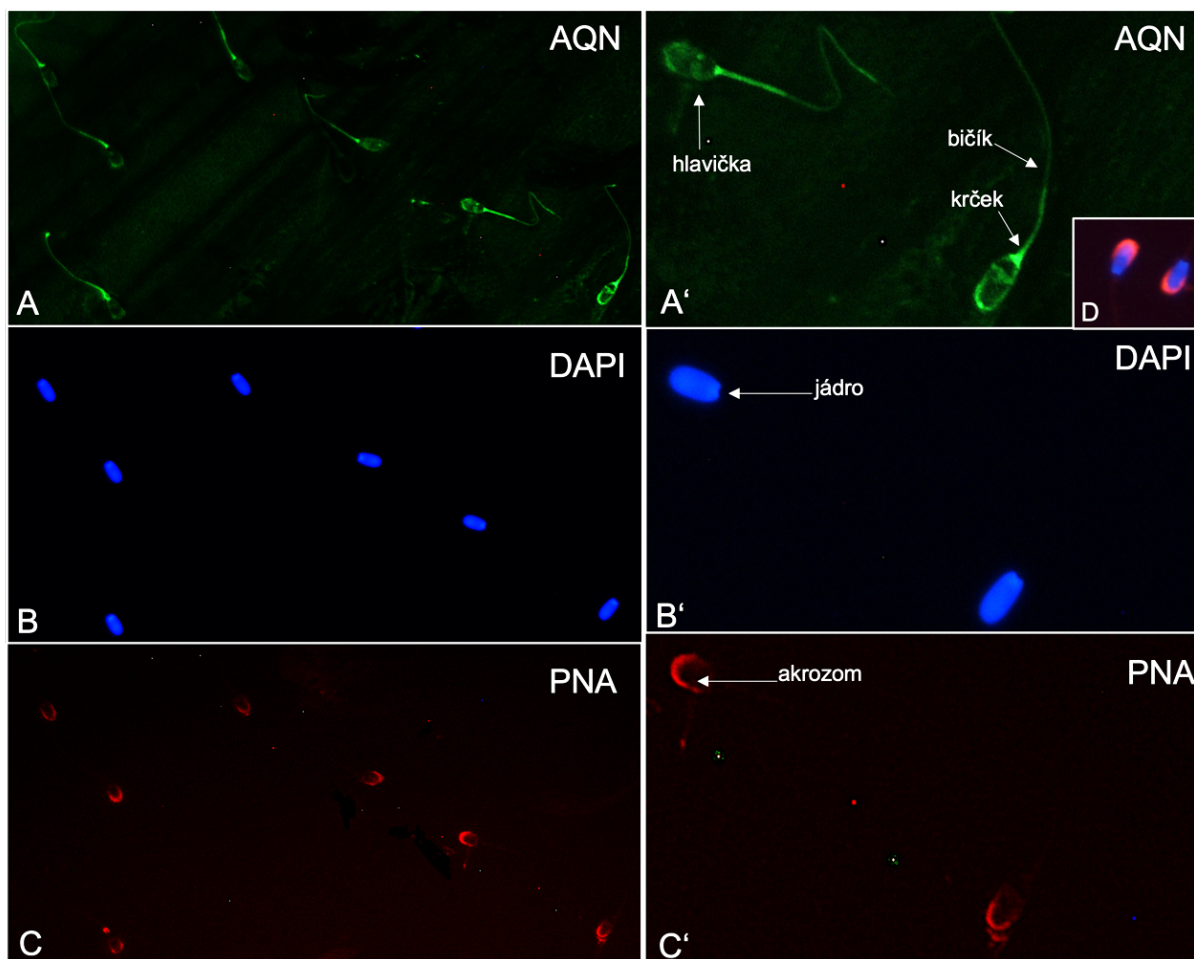
Graf č. 12: Průměrná relativní optická denzita síly signálu protilátky proti AWN u jednotlivých vzorků proteinů z povrchu proteinů společně s jejich \pm SEM, přičemž výsledky jsou vztahy ke kanci jménem Chlór. Statisticky významný rozdíl nebyl zjištěn (0,52026).

5.3 Lokalizace AQN a AWN spermadhesinů ve spermiích pomocí nepřímé imunofluorescence

Pro detekci a přesnou lokalizaci spermadhesinů na ejakulovaných spermiích byly využity vzorky z odběrů celkem od pěti kanců.

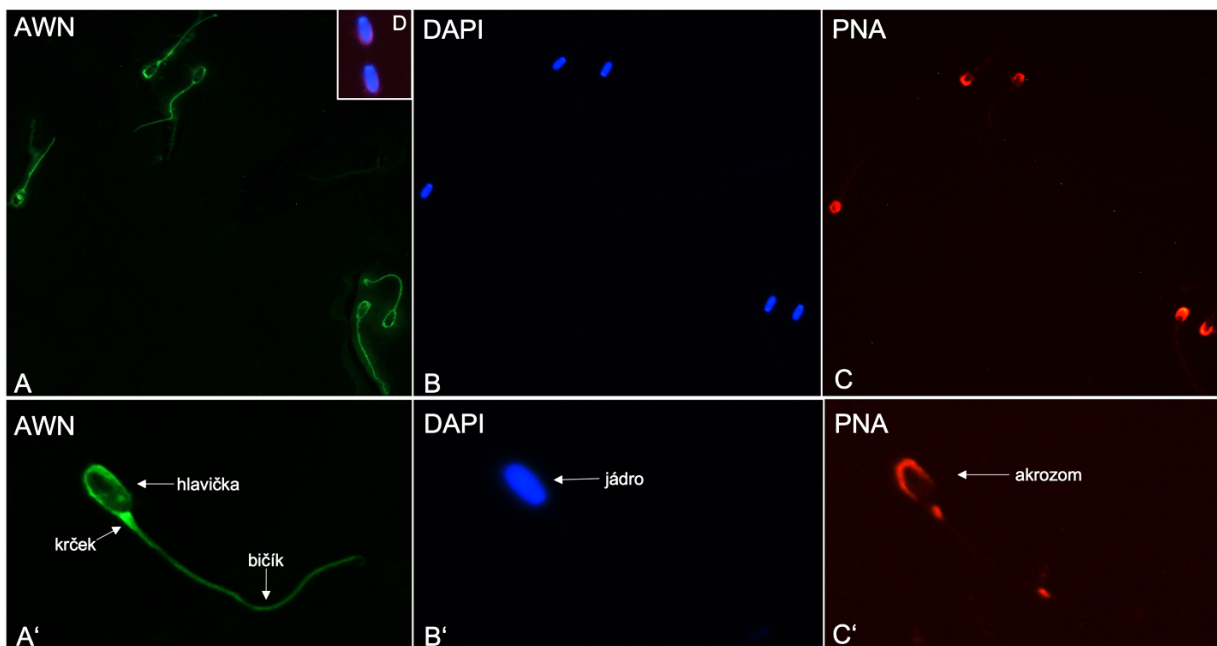
Byly připraveny prepráty vzorků spermií v suspenzi nebo fixovaných na mikroskopickém skle inkubované s protilátkou proti AQN či AWN spermadhesinům (viz kapitola 4.5). K vizualizaci byla použita sekundární protilátka konjugovaná s Alexa Fluor™ 488 (zelená fluorescence). Pomocí PNA lektinu konjugovaného s rhodaminem byl vizualizován akrozom spermií (červená fluorescence) a jádra spermií byla značena pomocí DAPI (modrá fluorescence) v montovacím médiu. Spermie pro negativní kontroly byly inkubovány pouze se sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům.

Na obrázku č. 12 jsou zobrazeny kančí ejakulované spermie, které byly fixovány aceton/metanolem s detekovaným AQN proteinem. Spermadhesin AQN byl pomocí protilátky lokalizován především na povrchu akrozomální čepičky, v oblasti krčku a střední části bičíku (Obr. č. 12A, A'). Na obrázku č. 12A', B', C' je zobrazen detail lokalizace AQN spermadhesinu na dvou ejakulovaných spermiích fixovaných aceton/metanolem.



