

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Změny v lektin vázající aktivitě kančích spermií během jejich
post-testikulární maturace**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Alena Kohoutková

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Změny v lektin vázající aktivitě kančích spermií během jejich post-testikulární maturace" jsem vypracoval(a) 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 autor(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. 4. 2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí diplomové práce RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení a trpělivost.

Souhrn

Během kapacitace spermií dochází k mnoha molekulárním změnám na povrchu plazmatické membrány i uvnitř buňky. Mezi tyto změny patří například nezbytný eflux cholesterolu a s tím spojené zvýšení fluidity membrány spermie vedoucí k reorganizaci lipidů a proteinů a změny v sacharidových strukturách na povrchu spermatické buňky, které lze detekovat pomocí lektinů. Cílem práce bylo najít rozdíly v sacharidových strukturách u kančích spermií před a po kapacitaci v in vitro podmínkách za pomoci vybraných lektinů. Pro experimenty bylo vybráno 10 lektinů s různou specifitou vazby k sacharidovým řetězcům glykoproteinů. Ejakulované a kapacitované spermie byly zpracovány v suspenzi a vlhkou fixací a byla sledována změna ve vazbě lektinů. Výskyt sacharidových struktur byl nejčastěji detekován ve střední části bičíku spermie a v akrozomální části hlavičky, kdy byla vazba v některých případech omezena pouze na její apikální část. Byl zjištěn nejvýznamnější rozdíl mezi fixovanými ejakulovanými a kapacitovanými spermii ve vazbě některých lektinů rozpoznávajících sacharidové řetězce obsahující fukosu (PSA a AAL) a galaktosu (RCA). V suspenzi pak byla zaznamenána především změna vazby WGA lektinu, který preferuje vazbu na N-acetylglukosamin a UEA rozpoznávající fukosu vázanou na galaktosu. Dále byly určeny přibližné molekulové hmotnosti glykoproteinů ve spermii před a po in vitro kapacitaci, u kterých byla zjištěna změna v míře vazby lektinu. Vazba lektinů na glykoproteiny kapacitovaných spermií byla viditelně slabší, včetně vazby AAL, WGA a SBA na povrchové glykoproteiny. Z dosažených výsledků je zřejmé, že během in vitro kapacitace docházelo ke změnám některých sacharidových struktur ve spermii. Odlišná byla i vazba některých lektinů na typické sacharidové řetězce ve fixovaných spermii a připravených v suspenzi, kde se vázaly pouze na jejich povrch. Na základě našich výsledků je možné usoudit, že některé lektiny (především PSA, AAL, UEA, RCA a WGA) jsou vhodné pro hodnocení změn ve spermii po kapacitaci, a proto by mohly sloužit jako nástroj detekce kapacitačního stavu kančích spermií.

Klíčová slova:

kančí spermie, kapacitace, povrchové proteiny, sacharidové struktury

Summary

During sperm capacitation, many molecular changes occur on the surface of the plasma membrane and within the cell. The changes include, for example, the necessary efflux of cholesterol and the associated increased fluidity of the sperm membrane leading to reorganization of lipids and proteins and changes in carbohydrate structures on the surface of the sperm cell that can be detected by lectins.

The aim of this work was to find differences in carbohydrate structures in boar spermatozoa before and after capacitation in in vitro conditions using selected lectins. For the experiments, 10 lectins with different binding specificity to the carbohydrate chains of glycoproteins were chosen. Ejaculated and capacitated spermatozoa were processed in suspension and wet fixation and change in lectin binding was monitored. Occurrence of carbohydrate structures were detected most frequently in the central part of the flagellum and in the acrosomal part of the head, where in some cases the binding was limited to the apical part. It was detected most significant difference between the fixed ejaculated and capacitated spermatozoa in binding of certain lectin recognizing the carbohydrate chains containing fucose (PSA and AAL) and galactose (RCA). In particular, the changes in WGA lectin binding, which prefers binding to N-acetylglucosamine and UEA recognizing fucose linked with galactose, was noted in the suspension. Furthermore, approximate molecular weights of sperm glycoproteins were determined before and after in vitro capacitation, in which a change in lectin binding rate was found. The binding of lectins to glycoproteins of capacitated spermatozoa was visibly weaker, including binding of AAL, WGA and SBA to surface glycoproteins.

From the obtained results it is evident that during in vitro capacitation there were changes of certain carbohydrate structures in spermatozoa. There was also a difference in the binding of some lectins to typical carbohydrate chains in fixed spermatozoa and prepared in suspension, where they bound only to their surface.

Based on our results we can conclude that some lectins (especially PSA, AAL, UEA, RCA and WGA), are suitable to assess the changes in spermatozoa after capacitation and therefore could serve as a detection tool of capacitation state of boar spermatozoa.

Keywords: boar spermatozoa, capacitation, surface proteins, carbohydrate structures

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíl práce.....	2
3 Literární rešerše.....	3
3.1 Vývoj a zrání samčích pohlavních buněk.....	3
3.1.1 Spermatogeneze.....	3
3.1.2 Morfologie spermie.....	4
3.1.3 Maturace spermií.....	5
3.1.4 Kapacitace spermií.....	6
3.2 Lektiny.....	7
3.2.1 Rozdělení lektinů.....	8
3.2.2 Vazba lektinů na savčí spermie.....	11
3.2.2.1 Vazba lektinů na spermie v epididymu u různých druhů zvířat.....	11
3.2.2.2 Vazba lektinů na ejakulované spermie u různých druhů savců.....	13
3.2.2.3 Vazba lektinů na kapacitované spermie u různých druhů savců.....	14
3.2.2.4 Vazba lektinů na akrozomově zreagované spermie u různých druhů zvířat.....	14
3.2.2.5 Vazba lektinů na kančí spermie.....	15
4 Metodika.....	16
4.1 Příprava spermií.....	16
4.1.1 Kapacitace spermií.....	16
4.2 Nepřímá fluorescenční mikroskopie.....	17
4.2.1 Fixace spermií na mikroskopická skla.....	17
4.2.1.1 Vlhká fixace.....	17
4.2.1.2 Vazba lektinů v suspenzi spermií.....	19
4.3 SDS elektroforéza.....	19
4.3.1 Příprava vzorku pro SDS elektroforézu.....	19
4.3.2 Izolace povrchových proteinů spermií.....	19
4.3.3 SDS elektroforéza.....	20
4.3.4 Western blot (elektropřenos proteinů z gelu na membránu).....	20
4.3.5 Vazba biotinem značených lektinů na proteiny na nitrocelulózkové membráně.....	21
5 Výsledky.....	23
5.1 Sledování vazby lektinů pomocí fluorescence.....	23
5.1.1 Vazba lektinu <i>Aleuria aurantia</i> (AAL).....	23
5.1.2 Vazba lektinu <i>Canavalia ensiformis</i> (ConA).....	25
5.1.3 Vazba lektinu <i>Lotus tetragonolobus</i> (LTG)	26

5.1.4 Vazba lektinu <i>Maackia amurensis</i> (MAA)	27
5.1.5 Vazba lektinu <i>Pisum sativum</i> (PSA)	28
5.1.6 Vazba lektinu <i>Ricinus communis</i> (RCA)	29
5.1.7 Vazba lektinu <i>Glycine max soybean</i> (SBA).....	30
5.1.8 Vazba lektinu <i>Sambucus nigra</i> (SNA)	31
5.1.9 Vazba lektinu <i>Ulex europaeus</i> (UEA)	32
5.1.10 Vazba lektinu <i>Triticum vulgare</i> (WGA)	33
5.2 Celkové hodnocení po detekci sacharidových struktur pomocí fluorescence.....	34
5.3 Vazba lektinů na glykoproteiny ejakulovaných a kapacitovaných spermíí.....	37
5.3.1 Detekce glykoproteinů pomocí <i>Aleuria aurantia</i> (AAL).....	38
5.3.2 Detekce glykoproteinů pomocí <i>Canavalia ensiformis</i> (ConA).....	38
5.3.3 Detekce glykoproteinů pomocí <i>Lotus tetragonolobus</i> (LTG).....	39
5.3.4 Detekce glykoproteinů pomocí <i>Maackia amurensis</i> (MAA).....	39
5.3.5 Detekce glykoproteinů pomocí <i>Pisum sativum</i> (PSA)	40
5.3.6 Detekce glykoproteinů pomocí <i>Ricinus communis</i> (RCA)	40
5.3.7 Detekce glykoproteinů pomocí <i>Glycine max soybean</i> (SBA)	41
5.3.8 Detekce glykoproteinů pomocí <i>Sambucus nigra</i> (SNA)	41
5.3.9 Detekce glykoproteinů pomocí <i>Ulex europaeus</i> (UEA)	42
5.3.10 Detekce glykoproteinů pomocí <i>Triticum vulgare</i> (WGA).....	42
5.3.11 Detekce sacharidových struktur v povrchových proteinech spermíí.....	42
6 Diskuze.....	44
7 Závěr.....	48
8 Literatura.....	49

1 Úvod

Během kapacitace dochází k významným změnám na povrchu spermií v lektin-vázající aktivitě (Tulsiani & Abou-Haila 2012). V ovidukální tekutině prasat byla detekována aktivita několika glykosidas, která se mění v průběhu hormonálního cyklu (Carrasco 2008). Tyto glykosidas mohou modulovat vazby spermií k ovidukálnímu epitelu a následně pak i k zona pellucida vajíčka opracováním sacharidových struktur na povrchu spermií během kapacitace (Tulsiani & Abou-Haila 2012). K hlavním sledovaným strukturám na spermii patří galaktosa, fruktosa, galaktosamin, manosa, sialové kyseliny a N-acetylglukosamin (Accogli et al. 2017). Tyto sacharidové struktury se dají detekovat pomocí lektinů. Každý lektin je schopen se specificky vázat na typické sacharidové struktury. Zároveň jejich výhodou je, že nevykazují žádnou enzymatickou aktivitu vůči cukrům a nedochází tak k ovlivnění výsledku detekce sacharidové struktury (Loris 2002). Od spermatogeneze přes kapacitaci až po akrozomovou reakci dochází na spermii k řadě změn, které umožňují spermii získat fertilizační schopnost. U lidských, býčích a myších spermií byly popsány studie detekující změny sacharidových struktur pomocí lektinů před a po kapacitaci (Baker et al. 2004, Xin et al. 2014, Umezu et al. 2017). Zatímco u kanců byly změny ve vazbě lektinů studovány pouze u spermií v epididymu (Fabrega et al. 2012) a u spermií po kapacitaci a indukci akrozomální reakce, kdy byla detekce provedena pouze se třemi vybranými lektiny (Jimenez et al. 2003).

2 Cíl práce

Byla stanovena hypotéza, že bude docházet ke změnám ve vazbě vybraných lektinů na glykoproteinové struktury kančích spermií po in vitro kapacitaci.

Pro ověření hypotézy byly vytyčeny následující cíle:

- 1) určit, na jakou část spermie obsahující určité sacharidové struktury se vážou vybrané lektiny;
- 2) zjistit, u kterých glykoproteinů dochází ke změnám v sacharidových strukturách během kapacitace.

3 Literární řešerše

3.1 Vývoj a zrání samčích pohlavních buněk

Samčí pohlavní soustava se skládá z šourku, varlat, nadvarlat, penisu a přídatných pohlavních žláz. Varlata jsou párový orgán a každé je individuálně umístěno v šourku, který uprostřed zdvojuje hladkosvalová vrstva, jenž ve střední rovině vytváří přepážku a tím rozděluje dutinu šourku na dva oddíly. Varlata mají dvě hlavní funkce a to spermatogenezi, produkci haploidních zárodečných buněk, a produkci steroidních hormonů, které podporují vývoj spermií a podílejí se na rozvoji sekundárních pohlavních znaků. Ve varleti se nachází různé typy buněk, jako jsou intersticiální Leydigovy buňky, Sertoliho buňky a peritubulární myoidní buňky. Mezi semenotvornými kanálky se nachází Leydigovy buňky, které produkují testosteron. Myoidní buňky oddělují vnější část semenného tubulu a jsou uloženy na periferii semenotvorného kanálku. Vyznačují se schopností kontrakce, která způsobuje zúžení kanálku a vypuzení pohlavních buněk. Sertoliho buňky se rozprostírají od myoidních buněk k lumen. Mají podpůrnou funkci a jsou v přímém kontaktu s vyvíjejícími se zárodečnými buňkami (Durairajanayagam et al 2015; O'Hara & Smith 2015).

3.1.1. Spermatogeneze

Spermatogeneze je velmi složitý proces, při kterém dochází k diferenciaci pohlavních buněk, které postupně prochází vývojovými stádii od zárodečných buněk spermatogonií, jenž se nachází na bazální membráně, přes primární a sekundární spermatocyty, pak spermatidy, které jsou nejbližší k lumen až po spermie. Nejprve dochází k mitotickému dělení spermatogonií, které jsou diploidní ($2n$). Tímto dělením vznikají nejprve dceřiné spermatogonie A. Proces mitotického dělení pokračuje až do vzniku spermatogonií B. Spermatogonie B se mění v primární spermatocyty. Během této změny dochází ke změnám v jádře, vláknité chromozomy se začínají kondenzovat, dochází k počátku meiotického dělení. Následuje meiotické dělení, během kterého se z primárních spermatocytů ($4n$) stávají sekundární spermatocyty ($2n$). Následně probíhá druhé meiotické dělení a z diploidních spermatocytů se stávají haploidní ($1n$) spermatidy, jejichž hlavičky mají ještě kulatý tvar (Franca & Hess, 2008; Durairajanayagam et al 2015).

Konečnou fází spermatogeneze je spermiogeneze, kdy spermatidy prochází čtyřmi vývojovými fázemi: je to Golgiho stádium, fáze čepičky, akrozomální fáze a maturační fáze. Během Golgiho

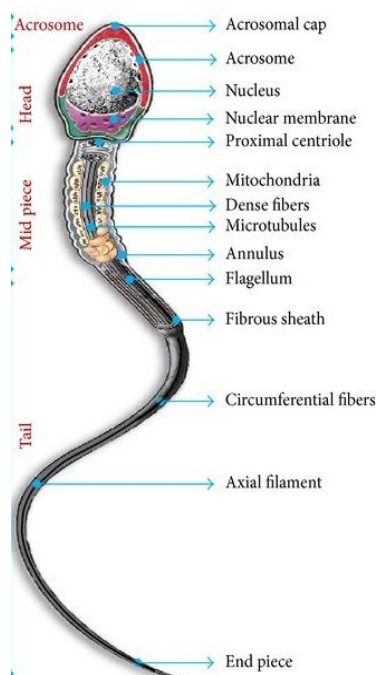
stádia se vytvářejí akrozomální granula. Postupně dochází k přilnavosti akrozomální granule na jaderný obal a v jeho blízkosti k tvorbě akrozomového váčku, který se následně začne zplošťovat kolem jaderného povrchu. Proximální centriol migruje blíže k jádru a dává základ pro vznik bičíku. Fáze čepičky je charakterizována šířením akrozomálních granulí na povrchu spermatidového jádra. Vzniklá akrozomální čapka pokrývá přibližně horní 1/3 jaderného povrchu. Postupně se akrozomální váček ztenčuje. Ve výsledku je každé spermatidové jádro pokryto membránou akrozomu, který těsně přilne k jadernému obalu. Následuje akrozomální fáze, pro kterou je typická přeměna kulatého tvaru hlavičky a jádra na oválný tvar. Dochází k výměně jaderných nukleoproteinů histonů za jaderné proteiny protaminy. Vzniká také kaudální manžeta. Jedná se o přechodnou strukturu složenou ze strany připojených mikrotubulů. Ve fázi maturace mizí kaudální manžeta. Prstenec migruje kaudálně k přednímu okraji vláknitého pláště, mitochondrie se shromažďují kolem přední báze k prstenci a vytváří šroubovicovitou strukturu ve střední části bičíku nazývanou mitochondriální částí bičíku. Na konci spermiogeneze dochází k uvolnění vytvořených spermií ze Sertoliho buněk z lumenu semenných kanálek do vývodných cest varlete (Hafez & Hafez 2000; O'Hara & Smith 2015).

3.1.2. Morfologie spermie

Spermie se skládá z hlavičky a bičíku. Typický tvar hlavičky je ovál, ale může se lišit u různých druhů savců např.: u myši, kde má hlavička tvar háčku. Zploštělý tvar hlavičky přináší určitou výhodu pro pohyb. Dochází k němu kondenzací jádra a snížením jeho objemu, neboť se uvnitř hlavičky nachází zploštělé jádro obsahující vysoce kondenzovaný chromatin. V tento moment je genom chráněn proti fyzickému poškození nebo chemické mutagenezi během přepravy na místo oplození. Horní část jádra je pokryta akrozomem, jež tvoří tenká membrána. Akrozomová čepička obsahuje akrosin, hyaluronidázu a další hydrololytické enzymy, které se podílí na procesu akrozomální reakce a průniku zona pellucida (Fawcett et al. 1971; Hafez & Hafez 2000).

Spojovací částí mezi hlavičkou a bičíkem je krček. Bičík se skládá ze střední, hlavní a koncové části. Krček nebo spojovací část tvoří základnu, jež nasedá na implantační jamku. Oblast bičíku mezi krčkem a hlavní částí se nazývá střední oddíl bičíku, který je bohatý na mitochondrie. Centrální jádro středního oddílu spolu s celou délkou bičíku tvoří osově vlákno a tvoří základ bičíku. Středem probíhá pár jednotlivých centrálních mikrotubulů. Hustá vnější vlákna (ODF) jsou spárovaná s vnitřními vlákny nazývanými dublety. Dublety jsou složeny z tubulinu a ODF z vláknité struktury, kterou tvoří keratin. Tyto vlákna obklopují pár centrálních mikrotubulů. Každý z

vnějších duálních mikrotubulů vytváří dvě řady nazývané vnitřní řada a vnější řada dyneinových ramének, které zajišťují pohyb spermie (Hafez & Hafez 2000; Lindemann & Lesich, 2016).



Obr. č. 1: Morfologie spermie (Rahman at al. 2013)

3.1.3. Maturace spermií

Nadvarle (epididymis) je umístěno podél dorsolaterální hrany každého varlete. Spermie jsou do nadvarlete uvolňovány po testikulárním vývoji a vytváří propojení varlat a chámovodu. Skládá se ze tří částí: z hlavy nadvarlete, kde se zvyšuje koncentrace spermií díky reabsorpci tekutiny vyplavující spermie z varlete, z těla nadvarlete a nakonec ocasu nadvarlete, ve kterém spermie dozrávají a dochází k jejich skladování do ejakulace. Během průchodu epididymem získávají spermie svou motilitu a schopnost oplodnit vajíčko (Yanagimachi 1994, Knobil 2006, Durairajanayagam et al. 2015, O'Hara & Smith 2015).

Během maturace spermií dochází ke změnám na jejich povrchu. Některé z proteinů plazmatické membrány spermií jsou odstraňovány nebo opracovávány pomocí hydrolytických enzymů přítomných v epididymální tekutině (Morris et al. 2002, Fabrega et al. 2012).

3.1.4 Kapacitace spermií

V samičím pohlavním traktu dochází u spermií k mnoha důležitým fyziologickým a biochemickým změnám, které vedou k větší citlivosti spermií na prostředí (Coy et al. 2012).

Kapacitaci mohou projít pouze spermie s neporušeným akrozomem, které se dostanou do kontaktu s následným navázáním na epitelovou výstelku v oviduktálním rezervoáru ve vejcovodu. Spermie se uchycují v isthmu oviduktu, kde dochází k zpomalení průběhu kapacitace, a to vede k delší přežitelnosti spermií a správnému načasování pro oplození oocyty. K uvolňování z oviduktu dochází postupně díky navození hyperaktivovanému pohybu (Rodriguez-Martinez 2007). V momentě, kdy se spermie dostanou do isthmu, se navážou na epiteliální buňky oviduktu. Navázání je zprostředkované sacharidovými zbytky přítomnými v epiteliálních buňkách oviduktu a proteiny podobné lektinu spermií (Coy et al. 2012). Typ sacharidů, na který se vážou spermie, se liší podle druhu, např. u vazby spermií na ovidukt u prasat se podílejí sacharidové zbytky galaktosy a mannosy (Ekhlesi-Hundrieser et al. 2005).

