

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Degradace beta-mikroseminoproteinu (MSP) na povrchu  
kančích spermií během in vitro kapacitace**

**Diplomová práce**

**Bc. Veronika Martínková  
Reprodukční biotechnologie**

**Školitel: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.  
Konzultant: prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D.**

© 2019 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Degradace beta-mikroseminoproteinů (MSP) na povrchu kančích spermií během in vitro kapacitace" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10.4.2019 \_\_\_\_\_

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala paní RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. a paní prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za ochotu, vstřícnost, odborné vedení a pomoc s realizací práce. Rovněž bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za trpělivost a oporu.

# Degradace beta-mikroseminoproteinů (MSP) na povrchu kančích spermií během *in vitro* kapacitace

## Souhrn

Pokud má být spermie schopna oplození vajíčka, musí projít zásadním procesem – kapacitací. Během ní dochází ke změnám cytoplazmatické membrány spermie, zvyšuje se tyrosinová fosforylace v proteinech, stoupá pH a dochází k nárůstu motility spermie.

Cílem této práce bylo detekovat a lokalizovat beta-mikroseminoprotein ( $\beta$ -MSP) v kančích spermiích a zjistit, zda se jeho zastoupení mění během kapacitace spermií v médiu s inhibitory ubiquitin-proteazomového systému a zda je tudíž tento systém zapojen do jeho degradace během kapacitace.

Při experimentech bylo použito pět různých typů vzorků kančích spermií. Prvním typem byly spermie ejakulované, druhým spermie kapacitované *in vitro* v nemodifikovaném médiu, třetím spermie kapacitované s inhibítorem proteazomu (MG-132), čtvrtým spermie kapacitované s inhibítorem ubiquitin aktivujícího enzymu (PYR-41) a pátým spermie kapacitované s rozpouštědlem použitým pro inhibitory – DMSO. Vzorky byly zpracovány metodou nepřímé imunofluorescence a imunodetekce.

Výsledky experimentu ukazují výskyt  $\beta$ -MSP v akrozomální oblasti hlavičky spermie a spojovacím a hlavním oddílu bičíku. Tento vzor lokalizace byl zaznamenán ve všech vzorcích spermií, ovšem u spermií podrobených kapacitaci byla intenzita značení nižší a lokalizace v akrozomu byla omezena na jeho apikální část. Pouze u spermií kapacitovaných s inhibítorem proteasomu MG-132 byla zaznamenána vyšší intenzita fluorescence než u kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu. Imunodetekce ukázala významně nižší množství proteinu ve vzorcích spermií kapacitovaných (v modifikovaném i nemodifikovaném médiu) než ve spermiích ejakulovaných. Naproti tomu ve vzorku spermií kapacitovaných s inhibítorem MG-132 bylo množství proteinu signifikantně vyšší než v extraktu spermií kapacitovaných v médiu bez inhibitoru.

Naše výsledky naznačují možné zapojení ubiquitin-proteazomového systému do degradace  $\beta$ -MSP během kapacitace kančích spermií.

**Klíčová slova:** spermie, kapacitace, proteazom, imunodetekce

# Degradation of beta-microseminoprotein (MSP) on the boar sperm surface during *in vitro* capacitation

## Summary

In order to fertilize an oocyte, sperm must undergo a fundamental process – capacitation. During this process changes in cytoplasmic membrane of the sperm occur, the protein tyrosine phosphorylation intensity increases, the pH rises and the sperm motility increases.

The aim of this work was to detect and localize beta-microseminoprotein ( $\beta$ -MSP) in boar spermatozoa and determine its concentration during the sperm capacitation in medium containing inhibitors of ubiquitin-proteasome system, and whether this system is involved in its degradation during capacitation.

Five different samples of boar sperm were used in the experiments. The first type was ejaculated spermatozoa, the second was *in vitro* capacitated spermatozoa in unmodified medium, the third was capacitated sperm in medium containing proteasomal inhibitor (MG-132), the fourth was capacitated sperm in medium containing inhibitor of ubiquitin activating enzyme (PVR-41) and the fifth was capacitated sperm in medium containing solvent used for inhibitors – DMSO. Samples were processed by indirect immunofluorescent method and immunodetection.

The experimental results show the presence of  $\beta$ -MSP in acrosomal part of the sperm head and the connecting and principal piece of tail. This localization pattern was found in all sperm samples, but in capacitated spermatozoa the intensity of the labeling was lower, and the acrosome localization was limited to its apical part. Only the spermatozoa capacitated with the proteasomal inhibitor MG-132 showed a higher fluorescence intensity than the capacitated spermatozoa in the unmodified medium. Immunodetection showed a significantly lower amount of protein in capacitated sperm samples (both in modified and unmodified media) than in ejaculated spermatozoa. In contrast, in the sperm sample capacitated with MG-132 inhibitor, the amount of protein was significantly higher than in extract from spermatozoa capacitated in inhibitor-free medium.

Our results suggest possible involvement of the ubiquitin-proteasome system in the  $\beta$ -MSP degradation during sperm boar capacitation.

**Keywords:** spermatozoa, capacitation, proteasome, immunodetection

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíl práce .....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Stavba spermie .....</b>	<b>3</b>
3.1.1	Hlavička .....	3
3.1.2	Bičík.....	3
<b>3.2</b>	<b>Spermatogeneze.....</b>	<b>4</b>
3.2.1	Spermatocytogeneze .....	4
3.2.2	Spermiogeneze.....	5
3.2.3	Spermiace.....	6
<b>3.3</b>	<b>Semenná plazma.....</b>	<b>6</b>
3.3.1	Semenná plazma kanců.....	7
<b>3.4</b>	<b>Beta-mikroseminoprotein.....</b>	<b>7</b>
3.4.1	Beta-mikroseminoprotein u prasat.....	10
<b>3.5</b>	<b>Cesta spermií pohlavním traktem samice.....</b>	<b>11</b>
3.5.1	Rezervoár spermií .....	11
<b>3.6</b>	<b>Kapacitace.....</b>	<b>12</b>
3.6.1	Základní poznatky o procesu kapacitace .....	12
3.6.2	Vliv samičího reprodukčního traktu .....	14
<b>3.7</b>	<b>Ubiquitin-proteazomový systém .....</b>	<b>15</b>
3.7.1	Ubiquitin .....	16
3.7.2	Součásti 26S proteazomu.....	17
3.7.3	Ubiquitin-proteazomový systém a reprodukce .....	18
3.7.4	Lokalizace ubiquitin-proteazomového systému na spermii.....	19
3.7.5	Ubiquitin-proteazomový systém a kapacitace spermií .....	19
3.7.6	Ubiquitin-proteazomový systém a akrozomální reakce.....	20
<b>4</b>	<b>Materiál a metodika.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>Zpracování spermií .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2</b>	<b>Kapacitace spermií.....</b>	<b>21</b>
<b>4.3</b>	<b>Nepřímá imunofluorescence.....</b>	<b>22</b>
<b>4.4</b>	<b>SDS Elektroforéza .....</b>	<b>23</b>
<b>4.5</b>	<b>Western blot a imunodetekce.....</b>	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1</b>	<b>Lokalizace <math>\beta</math>-MSP v kančích spermích po inhibici UPS během kapacitace .....</b>	<b>26</b>
<b>5.2</b>	<b>Imunodetekce <math>\beta</math>-MSP v extraktech kančích spermí před a po in vitro kapacitaci .....</b>	<b>33</b>

<b>6</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury.....</b>	<b>40</b>

# 1 Úvod

Před oplozením prochází spermie mnoha procesy a změnami. Jednou z nejdůležitějších událostí při jejím průchodu samičím pohlavním traktem je kapacitace (de Lamirande et al. 1997). Jde o složitý proces, jehož výsledkem je spermie schopná podstoupit akrozomální reakci, vytvořit vazbu se zona pellucida a oplodnit oocyt.

Při kapacitaci podléhá spermie významným změnám ve složení cytoplazmatické membrány a dochází ke zvýšení její fluidity. Stoupá hodnota pH uvnitř buňky. Dochází k intenzivní fosforylaci tyrosinových zbytků v proteinech a motilita spermie se hyperaktivuje (Kerns et al. 2016). Do kapacitace jsou zapojeny i proteiny semenné plazmy, které se při ejakulaci vážou na povrch spermie a provází je všemi událostmi až do vazby spermie na oocyt (Jonáková & Tichá 2004).

Jedním z těchto proteinů, který podléhá při kapacitaci změnám spolu se spermií, je beta-mikrosemínoprotein neboli  $\beta$ -MSP. Pravděpodobně je během tohoto procesu degradován ubiquitin-proteazomovým systémem, protože byl nalezen jako protein asociovaný s proteazomem (Miles et al. 2013).

$\beta$ -MSP byl poprvé nalezen v semenné plazmě mužů (Akiyama et al. 1985). Později byl popsán i u jiných druhů (Wang et al. 2003). V případě kančích spermií byl lokalizován jak na hlavičce, tak na bičíku spermií a bylo potvrzeno, že po kapacitaci se výskyt tohoto proteinu na spermii mění (Maňásková-Postlerová et al. 2011).



## **2 Vědecká hypotéza a cíl práce**

Cíle práce vychází z hypotézy, že je ubiquitin-proteazomový systém zapojen do odstraňování beta-mikroseminoproteinů z kančích spermií během kapacity.

Cílem práce byla detekce a lokalizace beta-mikroseminoproteinů v kančích spermiích před a po kapacitaci při inhibici ubiquitin-proteazomového systému.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Stavba spermie

Zralá spermie je protáhlá buňka, na které rozeznáváme dvě základní části - hlavičku a bičík. Celá je pokrytá plazmatickou membránou zvanou plazmolemma (Hafez 2000; De Jonge & Barratt 2006).

#### 3.1.1 Hlavička

Nejvýraznějším komponentem hlavičky je jádro. To vyplňuje většinu prostoru, je zploštělé a obsahuje vysoce kondenzovaný chromatin složený z DNA (deoxyribonukleová kyselina) a protaminů. Celé je obklopeno perinukleární thékou, což je ve své podstatě pevná schránka, která je chrání. Hlavičku spermie jako takovou lze rozdělit do tří segmentů – akrozomální, ekvatoriální a postakrozomální.

Akrozomálnímu segmentu dominuje akrozom. Jde o váček odvozený z Golgiho komplexu obsahující hydrolytické enzymy jako je hyaluronidáza a akrosin. Navíc se zde nachází receptory, které hrají roli při interakci se zona pellucida oocytu. Pokrývá přední hemisféru hlavičky a vytváří tak na ní čepičku. U akrozomu rozeznáváme dvě membrány – vnitřní a vnější akrozomální membránu. Vnitřní membrána splývá s perinukleární thékou a nese receptory účastnící se sekundární vazby na zona pellucida. Vnější akrozomální membrána se při akrozomální exocytóze rozpadá a formuje se ve váčky.

Ekvatoriální segment tvoří úsek akrozomálních membrán a perinukleární théky. Receptory zde přítomné se zapojují do spojení spermie a oolemy po průniku spermie zona pellucida. V postakrozomální části hlavičky nachází komplex proteinů, které jsou důležité pro aktivaci oocytu (Hafez 2000; De Jonge & Barratt 2006).

#### 3.1.2 Bičík

Bičík spermie lze rozdělit do čtyř částí, které mají společný znak – axonemu založenou na 9 párech mikrotubulů uspořádaných kolem jednoho centrálního páru. Spojovací část se skládá z devíti segmentovaných provazců, které mezi sebou uzavírají proximální centriol.

Střední část bičíku spirálovitě obklopují mitochondrie. Tento útvar se nazývá mitochondriální pochva a obsahuje 75 až 100 mitochondrií, které slouží k produkci energie nutné pro pohyb bičíku. Hlouběji pak leží devět hladkých provazců a pod nimi axonema. Střední a hlavní část bičíku odděluje takzvaný Jesenův prstenec, což je část distálního centriolu. Hlavní oddíl bičíku si ponechává stejné vnitřní uspořádání – devět hladkých

provazců a axonema. Navíc je obalen fibrózní pochvou. Poslední úsek bičíku je koncový oddíl, který je tvořen pouze axonemou obalenou cytoplazmatickou membránou (Hafez 2000; De Jonge & Barratt 2006).

## **3.2 Spermatogeneze**

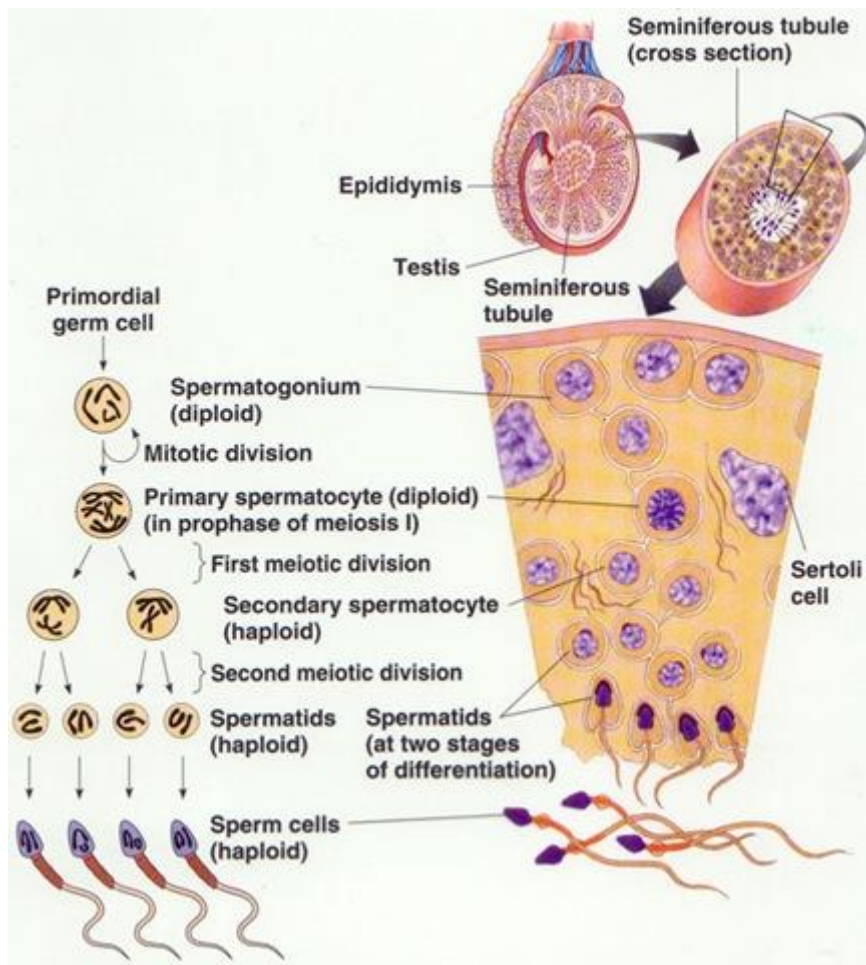
Spermatogeneze probíhá ve varlatech, konkrétně v semenotvorných kanálcích (obrázek 1, str. 4). Vyvíjející se gamety jsou zde přítomny v různých stádiích a jsou v těsném kontaktu se Sertoliho buňkami, které nasedají na bazální membránu. Pod bazální membránou leží vrstva svalových buněk, dále Leidigovy buňky a cévy. Nejbližší membráně jsou spermatogonie, s postupným vývojem se budoucí spermie přesouvají více do středu kanálku.

Předstupně vývoje spermie lze zaznamenat již v embryonálním stádiu. Z oblasti žloutkového vaku migrují primordiální zárodečné buňky do ještě nediferencovaných gonád. Několikrát se dělí a vznikají gonocyty. Dělením gonocytů vznikají spermatogonie A0.

Spermatogeneze zahrnuje několik na sebe navazujících procesů. Ty můžeme rozdělit do dvoufází – spermatocytogeneze a spermiogeneze. Spermatocytogeneze zahrnuje mitotické dělení diploidních spermatogonií za vzniku spermatocytů, které se dále dělí meioticky a diferencují se ve spermatidy. Následující vývoj je označován jako spermiogeneze a jedná se o přeměnu spermatidy na spermii. Postupné uvolňování spermií do lumen semenotvorných kanálků pak nazýváme spermiací (Hafez 2000; Nishimura & L'Hernault 2017).

### **3.2.1 Spermatocytogeneze**

Diploidní spermatogonie typu A0 se mitoticky množí pro zachování stálé populace této linie nebo se diferencují ve spermatogonie typu AI. Spermatogonie typu AI se diferencují v několik následujících linií, z nichž některé dávají vznik spermatogoniím typu B. Jejich mitotickým rozdělením vznikají primární spermatocyty, jejichž DNA je duplikovaná – jsou tedy tetraploidní. Ty podléhají meióze I, čímž se získají diploidní sekundární spermatocyty. Po dokončení meiózy II vznikají dvě haploidní spermatidy. To znamená, že jedna původní spermatogonie se diferencuje ve čtyři spermatidy a tedy i čtyři spermie (Hafez 2000; Nishimura & L'Hernault 2017).