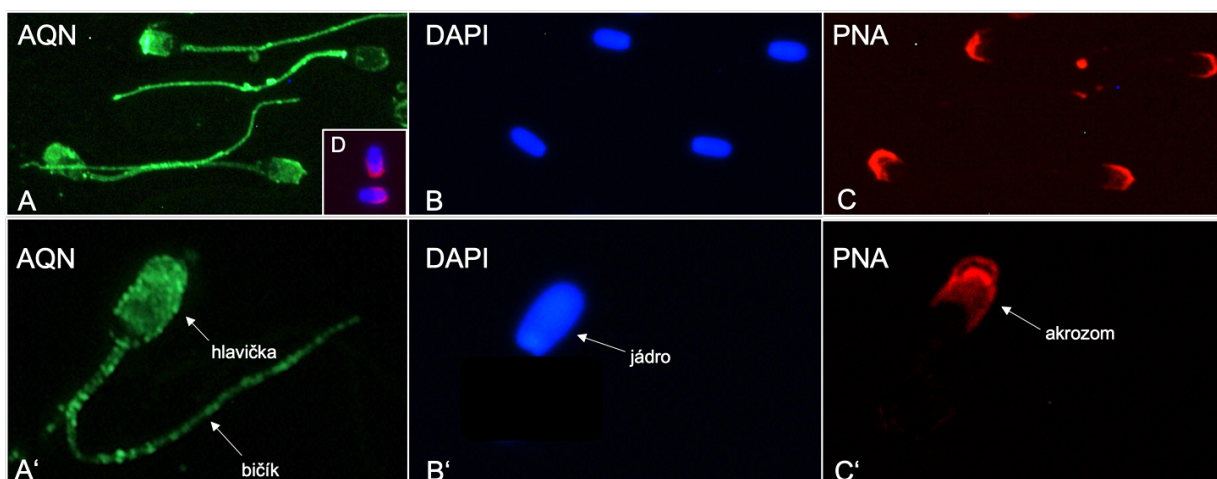
Obrázek č. 12: Imunolokalizace AQN spermadhesinu v ejakulovaných kančích spermích fixovaných aceton/metanolem pomocí specifické protilátky (A, A'), jádro značené DAPI (B, B'), značený akrozom pomocí PNA lektinu (C, C') a negativní kontrola pouze se sekundární protilátkou (D).

Na obrázku č. 13 jsou zobrazené kančí ejakulované spermie, které byly fixovány aceton/metanolem, kde byl detekován AWN protein. Spermadhesin AWN byl pomocí protilátky lokalizován především na povrchu hlavičky, v oblasti krčku a po celém bičíku (Obr. č. 13A, A'). Na obrázku č. 13 (A', B', C') je zobrazen detail lokalizace AWN spermadhesinu na jedné ejakulované spermii fixované aceton/metanolem.



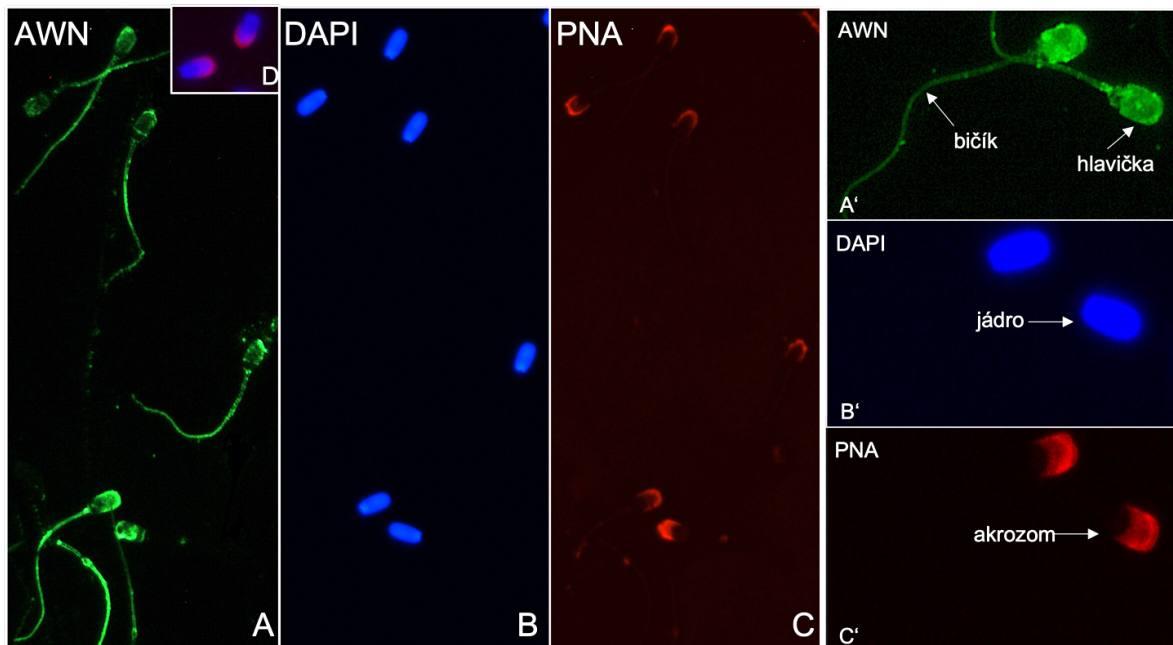
Obrázek č. 13: Imunolokalizace AWN spermadhesinu v ejakulovaných kančích spermích fixovaných aceton/metanolem pomocí specifické protilátky (A, A'), jádro značené DAPI (B, B'), značený akrozom pomocí PNA lektinu (C, C') a negativní kontrola pouze se sekundární protilátkou (D).

Obrázek č. 14 představuje kančí ejakulované spermie připravené v suspenzi, kdy nebyla permeabilizována plazmatická membrána spermii a spermadhesin AQN byl pomocí protilátky lokalizován přímo na povrchu buněk. AQN protein byl nalezen po celé hlavičce i bičíku spermie (Obr. č. 14A, A'). Na obrázku č. 14 (A', B', C') je zobrazen detail lokalizace AQN spermadhesinu na povrchu jedné ejakulované spermie.



Obrázek č. 14: Imunolokalizace AQN spermadhesinu v ejakulovaných kančích spermích inkubovaných v suspenzi se specifickou protilátkou (A, A'), jádro značené DAPI (B, B'), značený akrozom pomocí PNA lektinu (C, C') a negativní kontrola pouze se sekundární protilátkou (D).

Obrázek č. 15 představuje kančí ejakulované spermie připravené v suspenzi s nepermeabilizovanou plazmatickou membránou spermii a spermadhesin AWN byl pomocí protilátky lokalizován přímo na povrchu buněk. AWN protein byl detekován po celé hlavičce i bičíku spermie (Obr. č. 15A, A'). Na obrázku č. 15 (A', B', C') je zobrazen detail lokalizace AWN spermadhesinu na povrchu dvou ejakulovaných spermií.



Obrázek č. 15: Imunolokalizace AWN spermadhesinu v ejakulovaných kančích spermích inkubovaných v suspenzi se specifickou protilátkou (A, A'), jádro značené DAPI (B, B'), značený akrozom pomocí PNA lektinu (C, C') a negativní kontrola pouze se sekundární protilátkou (D).

6 Diskuze

Semenná plazma (SP) je složena převážně z proteinů, jenž jsou nezbytné pro normální funkci spermií a pro plodnost kance, protože poskytují nutriční podporu a ochranné prostředí pro spermie (Flowers et al. 2016). Proteiny v SP mohou ovlivňovat také přežití spermií při kryokonzervaci a následném rozmražení, anebo bránit kapacitačním změnám, ke kterým může dojít během těchto procesů (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Nejvíce prozkoumanými proteiny v SP kanců s velmi dobře popsanou strukturou a kompletní charakterizací jsou spermadhesiny (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002). Spermadhesiny tvoří hlavní proteinovou složku (75-90 %) SP kanců a jejich velikost se pohybuje kolem 12-16 kDa (Töpfer-Petersen et al. 1998, Höffner et al. 2020a). V podobných molekulových vahách jsme oba zkoumané spermadhesiny detekovali pomocí specifických protilátek, a to jak v SP, ejakulovaných spermiích, tak také v extraktech proteinů spermií cíleně izolovaných z jejich povrchu. Tato pozitivní detekce spermadhesinů byla potvrzena ve všech opakováních. Detekovali jsme vzorky celkem od sedmi kanců plemene Duroc, přičemž stabilně jsme dále pracovali pouze s ejakuláty od čtyř kanců, od kterých jsme získali vzorky z více odběrů z různých dnů.