Během kapacitace dochází k molekulárním změnám, vedoucí k zvýšení fluidity plazmatické membrány. Do těchto změn spadá reorganizace lipidů plazmatické membrány a proteinů, přičemž se mění poměr fosfolipidů a cholesterolu, díky tomu dochází k cholesterolovému efluxu (Liu 2015).

K odtoku cholesterolu dochází za pomoci sérového albuminu. Proto kapacitace v in vitro podmínkách může být blokována přidáním analogů cholesterolu (Visconti et al. 2002).

Zvyšuje se tyrosinová fosforylace proteinů ve spermii a bičíku, která vede k hyperaktivaci pohybu. Kapacitace umožňuje nejen získat schopnost hyperaktivovaného pohybu, ale i interagovat se zona pellucida oocyty, podstoupit akrozomovou reakci a zahájit splynutí s oocyttem (Naz et al. 2004). Dále dochází ke zvýšení aktivity adenylycyklázy, k zvýšení intraspermiového pH a zvýšení hladiny cyklického adenosin monofosfátu (cAMP). Aby nedošlo k předčasné akrozomální reakci, je nutné, aby se udržovala hladina cAMP a nedocházelo k jejímu nadměrnému zvýšení (Tulsiani & da Abou-Haila. 2004). Na zahájení a regulaci kapacitace se podílí zvýšený příjem extracelulárního Ca^{2+} . Vápník se účastní jak metabolismu cAMP, kde může aktivovat syntézu cAMP adenylycyklázou, tak se i podílí na degradaci cAMP cyklickým nukleotidem fosfodiesterázy. Výsledkem je pak fosforylace určitých vnitrobuněčných proteinů a příprava spermie na akrozomální reakci (Visconti et al. 2002). Změnám v průběhu kapacitace podléhá proteinový/glykoproteinový obal spermií a může docházet k výrazným změnám lektin-vázající aktivity plazmatické membrány spermií (Tulsiani & da Abou-Haila. 2012).

3.2 Lektiny

Lektiny tvoří velkou a různorodou skupinu proteinů, které mají společnou schopnost specificky rozpoznávat a vázat se na určité sacharidové struktury. Krystalové struktury různých lektinů rostlin a živočichů odhalily širokou škálu vazebných míst na sacharidy (Loris. 2002). Proto jsou schopné se navázat na glykany (polysacharidy), monosacharidy i na oligosacharidy, které jsou složeny ze dvou až deseti monosacharidů (Kekäläinen et al. 2015). Lektiny vytváří glykanové vazby a jsou obzvláště vhodné pro detekci glykokonjugátů vzhledem k jejich specifitě a schopnosti rozlišovat izomery cukru, jakož i rozvětvení, vazbu a terminální modifikace komplexních glykanů (Accogli et al. 2017).

Lektiny při vazbě na sacharidy nevykazují žádnou enzymatickou aktivitu vůči cukrům. Lze je nalézt ve všech formách organismů od virů přes bakterie a rostliny až po živočichy (Loris 2002). Protože jsou základem mnoha důležitých biologických procesů živých organismů. A díky tomu existuje široká škála lektinů z hlediska jejich různých struktur a velikostí (Yilmaz & Becer 2015).

Obecná charakteristika vazebných míst všech lektinů poukazuje na to, že se skládají z primárního vazebného místa, které je schopné rozpoznávat specifickým způsobem jediný monosacharidový konec, obvykle s nízkou afinitou v milimolárním rozmezí (Loris 2002).

V dnešní době mají lektiny široké uplatnění. Využívají se jak ve vědeckých laboratořích, tak v medicíně. Mohou být využity jako potenciální antifungální, antivirová činidla i činidla proti hmyzu, ale zkoumají se i jejich protirakovinové účinky. Neboť díky svým vlastnostem usnadňují pochopení mechanismů mnoha fyziologických a patologických procesů (Dan et al. 2016). Protože jsou široce používány k vizualizaci buněčného povrchu, který obsahuje glykoproteiny, díky své schopnosti rozpoznávat specifické uhlovodíkové skupiny (Baker et al. 2004). Lektiny poskytly nástroj pro studium glykoproteinového rozdělení a umožnily pozorovat změny na různých částech plazmatické membrány spermie (Gómez-Torres et al. 2012).

Studie o vazbě lektinu u dospělých spermií dosud ukázaly, že na povrchu buněk je k dispozici široká škála sacharidových skupin a navázání lektinu je nerovnoměrné a závislé na jeho specifitě, stejně jako na druhu, ze kterého spermie pochází (Koehler 1981). Například lektiny ukázaly změnu povrchu spermií během epididymálního dozrávání spermií u savců (Baker et al. 2004).

Ve výzkumu se využívají lektiny z různých zdrojů, které jsou komerčně dostupné v čisté formě od některých společností. V mnoha případech bývají lektiny spojené s fluorescenčními nebo elektronovými optickými značkami (Koehler. 1981). Mohou být označeny fluorescenčním barvivem, jako je fluorescein isothiokyanát (FITC) a pozorovány přímo použitím fluorescenčního mikroskopu, nebo jsou konjugovány s enzymy, jako je křenová peroxidáza, nebo hapteny, látkami o

nízké molekulové hmotnosti, jež dokážou vyvolat imunitní odpověď po navázání na látku s vyšší molekulovou hmotností např. biotin a digoxigenin (Dan et al. 2016).

Použití lektinů při studiu povrchových vlastností spermií přispívá ke znalostem o této vysoce jedinečné buněčné membráně a výhodou je mimořádná segregace povrchových molekul do specifických morfologických zón spermie (Koehler. 1981). Pomocí lektinů lze detekovat funkční parametry spermií, jako je průběh akrozomální reakce a kapacitace spermií související se změnami struktury glykokalyxu. Zvláště kapacitace zahrnuje přerozdělení glykokonjugátů na spermiích, které jsou nezbytné pro úspěšnou akrozomální reakci. Proto během kapacitace se dynamicky mění struktura glykokalyxu spermií, rozdíly v místech na hlavičce spermie jsou detekovatelné díky rozdílnému navázání lektinů (Umezumi et al. 2017). Baker et al. (2004) poukazuje, že vazba lektinů vykazuje významnou korelaci před a po kapacitaci myších spermií, a zároveň že dochází nejen ke změně rozmístění proteinů, ale může i dojít k úplné ztrátě, což naznačuje selektivní ztráta fukosyltransferázy z bičíku spermie.

3.2.1 Rozdělení lektinů

Klasifikace podle molekulární struktury lektinů

Do první skupiny patří jednoduché lektiny, které se skládají z malého počtu podjednotek s molekulovou hmotností nižší než 40 kDa.

Druhou skupinou jsou složené lektiny, které mají velmi různorodou strukturu. Patří sem virové hemaglutininy, zvířecí lektiny typu C-, P- a I, jež se skládají z různých typů bílkovin.

Třetí skupina se skládá z polymerních lektinů, které tvoří vláknité a heteropolymerní organely (Yilmaz & Becer 2015).

Rozdělení podle původu

Rostlinné lektiny

Rostlinné lektiny patří mezi nejpoužívanější lektiny a používají se velmi často při zjišťování multivalentní vazby sacharidů (Tab. č. 1). Více než 100 lektinů bylo izolováno ze semen rostlin. Prvním lektinem byl konkanavalin A (Concanavalin A) (Yilmaz & Becer 2015).

Tab. č. 1 Přehled používaných rostlinných lektinů se specifickými cukry

Lektin	Zdroj lektinu	Zdroj lektinu	Specifický cukr
Concanavalin A (Con A)	<i>Canavalia ensiformis</i>	Kanaválie	α Man > α Glc
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	podzemnice olejná	Gal(β 1,3)GalNAc
RCA	<i>Ricinus communis</i>	skočec obecný	Gal(β 1,4)GlcNAc
WGA	<i>Triticum vulgare</i>	pšenice	β GlcNAc
SBA	<i>Glycine max</i>	sója	α/β GalNAc
PSA	<i>Pisum sativum</i>	hrách setý	L-Fuc(α 1,3/6)GlcNAc, Man
UEA	<i>Ulex europaeus</i>	hlodáš evropský	L-Fuc(α 1,2)Gal(β 1,4)GlcNAc
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	bez černý	NeuNAc(α 2,6)Gal/GalNAc
MAA	<i>Maackia amurensis</i> <i>agglutinin</i>	mákie amurská	NeuNAc(α 2,3)Gal

Vysvětlivky použitých zkratk: NeuNAc: N-acetylneuraminová (sialová) kyselina, Gal: D-galaktosa, GalNAc: N-acetyl-D-galaktosamin, Glc: D-glukóza, GlcNAc: N-acetylglucosamin Fuc: L-fukosa, Man: D-manosa (Accogli et al. 2017; Yilmaz & Becer 2015).

Zvířecí lektiny

Mezi zvířecí lektiny patří lektiny typu C-, I-, P-, S-, pentraxiny, pstruhové lektiny, diskoidiny, kalnexin a kalretikulín, ERGIC-53 a VIP-36, fukolektiny, annexinové lektiny a lektiny fibrinogenového typu. I přes znalosti o jejich strukturách a funkcích, rozdělení a specifita zvířecích lektinů je ještě komplikovanější ve srovnání s rostlinnými (Tab. č. 2).

Nejčastěji se používají lektiny typu C živočišné lektiny, které potřebují ionty Ca^{2+} pro vazbu se sacharidy (Yilmaz & Becer 2015).

Tab. č. 2 Přehled běžných zvířecích lektinů se specifickými cukry

Lektin	Specifický cukr	Funkce u zvířat
C-typ	různé	různé funkce: adheze buněk, imunitní odpověď na patogeny, kontrola hladin bílkovin v krvi, apoptóza
I-typ	sialové kyseliny	zařazen do imunoglobulinů, s výjimkou protilátek a receptorů T-buněk
P-typ	Man-6-fosfát, různé	funkce při generování funkčních lysosomů v buňkách
S-typ	β -D-Gal	regulace cytoplasmatických dějů
Galektin	beta-galaktosidy, N-acetyl laktosamin	regulace imunitní a zánětlivé odpovědi organismu

Vysvětlivky použitých zkratk Gal: D-galaktóza, Man: D-manosa (Yilmaz & Becer 2015; Accogli et al. 2017).

Houbové lektiny

Doposud bylo izolováno a studováno kolem 80 typů lektinů z hub. Patří tam lektiny *Agrocybe cylindracea* a *Polyporus squamosus*, které se specificky vážou na kyselinu sialovou a lektiny *Aleuria aurantia*, *Aspergillusoryzae*, *Rhizopus stolonifer* a *Pholiota squarrosa* se vážou na fukosu (Kobayashi et al. 2014). Mezi houbové lektiny patří i *Aleuria aurantia* vázající fukosu (AAL), který se získává z mísenky oranžové (*Aleuria aurantia*). AAL se váže na L-fukosu (Imberty et al. 2005). Ačkoliv v současné době jsou houbové lektiny mnohem méně prozkoumány než živočišné a rostlinné, mohly by v budoucnosti mít velké využití v oblasti taxonomie, biomedicíny a molekulární a buněčné biologie (Kobayashi et al. 2014).

Bakteriální lektiny

Mnoho bakteriálních lektinů se liší od rostlin a živočichů svou vysokou ligandovou afinitou. A to díky životní strategii. Proto lektiny bakterií byly pozorovány jako domény bakteriálních toxinů, využívajících adheze k glykokonjugátům jako prostředku vstupu do buněk. Příkladem toho mohou být dva rozpustné bakteriální lektiny závislé na vápníku získané z bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, s nimiž jsou spojeny faktory virulence. A to PA-IL pro který je specifická galaktóza a PA-IIL, se přednostně váže na fukosu, ale může také rozpoznávat manosu (Imberty et al. 2005).

3.2.2 Vazba lektinů na savčí spermie

Povrchové glykokomponenty nejsou jednotně distribuovány přes buňku, ale jsou vysoce omezeny na specifické domény spermií. Během zrání se objevuje většinou změna povrchových struktur, které bývají nejčastěji spojovány s hlavičkou a zejména akrozomální oblastí spermie (Köhler. 1981). Na povrchu lidských spermií oproti spermiím jiných savců se nachází nejhojnější glykany a nejkomplexnější glykanové struktury, na které se dokáže navázat široká škála lektinů. Proto v porovnání s kančími, býčími, králíčími a beraními spermii vykazovaly lidské spermie nejvyšší vazebnou intenzitu (Xin et al. 2014). Studie o vazbě lektinů na zralé spermie dosud ukázaly, že široká škála sacharidových skupin je k dispozici pro lektiny na povrchu buněk a zároveň distribuce těchto látek je nerovnoměrná a závisí na specifitě lektinu a také druhu, ze kterého jsou spermie získány. Některé rozdíly existují s odkazem na specifickou oblast spermatu, která je označena daným lektinem. Většina běžně používaných lektinů má vyšší afinitu k oblasti plazmatické membrány spojené s hlavičkou spíše než bičíkem (Köhler 1981). Přítomnost glykanů na spermii je také závislá i na příbuznosti zvířat. U vzdálenosti pěti druhů (člověk, králík, kanec, býk a koza) podle profilů vazby lektinu byly shodné s rozsahem genomu sekvencí fylogenetického stromu s výjimkou králíka. Přičemž nejbližší druhy zvířat nejbližší k člověku byly býk, kozel a králík (Xin et al. 2014).

Chan et al. (2002) ze svých výsledků odvodil, že systém pro počítačově asistované stanovení morfologie spermií může být vhodný pro odhad reakce *in vitro*, pokud se použije barvení pomocí lektinu. Zatímco Kaefer et al. (2013) poukazuje na to, že při využití lektinů na nefixované spermie nedošlo ke ztrátě životaschopnosti nebo peroxidaci lipidů v důsledku inkubace s lektiny. Ale za to lektiny způsobily sníženou pohyblivost spermií a při jejich použití docházelo ke snížení štěpení blastocyst, i přestože nebyly morfologicky poškozené (Kaefer et al. 2013).

3.2.2.1 Vazba lektinů na spermie v epididymu u různých druhů zvířat

Glykokomponenty jsou rozsáhle syntetizovány a modifikovány během vývoje spermií a transportu spermií v reprodukčních traktech (Tulsiani & da Abou-Haila. 2012, Liu 2015). Savčí spermie podléhají biochemickým a fyziologickým změnám během epididymálního zrání. Tento proces zahrnuje několik intracelulárních a extracelulárních změn na spermii, včetně přeměny plazmatické membrány spermií a modifikace glykanových skupin glykokonjugátů spermií. Proto se při epididymálním zrání výrazně mění i vázání lektinů (Tulsiani 2006).

U býka se během Golgiho fáze, kdy se vytvářejí akrozomální granula, se výrazně váže lektin Con A, zatímco PNA a RCA I jen slabě na akrosom. Následně při vzniku akrozomální čapky a během akrozomální fáze se snižuje vazba PNA. Nejprve mizí specifické sacharidové konce pro Con A a následně i pro RCA I. Během těchto tří fází SBA a UEA I nevykazují žádnou specifickou afinitu. Nejvhodnějším lektinem pro detekci těchto vývojových struktur na akrosomu je WGA, jenž během maturace ztrácí schopnost se navázat. Zatímco SBA a UEA I se silně vážou v oblasti hlavičky spermie (Arya & Vanha-perttula 1985). Xin et al. (2014) došel ke stejnému závěru a to že na spermie kozla a králíka pocházející z kaudální části epididymu se silně váže SBA.

U potkana se Con A váže oproti býkovi slabě po celém povrchu spermie s nepatrnou změnou při dozrávání. SBA se silně váže na hlavičku spermie s důrazem na apikální hřbetní část buňky. Během změn v epididymu se tato vazba značně snižuje a znovu se objevuje až po ejakulaci.

RCA a PNA poskytují obecně rovnocenné výsledky, přičemž mají zpočátku silnou vazbu na celém povrchu spermií, která poklesne, a to na všech částech povrchu s výjimkou apikální části hlavičky spermie během epididymálního zrání. WGA se zpočátku projevuje slabě, ale postupně se zvyšuje (Magargee et al. 1988). Epididymální spermie myši barvené Con A-FITC, kde stejně jako u potkana se lektin naváže po celé hlavičce s tím rozdílem, že na většině hlavičky se projeví silná fluorescence se sníženou intenzitou přes ekvatoriální segment (Köhler 1981).

Nezralé spermie se vyznačují cytoplazmatickou kapkou, která obsahuje mnoho sacharidových struktur. Důkazem toho je studie Arya & Vanha-perttula (1985), která poukazuje, že u býčích spermií lektiny PNA, SBA, DBA a WGA, s výjimkou UEA I, se vážou v cytoplazmatických kapkách. Ale v průběhu dozrávání spermií, když začnou kapičky mizet a zmenšovat svou velikost zároveň dochází ke ztrátě intenzity zabarvení pomocí lektinů.

Köhler (1981) u králíků zjistil, že při průchodu spermií z hlavy do ocasu nadvarlete se vazba lektinů WGA a RCA na spermie postupně snižuje, zatímco lektin Con A vykazuje pouze malou změnu vazby. A to díky tomu že dochází ke ztrátě receptorů pro lektiny v oblasti akrosomů spermií s výjimkou Con A.

U kance se lektin PSA se na spermie v hlavě nadvarlete navázal na celý akrosom a mitochondriální oddíl bičíku a u spermií získaných z těla a ocasu nadvarlete se navázal na apikální část hlavičky a mitochondriální oddíl bičíku. Zatímco lektin WGA se v proximální části hlavičky nadvarlete navázal na cytoplazmatickou kapku a mitochondriální oddíl bičíku. Zatímco u spermií získaných z distální části hlavičky, z těla a ocasu se navázal na apikální část hlavičky a mitochondriální oddíl bičíku (Fabrega et al. 2012).

3.2.2.2 Vazba lektinů na ejakulované spermie u různých druhů savců

Glykokalyx na hlavičce spermií skotu je převážně koncentrovaný v oblasti akrozomu. U ejakulovaných spermií vykazují lektiny RCA₁₂₀, PNA, SBA, Con A a PSA nejvyšší podíl navázání v akrozomální oblasti (Umezu et al. 2017). Býčí spermie obarvené lektinem noc A-FITC pod mikroskopem svítí slabě celé, až na akrozom, který je výrazný a na ekvatoriální segment, kde se Con A nenaváže vůbec (Kaefer et al. 2013). Desantis et al. (2010) detekovali u hřebců sacharidové zbytky pomocí lektinu PNA, který se naváže na koncové zbytky Galb1,3GalNAc, které jsou lokalizovány v akrozomální oblasti hlavičky a v cytoplazmatická kapce. SBA se naváže v oblasti hlavičky, která nevykazuje přítomnost žádných zbytků GalNAc v segmentu a minimum na ocase spermií. Zatím co lektin Con A se přichytí na celém povrchu spermií.

U lidských spermií je prokázána přítomnost glykanů, kde se nejvýrazněji navážou lektiny MAA, RCA, SNA, o něco méně AAL a PSA, Con A, SBA a minimálně WGA, DBA, UEA I a LTG. Zatímco PNA skoro vůbec (Xin et al. 2014). Ale Köhler (1981) využil pro lokalizaci sacharidových struktur WGA-FITC, který se naváže skoro po celé hlavičce spermie, přičemž nejvíce v oblasti akrosomu. Ejakulované lidské spermie, které jsou označeny Con A-FITC, se navážou pouze v oblasti akrosomu.

Accogli et al. (2017) upozorňuje na rozdíl rozmístění sacharidových struktur na spermiích závislých i na sezonnosti zvířete, v tomto případě na býkovi. Kde SNA a Con A vykazují výraznější zbarvení u zvířat, která v době odběru mají pohlavní klid. A naproti tomu během období intenzivnímu využívání býků pro odběry se výrazněji projevují PSA a UEA I. U lektinu PNA nejsou zaznamenány významné rozdíly v intenzitě signálu.

Změnu zaznamenali i Desantis et al. (2010) u hřebce a to u lektinů UEA I a RCA₁₂₀. Kde se lektin UEA I během reprodukce nenaváže na žádnou část spermie a mimo období reprodukce se naváže na specifické struktury v oblasti akrozomu a bičíku, a slabě v postakrozomální oblasti. Zatímco lektin RCA₁₂₀ se nenaváže na spermii během sezóny a mimo reprodukci se váže pouze v oblasti akrozomální čapky.