**Obr.1 Spermatogeneze** (Zdroj:<https://www.majordifferences.com/2013/06/difference-between-spermatogenesis-and.html#.XHUE44hKg2x>)

### 3.2.2 Spermioogeneze

Přeměnu spermatidy na spermii můžeme rozdělit do následujících fází: Golgiho, čepičky, akrozomální a zrání.

V Golgiho fázi dochází k rozpadu Golgiho komplexu do granul, která nakonec splývají v jedno. To poté přilne k povrchu jádra. K opačnému pólu jádra se v této fázi zároveň přibližuje proximální centriol, budoucí základ bičíku.

Fáze čepičky je charakterizována rozprostřením akrozomálního granula až do dvou třetin přední části jádra, kde tak tvoří dvouvrstevný váček - čepičku. Z distálního centriolu se formují součásti axonemy a prodlužují se.

Během akrozomální fáze dochází ke kondenzaci chromatinu a remodelaci jádra z kulatého tvaru na zploštělý a protáhlý. Histony v jádře jsou nahrazeny tranzitními proteiny. Cytoplasma se začíná hromadit v distální části buňky a mikrotubuly v ní dočasně vytváří cylindrickou strukturu, tzv. manžetu. Poblíž proximální centrioly se kolem axonemy vytváří

prstencovitý útvar – Jesenův prsteneček, který se postupně posouvá distálním směrem. Okolo axonemy se také začínají shlukovat mitochondrie.

Ve fázi zrání jsou tranzitní proteiny v jádře nahrazeny protaminy a kondenzace chromatinu kulminuje. Dokončuje se vývoj bičíku, Jesenův prsteneček se dostává do pozice, kde odděluje jeho střední a hlavní oddíl. Mitochondrie již vytváří plnohodnotnou mitochondriální pochvu. Fáze zrání končí zformováním přebytečné cytoplazmy do reziduálního tělíska, které je však stále ještě částečně spojeno s gametou. V této podobě je spermie připravena k uvolnění do lumen semenotvorného kanálku (Hafez 2000; De Jonge & Barratt 2006).

### **3.2.3 Spermie**

Proces uvolňování již zformovaných spermií do dutiny semenotvorných kanálků se nazývá spermie. Dokončením oddělení reziduálního tělíska od spermie vzniká na proximální části bičíku cytoplasmatická kapka a zároveň je tak spermie uvolněna. Reziduální cytoplazma je fagocytována a recyklována Sertoliho buňkami (Hafez 2000).

## **3.3 Semenná plazma**

Semenná plazma tvoří tekutou složku spermatu (Hafez 2000). Její součástí jsou sekrety varlat, nadvarlat a přídatných pohlavních žláz (Jonáková & Tichá 2004). V případě kance se jedná o tyto žlázy: semenné váčky, prostata, bulbouretrální žlázy (Hafez 2000). V semenné plazmě se nacházejí látky organické i anorganické (Jonáková & Tichá 2004).

Ve velkém množství je zde obsažena kyselina citrónová, fruktóza nebo sorbitol (Hafez 2000). Dále je v semenné plazmě vysoká koncentrace cholesterolu. Ten zřejmě napomáhá zachování přítomnosti velkého množství cholesterolu v plazmatických membránách spermií a tím zabraňuje předčasné kapacitaci (de Lamirande et al 1997). Hydrogenuhlíčitanové anionty v semenné plazmě jsou důležité pro zahájení motility spermií (Visconti et al. 2011).

Významnou skupinou jsou proteiny. Ty se účastní procesů předcházejících oplození, které probíhají v pohlavních orgánech samců i samic. Řadí se mezi ně vazba na povrch spermie při ejakulaci, proces kapacitace, rozpoznání oocyty a vazba na oocyt. Proteiny ovšem nereagují pouze s látkami ve svém okolí, ale interagují i mezi sebou navzájem. Díky tomu tvoří pokryv na povrchu spermie agregáty v semenné plazmě. Proteinový pokryv spermie prochází různými změnami, jak gameta putuje k oocyty (Jonáková & Tichá 2004).

### 3.3.1 Semenná plazma kanců

Semenná plazma kanců obsahuje na několik set (536) popsaných proteinů (Feugang et al. 2018). Mezi nejvýznamnější zástupce patří proteinázové inhibitory, DQH povrchový protein spermie (pB1), lactoferrin, spermadheziny a  $\beta$ -mikroseminoprotein. Většina jich je přítomná v semenné plasmě ve formě agregátů, které se liší různou molekulární hmotností, vazebnými vlastnostmi a složením (Jonáková & Tichá 2004).

Ze skupiny proteinázových inhibitorů jsou nejlépe prozkoumané akrozinové inhibitory. Jejich úkolem je inaktivovat akrozin předčasně uvolněný z poškozených spermií. DQH je protein, který se váže na povrch akrozomu. Patří tedy mezi povrchové proteiny spermie. Spermadheziny jsou rodinou zahrnující dle odhadů 12 kDa až 16 kDa jednotlivých polypeptidů. Jsou hlavním komponentem semenné plasmy a schopné vázat široké spektrum ligandů – fosfolipidy, proteinázové inhibitory, polysacharidy. Také se periferně váží na povrch spermie (Jonáková & Tichá 2004).

### 3.4 Beta-mikroseminoprotein

Beta-mikroseminoprotein ( $\beta$ -MSP), jinak také nazývaný inhibitor motility spermií (Chao et al. 1996), prostatický sekreční protein, PSP94, imunoglobuliny vážící faktor či prostatický inhibinový peptid (Lazure et al. 2001) nebo MSMB, byl poprvé objeven v semenné plazmě mužů (Akiyama et al. 1985). Později byl nalezen i v jiných sekretech (Weiber et al. 1990) a byl popsán u jiných druhů - paviánů, makaků, myší, krysu, tamarinů, prasat (Wang et al. 2003), morčat (Franchi et al. 2008), pštrosů kuřat, krav, obojživelníků a ryb (Lazure et al. 2001). U většiny zvířat se nalézá pouze jedna varianta z celé rodiny  $\beta$ -MSP genů (Aoki et al. 2008).

Humánní varianta proteinu se skládá z 94 aminokyselin (Franchi et al. 2008). S kančím  $\beta$ -MSP vykazuje asi 50% homologii (Wang et al. 2003). Vyskytuje se na hlavičce spermie – v největší míře v oblasti akrozomu, méně pak v ekvatoriální oblasti či krčku. Ve vysoké koncentraci je zastoupen v sekretu prostaty (Franchi et al. 2008). Dále je přítomen i v sekretech dýchacích cest, krvi a žaludečních šťávách. U žen byla jeho přítomnost potvrzena v cervikálním sekretu (Weiber et al. 1990), ve tkáni prsou a v nádorových buňkách endometria (Baijal-Gupta et al. 2000). Hladina  $\beta$ -MSP je u obou pohlaví srovnatelná (Aoki et al. 2008).

U opic byl  $\beta$ -MSP lokalizován ve spermii výhradně na bičíku (Tollner et al. 2004).  $\beta$ -MSP morčete je podobně jako u lidí vázán na akrozom spermie (Franchi et al. 2008).

Protein patřící do rodiny beta-mikroseminoproteinů, tzv. *Loligo*  $\beta$ -MSP, se vyskytuje u olihní. Oproti savčím variantám mám neobvyklou funkci – působí jako kontaktní feromon. Je syntetizován se v pohlavních exokrinních žlázách samic a zabudovává se na povrch vajíček. Samec po dotknutí se vajíček a tedy i *Loligo*  $\beta$ -MSP ihned přechází od klidného chování k agresivním soubojům s ostatními samci (Cummins et al. 2011).

V séru hadů byly objeveny malé sérové proteiny, jež byly po analýze zařazeny rovněž do rodiny beta-mikroseminoproteinů. Jedná se o látky chránící hada před účinky svého vlastního jedu. Extrémně rychlá evoluce  $\beta$ -MSP vedla v případě jedovatých hadů k urychlené tvorbě toxinů s různým účinkem (Aoki et al. 2008).

Regulace hladiny  $\beta$ -MSP zřejmě probíhá pomocí steroidních hormonů. Analýzy DNA primátů dokázaly přítomnost elementů reagujících na steroidní hormony v genech pro výše zmíněný protein. Dále z experimentů na krysím modelu vyplývá, že exprese mRNA (messenger ribonucleic acid) proteinu je regulována pomocí androgenů. Do procesu je nejspíše zapojen i progesteron a glukokortikoidy (Kwong et al. 2000).

$\beta$ -MSP je hydrofilní látkou (Lazure et al. 2001) a s membránou spermie je zřejmě spojen prostřednictvím integrálních proteinů. Sám by se v tomto případě mohl označit za protein periferní (Wang et al. 2005). Možností také je, že integrální proteiny slouží jako receptory  $\beta$ -MSP (Franchi et al. 2008).

Monomery beta-mikroseminoproteinů se mohou spojovat za vzniku homodimerů. Toto spojení je závislé na hodnotě pH. Lze předpokládat, že v semenné plazmě je  $\beta$ -MSP přítomné v podobě neaktivních dimerů, které v prostředí vagíny disociují a aktivují se.  $\beta$ -MSP se rovněž přirozeně váže se sekrečními proteiny bohatými na cystein – tzv. CRISPs (cysteine-rich secretory proteins) a vytváří s nimi heterodimery. Váží se k sobě dokonce i proteiny od různých druhů. Je možné, že některé funkce  $\beta$ -MSP jsou uskutečnitelné právě díky jeho vazbě s CRISPs. Ty se u savců účastní zrání spermií a splynutí gamet (Kumar et al. 2010).

Druhově specifické varianty proteinu si zachovaly několik společných znaků – všechny mají kompletně zachovaných 10 cysteinových zbytků (Lazure et al. 2001), a tudíž jsou bohaté na disulfidické můstky a nejsou glykosylované (Wang et al. 2003).

Ve všech jiných ohledech se varianty  $\beta$ -MSP různých druhů od sebe navzájem výrazně odlišují. Z toho lze vyvozovat, že protein podstoupil neobvyklý a rychlý vývoj (Wang et al. 2003). Navíc studie naznačují, že exony genu pro  $\beta$ -MSP se vyvíjejí dvakrát tak rychleji než jeho introny. Díky tomu může být  $\beta$ -MSP považován za účinný marker při výzkumu vývoje druhů (Lazure et al. 2001).

Různé varianty  $\beta$ -MSP ovšem existují i v rámci druhu. Příčinnou jsou duplikace genu a alternativní transkripce. U lidí byly například izolovány dvě různé formy  $\beta$ -MSP mRNA, jako výsledek alternativního sestřihu (Lazure et al. 2001).

Role  $\beta$ -MSP v organismu není stále ještě plně prozkoumána. Předpokládá se, že u lidí slouží jako imunoglobuliny vázící faktor (Kamada et al. 1998), marker gastrického nádorového onemocnění (Weiber et al. 1999), potlačuje růst nádorových buněk prostaty (Lazure et al. 2001), chrání buňky prostaty před patogeny (Stott-Miller et al. 2013) a v neposlední řadě se zřejmě účastní interakcí mezi spermií a zona pellucida a regulace hyperaktivity spermie (Franchi et al. 2008). Je to látka tlumící aktivitu sodno-draselné pumpy (Chao et al. 1996) a inhibující motilitu spermií u prasat (Jeng et al. 1993). Rovněž inhibuje spontánní akrozomální reakce u spermií morčete (Franchi et al. 2008).

U lidí je polymorfismus genu pro  $\beta$ -MSP v jednom nukleotidu rizikovým faktorem pro vznik rakoviny prostaty. Nebezpečná alela způsobuje nízkou hladinu  $\beta$ -MSP, což je společným znakem mužů, kteří tímto onemocněním trpí. Jeho nízká koncentrace byla zaznamenána v moči, séru a tkáni prostaty. V maligní tkáni prostaty je přitom hladina proteinu nižší než v benigní tkáni a ještě nižší hladinu mají pacienti s agresivní formou choroby. Není zcela objasněné, z jakého důvodu hladina  $\beta$ -MSP při rozvoji onemocněním rakovinou prostaty poklesne. Nicméně studie naznačují, že hraje roli v regulaci buněčného růstu. Inhibuje proliferaci buněk nádorů ve tkáni prostaty prostřednictvím apoptózy (Haiman et al. 2013), nejspíše vazbou na receptory na povrchu buněk (Marečková et al. 2015). U lidí s nízkou hladinou  $\beta$ -MSP v krvi, měřenou 5 let před diagnózou, je statisticky vyšší pravděpodobnost následné diagnózy onemocnění (Haiman et al. 2013).

U žen je  $\beta$ -MSP potencionálním kandidátem na časný marker rakoviny vaječnicků. Jeho exprese je zřetelně zvýšená zvláště v raných stádiích nemoci. Je také nejvýznamnějším regulátorem exprese prostatinu – dalšího proteinu se zvýšenou expresí v raném stádiu rakoviny vaječnicků, a tedy dalším potencionálním markerem (Ma et al. 2014).

$\beta$ -Mikroseminoprotein je zřejmě identický s jednou hlavní z celkem tří izoform imunoglobuliny vázícího faktoru, přítomného v semenné plazmě mužů. Potlačuje množení lymfocytů a může tak hrát roli při ochraně spermií skrze potlačení tvorby protilátek proti těmto gametám v samčím i samičím pohlavním traktu. V přirozeném stavu je v semenné plazmě obsažen v neaktivní formě (Kamada et al. 1998).

$\beta$ -MSP by mohl v budoucnu sloužit jako biomarker kvality ejakulátu. U subfertilních mužů byla zjištěna jeho prokazatelně vyšší koncentrace v semenné plazmě oproti mužům



fertilním. Příčinou může být menší množství  $\beta$ -MSP vázaného na povrch spermií (Franchi et al. 2008).

### 3.4.1 Beta-mikrosemínoprotein u prasat

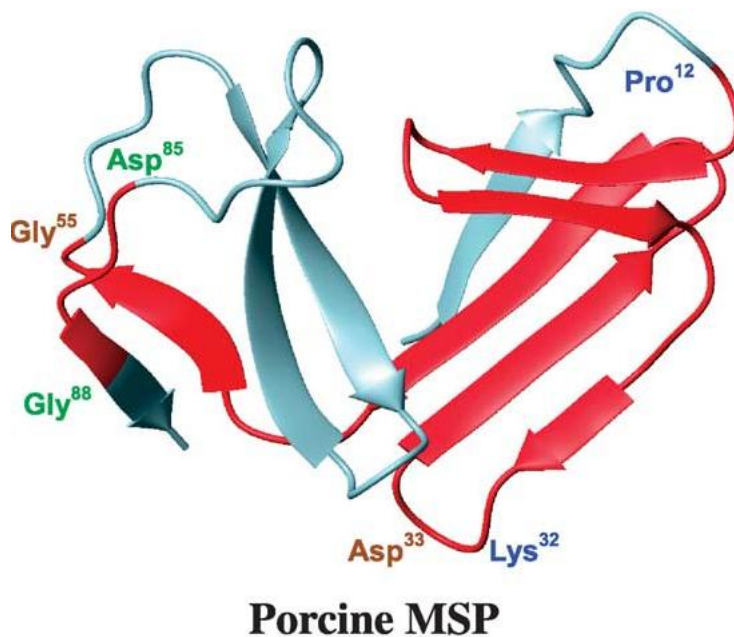
Prasečí beta-mikrosemínoprotein byl lokalizován především v sekretu a epitelu prostaty. Rovněž byla jeho přítomnost potvrzena v epiteliální tkáni varlat, dále v sekretu a epitelu hlavy a ocasu nadvarlat, Copwerových žlázách, uretrální žláze a semenných váčcích (Maňásková-Postlerová et al. 2011). U samice se podařilo identifikovat  $\beta$ -MSP v luteálních buňkách vaječníku (Tanaka et al. 1995).

Co se spermií týče, je přítomen na hlavičce i bičíku. Konkrétně v oblasti akrozomu a bičíku spermií z nadvarlete a ejakulovaných spermií. V případě kapacitovaných spermií byl detekován uvnitř akrozomu (Maňásková-Postlerová et al. 2011).

Mimo orgány spojené s reprodukcí byl  $\beta$ -MSP identifikován také ve tkáni mozku, ledvin a svalu. Několik oblastí výskytu tohoto proteinu naznačuje, že má v procesu reprodukce více úloh (Maňásková-Postlerová et al. 2011).

Tento 12 kDa protein (Maňásková-Postlerová et al. 2011) se u kance skládá z 91 aminokyselin a na N-konci molekuly je navázán pyroglutamát (Wang et al. 2003).  $\beta$ -MSP vytváří pět disulfidických můstků. Jeho sekundární struktura má podobu jednoho čtyřvláknového a dvou dvouvláknových antiparalelních  $\beta$ -skládaných listů (obrázek 2, str. 10). Pokud vzniká struktura  $\alpha$ -šroubovice, pak jen velmi málo.  $\beta$ -MSP je vysoce termostabilní, k úplné denaturaci nedochází ani při 95°C (Wang et al. 2003).