Přestože jsou spermadhesiny popisovány jako hlavní proteiny kančí SP, tak jejich přítomnost je popsána i na povrchu membrány spermií. Jejich možné účinky na spermie jsou od motility až po interakci s oocytem (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005, Maňásková et Jonáková 2008). Spermadhesiny svou vazbou na povrch spermií vytváří proteinové obalové vrstvy a také se účastní různých typů interakcí v dalších krocích reprodukčního procesu (Maňásková et Jonáková 2008), a proto jsme se i v naší studii zaměřili na detekci spermadhesinů nejen u vzorků SP, ale i v proteinových lyzátech spermií včetně izolovaných proteinů z jejich povrchu. I přes to, že povrch spermií je pokryt velkým množstvím různých spermadhesinů (Dostálová et al. 1994), tak ale relativní množství různých spermadhesinů na povrchu ejakulovaných spermií neodráží jejich relativní množství v SP. Množství AWN, AQN-1 a AQN-3 je až dvakrát vyšší ve spermiích než v SP, zatímco naopak koncentrace AQN-2 spermadhesinu je ve spermiích nižší než v SP (Sinowatz et al. 1995). Většina dřívějších prací využívala vzorky ejakulátu smíchaných od několika kanců, jako například studie Maňásková et al. (2003), což však neukazovalo individualitu mezi jednotlivci. Naše práce však ukázala, že mezi jednotlivými kanci byla individualita prokázána. Například v množství celkové nanášky proteinů v SP byla u kance Krysy jedna z nejnižších, avšak množství celkové nanášky proteinů ve spermiích vykazovalo u tohoto kance hodnoty nejvyšší oproti ostatním kancům. V naší práci jsme se však nezabývali rozdílem množství proteinů v SP a vázaných na spermie, je zde ale možnost do budoucna dalšího zajímavého výzkumu.

Přítomnost spermadhesinů je v procesu fertilizace klíčová a ukazuje jasnou roli spermadhesinů v tomto procesu u prasat (Jonáková et al. 2000), což dokazuje fakt, že u žádného ze vzorků nebyla v této práci detekce množství navázaných spermadhesinů negativní. V průběhu fertilizace mohou mít spermadhesiny různé role, jelikož se účastní procesů jako je kapacitace a tvorba oviduktálního rezervoáru (Jonáková et al. 2000, Töpfer-Petersen et al. 2005). Spermie se dostanou do kontaktu se SP během ejakulace, kdy dochází, k již zmíněné tvorbě ochranné proteinové vrstvy na jejich povrchu. Těmto ochranným molekulám se souhrnně říká dekapacitační faktory, jelikož zabraňují předčasné kapacitaci spermií (Gadella et

Luna 2014, Zigo et al. 2020). U prasat tuto ochrannou vrstvu na ejakulované spemii tvoří právě spermadhesiny (Maňásková et Jonáková 2008). Během kapacitace se pak část spermadhesinů z povrchu spermií uvolňuje a část na povrchu zůstává a je zapojena do vazby spermií na ZP oocytu (Dostálová et al. 1994, Ensslin et al. 1995, Töpfer-Petersen et al. 1998). Nejspíše proto jsme v naší studii zaznamenali určitou souvislost mezi množstvím AQN i AWN spermadhesinů v SP a jejich množstvím ve spermiích nebo na jejich povrchu u jednotlivých kanců. Bylo popsáno, že se spermadhesiny AWN a AQN3 váží na povrch spermií pomocí interakce s fosfolipidy v plazmatické membráně spermie. Jsou tedy nejtěsněji spojeny s povrchem spermií a mohou zabraňovat předčasné akrozomové rakci (Dostálová et al. 1994). Navíc spermadhesiny v kančí SP převažují v agregovaných formách nad jejich formami monomerními. Tvorba agregovaných forem představuje mnohem komplexnější pohled na obalovou vrstvu proteinů tvořenou na plazmatické membráně spermií, protože ukazuje na možnou rozdílnou funkci jednotlivých spermadhesinů v rámci reprodukce (Calvete et al. 1995b, Jonáková et al. 2000, Maňásková et al. 2003). Ve vzorcích SP použitých v této práci byla nalezena pozitivní detekce spermadhesinů také kolem molekulové hmotnosti 150 kDa u AQN a 75 kDa u AWN spermadhesinu. Tato skutečnost by mohla poukazovat právě na tyto agregované formy detekovaných spermadhesinů. Navíc v případě AQN spermadhesinu byla u spermií slabší detekce zaznamenána v molekulových hmotnostech >20 kDa a u AWN spermadhesinu zřetelné dva slabší proteinové proužky o 25 kDa a 37 kDa a slabší detekce >50 kDa, což může odpovídat multimerním komplexům v rámci proteinové rodiny spermadhesinů či kovalentní interakci s jinými proteiny.

Imunodetekce byla v této práci hodnocena pomocí denzitometrické analýzy, přičemž hodnocení bylo dvojitě. Prvním bylo hodnocení vztažené k naměřené koncentraci proteinů v SP, popřípadě u spermií k jejich počtu v ejakulátu a druhým bylo hodnocení k celkové nanášce proteinů ve vzorcích. Rozdíl v SP mezi koncentrací proteinů a celkovou nanáškou nebyl prakticky žádný, pouze u kance Jury byla u obou spermadhesinů mírně vyšší hodnota celkové nanášky oproti množstvím proteinů. Statisticky významný rozdíl byl tedy zjištěn pouze v případě podílu signálu spermadhesinu AQN ke koncentraci proteinů v SP. U analýzy spermií mezi koncentrací proteinů a celkovou nanáškou byl však patrný rozdíl u kance Krysy, jenž vykazoval u obou spermadhesinů vysoké hodnoty a proč tomu tak nejspíše bylo je popsáno níže. U spermií byl však oproti SP v případě podílu signálu obou spermadhesinů ke koncentraci spermií ve vzorcích různých kanců zjištěn statisticky významný rozdíl, a tudíž byla prokázána individualita v proteinovém složení mezi jedinci. V případě neprokázání statisticky významného rozdílu je však mezi kanci také vidět určitá individualita v množství spermadhesinů jak v SP, tak v proteomu spermií. Studie na individualitu ejakulátu jednotlivých kanců však neexistují, je však možné, že rozdíly mezi jednotlivými kanci mohou mít vliv například na fertilitu jedinců. Snížené množství spermadhesinů by mohlo znamenat nižší přežitelnost spermií v samčím reprodukčním traktu nebo i sníženou schopnost vazby spermií na ZP oocytu. Pro potvrzení této hypotézy je ale nutnost dalšího výzkumu.

Detekce spermadhesinů v proteinových extraktech izolovaných z povrchu spermií byla limitována efektivitou izolace. Z našich výsledků je patrné, že u vzorků od dvou kanců ze stejného dne ve všech měřeních byla detekce silná a z jiných dnů u těch samých kanců byla detekce mnohem slabší. Proto pro přesnější vyhodnocení by měl být experiment detekce spermadhesinů v proteinovém profilu získaném z povrchu spermií vícekrát zopakován a

ejakulát kanců by pro větší přesnost a objektivnost výsledků měl být odebrán pro tento experiment vícekrát. V této práci jsme detekovali spermadhesiny izolované z povrchu spermií pomocí značení biotinem, přičemž tuto techniku představil Zhao et al. (2004). Tato metoda však má svá omezení vyplývající především z toho, že adice biotinových skupin je omezena na vnější proteinovou vrstvu na spermiích a závisí na přístupnosti amidových skupin na proteinu pro reakci s biotinylačním činidlem (Zigo et al. 2013).

V této práci byly spermadhesiny pomocí imunofluorescenční mikroskopie na ejakulovaných kančích spermiích fixovaných aceton/metanolem pomocí protilátky lokalizovány především na povrchu akrozomu a po celém bičíku, což ukazuje i studie Sanz et al. (1992), dle které epitopy AWN pokrývají celou membránu akrozomální části kančí spermie. Tyto výsledky ukazují, že AWN spermadhesin splňuje kritéria pro molekulu, jenž hraje roli ve vazbě spermií na ZP oocyty (Sanz et al. 1992). Oproti tomu Zigo et al. (2019) fixovali ejakulované a kapacitované spermie formaldehydem s následnou permeabilizací membrány. Nicméně problémem fixace formaldehydem může být zesíťování proteinů a maskování epitopů pro protilátku (Zigo et al. 2019). My jsme navíc pro přesnou lokalizaci těchto povrchových proteinů zvolili inkubaci spermií s protilátkami přímo v suspenzi, kdy jsme zaznamenali odlišné značení po celé hlavičce spermie oproti reakci protilátek na fixovaných spermiích, kde byl signál pouze po jejím obrysu.

