

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Fosforylace proteinů hřebčích spermií jako indikátor
kapacitace**

Diplomová práce

Bc. Natálie Brabencová

Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: Ing. Filipa Bubeníčková Ph.D.

Konzultant: RNDr. Pavla Postlerová Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Fosforylace proteinů hřebčích spermií jako indikátor kapacity" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé práce Ing. Filipě Bubeníčkové Ph.D. a konzultantce RNDr. Pavle Postlerové Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí cenných rad a materiálů, trpělivost a vstřícnost. Zvláštní poděkování patří všem vyučujícím, kteří mě provázeli během celého studia v této komplikované době. Děkuji i mé rodině. Za všechno.

Fosforylace proteinů hřebčích spermií jako indikátor kapacity

Souhrn

Ejakulované spermie nejsou schopné oplodnit oocyt, proto musí spermie podstoupit sérii funkčních změn souhrnně označovaných jako kapacitace. Hlavní pozorované děje během kapacity jsou změny v metabolismu buňky, uspořádání plazmatické membrány a hyperaktivace motility. *In vivo* jsou tyto procesy vyvolány kontaktem spermie s oviduktem. V laboratorních podmínkách bylo zjištěno, že na zahájení kapacity většiny savců mají vliv 3 iniciační faktory: HCO_3^- , Ca^{2+} a albumin. HCO_3^- aktivuje adenylátcyklázu, která zahajuje tvorbu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Produkce cAMP slouží k aktivaci proteinkinázy A nutné k fosforylaci proteinů na tyrosinu, která je spojována s hyperaktivací motility bičíku a je brána jako marker kapacity. Tyto 3 iniciační faktory vedou pouze k částečné kapacitaci u hřebčích spermií, proto se zdá se, že u hřebce probíhá kapacitace specifickým, zatím neznámým způsobem.

Tato práce se zabývala hodnocením rozdílu fosforylace proteinů hřebčích spermií mezi nativními a kryokonzervovanými vzorky. Během kryokonzervace často dochází k nežádoucím změnám podobným kapacitaci označovaných jako kryokapacitace. Kryokapacitované spermie nejsou vhodné k oplození.

Nejdříve byla v této práci hodnocena lokalizace fosforylovaných proteinů u nativních a kryokonzervovaných vzorků hřebčích spermií pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Byly objeveny jisté rozdíly v lokalizaci signálu mezi porovnávanými vzorky. U nativních vzorků převládal signál v oblasti ekvatoriálního segmentu a zároveň bičíku, zatímco u kryokonzervovaných vzorků byl nejčastější signál v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku zároveň. Signál v oblasti bičíku byl výraznější v oblasti střední části u nativních vzorků, u kryokonzervovaných byl signál v celém bičíku rovnoměrný. Signál v ekvatoriálním segmentu nativních vzorků byl rozmístěn rovnoměrně po celém segmentu, zatímco u kryokonzervovaných byl uspořádán uprostřed do tvaru trojúhelníku. Byla hodnocena také přítomnost akrozomu a detekce signálu protilátky proti fosfotyrosinu. Přítomnost nebo nepřítomnost akrozomu neměla vliv na detekci signálu v této oblasti.

Pomocí metody Western Blot imunodetekce byla hodnocena míra signálu fosforylovaných proteinů hřebčích spermií. U kryokonzervovaných vzorků bylo detekováno větší množství proteinů se signálem proti fosfotyrosinu než u nativních vzorků. Mezi jednotlivými hřebci byl patrný rozdíl v míře detekovaného signálu. Z toho vyplývá individuální citlivost hřebců na kryokonzervaci a kryokapacitační změny.

Klíčová slova: fosforylace, spermie, hřebec, kapacitace, kryokonzervace, kryokapacitace

Stallion sperm protein phosphorylation as an indicator of capacitation

Summary

Ejaculated sperm are unable to fertilize the oocyte, so they must pass a series of functional changes referred to as capacitation. The main events observed during capacitation are changes in sperm metabolism, reorganisation of the plasma membrane, and hyperactivation motility of a sperm tail. These changes are *in vivo* initiated after contact of spermatozoa with the female oviduct. In laboratory conditions, three initiating factors of capacitation for most mammals were discovered: HCO_3^- , Ca^{2+} and albumin. HCO_3^- activates adenylat cyklase A, which initiates releasing cyclic adenosin monophosphate (cAMP). Production of cAMP activates also protein kinase A necessary for protein tyrosine phosphorylation. Protein tyrosine phosphorylation is connected with sperm tail hyperactivation and used as a marker of capacitation. These three initiating factors of capacitation lead not to full capacitation in horse, therefore, the stallion sperm appear to be capacitated in a specific, as yet unknown manner.

This work compared differences in protein tyrosine phosphorylation between native and cryopreserved stallion sperm. During cryopreservations sperm often undergo undesirable changes similar to capacitation described as cryocapacitation. Sperm which undergo cryocapacitation changes are not suitable for fertilization.

In this work localization of phosphorylated proteins in native and cryopreserved samples was observed using immunofluorescence microscopy. Particular differences in the localization of the signal were observed. In native samples, dominated signal was located in the equatorial segment and sperm tail simultaneously, whilst in cryopreserved sperm dominated signal was located in the acrosome, equatorial segment, and sperm tail simultaneously. Detected signal was stronger in midpiece of a sperm tail in native samples, whilst in cryopreserved samples was signal equal throughout sperm tail. The observed signal in equatorial segment was equal in native sperm, in cryopreserved sperm it was located in the middle in a shape of a triangle. The presence of acrosome and signal of protein tyrosine phosphorylation was studied. The presence or absence of acrosome did not affect the signal in this area.

Using method of Western Blot imunodetection was detected measurement of signal of phosphorylated proteins in stallion sperm. In cryopreserved samples, more phosphorylated proteins were detected than in native samples. Differences in the measurement of observed signal between particular stallions were detected. In conclusion, stallions seem to have different sensitivity to cryopreservation and cryocapacitation.

Keywords: phosphorylation, sperm, stallion, capacitation, cryopreservation, cryocapacitation

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Spermie	11
3.2 Hřebčí spermie	11
3.2.1 Plazmatická membrána spermie	12
3.2.2 Hlavička spermie	13
3.2.3 Bičík spermie.....	14
3.3 Kapacitace spermie <i>in vivo</i>	15
3.3.1 Signální dráhy a zahájení kapacitace	16
3.3.2 Fosforylace proteinu tyrosinu během kapacitace	17
3.4 Kapacitace hřebčí spermie <i>in vitro</i>	18
3.4.1 Vliv média na kapacitaci	18
3.4.2 Energetický metabolismus hřebčích spermií.....	19
3.4.3 Změny v plazmatické membráně spermie.....	20
3.5 Hyperaktivace motility spermií	21
3.5.1 Vztah mezi Ca^{2+} a hyperaktivací.....	21
3.5.2 Souvislost mezi hyperaktivací a fosforylací během kapacitace hřebčí spermie	22
3.6 Kryokapacitace	23
3.7 IVF u koní	24
3.7.1 Produkce embryí <i>in vitro</i> u koní.....	25
4 Metodika	27
4.1 Imunofluorescenční mikroskopie	27
4.1.1 Odběr a zpracování ejakulátu	27
4.1.2 Příprava vzorků	28
4.2 Western blot imunodetekce	29
4.2.1 Příprava vzorků	29
4.2.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s přidavkem dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)	29
4.2.3 Elektropřenos (Western blot)	30
4.2.4 Inkubace s protilátkami	31
4.2.5 Detekce a zpracování dat.....	31
5 Výsledky	32
5.1 Využití vzorků	32
5.2 Lokalizace fosforylovaných proteinů spermií	32

5.2.1	Hodnocení signálu proti fosfotyrosinu u nativních vzorků hřebčích spermíí	35
5.2.2	Detekce přítomnosti akrozomu a signálu proti fosfotyrosinu u nativních vzorků.....	36
5.2.3	Hodnocení signálu proti fosfotyrosinu u kryokonzervovaných vzorků hřebčích spermíí	38
5.2.4	Detekce přítomnosti akrozomu a signálu proti fosfotyrosinu u kryokonzervovaných vzorků	40
5.2.5	Srovnání lokalizace fosforylovaných proteinů nativních a kryokonzervovaných vzorků hřebčích spermíí	42
5.2.6	Srovnání přítomnosti akrozomu a signálu proti fosfotyrosinu nativních a kryokonzervovaných vzorků	43
5.2.7	Hodnocení míry fosforylace hřebčích spermíí	45
6	Diskuze	53
7	Závěr	57
8	Literatura.....	58
9	Použité zkratky.....	67

1 Úvod

Ejakulované spermie nejsou schopné oplození, přestože jsou zralé a motilní. Aby byly schopné navázat se na zonu pellucidu oocytu, musí spermie projít sérií funkčních změn označovaných jako kapacitace. Kapacitace je proces zrání, který spermie podstupuje při průchodu samičím pohlavním traktem (Suarez 2002). Během kapacitace se mění metabolismus spermie, v plazmatické membráně dochází k redistribuci proteinů a effluxu cholesterolu, takže se stává mnohem fluidnější a dochází k hyperaktivaci motility bičíku. Změny na spermii vyvolané kapacitací jsou nezbytné pro dosažení akrozomální reakce a fúze s oocytem (Leemans et al. 2019a). U většiny druhů savců je možné dosáhnout kapacitace *in vitro* pomocí kultivace v médiu obsahujícím HCO_3^- , Ca^{2+} a albumin. Přesto tyto 3 iniciátory kapacitace nestačí k úplné kapacitaci hřebčích spermií. Hřebčí spermie kapacitované *in vitro* nejsou schopné akrozomální reakce. Z toho plyne specifický průběh kapacitace u koně (Tremoleda et al. 2003).

Během kapacitace dochází také k zahájení signálních drah fosforylace. Fosforylace proteinu tyrosinu má patrně velký vliv na hypermotilitu. Během kapacitace ale dochází k fosforylaci většího množství proteinů. Proto je fosforylace brána jako jeden z markeru kapacitace (McPartlin et al. 2008).

Kryokonzervace je jednou z využívaných reprodukčních metod. Přesto není u koní příliš úspěšná, jelikož hřebčí spermie jsou špatně mrazitelné. Kryokapacitace má na spermie často negativní vliv. Nezřídka dochází k nevratnému poškození spermií vyvolaných kryokapacitací. Kryokapacitace se velmi podobá běžné kapacitaci, ale je vyvolána stresem působícím na spermie během mrazení nebo rozmrazování (Naresh & Atreja 2015). Během kryokapacitace dochází též k tyrosinové fosforylaci proteinů spermií (Bailey et al. 2000). Jelikož je kryokapacitace vyvolána předčasně, nejsou tyto spermie schopné navázat se na zonu pellucidu a dosáhnout akrozomové reakce a oplození. Přesné mechanismy kapacitace u hřebčích spermií nejsou ještě plně známy (Leemans et al. 2019a). Na rozdíl od jiných druhů hospodářských zvířat, kdy jsou známy iniciační faktory kapacitace a ta je v *in vitro* podmínkách úspěšná a je tedy možné u těchto druhů dosáhnout *in vitro* fertilizace, u koní tento proces stále selhává. Pochopení principů kapacitace a vlivů kryokapacitace by mělo velký vliv na reprodukci koní. K tomuto pochopení může přispět detekování rozdílné fosforylace jako markeru kapacitace mezi nativními a kryokonzervovanými vzorky hřebčích spermií.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je pomocí lokalizace a míry fosforylace proteinů vyhodnotit kapacitační stav spermií hřebců před a po kryokonzervaci na základě hypotézy, že během kryokonzervace u spermií nastávají změny podobné kapacitaci označované jako kryokapacitace.

3 Literární rešerše

3.1 Spermie

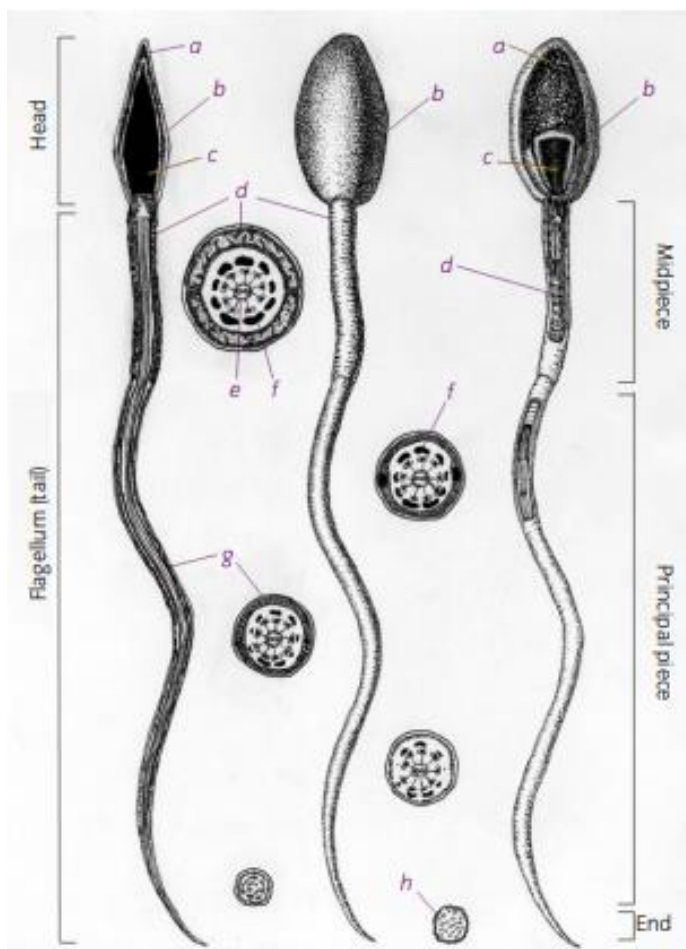
Spermie jsou samčí pohlavní buňky nesoucí genetickou informaci. Obsahují poloviční počet chromozomů, jsou tedy haploidní. Spermie vznikají spermatogenezí ve varleti a dozrávají a ukládají se v nadvarleti. Spermie opouštějící varlata jsou ještě nezralé a nepohyblivé. Až během průchodu nadvarletem zrají a získávají motilitu (Varner & Johnson 2007). Ale ani po ejakulaci stále ještě nejsou schopné oplodnit oocyt. To dokážou až po změnách vyvolaných kontaktem se samičím reprodukčním traktem. Tyto změny jsou souhrnně označovány jako kapacitace (Yanagimachi 1994).

3.2 Hřebčí spermie

Spermie savců se sice mohou morfologicky lišit, ale jejich struktura a stavba plazmatické membrány je podobná. Mezdruhové rozdíly jsou na první pohled patrné v rozdílné velikosti. Tato práce se zaměřuje na hřebčí spermie, ostatním druhům je věnováno méně pozornosti a jsou zmíněny spíše pro srovnání. Ejakulát koně obsahuje 25–100 x 10⁹ spermií/ml. Na množství a kvalitu spermií má vliv mnoho faktorů – věk, roční období, vyčerpání hřebce, plemeno atp. (Katila 1997). Velký počet spermií v ejakulátu je nutný, protože fertilizace *in vivo* je extrémně neefektivní proces. Pouze 0,0007 % ejakulovaných spermií dosáhne vejcovodu klisny, kde probíhá fertilizace (Rigby et al. 2000).