Působí jako inhibitor motility spermií, inhibuje aktivitu sodno-draselné pumpy (Wang et al. 2003). Podobně jako u lidí je shodný s imunoglobuliny vázícím faktorem v semenné plazmě a má tedy lokální vliv na imunitu. V případě prasat je však přítomný ve dvou izoformách (Kamada et al. 1998).



Obr. 2  $\beta$ -MSP kance (Wang et al. 2005)

### 3.5 Cesta spermií pohlavním traktem samice

Z několika miliard spermií deponovaných do samičí pohlavní soustavy jich uterotubálního spoje a isthmu dosáhne pouze několik tisíc. Spermie z téhož ejakulátu se od sebe navzájem liší. Rozdíl se nachází například v neporušenosti DNA, motilitě, morfologii a účinnosti signálních drah (García-Vazquéz et al. 2015).

Při cestě pohlavními orgány samice musí spermie překonat krček dělohy, jenž je pro ně značnou bariérou. Děloha samotná hraje roli v selekci spermií z hlediska jejich morfologie. Téměř 100 % spermií, které doputují až do uterotubálního spoje jsou morfologicky normální. Naopak v ejakulátu odcházejícím ze samice zpětným tokem, což je u prasnic běžný jev, je zvýšené procento morfologicky abnormálních spermií (García-Vazquéz et al. 2015).

Selekce spermií prostřednictvím pohlavního traktu samice může být založena i na molekulárních rozpoznávacích mechanismech. Vyloučeny tak mohou být přednostně spermie s poškozenou membránou či narušenou DNA (García-Vazquéz et al. 2015).

#### 3.5.1 Rezervoár spermií

Od chvíle, kdy jsou spermie uvolněné do samičího pohlavního traktu, vykazují vysokou úroveň progresivního pohybu (Suarez & Pacey 2006).

Během svého postupu neinteragují s jinými buňkami. To se však mění, jakmile dosáhnou isthmu (Suarez & Pacey 2006). Zde se spermie váží na epitel na dně krypt, které vytváří zřasená sliznice vejcovodu. Právě tato oblast je pak označována jako rezervoár spermií (Mburu et al. 1996). Ukazuje se, že ho dosáhnou pouze nejvíce fertilní spermie z ejakulátu (Gualtieri & Talevi 2003).

Přichycení spermií k epitelu zajišťují proteiny semenné plazmy pokrývající hlavičku spermie a sacharidové zbytky na buňkách epitelu oviduktu (Kerns et al. 2016). Tyto faktory jsou druhově specifické (Jonáková & Tichá 2004).

Spermie v rezervoáru kapacitují (Kerns et al. 2016) a setrvávají v těsném spojení s epitelem až do doby, kdy obdrží signál vyvolaný ovulací (Aitken & Nixon 2013). Uvolňování kapacitovaných spermií probíhá postupně, což pomáhá zabránit polyspermii. Signál spojený s ovulací pak umožňuje načasování setkání spermie s oocytem (Kerns et al. 2016).

Předpokládá se, že uvolnění spermie je docíleno odstraněním nebo lýzou jejích povrchových proteinů (Demott & Suarez 1992) a zvýšením motility až do stavu hyperaktivace (Pacey et al. 1995). Ze strany samice pak odštěpením sacharidových zbytků na povrchu epitelu, prostřednictvím enzymů přítomných v ovidukální tekutině v době ovulace (Carrasco et al. 2008)

## **3.6 Kapacitace**

### **3.6.1 Základní poznatky o procesu kapacitace**

Potenciál oplodnit oocyt získávají spermie již v nadvarleti. Ovšem skutečná schopnost oplození je potlačena až do prodělání kapacitace (Austin 1952), kterou spermie podstupují na cestě samičím reprodukčním traktem (de Lamirande et al 1997). Zahájena je odstraněním a/nebo redistribucí faktorů, jež spermie získala při pobytu v semenné plazmě a končí v okamžiku, kdy spermie získá schopnost prodělat akrozomální reakci po kontaktu s ligandy zona pellucida (Austin 1952).

Kapacitace je proces zahrnující sled událostí, jako je odpoutání se spermie od stěny vejcovodu, remodelace akrozomálního povrchu a příprava membrán spermie pro splynutí s oocytem (Sutovsky 2011). Uvnitř spermie se zvyšuje pH, zvyšuje se fluidita její buněčné membrány, stoupá intenzita fosforylace tyrosinových zbytků v proteinech a v neposlední řadě se zvyšuje motilita spermie (Kerns et al. 2016).

Celý proces začíná odstraněním dekapacitačních faktorů (Jonáková et al. 1998), které mohou být definovány jako látky schopné zvrátit kapacitaci (Chernoff & Dukelow 1969). Mezi ně patří například inhibitory proteáz, cholesterol (Aitken & Nixon 2013) a konkrétně u kance také spermadheziny (Jonáková et al. 1998). Dekapacitační faktory jsou buď složkami semenné plazmy, nebo jsou lokalizované na vnější akrozomální membráně spermie – v tomto případě jsou původem z varlat (Kerns et al. 2016). Při kapacitaci jsou tyto látky z povrchu spermie odstraňovány většinou pasivní difuzí (Aitken & Nixon 2013)

Cholesterol má v tomto ohledu velký význam. Je přítomný na povrchu spermií – v cytoplazmatické membráně. Při cestě nadvarletem napomáhá k udržení ustáleného stavu membrány a zabraňuje předčasné kapacitaci. V počáteční fázi kapacitace dochází k jeho odstraňování z membrány pomocí akceptorových molekul jako je albumin, apolipoproteiny a vysokohustotní lipoproteiny obsažené v mimobuněčném prostoru (Aitken & Nixon 2013; Kerns et al. 2016).

Nicméně hlavní roli v odstraňování cholesterolu z povrchu spermie hraje oxidativní stres. Hydrogenuhličitan v buňce podněcuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS = Reactive Oxygen Species), které reagují s cholesterolem a oxidují ho. Vyšší hydrofilnost výsledných produktů pak umožňuje jejich přenos na albumin. Klíčovou úlohu ROS dokazuje fakt, že přidání antioxidantů (vitamín C, vitamín E) ke spermiím narušuje jejich kapacitaci (Aitken & Nixon 2013). Důsledkem odstranění cholesterolu je zvýšená pohyblivost fosfolipidové dvouvrstvy membrány neboli fluidita a její propustnost pro ionty. Je rovněž umožněno přesouvání mnoha antigenů přítomných na membráně (de Lamirande et al 1997).

Dochází k odchodu draslíkových iontů z buňky a následnému poklesu záporného náboje membrány vedoucímu k její hyperpolarizaci (de Lamirande et al 1997). Vápenaté ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a hydrogenuhličitan ( $\text{HCO}_3^-$ ) pronikají dovnitř buňky (Boatman & Robbins 1991). Vápenaté ionty se účastní mnoha signálních drah jako druzí poslové a regulace kapacitace je pouze jednou z jejich funkcí (Yeste et al. 2015). Hydrogenuhličitanové anionty snižují pH v buňce a stimulují rozpustnou adenyl cyklázu (Visconti et al. 2011).

Aktivitu rozpustné adenyl cyklázy (SACY = soluble adenyl cyclase) dále ovlivňují zástupci ROS a zástupci skupiny reaktivních forem dusíku (RNS = Reactive Nitrogen Species) vznikající při kapacitaci. Například peroxid vodíku a peroxyinitrid. Oba jsou schopni oxidovat cysteinový zbytek v molekule enzymu fosfatázy a tím ji inaktivovat. Zablokování aktivity fosfatáz je podmínkou pro zvýšení tyrosinové fosforylace proteinů. Za přímou aktivaci SACY je nejspíše zodpovědný superoxid. Peroxid vodíku pak aktivitu SACY nepřímo zvyšuje prostřednictvím zvyšování aktivity tyrozin kinázy (Aitken & Nixon 2013).

Rozpustná adenylyl cykláza působí zvýšení hladiny cyklického adenosinmonofosfátu (Boatman & Robbins 1991). Zvýšení hladiny cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) aktivuje protein kinázu A. Ta dále aktivuje protein tyrosin kinázy a inhibuje protein tyrosin fosfatázy. Výsledkem je urychlení tyrosinové fosforylace proteinů v hlavičce a bičíku spermie (Baker et al. 2006).

Společně s kapacitací probíhá i takzvaná hyperaktivace motility spermie, která je charakteristickým znakem celého kapacitačního procesu (Aitken & Nixon 2013). Jedná se o specifický způsob pohybu, jenž je velmi energický, neprogresivní a má vysokou amplitudu. Hyperaktivace je důležitá pro odtržení spermie od stěny vejcovodu, její postup podél tkáně a průnik spermie zona pellucida (de Lamirande et al 1997).

Pro zahájení hyperaktivace je klíčový cAMP a zvýšená úroveň tyrosinové fosforylace proteinů v bičíku spermie. cAMP je původcem pulzačního uvolňování vápníku z intracelulárních zásob lokalizovaných ve střední části bičíku. Právě tyto pulzy navodí hyperaktivní pohyb buňky (Aitken & Nixon 2013; Yeste et al. 2015).

Po kapacitaci mnohých proteinů ubývá. Například látky přítomné na akrozomu regulující vezikulární transport a splývání membrán (Kwon et al. 2014).

Podle studie provedené Kwon et al. (2014) existují také proteiny, jejichž množství se po kapacitaci zvyšuje. Mezi nimi jsou látky chránící buňku před oxidativním stresem, regulující produkci energie, látky řídící uvolňování akrozinu z akrozomu (Kwon et al. 2014).

Hyperaktivace i kapacitace jsou vratné procesy. Důkazem této reverzibility je skutečnost, že po kontaktu již kapacitovaných spermií se semennou plazmou, dochází ke snížení jejich oplozovací schopnosti. Takto ošetřené spermie je možné opět rekapacitovat pobytem v samičím reprodukčním traktu (de Lamirande et al 1997)

Ukazuje se, že významnou roli hraje při kapacitaci rovněž ubiquitin-proteazomový systém, který dokáže tento proces regulovat (Sutovsky 2011).

### **3.6.2 Vliv samičího reprodukčního traktu**

V *in vivo* podmínkách je významným regulátorem kapacitace reprodukční trakt samice. Jeho působení probíhá prostřednictvím receptorů na spermiích. Například v brzkých stadiích kapacitace prolaktin podporuje životaschopnost spermií a zároveň brzdí nástup apoptotických drah v buňce (Aitken & Nixon 2013).

V pozdějších fázích kapacitace pak působení progesteronu připravuje spermiích pro akrozomální reakci (Aitken & Nixon 2013). Mimo to sekrece progesteronu spojená s ovulací vyvolává přesun vápníku do buňky. Tento přesun je zprostředkován kanály pro  $\text{Ca}^{2+}$

lokalizované v membráně hlavního oddílu bičíku spermie, tzv. CatSper kanály (cation channels of sperm). U lidí jsou tyto kanály aktivovány působením kombinace progesteronu a zvýšením pH uvnitř spermie. Zvýšení pH ovidukální tekutiny během říje může být hlavním faktorem pro zvýšení pH spermie, aktivaci CatSper kanálů a spuštění hyperaktivace. Roli zde zřejmě hraje i  $\text{HCO}_3^-$ , jehož koncentrace je oproti ocasu nadvarlete v prostředí pohlavního traktu samice mnohonásobně vyšší a který do spermie proniká (Coy et al. 2012).

U lidí pomáhá cervikální hlen udržet a zvýšit jejich schopnost později penetrovat zona pellucida a reagovat na látky navozující akrozomální reakci. Dále zprostředkovává odstraňování vitamínu E z membrány spermií. Je pravděpodobné, že připravuje spermie pro kapacitaci (De Jonge 2005). Folikulární tekutina ovlivňuje frekvenci pohybu bičíku a hyperaktivaci spermie (Suarez 2008).

Po kopulaci pronikají do cervikálního hlenu leukocyty a produkují zde reaktivní formy kyslíku. Ty mají kladný vliv na normálně funkční spermie – připravují je pro kapacitaci, ale poškozují nezralé a abnormálně fungující spermie (De Jonge 2017).

Existují důkazy, že odstraňování cholesterolu z membrán spermií začíná již v cervikálním hlenu, pomocí jeho struktury a přítomných látek. Dalším činitelem je zde epitel dělohy, který produkuje enzym sterol sulfatázu. Ten je rovněž schopen cholesterol odstraňovat (De Jonge 2017).

Předčasné kapacitaci zřejmě brání cholesterol ve vejcovodu. Ten má stabilizační efekt na membrány spermií. Navíc bylo zjištěno, že poměr cholesterolu a fosfolipidů je ve prospěch cholesterolu nejvyšší v isthmu vejcovodu a nejnižší v nálevce vejcovodu během ovulace. Tomuto jevu odpovídá i vyšší koncentrace lipidů schopných narušit membrány spermií v nálevce vejcovodu, oproti jejich koncentraci v isthmu (de Lamirande et al 1997).

Dalším činitelem, ovlivňující kapacitaci ze strany samice je teplota. V období předcházejícímu ovulaci je teplota isthmu vejcovodu nižší než teplota nálevky. Během ovulace se pak teplota isthmu zvyšuje, až se tento rozdíl vyrovná. Zvýšení teploty v isthmu vejcovodu může též ovlivňovat fluiditu plazmatické membrány spermie (de Lamirande et al 1997; Coy et al. 2012).

### **3.7 Ubiquitin-proteazomový systém**

Ubiquitin-proteazomový systém (UPS) zajišťuje substrátově specifickou proteolýzu zhruba 75% všech eukaryotických proteinů (Kerns et al. 2016).

Standardní ubiquitin-proteazomový systém spojuje proteiny, které slouží jako substrát, s poly-ubiquitinovými řetězci. Tím je připravuje k degradaci 26S proteazomem (Kerns et al.

2016). Výsledkem degradace jsou peptidové řetězce do délky 25 aminokyselin, které následně podléhají dalšímu rozkladu (Sutovsky 2011).

UPS hraje důležitou roli v mechanismu kontroly kvality spermií v nadvarleti, kapacitaci, akrozomální exocytóze a penetraci spermií skrz zona pellucida (Kerns et al. 2016).

Mezi inhibitory proteazomu patří látka MG-132. Ta vratně zastavuje enzymatickou aktivitu proteazomu a mění proces kapacitace. PYR-41, inhibitor ubiquitin aktivujícího enzymu (E1), při kapacitaci narušuje remodelaci akrozomální membrány tak, že spermiie již není schopná oplození (Kerns et al. 2016).

### **3.7.1 Ubiquitin**

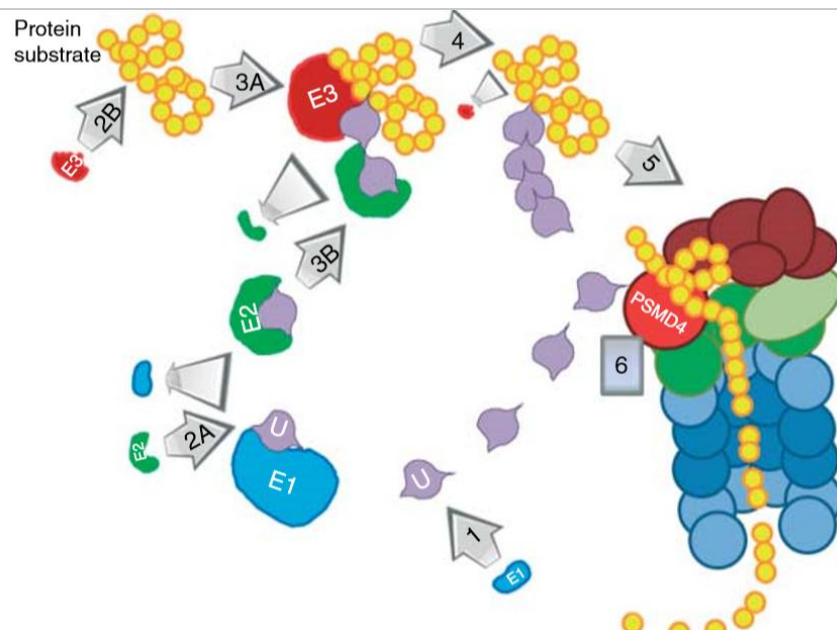
Ubiquitin je malý protein, který je kovalentně vázán na jiné proteiny. Přítomnost ubiquitinu je signál pro 26S proteazom, jenž protein vázaný na ubiquitin následně rozloží. Proces označování se nazývá ubiquitinace a pro některé z dílčích reakcí je nezbytný ATP (Yi et al. 2012).

Počáteční reakcí je navázání enzymu aktivujícího ubiquitin (E1) na monoubiquitin. Při tomto kroku se spotřebovává ATP. Výsledkem reakce je aktivovaný monoubiquitin.