Na celkovou kvalitu ejakulátu má také vliv ročního období. V naší studii byly použity vzorky z období od června do listopadu. Objem a koncentrace ejakulátu se lišily nejen mezi jednotlivými kanci, ale také mezi jednotlivými odběry. Kvalita ejakulátu se totiž během ročních období mění a tento sezónní efekt byl vyzorován u většiny parametrů kvality ejakulátu, kterými jsou například koncentrace spermií, motilita spermií či celkový počet spermií (Smital 2009, Luc et al. 2013). I když podle zmíněných studií objem ejakulátu sezónou ovlivňován není, tak my jsme rozdíl mezi objemy ejakulátů během období, kdy náš výzkum probíhal, zaznamenali. U některých kanců se objem zvýšil během jednoho měsíce i o desítky mililitrů, zatímco některým se objem naopak snížil. Nicméně z uvedených prací (Smital 2009, Luc et al. 2013) není jasné, zda byl monitorován celkový objem ejakulátu, který je u kanců složený z několika frakcí (Smital 2000, Akcay et al. 2006) nebo se jedná o frakci spermiovou, se kterou jsme pracovali my během našich experimentů.

Při porovnání výsledků poměru signálu protilátky proti AQN i AWN spermadhesinu a koncentrace spermií a poměru signálu protilátky proti AQN i AWN spermadhesinu a celkové nanášky proteinů vykazoval, jak už bylo výše řečeno obrovské rozdíly oproti ostatním kancem Krysa, což by mohlo být z důvodu toho, že ejakulát od tohoto kance byl zpracován jen jednou a tento vzorek ejakulátu měl vyšší celkový objem a vzhledem k ostatním kancům naopak mnohem nižší koncentraci spermií. Tomuto kanci byl ejakulát odebrán a zpracován začátkem zří, což by mohlo být způsobeno tím, že koncentrace a celkový počet spermií bývá nejnižší v létě a na podzim, zatímco vyšší na jaře a v zimě (Smital 2009, Luc et al. 2013). Pro potvrzení této teorie by však bylo nutné zopakovat odběry tohoto kance pro více vzorků. Proto pro zajímavost byli srovnáni dva kanci (Jeep a Chlór), jelikož u těchto dvou kanců proběhla detekce na všech membránách ve všech experimentech. Nelze to však tvrdit na základě srovnání průměrné relativní optické denzity síly signálu protilátky proti AQN a protilátky proti AWN spermadhesinu. V tomto případě hraje roli afinita každé z těchto protilátek k daným proteinům. Pokud bychom chtěli určit přesné množství určitého spermadhesinu ve vzorku SP

u jednotlivých kanců, museli bychom využít metody separační chromatografie podle studie Jonáková et al. (1998).

I když námi stanovená hypotéza, že se množství spermadhesinů v SP jednotlivých kanců bude lišit, byla potvrzena, je nutné se zamyslet nad dalšími experimenty, které by vyvodily jasné závěry. Jak již bylo zmíněno, snížené množství spermadhesinů v SP, popřípadě na spermiích by mohlo odrážet fertilizační schopnosti spermií jednotlivých kanců. Bohužel inseminační stanice LIPRA PORK, a.s. Skršín nemá k jednotlivým kancům jejich individuální data týkající se jejich plodnosti. V této stanici se řídí v plemenitbě pouze celkovou mírou zabřezávání prasnic a data shromažďují během určitého období. Navíc inseminace jsou prováděny směsnými inseminačními dávkami, aby byly zohledněny právě zmíněné výkyvy v koncentraci a kvalitě spermií. Pro případné další experimenty by bylo vhodné znát přesná data a detailnější informace o plodnosti jednotlivých kanců či se případně zaměřit na detailnější popis funkčních parametrů daných spermií, jakými jsou změny v morfologii, motilitě, navození kapacitace a akrozomální reakce nebo jejich schopnosti interakce s oocytem.

7 Závěr

Cíle této práce vycházely z hypotézy, že množství spermadhesinů v SP jednotlivých kanců se bude lišit, a proto bylo sledováno množství AQN a AWN spermadhesinů na základě jejich detekce pomocí protilátek v SP a spermích u jednotlivých kanců. Z naší studie vyplývají následující závěry:

- ⇒ AQN spermadhesin byl detekován v SP v molekulové váze v rozmezí 11-17 kDa a AWN v rozmezí 12-19 kDa. U AQN byl navíc detekován proteinový proužek okolo 150 kDa a u AWN okolo 75 kDa, které by mohly odpovídat multimerním formám těchto proteinů.
- ⇒ Byla provedena denzitometrická analýza, kdy u poměru síly signálu protilátky a celkové nanášky proteinů SP u AQN i AWN spermadhesinu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl. Zatímco v případě hodnocení poměru síly signálu protilátky proti AQN spermadhesinu a koncentrace proteinů v SP jednotlivých kanců statisticky významný rozdíl zjištěn byl a potvrzeno tím individuální proteinové složení SP.
- ⇒ U spermadhesinu AQN i AWN nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v množství těchto proteinů v lyzátech spermíí vztaženému k celkové proteinové nanášce, zatímco v podílu signálu ke koncentraci spermíí u obou spermadhesinů u jednotlivých kanců statisticky významný rozdíl byl zjištěn.
- ⇒ Byla provedena izolace povrchových proteinů spermíí tří kanců s různou účinností s následnou detekcí obou spermadhesinů ve třech proteinových prouzcích s molekulovými hmotnostmi v rozmezí 12-16 kDa několika forem.
- ⇒ U spermadhesinů detekovaných na povrchu spermíí v poměru síly signálu a celkové nanášky proteinů nebyl u AQN ani u AWN spermadhesinu zjištěn statisticky významný rozdíl ve vzorcích různých kanců.
- ⇒ Mezi lokalizací AQN a AWN spermadhesinů u spermíí fixovaných aceton/metanolem či v suspenzi nebyl zaznamenán žádný výrazný rozdíl. Nicméně metoda inkubace protilátky se spermii přímo v suspenzi představuje lepší přístup pro lokalizaci těchto povrchových proteinů.

U vzorků jednotlivých kanců byla v množství navázaných AQN a AWN spermadhesinů patrná individualita mezi nimi, jak v SP, tak spermích. Bylo by však potřeba více opakování s větším výběrem kanců a se zjištěním dalších parametrů, jakými jsou například integrita membrány spermíí, nebo hodnocení schopnosti kapacity či samotné fertility spermíí od jednotlivých kanců.

8 Literatura

- Akçay, E., Reilas, T., Andersson, M., Katila, T. 2006. Effect of Seminal Plasma Fractions on Stallion Sperm Survival after Cooled Storage. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. **53**(9). 481-485.
- Alghamdi, A. S., Lovaas, B. J., Bird, S. L., Lamb, G. C., Rendahl, A. K., Taube, P. C., Foster, D. N. 2009. Species-specific interaction of seminal plasma on sperm-neutrophil binding. *Animal Reproduction of Science*. **114**. 331–344.
- Alkmin, D. V., Perez-Patino, C., Barranco, I., Parrilla, I., Vasquez, J. M., Martinez, E. A., Rodriguez-Martinez, H., Roca, J. 2014. Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate. *Cryobiology*. **69**. 203-210.
- Almlid, T., Hofmo, P. O. 1996. A brief review of frozen semen application under Norwegian AI service conditions. *Reproduction in Domestic Animals*. **31**(1). 169-173.
- Alvarez, J. G., Storey, B. T. 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*. **42**(3). 334-346.
- Alves, M. B. R., Celeghini, E. C. C., Belleannée, C. 2020. From Sperm Motility to Sperm-Borne microRNA Signatures: New Approaches to Predict Male Fertility Potential. *Frontiers in Cell and Development Biology*. **8**. 1–16.
- Amann, R. P. 2011. Physiology and Endocrinology. Pages 881-908 in: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner VV, editors. *Equine reproduction*. Second edition. WileyBlackwell, Singapore.
- Ari, U., Daskin, A. 2010. Freezing of Washed Angora Goat Semen with Extenders Added Bull or Ram Seminal Plasma. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **16**. 233-237.
- Assreuy, A. M., Calvete, J. J., Alencar, N. M., Cavada, B. S., Rocha-Filho, D. R., Melo, S. C., Cunha, F. Q., Ribeiro, R. A. 2002. Spermadhesin PSP-I/PSP-II Heterodimer and Its Isolated Subunits Induces neutrophil Migration into the Peritoneal Cavity of rats. *Biology of Reproduction*. **76**(6). 1796-1803.
- Audebert, S., White, D., Cosson, J., Huitorel, P., Eddé, B., Gagnon, C. 1999. The carboxy-terminal sequence Asp427-Glu432 of beta-tubulin plays an important function in axonemal motility. *European Journal of Biochemistry*. **261**. 48–46.
- Aumüller, G., Riva, A. 1992. Morphology and functions of the human seminal vesicle. *Andrologia*. **24**. 183-196.