3.2.2.3 Vazba lektinů na kapacitované spermie u různých druhů savců

Baker et al. (2004) zkoumal navázání lektinů u myši, kde se lektin PSA váže v postakrosomální oblasti a hřbetní části hlavičky. Stejnou lokalizaci cukerných struktur zaznamenal i u vazby s lektinem PNA s rozdílem, že bylo přítomno mnohem méně sacharidových konců pro PNA. Stejně tak se nevýrazně navázal i lektin WGA, který byl lokalizován na celé hlavičce.

Umezu et al. (2017) poukazuje, že při in vitro kapacitaci dochází u spermií ke ztrátě sacharidových struktur na hlavičkách spermií skotu mnohem více než u ejakulovaných spermií. Příkladem toho bylo nenavázání se lektinu WGA u kapacitovaných spermií, kde je hlavička spermií zvláště ovlivněna in vitro kapacitací. Taktéž dochází k výraznému snížení vazby s WGA po in vitro kapacitaci u lidských spermií. Kde se lektin WGA se projevuje tečkovaným značením po celé cytoplazmatické membráně hlavičky spermie. Zatímco u lektinu PNA dochází k výraznějšímu navázání na plazmatickou membránu spermií po kapacitaci (Pang et al., 2012).

U některých spermií při kapacitaci v in vitro podmínkách dochází ke spontánní akrozomální reakci, která může vést ke ztrátě vazby lektinu v akrosomální oblasti, jak to bylo popsáno u spermií skotu (Umezu et al. 2017).

3.2.2.4 Vazba lektinů na akrozomově zreagované spermie u různých druhů zvířat

Lektin PSA je schopen se navázat v akrozomální oblasti u lidských spermií, a proto je vhodným lektinem pro sledování lidských spermií, přičemž PSA se váže na spermie reagující jen s částí akrozomu (Cross et al. 1986). Pro značení lidských spermií při sledování akrozomové reakce se ukázal také jako velmi vhodný lektin PNA, který se specificky váže na vnější akrozomální membránu. Proto je vhodný pro identifikaci jak akrozomové reakce, tak akrozomu. Vazebný vzor pro lektin PNA se nachází v ekvatoriálním segmentu akrozomu zatímco u apikální oblasti čepičky nedochází k vazbě (Mortimer et al. 1987).

U myši se lektin PSA naváže v přední části hlavičky a minimálně ve spodní části postakrozomální oblasti. Zatím co PNA se slabě se naváže po celé hlavičce a výrazně v akrozomální oblasti. Lektin UEA I se naváže v postakrozomální oblasti hlavičky a WGA se váže výrazně v akrozomální části hlavičky a přerušovaně v postakrozomální oblasti. Přičemž rozmístění sacharidových struktur pro spermie po akrozomální reakci není zaznamenáno u všech. U některých akrozomální reakce neproběhla viz tab. č. 3 (Baker et al. 2004). Chan et al. (2002) významného nárůstu zaznamenali po akrozomální reakci lidských spermií u lektinů WGA a PSA. Přičemž poukazují na to, že jsou

schopné správně podstoupit akrozomovou reakci ty spermie, které vykazují správnou morfologii. To prokazuje úzký vztahy mezi morfologickými defekty spermií a akrozomální reakcí spermie.

Tab. č. 3 Navázání vybraných lektinů na spermie u myši po akrozomální reakci a procento spermií s typickým vzorem navázání.

Lektin	Místo navázání lektinu	% spermií s typickým vzorem navázání
PSA	Přední část hlavičky	94
PNA	Akrozomální oblast	97
UEA-1	Postakrozomální část hlavičky	95
WGA	Akrozomální a postakrozomální část hlavičky	97

3.2.2.5 Vazba lektinů na kančí spermie

U prasat byla studována vazba lektinů (PNA, LCA, PSA, PHA, WGA, SBA a UEA) na epididymální spermie izolované ze 4 částí nadvarlete. Všechny lektiny se převážně vážaly do oblasti akrozomu a střední části bičíku a u některých z lektinů se viditelně měnil vzor vazby na spermie od hlavy k ocasu nadvarlete. V rámci této studie byly izolovány povrchové proteiny epididymálních spermií a byla ukázána vazba vybraných lektinů na určité glykoproteiny na povrchu spermií (Fabrega et al. 2012).

Vazba lektinů ConA, UEA a WGA na kančí ejakulované, kapacitované a akrozomě zreagované byla popsána v dřívější studii, kde byl zjištěn pokles vazby UEA a WGA lektinů na spermie po kapacitaci a akrozomální reakci (Jimenez et al. 2003). Flesch et al. (1998) lokalizoval vazebné místa za pomoci lektinů: WGA-FITC, LEA-FITC a PNA-FITC, GS-I, GSII, AIA, DBA, ConA, UEA-I, MPA, BPA, SBA, LPA.

4 Metodika

Vzorky ejakulovaných spermií byly získány z inseminační stanice společnosti Proagro Nymburk, a.s. a ten samý den transportovány do laboratoře KVD ČZU. Vzorky pocházely od dospělých kanců plemene Landrace. Ejakulát byl transportován z inseminační stanice v plastové nádobě, kvůli riziku chladového šoku, jež byla uložena v polystyrenové krabici. V laboratoři KVD ČZU byla inseminační dávka uchovávána ve sterilní falkoně a skladována v inkubátoru při 17 °C do doby než se s ním začalo pracovat.

4.1 Příprava spermií

Pro další zpracování spermií byl použit promývací roztok PBS (0,01 M Phosphate-buffered saline, Sigma-Aldrich, USA, obsahující 0,138 M NaCl a 0,0027 M KCl, pH 7,4). V tomto roztoku byly spermie promývány a centrifugovány (Eppendorf 5702) 3x po dobu 10 minut při 250 x g při laboratorní teplotě.

4.1.1 Kapacitace spermií

V dávce byla vždy spočítána koncentrace spermií v Bürkrově komůrce. Koncentrace se pohybovala v rozmezí 5–8 x 10⁷ spermií/ml. Pro kapacitaci byla použita koncentrace spermií 2,5–5 x 10⁷ spermií/ml. Nejdříve byla suspenze stočena na centrifuze (Eppendorf 5702, 250 g, 10 min, pokojová teplota), následně byl supernatant odpipetován a spermie byly 2x promyty PBS a pokaždé byla provedena centrifugace (250 g, 10 minut). Po druhém promytí byla peleta spermií rozsuspendována v 10 ml TBM (Tris Buffer Medium, 1x koncentrovaný) s přísadkou 10 mg BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, USA). Složení 10x koncentrovaného kapacitačního média (TMB; Ded et al. 2010): 20 mM TRIS (Sigma-Aldrich, USA), 3 mM KCl (Lach: Ner, ČR), 10 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich, USA), 113,1 mM NaCl, 11 mM glukosa (Penta, ČR), 5 mM pyruvát (Sigma-Aldrich, USA), 1 amp. gentamycinu (1 ml ATK) (Sigma-Aldrich, USA). Suspenze spermií byla rozpipetována do 20 mikrokumavek po 0,5 ml, které byly následně vloženy do termostatu. Kapacitace probíhala při 38 °C po dobu 1,5 hod při 5 % CO₂.

4.2 Nepřímá fluorescenční mikroskopie

K zjišťování vazeb lektinů na proteinové struktury spermií byly použity tři typy přípravy vzorků, a to vlhká fixace vymraženým aceton-metanolem 1:1, zasušení na vzduchu a vazba v suspenzi spermií.

Nejprve na podložní sklíčka byla vyznačena plocha pomocí hydrofobní fixy PAN Pen liquid Blocker (Sigma-Aldrich, USA). Kruh na pravé straně vždy představoval negativní kontrolu. Podle toho byly v dalších krocích nanášeny roztoky. Na levou stranu byly aplikovány biotinem značené lektiny a lektin PNA konjugovaný s rhodaminem pro kontrolu integrity akrosomu a na pravou stranu pouze PBS.

4.2.1 Fixace spermií na mikroskopická skla

4.2.1.1 Vlhká fixace

Při vlhké fixaci bylo na sklíčko do každého kroužku napipetováno 20 μ l suspenze spermií v PBS a následně zakápnuto vymraženým aceton-metanolem (aceton; Lach: Ner, ČR, metanol; VWR, BDH Chemicals, Francie) v poměru 1:1. Po 5 min byla skla opláchnuta PBS.

Pro blokaci volných míst bylo na všechny preparáty spermií napipetováno 150 μ l Super Bloku v PBS (Thermo Scientific, USA) a skla byla vložena do vlhké komůrky, kde byla ponechána 30 min.

Následně byl připraven roztok lektinů v poměru 1:100 v HEPES pufru (10 mM HEPES, pH 7,5; 0,15 M NaCl, 0,1 mM Ca^{2+}). Pro experimenty bylo využito 10 biotinem značených lektinů (Vector Laboratories, USA), a to *Sambucus nigra* (SNA), *Glycine max soybean* agglutinin (SBA), *Ulex europaeus* agglutinin (UEA), *Maackia amurensis* agglutinin (MAA), *Ricinus communis* agglutinin (RCA), *Pisum sativum* agglutinin (PSA), Concanavalin A *Canavalia ensiformis* (ConA), *Aleuria aurantia* lectin, (AAL), *Lotus tetragonolobus* (LTG), *Triticum vulgare* wheat germ agglutinin (WGA).

Tab. č. 4 Přehled lektinů se specifickými cukry

Lektin	Specifický cukr, na který se lektin váže
AAL	L-fukosa (α 1,6) N-acetylglukosamin, L-fukosa (α 1,2)
ConA	α -D-manosa > α D-glukosa
LTG	L-fukosa (α 1,3)-N-acetylglukosamin, Sia-Lex
MAA	N-acetylneuraminová (sialová) kyselina (α 2,3) D-galaktosa
PSA	L-fukosa (α 1,3/6) N-acetylglukosamin, manosa
RCA	D-galaktosa (β 1,4) N-acetylglukosamin
SBA	α/β N-acetyl-D-galaktosamin
SNA	N-acetylneuraminová (sialová) kyselina (α 2,6) D-galaktosa / N-acetyl-D-galaktosamin
UEA	L-fukosa (α 1,2) D-galaktosa β 1,4 N-acetylglukosamin
WGA	β -N-acetylglukosamin

Preparáty byly promyty PBS a aplikováno 100 μ l biotinem značeného lektinu. Do kolečka s negativní kontrolou bylo nanášeno pouze 100 μ l HEPES pufru. Preparáty byly vloženy do vlhké komůrky a ponechány přes noc v lednici.

Další den byly preparáty omyty PBS a osušeny. Bylo přidáno do obou koleček 100 μ l streptavidinu konjugovaného s Fluorescein isothiocyanate (FITC) (Vector Laboratories, USA) ředěného 1:300 v PBS. Preparáty byly inkubovány ve vlhké komůrce po dobu 45 min ve tmě.

Pro kontrolu integrity akrozomu byl na preparáty nanášen lektin PNA značený rhodaminem (Rhodamin Peanut Agglutinin, Vector Laboratories, USA) v poměru 1:500 v PBS. Bylo aplikováno 100 μ l do levých koleček a zároveň na pravé straně byla ponechána kontrola, do které bylo napipetováno pouze 100 μ l PBS. Po inkubaci ve vlhké komůrce po dobu 30 min byly vzorky promyty PBS a následně destilovanou vodou a osušeny.

Na závěr bylo přidáno 5 μ l montovacího média VectaShield s DAPI (Antifade Mounting Medium, Vector Laboratories, USA) pro vizualizaci jádra a preparáty byly překryty krycím sklíčkem. Sklíčka byla opět vložena do vlhké komůrky, kde byly inkubovány 10 min.

Vzorky byly vyhodnoceny na imunofluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse E 600, přičemž bylo využito pro nafocení preparátů kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi 1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements. PNA značené rhodaminem bylo pozorováno jako červená fluorescence, zatímco biotinem značené lektiny označovaly specifické sacharidové struktury. Vazba lektinů byla vizualizována pomocí specifické interakce biotinu se streptavidinem konjugovaným s FITC, který se vyznačoval zelenou fluorescencí. DAPI označilo modře jádra spermií.

4.2.1.2 Vazba lektinů v suspenzi spermií

Po promytí spermií byla peletka spermií rozsuspendována ve 300 μ l HEPES pufru. Do suspenze byly přidány lektiny (ředění 1:100) a vloženy do termostatu, kde byly ponechány přes noc při 37 °C.

Následně byly spermie stočeny na centrifuze při 250 x g 10 minut, promyty PBS a naředěny do 150 μ l. Na sklíčka bylo nanášeno po 20 μ l.

Byla provedena blokáce pomocí SuperBloku v PBS, který byl napipetován do všech vyznačených koleček po 150 μ l. Po té byly preparáty vloženy do vlhké komůrky, kde byly inkubovány 30 minut. Po omytí preparátů PBS a osušení bylo přidáno 100 μ l Streptavidinu konjugovaného s FITC ředěného 1:300 v PBS a proběhla inkubace 45 min ve vlhké komůrce ve tmě. Následně bylo aplikováno 100 μ l lektinu PNA ředěného 1:500 v PBS, které bylo necháno 30 min ve vlhké komůrce. Nakonec se přidalo montovací médium Vectashield s DAPI 5 μ l a přiloženo krycí sklíčko. Jako negativní kontrola byly spermie bez inkubace s lektiny.

4.3 SDS elektroforéza

4.3.1 Příprava vzorku pro SDS elektroforézu

K peletce spermií (5×10^7 buněk) bylo přidáno 100 μ l dvakrát koncentrovaného vzorkového pufru (0,5M TRIS-HCl, pH 6,8; glycerol; 2% SDS; 0,05% bromfenolová modř; Sigma-Aldrich, USA). Mikrozkušavky se vzorky byly následně inkubovány na ledu minimálně 30 min a byla tak provedena extrakce proteinů. Během lyzace byly vzorky každých 5 min promíchány. Poté byly mikrozkušavky se vzorky dány do termobloku a inkubovány 5 min při 100 °C. Vzorky byly nakonec odstředěny 5 min při 10 000 x g.

4.3.2 Izolace povrchových proteinů spermií

Povrchové proteiny kančích spermií byly izolovány pomocí kitu Cell Surface Protein Isolation Kit (Pierce, USA) a přiloženého protokolu výrobce. Nejdříve byly celé buňky značeny Sulfo-NHS-SS-Biotinem. Poté byly buňky lyzovány (Lysis buffer) a biotinem značené proteiny byly izolovány afinitní chromatografií na gelových kuličkách s imobilizovaným avidinem (Immobilized NeutrAvidin™ Gel). Následně byl avidin se zachycenými proteiny promyty pufrům (Wash Buffer) a

proteiny byly uvolněny do neredukujícího vzorkového pufru pro SDS elektroforézu (0,5 M Tris (Sigma-Aldrich). HCl, pH 6,8 (Bio-Rad), glycerol, 2% SDS (dodecyl sulfát sodný, GE Healthcare 0,05% bromfenolová modř) inkubací v termobloku při 100° C 5 min.

4.3.3 SDS elektroforéza

Skla pro elektroforézu byla upevněna do stojánku. Byl připraven roztok 15 % separačního polyakrylamidového gelu (2,5 ml destilovaná voda; 5,0 ml 30% akrylamid/bis akrylamid (Bio-Rad); 100 µl 10 % SDS; 2,25 ml 1,5 M Tris. HCl pH 8,8 (Bio-Rad); 3,8 µl TEMED; 70 µl 10% persíran amonný). Roztok gelu byl nalit mezi skla převrstven destilovanou vodou. Gel byl ponechán tuhnout asi po dobu 30 min. Poté byl připraven 4 % zaostřovací gel (1,52 ml destilovaná voda; 0,025 ml 10 % SDS; 0,625 ml 0,5 M Tris HCl pH 6,8 (Bio-Rad); 0,25 ml 30 % akrylamid/bis akrylamid (Bio-Rad); 50 µl 10 % persíran amonný, 4,5 µl TEMED). Byla odstraněna destilovaná voda a bylo napipetováno 700 µl roztoku zaostřovacího gelu. Ihned byl do roztoku gelu zanořen hřebínek pro tvorbu jamek. Gel ponechán polymerovat nejméně 10 min.

Skla s gelem byla vložena do aparatury pro elektroforézu, byly vyndány hřebeny a vše bylo zalito elektrodoým pufrem o pH 8,3: 15 g Tris (GE Healthcare, Švédsko), 72 g glycinu (Sigma-Aldrich, USA), 5 g dodecylsulfátu sodného (SDS), destilovaná voda do 1 litru, pak následně ředěno 1:4 destilovanou vodou. Do jamek v gelu byly nanášeny proteinové molekulové standardy Dual Color (Bio-Rad, USA) po 4 µl a proteinové extrakty spermií po 15 µl. Aparatura byla zapojena do zdroje elektrického proudu a elektroforéza probíhala nejprve při konstantním napětí 80 V 20 min a poté při 150 V po dobu asi 1 hod.

4.3.4 Western blot (elektropřenos proteinů z gelu na membránu)

Příprava transferového pufru:

3,03 g Tris (Sigma-Aldrich, USA)

14,4 g glycin (Sigma-Aldrich, USA)

Tris a glycin byly rozpuštěny ve 200 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 200 ml metanolu (VWR, BDH Chemicals, Francie) a vzniklý roztok byl následně doplněn do 1 litru destilovanou vodou.

Chromatografický filtrační papír Whatman (4 ks), 2 houbičky, 1 nitrocelulósová membrána (Hybond C, Amersham, Švédsko) byly v misce po dobu 15 min namočený v transferovém pufru. Po

ukončení elektroforézy byl vyndán gel a promyt destilovanou vodou, následně byl ponořen do transferového pufru. Kazeta byla vložena do misky s transferovým pufrem a následně byly komponenty systematicky naskládány v tomto pořadí: houbička, 2x filtrační papír, gel, nitrocelulózová membrána, 2x filtrační papír, houbička. Pro přenos proteinů z gelu na membránu bylo důležité, aby membrána byla situována u kladné elektrody. Takto připravená kazeta byla vložena do apratury s transferovým pufrem. Vanička byla vložena do nádoby, ve které se nacházel led a studená voda pro chlazení. Elektropřenos probíhal 1,5 h při 0,5 A.

4.3.5. Vazba biotinem značených lektinů na proteiny na nitrocelulózové membráně

Membrána byla omyta destilovanou vodou a následně PBS. Vizualizace proteinů na membráně po elektropřenosu byla provedena roztokem Ponceau (Sigma-Aldrich, USA) obarvením gelu po dobu 1 min. Odbarvení pozadí bylo provedeno pomocí destilované vody a následným promytím PBS došlo k úplnému odbarvení a membrána byla připravena pro vazebnou studii.

Deaktivace volných míst na membráně byla provedena pomocí 1% želatiny (Gelatin from cold water fish skin, Sigma, Canada) v PBS po dobu 1 hodiny inkubace na třepačce. Poté byla membrána 2x promyta PBS s 0,05% Tweenem 20 (PBS-T) na třepačce po 5 min pro odstranění nescifických interakcí.

Dále byla provedena inkubace s biotinem značenými lektiny ředěnými v Hepes pufru (10 mM Hepes, pH 7,5).

WGA (Biotinylated wheat germ agglutinin) 20 μ l/ml

SNA (Biotinylated elderberry bark lectin) 20 μ l/ml

DBA (Biotinylated dolichos biflorus agglutinin) 20 μ l/ml

MAA (Biotinylated maackia amurensis lectin) 10 μ l/ml

AAL (Biotinylated aleuria aurantia lectin) 10 μ l/ml

UEA (Biotinylated ulex europaeus agglutinin) 20 μ l/ml

SBA (Biotinylated soybean agglutinin) 20 μ l/ml

Negativní kontrola byla inkubována pouze v Hepes pufru.

Do falkony byla vložena membrána s 5 ml roztoku daného lektinu a membrána byla inkubována na rotační třepačce přes noc. Membrána byla následně promyta 3x po 10 min PBS-T pro odstranění nescifických interakcí. Následně byla provedena inkubace se streptavidinem konjugovaným

s křenovou peroxidasou (Sigma-Aldrich, USA) v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Pak následovalo promytí membrány 4x po 5 min PBS-T a 2x po 5 min pouze v PBS.