E1 se následně z monoubiquitinu uvolní a je nahrazen enzymem (E2), který spojuje monoubiquitin s ubiquitinem již vázaným na substrát.

Souběžně s předcházejícími událostmi probíhá spojení substrátového proteinu s ubiquitin ligázou (E3). Těchto ligáz existuje mnoho typů a jsou zodpovědné za substrátově specifickou ubiquitinaci proteinů. Ubiquitin ligáza následně katalyzuje vznik kovalentní vazby mezi substrátovým proteinem a ubiquitinem (obrázek 3, str. 16).

Na substrát jsou přenášeny další ubiquitiny a vzniká tak poly-ubiquitinový řetězec. Takovýto řetězec o délce čtyř a více ubiquitinových jednotek je signálem pro proteazomovou částici označovanou jako 19S proteazomový regulační komplex. Po spojení ubiquitinovaného proteinu s proteazomem se polyubiquitinový řetězec uvolní a následně rozloží, aby mohl být znovu využit (Sutovsky 2011).



**Obr. 3 Ubiquitinace** (Zdroj: Sutovsky 2011). 1 – enzym aktivující ubiquitin (E1) aktivuje monoubiquitin (U); 2A – E1 je nahrazen enzymem spojujícím monoubiquitin s ubiquitinem již navázaným na substrátu (E3); 2B – enzym ubiquitin ligáza (E3) se váže na substrát; 3A – E3 katalyzuje vazbu monoubiquitinu na substrát; 3B – Další monoubiquitin je navázán na ubiquitin spojený se substrátem; 4 – vznik polyubiquitinového řetězce; 5 – rozpoznání a navázání polyubiquitinového řetězce na proteazom; 6 – substrát je deubiquitinován a přesunut do jaderné částice proteazomu, rozštěpen a uvolněn.

### 3.7.2 Součásti 26S proteazomu

26S proteazom se skládá z dutého jádra – 20S jaderné částice, které je na jednom nebo obou koncích překryto 19S regulační částicí.

20S jaderná částice se skládá ze čtyř soustředných kruhů, každý o sedmi podjednotkách. Tvarem tedy připomíná soudek. Uvnitř dutiny dochází k proteolýze.

19S regulační částice se skládá z báze a víka. Báze nasedá na 20S jádro a tvoří ji 14 podjednotek, které jsou nezávislé na ATP. Významná je podjednotka PSMD4 (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4), ta zajišťuje rozpoznání a navázání polyubiquitinového řetězce. Víko je složeno ze šesti podjednotek. Všechny potřebují ke své funkci ATP. Uvádí se, že mají za úkol rozvinutí substrátového proteinu a jeho přesun do 20S jaderné částice.

Existují i jiné, specializované typy proteazomů. Ty se odlišují stavbou, funkcí i výskytem ve tkáních (Sutovsky 2011).



### 3.7.3 Ubiquitin-proteazomový systém a reprodukce

Ubiquitin-proteazomový systém se účastní regulace procesu oplození (Sutovsky 2011). Především kapacitace (Kerns et al. 2016) a penetrace spermie zona pellucida (Sutovsky 2011). Je možné že proteazomy lokalizované na gametách se nějakým způsobem účastní všech jejich aktivit napříč všemi událostmi oplození (Zimmerman et Sutovsky 2009). Konkrétní role proteazomů v reprodukci není ještě plně objasněna a u různých druhů se liší (Morales et al. 2003).

Mezi proteiny interagující s proteazomem (PIPs) se řadí lactadherin MFGE8, spermadhesin AWN, glykoprotein semenné plazmy kanců-I (Miles et al. 2013) a spermadhesin AQN1 (Yi et al. 2010). Všechny se vyskytují na povrchu akrozomu spermie po ejakulaci nebo během její cesty samičím pohlavním traktem. Byla prokázána jejich účast na formování rezervoáru spermií, kapacitaci i vazby spermie na zona pellucida. Během procesu oplození mohou sloužit jako substrát pro proteazomy přítomné na akrozomu. Proteiny interagující s proteazomem obecně jsou buď jeho substrátem, nebo regulují jeho aktivitu (Miles et al. 2013).

$\beta$ -MSP pravděpodobně také patří mezi PIPs. Může ukotvovat proteazom na akrozomální membráně nebo se účastnit remodelace akrozomu při kapacitaci a akrozomální reakci zprostředkované proteazomem (Miles et al. 2013).

Funkce proteazomu při oplození se odráží v poruchách tohoto procesu. U neplodných mužů byla prokázána nižší proteazomová enzymatická aktivita spermií oproti mužům zdravým. Tento jev byl dále zaznamenán v subpopulacích morfologicky abnormálních spermií získaných ze vzorků od jinak zdravých dárců. Zároveň existuje kladný vztah mezi enzymatickou aktivitou proteazomů a motilitou spermií a jejich normální morfologií. V neposlední řadě byla v semenné plazmě neplodných mužů zjištěna přítomnost protilátek proti antigenům přítomným na plazmatické membráně spermií. Některé z těchto antigenů byly určeny jako proteazomové podjednotky.

Zvýšení aktivity proteazomů spermií, a tím i zvýšení jejich motility a fertility, lze *in vitro* docílit například přidáním extracelulárního adenosintrifosfátu. Za určitých podmínek může sloužit jako zdroj energie také anorganický pyrofosfát (PPi), ze kterého je na konci enzymatické dráhy získán adenosintrifosfát (ATP). Přidání pyrofosfátu do média navíc zvyšuje přežitelnost spermií při skladování a penetraci zona pellucida při oplození. PPi je také stálejší a než ATP.

### **3.7.4 Lokalizace ubiquitin-proteazomového systému na spermii**

U kopytníků, hlodavců a lidí jsou proteazomy umístěné extracelulárně na plazmatické membráně překrývající povrch akrozomu. Dále byla jejich přítomnost potvrzena na vnitřní i vnější membráně akrozomu, stejně tak jako v jeho matrix (Sutovsky 2011). Po prodělání akrozomální reakce byly proteazomy detekovány na membráně vzniklých vezikulů ( Yi et al. 2010). U zralých lidských spermii byly kromě akrozomu lokalizovány i v postakrozomální oblasti (Morales et al. 2003). Na bičíku byla jejich přítomnost potvrzena v jeho spojovací, střední (Zimmerman & Sutovsky 2009) a hlavní části (Sutovsky 2011). K zabudování proteazomů pravděpodobně dochází již ve stádiu spermatidy (Sutovsky 2011).

Tak jako jsou proteazomy přítomné na povrchu spermie, na zona pellucida se nachází substrát určený k degradaci proteazomy – již ubiquitinované receptory pro spermie (Sutovsky 2011). U prasete byly ubiquitinované proteiny na zona pellucida detekovány již v raných fázích folikulogeneze (Zimmerman & Sutovsky 2009).

### **3.7.5 Ubiquitin-proteazomový systém a kapacitace spermii**

Proteazomy hrají v procesu kapacitace významnou roli. Mnoho UPS proteinů je v průběhu kapacitace fosforylováno. Ve shodě s tím se zvyšuje i aktivita proteazomů. Mezi proteiny podstupující fosforylaci se řadí enzym aktivující ubiquitin (E1), mnohé části proteazomu, ubiquitin a protein obsahující valosin (Sutovsky 2011), který je zodpovědný za odnímání membránových proteinů a jejich prezentaci proteazomu (Kerns et al. 2016). K aktivaci proteazomů přispívá i změna pH v buňce, která při kapacitaci nastává (Zimmerman & Sutovsky 2009). Zvýšená funkce Proteazomu pak může přímo či nepřímo ovlivnit aktivitu protein kináz a to nejen v akrozomu, ale i v oblasti bičíku. Je možné, že UPS přítomný v hlavní části bičíku má na svědomí zvýšenou motilitu spermie (Sutovsky 2011).

Během kapacitace se odehrávají významné změny na plazmatické membráně spermie, na vnější akrozomální membráně a v akrozomální matrix. Proteazomy napomáhají těmto změnám odstraňováním proteinů ze zmiňovaných membrán. UPS tak může být zapojen do odpoutání spermie z rezervoáru spermii. Předpokládá se totiž, že stojí za ztrátou spermadhezinu AQN1 (Zimmerman & Sutovsky 2009), AWN, PSP a povrchového proteinu DQH (Zigo et al. 2019) z plazmatické membrány spermie a dovoluje tím odtržení spermie od epitelu vejcovodu (Zimmerman & Sutovsky 2009).

Spolu s postupným odstraňováním ubiquitinovaných proteinů UPS v přední části membrány hlavičky spermie a souběžně stoupá její afinita ke glykoproteinu ZP3 na zona pellucida (Kerns et al. 2016). Inhibitor E1 narušuje průběh remodelace membrány v oblasti

akrozomu a brání tak spermii nabýt schopnosti prodělat akrozomální reakci a penetrovat zona pellucida (Yi et al. 2012).

Role proteazomů může spočívat i v degradaci proteinů spojených s akrozomem, které zřejmě mají schopnost udržovat akrozomální enzymy inaktivní až do kapacitace nebo akrozomální reakce. Jejich odstraněním se pak tyto enzymy aktivují. Mezi zmiňované proteiny patří inhibitor akrozinu a jeden ze zástupců spermadhezinů (Sutovsky 2011). Oba jsou nejspíše ubiquitinovány ještě před kapacitací a degradovány jsou pak později během tohoto procesu (Yi et al. 2012). Mnohé proteiny jsou však ubiquitinovány až po započetí kapacitace. Při remodelaci akrozomu v průběhu kapacitace dochází k degradaci jak proteinů na jeho povrchu tak i uvnitř (Yi et al. 2012).

### **3.7.6 Ubiquitin-proteazomový systém a akrozomální reakce**

Akrozomální reakce (AR) zřejmě začíná již při kapacitaci. Obecný průběh je takový, že po navázání spermie na specifické receptory na zona pellucida dojde ke spojení vnější akrozomální membrány a plazmatické membrány spermie. Vznikají váčky (vezikulace), které spolu s akrozomální matrix tvoří tzv. acrosomal shroud (Sutovsky 2011).

Proteazomy se ukazují být nezbytné pro průběh AR u mnoha savčích druhů. Jejich inhibice má za následek neschopnost kapacitované spermie prodělat AR (Sutovsky 2011). Zřejmě jsou zapojeny do kaskády událostí vedoucí k influxu vápníku (Morales et al. 2003). Díky degradaci proteinů spojených s vnější akrozomální membránou proteazomy dochází při AR k vezikulaci (Zimmerman & Sutovsky 2009).

U některých druhů jsou extracelulárně situované proteazomy potřebné pro vazbu spermie na zona pellucida (Kerns et al. 2016). Proteazomy z povrchu akrozomu jsou zapojeny v blokaci polyspermie. Inhibice podjednotky, jež se podílí na deubiquitinaci (PSMD8), zvyšuje proteolýzu UPS. Tím se zvyšuje i procento oplození a výskyt polyspermie (Yi et al. 2010a). Konkrétně podjednotka PSMD4, rovněž situovaná na akrozomální povrchu, je nezbytná pro penetraci spermie zona pellucida. Avšak pro předcházející krok - vazbu spermie na zona pellucida – není nutná (Yi et al. 2010b). Proteazomy umístěné v matrix akrozomu umožňují degradaci proteinů na povrchu zona pellucida a tím také umožňují její penetraci spermii (Miles et al. 2013).

Proteazomy vnitřní membrány akrozomu, jež zůstávají zachované po AR, jsou proteolyticky aktivní během prostupu spermie ZP a dokonce i po jejím proniknutí do oocyty (Zimmerman & Sutovsky 2009). V zygote se pak zapojují do odstraňování mitochondrií a mitochondriální DNA pocházející ze spermii (Miles et al. 2013).

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Zpracování spermií

Pro experimenty byly použity inseminační dávky kanců plemene Landrace od dodavatele PROAGRO Nymburk a.s. Ředidlem použitým pro výrobu dávky bylo SUS.

Koncentrace spermií v inseminačních dávkách byla spočítána v Bürkrově komůrce pod světelným mikroskopem. Koncentrace spermií se v dávkách pohybovala mezi  $5-8 \times 10^7$  na mililitr. Z inseminační dávky bylo odebráno vždy 5 ml. Tento vzorek byl následně centrifugován (Benchmark LC-8 series) při  $300 \times g$  10 minut. Po centrifugaci byl odsát supernatant a vzorek byl doplněn do původního množství přidáním PBS (Phosphate buffered Saline tablet; složení: 0,01 M fosfátový pufr, 0,0027 M chlorid draselný, 0,137 M chlorid sodný, pH 7,4; Sigma-Aldrich). Centrifugace a promytí PBS bylo zopakováno dvakrát. Výsledkem byl vzorek ejakulovaných spermií vhodný pro další zpracování. Byly připraveny pelety spermií pro extrakci proteinů a suspenze pro přípravu mikroskopických preparátů.

### 4.2 Kapacitace spermií

Kapacitace ejakulovaných spermií byla provedena pomocí kapacitančního média o následujícím složení: 0,099 g glukóza; 0,0275 g pyruvátu sodného; 0,0147 g  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 1 g BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich); 0,0084 g  $\text{NaHCO}_3$  v 50 ml TL-Hepes (1000 ml destilovaná voda; 1,4 ml laktát sodný; 0,0220 g pyruvát sodný; 0,1018 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2386 g KCl; 6,6634 g NaCl; 2,383 g Hepes; 0,0408 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1 g PVA (polyvinylalkohol); 2,186 g sorbitol; 0,065 g penicilin; 0,025 g gentamycin).

Vzorek spermií byl rozdělen do čtyř dávek, každá obsahovala po 10 ml kapacitančního média a přibližně  $2,5 - 5 \times 10^7$  spermií na mililitr. Jedna z dávek byla ponechána beze změny, do druhé byl přidán inhibitor proteazomu MG-132 (EMD MiliporeCorp.) v DMSO (dimethyl sulfoxid), do třetí byl přidán inhibitor enzymu aktivujícího ubiquitin PYR-41 (Sigma-Aldrich) v DMSO a do čtvrté bylo přidáno 80  $\mu\text{l}$  rozpouštědla DMSO. Inhibitory byly přidány do jejich výsledné koncentrace 100  $\mu\text{M}$ .

Každá z dávek byla následně rozdělena do 20 mikroskopických vzorků, vždy po 0,5 ml. Všechny vzorky byly vloženy do termostatu. Zde byly ponechány 90 minut při  $38^\circ\text{C}$  a 5 %  $\text{CO}_2$ . Průběh kapacitace byl sledován na základě hyperaktivace motility pomocí CASA (Computer-assisted sperm analysis) a účinnosti akrozomální reakce (viz diplomová práce

Lenky Malinové „Ovlivnění funkčních parametrů kančích spermií během modifikované kapacity *in vitro*“).

Po vyjmutí z termostatu bylo každých 20 mikrozkušavek opět spojeno do původních 4 dávek. V této podobě pak byly vzorky dvakrát centrifugovány při 300 x g 10 minut a po odsátí supernatantu doplněny na původní objem (5 ml) přidáním PBS.

Tímto postupem byly připraveny kapacitované spermie a spermie kapacitované v médiu s inhibitory UPS pro sledování změn v detekci  $\beta$ -MSP proteinu. Vzorky pro extrakci proteinů byly opět v podobě peletek a pro přípravu mikroskopických preparátů v podobě suspenze.

### 4.3 Nepřímá imunofluorescence

Pro imunofluorescenci byly použity vzorky ejakulovaných, kapacitovaných spermií a spermií kapacitovaných s inhibitory připravené výše zmíněným postupem.

Suspenze spermií byla upravena na optimální koncentraci buněk pro přípravu preparátů.

20  $\mu$ l vzorku spermií bylo nanášeno do každého ze dvou připravených políček na podložní skličku, ohraničených pomocí hydrofobní fixy PAN Pen (Liquid Blocker Super PAN Pen, Agar Scientific). Jedno z políček na každém skličku bylo určeno pro negativní kontrolu. Na podložní sklička se suspenzí spermií určená pro zpracování vlhkou fixací bylo dále nanášeno 50  $\mu$ l vymraženého roztoku acetonu a metanolu v poměru 1:1. Proběhla inkubace při pokojové teplotě po dobu 5 minut a preparáty byly následně třikrát opláchnuty pomocí PBS. Po tomto kroku byla sklička ponechána volně oschnout. Takto zpracovaná byla skladována v lednici. Před opětovným použitím byla promyta pomocí PBS. Podložní sklička se suspenzí spermií určená pro acetonovou fixaci byla ponechána volně zaschnout na vzduchu a poté byla vložena na 10 minut do kyvety s vymraženým acetonem. Po vyjmutí z kyvety byla sklička třikrát opláchnuta pomocí PBS.