- 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.
- Badia, E., Pinart, E., Briz, M. 2005. Lectin histochemistry of the boar bulbourethral flanda. *European Journal of Histochemistry*. **49** (2). 131-138.
- Bork, P., Beckmann, G. 1993. The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *Journal of Molecular Biology*. **231**. 539-545.
- Brohi, R. D., Huo, L. J. 2017. Posttranslational modifications in spermatozoa and effects on male fertility and sperm viability. *Omics*. **21**. 245-56.
- Bubeníčková, F., Postlerová, P., Šimonik, O., Sirohi, J., Šichtář, J. 2020. Effect of Seminal Plasma Protein Fractions on Stallion Sperm Cryopreservation. *International Journal of Molecular Sciences*. **21**(17). 6415.
- Caballero, I., Vazquez, J. M., Garcia, E. M., Parrilla, I., Roca, J., Calvete, J. J., Sanz, L., Martinez, E. A. 2008. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology*. **70**(8). 1352-1355.
- Calvete, J. J., Solís, D., Sanz, L., Diaz-Maurino, T., Schäfer, W., Mann, K., Töpfer-Petersen, E. 1993. Characterization of two glycosylated boar spermadhesins. *European Journal of Biochemistry*. **218**. 719-725.
- Calvete, J. J., Nessau, S., Mann, K., Sanz, L., Sieme, H., Klug, E., Töpfer-Petersen, E. 1994. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. *Reproduction of Domestic Animals* **29**. 411–426.
- Calvete, J. J., Sanz, L., Dostálová, Z., Töpfer-Petersen, E. 1995a. Spermadhesins: Sperm coating protein involved in capacitation and zona pellucida binding. *Fertilität*. **11**. 35-40.
- Calvete, J. J., Mann, K., Schäfer, W., Raida, M., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E. 1995b. Boar spermadhesin PSP-II: location of post-translational modifications, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. *FEBS Letters*. **365**. 179-182.
- Calvete, J. J., Carrera, E., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E. 1996. Boar spermadhesins AQN1 and AQN3 oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *FEBS Letters*. **379**. 207-211.
- Calvete, J. J., Sanz, L. 2007. Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins. *Society of Reproduction and Fertility* **65**. 201–215.

- Centurion, F., Vazquez, J. M., Calvete, J. J., Roca, J., Sanz, L., Parrilla, I., Garcia, E. M., Martinez, E. A. 2003. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biology of Reproduction*. **69**. 640-646
- Dacheux, J. L., Gatti, J. L., Dacheux, F. 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation, *Microscopy Research and Technique*. **61**. 7–17.
- Dacheux, J. L., Belleannée, C., Jones, R., Labas, V., Belghazi, M., Guyonnet, B., Druart, X., Gatti, J. L., Dacheux, F. 2009. Mammalian epididymal proteome. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **306**. 45–50.
- Dacheux, J. L., Belleannée, C., Guyonnet, B., Labas, V., Teixeira-Gomes, A. P., Ecroyd, H., Druart, X., Gatti, J. L., Dacheux, F. 2012. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. **58**. 197-210.
- Dostálová, Z., Calvete, J. J., 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. *BBA-General Subjects*. **1200**. 48–54.
- Dostálová, Z., Calvete, J. J., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E. 1995. Boar spermadhesin AWN-1: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *European Journal of Biochemistry*. **230**. 329–336.
- Druart, X., de Graaf, S. 2018. Seminal plasma proteomes and sperm fertility. *Animal Reproduction of Science*. **194**. 33–40.
- Du, J., Shen, J., Wang, Y., Pan, Ch., Pang, W., Diao, H., Dong, W. 2016. Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. *Oncotarget*. **7(37)**. 58832-58847.
- Dyce, K. M., Sack, W. O., Wensing, C. J. G. 1999. *Anatomia Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana. Mexico. ISBN: 9780323442640.
- Dziedońska, A., Swiader, K., Koziorowska-Gilun, M., Mietelska, K., Zasiadczyk, L., Kordan, W. 2017. Effect of boar ejaculate fraction, extender type and time of storage on quality of spermatozoa. *Polish Journal of Veterinary Science*. **20**. 77-84.
- Ekhlasi-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.
- Ekhlasi-Hundrieser, M., Gohr, K., Wagner, A., Tsoлова, M., Petrunkina, A., Töpfer-Petersen, E. 2005. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in pig. *Biology of Reproduction*. **73(3)**. 536-545.

- Ensslin, M., Vogel, T., Calvete, J. J., Thole, H. H., Schmidtke, J., Matsuda, T., Töpfer-Petersen, E. 1998. Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. *Biology of Reproduction*. **58**. 1057–1064.
- Erickson, M. C. 1998. Chemistry and function of phospholipids. *Food lipids, chemistry, nutrition and biochemistry*. p. 41.
- Eriksson, B. M., Vazquez, J. M., Martinez, E. A. 2001. Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*. **55**(8). 1593-1605.
- Eriksson, B. M., Petersson, H., Rodríguez-Martínez, H. 2002. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology*. **58**(6). 1065-1079.
- Estrada, E., Rodríguez-Gil, J. F., Rocha, L. G., Balasch, S., Bonet, S., Yeste, M. 2014. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*. **2**. 88-99.
- Euler von, U. S. 1983. History and development of prostaglandins. *General Pharmacology: The Vascular System*. **14**(1). 3-6.
- Fahy, G. M. 1986. Vitrification: a new approach to organ cryopreservation. *Progress in clinical and biological research*. **224**. 305-335.
- Flesch, F. M., Gadella, B. M. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the proces of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1469**. 197-235.
- Flowers, W. L., Deller, F., Stewart, K.R. 2016. Use of heterospermic inseminations and paternity testing to evaluate the relative contributions of common sperm traits and seminal plasma proteins in boar fertility. *Animal Reproduction Science*. **174**. 123-131.
- Foote, R.H., Leonard, E.P. 1964. The influence of pH, osmotic pressure, glycine, and glycerol on the survival of dog sperm in buffered-yolk extenders. *Cornell Vet.* **54**(1). 78-89.
- Gadea, J. 2003. Review: Semen extender used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*. **1**. 17-27.
- Gadella, B. M., Tsai, P-S., Boerke, A., Brewis, I. A. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *The International Journal of Developmental Biology*. **52**(5-6). 473-480.
- Gage, M. J. G. 1998. Mammalian sperm morphometry. *The Royal Society*. **265**. 97-103.