Vizualizace byla provedena pomocí chemiluminiscenčního substrátu SuperSignal West Pico (Pierce, USA) v přístroji Azure c600 (Azure Biosystems, USA; Biocev, Vestec). Odhad molekulových hmotností vazebných proteinů byl proveden pomocí kalibračních křivek s proteinovými molekulovými standardy. U vybraných detekovaných glykoproteinů byla provedena denzitometrická analýza v programu Image Studio Digits (C-Digit, USA).

5 Výsledky

5.1 Sledování vazby lektinů pomocí fluorescence

Pro vyhodnocení změn v sacharidových strukturách na povrchu kančích spermií před a po in vitro kapacitaci byla zvolena vazba s vybranými biotinem značenými lektiny v suspenzi a nepřímá fluorescenční mikroskopie (kap 4.2). Vlhká fixace spermií vymraženým acetonem-metanolem (kap 4.2.1.1) byla provedena za účelem sledování změn v sacharidových strukturách během kapacitace také uvnitř buňky.

Pro experimenty byly využity následující biotinylované lektiny: *Sambucus nigra* (SNA), *Glycine max soybean* agglutinin (SBA), *Ulex europaeus* agglutinin (UEA), *Maackia amurensis* agglutinin (MAA), *Ricinus communi* agglutinin (RCA), *Pisum sativum* agglutinin (PSA), Concanavalin A *Canavalia ensiformis* (ConA), *Aleuria aurantia* lectin, (AAL), *Lotus tetragonolobus* (LTG), *Triticum vulgare* wheat germ agglutinin (WGA). Samotná vazba byla vizualizována pomocí streptavidinu konjugovaného s FITC (zelená fluorescence), PNA lektin konjugovaný s rhodaminem (červená fluorescence) byl použit pro kontrolu integrity akrozomu. Pro vizualizaci jádra bylo použito DAPI (modrá fluorescence). Kontrola, ve které chyběl biotinem značený lektin, byla ve všech případech negativní.

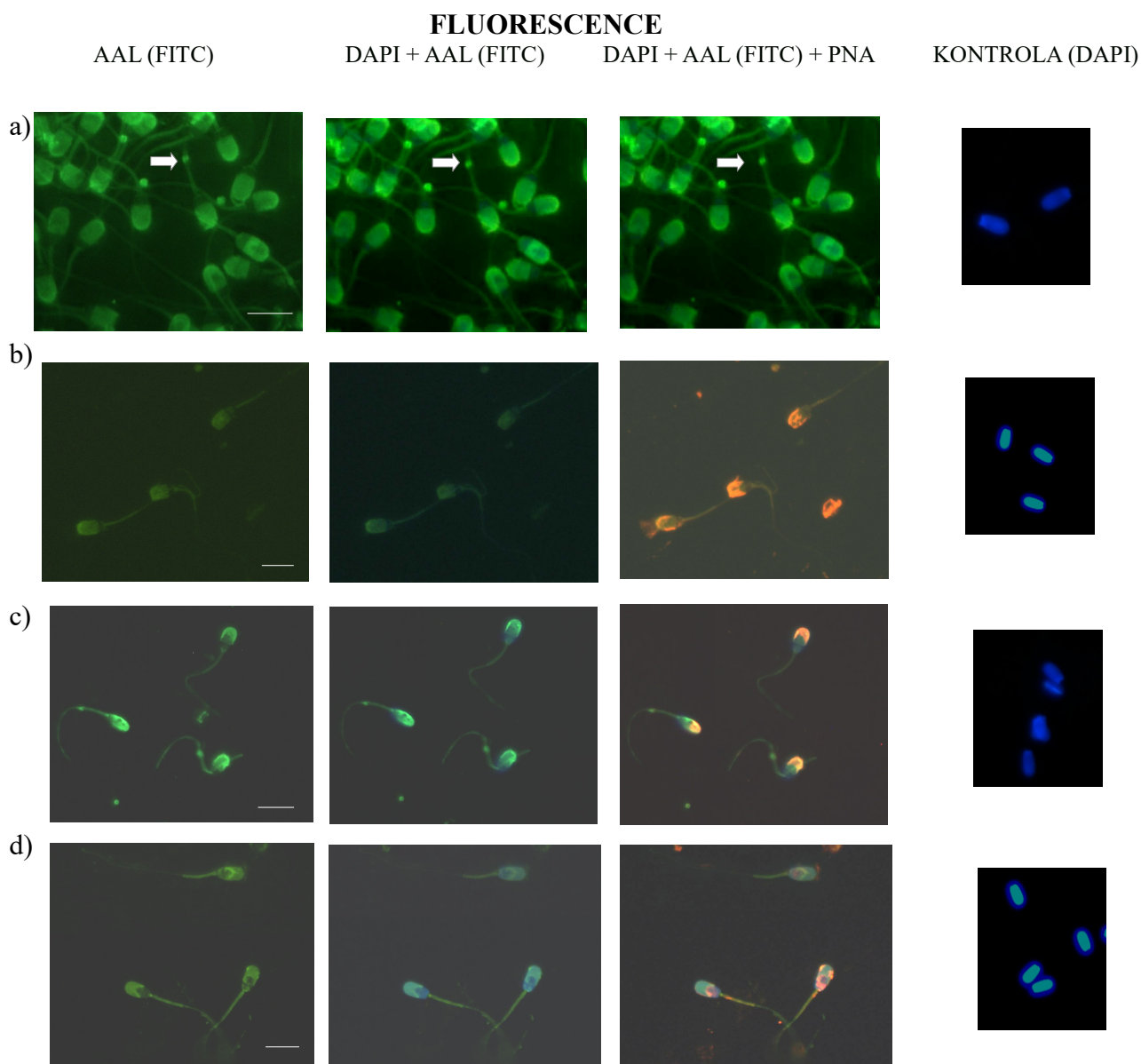
U všech vazeb lektinů na sacharidové struktury spermií bylo počítáno 100 buněk se stejným vzorem. Téměř u všech vazeb nebyly zaznamenány výrazné subpopulace spermií. U ejakulovaných spermií se počty buněk se stejným vzorem blížily ve všech případech téměř ke 100 %. U spermií po in vitro kapacitaci po spočítání buněk vycházelo zhruba kolem 90 % spermií se stejným vzorem fluorescence. U spermií s poškozeným akrosomem nebyl napočítán vzor.

Cílem bylo zjistit, na jakou část spermie obsahující určité sacharidové struktury se váže použitý lektin.

5.1.1 Vazba lektinu *Aleuria aurantia* (AAL)

Lektin *Aleuria aurantia* (AAL) se váže na sacharidové struktury obsahující L-fukosu vázanou (α -1,6) na *N*-acetylglukosamin nebo L-fukosu (α -1,2). U fixovaných ejakulovaných spermií se lektin AAL navázal především v oblasti akrozomu a fluorescence byla viditelná také u spermií s cytoplazmatickou kapkou na konci střední části bičíku (obr. 2a). Vazba PNA v oblasti akrozomu

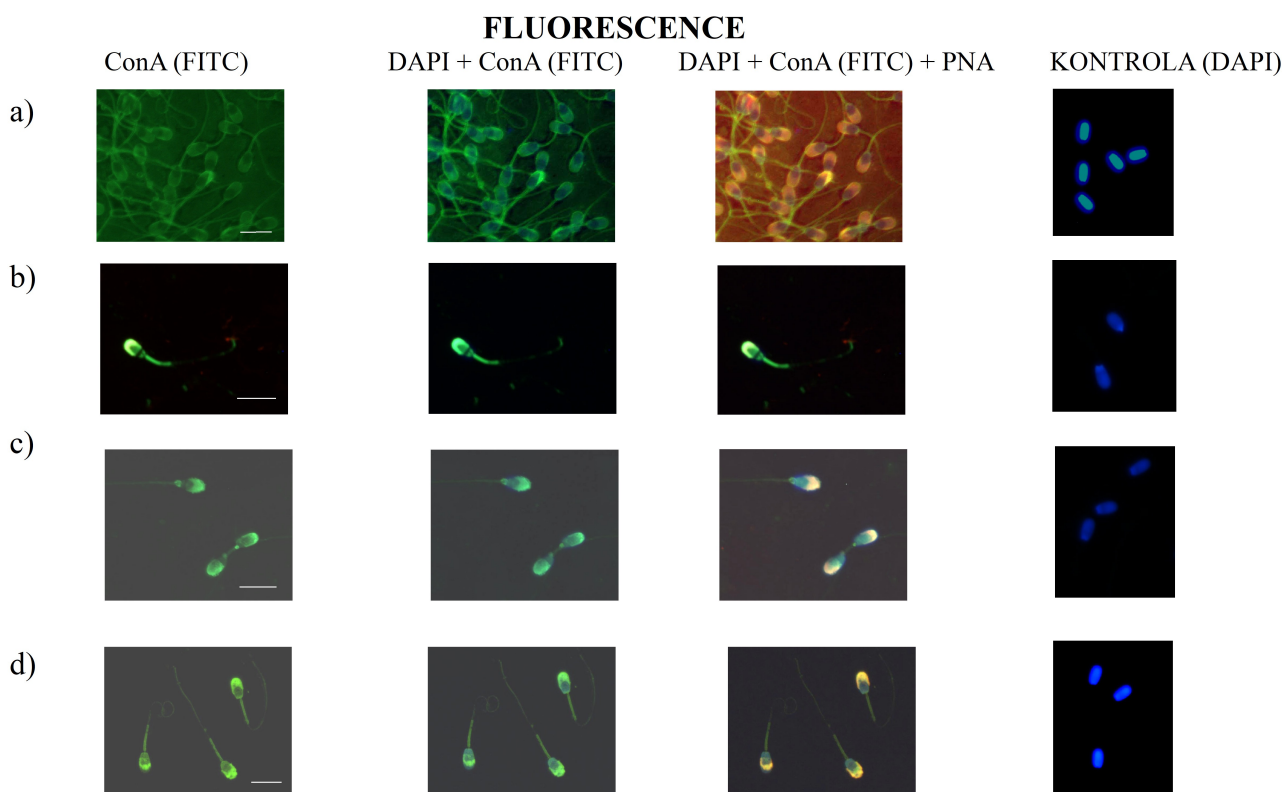
nebyla zaznamenána. Se slabší intenzitou se lektin vázal v oblasti akrozomu i u ejakulovaných spermíí v suspenzi, i když PNA značení ukazuje na částečně poškozené akrozomy (obr. 2b). Zatímco u fixovaných kapacitovaných spermíí došlo ke změně, kdy se lektin AAL výrazněji vázal na hlavičce především v apikální části akrozomu (obr. 2c). Vazba lektinu v suspenzi kapacitovaných spermíí byla zaznamenána v bičíku a se slabší homogenní fluorescencí také v celé oblasti akrozomu (obr. 2d), i když vazba PNA naznačuje jejich poškození. U fixovaných ejakulovaných spermíí bylo spočítáno 100 % buněk se stejným vzorem vazby lektinu na sacharidovou strukturu. U fixovaných spermíí po in vitro kapacitaci bylo napočítáno 99 % se stejným vzorem vazby lektinu. Vzorčky v suspenzi nebyly hodnoceny z důvodu poškození akrozomu.



Obr. č.2: Vazba lektinu AAL na a) ejakulované spermie, b) ejakulované spermie v suspenzi, c) kapacitované spermie, d) kapacitované spermie v suspenzi. Měřítko: 10 μ m.

5.1.2 Vazba lektinu *Canavalia ensiformis* (ConA)

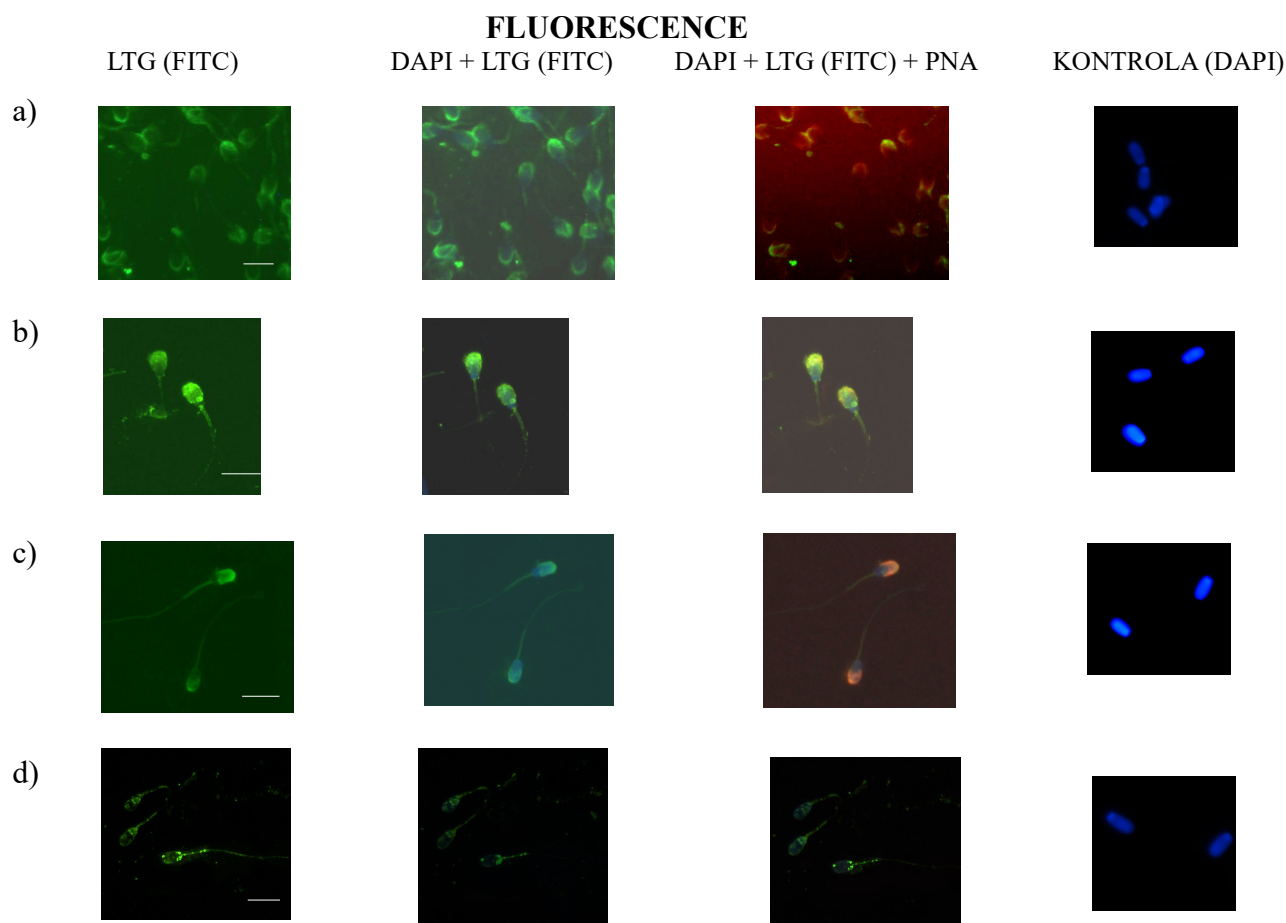
Lektin *Canavalia ensiformis* (ConA) se váže na α -D-manosu a α -D-glukózu. ConA se u fixovaných ejakulovaných spermíí navázal v oblasti akrozomu, kde byla viditelná fluorescence s nízkou intenzitou a v bičíku (obr. 3a). Zatímco u ejakulovaných spermíí v suspenzi se sacharidové struktury, na které se dokáže ConA navázat, byla zaznamenána celoplošná fluorescence v akrozomu (obr. 3b). U fixovaných kapacitovaných spermíí byla viditelná vazba s lektinem v akrozomální oblasti hlavičky, kde byla fluorescence výraznější než u ejakulovaných spermíí (obr. 3c). Navíc byly tyto sacharidové struktury detekovány také v krčku. U kapacitovaných spermíí v suspenzi se lektin navázal na akrozom i na mitochondriální oddíl bičíku (obr. 3d). Vazba PNA na akrozomy u ejakulovaných spermíí v suspenzi nebyla viditelná. Kontrola u lektinu ConA ve všech případech byla negativní a bylo zobrazeno pouze jádro modrou fluorescencí pomocí DAPI. U fixovaných ejakulovaných spermíí bylo spočítáno 99 % buněk se stejným vzorem vazby lektinu na sacharidovou strukturu a u spermíí v suspenzi 98 %. U fixovaných spermíí po in vitro kapacitaci bylo napočítáno 89 % u spermíí fixovaných vlhkou fixací se stejným vzorem vazby lektinu a u spermíí v suspenzi se stejným vzorem bylo napočítáno 95 %.



Obr: č. 3: Vazba lektinu ConA na a) ejakulované spermie, b) ejakulované spermie v suspenzi, c) kapacitované spermie d) kapacitované spermie v suspenzi. Měřítko: 10 μ m.

5.1.3 Vazba lektinu *Lotus tetragonolobus* (LTG)

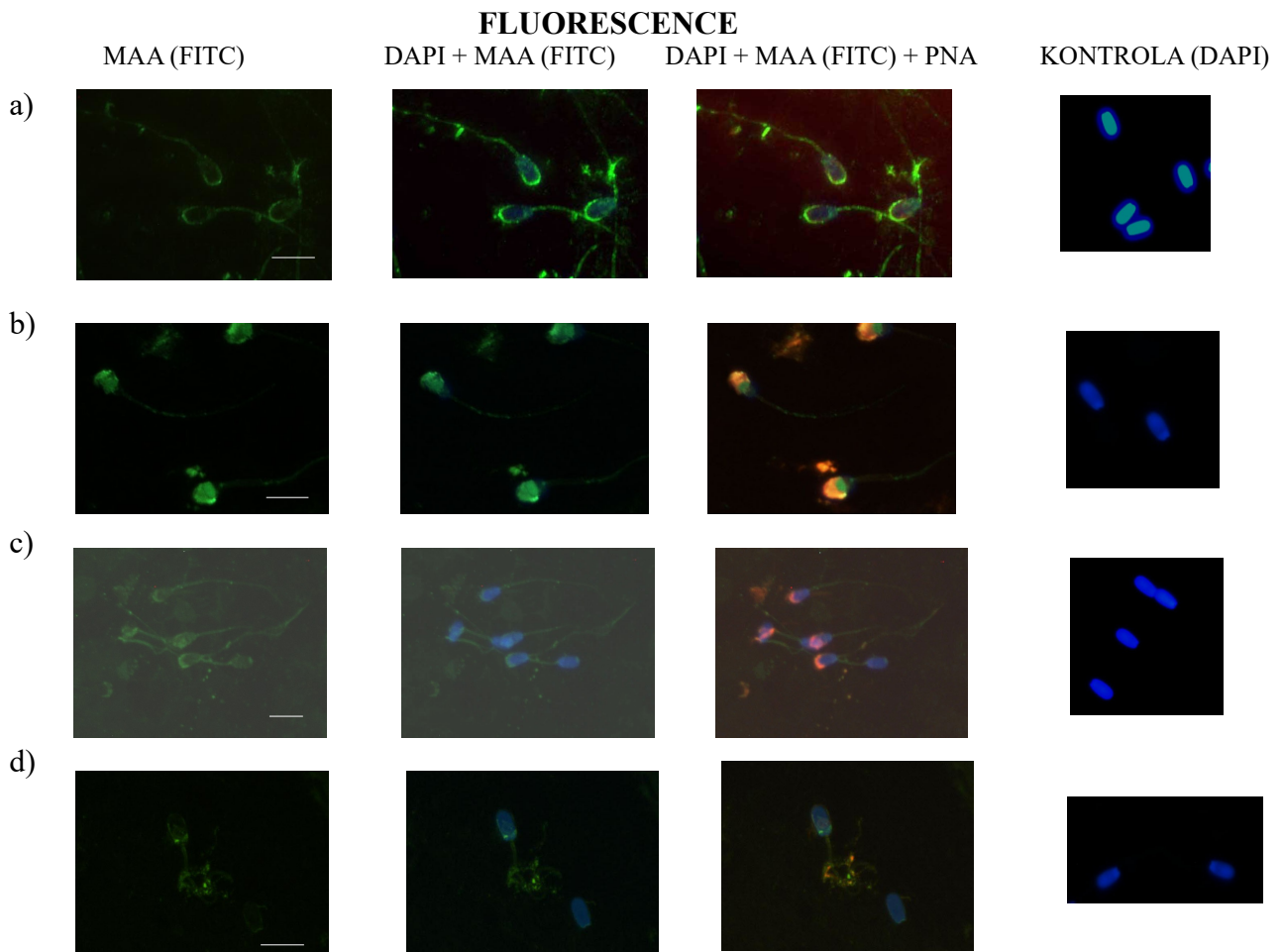
Lektin *Lotus tetragonolobus* (LTG) se váže na sacharidovou strukturu α -L-fukosu vázanou 1-3. U ejakulovaných spermií se lektin LTG navázal na sacharidové struktury v oblasti akrozomu (obr. 4a), přičemž se projevil slabou fluorescencí, až na apikální část akrozomu, kde byla fluorescence intenzivnější, zatímco u ejakulovaných spermií v suspenzi se lektin navázal na celou hlavičku a na mitochondriální oddíl bičíku (obr. 4b). U kapacitovaných spermií se lektin navázal v akrozomální oblasti hlavičky (obr. 4c). U vazby LTG lektinu na kapacitované spermie v suspenzi (obr. 4d), kde se lektin difúzně vázal na sacharidové struktury v postakrozomální oblasti hlavičky a v mitochondriálním oddílu bičíku je viditelná absence vazby lektinu PNA u většiny spermií, což ukazuje na spermie s poškozenými akrozomy. U fixovaných ejakulovaných spermií bylo spočítáno 98 % buněk se stejným vzorem vazby lektinu na sacharidovou strukturu. U fixovaných spermií po in vitro kapacitaci bylo napočítáno 93 % se stejným vzorem vazby lektinu. Vzorky v suspenzi nebyly hodnoceny z důvodu poškození akrozomu.