Hřebčí spermie mají podobnou strukturu jako spermie býka, člověka, kozla, kance a psa. Průměrná délka činí 61-86 μm. V porovnání s velikostí těla jsou hřebčí spermie menší než například u myši (123 μm), potkana (190 μm), křečka (189 μm), člověka (57 μm) (Cummins & Woodall 1985).

Spermie jsou členěny na hlavičku a bičík (viz obr. č.1). Hlavička obsahuje jádro s genetickou informací, kryté akrozomem a nízký počet cytosolických elementů. Bičík je organela pohybu. Celá spermie je kryta společnou plazmatickou membránou, která se rozděluje na regionální domény. Ty ovlivňují vlastnosti membrány: přilnavost k vejcovodu, průběh akrozomální reakce, aktivaci a hyperaktivaci motility, penetraci kumulem oocytu, adhezi a následnou fúzi pohlavních buněk (Varner et al. 2015).



Obrázek č. 1: Kresby stavby hřebčí spermie: středosažitální průřez (vlevo), celá spermie (uprostřed) a částečný průřez (vpravo). Podélná dělení spermii: vlevo hlavička (head) a bičík (flagellum), vpravo spojovací část (midpiece), hlavní část (principal piece) a koncová část bičíku (end). Další části: a. akrozom, b. plazmatická membrána, c. jádro, d. mitochondrie, e. axonema, f. vnější hustá vlákna, g. vláknité pouzdro, h. mikrotubuly axonemy. Upraveno podle Varner & Johnson (2007).

3.2.1 Plazmatická membrána spermie

Plazmatická membrána (PM) spermii je velmi složitá, heterogenní a dynamická dvouvrstvá struktura, která pokrývá celý povrch spermie (Flesch & Gadella 2000; Varner et al. 2015). Její složení a organizace jsou zodpovědné za afinitu spermie k vejcovodu, permeabilitu rozpuštěných látek, buněčnou signalizaci a fúzní procesy (Flesch & Gadella 2000). Je tvořena lipidy (zejména fosfolipidy), cholesterolem a proteiny. Lipidy tvoří dvojvrstvu s hydrofilními konci orientovanými ven a hydrofobními dovnitř (Juhász et al. 2000). Za normálních okolností jsou lipidy rozmístěné ve dvouvrstvě asymetricky (Friend 1982). Například u kanců jsou sfingomyelin, fosfatidylcholin a glykosfingolipidy umístěné přednostně na vnější vrstvě plazmatické membrány, zatímco jiné lipidy jako fosfatidylserin a aminofosfolipidy jsou umístěné spíše ve vnitřní vrstvě (Gadella et al. 1999). Mezi lipidy jsou rozmístěné proteiny. Některé z nich fungují jako transportní kanály nebo membránové receptory. Mnoho proteinů obsahuje sacharidové postranní řetězce schopné vázat jiné proteiny z okolního prostředí. Poměr

cholesterolu a fosfolipidů a povaha fosfolipidů ovlivňují pružnost membrány. Za běžných podmínek je membrána polotekutá (Hammerstedt et al. 1990; Juhász et al. 2000).

Během kapacitace podstupuje plazmatická membrána změny ve své struktuře, což vede ke ztrátě její běžné asymetrie (Harrison 1996). Zvyšuje se fluidita a dochází k reorganizaci lipidů, některé lipidy (např. fosfatidylserin, fosfatidylethanolamin) se přesouvají z vnitřní vrstvy membrány do vnější, a naopak lipidy vnější vrstvy (sfingomyelin, glykosfingolipidy) se přesouvají do vnitřní. Přesun lipidů vede ke zvýšení fluidity membrány, což usnadňuje odčerpání cholesterolu z plazmatické membrány (Gadella & Harrison 2002).

Plazmatická membrána spermie je diferencována na 4 segmenty: apikální čepičku, pre-ekvatoriální, ekvatoriální a post-ekvatoriální segment. Každý z těchto segmentů hraje při oplození specifickou roli. Apikální čepička zprostředkovává navázání na zonu pellucidu a spolu s pre-ekvatoriálním segmentem hraje roli při akrozomální reakci. Ekvatoriální segment zahajuje vazbu s plazmatickou membránou oocyty (oolemou) a následnou fúzi gamet (Gadella et al. 2008).

3.2.2 Hlavička spermie

Hlavička hřebčí spermie má eliptický tvar, je dorsoventrálně zploštělá a v apikální části se zužuje (Juhász et al. 2000). Hlavička je tvořena jádrem, akrozomem, postakrozomální laminou a implantační jamkou. Většinu hlavičky vyplňuje jádro s haploidním počtem chromozomů, nesoucí genetický materiál. Chromatin v jádře spermatické buňky je velmi kondenzovaný, zabírá pouze 5-10 % velikosti jádra somatické buňky. Jaderný obal sestává z dvojité lipidové membrány a na rozdíl od jaderné membrány somatických buněk neobsahuje téměř žádné póry. Ty se na membráně nacházejí pouze lokálně (Varner et al. 2015).

Jádro je kryto ze 2/3 akrozomem (Katia 1997, Juhász et al. 2000). Akrozom vzniká z Golgiho aparátu a během průchodu nadvarletem dokončuje morfologické a biochemické změny (Gerton 2002). Zralý akrozom obsahuje proteinové receptory a hydrolytické enzymy nutné pro přilnavost a penetraci zónou pellucidou a interakci s oolemmou. Mezi nejdůležitější enzymy patří proakrozin a hyaluronidáza (Gadella & Harrison 2002).

Akrozom je tvořen akrozomální matrix krytou membránou, rozdělenou na 2 části: vnitřní a vnější. Vnitřní část akrozomální membrány se napojuje na jaderný obal, vnější část leží pod plazmatickou membránou spermie. V oblasti ekvatoriálního segmentu se membrány sbíhají. Membránu akrozomu je možné rozdělit na apikální, hlavní a rovníkový segment. Rovníkový segment neobsahuje enzymy a neúčastní se akrozomální reakce, ale plazmatická membrána této oblasti splývá s membránou oocyty (Juhász et al. 2000). Během akrozomální reakce splyne vnější akrozomální membrána s plazmatickou membránou, která ji překrývá. Splynutím membrán vznikají póry, skrz které je uvolňován akrozomální obsah (Toshimori & Ito 2003). Postakrozomální segment může hrát roli během přichycení spermie k oocyty (Juhász et al. 2000).

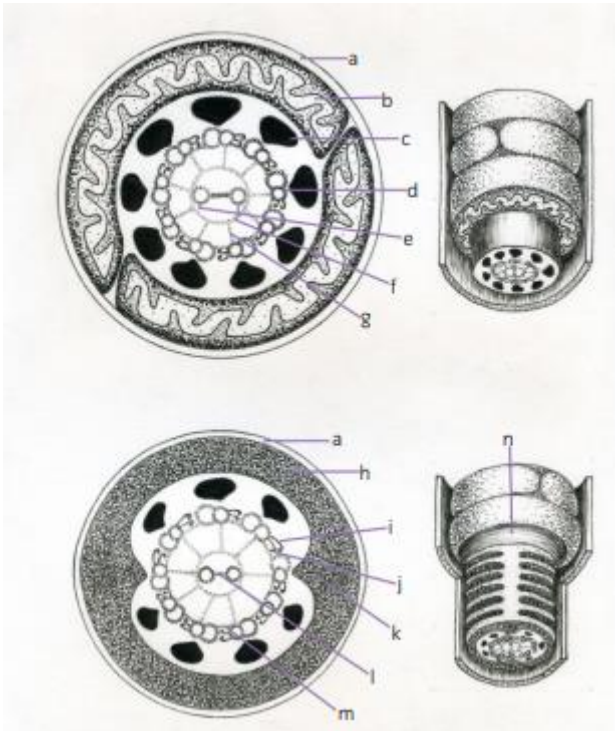
Implantační jamka je místo, kde se bičík připojuje k hlavičce. U hřebce se často nachází mimo osu spermie (Amman & Graham 1993; Johnson et al. 1997).

3.2.3 Bičík spermie

Bičík můžeme rozdělit na krček, střední (spojovací) část, hlavní část a koncovou část. Krček je oblast spojení mezi bičíkem a hlavičkou. Skládá se především ze segmentovaných sloupců vláken označovaných jako capitulum a proximálních a distálních centriol. Tato část slouží k připojení bičíku k hlavičce a tvorbě strukturálních složek bičíku. Capitulum se jemnými filamenty připojuje k bazální ploténce. Okolní centrioly vytvářejí spojovací část axonemy (hlavní cytoskeletární struktura bičíku) a základy hustých vláken (Varner et al. 2015). Tato oblast je velmi křehká, ale odsud je nejspíše zahájeno kmitání bičíku (Juhász et al. 2000).

Střední část je nejširší a sahá od kaudální oblasti krčku až k prstenci označovanému též annulus. Střední část bičíku obsahuje mitochondriální pochvu. Mitochondrie jsou spirálovitě uspořádány kolem hustých vláken obklopujících axonemu. Jejich funkcí je produkce ATP k pohybu bičíku. Délka střední části a počet mitochondrií je druhově rozdílná, u hřebce je to 40-50 mitochondrií (Varner et al. 2015). Poruchy v jejich počtu a uspořádání vedou až ke snížené plodnosti hřebců (Love et al. 2000). V centru mitochondrií je devět hustých vláken tvořených mikrotubulárními dublety, táhnoucích se od krčku celou střední a většinou hlavní částí. Tato hustá vlákna se nestahují, ale poskytují pružnost a pevnost. V jejich středu je stažitelná axonema (viz obr. 2; Varner et al. 2015). Centrální pár mikrotubulů je propojen spojovacím mostem a obklopen vláknitým pouzdem. Na pouzdro jsou připojené dublety, které jsou navzájem spojené nexinovými rameny. Hlavní složkou dubletů jsou tubulinové proteiny. Rozdělují se na válcovitou A podjednotkou a B podjednotkou tvaru C. Podjednotky A slouží k uchycení vnějších dyneinových ramének. Dyneinová raménka mají ATP aktivitu, jelikož slouží ke generování pohybu bičíku pomocí přibližování a oddalování A a B podjednotek sousedních dubletů. Vzájemné klouzání mezi dubletovými mikrotubuly vytváří pohyb bičíku (Varner et al. 2015).

Střední část přechází v hlavní část na prstenci (*annulus*, viz obr. č.2) v místě, kde je mitochondriální pouzdro z hustých vláken nahrazeno vláknitým pouzdem. V této oblasti seplazmatická membrána pojí pevně k cytoskeletálním strukturám (Juhász et al. 2000). Hlavní část je nejdelší částí spermie. Kromě axonemy a hustých vláken, obsahuje také vláknitou vrstvu, která slouží jako podpora pružnosti pohybu. Vlákenná vrstva se táhne po celé délce hlavní části a je tvořena 2 podélně uspořádanými vláknitými sloupci vzájemně propojených vláknitými žebry. Poskytuje bičíku nejen potřebnou podporu a elasticitu, ale také umožňuje buněčnou signalizaci a metabolické děje (Varner et al. 2015). Koncová část obsahuje pouze axonemu nebo jednotlivé mikrotubuly obklopené plazmatickou membránou (Amman & Graham 1993, Johnson et al. 1997, Juhász et al. 2000). Celý bičík kryje plazmatická membrána (Varner et al. 2015).



Obrázek č. 2: Příčný řez spojovací a hlavní části bičíku hřebčí spermie: a. plazmatická membrána (PM), b. mitochondrie, c. vnější hustá vlákna, d. axonemální dublet, e. centrální pár, f. radiální raménko, g. vláknité pouzdro (vrstva), h. prstenec (annulus), i. vnější dyneinové raménko, j. vnitřní dyneinové raménko, k. podélný sloupec (column) vláknitého pouzdra, l. spojovací most centrálního páru, m. nexinové spoje, n. plášť obklopující centrální pár. Upraveno podle Varner & Johnson 2007.

3.3 Kapacitace spermie *in vivo*

Oplození u savců je závislé na aktivaci spermií, označované jako kapacitace (Visconti et al. 2009). Kapacitace je proces zrání, který spermie podstupuje po ejakulaci během průchodu samičím pohlavním traktem. Po ejakulování zahájí životaschopné spermie transport do vejcovodu, kde dochází k oplození po setkání s vajíčkem. U některých druhů, včetně koně, mohou být nekapacitované spermie uloženy v rezervoáru spermií ve vejcovodu. Rezervoár se nachází v kaudální části vejcovodu označované jako isthmus (Suarez 2002). Zde jsou spermie uloženy, ale také zde dochází k výběru spermií s normální morfologií a progresivním pohybem (Scott & Overstreet 1998; Scott et al. 2000). Vazba spermie na vejcovod prodlužuje životaschopnost spermie, což je důležité, protože doba ejakulace (inseminace) a ovulace nejsou synchronizovány (Maitan et al. 2021a). Když se blíží ovulace, dochází ke kapacitaci spermií a hyperaktivaci motility potřebné k jejich uvolnění z epitelu vejcovodů a zahájení transportu ke zralému oocytu (Yanagimachi 1969; Suarez 2002). Po kontaktu se zonou pellucidou oocytu dochází k akrozomální reakci a fúzi spermie s oocytem. Pokud k ejakulaci (inseminaci) došlo v době ovulace, spermie nemusí být uloženy v isthmu a mohou rovnou postupovat vejcovodem k oocytu. To naznačuje, že uložení v rezervoáru není nutné pro zahájení kapacitace (Maitan et al. 2021a).

Po ejakulaci nebo inseminaci jsou hřebčí spermie transportovány z děložního těla klisny do vejcovodu pomocí kontrakcí dělohy (tzv. pasivní transport spermií) s malým přispěním aktivní motility spermií (Katila 2001). Pouze malé množství spermií doputuje do vejcovodu a podstoupí kapacitaci (Scott & Overstreet 1998). Do místa oplodnění se dostanou jen spermie s vynikající životaschopností, morfologií a pohyblivostí (Hunter et al. 1987; Fazeli et al. 1999). Mrtvé a poškozené spermie jsou fagocytovány. Během transportu do vejcovodu je nutné zabránit předčasné kapacitaci spermií. Proto jsou spermie během a po ejakulaci pokryty dekapacitačními faktory ze semenné plazmy (Maitan et al. 2021a).

Pouze kapacitované spermie jsou schopné oplodnit zralý oocyt. Hlavní pozorované děje kapacitace jsou hyperaktivace motility (potřebná pro pohyb spermie a penetraci zonou pellucidou) a změny v metabolismu buňky a uspořádání plazmatické membrány (Gadella 2008; Leemans et al. 2019a). Část látek pokrývajících povrch membrány je přesunuta, nebo povrch opouští. V membráně je redukován obsah cholesterolu, mění se struktura proteinů a glykoproteinů (Gadella & Harrison 2002). Tím se zvyšuje fluidita membrány. Právě redistribuce membránových lipidů umožní odčerpání cholesterolu. Díky tomu je spermie schopná akrozomální reakce a navázání na oocyt (Flesch et al. 2001a).