- Gamčík, P., Kozumplík, J. 1984. Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. Príroda. Bratislava. 344 s.
- García-Contreras, A., De Loera, Y., García-Artiga, C., Palomo, A., Guavera, J. A., Herrera-Haro, J., López-Fernández, C., Johnston, S., Gosálvez, J. 2011. Elevated dietary intake of Zn-methionate is associated with increased sperm DNA fragmentation in the boar. *Reproductive Toxicology*. **31**. 570–573.
- Gilany, K., Minai-Tehrani, A., Savadi-Shiraz, E., Rezadoost, H., Lakpour, N. 2015. Exploring the Human Seminal Plasma Proteome: An Unexplored Gold Mine of Biomarker for Male Infertility and Male Reproduction Disorder. *Journal of Reproduction and Infertility*. **16**. 61-71.
- Haase, B., Schlötterer, C., Ekhlasi-Hundrieser, M., Kuiper, H., Distl, O., Töpfer-Petersen, E., Leeb, T. 2005. Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene*. **352**. 20-29.
- Hafez, B., Hafez, E. S. E. 2000. *Reproduction in Farm Animal*. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolan, J. P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal of Andrology*. **11**. 73. 88.
- Hao, Y., Mathialagan, N., Walters, E., Mao, J., Lai, L., Becker, D., Li, W., Critser, J., Prather, R. S. 2006. Osteopontin reduces polyspermy during *in vitro* fertilization of porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. **75**. 726-733.
- Hernandez-Aviles, C., Love, .CC., Serafini, R., Ghosh, S., Teague, S.R., LaCaze, K.A., Varner, D.D. 2018. The effects of extender glucose concentration and storage temperature on stallion semen quality following cooled storage. *Journal of Equine Veterinary Science*. **66**. 46.
- Höfner, L., Luther, A., Waberski, D. 2020a. The role of seminal plasma in the liquid storage of spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. **220**.
- Höfner, L., Luther, A., Palladini, A., Fröhlich, T., Waberski, D. 2020b. Tolerance of Stored Boar Spermatozoa to Autologous Seminal Plasma: A Proteomic and Lipodomic Approach. **21** (18). 6474.
- Huo, L. J., Yue, K. Z., Yang, Z. M. 2002. Characterization of viability, mitochondrial activity, acrosomal integrity and capacitation status in boar sperm during *in vitro* storage at different ambient temperatures. *Reproduction, fertility, and development*. **14**. 509-514.
- Chłopik, A., Wysokińska, A. 2019. Canine spermatozoa-What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reproduction in Domestic Animals*. **55**. 113-126.

- Jeng, H., Chu, H. H., Cheng, W. T., Chang, W. C., Su, S. J. 2001. Secretory origin and temporal appearance of the porcine beta-microseminoprotein (sperm motility inhibitor) in the boar reproductive system. *Molecular Reproduction and Development*. **58**. 63–68
- 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., Maňásková, P., Kraus, M., Liberda, J., Tichá, M. 2000. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. **56**. 275-277.
- Jovičić, M., Chmelíková, E., Sedmíková, M. 2020. Cryopreservation of boar semen. *Czech Journal of Animal Science*. **65**. 115-123.
- Karunakaran, M., Ratnakaran, U., Naik, P. K., Chakurkar, E. B. 2015. Electrophoretic profile of boar seminal proteins. *Journal of Applied Animal Research*. **44**(1). 403-405.
- Kayser, J.P., Amann, R.P., Shideler, R.K., Squires, E.L., Jasko, D.J., Pickett, B.W. 1992. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*. **38**. 601-614.
- Kierszenbaum, A. L. 2002. Sperm axoneme: A tale of tubulin posttranslation diversity. *Molecular Reproduction and Development*. **62**. 1–3.
- Kliment, J., Hintnaus, J., Novák, M., Rob, O., Šťastný, P. 1983. *Reprodukcia hospodárskych zvierat. Príroda*. Bratislava. 376 s.
- Knox, E. V. 2015. The fertility of frozen boar sperm when used for artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*. **50**. 90-97.
- Kommisrud, E., Paulenz, H., Sehested, E., Grevle, I. S. 2002. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. **43**(1). 49-55.
- Kwok, S. C. M., Soares, M. J., McMurtry, J. P., Yurewicz, E. C. 1993a. Binding characteristics and immunolocalization of porcine seminal protein, PSP-I. *Molecular Reproduction and Development*. **35**. 244-250.
- Kwok, S. C. M., Yang, D., Dai, G., Sores, M. J., Chen, S., McMurtry, J. P. 1993b. Molecular cloning and sequence analysis of two porcine seminal proteins, PSP-I and PSP-II: New members of the spermadhesin family. *DNA and Cell Biology*. **12**. 605-610.

- Li, J., Roca, J., Pérez-Patino, C., Barranco, I., Martinez, E. A., Rodriguez-Martinez, H., Parrilla, I. 2018. Is boar sperm freezability more intrinsically linked to spermatozoa than to the surrounding seminal plasma?. *Animal Reproduction Science*. **195**. 30-37.
- Lieu, P. T., Heiskala, M., Peterson, P. A., Yang, Y. 2001. The roles of iron in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*. **22**. 1–87.
- Loveland, K. L., Klein, B., Pueschl, D., Indumathy, S., Bergmann, M., Loveland, B.E., Hedger, M. P., Schuppe, H. C. 2017. Cytokines in male fertility and reproductive pathologies: Immunoregulation and beyond. *Frontiers in Endocrinology*. **8**. 307.
- Luther, A. M., Waberski, D. 2019. In vitro aging of boar spermatozoa: role of sperm proximity and seminal plasma. *Journal of Fertility*. **7**. 382-390.
- Maldera, J. A., Weigel Munoz, M., Chirinos, M., Busso, D., Ge, R. F., Battistone, M. A., Blaquier, J. A., Larrea, F., Cuasnicu, P. S. 2014. Human fertilization: epididymal hCRISP1 mediates sperm-zona pellucida binding through its interaction with ZP3. *Molecular Human Reproduction*. **20**(4). 341-349.
- Mann, T., Lutwak-Mann, C. 1981. *Male Reproductive Function and Semen*. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Manjunath, P., Sairam, M.R., Uma, J. 1987. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Bioscience Reports*. **7**(3). 231-238.
- Manjunath, P., Baillargeon, L., Marcel, Y. L., Seidah, N. G., Chrétien, M., Chapdelaine, A. 1988. Diversity of Novel Proteins in Gonadal Fluids. *Molecular Biology of Brain and Endocrine Peptidergic Systems*. 259-273.
- Manjunath, P., Thérien, I. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*. **53**. 109–119.
- Manjunath, P., Bergeron, A., Lefebvre, J., Fan, J. 2007. Seminal plasma proteins functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Social Reproduction. Fertility Supplement*. **65**. 217-228.
- Maňásková, P., Mészárosová, A., Liberda, J., Voburka, Z., Tichá, M., Jonáková, V. 1999. Aggregated forms of heparin-binding and non-heparin-binding proteins of boar seminal plasma and their binding properties. *Folia Biologica*. **45**. 193-201.
- Maňásková, P., Liberda, J., Tichá, M., Jonáková, V. 2002a. Isolation of non-heparin-binding and heparin-binding proteins of boar pros-tate. *Journal of Chromatography B*. **770**. 137–143

Maňásková, P., Ryšlavá, H., Tichá, M., Jonáková, V. 2002b. Character-ization of proteins from boar prostate. *American Journal of Reproductive Immunology*. **48**. 283–290

Maňásková, P., Balínová, P., Kraus, M., Tichá, M., Jonáková, V. 2003. Mutual interactions of boar seminal plasma proteins studied immunological and chromatographic methods. *American Journal of Reproductive Immunology*. **50**. 399-410.

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, P., Jonáková, V. 2008. Localization of porcine seminal plasma (PSP) proteins in the boar reproductive tract and spermatozoa. *Journal of Reproductive Immunology*. **78**. 40-48.

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.

Mao, H. T., Yang, W. X. 2013. Modes of acrosin functioning during fertilization. *Gene*. **526**. 75–79.

Maringuzman, J., Mahan, D. C., Whitmoyer, R. 2000. Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. *Journal of Animal Science*. **78**. 1544–1550

Marvan, F., Hampl, A. 2011. *Morfologie hospodářských zvířat*. Vyd. 5. Praha: Vydala Česká zemědělská univerzita v Praze v nakladatelství Brázda. ISBN: 978-80-213-2188-5.

Maxwell, W. M. C., Welch, G., Johnson, L. 1997. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometry sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction and Fertility*. **8**. 1165-1178.

Maxwell, W. M. C., Graaf, S. P. D., Ghaoui E. H., Evans G. 2007. Seminal plasma effects on sperm handling and female infertility. *Social Reproduction. Fertility Supplement*. **64**. 13-38.

Mazur, P., Leibo, S. P., Seidel, G. E. 2008. Cryopreservation of the Germplasm of Animals Used in Biological and Medical Research: Importance, Impact, Status, and Future Directions. *Biology of Reproduction*. **78**. 2-12.

Mendoza, N., Casao, A., Perez-Pe, R., Cebrian-Perez, J. A., Muino-Blanco, T. 2013. New insights into the mechanisms of ram sperm protection by seminal plasma proteins. *Biology of reproduction*. **88**. 149.