Na sklička připravená pomocí postupu pro vlhkou i acetonovou fixaci bylo nanášeno 100  $\mu$ l primární králičí polyklonální protilátky proti prasečímu  $\beta$ -MSP (Laboratoř biochemie reprodukce Ústavu molekulární genetiky AV ČR, Praha) ředěné v PBS v poměru 1:50. Políčka určená pro negativní kontrolu byla ponechána bez primární protilátky. Takto byla sklička inkubována přes noc v lednici ve vlhké komůrce.

Před dalším krokem byla sklička promyta pomocí PBS. Dále bylo na každý preparát (i na políčka určená pro negativní kontrolu) nanášeno 100  $\mu$ l sekundární protilátky proti králičím imunoglobulinům konjugované s Alexa 488 (Alexa Fluor<sup>TM</sup> 488 goat anti-rabbit IgG (H+L), Invitrogen) ředěné v PBS v poměru 1:300. Takto byla sklička inkubována 60 minut ve vlhké komůrce ve tmě.

Po inkubaci byla sklíčka třikrát promyta pomocí PBS. Následně bylo do každého políčka nanášeno 100  $\mu$ l PNA lektinu konjugovaného s rhodaminem (Rhodamine Peanut Agglutinin, Vector Laboratories) ředěného v PBS v poměru 1:500. Preparáty byly inkubovány 30 minut ve tmě ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Po inkubaci byla sklíčka třikrát promyta pomocí PBS a třikrát pomocí destilované vody a ponechána volně oschnout.

Poté bylo do každého políčka nanášeno 10  $\mu$ l montovacího média s DAPI (Vecta-Shield DAPI, Vector Laboratories). V posledním kroku byla políčka překryta krycími sklíčky a zafixována pomocí laku. Takto připravené preparáty byly pozorovány pod konfokálním mikroskopem ZEISS a pod epifluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E600s dokumentačním systémem NIS.

#### **4.4 SDS Elektroforéza**

Pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (dodecylsírán sodný) byly použity vzorky ejakulovaných, kapacitovaných spermií a spermií kapacitovaných s inhibitory UPS. Všechny vzorky o počtu spermií přibližně  $5 \times 10^7$  byly zbaveny promývacího roztoku PBS centrifugací při 300 xg po deset minut a následně byl odstraněn supernatant. Do každého vzorku byl ke vzniklé peletce přidán 2x koncentrovaný vzorkový pufr pro SDS elektroforézu (4,2 ml destilovaná voda; 1,0 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 (Bio-Rad); 0,8 ml glycerol; 1,6 ml 2 % SDS; 0,4 ml 0,05 % bromfenolová modř). Vzorky byly inkubovány na ledu po dobu jedné hodiny a každých pět minut promíchány. Poté byly vzorky spermií 5 minut ponechány v termolázni při 100°C a následně centrifugovány v chlazené centrifuze 5 minut při 10 000 x g. Takto zpracované vzorky byly dále děleny pomocí SDS elektroforézy.

Při experimentu byla použita vertikální elektroforéza, systém Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad) a jedenkrát koncentrovaný elektrodový pufr připravený z původního pětkrát koncentrovaného roztoku o složení: 1 l destilovaná voda, 5 g SDS; 15 g Tris; 72 g glycin, pH 8,3.

Byl připraven roztok 15% akrylamidového separačního gelu (2,5 ml destilovaná voda; 5,0 ml 30% akrylamid/bis akrylamid (Bio-Rad); 100  $\mu$ l 10 % SDS; 2,25 ml 1,5 M Tris. HCl pH 8,8 (Bio-Rad); 3,8  $\mu$ l TEMED; 70  $\mu$ l 10% persíran amonný). Tento roztok byl nalit mezi skla uchycená ve stojácích, převrstven destilovanou vodou a ponechán 30 minut polymerovat.

Dalším krokem byla příprava 4% zaostřovacího gelu: 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  $\mu$ l 10 % persíran amonný, 4,5  $\mu$ l TEMED). Roztok gelu byl po slití

vrstvy destilované vody aplikován na separační gel již připravený mezi skly ve stojánku. Do zaostřovacího gelu byl vložen hřebínek pro tvorbu jamek a celá sestava byla takto ponechána deset minut pro dostatečnou polymeraci zaostřovacího gelu. Po uplynutí této doby byla skla vložena do aparatury pro elektroforézu, zalit elektrodovým pufrům a hřebínek byl vyjmut.

Do jamek byl nanesen proteinový molekulový standard (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad) v objemu 4  $\mu$ l a výše zmíněné proteinové extrakty spermií po 15  $\mu$ l. Elektroforéza probíhala asi 20 minut při konstantním elektrickém napětí 80 V, které bylo následně zvýšeno na 120 V po dobu asi 1 hodiny. Ukončena byla po úspěšné separaci nízkomolekulárních proteinů.

#### **4.5 Western blot a imunodetekce**

Pro metodu Western blot, elektropřenos separovaných proteinů po SDS elektroforéze na nitrocelulózovou membránu, byly nejprve připraveny filtrační papíry Whatman, nitrocelulózová membrána (Nitrocellulose membranes Hybond<sup>TM</sup>C) a houbičky. Všechny komponenty byly ponechány v transferovém pufru (800 ml destilovaná voda; 3,03 g Tris; 200 ml metanol; 14,4 g Glycin) asi 15 minut.

Gel se separovanými proteiny po SDS elektroforéze byl promyt v destilované vodě a následně přenesen na nitrocelulózovou membránu. Nitrocelulózová membrána i s gelem byla následně z obou stran překryta dvěma papíry Whatman a houbičkou. Tímto způsobem uspořádané komponenty byly vloženy do kazety určené pro Western blot. Kazety byly umístěny do aparatury tak, aby proteiny z gelu putovaly ke kladné elektrodě a vše bylo zalito transferovým pufrům. Elektropřenos probíhal 90 minut při konstantním elektrickém proudu 500 mA.

Po uplynutí této doby byla nitrocelulózová membrána vyjmuta, opláchnuta destilovanou vodou a obarvena barvivem Ponceau (PonceauS solution, Sigma-Aldrich) pro vizualizaci proteinů. Po 60 sekundách byla membrána opět odbarvena nejdříve destilovanou vodou a poté PBS.

Následně byla membrána inkubována v 5% roztoku sušeného mléka (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad) v PBS 1 hodinu při pokojové teplotě.

Dále byla membrána dvakrát v odstupu pěti minut na třepačce promyta PBS s 0,05% Tweenem 20 (PBS-T). Poté byla membrána inkubována v polyklonální králičí protilátce proti prasečímu  $\beta$ -MSP ředěné v PBS v poměru 1:500. Pro kontrolu nanesených proteinů byla

membrána inkubována s monoklonální protilátkou proti alfa-tubulinu DM1A (Sigma-Aldrich) ředěnou 1:5000. Inkubace probíhala přes noc v lednici.

Po inkubaci byla membrána na třepačce třikrát v odstavu 10 minut promyta PBS-T. Následně byla membrána pro detekci  $\beta$ -MSP inkubována se sekundární protilátkou proti králíčím imunoglobulinům konjugovanou s křenovou peroxidasou (goat anti-rabbit IgG (L+H), Horseradish Peroxidase-Linked; Bio-Rad) nebo pro detekci alfa-tubulinu se sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům (goat anti-mouse IgG (L+H), Horseradish Peroxidase-Linked; Bio-Rad) ředěnou v poměru 1:3000 s PBS. Inkubace probíhala na třepačce po dobu 60 minut.

Po inkubaci byla membrána čtyřikrát v odstavu pěti minut promyta PBS-T a poté dvakrát v odstavu pěti minut v PBS. Tímto byl celý proces zakončen a byla provedena vizualizace reakce proteinu s protilátkou. Pro vizualizaci byl použit chemiluminiscenční substrát (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate; Thermo SCIENTIFIC) a přístroj Azure c600 (Azure Biosystems; Biocev, Vestec).

Výsledky byly denzitometricky vyhodnoceny za pomoci programu Image Studio Lite Ver. 5.2. Následně byla provedena analýza dat – One Way ANOVA a t-test v programu GraphPad Prism ver.5.



## 5 Výsledky

Byla provedena kapacitace kančích spermií v modifikovaném a nemodifikovaném médiu (viz kap. 4.2 Kapacitace spermií). Modifikace média byla provedena přidáním inhibitorů UPS rozpuštěných v DMSO a samotného DMSO. Takto bylo získáno pět různých vzorků. Vzorek spermií ejakulovaných (viz kap. 4.1 Zpracování spermií), vzorek spermií kapacitovaných v nemodifikovaném médiu, vzorek spermií kapacitovaných s inhibitorem proteazomu MG-132, vzorek spermií kapacitovaných s inhibitorem enzymu aktivujícího ubiquitin PYR-41 a vzorek spermií kapacitovaných srozpouštědlem DMSO.

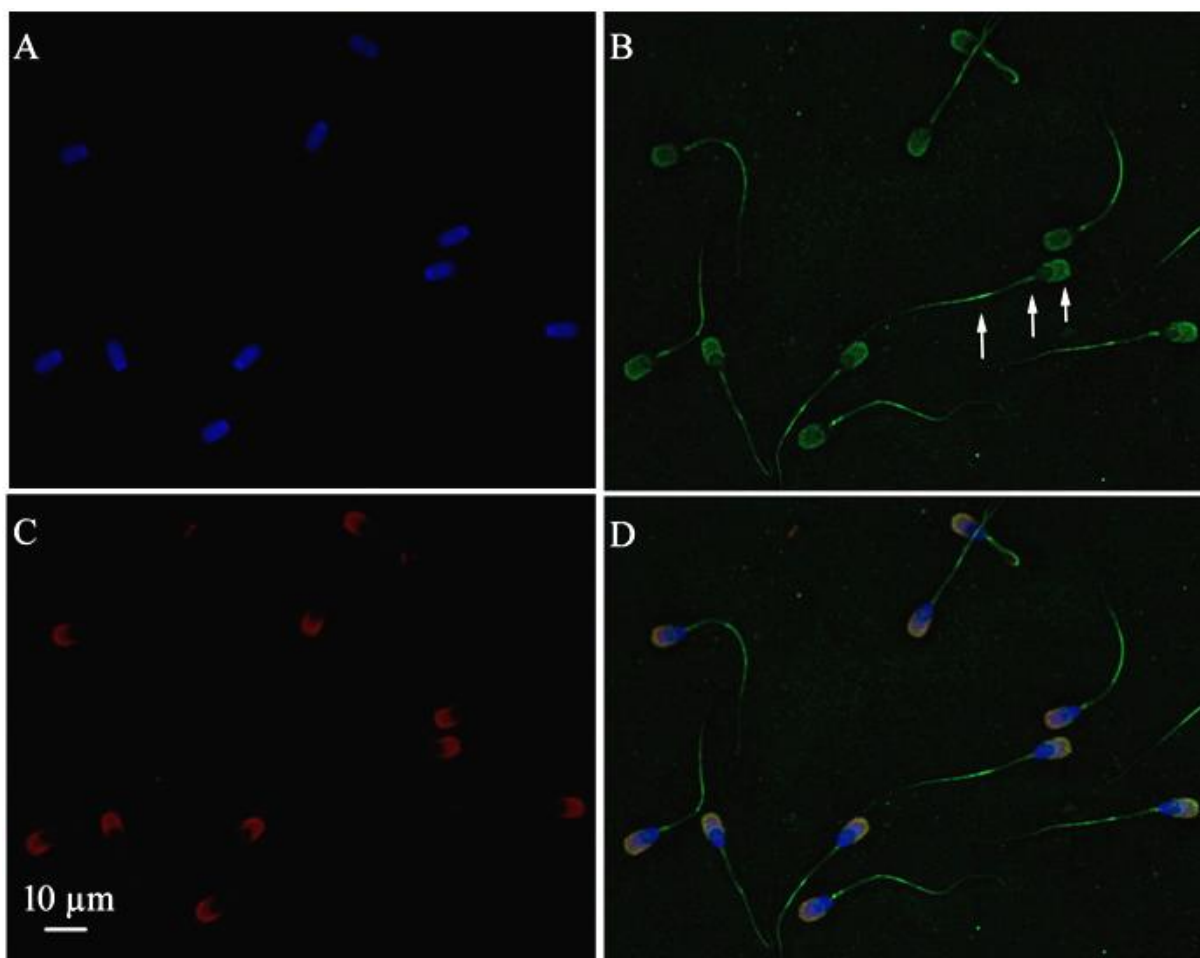
Průběh kapacitace byl vyhodnocen na základě proběhlé akrozomální reakce a hyperaktivace motility pomocí CASA (viz diplomová práce Lenky Malinové „Ovlivnění funkčních parametrů kančích spermií během modifikované kapacitace *in vitro*“).

### 5.1 Lokalizace $\beta$ -MSP v kančích spermiích po inhibici UPS během kapacitace

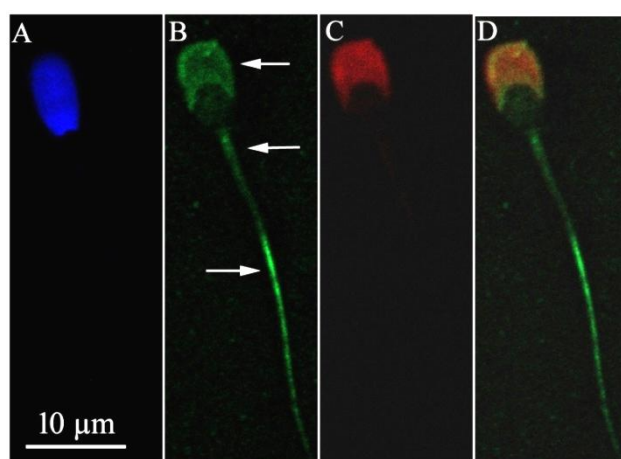
Byly připraveny mikroskopické preparáty pro lokalizaci  $\beta$ -MSP v ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných kančích spermiích s využitím králičí polyklonální protilátky proti prasečímu  $\beta$ -MSP (kap. 4.3 Nepřímá imunofluorescence).

Na obrázku 4 je vidět vzorek ejakulovaných spermií zpracovaný acetonovou fixací pozorovaný pod konfokálním mikroskopem a na obrázku 5 je odpovídající zvětšený výřez. Zleva doprava je zde zachyceno jádro značené DAPI (modrá),  $\beta$ -MSP značený pomocí protilátek (zelená), akrozom značený lektinem PNA konjugovaným s rhodaminem (červená) a jako poslední propojení předchozích obrázků. Stejným způsobem byly zpracované všechny následující fotografie vzorků. Negativní kontroly představují preparáty spermií bez inkubace s primární protilátkou.

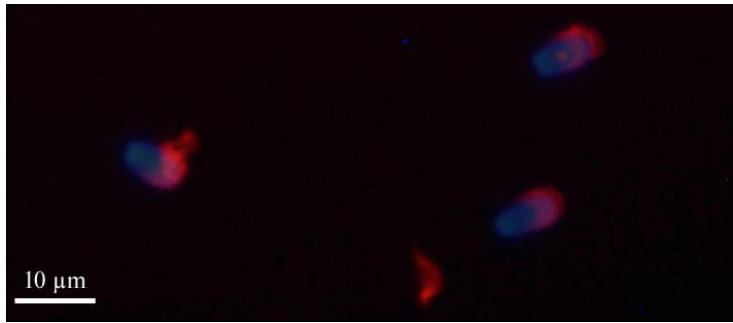
Obrázek 4 a 5 dokládá u ejakulovaných spermií vysokou koncentraci  $\beta$ -MSP ve spojovacím a hlavním oddílu bičíku spermie. Slabší intenzita fluorescence je vidět v akrozomální oblasti hlavičky spermie. Na obrázku 6 je negativní kontrola pro vzorek ejakulovaných spermií.