Tekutina vejcovodu ovlivňuje spermie mnoha způsoby, včetně kapacitace. Viskozita, objem a složení tekutiny vejcovodu se mění během estrálního cyklu. Viskozita se po ovulaci snižuje. Usnadňuje se tak transport spermií (Hunter et al. 2011). Důležité jsou i změny molekulárního složení (Killian 2011). Změny koncentrace lipidů (zejm. fosfolipidů) a cholesterolu mají vliv na fluiditu membrány. Další faktory jako hladina elektrolytů (Ca^{2+} , HCO_3^-), energetické substráty a další faktory, přispívají k vytvoření optimálních podmínek k oplození (Maitan et al. 2021a). Pravděpodobně hraje roli také pH vejcovodu. Předpokládá se, že u hřebců má nárůst pH vliv na kapacitaci (Leemans et al. 2014).

3.3.1 Signální dráhy a zahájení kapacitace

Během laboratorních pokusů bylo zjištěno, že po oddělení spermie od semenné plazmy dochází k rapidnímu zvýšení fluidity membrány, nárůstu koncentrace intracelulárního HCO_3^- a aktivace dráhy druhého posla zahrnující rozpustnou adenylátcyklázu a zvýšení intracelulárního Ca^{2+} (Gadella et al. 2008; Rathi et al. 2003). Nárůst HCO_3^- vede k aktivaci adenylátcyklázy. Enzym adenylátcykláza zahajuje tvorbu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) uvolňováním pyrofosfátu z adenosintrifosfátu (ATP). Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) je důležitý druhý posel, sloužící k přenosu signálu (Rall & Sutherland 1958). Jeho množství v buňce regulují fosfodiesterázy jeho degradací (Housler et al. 2010). Aktivace cAMP vede k vyčerpání cholesterolu z plazmatické membrány pomocí akceptorů cholesterolu, jako je například albumin. To umožní sérii funkčních změn a přeskupení lipidových domén na membráně směrem k apikálnímu konci hlavičky. Tyto domény obsahují komplexy proteinů vázajících se na zonu pellucidu (van Gestel et al. 2007). Zároveň produkce cAMP slouží k aktivaci proteinkinázy A (PKA) nutné k fosforylaci tyrosinu (Signorelli et al. 2012). Ta je spojována s hyperaktivací motility v bičíku spermie a je považována za marker esenciálních částí kapacitace. U různých

druhů je fosforylace proteinu tyrosinu na cAMP závislá. (Flesch et al. 1999; Harayama et al. 2012).

Kapacitace může být vyvolána také uměle pomocí inkubačního média bohatého na HCO_3^- , Ca^{2+} a albumin (Gadella et al. 2008). Nejprve je spermie nutné pomocí centrifugace oddělit od semenné plazmy a poté vložit do média. HCO_3^- , Ca^{2+} a albumin jsou u většiny druhů tři hlavní kapacitační faktory spouštějící změny na spermii nutné k získání oplozovací schopnosti (Leemans et al. 2019a). U některých druhů byly identifikovány specifické iniciační faktory kapacitace. Např. u skotu jsou to glykosaminoglykany (Chamberland et al. 2001). Naneštěstí přesné složení média a potřebné podmínky spouštějící kapacitaci *in vitro* u koní zatím nebyly objeveny. Použitím tří základních kapacitačních faktorů dochází pouze k částečné kapacitaci hřebčích spermií (McPartlin et al. 2008; Leemans et al. 2016b).

3.3.2 Fosforylace proteinu tyrosinu během kapacitace

Fosforylace proteinů je jeden z regulačních mechanismů pro kontrolu různých buněčných procesů. Ve spermiích serin/threonin a tyrosin podléhají fosforylaci. Fosforylace tyrosinu patří mezi indikátory kapacitace (Urner et al. 2001). Z výsledků mnoha studií vyplývá zásadní vliv fosforylace tyrosinu v proteinech (PTP) na funkci spermií a indikaci kapacitace (Brener et al. 2003). U myši bylo prokázáno, že inhibice PTP brání kapacitaci, akrozomální reakci a zamezí úspěšné *in vitro* fertilizaci (IVF) (Urner et al. 2001; Visconti 2009).

Fosforylaci ovlivňují podobné faktory jako kapacitaci: snížení cholesterolu, nárůst HCO_3^- , zvýšení hladiny intracelulárního Ca^{2+} , cAMP, volných radikálů (ROS). Kinázy regulované extracelulárním signálem, cAMP/PKA jsou důležité signální dráhy zapojené do fosforylace proteinů spermie (Naresh & Atreja 2015).

PTP byla pozorována v rozdílných lokacích na spermii během kapacitace i navázání spermie na zonu pellucidu (Urner et al. 2001). Proteinů podstupujících fosforylaci během kapacitace je na celé spermii mnoho. Jsou rozmístěny na ekvatoriálním segmentu hlavičky a po celém bičíku (Naresh & Atreja 2015). Nejvíce PTP probíhá na bičíku spermie a předpokládá se, že hraje zásadní roli během hyperaktivace (Saccary et al. 2013).

Během redistribuce proteinů do oblasti krčku a akrozomu dochází u lidských spermií též k fosforylaci tyrozinu, což má vliv na vazbu spermie se zónou pellucidou (Sati et al. 2013). U myši, člověka a křečka byla fosforylace prokázána u kotevních proteinů kinázy A: AKAP3 a AKAP4. Tyto proteiny se nachází na vláknitém pouzdře bičíku a slouží k regulaci motility. Protein CABYR (protein vázající vápník u lidské spermie) také podléhá regulaci PTP a má pravděpodobně vliv na hyperaktivaci motility spermie. Fosforylaci podstupují také proteiny cytoskeletu, včetně spektrinu, tubulinů, dyneinu a aktinu (Brener et al. 2003).

Pomocí průtokové cytometrie se prokázalo, že u kanců ne všechny spermie podstupují fosforylaci tyrosinu v závislosti na podmínkách kapacitace a kryokonzervace. Existují dílčí

populace spermií vykazující různou citlivost na fosforylaci tyrosinu (Kumaresan et al. 2012). PTP hraje roli v přípravě spermie na podstoupení akrozomální reakce a oplození. Ačkoli PTP je považována za důležitou součást kapacity, přesný vztah mezi fosforylací a schopností oplodnit oocyt není znám (Naresh & Atreja 2015).

3.4 Kapacitace hřebčí spermie *in vitro*

V porovnání s ostatními druhy savců konvenční *in vitro* fertilizace (IVF) u koní není příliš úspěšná. V *in vitro* podmínkách nejsou hřebčí spermie schopné penetrovat zonu pellucidu, nejčastěji kvůli neúplné aktivaci (kapacitaci) spermie (Tremoleda et al. 2003). Pokud jsou spermie vystaveny vhodným iniciátorům kapacity, dojde k zahájení molekulárních a biochemických procesů vedoucích ke změnám v plazmatické membráně a cytoplazmě. Na úrovni plazmatické membrány dochází ke zvýšení fluidity, snížení obsahu cholesterolu a přeskupení lipidů. Součástí cytoplazmatických změn je fosforylace proteinů, zvýšení pH a koncentrací cAMP a Ca^{2+} . Tyto procesy vedou ke změnám motility spermie z progresivního pohybu do hyperaktivovaného a zahájení akrozomové reakce. U většiny savců (zejm. hospodářských zvířat) byly popsány specifické iniciační faktory kapacity. Bohužel žádný z popsaných iniciačních faktorů nedokáže vyvolat úplnou kapacitaci hřebčích spermií. Nicméně znalost průběhu kapacity a spouštěče u jiných druhů savců nám může pomoci pochopit procesy vedoucí ke kapacitaci hřebčích spermií (Leemans et al. 2019a).

Kapacitace spermie je nezbytný krok pro další děj vedoucí k oplození – akrozomální reakci (Okabe M. 2016). Jako indikátor úspěšné kapacity se považuje schopnost spermie vazby se zónou pellucidou, nebo schopnost reagovat na progesteron (Cross & Razy-Faulkner 1997, McPartlin et al. 2008). Spermie, která podstoupí kapacitaci by měla být schopná úspěšně fúzovat s oocytem. Pro hodnocení kapacitačního stavu spermií se s oblibou využívá barvení chlortetracyklinem, který reaguje s Ca^{2+} , a lze tak odlišit fáze zrání spermií: před kapacitací, kapacitované s intaktním akrozomem a kapacitované se zreagovaným akrozomem (Gadella & Harrison 2002).

3.4.1 Vliv média na kapacitaci

Od počátku popsání kapacity r. 1951 Austinem a Changem (Austin 1951; Chang 1951) začaly pokusy s docílením kapacity v *in vitro* podmínkách pomocí vhodného inkubačního média (Gadella et al. 2002). Kapacitační média se skládají z proteinového komponentu (nejčastěji serum albumin skotu BSA) a energetického substrátu (pyruvát, laktát, glukóza), dále obsahují Ca^{2+} a $NaHCO_3^-$ (Kopf et al. 1999). Přesná role Ca^{2+} v procesu kapacity zatím není jasná. Pravděpodobně má zásadní vliv na hyperaktivaci motility. Předpokládá se, že serum albumin působí jako vychytávač cholesterolu z plazmatické membrány. Odstranění cholesterolu vede ke snížení poměru cholesterolu a fosfolipidů, což má vliv na transmembránovou signalizaci a další buněčné funkce. Hydrogenuhlíčitan byl prokázán jako klíčový pro kapacitaci řady druhů. Zajímavé je, že v nadvarletí je jeho koncentrace nízká, ale ve vejcovodu vysoká. Studie

prokázaly, že jeho funkcí je stimulace adenylátcyklázy, což vede k zvýšení koncentrace cAMP a aktivaci PKA (Gadella & Harrison 2000; Gadella et al. 2002; Signorelli et al. 2012).

Přesné složení média a potřebné podmínky k inkubaci hřebčích spermií zatím nejsou známy. U spermií inkubovaných po 4-6 h ve Whittenově médiu (MW) obohaceném o NaHCO_3^- a BSA (kapacitační médium) byla naměřena vysoká úroveň fosforylace proteinu tyrosinu. Pokud byla do MW média přidána membránou propustná forma cAMP a fosfodiesterázový inhibitor (IBMX) bez přítomnosti HCO_3^- a BSA, fosforylace nebyla vyvolána. Z toho vyplývá, že k vyvolání fosforylace pouze cAMP nestačí a hřebčí spermie v porovnání s ostatními savci reagují specificky na dané komponenty média. Inkubace spermií v určitých kapacitačních podmínkách se pojila s vysokým procentem akrozomální exocytózy. Pokud bylo použito médium bez přítomnosti BSA a NaHCO_3^- , docházelo při vystavení spermií progesteronu k exocytóze 44,6 % spermií, při vystavení ionoforu vápníku exocytóza dosahovala 51,6 % (McPartlin et al. 2008).

Některé kapacitační procesy ovlivňuje pH prostředí. Zvýšení pH média vyvolá zvýšení cytoplazmatického pH, což vede k zahájení fosforylace proteinu tyrosinu (PTP) v bičíku spermie (González Fernández et al. 2012; González Fernández et al. 2013). Navíc k hypermotilitě, závislé na nárůstu Ca^{2+} uvnitř buňky, dochází pouze při zvýšení pH média (Loux et al. 2013). Hodnota pH pro motilitu spermií je druhově specifická. Maximální motilita spermií byla naměřena u býka při pH 7,0–8,1, u berana při pH 7,5–8,0, u člověka pH 7,8 a u hřebce při pH 7,0. Vhodné pH umožňuje symetrický pohyb bičíku a tím progresivní pohyb spermií vpřed (Leemans et al. 2019a). K hypermotilitě dochází u hřebců při zvýšení pH z 7,4 na 7,9 (Leemans et al. 2019b).

Při inkubaci hřebčích spermií v kapacitačních podmínkách při pH 7,4 má Ca^{2+} inhibiční účinek na fosforylaci díky komplexu Ca^{2+} /kalmomodulin podporující fosfatázovou aktivitu (Gonzalez-Fernandez et al. 2012). Naopak hodnota pH mezi 7,4 až 7,9 zahajuje hypermotilitu spermií závislou na Ca^{2+} (Loux et al. 2013; Leemans et al. 2019a).

Na modelu využívajícím spermie zbavené plazmatické membrány Loux et al. (2014) dokázali, že zvýšení extracelulárního Ca^{2+} nevyvolává hyperaktivaci hřebčích spermií bez ohledu na hodnotu pH. Oproti tomu zvýšení pH vyvolalo jak hyperaktivovanou motilitu, tak nárůst cytoplazmatického Ca^{2+} . Loux et al. (2013) pozoroval nárůst pH z 7,1 na 7,3–7,4 během hyperaktivace. Podle těchto studií samotné Ca^{2+} na hyperaktivaci motility nestačí a naznačují nezanedbatelnou roli změny pH v procesu kapacitace (Leemans et al. 2019a).

3.4.2 Energetický metabolismus hřebčích spermií

Kapacitace a další procesy vedoucí k oplození vyžadují velké množství energie. Aby byly splněny vysoké nároky na energii, musí spermie generovat velké množství adenosintrifosfátu (ATP). U většiny savců, včetně člověka závisí pohyblivost spermie a integrita membrány hlavně na ATP získaném pomocí glykolýzy, tedy anaerobním rozkladem glukózy (Mucui & Okuno

2004; Storey 2008; du Plessis et al. 2015). Glykolyzovatelné substráty mohou být přítomny v semenné tekutině (člověk, býk), nebo v samičím pohlavním traktu (prase, ovce, myš). Enzymatická aktivita glykolýzy byla detekována v savčích kančích a myších spermích. Enzymy související s glykolýzou jsou lokalizovány v bičíku spermii (Mucai & Okuno 2004).

Omezení mitochondriálního dýchání vede k prudkému snížení koncentrace ATP v cytoplazmě hřebčí spermie, což vedlo k téměř úplnému zastavení pohyblivosti spermie (Davila et al. 2016). Podle Gibb et al. (2014) jsou hřebčí spermie závislé na aerobní produkci ATP. Zvýšení koncentrace aerobně produkovaného ATP vede k nárůstu volných radikálů (ROS) a jejich redukováných forem. Jako ochranu vůči oxidativnímu stresu obsahuje hřebčí semenná plazma vysoké koncentrace antioxidantů (katalázu, ergothionin, superoxid dismutázu, glutathionin). Zásoba antioxidantů může být vyčerpána a její nedostatek může vést k buněčné smrti (Leemans et al. 2019a). Studie Gibb et al. (2014) vedla k překvapivému pozorování závislosti oxidativního stresu a plodnosti spermii. U hřebců, kteří dosahovali vyšší oplozovací úspěšnosti, bylo nalezeno větší množství spermii, které měly procentuálně více porušené membrány a také vyšší procento poškození buňky vyvolané oxidativním stresem. Předpokládá se tedy, že plodnější hřebci produkují více metabolicky aktivní spermie, které vykazují vyšší hladinu oxidativní fosforylace a následně vyšší hladiny reaktivních forem kyslíku – ROS (Leemans et al. 2019a). ROS vznikají následkem energetického metabolismu buňky (Aitken et al. 1997). Tvorba ROS vede ke zvýšené oxidaci lipidů, ale také ke zhoršené pohyblivosti a integritě membrány plodnějších hřebců. Možným vysvětlením by mohl být rychlejší metabolismus spermii vysoce plodných hřebců, který má za následek zvýšení oxidativní fosforylace v mitochondriích, a tím i generování většího množství ROS (Davila et al. 2015). Na základě toho se dá předpokládat, že se spermie plodných hřebců rychleji vyčerpávají, ale úspěšně podstupují kapacitaci a získávají oplozovací schopnost (Gibb & Aitken 2016). To vedlo k teorii, že spermie těchto hřebců „žijí rychle a umírají mladé“ (Leemans et al. 2019a).