- Mills, K. M., Aryal, U. K., Sobreira, T., Minton, A. M., Casey, T., Stewart, K. R. 2020. Shotgun proteome analysis of seminal plasma differentiate boars by reproductive performance. *Theriogenology*. **157**. 130-139.
- Morel, M. C. G. D. 2008. Equine reproductive physiology, breeding and stud management. CAB International. Cambridge. 378 p. ISBN: 978-1-84593-450-7.
- Moreno, R. D., Barros, C. 2000. A basic 18-amino acid peptide contains the polysulfate-binding domain responsible for activation of the boar proacrosin/acrosin system. *Biology of Reproduction*. **62**. 1536–1542.
- Morgan, H. L., Watkins, A. J. 2020. The influence of seminal plasma on offspring development and health. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. **97**. 131-137.
- Muino-Bianco, T., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J. A. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in Domestic Animals*. **43**(4). 18-31.
- 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.
- Nimtz, M., Grabenhorst, E., Conradt, H. S., Sanz, L., Calvete, J. J. 1999. Structural characterization of the oligosaccharide chains of native and crystallized boar seminal plasma spermadhesin PSP-I and PSP-II glycoforms. *European Journal of Biochemistry*. **265**. 703-718.
- Novak, S., Ruiz-Sánchez, A., Dixon, W. T., Foxcroft, G. R., Dyck, M. K. 2010. Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars. *Journal of andrology*. **31**(2). 188-200.
- Oakley, B. R. 2000. An abundance of tubulins. *Trends in Cell Biology*. **10**. 537–542.
- Okazaki, T., Abe, S., Yoshida, S., Shimada, M. 2009. Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology*. **71**. 491-498.
- Okazaki, T., Ikoma, E., Tinen, T., Akiyoshi, T., Mori, M., Teshima, H. 2014. Addition of oxytocin to semen extender improves both sperm transport to the oviduct and conception rates in pigs following AI. *Journal of Animal Science*. **85**. 8–14
- Panarace, M., Pellegrini, R.O., Basualdo, M.O., Belé, M., Ursino, D.A., Cisterna, R., Desimonea, G., Rodríguez, E., Medina, M.J. 2014. First field results on the use of stallion sex-sorted semen in a large-scale embryo transfer program. *Theriogenology*. **81**. 520–525.
- Parks, J. E., Lynch, D. V. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. **29**. 255-266.

- Pena, F. J., Saravia, F., Núñez-Martínez, I., Johannisson, A., Wallgren, M., Rodríguez Martínez, H. 2006. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? *Animal Reproduction Science*. **93**. 101-113.
- Penny, P. C., Noble, R. C., Maldjan, A., Cerolini, S. 2000. Potencial role of lipids for the enhancement of boar fertility and fecundity. *Pig News and Information*. **25**. 119-126.
- Pérez-Patio, C., Parrilla, I., Barranco, I., Vergara-Barberán, M., Roca, J. 2018. New in-depth analytical approach of the porcine seminal plasma proteome reveals potential fertility biomarkers. *Journal of Proteome Research*. **17**. 1065-1076.
- Pesh, S., Bergmann, M., Bostedt, H. 2006. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology*. **66**. 307-313.
- Petrunkina, A. M., Läkamp, A., Gentzel, M., Ekhlasi-Hundrieser, M., Töpfer-Petersen, E. 2003. Fate of lactadherin P47 during post-testicular maturation and capacitation of boar spermatozoa. *Reproduction*. **125**. 377–387.
- Piehl, L. L., Fishman, M. L., Hellman, U., Cisale, H., Miranda, P. V. 2013. Boar seminal plasma exosomes: Effect on sperm function and protein identification by sequencing. *Theriogenology*. **79**(7). 1071-1082.
- Pipan, M. Z., Mrkun, J., Strajn, B. J., Vrtač, K. P., Kos, J., Pišlar, A., Zrimšek, P. 2017. The influence of macro– and microelements in seminal plasma on diluted boar sperm quality. *Acta Veterinaria Scandinavica*. **59**. 11.
- Plante, G., Manjunath, P. 2015. Epididymal Binder of Sperm genes and proteins: what do we know a decade later?. *Andrology*. **3**(5). 817-824.
- Poliakov, A., Spilman, M., Dokland, T., Amling, C. L., Mobley, J. A. 2009. Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. *The Prostate*. **69**. 159-167.
- Pursel, V. G., Johnson, L. A. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal Animal Science*. **40**. 99-102.
- Quintero-Moreno, A., Miro, J., Rigau, T., Rodríguez.Gil, J. E. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*. **59**(9). 1973-1990.
- Raheja, N., Choudhary, S., Grewal, S., Sharma, N. and Kumar, N. 2018. A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. **6**(3). 239-245.

Reece, W. O. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat-2-, rozšířené vydání. Grada Publishing as. 480 p. ISBN: 978-80-247-3282-4.

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

Reinert, M., Calvete, J. J., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E. 1997. Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, and topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin protein family. *Andrologia*. **29**(4). 179-186.

Rodríguez-Martínez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vázquez, J., Martínez, E., Roca, J., Sanz, L., Calvete, J. 2005. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*. **63**. 514-535.

Rodríguez-Martínez, H., Kvist, U., Saravia, F., Wallgren, M., Johannisson, A., Sanz, L., Pena, F. J., Martínez, E. A., Roca, J., Vázquez, J. M., Calvete, J. J. 2009. The physiological roles of the boar ejaculate. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. **66**. 1-21.

Rodríguez-Martínez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., Calvete, J. J. 2011. Seminal plasma proteins: what role do they play?. *American Journal of Reproductive Immunology*. **66**. 11-22.

Rooke, J. A., Shao, C. C., Speake, B. K. 2001. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction*. **121**. 315-322.

Romero, A., Varela, P. F., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E., Calvete, J. J. 1996. Crystalization and preliminary X-ray diffraction analysis of boar seminal plasma spermadhesin PSP-I/PSP-II, a heterodimer of two CUB domains. *FEBS Letters*. **382**(1-2). 15-17.

Romero, A., Romao, M. J., Varela, P. F., Kolln, I., Dias, J. M., Carvalho, A. L., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E., Calvete, J. J. 1997. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nature Structural Biology*. **4**. 783-788.

Rubinski, B., Perez, P. A., Carlson, M. E. 2005. The thermodynamic principles of isochoric cryopreservation. *Cryobiology*. **50**(2). 121-138.

Sabeur, K., Ball, B. A. 2007. Characterization of galactose-binding proteins in equine testis and spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. **101**(1-2). 74-84.

Samanta, L., Parida, R., Dias, T. R., Agarwal, A. 2018. The enigmatic seminal plasma: A proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology*. **16**(41).

- Santos, M., Soares, F., Moreira, M. and Beirão, J. 2018. Evaluation of different extenders for the cold storage of meagre (*Argyrosomus regius*) semen. *Aquaculture Research*. **49**(8). 2723-2731.
- Smital, J. 2000. Současné a perspektivní metody hodnocení plodnosti kanců. *Náš chov* **60**. 32-33. Praha.
- Smital, J. 2009. Effects influencing boar semen. *Animal Reproduction Science*. **110**(3-4). 335-346.
- Soleilhavoup, C., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Kohnke, P. L., Dacheux, J. L., Guérin, Y., Gattin, J. L., de Graaf, S. P., Druart, X. 2014. Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. *Proteomics*. **109**. 245-260.
- Suzuki, K., Asano, A., Eriksson, B., Niwa, K., Nagai, T., Rodriguez-Martinez, H. 2002. Capacitation status and *in vitro* fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *International journal of andrology*. **25**. 84-93.
- Techakupmhu, M., Buranaamnuay, K., Tantasuparuk, W., Am-I, N. 2013. Improvement of Semen Quality by Feed Supplement and Semen Cryopreservation in Swine. In *Success in Artificial Insemination—Quality of Semen and Diagnostics Employed*. 1st ed. Lemma, A., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia. pp. 17-37.
- Thérien, I., Moreau, R., Manjunath, P. 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*. **59**. 768-776.
- Tichá, M., Kraus, M., Čechová, D., Jonáková, V. 1998. Saccharide-binding properties of boar AQN spermadhesins and DQH sperm surface protein. *Folia Biologica*. **44**. 15–21.
- Tichý F. 2004. *Histologie: mikroskopická anatomie*. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno.
- Töpfer-Petersen, E., Romero, A., Varela, P. F., Ekhlasi-Hundrieser, M., Dostalova, Z., Sanz, L., Calvete, J. J. 1998. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*. **30**. 217-224.
- Töpfer-Petersen, E. 1999. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Human Reproduction Update*. **5**. 314-329.
- 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**. 159-170.