**Obr. 4 Ejakulované spermie – acetonová fixace** (šipky označují zřetelnou detekci  $\beta$ -MSP protilátkou). A – DAPI; B –  $\beta$ -MSP; C – lektin PNA konjugovaný s rhodaminem; D – kombinace

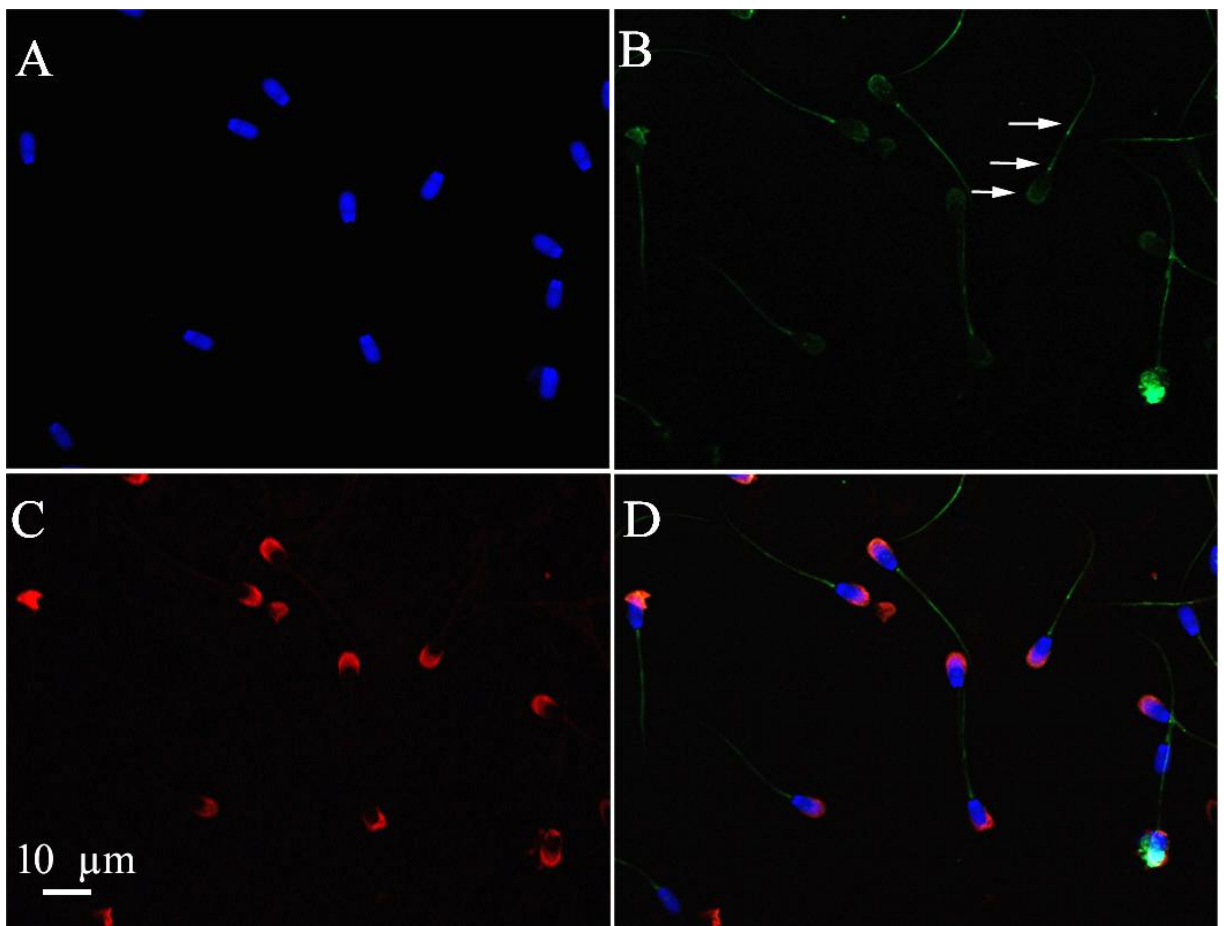


**Obr. 5 Ejakulované spermie – acetonová fixace** (šipky označují zřetelnou detekci  $\beta$ -MSP protilátkou). A – DAPI; B –  $\beta$ -MSP; C – lektin PNA konjugovaný s rhodaminem; D – kombinace

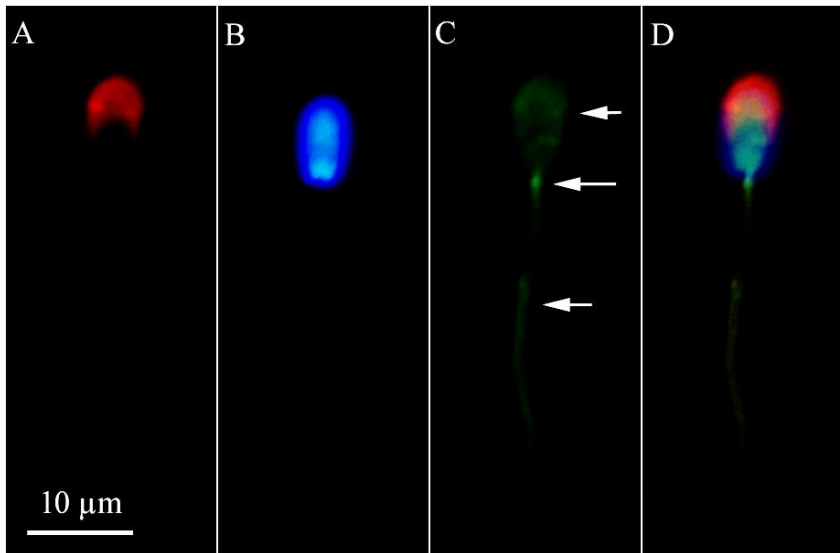


**Obr. 6 Ejakulované spermie negativní kontrola– acetonová fixace.** Modře – DAPI; červeně–lektin PNA konjugovaný s rhodaminem

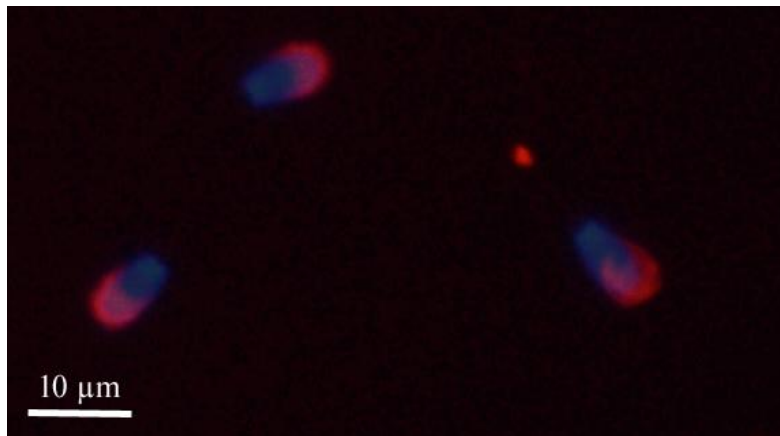
Na obrázku 7 a 8 je zachycen vzorek kapacitovaných spermií.  $\beta$ -MSP je detekován nejzřetelněji ve spojovacím a hlavním oddílu bičíku spermie a slaběji v apikální části akrozomální čepičky. Obrázek 9 ukazuje negativní kontrolu pro vzorek kapacitovaných spermií.



**Obr. 7 Kapacitované spermie – acetonová fixace** (šipky označují zřetelnou detekci  $\beta$ -MSP protilátkou). A – DAPI; B –  $\beta$ -MSP; C – lektin PNA konjugovaný s rhodaminem; D – kombinace

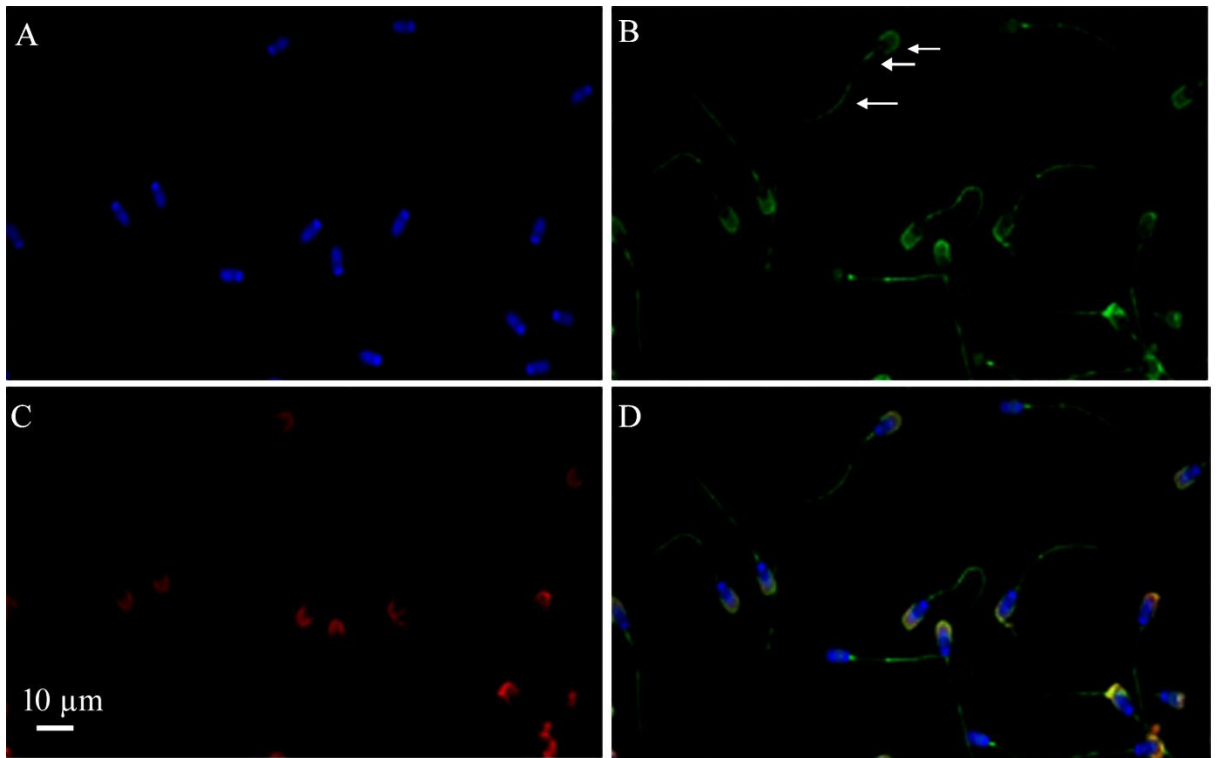


**Obr. 8 Kapacitované spermie – acetonová fixace** (šipky označují zřetelnou detekci  $\beta$ -MSP protilátkou). A – DAPI; B –  $\beta$ -MSP; C – lektin PNA konjugovaný s rhodaminem; D - kombinace

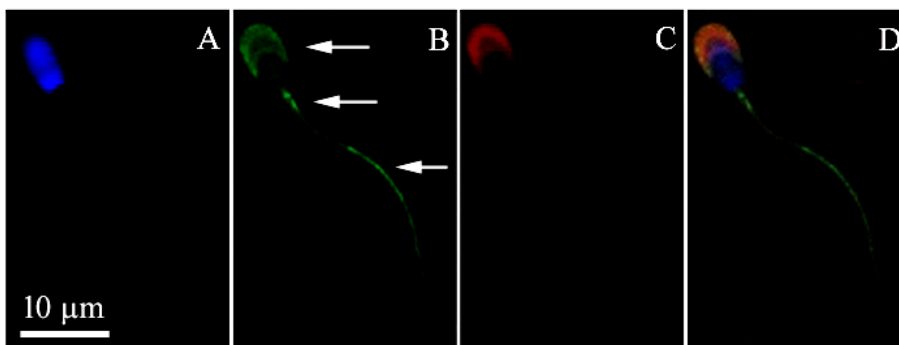


**Obr. 9 Kapacitované spermie negativní kontrola– acetonová fixace.** Modře – DAPI; červeně–lektin PNA konjugovaný s rhodaminem

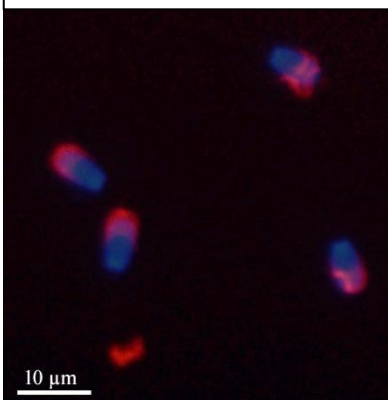
Obrázek 10 a 11 ukazuje spermie kapacitované s inhibítozem MG-132. Lokalizace proteinu  $\beta$ -MSP je viditelná v akrozomální oblasti hlavičky spermie a ve spojovacím a hlavním oddílu bičíku. Intenzita fluorescence je vyšší než u spermii kapacitovaných v nemodifikovaném médiu (Obr. 7, 8). Na obrázku 12 je negativní kontrola tohoto vzorku.



**Obr. 10 Spermie kapacitované s MG-132 – acetonová fixace** (šipky označují zřetelnou detekci  $\beta$ -MSP protilátkou). A – DAPI; B –  $\beta$ -MSP; C – lektin PNA konjugovaný s rhodaminem; D – kombinace

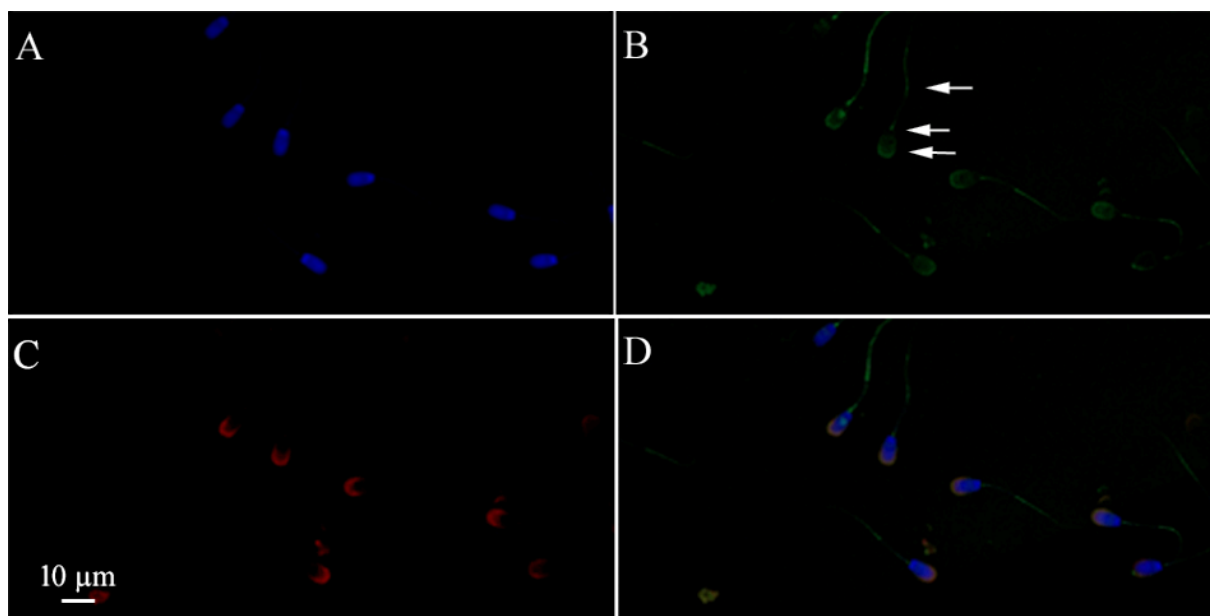


**Obr. 11 Spermie kapacitované s MG-132 – acetonová fixace** (šipky označují zřetelnou detekci  $\beta$ -MSP protilátkou). A – DAPI; B –  $\beta$ -MSP; C – lektin PNA konjugovaný s rhodaminem; D – kombinace

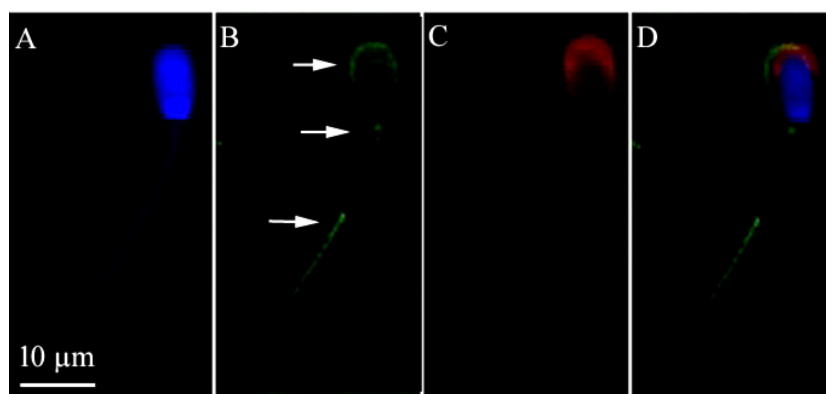


**Obr. 12 Spermie kapacitované s MG-132 negativní kontrola – acetonová fixace.** Modře – DAPI; červeně – lektin PNA konjugovaný s rhodaminem

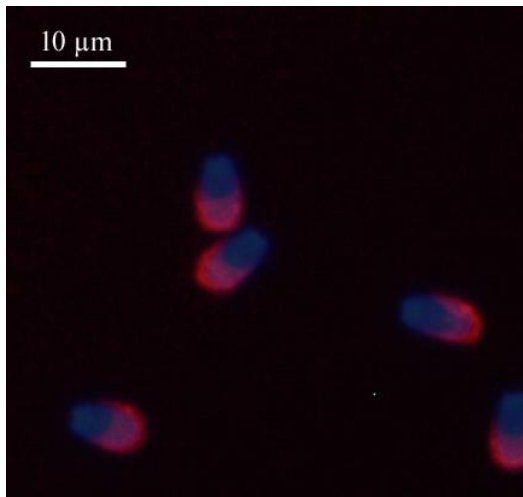
Na obrázku 13 a 14 jsou zachyceny fotografie vzorku spermií kapacitovaných s inhibítorem PYR-41. Je vidět velmi slabá intenzita fluorescence odpovídající detekci  $\beta$ -MSP v apikální oblasti akrozomu, dále ve spojovacím a hlavním oddílu bičíku spermie. Intenzita fluorescence je srovnatelná se značením spermií kapacitovaných v nemodifikovaném médiu (Obr. 7, 8). Obrázek 15 dokládá negativní kontrolu pro tento vzorek.