Obr. č. 4: Vazba lektinu LTG na a) ejakulované spermie, b) ejakulované spermie v suspenzi, c) kapacitované spermie, d) kapacitované spermie v suspenzi. Měřítka: 10 μ m.

5.1.4 Vazba lektinu *Maackia amurensis* (MAA)

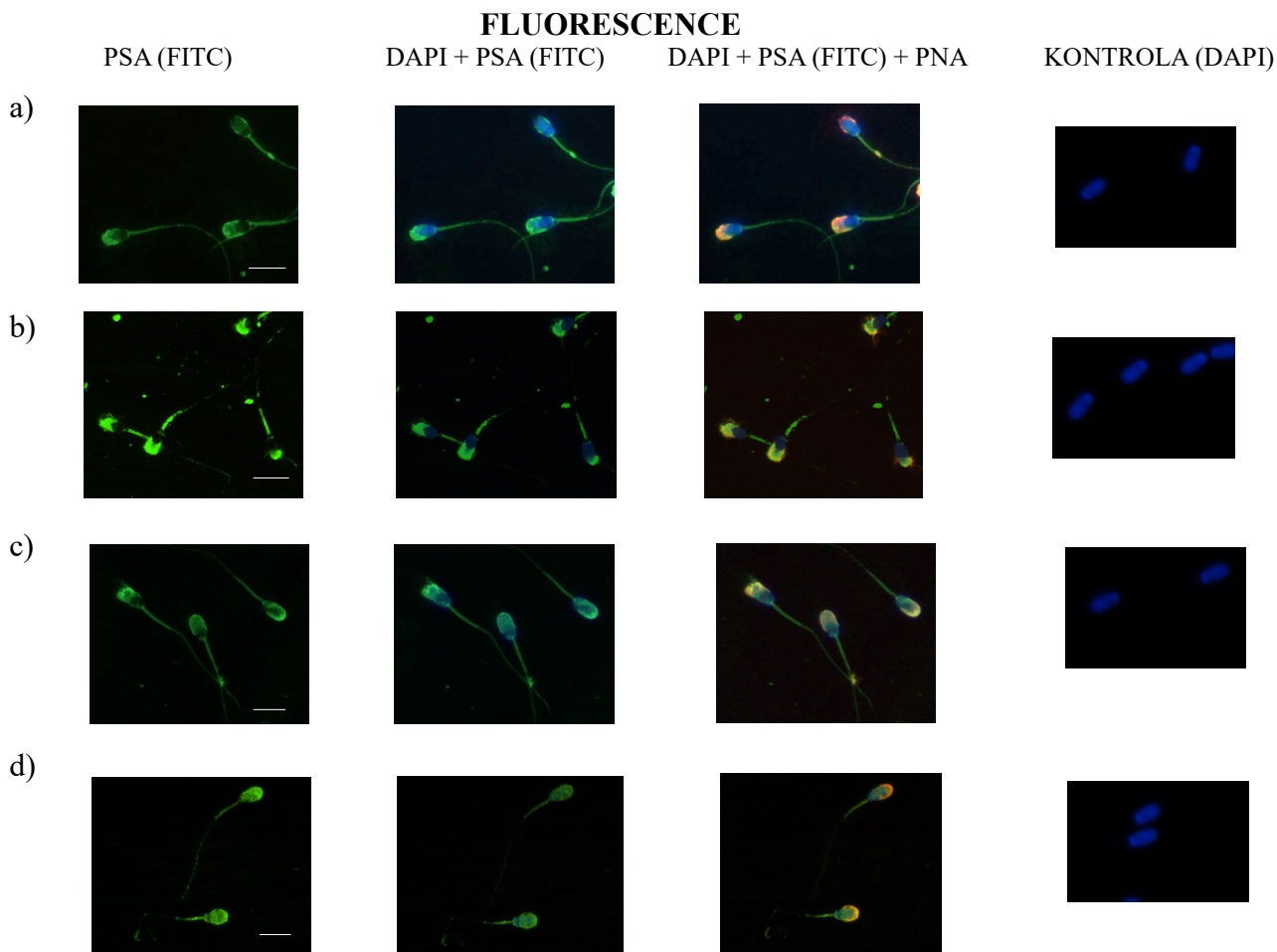
Lektin *Maackia amurensis* (MAA) se váže na kyselinu sialovou vázanou na D-galaktózu (β -1,4) N-acetylglukosamin. U ejakulovaných spermií se lektin MAA navázal hlavně v apikální části akrozomu, která se projevila výraznou fluorescencí (obr. 5a). A pak na postakrozomální oblast a celý bičík spermií, kde je intenzita fluorescence výrazně nižší. Zatím co u ejakulovaných spermií připravených v suspenzi se lektin výrazně navázal na celou hlavičku (obr. 5b). Vazba PNA na akrozomy ukazuje v tomto případě na jejich poškození. Po kapacitaci spermií fixovaných vlhkou fixací se lektin navázal pouze v apikální části akrozomu, kde se projevil slabou fluorescencí a ve střední části bičíku (obr. 5c). U kapacitovaných spermií nebyla zaznamenána vazba PNA lektinu (obr. 5d). U fixovaných ejakulovaných spermií bylo spočítáno 99 % buněk se stejným vzorem vazby lektinu na sacharidovou strukturu. U fixovaných spermií po in vitro kapacitaci bylo napočítáno 90 % se stejným vzorem vazby lektinu. Vzorky v suspenzi nebyly hodnoceny z důvodu poškození akrozomu.



Obr. č. 5: Vazba lektinu MAA na a) ejakulované spermie, b) ejakulované spermie v suspenzi, c) kapacitované spermie, d) kapacitované spermie v suspenzi. Měřítka: 10 μ m.

5.1.5 Vazba lektinu *Pisum sativum* (PSA)

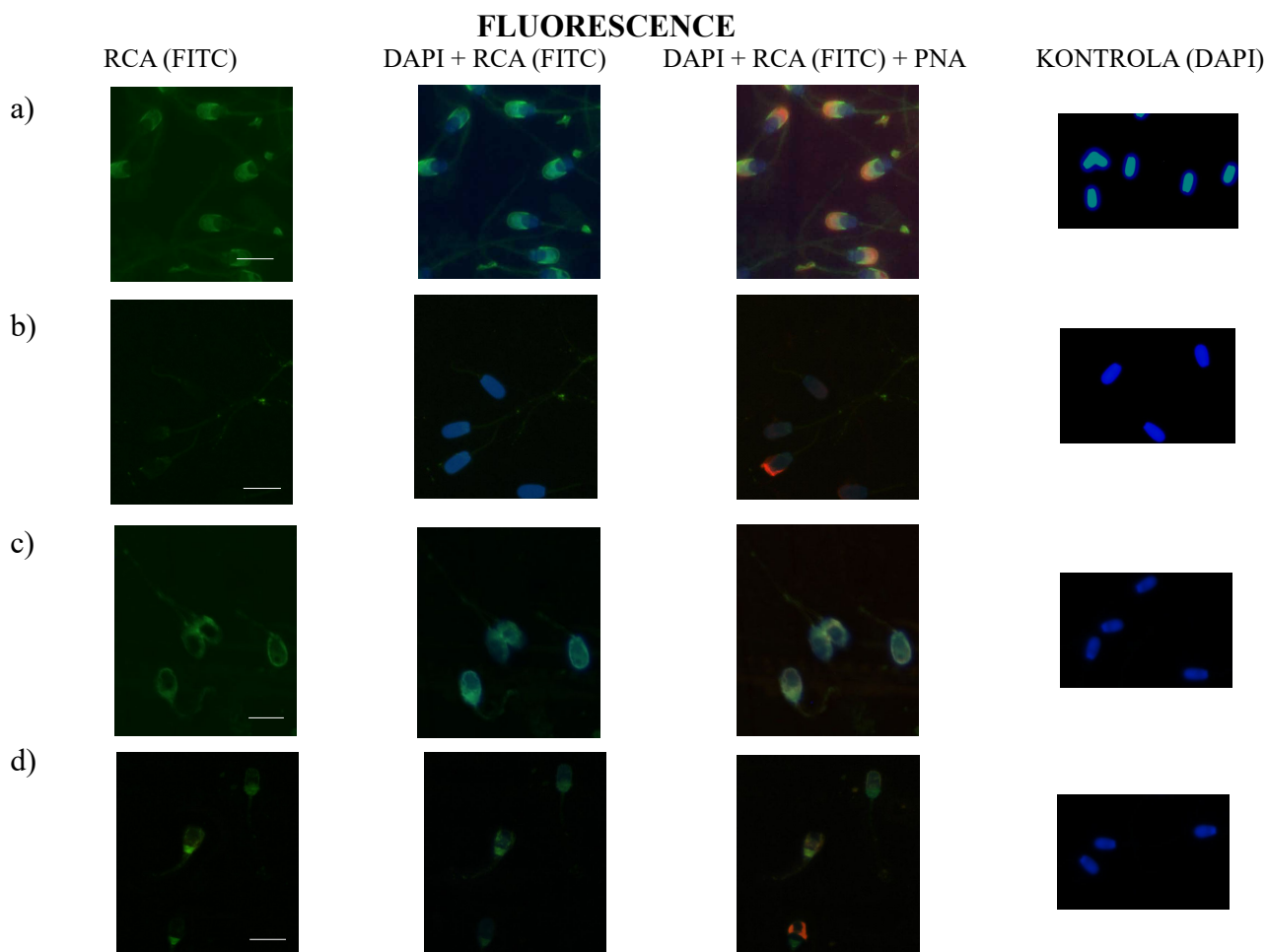
Lektin *Pisum sativum* (PSA) se váže na sacharidovou strukturu L-fukosu α 1,3/6 vázanou na N-acetylglukosamin, popř. na manosu. U ejakulovaných spermíí se lektin PSA převážně navázal v oblasti akrozomu a ve střední části bičíku (obr. 6a). Stejné navázání lektinu bylo zaznamenáno i u ejakulovaných spermíí v suspenzi (obr. 6b). Během kapacitace se navíc projevila vazba na tyto sacharidové struktury ještě slabě v postakrozomální oblasti spermie a opět se stejně jako u ejakulovaných spermíí PSA lektin navázal na oblast akrozomu a střední část bičíku (obr. 6c). U kapacitovaných spermíí v suspenzi se PSA navázal na celou hlavičku i na mitochondriální oddíl bičíku (obr. 6d). U fixovaných ejakulovaných spermíí bylo napočítáno 99 % buněk se stejným vzorem vazby lektinu na sacharidovou strukturu, u buněk v suspenzi to bylo 98 %. U fixovaných spermíí po in vitro kapacitaci bylo napočítáno 89 % buněk se stejným vzorem vazby lektinu, u spermíí v suspenzi to bylo 94 %.



Obr. č. 6: Vazba lektinu PSA na a) ejakulované spermie, b) ejakulované spermie v suspenzi, c) kapacitované spermie, d) kapacitované spermie v suspenzi. Měřítko: 10 μ m.

5.1.6 Vazba lektinu *Ricinus communis* (RCA)

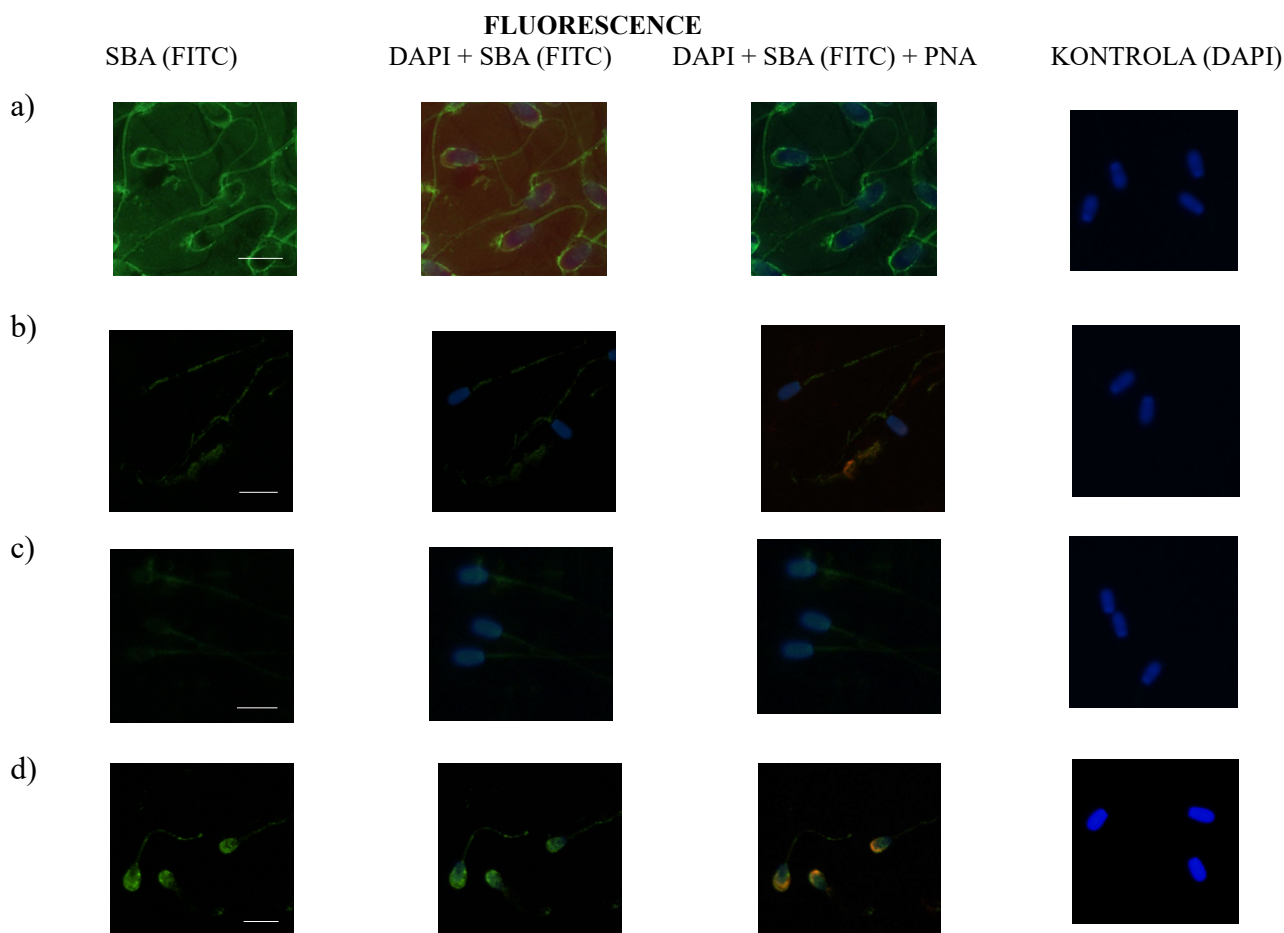
Pro lektin *Ricinus communis* (RCA) je typickým cukrem D-galaktóza vázaná β 1,4 na N-acetylglukosamin. U ejakulovaných spermii fixovaných vlhkou fixací se lektin RCA navázal na sacharidové struktury pouze v oblasti akrozomu (obr. 7a). Zatímco u ejakulovaných spermii v suspenzi se nenavázal vůbec a absence vazby PNA lektinu ukazuje na chybějící akrozomy (obr. 7b). Po kapacitaci se lektin navázal na celou plochu hlavičky spermie, a to i v postakrozomální oblasti (obr. 7c) a u spermii v suspenzi po kapacitaci je viditelná vazba RCA lektinu pouze v postakrozomální oblasti hlavičky (obr. 7d). Opět je viditelná absence vazby PNA lektinu na akrozomy. U fixovaných ejakulovaných spermii bylo napočítáno 98 % buněk se stejným vzorem vazby lektinu na sacharidovou strukturu. U fixovaných spermii po in vitro kapacitaci bylo napočítáno 97 % buněk se stejným vzorem vazby lektinu. Vzorky v suspenzi nebyly hodnoceny z důvodu poškození akrozomů.



Obr. č. 7: Vazba lektinu RCA na a) ejakulované spermie, b) ejakulované spermie v suspenzi, c) kapacitované spermie, d) kapacitované spermie v suspenzi. Měřítka: 10 μ m.

5.1.7 Vazba lektinu *Glycine max soybean* (SBA)

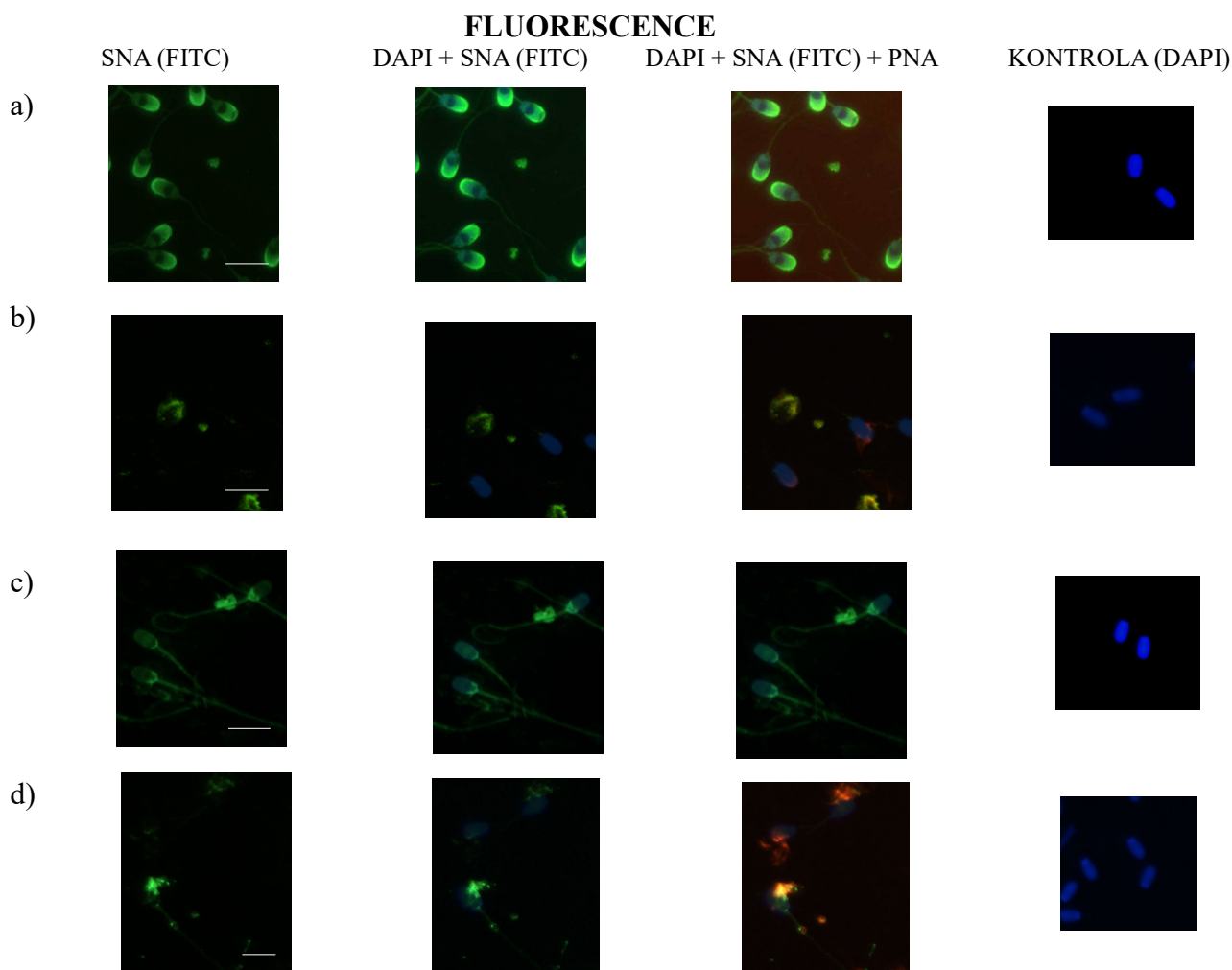
Lektin *Glycine max soybean* (SBA) se váže na α/β N-acetyl-D-galaktosamin. U ejakulovaných spermíí se lektin SBA navázal okolo celé hlavičky spermie a také v bičíku (obr. 8a). U ejakulovaných spermíí v suspenzi byla slabě viditelná vazba lektinu SBA pouze na bičíku po celé jeho délce. Absence PNA vazby na akrozomy ukazuje jejich poškození (obr. 8b). Během kapacitace u spermíí připravených vlhkou fixací se lektin SBA nenavázal (obr. 8c). Ke změně došlo během kapacitace i u spermíí v suspenzi, a to že se lektin navázal na hlavičku v oblasti akrozomu (obr. 8d). U fixovaných ejakulovaných spermíí bylo napočítáno 100 % buněk se stejným vzorem vazby lektinu na sacharidovou strukturu. U spermíí v suspenzi po in vitro kapacitaci bylo stejně značeno 88 %. Vzorčky ejakulovaných spermíí v suspenzi a fixovaných kapacitovaných spermíí nebyly hodnoceny z důvodu chybějících akrozomů.