- Tumova, L., Zigo, M., Sutovsky, P., Sedmikova, M., Postlerova, P. 2020. The Ubiquitin-Proteasome System Does Not Regulate the Degradation of Porcine β -Microseminoprotein during Sperm Capacitation. *International Journal of Molecular Sciences*. **21**(11). 4151.
- Usuga, A., Rojano, B., Restrepo, G. 2017. Effect of Seminal Plasma Components on the Quality of Fresh and Cryopreserved Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*. **58**. 103-111.
- Varela, P. F., Romero, A., Sanz, L., Romao, M. J., Töpfer-Petersen, E., Calvete, J. J. 1997. The 2.4 Å Resolution Crystal Structure of Boar Seminal Plasma PSP-I/PSP-II: a Zona Pellucida-binding Glycoprotein Heterodimer of the Spermadhesin Family Built by a CUB Domain Architecture. *Journal of Molecular Biology*. **274**. 635-649.
- Veselsky, L., Dostal, J., Holan, V., Soucek, J., Zelezna, B. 1996. Effect of boar seminal immunosuppressive fraction on B lymphocytes and on primary antibody response. *Biology of Reproduction*. **55**. 194-199.
- Villaverde, A. I., Fioratti, E. G., Ramos, R. S., Neves, R. C. F., Ferreira, J. C. P., Cardoso, G. S., Padilha, P. M., Lopes, M. D. 2014. Blood and seminal plasma concentrations of selenium, zinc and testosterone and their relationship to sperm quality and testicular biometry in domestic cats. *Animal Reproduction Science*. **150**. 50–55.
- Waberski, D., Schäfer, J., Bölling, A., Scheld, M., Henning, H., Hambruch, N., Schuberth, H. J., Pfaffer, C., Wrenzycki, C., Hunter, R. H. F. 2018. Seminal plasma modulates the immune-cytokine network in the porcine uterine tissue and pre-ovulatory follicles. *PLoS ONE*. **13**.
- Waberski, D., Riesenbeck, A., Schulze, M., Weitze, K. F., Johnson, L. 2019. Application of preserved boar semen for artificial insemination: past, present and future challenges. *Theriogenology*. **137**. 2-7.
- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. **60-61**. 481-492.
- Willenburg, K. L., Knox, R. V., Kirkwood, R. N. 2004. Effect of estrogen formulation and its site of deposition on serum PGFM concentrations, uterine contractility, and time of ovulation in artificially inseminated weaned sows. *Animal Reproduction Science*. **80**. 147–156.
- Wise, T., Lunstra, D. D., Rohrer, G. A., Ford, J. J. 2003. Relationships of testicular iron and ferritin concentrations with testicular weight and sperm production in boars. *Journal of Animal Science*. **81**. 503–511
- Wong, W. Y., Flik, G., Groenen, P. M. W., Swinkels, D. W., Thomas, C. M. G., Copius-Peereboom, J. H. J., Merkus, H. M. W. M., Steegers-Theunissen, R. P. M. 2001. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reproduction Toxicology*. **15**. 131–136.

- Wright, P. C., Noriel, J., Ow, S. Y., Fazeli, A. 2017. A review of current proteomic technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogenology*. **77**. 738-65.
- Wu, Y., Lai, W., Liu, Z., Wei, H., Zhou, Y., Tan, J., Sun, H., Li, S., Peng, J. 2019. Serum and Seminal Plasma Element Concentrations in Relation to Semen Quality in Duroc boars. *Biological Trace Element Research*. **189**(1). 85-94.
- Yeste, M. 2016. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*. **85**. 47-64.
- Yeste, M. 2017. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction*. **14**(1). 69-81.
- Zaborowski, M. P., Balaj, L., Breakefield, X. O., Lai, C. P. 2015. Extracellular vesicles: composition, biological relevance, and methods of study. *Bioscience*. **65**. 783–797.
- Zasiadczyk, L., Fraser, L., Kordan, W., Wasilewska, K. 2015. Individual and seasonal variations in the quality of fractionated boar ejaculates. *Theriogenology*. **83**. 1287-1303.
- Zhao, Y., Zhang, W., Kho, Y., Zhao, Y. 2004. Proteomic Analysis of Integral Plasma membrane Proteins. *Analytical Chemistry*. **76**(7). 1817-1823.
- Zigo, M., Jonáková, V., Šulc, M., Maňásková-Postlerová, P. 2013. Characterization of sperm protein patterns of ejaculated and capacitated boar semen, with the detection of ZP binding candidates. *International Journal of Biological Macromolecules*. **61**. 322-328.
- Zigo, M., Jonáková, V., Maňásková-Postlerová, P., Kerns, K., Sutovsky, P. 2019. Ubiquitin-proteasome system participates in the deaggregation of spermadhesins and DQH protein during boar sperm capacitation. **157**(3). 283-295.
- Zigo, M., Maňásková-Postlerová, P., Zuidema, D., Kerns, K., Jonáková, V., Tůmová, L., Bubeníčková, F., Sutovsky, P. 2020. Porcine model for the study of sperm capacitation, fertilization and male fertility. *Cell and Tissue Research*. **380**. 237-262.

9 Samostatné přílohy

Tabulka P1: Statistické vyhodnocení poměru signálu protilátky proti AQN a celkové nanášky proteinů.

Kanec	Počet opakování	Součet	Průměr	Rozptyl
Chlór	8	8	1	0
Grál	3	1,500479	0,500160	0,018248
Igor	4	3,733362	0,933341	0,138659
Jeep	8	5,718291	0,714786	0,118204
Jura	6	4,996423	0,832737	0,122962
Krysa	3	1,943782	0,647927	0,184480
Larva	4	2,551276	0,637819	0,275474

Tabulka P2: Statistické vyhodnocení poměru signálu protilátky proti AWN a celkové nanášky proteinů.

Kanec	Počet opakování	Součet	Průměr	Rozptyl
Chlór	8	8	1	0
Grál	3	3,044206	1,014735	0,191249
Igor	4	4,455721	1,113930	0,252428
Jeep	8	6,177268	0,772159	0,209462
Jura	6	8,171838	1,361973	0,425959
Krysa	3	2,387730	0,795910	0,311337
Larva	4	4,791093	1,197773	1,232874

Tabulka P3: Statistické vyhodnocení poměru signálu protilátky proti AQN a koncentrace spermií.

Kanec	Počet opakování	Součet	Průměr	Rozptyl
Chlór	4	4	1	0
Jeep	4	5,192789	1,298197	0,080042
Jura	4	3,446211	0,861553	0,082506
Krysa	3	7,814196	2,604732	0,042853

Tabulka P4: Statistické vyhodnocení poměru signálu protilátky proti AQN a celkové nanášky proteinů.

Kanec	Počet opakování	Součet	Průměr	Rozptyl
Chlór	4	4	1	0
Jeep	4	4,738466	1,184617	0,021452
Jura	4	3,983106	0,995777	0,054436
Krysa	3	4,036307	1,345436	0,251720

Tabulka P5: Statistické vyhodnocení poměru signálu protilátky proti AWN a koncentrace spermií.

Kanec	Počet opakování	Součet	Průměr	Rozptyl
Chlór	4	4	1	0
Jeep	4	5,632908	1,408227	0,075410
Jura	4	2,875540	0,718885	0,086052
Krysa	3	7,402186	2,467395	0,456978

Tabulka P6: Statistické vyhodnocení poměru signálu protilátky proti AWN a celkové nanášky proteinů.

Kanec	Počet opakování	Součet	Průměr	Rozptyl
Chlór	4	4	1	0
Jeep	4	5,707286	1,426822	0,467992
Jura	4	3,216740	0,804185	0,057346
Krysa	3	3,885106	1,295035	0,049482

Tabulka P7: Statistické vyhodnocení poměru signálu protilátky proti AQN a signálu z gelu.

Kanec	Počet opakování	Součet	Průměr	Rozptyl
Chlór	6	6	1	0
Kuna	6	8,104593	1,350766	1,277718
Jura	6	13,344330	2,224056	1,832739

Tabulka P8: Statistické vyhodnocení poměru signálu protilátky proti AWN a signálu z gelu.

Kanec	Počet opakování	Součet	Průměr	Rozptyl
Chlór	6	6	1	0
Kuna	6	8,232902	1,372150	1,812232
Jura	6	11,157650	1,859608	3,087336