3.4.3 Změny v plazmatické membráně spermie

Redistribuce fosfolipidů PM na hlavičce spermie je klíčovým krokem kapacitace. HCO_3^- rozpustná adenylátcykláza a cAMP zprostředkovávají zvýšení fluidity membrány, a tím umožnění distribuce cholesterolu z ekvatoriálního segmentu směrem k apikálnímu konci a přesunutí lipidů opačným směrem. Cholesterol a lipidy jsou považovány za stabilizátory plazmatické membrány, které brání fúzi membrán před kapacitací. HCO_3^- umožňuje přeskupování lipidů a uvolňování cholesterolu, což zvýší tekutost membrány (Leemans et al. 2019a).

V *in vitro* podmínkách může být dosaženo extrakce cholesterolu oxidací membránových sterolů, nebo pomocí aktivních transportérů cholesterolu (Flesch et al. 2001a). Nezbytná pro formaci oxysterolů (oxidované deriváty sterolů, hlavně cholesterolu) je produkce ROS. Tento proces má pravděpodobně také vliv na regulaci fosforylace proteinů pomocí produkce cAMP a potlačením tyrosin fosfatázové aktivity (Leemans et al. 2019a). Oxysteroly jsou více hydrofilní než samotný cholesterol, a tak mohou snáz cestovat skrz plazmatickou membránu a navázat se

na akceptor sterolu, např. albumin. Přítomnost BSA v médiu je esenciální kvůli jeho schopnosti pohlcovat hydrofilní produkty oxidace, a tím usnadňovat extrakci cholesterolu (Boerke et al. 2008). Alternativní makromolekulou, kterou lze využít k extrakci cholesterolu, je methyl- β -cyclodextrin. Ten ale není pro zvířata přirozený. Zatímco albumin extrahuje 20 % cholesterolu, methyl- β -cyclodextrin extrahuje 50 % cholesterolu z plazmatické membrány spermie. Nevýhodou je, že methyl- β -cyclodextrin může mít na spermie negativní vliv. Jeho zhoršující účinek na index oplodnění byl popsán také na myších oocytech. Také u déle inkubovaných oocytů vyvolal buněčnou smrt, způsobenou jinými, než běžně známými apoptickými dráhami (Buschiazzi et al. 2013).

U hřebčích spermií zajištění standardních kapacitačních podmínek (HCO_3^- , Ca^{2+} , BSA) neznamená snažší uvolňování cholesterolu z plazmatické membrány. Ačkoli HCO_3^- vyvolává nárůst ROS, jeho efekt je zrušen přidáním Ca^{2+} nebo albuminu. Výsledky studií naznačují specifický rozdíl v remodelaci plazmatické membrány během kapacitace hřebčích spermií oproti jiným druhům savců (Macias Garcia et al. 2015). Maitan et al. (2021b) přišel s hypotézou, že u hřebčích spermií dochází oproti jiným druhům savců k malému uvolňování cholesterolu z PM.

3.5 Hyperaktivace motility spermií

Hyperaktivace je nutná pro získání rychlosti a odlepení spermie z oviduktárního rezervoáru, migraci oviduktem a následnou penetraci kumulární matrix a zonou pellucidou ovulovaného oocytu (Stauss et al. 1995). U savců je motilita zajišťována ATP, HCO_3^- a Ca^{2+} a řízena fosforylací proteinů bičíku závislou na cAMP (Tash 1989; Ho et al. 2002).

Hyperaktivaci vyvolává a udržuje příliv Ca^{2+} do cytosolu bičíku (Ho et al. 2002). U mnoha druhů je hyperaktivace charakterizována velkou amplitudou kmitání připomínající pohyb biče (Yanagimachi 1994). Ca^{2+} přímo reguluje rozpustné adenylátcyklázy, které mají vliv na produkci cAMP a aktivaci PKA, která vyvolá fosforylací tyrosinové kinázy v bičíku spermie. Defosforylací dyneinu zajišťuje serin/threoninová fosfatáza a kalcineurin (Tash & Bracho 1994). Pokud je aktivita serin/threoninové fosfatázy dominantní, spermie jsou nepohyblivé. U některých druhů savců bylo popsáno, že dominantní serin/threoninová kináza naopak souvisí se zvýšenou pohyblivostí spermií (člověk, makak *Rhesus*: Smith et al. 1996; býk: Vijayaraghavan et al. 1996).

3.5.1 Vztah mezi Ca^{2+} a hyperaktivací

Jak již bylo zmíněno výše, hyperaktivaci vyvolává a udržuje nárůst Ca^{2+} v cytosolu bičíku. Progresivní pohyb býčích spermií zbavených membrány byl zachován při intracelulární koncentraci Ca^{2+} ~50 nM. Během hyperaktivace stoupla koncentrace Ca^{2+} na 400 nM (Ho et al. 2002). Loux et al. (2014) uvedl, že stupeň hyperaktivované motility hřebčích spermií nepřímo souvisí s hladinou cytoplazmatického Ca^{2+} . Jako silný induktor hyperaktivace se u hřebců dá využít také prokain, který působí nezávisle na extracelulárním Ca^{2+} . Z těchto studií vyplývá druhově specifická citlivost na Ca^{2+} a hyperaktivaci spermií u koně (Loux et al. 2013)

Spermie některých druhů, včetně člověka, získávají Ca^{2+} z intracelulárního prostředí pomocí CatSper kanálů přítomných v membráně bičíku (Hwang et al. 2019). Hlavním spouštěčem těchto kanálů je zvýšení pH tekutiny vejcovodu. Kontakt spermie a alkalického prostředí oviduktu CatSper kanály aktivuje (Leemans et al. 2019a). Aktivací dojde k otevření CatSper kanálů, což umožní průnik extracelulárních iontů Ca^{2+} do buňky. Tím je vyslán signál pro zahájení hyperaktivovaného kmitání bičíku (Hwang et al. 2019). Podle Loux et al. (2013) je citlivost proteinu CATSPER1 na pH druhově specifická. V hřebčích spermiích byla nalezena mRNA CATSPER1 a protein CATSPER1 byl lokalizován v hlavní části bičíku. U hřebce je předpokládán slabý vztah mezi hyperaktivitou spermií a extracelulárním zdrojem Ca^{2+} (Loux et al. 2013; Leemans et al. 2019a). Zvýšení pH oviduktu a následné zvýšení cytoplazmatického pH spermie vedoucí k aktivaci CatSper kanálů bylo pozorováno u makaků Rhesus. U lidí bylo pro změnu prokázáno, že je možné CatSper kanály aktivovat progesteronem a prostaglandinem (Lishko et al. 2011).

Kromě extracelulárního přílivu Ca^{2+} přes CatSper kanály existují také intracelulární zdroje Ca^{2+} uložené v tzv. redundantním jaderném obalu (RNE – redundant nuclear envelope), umístěné na bázi bičíku, schopné poskytnout Ca^{2+} pro cytoplazmu buňky (Ho & Suarez 2001; 2003). Vliv intracelulárních zdrojů Ca^{2+} na zahájení hyperaktivace spermie u hřebců je zatím pouze teoretický (Leemans et al. 2019a). Extracelulární i intracelulární zdroj Ca^{2+} přispívá k nárůstu a udržení vysoké koncentrace Ca^{2+} během hyperaktivace motility. Navíc se předpokládá podíl aktivace CatSper kanálů na následné akrozomální reakci spermií (Quill et al. 2003).

U myších spermií bylo dosaženo hyperaktivace pomocí Ca^{2+} ionoforů, např. A23187, nebo ionomycinu (Tateno et al. 2013). Přesto podobný pokus u koně vedl k úplné ztrátě motility a membránové integrity spermií do 1 hodiny (Rathi et al. 2001). Je možné, že tento nepříznivý vliv Ca^{2+} ionoforů je zapříčiněn faktem, že hřebčí spermie jsou energeticky závislé na mitochondriální ATP. V tom případě může nadbytečná koncentrace Ca^{2+} vést k mitochondriálnímu selhání a buněčné smrti (Contreras et al. 2010). Navíc ionofory Ca^{2+} brání oxidativní fosforylaci inhibicí mitochondriální ATPázové aktivity. Při narušení tvorby mitochondriální ATP rychle dochází k poruchám motility a integrity membrány (Gibb et al. 2014; Davila et al. 2016). To je v *in vitro* podmínkách velký problém, protože je nutné zachovat životaschopnost a pohyblivost spermií několik hodin. U myší byly vyzkoušeny i jiné spouštěče uvolňování intracelulárních Ca^{2+} : kofein, thapsigargin, thimerosal, všechny evokující asymetrické kmitání bičíku. Účinek těchto molekul na cytoplazmatickou koncentraci Ca^{2+} a hyperaktivaci u hřebčích spermií zatím nebyl studován (Ho & Suarez 2001).

3.5.2 Souvislost mezi hyperaktivací a fosforylací během kapacitace hřebčí spermie

Hyperaktivace se pojí s fosforylací tyrosinu bičíku, která je závislá na hladině cAMP. Proteinkináza A je spojena s bičíkem pomocí kotvících proteinů (AKAP), které mají význam při aktivaci tyrosinkináz a následné fosforylaci proteinů (Leemans et al. 2019a). Nezávisle na PKA se na motilitě podílí Ca^{2+} . Ten váže kalmodulin z hlavní části bičíku. Tato

vazba aktivuje kinázy na nich závislé. Kinázy dále fosforylují konkrétní axonemální proteiny, a tím vyvolávají hyperaktivaci (Suarez 2008). Kinázy se tedy pojí s hyperaktivací motility. Oproti tomu fosfatázy působí jako antagonisté kináz a regulují ATPázy dyneinu (Leemans et al. 2019a).

Jak už bylo zmíněno výše, u většiny savců je prokázána souvislost mezi zvýšením cAMP/PKA a Ca^{2+} /kalmodulin dependentní kinázovou aktivitou, která indukuje tyrosinovou fosforylaci proteinů bičíku spermie, a tím ovlivnění klouzání mikrotubulů bičíku (Leemans et al. 2019a). Překvapivě hyperaktivace motility a fosforylace proteinů může nastat nezávisle na sobě (Marquez & Suarez 2004). Tato pozorování se u hřebčích spermií potvrdila. Například rozpustná adenylátcykláza (typ 10) indukuje fosforylaci proteinu na tyrosinu bez zahájení hyperaktivace (McPartlin et al. 2011). Zvýšená aktivita PKA a fosforylace proteinů bez hyperaktivace byla pozorována u hřebčích spermií *in vitro* podmínkách s rozpustnými analogy cAMP nebo inhibítorem fosfodiesterázy, kterým je kofein (Pommer et al. 2003). Stejně tak vazba spermie na preovulační epitel oviduktu *in vivo* indukuje fosforylaci bez vyvolání hyperaktivace. Fosforylaci v tomto případě vyvolává primárně vysoké pH v prostředí oviduktu (Leemans et al. 2014).

Oproti jiným druhům savců nedochází u hřebčích spermií k zvýšení koncentrace Ca^{2+} ani hyperaktivaci motility po vystavení progesteronu nebo prostaglandinu E_1 (Loux et al. 2013). Byly popsány také další spouštěče hypermotility hřebčích spermií, které ale nepodporují fosforylaci v bičíku spermie. Kupříkladu tři základní parametry progresivní motility (přímočarost, přímočará rychlost, linearita) byly u hřebce sníženy při inkubaci v 10% folikulární tekutině, což indukuje hyperaktivovanou motilitu (Lange-Consiglio & Cremonesi 2012). Také Leemans et al. (2015b) prokázali při vystavení hřebčích spermií alkalické folikulární tekutině hyperaktivovanou motilitu spermii. Podobně indukoval hypermotilitu také prokain. Obě látky ale nezpůsobily fosforylaci proteinů spermie (McPartlin et al. 2009; Leemans et al. 2015a).

3.6 Kryokapacitace

Kryokonzervace spermatu vystavuje spermie stresu, který často vede ke změnám připomínajícím kapacitaci – tzv. kryokapacitaci (Naresh & Atreja 2015). Během kryokapacitace je pozorováno předčasné zahájení fosforylace tyrosinu (Bailey et al. 2000; Watson 2000) a zvýšení fluidity membrány (Ortega-Ferrusola et al. 2017). Poškození vzniklé chlazením způsobuje aktivaci intracelulárních drah jako cAMP a Ca^{2+} , a tím dochází k vyvolání jevů podobných kapacitaci. Po kryokonzervaci spermie vykazovaly zvýšené hodnoty intracelulárního Ca^{2+} , ROS a sníženou antioxidační kapacitu (Leemans et al. 2019a). Postup zmrazování a rozmrazování během kryokonzervace velmi ovlivňuje fosforylaci tyrosinu. Proces PTP je během kryokapacitace narušen. Kumar et al. (2012) ve své studii buvolích spermií vyzoroval nárůst PTP ze 2 proteinů u spermií čerstvé dávky na 9 proteinů u kryokonzervované dávky. Kryokapacitované spermie obvykle vykazují jiné vzorce fosforylace proteinů než *in vitro* kapacitované spermie. Spermie, které podstoupily PTP během kryokonzervace, měly prokazatelně sníženou schopnost vazby na zonu pellucidu oproti spermii kapacitovaným *in vitro*. To by mohlo vysvětlovat sníženou schopnost oplození u kryokonzervovaných spermií (Naresh & Atreja 2015).

Studie Ortega-Ferrusola et al. (2017) prověřovala vliv kryokonzervace hřebčích spermií na apoptózu a předčasné změny podobné kapacitaci. Výsledky studie odhalily, že během kryokonzervace dochází ke zvýšení aktivity kaspázy 3, translokaci fosfatidylserinu z vnitřní do vnější lipidové dvojvrstvy plazmatické membrány, snížení mitochondriálního membránového potenciálu a zvýšení koncentrace Na^+ v cytoplazmě. Všechny tyto změny naznačují přítomnost apoptického procesu kryokonzervovaných hřebčích spermií (Ortega-Ferrusola et al. 2017).

Úprava kryokonzervačního média by mohla snížit negativní vliv kryokonzervace. Běžným celosvětově využívaným postupem pro zvýšení kvality hřebčích spermií po rozmrazení je odstranění téměř celé semenné plazmy před zmrazením (Love et al. 2005). Absence semenné plazmy u kryokonzervovaných vzorků má možná negativní vliv na samotné mrazení, protože se předpokládá, že různé faktory přítomné v semenné plazmě mají vliv na zmrazení, motilitu a metabolismus spermií (Töpfer-Petersen et al. 2005). Oproti tomu přidání semenné plazmy po rozmrazení snížilo PTP u hřebčích a kančích kryokonzervovaných spermií (de Andrade et al. 2012). Proteiny semenné plazmy mají zřejmě významný vliv na fyziologii spermií. Přidání proteinů semenné plazmy při kryokonzervaci mělo vliv na zlepšení přežitelnosti a funkčních parametrů spermií. Přesto je ale přesná role mnoha těchto proteinů neznámá (Calvette et al. 1994, Bubenickova et al. 2020).

Pro lepší pochopení kapacity je potřeba objasnit rozdíly mezi *in vitro* kapacitovanými spermiemi a kryokapacitovanými spermiemi. Výzkum zaměřený na proteiny podstupující fosforylaci tyrosinu během kapacity a kryokapacity by mohl vést k lepšímu chápání celého procesu a zlepšení uchovávání spermií (Naresh & Atreja 2015).