Obr. č. 8: Vazba lektinu SBA na a) ejakulované spermie, b) ejakulované spermie v suspenzi, c) kapacitované spermie, d) kapacitované spermie v suspenzi. Měřítko: 10 μ m.

5.1.8 Vazba lektinu *Sambucus nigra* (SNA)

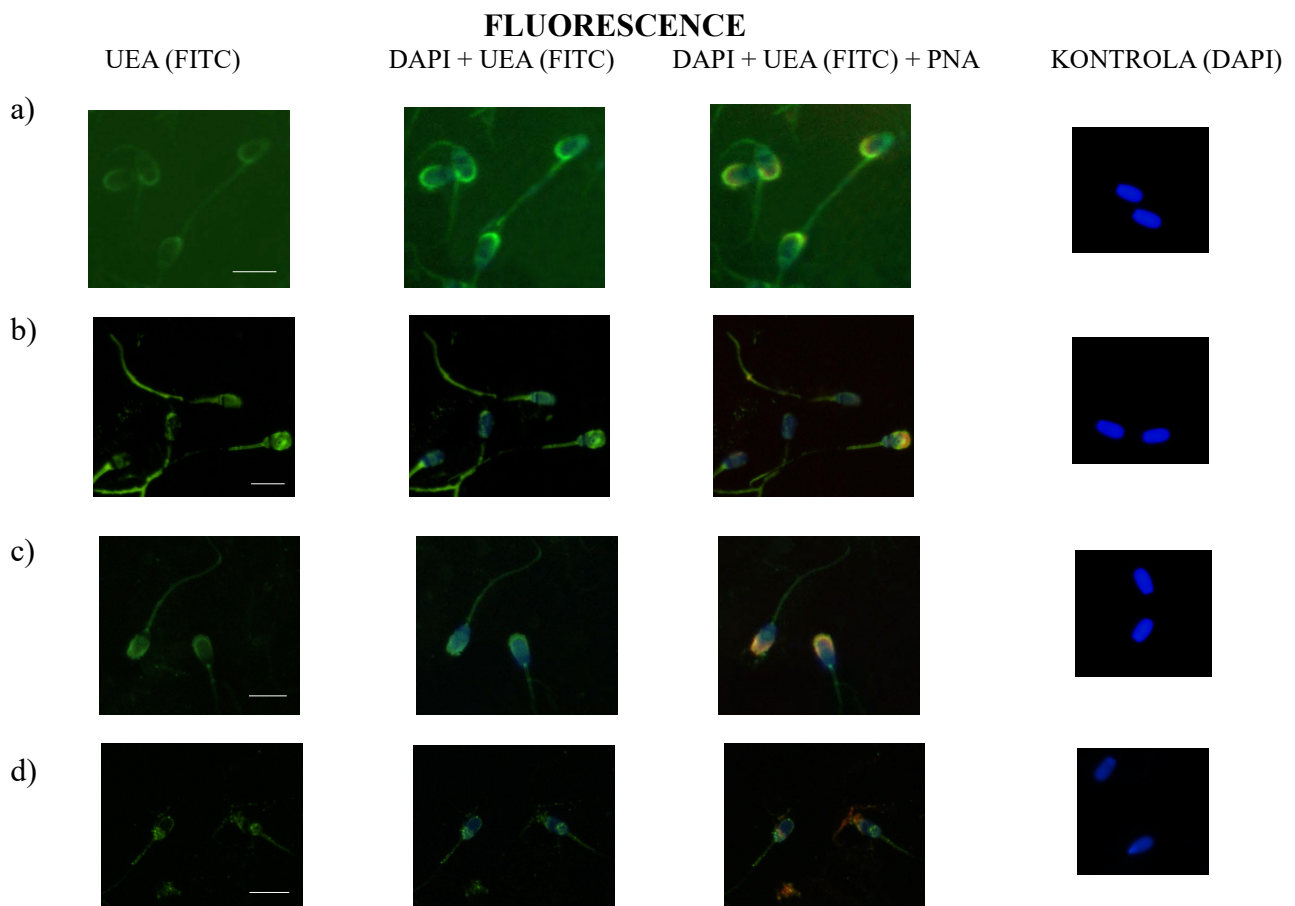
Pro lektin *Sambucus nigra* (SNA) je typickým cukrem, na který se váže kyselinu N-acetylneuraminovou (sialovou) vázanou $\alpha 2,6$ na D-galaktózu a N-acetyl-D-galaktosamin. Na ejakulovaných spermii se lektin SNA váže v oblasti hlavičky na akrozomu (obr. 9a). Zatímco u ejakulované spermie v suspenzi se lektin SNA nenařádal vřbec a absence PNA značení ukazuje na chybějící akrozomy (obr. 9b). Po kapacitaci se u vlhké fixace spermii lektin navázal pouze v postakrozomální oblasti a absence PNA vazby opět ukazuje na poškození akrozomů (obr. 9c). U kapacitovaných spermii v suspenzi se lektin SNA nenařádal vřbec a i v tomto případě nebyla viditelná vazba PNA na akrozomy (obr. 9d). U fixovaných ejakulovaných spermii bylo napočítáno 100 % buněk se stejným vzorem vazby lektinu na sacharidovou strukturu. U dalších vzorků z důvodu poškození akrozomů nebyla vazba SNA lektinu vyhodnocena.



Obr. č. 9: Vazba lektinu SNA na a) ejakulované spermie, b) ejakulované spermie v suspenzi, c) kapacitované spermie, d) kapacitované spermie v suspenzi. Měřítko: 10 μm .

5.1.9 Vazba lektinu *Ulex europaeus* (UEA)

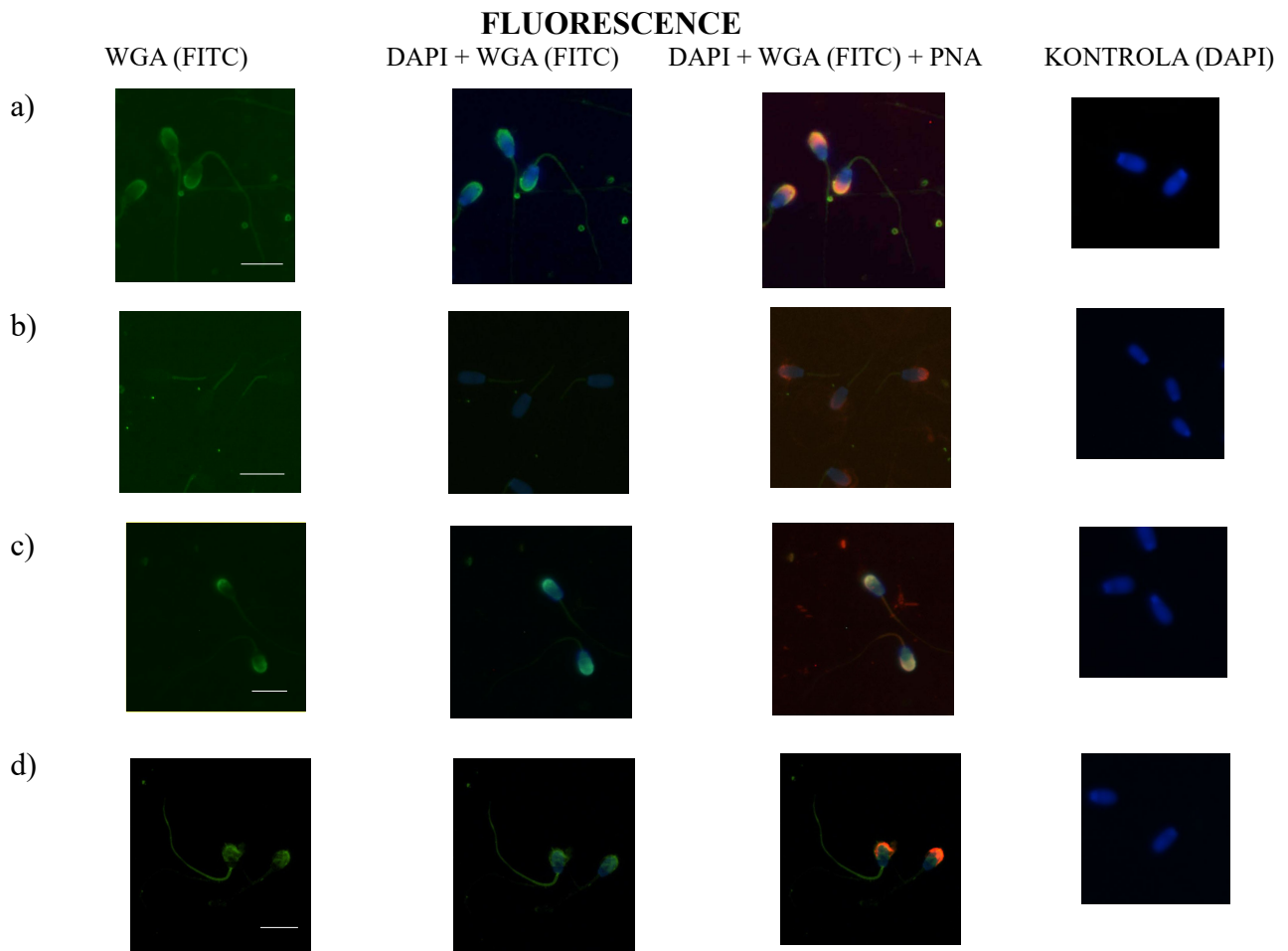
Pro lektin *Ulex europaeus* (UEA) je typický cukr L-fukosa vázaná α 1,2 D-galaktosu, na který se dokáže vázat. U ejakulované spermie se lektin UEA vázal především v apikální části akrozomu (obr. 10a). Oproti tomu u ejakulovaných spermií v suspenzi se navázal po celé délce bičíku a do akrozomálního segmentu. Většina spermií postrádala značení PNA, což ukazuje na poškození akrozomů. U spermií s neporušeným akrozomem byla viditelná také vazba UEA (obr. 10b). U fixovaných kapacitovaných spermií se UEA lektin vázal v apikální oblasti akrozomu a v krčku (obr. 10c). U kapacitovaných spermií v suspenzi se pomocí lektinu povedlo zaznamenat vazbu na sacharidové struktury v postakrozomální části hlavičky spermie a ve středním oddíl bičíku s nižší fluorescencí. Absence PNA vazby jasně ukazuje na chybějící akrozomy (obr. 10d). U fixovaných ejakulovaných spermií bylo napočítáno 99 % buněk se stejným vzorem vazby lektinu na sacharidovou strukturu. U fixovaných spermií po in vitro kapacitaci bylo spočítáno 90 % stejně značených buněk. Vzorky v suspenzi nebyly z důvodu porušených akrozomů hodnoceny.



Obr. č. 10: Vazba lektinu UEA na a) ejakulované spermie, b) ejakulované spermie v suspenzi, c) kapacitované spermie, d) kapacitované spermie v suspenzi. Měřítko: 10 μ m.

5.1.10 Vazba lektinu *Triticum vulgaris* (WGA)

Lektin *Triticum vulgaris* (WGA) se váže na sacharidové struktury obsahující β -N-acetylglukosamin. U fixovaných ejakulovaných spermíí se lektin WGA navázal pouze na apikální část akrozomu (obr. 11a). Oproti tomu u ejakulovaných spermíí v suspenzi se navázal pouze na mitochondriální část bičíku (obr. 11b). Po kapacitaci se lektin WGA vázal ve spermíích upravených vlhkou fixací především v apikální části akrozomu (obr. 11c). U spermíí v suspenzi po kapacitaci se lektin navázal na akrozomální část hlavičky a u některých spermíí také na mitochondriální segment bičíku (obr. 11d). U fixovaných ejakulovaných spermíí bylo spočítáno 100 % buněk se stejným vzorem vazby lektinu na sacharidovou strukturu, u spermíí v suspenzi to bylo 99 %. U fixovaných spermíí po in vitro kapacitaci bylo napočítáno 91 % se stejným vzorem vazby lektinu, u spermíí v suspenzi to bylo 89 %.











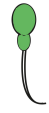
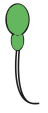


Obr. č. 11: Vazba lektinu WGA na a) ejakulované spermie, b) ejakulované spermie v suspenzi, c) kapacitované spermie, d) kapacitované spermie v suspenzi. Měřítko: 10 μ m.

5.2 Celkové hodnocení po detekci sacharidových struktur pomocí fluorescence

U ejakulovaných spermií byly sacharidové struktury fukosy převážně detekované v akrosomální oblasti hlavičky spermie (tab. 5). Lektiny UEA, AAL vázající se převážně na fukosu ukázaly, že během kapacitace došlo ke ztrátě těchto sacharidových struktur. Zatímco lektiny LTG a PSA, které se váží také převážně na fukosu odhalily, že po kapacitaci došlo k odhalení fukosylových struktur téměř v celé přední části hlavičky spermie. Lektin PSA nezaznamenal rozdíl mezi detekcí sacharidů v celé spermii a na povrchu (suspenze) jak u ejakulovaných, tak kapacitovaných spermiích (tab. 5).



Tab. č. 5 Přehled lektinů s preferencí vazby na fukosu a vyobrazení míst, kde byla detekována vazba na spermii

FUKOSA				
Lektin specifický sacharid	ej	ej sus	kap	kap sus
UEA L-Fuc(α 1,2)Gal(β 1,4)GlcNAc β				
LTG L-Fuc(α 1-3)GlcNAc		X		X
AAL L-Fuc(α 1,2),L-Fuc(α 1,6)GlcNAc		X		X
PSA L-Fuc(α 1,3/6)GlcNAc; Man				

Vysvětlivky použitých zkratk: Gal: D-galaktosa, GlcNAc: N-acetylglucosamin, Fuc: L-fukosa, Man: D-manosa.; ej: fixované ejakulované spermie, ej sus: ejakulované spermie v suspenzi, kap: fixované kapacitované spermie, kap sus: kapacitované spermie v suspenzi; X: nehodnoceno.

Galaktosa byla detekována pomocí RCA lektinu v akrosomální části hlavičky ejakulované spermie. Na spermii po kapacitaci se tento lektin vázal po celé hlavičce (tab. 6).





Tab. č. 6 Přehled lektinu s preferencí vazby na galaktosu a vyobrazení míst, kde byla detekována vazba na spermii

GALAKTOSA				
Lektin specifický sacharid	ej	ej sus	kap	kap sus
RCA Gal(β1,4)GlcNAc		X		X

Vysvětlivky použitých zkratk: Gal: D-galaktosa, GlcNAc: N-acetylglucosamin, ej: fixované ejakulované spermie, ej sus: ejakulované spermie v suspenzi, kap: fixované kapacitované spermie, kap sus: kapacitované spermie v suspenzi; X: nehodnoceno.

Sacharidové struktury manosy byly detekovány pomocí lektinu ConA, hlavně v oblasti akrosomu hlavičky spermie před i po kapacitaci. Změna ve vazbě lektinu byla viditelná po kapacitaci převážně ve střední části bičíku (tab. 7).




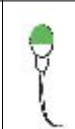
Tab. č. 7 Přehled lektinu s preferencí vazby na manosu a vyobrazení míst, kde byla detekována vazba na spermii

MANOSA				
Lektin specifický sacharid	ej	ej sus	kap	kap sus
ConA α Man > α Glc				

Vysvětlivky použitých zkratk: Glc: D-glukóza, Man: D-manosa. Vysvětlivky použitých zkratk: Gal: D-galaktosa, GlcNAc: N-acetylglucosamin, ej: fixované ejakulované spermie, ej sus: ejakulované spermie v suspenzi, kap: fixované kapacitované spermie, kap sus: kapacitované spermie v suspenzi; X: nehodnoceno.

Sacharidové struktury N-acetylglucosaminu detekovatelných pomocí lektinu WGA se během kapacitace spermii připravených vlhkou fixací nezměnily. Zatímco u spermii, kde byl lektin navázán v suspenzi, došlo k výrazným změnám ve vazbě WGA na povrch kapacitovaných spermii (tab. 8).



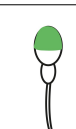
Tab. č. 8 Přehled lektinu s preferencí vazby na N-acetylglukosamin a vyobrazení míst, kde byla detekována vazba na spermii

N-ACETYLGLUKOSAMIN				
Lektin specifický sacharid	ej	ej sus	kap	kap sus
WGA β GlcNAc				

Vysvětlivky použitých zkratk: GlcNAc: N-acetylglukosamin, ej: fixované ejakulované spermie, ej sus: ejakulované spermie v suspenzi, kap: fixované kapacitované spermie, kap sus: kapacitované spermie v suspenzi; X: nehodnoceno.

U spermií byla kyselina sialová detekována za pomoci lektinů MAA a SNA převážně v apikální části hlavičky spermie v ostatních částech spermie se navázání výrazně lišilo (tab. 9).



Tab. č. 9 Přehled lektinů s preferencí vazby na kyselinu sialovou a vyobrazení míst, kde byla detekována vazba na spermii

KYSELINA SIALOVÁ				
Lektin specifický sacharid	ej	ej sus	kap	kap sus
MAA Sia(α 2,3)Gal		X		X
SNA Sia(α 2,6)Gal/GalNAc		X	X	X

Vysvětlivky použitých zkratk: Sia: sialová kyselina, Gal: D-galaktosa, GalNAc: N-acetyl-D-galaktosamin, ej: fixované ejakulované spermie, ej sus: ejakulované spermie v suspenzi, kap: fixované kapacitované spermie, kap sus: kapacitované spermie v suspenzi; X: nehodnoceno.

Vazba lektinu SBA rozpoznávajícího N-acetylgalaktosamin ukázala vazbu v plazmatické membráně ejakulované spermie. V suspenzi se zdařila pouze vazba na kapacitované spermii, kde byla značena oblast akrosomu (obr. 10).

Tab. č. 10 Přehled lektinu s preferencí vazby na galaktosamin a vyobrazení míst, kde byla detekována vazba na spermii

N-ACETYLGALAKTOSAMIN				
Lektin, specifický sacharid	ej	ej sus	kap	kap sus
SBA α/β GalNAc		X	X	

Vysvětlivky použitých zkratk: GalNAc: N-acetylgalaktosamin; ej: fixované ejakulované spermie, ej sus: ejakulované spermie v suspenzi, kap: fixované kapacitované spermie, kap sus: kapacitované spermie v suspenzi; X: nehodnoceno.