**Obr. 13 Spermie kapacitované s PYR-41 – acetonová fixace** (šipky označují zřetelnou detekci  $\beta$ -MSP protilátkou). A – DAPI; B –  $\beta$ -MSP; C – lektin PNA konjugovaný s rhodaminem; D – kombinace

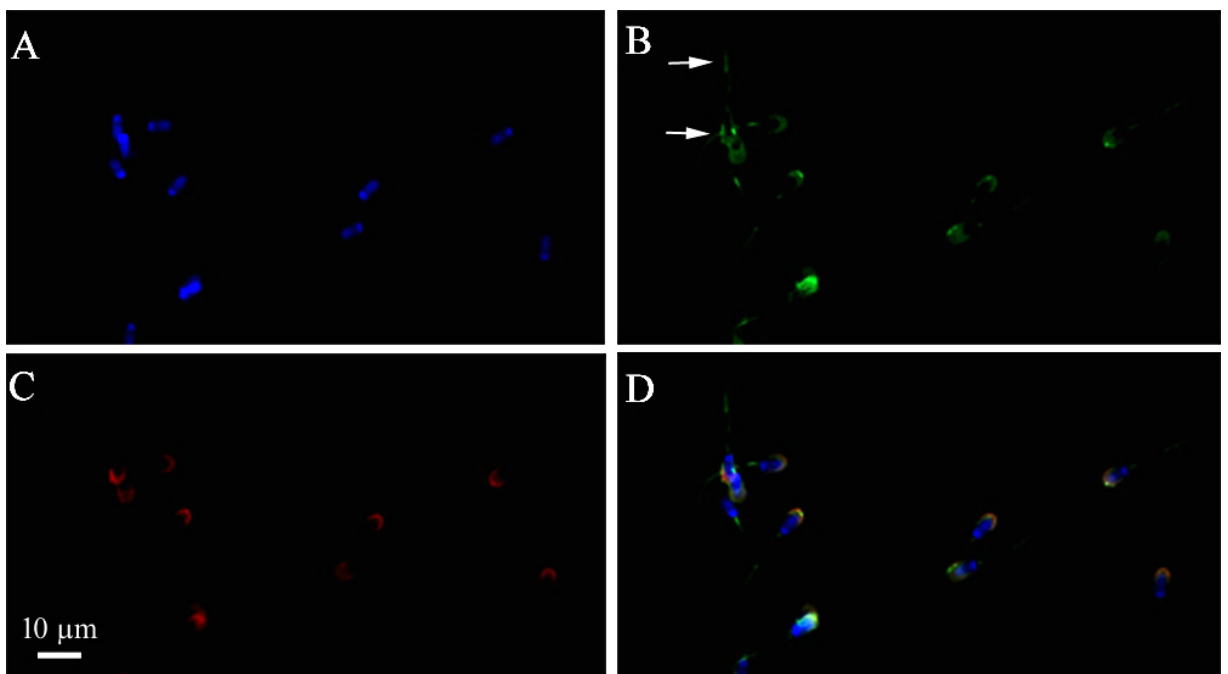


**Obr. 14 Spermie kapacitované s PYR-41 – acetonová fixace** (šipky označují zřetelnou detekci  $\beta$ -MSP protilátkou). A – DAPI; B –  $\beta$ -MSP; C – lektin PNA konjugovaný s rhodaminem; D – kombinace

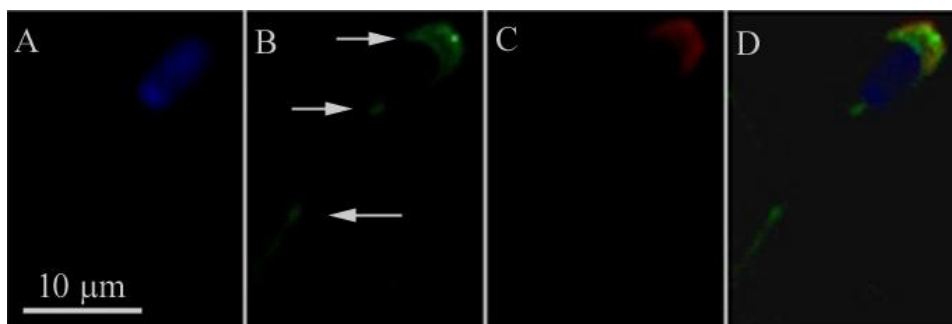


**Obr. 15 Spermie kapacitované s PYR-41 negativní kontrola – acetonová fixace.** Modře – DAPI; červeně–lektin PNA konjugovaný s rhodaminem

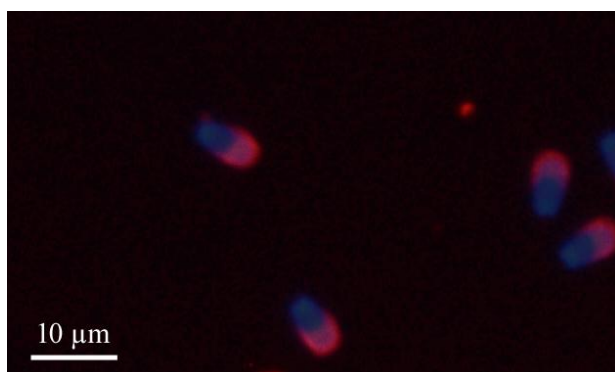
Na obrázku 16 a 17 lze vidět vzorek spermií kapacitovaných s DMSO. Protein je zde detekován v apikální oblasti akrozomu hlavičky spermie, slabší fluorescenční značení je viditelné ve spojovacím a hlavním oddílu bičíku. Intenzita fluorescence je srovnatelná se značením spermií kapacitovaných v nemodifikovaném médiu (Obr. 7, 8). Obrázek 18 zachycuje negativní kontrolu pro tento vzorek.



**Obr. 16 Spermie kapacitované s DMSO – acetonová fixace** (šipky označují zřetelnou detekci  $\beta$ -MSP protilátkou). A – DAPI; B –  $\beta$ -MSP; C – lektin PNA konjugovaný s rhodaminem; D – kombinace



**Obr. 17 Spermie kapacitované s DMSO – acetonová fixace** (šipky označují zřetelnou detekci  $\beta$ -MSP protilátkou). A – DAPI; B –  $\beta$ -MSP; C – lektin PNA konjugovaný s rhodaminem; D - kombinace



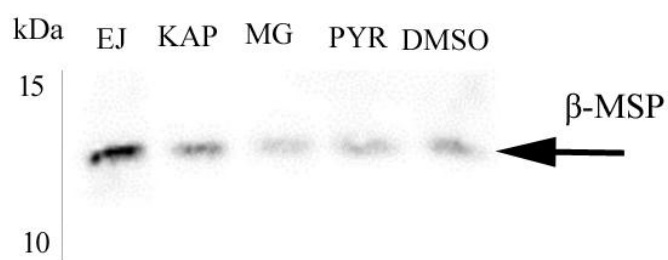
**Obr. 18 Spermie kapacitované s DMSO negativní kontrola – acetonová fixace.** Modře – DAPI; červeně – lektin PNA konjugovaný s rhodaminem

## 5.2 Imunodetekce $\beta$ -MSP v extraktech kančích spermii před a po in vitro kapacitaci

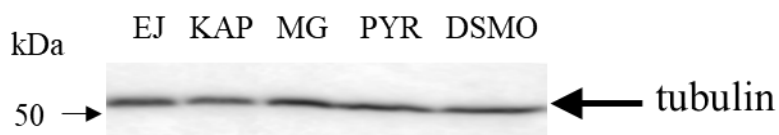
Byly připraveny proteinové extrakty z ejakulovaných in vitro kapacitovaných spermii v nemodifikovaném a modifikovaném kapacitačním médiu s přidavkem inhibitorů MG-132 a PYR-41. Proteiny spermii byly separovány pomocí SDS elektroforézy (viz kap. 4.4) a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Po skončení elektropřenosu byla membrána dočasně obarvena barvivem Ponceau. Po inkubaci byla membrána opět promyta a podrobena vizualizaci. Proteiny byly denzitometricky změřeny a získaná data byla analyzována. Celkem byla shodným způsobem zpracována data ze tří experimentů (viz kap. 4.5 Western blot a imunodetekce).

Byl zjištěn podíl denzitometrických hodnot obou proteinů pro jednotlivé vzorky –  $\beta$ -MSP/tubulin. Na obrázku 19 je zachycena membrána s detekcí  $\beta$ -MSP (A) a detekcí tubulinu (B) pro kontrolu nanášky proteinu ve vzorcích.





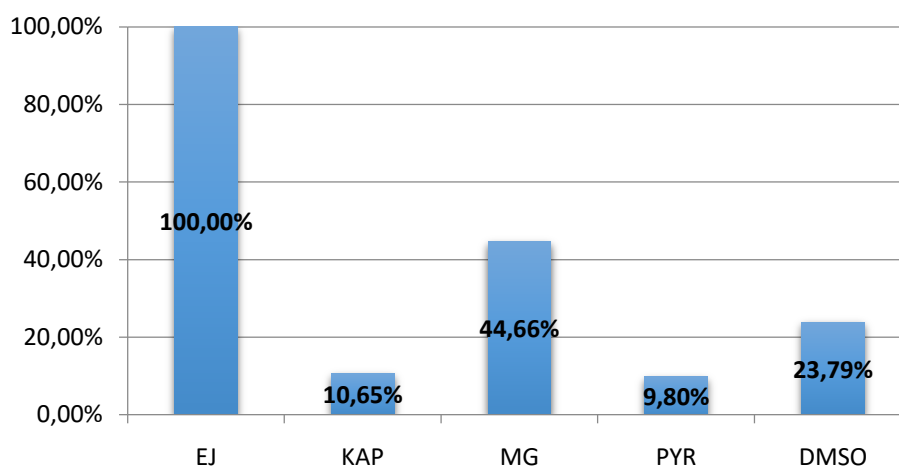
**Obr. 19A Reprezentativní membrána imunodetekce  $\beta$ -MSP.** EJ – vzorek ejakulovaných spermií; KAP – vzorek kapacitovaných spermií; MG – vzorek spermií kapacitovaných spolu s MG-132; PYR – vzorek spermií kapacitovaných spolu s PYR-41; DMSO - vzorek spermií kapacitovaných spolu s DMSO bez inhibitorů.



**Obr. 19B Detekce tubulinu.** EJ – vzorek ejakulovaných spermií; KAP – vzorek kapacitovaných spermií; MG – vzorek spermií kapacitovaných spolu s MG-132; PYR – vzorek spermií kapacitovaných spolu s PYR-41; DMSO – vzorek spermií kapacitovaných spolu s DMSO bez inhibitorů.

Hodnoty z relativní optické denzity byly vyjádřeny v procentech přisouzením koncentrace vzorku ejakulovaných spermií 100 %. Následně byl získán průměr těchto podílů ze všech pokusů. Průměrná hodnota intenzity signálu detekce  $\beta$ -MSP ve vzorku ejakulovaných spermií pak činila 100 %, spermií kapacitovaných s MG-132 dosahovala 44,66 %. U vzorku spermií kapacitovaných s DMSO bez inhibitoru 23,79 %. U vzorku kapacitovaných spermií je průměr ze všech pokusů 10,65 % a u vzorku spermií kapacitovaných s PYR-41 9,80 % (graf 1).

## Průměr pokusů



**Graf 1 Průměr výsledných hodnot denzitometrické analýzy všech pokusů vyjádřený v procentech.**

EJ – vzorek ejakulovaných spermií; KAP – vzorek kapacitovaných spermií; MG – vzorek spermií kapacitovaných spolu s MG-132; PYR – vzorek spermií kapacitovaných spolu s PYR-41; DMSO – vzorek spermií kapacitovaných spolu s DMSO bez inhibitorů.

Procentuální hodnoty relativní denzity byly podrobeny testu ANOVA a t-testu (viz kap. 4.5 Western blot a imunodetekce). Mezi spermiemi kapacitovanými v nemodifikovaném médiu (KAP) a spermiemi kapacitovanými v modifikovaném médiu (MG, PYR, DMSO) byl prokázán statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ), stejně tak při porovnání vzorku spermií kapacitovaných a kapacitovaných v médiu s MG-132.

## 6 Diskuse

Při cestě pohlavním traktem samice prochází spermie mnoha změnami. Soubor nejpodstatnějších z těchto změn, umožňující spermii projít akrozomální reakcí a následně splynout s oocytem, se nazývá kapacitace (de Lamirande et al 1997). Zahrnuje odstranění dekapacitačních faktorů (Jonáková et al. 1998), zvyšuje se fluidita cytoplazmatické membrány, stoupá pH a zvyšuje se intenzita fosforylace tyrosinových zbytků v proteinech (Kerns et al. 2016). Všechny tyto změny se projevují odtržením spermie z rezervoáru spermií, remodelací membrán (Sutovsky 2011) a zvýšením motility spermie (Kerns et al. 2016) a to až do stavu hyperaktivace (Aitken & Nixon 2013). Jde o složitý proces, který ještě stále není plně prozkoumán. Pro oplození je ovšem naprosto zásadní a je tedy důležité jej podrobně prostudovat a porozumět mu.

Z dosavadních výzkumů vyplývá, že mezi změny probíhající při kapacitaci patří i změna v přítomnosti či nepřítomnosti a tedy i v množství beta-mikroseminoproteinu (Maňásková-Postlerová et al. 2011). Tento protein byl původně objeven u člověka, konkrétně v semenné plazmě (Akiyama et al. 1985). Později byl identifikován u žen (Weiber et al. 1990) a dále i u jiných druhů (Wang et al. 2003) a v různých tkáních (Lazure et al. 2001).

U prasat se  $\beta$ -MSP vyskytuje v největší míře v sekretu a epitelu prostaty. Z přídatných pohlavních žláz je též přítomen v Copwerových žlázách, uretrální žláze a semenných váčcích. Dále je lokalizován v epitelu varlat a v sekretu a epitelu nadvarlat (Maňásková-Postlerová et al. 2011). U samic byl výskyt beta-mikroseminoproteinu doložen v luteálních buňkách vaječníku (Tanaka et al. 1995).

U kanců tento protein blokuje aktivitu sodno-draselné pumpy, inhibuje motilitu spermií (Wang et al. 2003) a hraje roli jako faktor vážící imunoglobuliny (Kamada et al. 1998).  $\beta$ -MSP spermií morčat pravděpodobně zabraňuje sponntání akrozomální reakci. Obecně se předpokládá jeho účast na hyperaktivaci spermie, interakci spermie se zona pellucida (Franchi et al. 2008) a v blokaci lokální imunitní odpovědi (Kamada et al. 1998).

V současnosti je beta-mikroseminoprotein často zmiňován v souvislosti s rakovinou. Mohl by sloužit jako marker rakoviny vaječníků žen (Ma et al. 2014) a u mužů výskyt rizikové alely genu pro  $\beta$ -MSP úzce souvisí s výskytem rakoviny prostaty (Haiman et al. 2013). Rovněž by v budoucnu mohl být využíván jako biomarker při hodnocení kvality ejakulátu (Franchi et al. 2008).  $\beta$ -MSP je proto zajímavým a významným předmětem výzkumů nejen v oblasti reprodukce.

U spermií mužů je  $\beta$ -MSP lokalizován na hlavičce spermie, především akrozomu (Franchi et al. 2008). Podobný výskyt tohoto proteinu na spermii jako lidé mají morčata (Franchi et al. 2008). U opic je naopak omezen pouze na oblast bičíku (Tollner et al. 2004). Kančí spermie nesou  $\beta$ -MSP na akrozomální část hlavičky, na spojovacím a na hlavním oddílu bičíku. U prasat je rovněž popsána rozdílná lokalizace tohoto proteinu u spermií ejakulovaných a kapacitovaných – u ejakulovaných byl detekován v oblasti akrozomu a bičíku a u kapacitovaných pouze uvnitř akrozomu (Maňásková-Postlerová et al. 2011).

Z našich výsledků vyplývá, že se  $\beta$ -MSP u kančích spermií vyskytuje v akrozomální oblasti hlavičky spermie, na spojovacím a na hlavním oddílu bičíku. V našich experimentech byl  $\beta$ -MSP ve fixovaných spermiích po kapacitaci detekován v apikální části akrozomu s velmi slabou intenzitou. Podobná intenzita vazby protilátky proti  $\beta$ -MSP byla zaznamenána u spermií kapacitovaných v médiu s inhibítorem PYR-41 a s DMSO. Dále protein nebyl zachycen v oblasti středního oddílu bičíku, což je rovněž v rozporu s předchozími poznatky (viz. Maňásková-Postlerová et al. 2011). Příčinou může být nedostatečný počet opakování experimentu a/nebo slabší protilátka použitá pro detekci proteinu. Je nutné zmínit, že v našich experimentech byla použita jiná protilátka, i když se stejnou specifitou, než v předchozí studii (viz. Maňásková-Postlerová et al. 2011). Pro exaktní hodnocení změny množství  $\beta$ -MSP ve vzorcích kapacitovaných spermií v modifikované a nemodifikovaném médiu nebylo uděláno dostatek experimentů a zanalyzován příslušný počet buněk.