3.7 IVF u koní

Konvenční metoda *in vitro* fertilizace (IVF) zahrnuje společnou inkubaci zralých oocytů se spermiemi v petriho misce. Dochází tak k samovolnému oplození. Jedná se o standardní proces využívaný k produkci embryí různých druhů včetně člověka, skotu, prasat a různých laboratorních zvířat (Leemans et al 2019). Tato metoda ale není u koní příliš úspěšná. Úspěchu brání neschopnost hřebčích spermií proniknout zónou pellucidou *in vitro* (Tremoleda et al. 2003). Předpokládalo se, že je to způsobeno buď *in vitro* neúplně kapacitovanou spermií, nebo *in vitro* dozrávajícím oocytem. Bylo prokázáno, že oocyty produkované *in vitro* je možné oplodnit *in vivo* v oviduktu (Hinrichs et al. 2002), ale oocyty zralé *in vivo* není možné oplodnit *in vitro*. Z toho vyplývá problém se spermií (Palmer et al. 1991). Neschopnost spermií proniknout zónou pellucidou *in vitro* je pravděpodobně způsobeno nedostatečnou kapacitací a aktivací spermie (Tremoleda et al. 2003). Ačkoli je již možné dosáhnout navázání hřebčích spermií na zónu pellucidu, nedochází k zahájení akrozomové reakce, a tudíž ani k oplození oocytu (Tremoleda et al. 2003). V porovnání s ostatními druhy postrádají hřebčí spermie produkované za obvyklých podmínek IVF (kultivace v médiu s obsahem HCO_3^- , Ca^{2+} a albuminu) také další znaky kapacitovaných spermií jako je hyperaktivita, zvýšení fluidity membrány a fosforylace proteinu tyrosinu (Tremoleda et al. 2003).

Na celém světě se narodila pouze 2 hříbata metodou IVF. Povedlo se to v letech 1990-91 (Palmer et al. 1991). Úspěch je přičítán inkubaci oocytů se spermii obohacenými o ionty vápníku. Bohužel tento postup se ukázal jako nereprodukovatelný. Snaha navázat na tyto pokusy vedla k velmi špatným výsledkům (Leemans et al. 2016a). Během poslední dekády se spekulovalo o využití prokainu v IVF médiu. Prokain patří mezi aminoestery a využívá se jako lokální anestetikum. U hřebčích spermií indukuje hyperaktivitu (McPartlin et al. 2009). Dokonce prokain může vyvolat hyperaktivaci hřebčích spermií v kapacitačním médiu neobsahujícím Ca^{2+} (Loux et al. 2013). Takto indukované hyperaktivace se podle všeho neúčastní CatSper kanály, které slouží jako běžný zdroj Ca^{2+} . Fosforylace proteinu byla v tomto případě pravděpodobně vyvolána jinými složkami média, nebo vysokou hladinou pH (McPartlin et al. 2009). Při těchto pokusech se ale žádný z inkubovaných oocytů nevyvinul do stádia blastocysty. Leemans et al. (2015a) prokázal, že prokain sice vyvolal hyperaktivaci spermií a dělení oocytů, ale k aktivaci oocytu nedošlo. Navíc bylo prokázáno, že množství prokainu nutné pro hypermotilitu spermií je pro DNA toxické (Leemans et al. 2015a). Spíše, než pravé oplození prokain způsobil fragmentaci DNA s degenerací štěpení blastomer ve stádiu 8-16 buněk (Leemans et al. 2019a). Aby se předešlo dezinterpretaci, musí se oplození potvrzovat přesnými metodami. Přítomnost 2 pronukleí není dostačující k odlišení oplození od partenogeneze u koní (Leemans et al. 2015a).

3.7.1 Produkce embryí *in vitro* u koní

V reprodukci koní se v ČR běžně s dobrými výsledky využívá metod přirozené plemenitby a inseminace. Na popularitě získává embryotransfer zamrazených embryí. Výhodou je zisk až pěti potomků od jedné klisny za sezonu. Další možností je produkce koňských embryí *in vitro* (IVP). Jelikož klasická IVF u koní selhává, skládá se tato metoda z aspirace a následné maturace oocytů, oplození intracytoplazmatickou injekcí spermií (ICSI) a kultivace embrya v laboratoři. Nejprve je nutné pomocí metody ovum pick up (OPU) získat oocyty, ty je pak nutné rozdělit podle morfologie kumulu. Vhodné oocyty je nutné kultivovat 22-28 h v inkubátoru při 38,2 °C (Šichtař 2018).

Jak již bylo zmíněno, klasická IVF v petriho misce u koní nefunguje, využívá se proto metoda ICSI. Nevýhodou je, že nedochází k přirozenému fyziologickému výběru spermií a určující je laboratorní technik. Podle některých teorií může dojít k vybrání spermií, která nese vývojové abnormality a která by jinak nebyla schopná úspěšného oplození. Tyto teorie ale zatím nebyly potvrzeny. Oplozený oocyt je inkubován po dobu 7 dní do stádia blastocysty. Úspěšnost inkubace je velmi rozdílná v závislosti na laboratoři a pohybuje se od 13 % (Colleoni et al. 2007), 26 % (Gallie et al. 2007; Matsukawa et al. 2007) přes 25–35 % po 42 % (Hinrichs et al. 2014). Důležitějším ukazatelem, než úspěšnost inkubace je ale procento úspěšného zabřezávání klisen po embryotransferu. V současnosti je to kolem 60–80 % (Hinrichs et al. 2014; Galli et al. 2016). Do 60. dne březosti ale dochází až k 20 % ztrátám (Hinrichs et al. 2014). K ohřebení dochází v průměru asi u 50 % klisen (Maserati & Mutto 2016).

Nevýhodou této metody je zatím vysoká cena. Podle Maserati & Mutto (2016) jsou mezi laboratořemi rozdíly, např. v USA 8–10 tis. dolarů, v Brazílii je cena poloviční. Překážkou je také technicky náročný postup a zručnost techniků. Přesto však u chovatelů vzbudila tato biotechnologie nemalý zájem, zejména u sportovních klisen, protože umožňuje produkovat potomky bez velkého vlivu na kariéru klisny. Potenciál má tato metoda také při záchraně ohrožených druhů koňovitých (Morris 2018).

Přestože embryotransfer přináší jisté výsledky, odhalení průběhu kapacitace hřebčích spermií by mohlo získání embryí v *in vitro* podmínkách zjednodušit. Zásadní vliv na funkci spermií a kapacitaci má fosforylace proteinů spermií. Pochopení přesného vlivu fosforylace proteinů na průběh kapacitace u hřebčích spermií by mohlo znamenat významný posun pro metody IVF. Možnost využívat metod IVF by znamenalo významný posun v rozvoji reprodukčních biotechnologií u koní.

4 Metodika

Pro tuto práci bylo zvoleno srovnání fosforylace proteinů čerstvých a kryokonzervovaných hřebčích spermií pomocí metod imunofluorescenční mikroskopie (IF) a Western blot imunodetekce (WB).

Tabulka č.1: Nativní vzorky využité pro tuto práci.

Vzorek	Místo odběru	Datum odběru
1H	Písek	9.2.2021
2H	Písek	9.2.2021
3H	Písek	9.2.2021
4H	Písek	9.2.2021
5H	Písek	9.2.2021

Tabulka č.2: Kryokonzervované vzorky využité pro tuto práci.

Vzorek	Místo odběru	Datum odběru
1A	Písek	26.1.2021
2B	Písek	26.1.2021
1C	Písek	26.1.2021
2C	Písek	26.1.2021
3A	Písek	4.2.2021
3B	Písek	4.2.2021
3C	Písek	4.2.2021
3D	Písek	4.2.2021
7A	Písek	12.2.2021
7B	Písek	12.2.2021
7C	Písek	12.2.2021
7D	Písek	12.2.2021
SDE 61	Písek	4.2.2021

4.1 Imunofluorescenční mikroskopie

4.1.1 Odběr a zpracování ejakulátu

Ejakulát byly od hřebců odebírány standartním způsobem pomocí umělé vagíny a fantoma. Všichni hřebci zařazení do této práce byli zdraví, využívání k reprodukci v Zemském hřebčinci Písek s.p.o. Ihned po odběru byl zhodnocen objem ejakulátu, motilita a koncentrace spermií. Zhodnocený ejakulát byl dále zpracován.

Nativní ejakuláty byly ihned po odběru 10 minut centrifugovány (Centrifuga Mikro 22R) při 300 g. Centrifugací došlo k oddělení semenné plazmy a spermií. Semenná plazma byla odpipetována a ke spermiím bylo přidáno 15 ml PBS (phosphate buffered saline; Sigma-Aldrich, USA) a roztok byl znovu centrifugován 10 minut při 300 x g. Tento krok byl ještě jednou zopakován, aby se spermie promyly. Zcentrifugované vzorky byly poté dále zpracovány pro imunofluorescenční mikroskopii a Western Blot.

Dávky určené ke kryokonzervaci byly naředěny Keeneyho ředidlem a centrifugovány 15 minut při 650 g. Poté byl oddělen supernatant a ke spermii bylo přidáno laktózo-žloutkové ředidlo. Následně byl roztok rozdělen do pejet o objemu 0,5 ml. Pejety byly ekvilibrovány 2 hodiny při 5°C a poté byly horizontálním mrazením zamrazeny nad parami tekutého dusíku. Pejety byly následně uloženy do tekutého dusíku (-196°C) do dalšího zpracování.

Po vyjmutí z kontejneru s tekutým dusíkem byly pejety rozmrazeny ve vodní lázni (MiniWater bath N3-4, Kisker Biotech) o teplotě 37 °C po dobu 30 sekund. Poté byly vzorky z pejet přemístěny do označených mikrozkuvek a následně centrifugovány po dobu 10 min při teplotě 22 °C a 300 x g, aby se oddělily spermie od žloutkového ředidla. Po centrifugaci bylo ředidlo odsáto, ke vzorkům bylo přidáno 500 µl PBS. Spermie byly následně rozsuspendovány a doplněny o dalších 500 µl PBS. Poté byly vzorky znovu stočeny a opět byl odebrán supernatant a byl zopakován předchozí krok s doplněním PBS na 1 ml. Vzorky byly znovu centrifugovány.

4.1.2 Příprava vzorků

Pro čerstvé i kryokonzervované vzorky byla příprava vzorků stejná. Z centrifugovaných promytých vzorků byl odebrán supernatant, k sedimentu bylo přidáno 500 µl PBS a opatrně rozsuspendováno. Z každého vzorku bylo odebráno 100 µl do zvláštní mikrozkuvky. Tyto vzorky byly určeny na přípravu pro Western Blot analýzu. Původní vzorek byl stočen, supernatant odebrán a bylo přidáno 500 µl roztoku 3% formaldehydu. Vzorky byly ponechány 10 min ve fixativu, pak byly stočeny. Ze stočených vzorků byl odebrán supernatant a bylo přidáno 300 µl PBS a vzorky byly opět stočeny. Tento krok byl ještě jednou zopakován pro úplné odstranění formaldehydu. Po posledním stočení a odebrání supernatantu bylo opět přidáno 300 µl PBS. Následně byla suspenze spermii nanášena na připravená sklíčka po 20 µl do označených koleček pomocí hydrofobní fixy a preparát byl ponechán zaschnout na vzduchu.

Po zaschnutí byly preparáty spermii nejprve permeabilizovány 0,1% Tritonem. Na obě kolečka bylo nanášeno 100 µl 0,1% Tritonu-X100 (ředění v PBS) na dobu 10 min. Poté byla sklíčka opláchnuta PBS a osušena. Byla provedena blokace roztokem SuperBlock (Thermo Scientific, USA). Do obou koleček bylo napipetováno 100 µl. Vzorky byly vloženy do vlhké komůrky a byly inkubovány 30 min při laboratorní teplotě. Poté byly vzorky opět omyty PBS a osušeny. Dále proběhla inkubace s myší monoklonální protilátkou proti fosfotyrosinu (klon 4G10, Millipore Corporation, USA) ředěné v PBS v poměru 1:300. Do pravého kolečka bylo napipetováno 100 µl protilátky, do levého kolečka, představující negativní kontrolu, bylo napipetováno 100 µl PBS. Poté byly preparáty inkubovány přes noc ve vlhké komůrce v lednici.

Druhý den byly preparáty omyty PBS a poté osušeny. Dále byla provedena inkubace se sekundární protilátkou anti-mouse konjugovanou s Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen, USA). Sekundární protilátka byla ředěna v poměru 1:300 v PBS. Na preparáty bylo napipetováno 100 µl sekundární protilátky. Vzorky byly inkubovány ve vlhké komůrce v lednici po dobu 1 h.

Po inkubaci se sekundární protilátkou byly preparáty omyty PBS a poté osušeny. Následně proběhlo značení akrozomů spermii pomocí PNA lektinem konjugovaným s rhodaminem (Rhodamin Peanut Agglutinin, Vector Laboratories, USA). Do obou koleček bylo nanášeno 100 µl roztoku PNA s rhodaminem ředěným v PBS v poměru 1:700. Při manipulaci s PNA bylo

pracováno v přítmí. Inkubace byla provedena ve vlhké komůrce a tmě 30 min při laboratorní teplotě. Poté byly preparáty omyty v PBS a destilované vodě a následně osušeny. Ve tmavém prostředí bylo do obou koleček napipetováno 5 μ l montovacího média VectaShield DAPI (Antifade Mounting Medium, Vector Laboratories, USA) a preparát byl překryt krycím sklíčkem. Tím byla prodloužena doba imunofluorescence preparátů a označena jaderná DNA. Krycí sklíčko bylo zafixováno lakem na nehty. Preparáty byly následně uloženy do desek a připraveny k hodnocení.

Preparáty byly snímány pomocí imunofluorescenční mikroskopie při 400 x zvětšení. K vyhodnocení byl použit program NIS Elements. Bylo hodnoceno minimálně 200 spermií z každého vzorku.

U nativních i kryokonzervovaných vzorků byla hodnocena přítomnost signálu a lokalizace protilátky proti fosfotyrosinu a přítomnost akrozomu. Získaná data byla statisticky hodnocena v programu Statistica (ver. 12, StatSoft, CZ) a graficky zpracována v programu Microsoft Excel a Adobe Photoshop Elements 2022.

4.2 Western blot imunodetekce

4.2.1 Příprava vzorků

Mikrozkumavky oddělené při přípravě preparátů pro imunofluorescenční značení se 100 μ l suspenze spermií byly doplněny na 500 μ l PBS (phosphate buffered saline; Sigma-Aldrich, USA), rozsuspendovány, zcentrifugovány a supernatant byl odsát. K sedimentům bylo přidáno 100-150 μ l neredukujícího vzorkového pufru (složení: 4,2 ml H₂O, 1 ml 0.5 M Tris.HCl pH 6.8, 0,8 ml glycerol, 1,6 ml 10% SDS, 0,4 ml bromfenolová modř) podle množství sedimentu tak, aby množství pufru bylo oproti sedimentu dvojnásobné. Roztok byl pořádně rozsuspendován a povařen 5 min při teplotě 100 °C. Poté byly vzorky stočeny 2 min při 10 000 x g a teplotě 4 °C v centrifuze (Centrifuga Mikro 22R). Po stočení byl odebrán supernatant do zvláštní zkumavky. K supernatantu byl přidán merkaptopletanol do finální 5% koncentrace. Ke vzorkům, které byly předtím doplněny o 100 μ l pufru bylo přidáno 7 μ l merkaptopletanolu, ke vzorkům doplněným o 150 μ l pufru bylo přidáno 17 μ l merkaptopletanolu. Vzorky byly následně povařeny 2 min při teplotě 100 °C ve vyhřívané třepačce (Thermo-Shaker TS-100, BioSan).