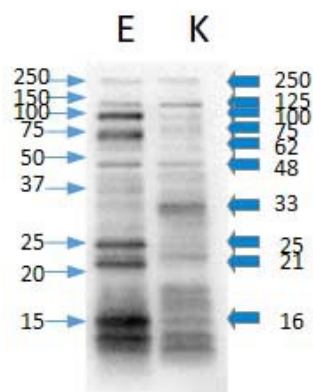
5.3 Vazba lektinů na glykoproteiny ejakulovaných a kapacitovaných spermií

Pro vyhodnocení změn v glykoproteinech kančích spermií před a po in vitro kapacitaci byla využita vazebná studie na NC membráně s biotinem značenými lektiny (kap. 4.1.1).

Pro získání kapacitovaných spermií byla provedena kapacitace in vitro (kap. 4.1.1) a extrakce celkových a povrchových proteinů ze spermií (kap. 4.3.2), a to kapacitovaných i ejakulovaných a kapacitovaných. Proteiny z kapacitovaných a ejakulovaných spermií byly separovány pomocí SDS elektroforézy (kap. 4.3.3) a přeneseny z gelu na NC membránu (kap. 4.3.4). Nanáška proteinů byla zkontrolována barvením na proteiny pomocí Ponceau. Koncentrace proteinů v obou vzorcích extraktu byla podle denzitometrické analýzy shodná. Byla provedena inkubace s biotinem značenými vybranými lektiny a vizualizace vazby pomocí avidinu konjugovaného s křenovou peroxidasou a po reakci s chemiluminiscenčním substrátem. Molekulové hmotnosti detekovaných glykoproteinů byly určeny z kalibračních křivek sestavených na základě vzdálenosti proteinů od horního okraje gelu a proteinových molekulových standardů. Intenzita vazby lektinů u některých glykoproteinů byla vyhodnocena denzitometrickou analýzou.

5.3.1 Detekce glykoproteinů pomocí *Aleuria aurantia* (AAL)

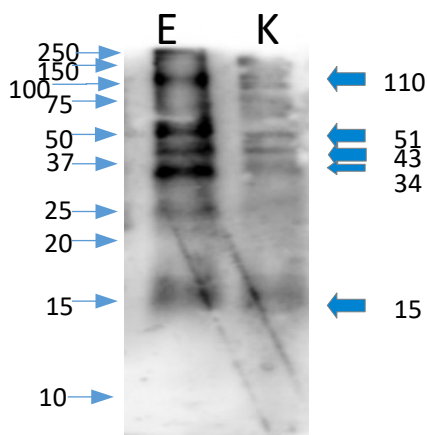
Lektin *Aleuria aurantia* (AAL) se váže na sacharidové struktury obsahující L-fukosu vázanou (α -1,6) na N-acetylglukosamin nebo L-fukosu (α 1,2). Navázal se bez výrazných rozdílů na glykoproteiny ejakulovaných a kapacitovaných spermií s molekulovou hmotností 250 kDa, 125 kDa a 48 kDa. Zatímco u ejakulovaných spermií (obr. 12, E) se navázal lektin s větší intenzitou u glykoproteinů s molekulovou hmotností 100 kDa, 75 kDa, 62 kDa, 25 kDa, 21 kDa a 16 kDa. U kapacitovaných spermií se s větší intenzitou navázal lektin pouze na glykoprotein s molekulovou hmotností 33 kDa (obr. 12, K).



Obr. č. 12 : detekce pomocí AAL lektinu, E: ejakulované spermie, K: kapacitované spermie

5.3.2 Detekce glykoproteinů pomocí *Canavalia ensiformis* (ConA)

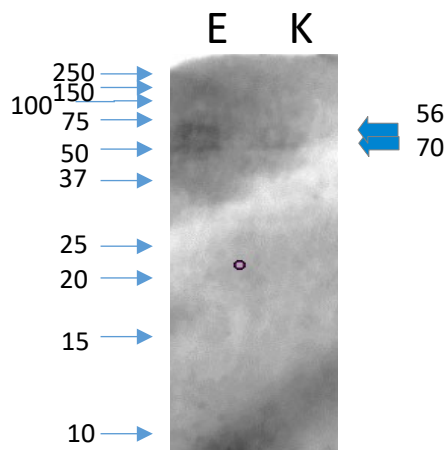
Lektin *Canavalia ensiformis* (ConA) se váže na α -D-manosu a α -D-glukózu. Navázal se bez výrazných rozdílů na glykoproteiny ejakulovaných a kapacitovaných spermií s molekulovou hmotností 15 kDa. Zatímco u ejakulovaných spermií se navázal lektin s větší intenzitou u glykoproteinů s molekulovou hmotností 110 kDa, 51 kDa, 43 kDa a 34 kDa (obr. 13, E). U kapacitovaných spermií se s větší intenzitou se lektin nenavázal (obr. 13, K).



Obr. č. 13 Detekce pomocí ConA lektinu, E: ejakulované spermie, K: kapacitované spermie

5.3.3 Detekce glykoproteinů pomocí *Lotus tetragonolobus* (LTG)

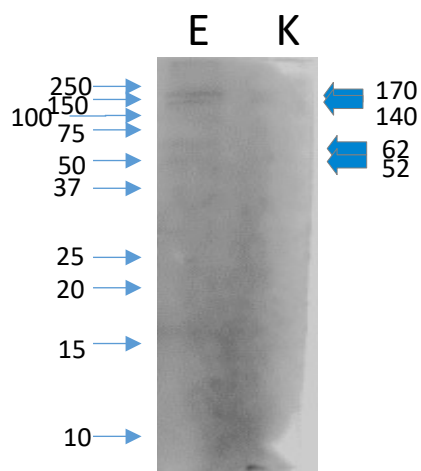
Lektin *Lotus tetragonolobus* (LTG) se váže na sacharidovou strukturu α -L-fukosu vázanou 1-3. Navázal se výrazněji na glykoproteiny ejakulovaných než na kapacitovaných spermii s molekulovou hmotností 56 kDa (obr. 14, E). Ještě bylo zaznamenáno navázání u ejakulovaných spermii na glykoproteiny s molekulovou hmotností 70 kDa (obr. 14, E), zatímco u kapacitovaných spermii nedošlo k navázání (obr. 14, K).



Obr. č. 14 Detekce pomocí LTG lektinu, E: ejakulované spermie, K: kapacitované spermie

5.3.4 Detekce glykoproteinů pomocí *Maackia amurensis* (MAA)

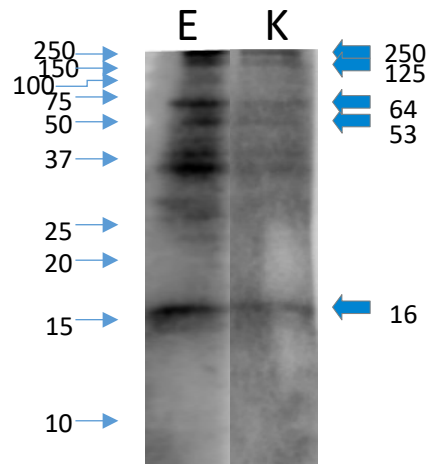
Lektin *Maackia amurensis* (MAA) se váže na kyselinu sialovou vázanou na D-galaktózu (β -1,4) N-acetylglukosamin. Navázal se u ejakulovaných spermii s větší intenzitou u glykoproteinů s molekulovou hmotností 170 kDa a 140 kDa (obr. 15, E), zatímco u kapacitovaných spermii se navázal se slabší intenzitou (obr. 15, K). Pak se ještě navázal u ejakulovaných spermii se slabší intenzitou u glykoproteinů s molekulovou hmotností 62 kDa a 52 kDa (obr. 15, E) a u kapacitovaných spermii nedošlo k žádnému navázání (obr. 15, K).



Obr. č. 15 Detekce pomocí MAA lektinu, E: ejakulované spermie, K: kapacitované spermie

5.3.5 Detekce glykoproteinů pomocí *Pisum sativum* (PSA)

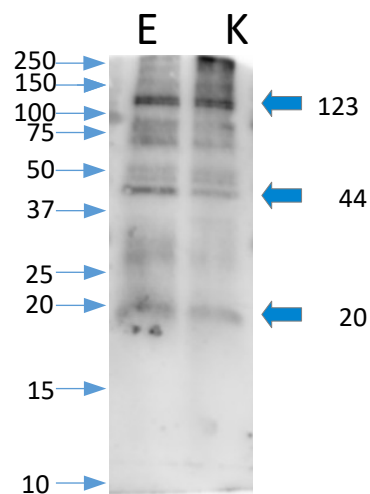
Lektin *Pisum sativum* (PSA) se váže na sacharidovou strukturu L-fukosu (α 1,3/6) vázanou na N-acetylglukosamin, popř. na manosu. Navázal se u ejakulovaných spermii s větší intenzitou u glykoproteinů s molekulovou hmotností 250 kDa, 125 kDa, 64 kDa, 53 kDa a 16 kDa (obr. 16, E). U extraktu kapacitovaných spermii se lektin PSA vázal na stejné glykoproteiny, ale s výrazně slabší intenzitou (obr. 16, K).



Obr. č. 16 Detekce pomocí PSA lektinu, E: ejakulované spermie, K: kapacitované spermie

5.3.6 Detekce glykoproteinů pomocí *Ricinus communis* (RCA)

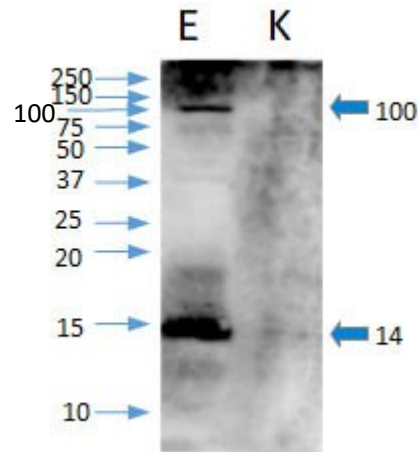
Lektin *Ricinus communis* (RCA) je typickým cukrem D-galaktóza vázaná β 1,4 na N-acetylglukosamin. Navázal se bez výrazných rozdílů na glykoproteiny ejakulovaných i kapacitovaných spermii s molekulovou hmotností v rozmezí od 123 kDa do 20 kDa (obr. 17, E,K). Zatímco u ejakulovaných spermii se navázal lektin s větší intenzitou u glykoproteinu s molekulovou hmotností 27 kDa a 44 kDa (obr. 17, E). U kapacitovaných spermii se s větší intenzitou lektin nenavázal (obr. 17, K).



Obr. č. 17 Ddetekce pomocí RCA lektinu, E: ejakulované spermie, K: kapacitované spermie

5.3.7 Detekce glykoproteinů pomocí *Glycine max soybean* (SBA)

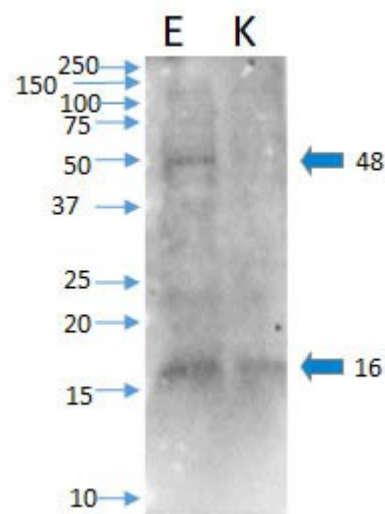
Lektin *Glycine max soybean* (SBA) se váže na α/β N-acetyl-D-galaktosamin. Navázal se u ejakulovaných spermíí s větší intenzitou u glykoproteinů s molekulovou hmotností 100 kDa a 14 kDa (obr. 18, E). U kapacitovaných spermíí je viditelná velmi slabá vazba lektinu SBA na tyto dva glykoproteiny (obr. 18, K).



Obr. č. 18 Detekce pomocí SBA lektinu, E: ejakulované spermie, K: kapacitované spermie

5.3.8 Detekce glykoproteinů pomocí *Sambucus nigra* (SNA)

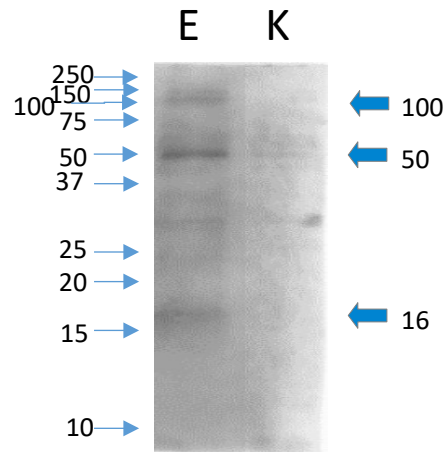
Lektin *Sambucus nigra* (SNA) je typickým cukrem, na který se váže kyselinu N-acetylneuraminovou (sialovou) vázanou $\alpha 2,6$ na D-galaktózu a N-acetyl-D-galaktosamin. Se navázal o něco slaběji na glykoprotein s molekulovou hmotností 16 kDa (obr. 19, E,K). Zatímco u ejakulovaných spermíí se navázal lektin s velkou intenzitou na glykoprotein s molekulovou hmotností 48 kDa (obr. 19, E). U extraktu kapacitovaných spermíí není viditelná žádná vazba lektinu v této molekulové hmotnosti (obr. 19, K).



Obr. č. 19 Detekce pomocí UEA lektinu, E: ejakulované spermie, K: kapacitované spermie

5.3.9 Detekce glykoproteinů pomocí *Ulex europaeus* (UEA)

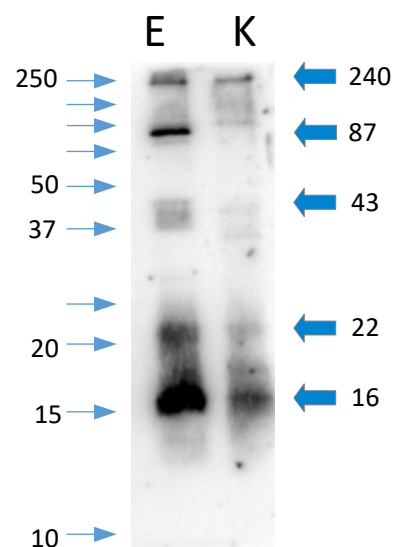
Pro lektin *Ulex europaeus* (UEA) je typický cukr L-fukosa vázaná α 1,2 D-galaktosu, na který se dokáže vázat. Lektin UEA u ejakulovaných spermii se navázal s větší intenzitou u glykoproteinů s molekulovou hmotností 100 kDa, 50 kDa, a 16 kDa (obr. 20, E). Slabší vazba je viditelná u glykoproteinů mezi 25 a 37 kDa. U kapacitovaných spermii je intenzita vazby lektinu na tyto glykoproteiny velmi nízká (obr. 20, K).



Obr. č. 20 Detekce pomocí UEA lektinu, E: ejakulované spermie, K: kapacitované spermie

5.3.10 Detekce glykoproteinů pomocí *Triticum vulgaris* (WGA)

Lektin *Triticum vulgaris* (WGA) se váže na sacharidové struktury obsahující β -N-acetylglukosamin. Lektin WGA se navázal bez výrazných rozdílů na glykoproteiny ejakulovaných a kapacitovaných spermii s molekulovou hmotností 240 kDa. Zatímco u ejakulovaných spermii se navázal lektin s větší intenzitou u glykoproteinů s molekulovou hmotností 87 kDa, 43 kDa, 22 kDa a 16 kDa (obr. 21, E). V extraktu kapacitovaných spermii se vázal lektin na tyto glykoproteiny s výrazně nižší intenzitou. U molekulové hmotnosti 87 kDa došlo k úplnému vymizení vazby lektinu (obr. 21, K).



Obr. č. 21 Detekce pomocí WGA lektinu, E: ejakulované spermie, K: kapacitované spermie

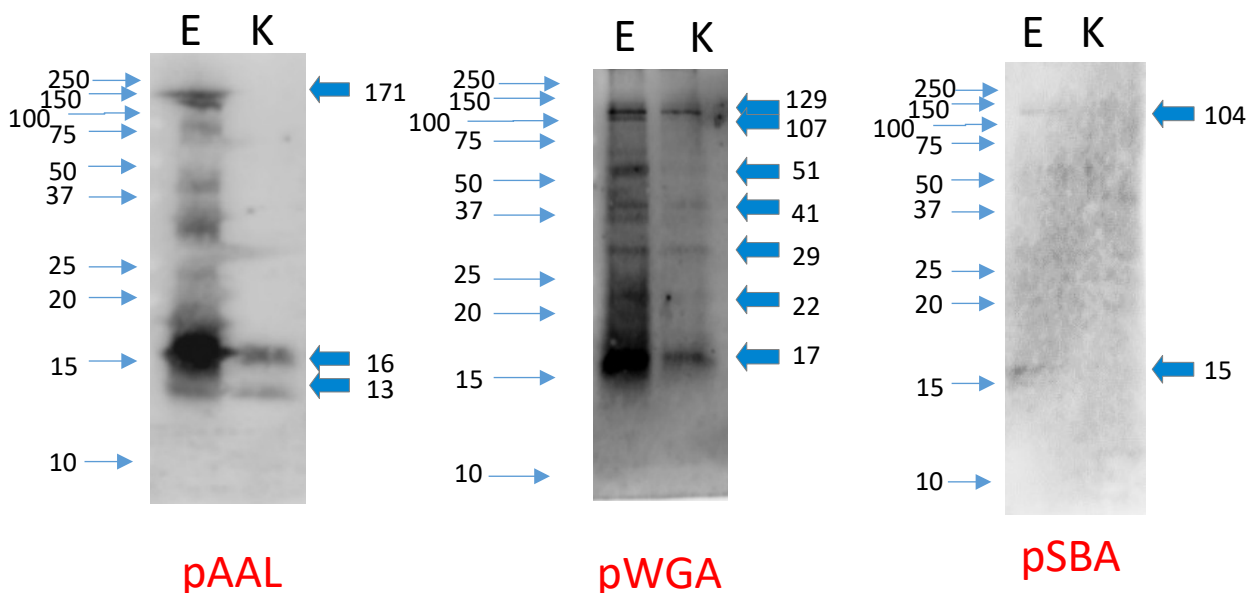
5.3.11 Detekce sacharidových struktur v povrchových proteinech spermii

Byly izolovány povrchové proteiny ejakulovaných a in vitro kapacitovaných spermii (kap. 4.1.1). Po jejich separaci pomocí SDS elektroforézy (kap. 4.3.3) a přenosu na NC membránu (kap. 4.3.4) byla provedena vazebná studie s vybranými biotinem značenými lektiny (kap. 4.3.4). Intenzita vazby lektinů na glykoproteiny byla hodnocena denzitometricky a vztažena k celkové nanášce proteinů ve vzorku.

Lektin AAL se navázal bez výrazných rozdílů na povrchový glykoprotein ejakulovaných a kapacitovaných spermii s molekulovou hmotností 13 kDa (obr. 22, pAAL). Zatímco výrazná intenzita vazby lektinu v extraktu ejakulovaných spermii byla viditelná u glykoproteinů s molekulovou hmotností 171 kDa a 16 kDa. Slabší vazba byla zaznamenána u několika glykoproteinů mezi 20 a 75 kDa.

Zatímco lektin WGA (obr. 22, pWGA) se navázal bez výrazných rozdílů pouze na jeden povrchový glykoprotein ejakulovaných a kapacitovaných spermii s molekulovou hmotností 129 kDa. U ejakulovaných spermii se navázal lektin s větší intenzitou u glykoproteinů s molekulovou hmotností 107 kDa, 51 kDa, 41 kDa, 29 kDa, 22 kDa a 17 kDa. U kapacitovaných spermii byla vazba na tyto glykoproteiny výrazně slabší nebo úplně vymizela (107 kDa).

Lektin SBA (obr. 22, pSBA) se navázal u ejakulovaných spermii na povrchové glykoproteiny s molekulovou hmotností 104 kDa a 15 kDa. Ve vzorku povrchových proteinů kapacitovaných spermii nebyla viditelná žádná vazba tohoto lektinu na glykoproteiny.