Pokud se protein po kapacitaci z povrchu hlavičky a bičíku spermie skutečně ztrácí (Maňásková-Postlerová et al. 2011), tzn. je degradován, musí se tato změna odrazit v celkovém snížení koncentrace  $\beta$ -MSP ve spermii. Tento předpoklad zde popsaný výzkum potvrzuje. Z dat zjištěných pomocí imunodetekce vyplývá, že u kapacitovaných spermií je koncentrace proteinu dramaticky nižší než u spermií ejakulovaných.

Mechanismus, který za degradaci  $\beta$ -MSP na spermii při kapacitaci stojí, však dosud nebyl odhalen. Miles et al. (2013) ve své publikaci zařadil beta-mikroseminoproteinna seznam možných členů skupiny proteinů interagujících s proteazomem (PIPs). Proteazomy spermie se podílí na odstraňování mnoha ubiquitinem označených proteinů a v podstatě se podílí na všech reakcích nutných pro splynutí spermie s vajíčkem (Zimmerman & Sutovsky 2009).

Výsledky této práce ovšem naznačují, že by ubiquitin-proteazomový systém mohl hrát roli v úbytku  $\beta$ -MSP při kapacitaci. Metodou imunodetekce byl v množství  $\beta$ -MSP mezi spermiemi kapacitovanými v nemodifikovaném médiu a spermiemi kapacitovanými v modifikovaném médiu zjištěn statisticky významný rozdíl, kdy při použití inhibítora proteazomu MG-132 byla zaznamenána hladina proteinu vyšší než při kapacitaci spermií

v nemodifikovaném médiu. O tomto inhibitoru je známo, že blokuje všechny tři proteázové aktivity proteazomu (kaspázová, trypsinová, chymotrypsinová). S nižší účinností také inhibuje aktivitu kalpainů, což jsou proteázy aktivované vápenatými ionty (Peheré et al. 2019). Naproti tomu, PYR-41 inhibuje pouze enzym aktivující ubiquitin (Yoshida et al. 2018). Vyšší hladina  $\beta$ -MSP při použití MG-132 tak může ukazovat na vedlejší působení této látky. V příštích studiích by bylo vhodné tento jev více prozkoumat a zvolit inhibitor, který by inhiboval aktivitu proteazomu specificky.

Přesto, že naše výsledky naznačují účast ubiquitin-proteazomového systému při degradaci  $\beta$ -MSP spermií během kapacitace, nelze tyto výsledky považovat za definitivní. Proto by bylo nezbytné experimenty podrobit více opakování.

Je třeba shromáždit více detailnějších poznatků jak o beta-mikroseminoproteinu a jeho úloze ve spermiích a celkově v reprodukci, tak o přesném zapojení ubiquitin-proteazomového systému do kapacitace spermií. I samotný proces kapacitace stále nabízí mnoho možností pro další studie. Námi získané poznatky mohou přispět k dalšímu pochopení molekulárních mechanismů vedoucích ke kapacitaci spermií a úspěšnému oplození vajíčka.

## 7 Závěr

Imunolokalizací byla přítomnost beta-mikroseminoproteinů prokázána v akrozomální oblasti hlavičky spermie, ve spojovacím a hlavním oddílu bičíku. Ve jmenovaných oblastech byl tento protein lokalizován podobně u všech zkoumaných vzorků. Nejsilnější značení se objevilo ve vzorku ejakulovaných spermií. Ve vzorku spermií kapacitovaných v modifikovaném médiu s inhibítorem proteasomu MG-132 byla intenzita imunofluorescenčního značení vyšší než u spermií kapacitovaných v nemodifikovaném médiu.

Imunodetekcí byla zjištěna nejvyšší koncentrace  $\beta$ -MSP ve vzorku ejakulovaných spermií. Množství proteinu bylo srovnatelné ve spermiích kapacitovaných v nemodifikovaném a modifikovaném médiu s inhibítorem PYR-41 a DMSO. Ve vzorku spermií kapacitovaných s MG-132 byla však koncentrace  $\beta$ -MSP oproti ostatním vzorkům podrobeným kapacitaci signifikantně vyšší.

Naše hypotéza, že je ubiquitin-proteazomový systém zapojen do odstraňování beta-mikroseminoproteinů z kančích spermií během kapacitace nebyla jednoznačně potvrzena, protože jsme neměli k dispozici dostatek dat pro zpracování analýzy obrazu z fluorescenčních experimentů. Nicméně na základě výsledků imunodetekce množství  $\beta$ -MSP ve vzorcích kapacitovaných spermií s inhibítorem proteasomu se zdá, že by se ubiquitin-proteazomový systém mohl degradace  $\beta$ -MSP účastnit.

## 8 Seznam literatury

Aitken RJ, Nixon B. 2013. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Molecular Human Reproduction* **19**: 785-793.

Akiyama K, Yoshioka Y, Schmid K, Offner GD, Troxler RF, Tsuda R, Hara M. 1985. The amino acid sequence of human  $\beta$ -microseminoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **829**: 288-294.

Aoki N, Matsuo H, Deshimaru M, Terada S. 2008. Accelerated evolution of small serum proteins (SSPs)-The PSP94 family proteins in a Japanese viper. *Gene* **426**: 7-14.

Austin CR. 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* **170**: 326.

Baijal-Gupta M, Clarke MW, Finkleman MA, McLachlin CM, Han VKM. 2000. Prostatic secretory protein (PSP94) expression in human female reproductive tissues, breast and in endometrial cancer cell lines. *Journal of Endocrinology* **165**: 425-433.

Baker MA, Hetherington L, Aitken RJ. 2006. Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *Journal of Cell Science* **119**: 3182-3192.

Boatman DE, Robbins RS. 1991. Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biology of Reproduction* **44**: 806-813.

Carrasco LC, Romar R, Aviles M, Gadea J, Coy P. 2008. Determination of glycosidase activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle. *Reproduction* **136**: 833-842.

Coy P, García-Vázquez FA, Visconti PE, Avilés M. 2012. Roles of oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction* **144**: 649-660.

- Cummins SF, Boal JG, Buresch KC, Kuanpradit CH, Sobhon P, Holm JB, Degnan BM, Nagle GT, Hanlon RT. 2011. Extreme aggression in male squid induced by a  $\beta$ -MSP-like pheromone. *Current Biology* **21**: 322-327.
- De Jonge CH. 2005. Biological basis for human capacitation. *Human Reproduction Update* **11**: 205-214.
- De Jonge CH. 2017. Biological basis for human capacitation - revisited. *Human Reproduction Update* **23**: 289-299.
- De Jonge CHJ, Barratt CH. 2006. *The Sperm Cell*. Cambridge University Press, New York.
- de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction* **3**:175-197.
- Demott RP, Suarez SS. 1992. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biology of Reproduction* **46**: 779-785.
- Feugang JM, Liao SF, Willard TS, Ryan LP. 2018. In-depth proteomic analysis of boar spermatozoa through shotgun and gel-based method. *BioMedCentral Genomic* **19**:62-75.
- Franchi NA, Avedano C, Molina RI, Tissera AD, Maldonado CA, Oehninger S, Coronel CE. 2008.  $\beta$ -Microseminoprotein in human spermatozoa and its potential role in male fertility. *Reproduction* **136**: 157-166.
- García-Vazquez FA, Hernández-Caravaca I, Matás C, Soriano-Úbeda C, Abril-Sánchez S, Izquierdo-Rico MJ. 2015. Morphological study of boar sperm during their passage through female genital tract. *Journal of Reproduction and Development* **61**: 407-413.
- Gualtieri R, Talevi R. 2003. Selection of highly fertilization-competent bovine spermatozoa through adhesion to the fallopian tube epithelium in vitro. *Reproduction* **125**: 251-258.



- Hafez ESE. 2000. Reproduction in farm animals. Lippincott Williams & Wilkins, Pennsylvania.
- Haiman CHA, Stram DO, Vickers AJ, Wilkens LR, Braun K, Valtonen-André C, Peltola M, Pettersson K, Waters KM, Le Marchand L, Kolonel LN, Henderson BE, Lilja H. 2013. Levels of Beta-Microseminoprotein in Blood and risk of Prostate cancer in Multiple Populations. *Journal of National Cancer Institute* **105**: 237-243.
- Chao CF, Chiou ST, Jeng H, Chang WC. 1996. The porcine sperm motility inhibitor is identical to beta-microseminoprotein and its competitive inhibitor of Na<sup>+</sup>, K(+) – ATPase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **218**: 623-628.
- Chernoff HN, Dukelow WR. 1969. Decapacitation factor purification with lipid solvent. *Journal of Reproduction and Fertility* **18**:141-144.
- Jonáková V, Kraus M, Veselský L, Čechová D, Bezouška K, Tichá M. 1998. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility* **114**: 25-34.
- Jonáková V, Tichá M. 2004. Boar seminal plasma proteins and their binding properties. A review. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **69**:461-475.
- Kamada M, Mori H, Maeda N, Yamamoto S, Kunimi K, Takikawa M, Maegawa M, Aono T, Futaki S, Koide SS. 1998.  $\beta$ -Microseminoprotein/prostatic secretory protein is a member of immunoglobulin binding factor family. *Biochimica et Biophysica Acta* **1388**: 101-110.
- Kerns K, Morales P, Sutovsky P. 2016. Regulation of Sperm Capacitation by the 26S Proteasome: An Emerging New Paradigm in Spermatology. *Biology of Reproduction* **94**:117-125.
- Kumar A, Jagtap DD, Mahale SD, Kumar M. 2010. Crystal structure of secretory protein PSP94 shows an edge-to-edge association of two monomers to form a homodimer. *Journal of Molecular Biology* **397**: 947-956.

Kwon W, Rahman MS, Lee J, Kim J, Yoon S, Park Y, You Y, Hwang S, Pang M. 2014. A comprehensive proteomic approach to identifying capacitation related proteins in boar spermatozoa. *BioMedical Central Genomic* **15**: 897-908.

Kwong J, Xuan JW, Chan PSF, Ho S, Chan FL. 2000. A Comparative Study of Hormonal Regulation of Three Secretory Proteins (Prostatic Secretory Protein-PSP94, Probasin, and Seminal Vesicle Secretion II) in Rat Lateral Prostate. *Endocrinology* **141**: 4543-4551.

Lazure C, Villemure M, Gauthier D, Naudé RJ, Mbikay M. 2001. Characterization of ostrich (*Struthio camelus*) -microseminoprotein (MSP): Identification of homologous sequences in EST databases and analysis of their evolution during speciation. *Protein Science* **10**: 2207-2218.

Ma J, Yan B, Zhang J, Jiang B, Guo Y, Riedel H, Mueller MD, Remick SC, Yu JJ. 2014. PSP94, an upstream signaling mediator of prostasin found highly elevated in ovarian cancer. *Cell Death and Disease* (e1407) doi:10.1038/cddis.2014.374.

Maňásková-Postelrová P, Davidová N, Šulc M, Philimonenko A, Hozák P, Jonáková V. 2011. Reproductive tissue expression and sperm localization of porcine beta-microseminoprotein. *Cell and Tissue Research* **344**:341-353.

Marečková L, Petroková H, Osička R, Kuchař M, Malý M. 2015. Novel binders derived from an albuminbinding domain scaffold targeting human prostate secretory protein 94 (PSP94). *Protein & Cell* **6**: 774-779.

Mburu J, Einarsson S, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H. 1996. Distribution, number and membrane integrity of spermatozoa in the pig oviduct in relation to spontaneous ovulation. *Animal Reproduction Science* **45**: 109-121.

Miles EL, O’Gorman CH, Zhao J, Samuel M, Walters E, Yi Y, Sutovsky M, Prather RS, Wells KD, Sutovsky P. 2013. Transgenic pig carrying green fluorescent proteasomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 6334-6339.

Morales P, Kong M, Pizzaro E, Pasten C. 2003. Participation of the sperm proteasome in human fertilization. *Human Reproduction* **18**: 1010-1017.

Nishimura H, L'Hernault SW. 2017. Spermatogenesis. *Current Biology* **27**:988-994.

Pacey AA, Davies N, Warren MA, Barratt CL, Cooke ID. 1995. Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Human Reproduction* **10**: 2603-2609.

Pehere AD, Nguyen S, Garlick SK, Wilson DW, Hudson I, Sykes MJ, Morton JD, Abell AD. 2019. Tripeptide analogues of MG132 as protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **27**: 436-441.

Stott-Miller M, Wright JL, Stanford JL. 2013. MSMB gene variant alters the association between prostate cancer and number of sexual partner. *Prostate* **73**: 1803-1809.

Suarez SS. 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update* **14**: 647-657.

Sutovsky P. 2011. Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction* **142**: 1-14.

Tanaka T, Itahana K, Andoh N, Takeya T, Sato E. 1995. Expression of prostatic secretory protein (PSP)-like protein in porcine corpus luteum: Isolation and characterization of a new gene encoding PSP94-like protein. *Molecular Reproduction and Development* **42**: 149-156.

Tollner TL, Yudin AI, Treece CA, Overstreet JW, Cherr GN. 2004. Macaque sperm release ESP13.2 and PSP94 during capacitation: the absence of ESP13.2 is linked to sperm-zona recognition and binding. *Molecular Reproduction and Development* **69**:325-337.

Yeste M, Fernández-Novell JM, Ramió-Lluch L, Estrada E, Rocha LG, Cebrián-Pérez JA, MuiNo-Blanco T, Concha II, Ramírez A, Rodríguez-Gil JE. 2015. Intracellular calcium movements of boar spermatozoa during 'in vitro' capacitation and subsequent acrosome exocytosis follow a multiple-storage place, extracellular calcium-dependent model. *Andrology* **3**: 729-747.

Yi Y, Manandhar G, Sutovsky M, Jonáková V, Park CH, Sutovsky P. 2010a. Inhibition of 19S proteasomal regulatory complex subunit PMSD8 increases polyspermy during porcine fertilization *in vitro*. *Journal of Reproductive Biology* **84**: 154 – 163.

Yi Y, Manandhar G, Sutovsky M, Zimmerman SW, van Leeuwen FW, Oko R, Park CH, Sutovsky P. 2010b. Interference with the 19S proteasomal regulatory complex subunit PMSD4 on the sperm surface inhibits sperm-zona pellucida penetration during porcine fertilization. *Cell and Tissue Research* **341**: 325-340.

Yi YJ, Zimmerman SW, Manandhar G, Odhiambo JF, Kennedy C, Jonáková V, Maňásková-Postlerová P, Sutovsky M, Parks CS, Sutovsky P. 2012. Ubiquitin-activating enzyme (UBA1) is required for sperm capacitation, acrosomal exocytosis and sperm–egg coat penetration during porcine fertilization. *International Journal of Andrology* **35**:196-210.

Yoshida K, Kang W, Nakamura A, Kawano N, Hanai M, Miyado M, Miyamoto Y, Iwai M, Hamatani T, Saito H, Miyado K, Umezawa A. 2018. Ubiquitin-activating enzyme E1 inhibitor PYR-41 retards sperm enlargement after fusion to egg. *Reproductive Toxicology* **76**: 71-77.

Wang I, Lou YC, Wu KP, Wu SH, Chang WC, Chen C. 2005. Novel solution structure of porcine beta-Microseminoprotein. *Journal of Molecular Biology* **346**: 1071-1082.

Wang I, Tsun-Ai Y, Shih-Hsiung W, Wen-Chang CH, Chinpan CH. 2003. Disulfide pairings and secondary structure of porcine beta-microseminoprotein. *FEBS Letters* **541**: 80-84.

Weiber H, Andersson CH, Murne A, Rannevik G, Lindstrom C, Lilja H, Fernlund P. 1990.  $\beta$  Microseminoprotein Is Not a Prostate-specific Protein. *American Journal of Pathology* **137**: 593-603.

Weiber H, Borch K, Sundler F, Fernlund P. 1999.  $\beta$ -Microseminoprotein in Gastric Carcinoids: A Marker of Tumour Progression. *Digestion* **60**:440–448.

Zigo M, Jonakova V, Manaskova-Postlerova P, Kerns K, Sutovsky P. 2019. Ubiquitin-proteasome systém participace in the de-aggregation of spermadhesins and DQH protein during boar sperm capacitation. *Reproduction* **157**: 283-295.

Zimmerman S, Sutovsky P. 2009. The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization. *Journal of Reproductive immunology* **83**: 19-25.