4.2.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s přidavkem dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)

Nejdříve bylo nutné sestavit aparaturu pro přípravu gelů. Dále přišla na řadu příprava separačního gelu. Pro tyto experimenty byl zvolen 12% separační polyakrylamidový gel. Na přípravu 2 separačních gelů bylo potřeba 3,5 ml destilované H₂O, 2,5 ml pufru B (pH 8,8; Resolving Gel Buffer B, Biorad, USA), 4 ml 30% roztoku acrylamidu (ACRYLAMIDE/bis-ACRYLAMIDE, Bio-Rad, USA), 100 μ l 10% dodecylsulfátu sodného (SDS; Sigma-Aldrich, USA). Těsně před aplikací bylo přidáno 4,5 μ l tetramethylenediaminu - TEMED (GE Healthcare, Švédsko) a 70 μ l APS (10% roztok persíranu amonného). Po přidání APS začíná gel tuhnout, proto bylo nutné gel co nejdříve nanést mezi elektroforetická skla. Postupně bylo napipetováno

do každé soupravy 5 ml gelu. Gel byl překryt po okraj soupravy destilovanou vodou a ponechán 40 min tuhnout.

Po ztuhnutí separačního gelu byla vylita destilovaná voda a byl nanesen 4% zaostřovací gel. Ten byl připraven z 1,52 ml destilované H₂O, 625 µl pufru C (Stocking gel Buffer, pH 6,8), 325 µl acrylamidu (ACRYLAMIDE/bis-ACRYLAMIDE, Bio-Rad, USA), 25 µl 10% SDS (Sigma-Aldrich, USA). Těsně před aplikací gelu bylo přidáno 3,8 µl TEMEDu (GE Healthcare, Švédsko) a 50 µl 10% APS. Zaostřovací gel byl opatrně napipetován na zatuhlý separační gel. Ihned po nanesení byl do zaostřovacího gelu vložen hřeben tvořící jamky pro nanášení vzorků. Gel byl ponechán 10-15 minut tuhnout.

Po zatuhnutí zaostřovacího gelu byla aparatura na přípravu gelů rozebrána a skla s gely byla přenesena do aparatury na elektroforézu. Nádoba na elektroforézu byla zalita stanoveným množstvím elektronového pufru (15 g Tris, 72 g glycin, 5 g SDS rozpuštěno v 1 l destilované H₂O, vzniklý roztok byl dále ředěn 1:4 v destilované H₂O). Opatrně byly vyjmuty hřebeny ze zaostřovacího gelu. Poté byly pomocí Hamiltonovy stříkačky napipetovány jednotlivé vzorky (10-18 µl) spolu s 3 µl proteinových hmotnostních standardů (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad, USA). Poté byla spuštěna elektroforéza a probíhala přibližně 1 h při nastavení konstantního elektrického proudu 0,03 A.

4.2.3 Elektropřenos (Western blot)

Po dokončení elektroforézy následoval přenos proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu (NC). Do misky byly na 10 minut do transferového pufru (3,03 g Trisu, 14,4 g glycinu rozpuštěno ve 200 ml destilované H₂O, doplněno o 200 ml methanolu a dolito na 1 l destilovanou H₂O) namočený 2 houbičky, 4 výstřižky chromatografického papíru Whatman (8,5 x 10 cm) a 1 NC membrána (6 x 9 cm) pro každý gel. Do jiné misky s malým množstvím transferového pufru byla připravena kazeta.

Gely byly opatrně vyjmuty z aparatury a přendány do nádoby s destilovanou H₂O. Poté byly postupně přendány do blotovací kazety: na černou stranu kazety byla nejprve položena houbička, poté 2 ks chromatografického papíru Whatman, gel, NC membrána, opět 2 ks chromatografického papíru Whatman a houbička. Kazeta byla uzavřena a vložena do blotovacího rámu, černou částí kazety k černé straně rámu. Rám s kazetami byl umístěn do nádoby a zalit určeným množstvím transferového pufru. Celá soustava byla vložena do vaničky s vodou a ledem, která slouží jako chladič. Po sestavení byla aparatura zapojena do zdroje a spuštěna po dobu 1–1,5 h při konstantním elektrickém proudu 500 mA.

Po dokončení elektropřenosu byla aparatura rozebrána, kazeta vyjmuta, rozložena a membrána byla přendána do misky. Membrány byly opláchnuty v destilované H₂O a obarveny na 1–2 min roztokem Ponceau S (Sigma–Aldrich, USA) na přítomnost přenesených proteinů. Dále následovalo 2x promytí v roztoku PBS s 0,1% Tweenem 20 pro odmytí Ponceau.

4.2.4 Inkubace s protilátkami

Po odmytí Ponceau byly membrány na 1 h umístěny na lineární třepačku (SK-L180E, Biotech) do 5% mléka (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad, USA). 5% mléko pro 2 membrány bylo připraveno z 1 g mléka rozpuštěného ve 20 ml PBS. Po zablokování v mléce byly membrány 1 x promyty v PBS s Tweenem. Po promytí byly membrány přeneseny do parafilmu. Na jednu membránu byly nanášeny 2 ml myší monoklonální protilátky proti fosfotyrosinu (klon 4G10, Millipore Corporation, USA) ředěné 1:1000 v PBS. Na druhou membránu, představující negativní kontrolu, byly nanášeny 2 ml PBS. Membrány byly inkubovány přes noc v lednici.

Druhý den byly membrány vyjmuty z parafilmu a 30 minut promývány po 10 minutách v PBS s Tweenem. Po promývání bylo na obě membrány nanášeno 6 ml sekundární protilátky (EIA Grade Affinity Purified Goat Anti-Mouse IgG orseradish Peroxidase Conjugate) ředěné 1:3000 v PBS. Membrány byly ponechány v sekundární protilátce na třepačce 1 h a poté byly 6 x promyty po 5 min v PBS s Tweenem.

Protilátka proti α -tubulinu (Monoclonal Anti- α -Tubulin Antibody produced in mouse, SIGMA, USA) byl ředěn 1:5000 v PBS a nanášen v množství 2 ml. Před nanášením tubulinu bylo nutné membrány nejprve zablokovat v 5 % mléce po dobu 1 h na třepačce. Poté byly membrány 1 x promyty v PBS s Tweenem, uloženy do parafilmu a byl na ně nanášen tubulin. Takto byly membrány inkubovány přes noc v lednici.

4.2.5 Detekce a zpracování dat

Pro detekci proteinů na NC membránách byl využit přístroj Azure c300 Gel Imaging System (Azure Biosystems, Dublin, USA). Každá membrána byla při vložení do přístroje překryta 2 ml dvousložkového chemiluminiscenčního substrátu (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo SCIENTIFIC, USA) připraveného v poměru 1:1.

Po provedení detekce byly membrány 2x promyty v PBS s Tweenem. Poté byly pomocí Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo SCIENTIFIC, USA) odmyty navázané protilátky. Membrány byly poté využity pro detekci tubulinu použitého jako referenční protein pro hodnocení nanášky proteinu ve vzorku. Ke zpracování dat byl využit Microsoft Excel. Síla signálu byla detekována pomocí software Image Studio Digits verze 4.0. C-Digit Scanner. Změřený signál byl následně vydělen plochou signálu daného proteinu. Stejný postup proběhl též u tubulinu. Hodnoty získané vydělením síla signálu/plocha signálu protilátky proti fosfotyrosinu byly vyděleny výsledkem síla signálu/ plocha signálu u tubulinu. Výsledná hodnota byla vztažena ke zvolenému srovnávacímu proteinu. Výsledky byly porovnány. Rozdíly mezi jednotlivými vzorky byly statisticky hodnoceny pomocí GraphPad Prism 5 Software. Ke statistickému hodnocení byla zvolena jednocestná ANOVA.

5 Výsledky

U hřebčích spermií byla hodnocena lokalizace fosforylovaných proteinů a vztahu přítomnosti akrozomu (PNA signálu) a fosforylace tyrosinu (PTyr proteinů) pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Míra fosforylace byla hodnocena pomocí Western Blot imunodetekce.

5.1 Využití vzorků

Tabulka č.3: Využití nativních vzorků. IF = imunodetekce, WB = Western Blot.

	1H	2H	3H	4H	5H
IF	ano	ano	ano	ano	ano
WB	ano	ne	ano	ano	ano

Příprava vzorku 2H (tabulka č.3) pro WB se nezdařila, vzhledem k nedostatečnému množství vzorku nemohla být nová příprava provedena.

Tabulka č.4: Využití kryokonzervovaných vzorků. IF = imunodetekce, WB = Western blot.

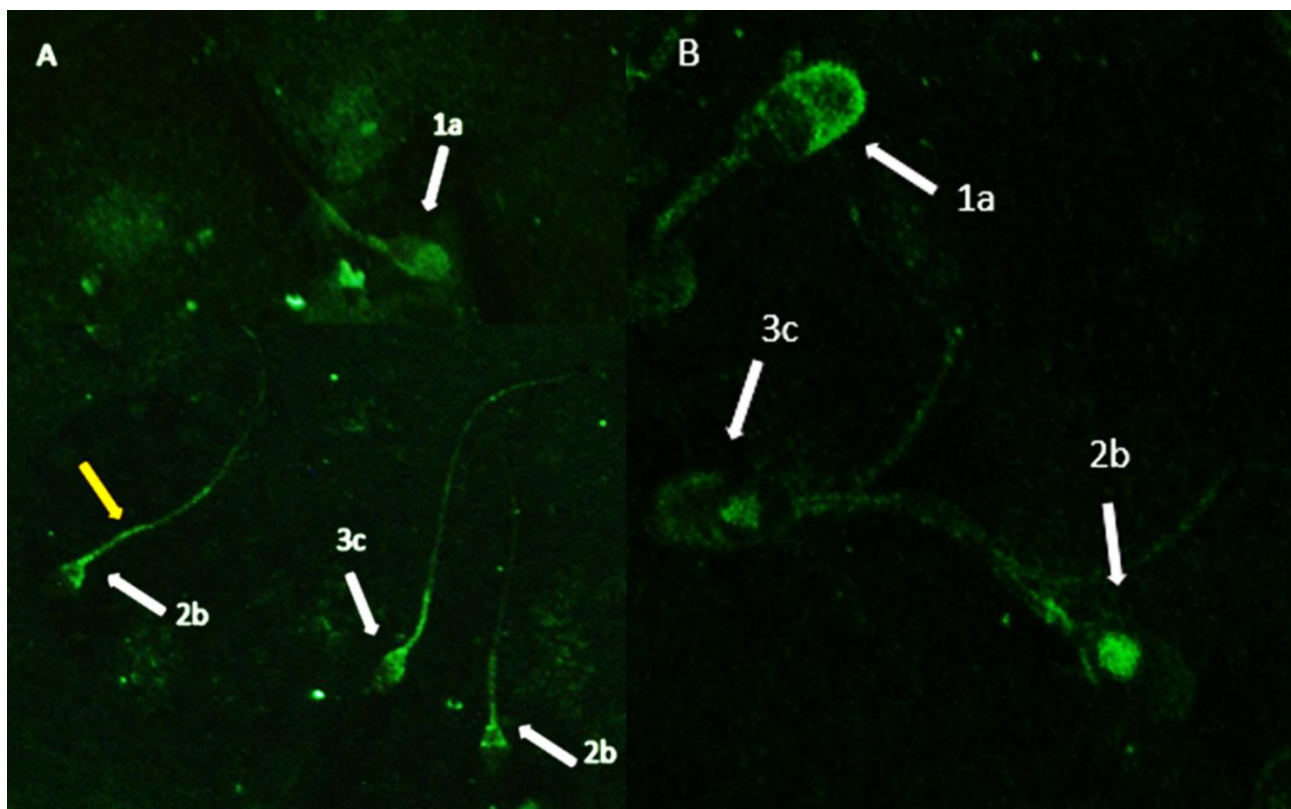
	1A	2B	1C	2C	3A	3B	3C	3D	7A	7B	7C	7D	SDE 61
IF	ano	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
WB	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano

Příprava vzorků 3A, 3B, 3C, 3D, 7A, 7B, 7C, 7D a SDE 61 (tabulka č.4) pro IF se nezdařila a vzhledem k nedostatečnému množství vzorku nebylo možné postup zopakovat. Proto byly do studie zařazeny vzorky nové (1A, 2B, 1C, 2C), aby bylo možné vyhodnocení IF a zároveň WB.

5.2 Lokalizace fosforylovaných proteinů spermií

Pro vyhodnocení imunofluorescenční detekce bylo z každého vzorku napočítáno minimálně 200 spermií. Pro vyhodnocení signálu protilátky proti fosfotyrosinu (PTyr proteinů) byly u nativních i kryokonzervovaných vzorků spermie rozděleny do 3 kategorií se signálem PTyr (obr. č.3) a 1 kategorii bez signálu PTyr. Kategorie se signálem byly následující: spermie s detekovaným signálem v oblasti akrozomu a zároveň bičíku (A+B), spermie se signálem v oblasti ekvatoriálního segmentu a zároveň bičíku (E+B), spermie se signálem v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku (A+E+B) a spermie bez detekovaného signálu proti fosfotyrosinu. Ze získaných dat bylo vypočteno procentuální zastoupení jednotlivých kategorií.