Obr. č. 22 Detekce pomocí povrchových lektinů pAAL, pWGA, pSBA, E: ejakulované spermie, K: kapacitované spermie

6 Diskuze

Během kapacitace dochází ke změnám na povrchu spermií, které vedou k získání fertilizační schopnosti spermií. Změny na úrovni sacharidů na povrchu spermií lze detekovat pomocí lektinů, které se specificky vážou na určité sacharidové struktury. Změna intenzity nebo místa vazby určitého lektinu na spermii po kapacitaci může odhalit její případný kapacitační stav.

V naší studii jsme využili lektiny UEA, LTG, PSA a AAL, které jsou schopny rozpoznávat fukosu v různých spojeních v sacharidových řetězcích glykoproteinů, pro detekci změn ve spermiích před a po kapacitaci. Na ejakulovaných spermiích připravených vlhkou fixací byly fukosylové struktury zaznamenány především v akrosomální části hlavičky spermie. Vazba lektinu UEA byla omezena na apikální část hlavičky fixované ejakulované spermie a střední část bičíku, na spermii po kapacitaci se vazba viditelně nezměnila. U ejakulovaných spermií v suspenzi oproti spermiím připraveným vlhkou fixací se lektin UEA navázal po celé délce bičíku a po celé hlavičce kromě ekvatoriálního segmentu. Znamená to tedy, že u fixovaných spermií jsou fukosylované struktury soustředěny také uvnitř buňky, zřejmě v cytoplazmě, protože u fixovaných spermií byla fluorescence v apikální části hlavičky velmi intenzivní. U spermií v suspenzi došlo také ke změně vazby lektinu po kapacitaci, kdy zcela zmizely sacharidové struktury rozpoznávané UEA z oblasti akrosomu a hlavní části bičíku, ale zůstaly v postakrosomální části hlavičky spermie, přičemž akrosomy zůstaly neporušeny. Pouze ve středním oddíle bičíku nedošlo ke změně (tab. 5). Desantis et al. (2010) upozorňuje na změnu sacharidů na ejakulované spermii v závislosti na reprodukčním období, a to že lektin UEA se u ejakulovaných spermií hřebce během reprodukce neváže na žádnou část spermie a mimo období reprodukce se váže v oblasti akrosomu a bičíku, slabě pak v postakrosomální oblasti. Accogli et al. (2017) došel k podobnému závěru u býků, kdy se v době odběrů UEA výrazněji váže na spermie v době reprodukční aktivity než v období klidu. Vazba lektinu UEA byla již dříve zkoumána i na kančích spermiích, kdy bylo nalezeno snížení míry vazby na kapacitované spermie v suspenzi oproti ejakulovaným (Jimenez et al. 2003).

Pomocí LTG byly detekovány pouze sacharidové struktury obsahující fukosu vázanou 1,3 na N-acetylglukosamin ve spermiích připravených vlhkou fixací, u spermií připravených v suspenzi došlo k poškození akrosomů. Před a po kapacitaci nebyl zaznamenán žádný rozdíl, v obou případech došlo k navázání v oblasti akrosomu hlavičky (tab. 5). Xin et al (2014) využil pro detekci na lidských ejakulovaných spermiích také tento lektin, ale jeho vazba byla velmi slabá oproti ostatním testovaným lektinům MAA, RCA, SNA, PSA, Con A, SBA a AAL, z nichž některé rozpoznávají také fukosu podobně jako LTG.

Pomocí AAL byly detekovány fukosylované struktury pouze u spermií připravených vlhkou fixací, u spermií v suspenzi došlo k poškození akrosomů. Po kapacitaci byla zaznamenána ztráta

sacharidových struktur v oblasti akrosomu, tak že došlo k navázání lektinu pouze v apikální části akrosomu (tab. 5).

Při použití lektinu PSA u ejakulovaných spermií v suspenzi a fixovaných vlhkou fixací jsme nenalezli změnu ve vazbě na sacharidové struktury spermie. V obou případech byl zaznamenán vzor v oblasti akrosomu spermie a mitochondriálního oddílu bičíku. Stejně tak tomu bylo v případě kapacitovaných spermií v suspenzi a fixovaných vlhkou fixací, kde byl zaznamenán stejný vzor navázání po celé ploše hlavičky a v mitochondriálním oddílu bičíku. Díky tomu lze usuzovat, že sacharidové struktury, na které se váže lektin PSA, jsou přítomné pouze na povrchu spermie, neboť nebyla zaznamenána změna mezi vazbou lektinu na fixované spermie a spermie v suspenzi, kde lektiny rozpoznávají pouze struktury na povrchu spermie. Také se dá usuzovat, že během kapacitace dochází k objevení dalších sacharidových struktur pro vazbu PSA v postakrosomální oblasti spermie (tab. 5). Accogli et al. (2017) pomocí lektinu PSA detekovali sacharidové struktury u ejakulovaných spermií býka během období odběrů, kdy se míra vazby lektinu PSA projevovала silněji než mimo sezonu. Baker et al. (2004) detekoval navázání lektinu PSA u myši u kapacitovaných spermií v postakrosomální oblasti a apikální části hlavičky. Zatímco my jsme u kance detekovali navázání na celé hlavičce a v mitochondriálním oddílu bičíku, kde můžeme poukázat na výrazný mezidruhový rozdíl uskupení sacharidových struktur pro lektin PSA. Cross et al. (1986) poukazuje na vhodnost PSA pro detekci akrosomální reakce u lidských spermií, kde reaguje jen s částí akrosomu.

Rozdíly v lokalizaci podobných struktur, které rozpoznávají všechny zmíněné lektiny (UEA, RCA, AAL a PSA), tzn. převážně fukosu, naznačují rozdílné preferenční vazby v sacharidových řetězcích.

Pomocí lektinu RCA rozpoznávajících galaktosu v sacharidových řetězcích glykoproteinů jsme detekovaly struktury pouze u spermií připravených vlhkou fixací, protože u spermií připravených v suspenzi došlo opět k poškození akrosomů. U ejakulovaných spermií byla pomocí lektinu detekována galaktosa v oblasti akrosomu. Po kapacitaci byly sacharidové struktury zaznamenány v celé oblasti hlavičky. Během kapacitace tedy nedošlo ke ztrátám typických sacharidových struktur ale naopak k jejich odkrytí (tab 6). Umezu et al. (2017) zaznamenal stejné navázání lektinu RCA v akrosomální oblasti u ejakulovaných spermií býka jako jsme zaznamenaly u kance. Přítomnost sacharidových struktur pro lektin RCA byla popsána také u lidských ejakulovaných spermií (Xin et al. 2014). Desantis et al. (2010) pomocí RCA detekoval u hřebce na ejakulovaných spermií typické sacharidové struktury v oblasti akrosomální čapky pouze mimo reprodukční období.

Ve vazbě lektinu ConA, který preferenčně rozpoznává manosové struktury, nedošlo ke změně na spermiích po kapacitaci jak ve fixovaných buňkách, tak v suspenzi. Lektin se vázal opět do oblasti akrosomu kančích spermií a střední části bičíku (tab. 7). Naproti tomu Jimenez et al. (2003) zjistili

zvýšení míry vazby ConA lektinu na kančí spermie po kapacitaci. Accogli et al. (2017) zaznamenal výrazný rozdíl v intenzitě vazby tohoto lektinu na býčí spermie v období reprodukčního klidu, kdy se lektin ConA vázal velmi silně do oblasti akrosomu spermie.

U lektinu WGA, rozpoznávajícího N-acetylglukosamin, se zdařila vazba na spermie v suspenzi, kde po kapacitaci byly detekovány specifické struktury pro vazbu tohoto lektinu na povrchu akrosomu, přestože na ejakulovanou spermii se lektin nevázal (tab. 8). Naše zjištění je v rozporu s výsledky práce Jimenez et al. (2003), kdy byla popsána naopak snížená intenzita vazby lektinu WGA na spermie po kapacitaci. Zatímco nám se lektin navázal spíše v oblasti akrosomu, Flesch et al. (1998) detekoval navázání na kančí spermie na celou plochu hlavičky.

Lektin MAA, který rozpoznává především kyselinu sialovou, detekoval zmizení sacharidu v postakrosomální oblasti hlavičky a hlavní části bičíku, až na apikální části akrosomu a střední část bičíku ve spermii po kapacitaci (tab 9). Xin et al. (2014) poukazuje na nevýrazné navázání lektinu MAA na sacharidové struktury u lidských spermii.

Lektiny SNA a SBA, které se preferenčně vážou k N-acetylgalaktosaminu, detekovaly struktury pouze u ejakulovaných spermii připravených vlhkou fixací. U spermii v suspenzi i fixovaných spermii zřejmě při manipulaci se vzorkem došlo k poškození akrosomů. Proto vazbu těchto lektinu nelze vyhodnotit.

V našich dalších experimentech jsme se zaměřili na vazbu lektinů na glykoproteiny izolované z celé spermatické buňky a cíleně jen z jejího povrchu. Zjistili jsme nejen sníženou míru vazby námi vybraných lektinů na celkové proteiny ze spermii po in vitro kapacitaci, ale také rozdíly ve velikostech detekovaných molekul, a to v případě vazby ConA lektinu. Odlišné molekulové hmotnosti glykoproteinů rozpoznávaných lektiny v extraktech spermii před a po in vitro kapacitaci mohou být způsobeny odstraněním určitých proteinů z povrchu buňky během kapacitace, a tím rozdílnému poměru proteinů a glykoproteinů ve vzorku. Lektin ConA rozpoznával celou škálu glykoproteinů o různých velikostech jak v extraktu ejakulovaných, tak kapacitovaných spermii. Podobně je tomu u detekce vazby PSA lektinu, který kromě fukosy rozpoznává podobně jako ConA také manosylové zbytky. Ačkoliv se vazba lektinu WGA na spermie zpracované pro imunofluorescenční mikroskopii jevila jako velmi slabá, v extraktech a především v proteinech izolovaných z povrchu spermii se tento lektin vázal na své preferenční cukry poměrně silně. To může být způsobeno maskováním těchto struktur na spermatické buňce, čímž dochází k jejich nedostupnosti pro daný lektin. V rozporu s našimi výsledky Flesch et al. (1998) poukazuje, že se lektin vázal na své preferenční cukry slabě.

Pro detekci sacharidových struktur povrchových glykoproteinů jsme prozatím otestovali pouze tři vybrané lektiny, a to AAL, SBA a WGA, přičemž každý z nich rozpoznává jiné cukerné zbytky.

Změna v lektin vázající aktivitě spermii u prasat byla podrobně popsána pouze u spermii během

jejich zrání v epididymu (Fabrega et al. 2012) a v dřívější studii zaměřené pouze na změnu vazby tří lektinů na ejakulované, kapacitované a akrozomě zreagované spermie (Jimenez et al. 2003).

Naše studie přináší předběžná data o možnosti využití vazby lektinů jako nástroje pro detekci změn na spermii po kapacitaci. Nicméně jsme si vědomi, že zejména experimenty v suspenzi spermií nebylo z důvodu poškození akrosomů, patrně v důsledku nešetrné manipulace se vzorkem, možné vyhodnotit. Pouze vazba čtyř lektinů (UEA, PSA, ConA a WGA) mohla být posouzena u všech typů vzorků spermií. Navíc je potřeba získat více dat z dalších opakování experimentů, abychom mohli s jistotou říci, že lze určité lektiny využít jako nástroje pro detekci kapacitačního stavu kančích spermií.

7 Závěr

Vazba určitých lektinů na typické sacharidové konce na spermie připravované v suspenzi a vlhkou fixací se lišila, přičemž u spermií připravených vlhkou fixací se lektiny vážou na sacharidové struktury také ve spermiu a u spermií v suspenzi pouze na jejich povrchu. Metodou imunofluorescence jsme určili, na jakou část spermie obsahující určité sacharidové struktury se vážou vybrané lektiny. Výskyt sacharidových struktur byl nejčastěji detekován v akrosomální části hlavičky spermií a ve středním oddíle bičíku.

Byl zjištěn nejvýznamnější rozdíl mezi fixovanými ejakulovanými a kapacitovanými spermii ve vazbě některých lektinů rozpoznávajících sacharidové řetězce obsahující fukosu (PSA a AAL) a galaktosu (RCA). Změna vazby lektinů na spermie v suspenzích mohla být vyhodnocena pouze u čtyř lektinů, a to UEA, PSA, ConA a WGA z důvodu poškození akrosomů u většiny spermií v suspenzi během inkubace s ostatními lektiny. Byla zaznamenána především změna vazby WGA lektinu, který preferuje vazbu na N-acetylglukosamin a UEA rozpoznávající fukosu vázanou na galaktosu. Vazba s lektiny PSA a UEA ukázala, že dochází k objevení sacharidových struktur obsahujících fukosy na povrchu spermií po jejich kapacitaci. Naproti tomu umístění manosylových struktur detekovaných pomocí lektinu ConA se ve spermiích po kapacitaci nemění.

Vazbu lektinů na glykoproteiny izolované z celé spermatické buňky a cíleně jen z jejího povrchu jsme testovali na separovaných proteinech přenesených na nitroceluloseovou membránu, kdy bylo testováno, u kterých glykoproteinů dochází ke změnám v sacharidových strukturách během kapacitace. Zjistili jsme nejen sníženou míru vazby námi vybraných lektinů na celkové proteiny spermií po kapacitaci, ale také rozdíly ve velikostech detekovaných molekul, a to především u vazby lektinu ConA.

Naše výsledky ukazují, že spermie během kapacitace mění své sacharidové struktury na svém povrchu. Námi stanovená hypotéza, že bude docházet ke změnám ve vazbě vybraných lektinů na glykoproteinové struktury kančích spermií po in vitro kapacitaci, byla potvrzena.

Nicméně práce prezentuje předběžné výsledky testování detekce vazby lektinů na sacharidové struktury spermií a je třeba lépe vybrat vhodné lektiny, které budou jasně detekovat kapacitační stav kančích spermií.

8 Literatura

- Accogli G, Aiudi G, Cox SN, Desantis S, Lacalandra GM. 2017. Differential surface glycoprofile of buffalo bull spermatozoa during mating and non-mating periods. *Animal* 11:10: 1807–1815.
- Arya M, Vanha-perttula T. 1985. Lectin-binding Pattern of Bull Testis and Epididymis. *Journal of Andrology*. 6: 230-242.
- Baker SS, Thomas M, Thaler CD. 2004. Sperm Membrane Dynamics Assessed by Changes in Lectin Fluorescence Before and After Capacitation. *Journal of Andrology* 25: 744–751
- Becer CR, Yilmaz G. 2015. Glyconanoparticles and their interactions with lectins. *Polymer Chemistry* 6: 5503–5514.
- Carrasco LC, Romar R, Avile's M, Gadea J, Coy P. 2008. Determination of glycosidase activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle. *Reproduction* 136: 833–842.
- Coy P, Garcí'a-Va'zquez FA, Visconti PE, Avile's M. 2012. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction* 144: 649–660
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. 1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research* 15:213-226.
- Dan X, Liu W, Ng TB. 2016. Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. *Wiley Periodicals* 36: 221–247.
- Ded L, Dostalova P, Dorosh A, Dvorakova-Hortova K, Peknicova J. 2010. Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8: 87.
- Desantis S, Ventriglia G, Zizza S, Nicassio M, Valentini L, Di Summa A, Lacalandra GM. 2010. Lectin-binding sites on ejaculated stallion sperm during breeding and non-breeding periods. *Theriogenology* 73: 1146–1153.
- Durairajanayagam D, Rengan A, Sharma RK, Agarwal A. 2015. Sperm Biology from Production to Ejaculation. Pages 29-42 in Schattman GL, Esteves SC, Agarwal A, editors. *Unexplained Infertility: Pathophysiology, Evaluation and Treatment*. Springer. New York.
- Ekhlasi-Hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsoleva M, Petrunkina A, To'pfer-Petersen E. 2005. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biology of Reproduction* 73: 536–545
- Fa'brega A, Puigmule' M, Dacheux JL, Bonet S, Pinart E. 2012. Glycocalyx characterisation and glycoprotein expression of *Sus domesticus* epididymal sperm surface samples. *Reproduction, Fertility and Development*: 24, 619–630
- Fawcett DW, Anderson WA, Phillips DM. 1971. Morphogenetic Factors Influencing the Shape of the Sperm Head. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 26: 220-251.

- Flesch FM, Voorhout WF, Colenbrander B, van Golde LMG, Gadella BM. 1998. Use of Lectins to Characterize Plasma Membrane Preparations from Boar Spermatozoa: A Novel Technique for Monitoring Membrane Purity and Quantity. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 59: 1530–1539.
- Franca LR, Hess RA, 2008. *Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium*. Springer. New York.
- Gómez-Torres J, Avilés M, Girela JL, Murcia V, Fernández-Colom PJ, Romeu A, De Juan J. 2012. Characterization of the lectin binding pattern in human spermatozoa after swim-up selection. *Histol Histopathol* 27: 1621-1628.
- Green CE, Bredl J, Holt WV, Watson PF, Fazeli A. 2001. Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro. *Reproduction* 122: 305–315
- Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- Chan JZ, Krause W, Bohring C. 2002. Computer-assisted analysis of sperm morphology with the aid of lectin staining. *Andrologia* 34, 379–383
- Kaefler C, Komninou ER, Campos VF, de Leon PM, Arruda FVS, Nascimento KS, Teixeira EH, Stefanello FM, Barschak AG, Deschamps JC, Seixas FK, Cavada BS, Collares T. 2013. Binding pattern and toxicological effects of lectins from genus *Canavalia* on bovine sperm. *Reproductive Toxicology* 38: 72– 80.
- Kekäläinen J, Larma I, Linden M, Evans JP. 2015. Lectin staining and flow cytometry reveals female-induced sperm acrosome reaction and surface *carbohydrate reorganization* *Scientific Reports* 5: 1-11
- Knobil E. 2006. *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (Vol. 2). Gulf Professional Publishing.
- Koehler JK. 1981. Lectins as Probes of the Spermatozoon Surface. *Archives of Andrology* 6:3: 197-217.
- Lindemann CH B, Lesich K A. 2016. Functional Anatomy of the Mammalian Sperm Flagellum. *Cytoskeleton* 73:652–669.
- Liu M. 2015. Capacitation-Associated Glycocomponents of Mammalian Sperm. *Reproductive Sciences* 1: 1-23
- Loris R. 2002. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1572: 198 – 208.
- Magargee SF, Kunze E, Hammerstedt RH. 1988. Changes in Lectin-Binding Features of Ram Sperm Surfaces Associated with Epididymal Maturation and Ejaculation. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 38: 667-685
- Morris, L., Tiplady, C., Allen, W.R. 2002. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology*. 58. 643-646.
- Mortimer D, Curtis EF, Miller RG. 1987. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *Journals Reproduction & Fertility* 81: 127-135.

- O'Hara L, Smith LB. 2015. Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. *Best Practice & Research Clinical. Endocrinology & Metabolism* 29: 595 – 605
- Rahman MS, Lee JS, Kwon WS, Pang MG. 2013. Sperm Proteomics: Road to Male Fertility and Contraception. *International Journal of Endocrinology* 11: 1-12
- Rodriguez-Martinez H. 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology* 68: 138–146
- Serrano H, Diaz-Esparza L, García-Suárez D. 2001. Pig sperm membrane integrity evaluated by lectin labeling. *Archives of andrology* 47:59–65
- Tulsiani RP, da Abou-Haila A. 2004. Is sperm capacitation analogous to early phases of Ca²⁺-triggered membrane fusion in somatic cells and viruses? *BioEssays* 26: 281–290
- Tulsiani DRP. 2006. Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 250: 58–65.
- Tulsiani DR, Abou-Haila A. 2012. Biological Processes that Prepare Mammalian Spermatozoa to Interact with an Egg and Fertilize It. *Scientific (Cairo)* 12:1-12
- Umezu K, HARA K, HIRADATE Y, NUMABE T, TANEMURA K. 2017. Effects on glycocalyx structures of frozen-thawed bovine sperm induced by flow cytometry and artificial capacitation. *Journal of Reproduction and Development* 63: 473–480.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. 2002. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of Reproductive Immunology* 53: 133–150
- Xin AJ, Cheng L, Diao H, Wang P, Gu YH, Wu B, Zhou YChSM, Guo SJ, Shi HJ, Tao SC. 2014. Comprehensive profiling of accessible surface glycans of mammalian sperm using a lectin microarray. *Clinical Proteomics* 11: 1-10
- Yilmaz G, Becer CR. 2015. Glyconanoparticles and their interactions with lectins. *Polymer Chemistry* 6: 5503–5514.