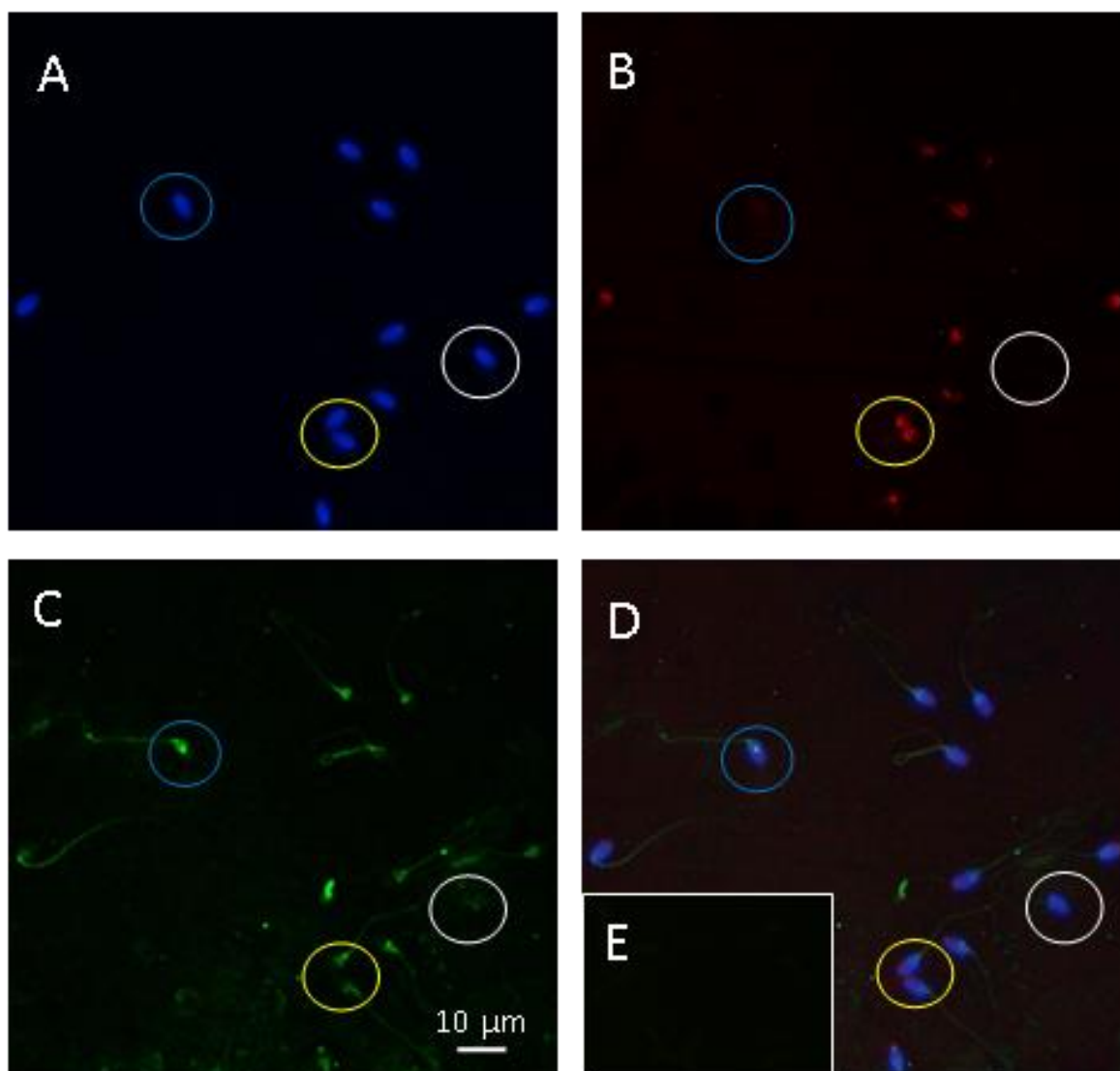
Při vyhodnocování byly patrné rozdíly mezi detekovanými signály u nativních a kryokonzervovaných vzorků (obr. č.3). Nativní vzorky měly výraznější signál ve střední části bičíku (obr. č.3 A, označení žlutou šipkou), zatímco u kryokonzervovaných vzorků svítil celý bičík stejnoměrně. Také je patrný rozdíl v signálu v ekvatoriálním segmentu. U nativních vzorků je signál v celé oblasti, u kryokonzervovaných vzorků byl signál spíše uprostřed a tvarem připomínal trojúhelník.



Obrázek č.3: Detail lokalizace fosforylace u hřebčích spermii.

A – lokalizace signálu u nativních vzorků, B – lokalizace signálu u kryokonzervovaných vzorků. 1a – fosforylace v oblasti akrozomu a bičíku (A+B), 2b – fosforylace v oblasti ekvatoriálního segmentu a bičíku (E+B), 3c – lokalizace fosforylace v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku (A+E+B).

V další části imunofluorescenčního hodnocení jsme se zaměřili na přítomnost funkčního akrozomu značeného pomocí PNA a jeho vztahu k přítomnosti signálu protilátky proti fosfotyrosinu (obrázek č.4). U nativních i kryokonzervovaných vzorků byly spermie rozděleny do 3 kategorií: spermie s akrozomem a zároveň signálem protilátky proti fosfotyrosinu (PNA+, FOS+), dále spermie bez akrozomu, ale se signálem protilátky proti fosfotyrosinu (PNA-, FOS+) a spermie bez akrozomu a zároveň bez signálu proti fosfotyrosinu (PNA-, FOS-). Spermie s akrozomem, ale bez signálu protilátky proti fosfotyrosinu byly vždy výrazně mechanicky poškozené, proto nebyly do hodnocení zahrnuty. Jako signál protilátky proti fosfotyrosinu byl v tomto případě počítán jakýkoliv signál, nedochází k rozdělování do 4 kategorií zmíněných výše.



Obrázek č.4: Zobrazení signálu protilátky proti fosfotyrosinu a signálu akrozomu značeného PNA lektinem zaznamenané pomocí fluorescenčního mikroskopu.

A – značení jádra spermií pomocí DAPI, B – značení akrozomu pomocí PNA lektinu, C - detekce signálu protilátky proti fosfotyrosinu, D – prolínání snímků A, B, C dohromady; E - negativní kontrola. Bílé kroužky – spermie bez akrozomu a bez detekce protilátky proti fosfotyrosinu – bez signálu, (PNA-, FOS-); modré kroužky – spermie bez akrozomu se signálem proti fosfotyrosinu (PNA-, FOS+), žluté kroužky – spermie s akrozomem a signálem protilátky proti fosfotyrosinu (PNA+, FOS-). Zvětšení 400x. Měřítko: 10 µm.

5.2.1 Hodnocení signálu proti fosfotyrosinu u nativních vzorků hřebčích spermií

V detekované lokalizaci signálu PTyr u nativních vzorků byly patrné rozdíly mezi jednotlivými hřebci (graf č.2, tab. č.5). U nativních vzorků 1H, 3H a 5H měly největší zastoupení spermie se signálem protilátky v oblasti ekvatoriálního segmentu a zároveň bičíku (E+B). Vzorky 2H a 4H měly největší zastoupení fosforylace v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku (A+E+B) a to 39,2 % a 51,8 %. Kategorie spermií se signálem protilátky proti fosfotyrosinu v oblasti akrozomu a bičíku (A+B) byla detekována pouze u vzorků 2H, 3H a 4H, a to ve velmi malém procentuálním zastoupení (tab. č.5). Nejvyšší procento signálu PTyr v oblasti A+B měl s 9 % vzorek 2H. U vzorků 1H a 5H tento signál detekován nebyl. Průměrně téměř 20 % spermií z nativních vzorků bylo bez signálu (tab. č.5). Z průměrných hodnot vyplývá, že mezi nativními vzorky převažoval signál lokalizovaný v ekvatoriálním segmentu a zároveň bičíku (E+B). Mezi rozdíly průměrných hodnot byl nalezen statisticky významný rozdíl (graf č. 1). Mezi skupinou A+B a E+B na hladině významnosti $p < 0,001$, mezi E+B a A+E+B na hladině významnosti $p < 0,01$ a mezi A+E+B a kategorií bez signálu na hladině významnosti $p < 0,001$ (graf č.1).

Tabulka č.5: Procentuální zastoupení jednotlivých kategorií signálu fosforylace u nativních vzorků s průměrnými hodnotami.

Nativní vzorky	A+B	E+B	A+E+B	Bez signálu
1H	0,0%	79,1%	1,8%	19,1%
2H	9,0%	27,8%	39,2%	24,0%
3H	0,5%	57,5%	13,2%	28,8%
4H	1,5%	44,2%	51,8%	2,5%
5H	0,0%	83,7%	4,2%	12,1%
Průměr	2,2%	58,5%	22,0%	17,3%

A+B – signál v oblasti akrozomu a bičíku

E+B – signál v oblasti ekvatoriálního segmentu a bičíku

A+E+B – signál v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku.



Graf č.1: Vyjádření statistické závislosti mezi průměrnými hodnotami lokalizace signálu proti fosfotyrosinu u nativních vzorků.

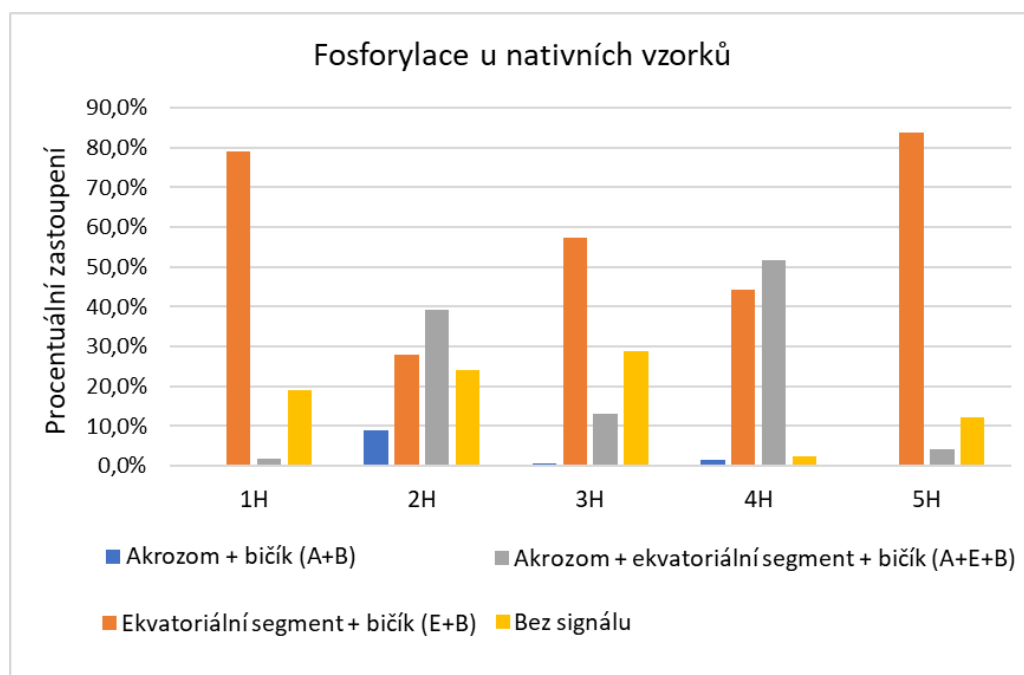
A+B – signál v oblasti akrozomu a bičíku

E+B – signál v oblasti ekvatoriálního segmentu a bičíku

A+E+B – signál v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku

Index ** – značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,01$

Index *** – značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,001$



Graf č.2: Procentuální vyjádření detekce signálu protilátky proti fosfotyrosinu u jednotlivých nativních vzorků spermíí hřebců (1H-5H).

5.2.2 Detekce přítomnosti akrozomu a signálu proti fosfotyrosinu u nativních vzorků

Dále byl hodnocen vztah přítomnosti akrozomu (PNA) a přítomnost signálu protein tyrosinové fosforylace (FOS). Nejčastěji byly pozorovány spermie s detekovaným akrozomem a zároveň signálem proti fosfotyrosinu (PNA+, FOS+) (tab. č.6, graf č.4). Výjimku tvoří hřebec

2H, u kterého bylo výrazně více spermií bez akrozomu, ale se signálem proti fosfotyrosinu (PNA-, FOS+) a to 59,4%. Průměrně bylo mezi vzorky detekováno jen 24,5 % spermií v kategorii PNA-, FOS+. U hřebce 2H bylo detekováno mnohem nižší procento spermií PNA+, FOS+ než u ostatních hřebců (tab. č.6). U tohoto hřebce bylo při hodnocení fosforylace detekováno nejvíce spermií se signálem proti fosfotyrosinu v oblasti akrozomu a zároveň bičíku (A+B) (graf č.4). Průměrně asi u 20 % spermií nebyl detekován akrozom ani signál proti fosfotyrosinu (PNA-, FOS-). Z průměrných hodnot vyplývá 58% zastoupení PNA+, FOS+ u nativních vzorků (tab. č.6). Byl nalezen statisticky významný rozdíl (graf č.3) mezi průměrnými hodnotami signálu PNA+, FOS+ a PNA-, FOS+ ($p < 0,05$) a mezi signály PNA+,FOS+ a PNA-, FOS- ($p < 0,01$).

Tabulka č.6: Procentuální zastoupení jednotlivých kategorií spermií detekovaných na přítomnosti přítomnosti akrozomu (PNA) a signálu protilátky proti fosfotyrosinu (FOS) u nativních vzorků s průměrnými hodnotami.

Nativní vzorky	PNA+,FOS+	PNA-, FOS +	PNA-, FOS-
1H	71,1%	9,8%	19,1%
2H	16,6%	59,4%	24,0%
3H	63,4%	7,8%	28,8%
4H	76,6%	19,9%	3,5%
5H	62,3%	25,6%	12,1%
Průměr	58,0%	24,5%	17,5%

PNA +, FOS+ – spermie s akrozomem a signálem proti fosfotyrosinu
PNA-, FOS+ – spermie bez akrozomu se signálem proti fosfotyrosinu
PNA-, FOS- – spermie bez akrozomu a bez signálu proti fosfotyrosinu



Graf č.3: Vyjádření statistické závislosti mezi průměrnými hodnotami jednotlivých kategorií přítomnosti akrozomu a detekce protilátky proti fosfotyrosinu u nativních vzorků.

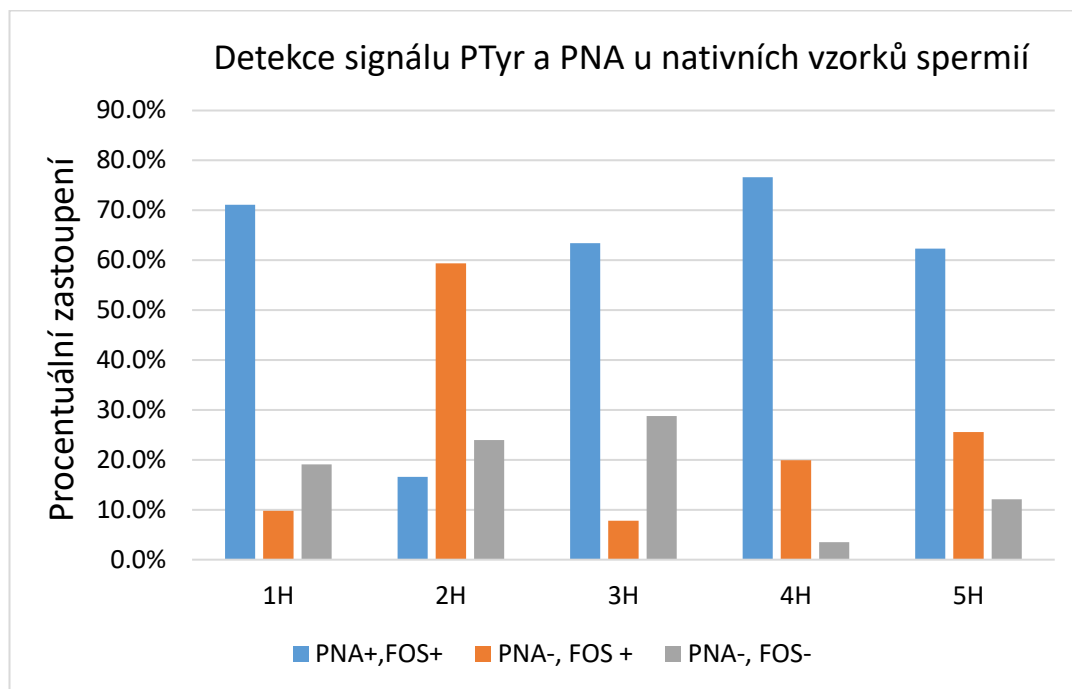
PNA +, FOS+ – spermie s akrozomem a signálem proti fosfotyrosinu

PNA-, FOS+ – spermie bez akrozomu se signálem proti fosfotyrosinu

PNA-, FOS- – spermie bez akrozomu a bez signálu proti fosfotyrosinu

Index * – značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$

Index ** – značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,01$



Graf č.4: Procentuální vyjádření vztahu přítomnosti akrozomu a detekce signálu protilátky proti fosfotyrosinu u jednotlivých nativních vzorků.

PNA +, FOS+ – spermie s akrozomem a signálem proti fosfotyrosinu

PNA-, FOS+ – spermie bez akrozomu se signálem proti fosfotyrosinu

PNA-, FOS- – spermie bez akrozomu a bez signálu proti fosfotyrosinu

5.2.3 Hodnocení signálu proti fosfotyrosinu u kryokonzervovaných vzorků hřebčích spermií

U kryokonzervované sady byly jednotlivé kategorie pozorovány u všech vzorků. Z hodnot grafu č.6 a tabulky č.7 je patrné u kryokonzervovaných vzorků nejvyšší zastoupení spermií se signálem proti fosfotyrosinu v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu i bičíku zároveň (A+E+B) a to u všech vzorků. Průměrná hodnota (tab č.7) signálu v oblasti A+E+B činila 71,35 %. Ostatní kategorie byly mnohem méně zastoupené. U vzorku 2C byl pozorován větší počet spermií se signálem v oblasti akrozomu a současně bičíku (A+B) než u ostatních vzorků. Nízkých hodnot dosahoval počet spermií se signálem v oblasti ekvatoriálního segmentu a bičíku (E+B), průměrně jen 7,7 %. Nejvíce byla tato kategorie zastoupena 16 % u vzorku 2B. U tohoto vzorku bylo napočítáno stejné procento spermií bez signálu PTyr. Bez signálu PTyr bylo pozorováno průměrně necelých 10 % spermií (tab. č.7). Byl nalezen statisticky významný rozdíl (graf č.5) mezi průměrnými hodnotami kategorií A+B a A+E+B (na hladině významnosti $p < 0,001$), E+B a A+E+B ($p < 0,001$) a A+E+B a kategorií Bez signálu ($p < 0,001$).

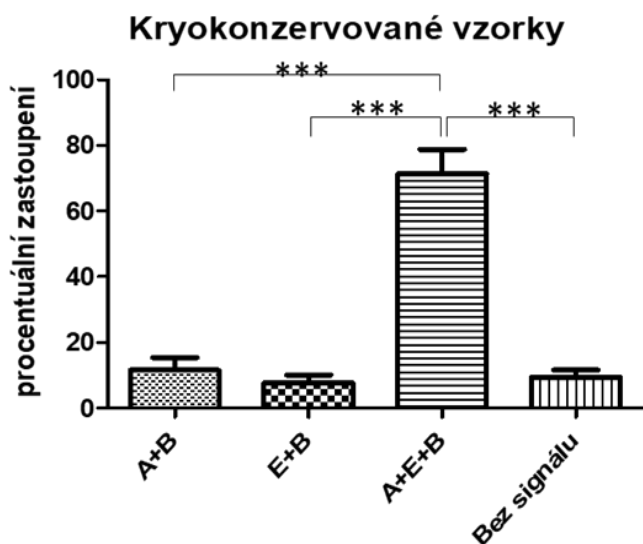
Tabulka č.7: Procentuální zastoupení signálu protilátky proti fosfotyrosinu u kryokon- zervovaných vzorků hřebčích spermií. Poslední řádek představuje průměrné hodnoty.

Kryokonzer- vované vzorky	A+B	E+B	A+E+B	Bez signálu
1A	5,60%	2,30%	86,50%	5,60%
2B	11,00%	16,00%	57,00%	16,00%
1C	3,90%	3,40%	89,30%	3,40%
2C	25,80%	9,10%	52,60%	12,50%
Průměr	11,58%	7,70%	71,35%	9,38%

A+B – signál v oblasti akrozomu a bičíku

E+B – signál v oblasti ekvatoriálního segmentu a bičíku

A+E+B – signál v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku



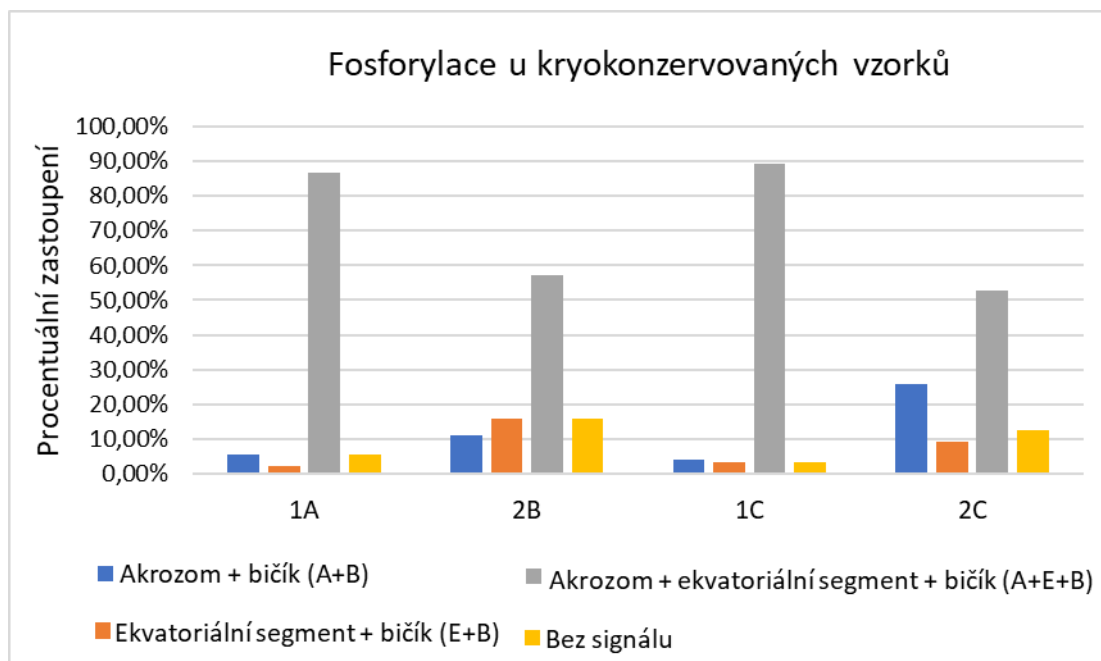
Graf č.5: Vyjádření statistické závislosti mezi průměrnými hodnotami lokalizace signálu proti fosfotyrosinu u kryokonzervovaných vzorků hřebčích spermií.

A+B – signál v oblasti akrozomu a bičíku

E+B – signál v oblasti ekvatoriálního segmentu a bičíku

A+E+B – signál v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku

Index *** – značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,001$



Graf č.6: Procentuální vyjádření detekce signálu protilátky proti fosfotyrosinu u jednotlivých kryokonzervovaných vzorků.

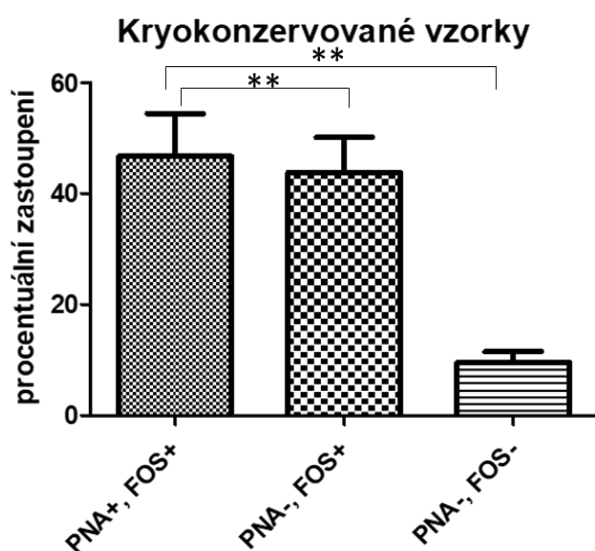
5.2.4 Detekce přítomnosti akrozomu a signálu proti fosfotyrosinu u kryokonzervovaných vzorků

Podle průměrných hodnot z tabulky č.8 bylo zastoupení spermií s akrozomem a signálem proti fosfotyrosinu (PNA+, FOS+) téměř shodné s počtem spermií bez akrozomu a zároveň signálem proti fosfotyrosinu (PNA-, FOS+). Podle individuálních hodnot (graf č.8) převládala u vzorků 1A, 2B, 1C nejčastěji přítomnost akrozomu a zároveň signálu proti fosfotyrosinu (PNA+, FOS+). Pouze u vzorku 2C byly nejčastěji pozorovány spermie bez akrozomu se signálem proti fosfotyrosinu (PNA-, FOS+). U tohoto vzorku byl také pozorován výrazně vyšší počet spermií se signálem proti fosfotyrosinu v oblasti akrozomu a zároveň bičíku (A+B) (graf č.8). U všech vzorků bylo nejméně zastoupeny spermie bez akrozomu a zároveň bez signálu proti fosfotyrosinu (PNA-, FOS-), průměrně necelých 10 % hodnocených spermií (tab. č.8). Byl detekován statisticky významný rozdíl (graf č.7) mezi průměrnými hodnotami kategorií PNA+, FOS+ a PNA-, FOS+ (na hladině významnosti $p < 0,01$) a kategoriemi PNA-, FOS+ a PNA-, FOS- (hladina významnosti $p < 0,01$).

Tabulka č.8: Procentuální zastoupení jednotlivých kategorií přítomnosti akrozomu a signálu protilátky proti fosfotyrosinu u kryokonzervovaných vzorků s průměrnými hodnotami.

Kryokonzervované vzorky	PNA+, FOS+	PNA-, FOS+	PNA-, FOS-
1A	57,40%	37,00%	5,60%
2B	59,60%	28,80%	11,80%
1C	52,70%	42,50%	4,80%
2C	17,20%	67,00%	15,80%
Průměr	46,73%	43,83%	9,50%

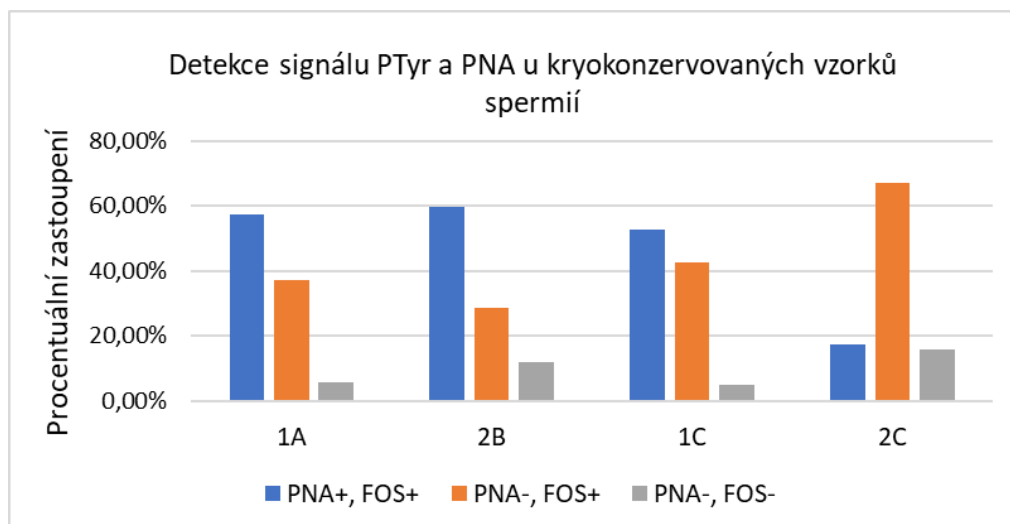
PNA +, FOS+ – spermie s akrozomem a signálem proti fosfotyrosinu
 PNA-, FOS+ – spermie bez akrozomu se signálem proti fosfotyrosinu
 PNA-, FOS- – spermie bez akrozomu a bez signálu proti fosfotyrosinu



Graf č.7: Vyjádření statistické závislosti mezi průměrnými hodnotami jednotlivých kategorií přítomnosti akrozomu a detekce protilátky proti fosfotyrosinu u kryokonzervovaných vzorků.

PNA +, FOS+ – spermie s akrozomem a signálem proti fosfotyrosinu
 PNA-, FOS+ – spermie bez akrozomu se signálem proti fosfotyrosinu
 PNA-, FOS- – spermie bez akrozomu a bez signálu proti fosfotyrosinu

Index ** – značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,01$



Graf č.8: Procentuální vyjádření vztahu přítomnosti akrozomu a detekce signálu protilátky proti fosfotyrosinu u kryokonzervovaných vzorků.

PNA +, FOS+ – spermie s akrozomem a signálem proti fosfotyrosinu

PNA-, FOS+ – spermie bez akrozomu se signálem proti fosfotyrosinu

PNA-, FOS- – spermie bez akrozomu a bez signálu proti fosfotyrosinu

5.2.5 Srovnání lokalizace fosforylovaných proteinů nativních a kryokonzervovaných vzorků hřebčích spermií

Mezi sadou nativních a kryokonzervovaných vzorků jsou patrná rozdílná pozorování signálu fosforylace (graf č.9). Oproti nativním vzorkům bylo u kryokonzervovaných vzorků pozorováno více spermií se signálem v oblasti akrozomu a bičíku (A+B), nejvíce byl u kryokonzervovaných vzorků detekován signál v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku (A+E+B). U nativních vzorků byl nejčastěji detekovaný signál v oblasti ekvatoriálního segmentu a bičíku (E+B). Více spermií bez signálu (necelých 20 %) bylo detekováno u nativních vzorků.

Mezi nativními a kryokonzervovanými vzorky byla dále zkoumána statistická závislost. Ke statistickému hodnocení byl použit program Statistica (ver. 12, StatSoft, CZ). K hodnocení analýzy rozptylu byla využita jednofaktorová ANOVA (hodnocen byl jeden faktor – srovnání nativních x kryokonzervovaných vzorků). Po analýze rozptylu byla ověřena statistická závislost mezi sledovanými skupinami pomocí post-hoc testů. Pro hodnocení byl zvolen Scheffeho test a Tukeyeho HSD test. Oba testy ukázaly statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi nativními a kryokonzervovanými vzorky u signálů protilátky proti fosfotyrosinu v kategoriích ekvatoriální segment a bičík (E+B) a akrozom, ekvatoriální segment a bičík (A+E+B).

Z hodnot jednotlivých kategorií lokalizace signálu protilátky proti fosfotyrosinu byla stanovena korelace mezi typy signálů na hladině významnosti $p < 0,05$ (graf č.9). Podle dat z tabulky č.9 vyplývá, že byla potvrzena záporná korelace mezi signálem A+B+ (signál v oblasti akrozomu a bičíku) a signálem E+B+ (signál v oblasti ekvatoriálního segmentu a bičíku). Záporná korelace znamená, že s růstem jedné kategorie se druhá kategorie snižuje a naopak. U kategorie E+B+ (signál v ekvatoriálním segmentu a bičíku) a kategorie A+E+B+ (spermie se signálem v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku) byla potvrzena pozitivní

korelace. Kladné hodnoty korelace znamenají, že s růstem jedné veličiny roste i druhá a naopak. Mezi A+B+ (signál v oblasti akrozomu a bičíku) a A+E+B (spermie se signálem v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku) byla potvrzena záporná korelace. Pokud jedna kategorie roste, druhá kategorie se snižuje.

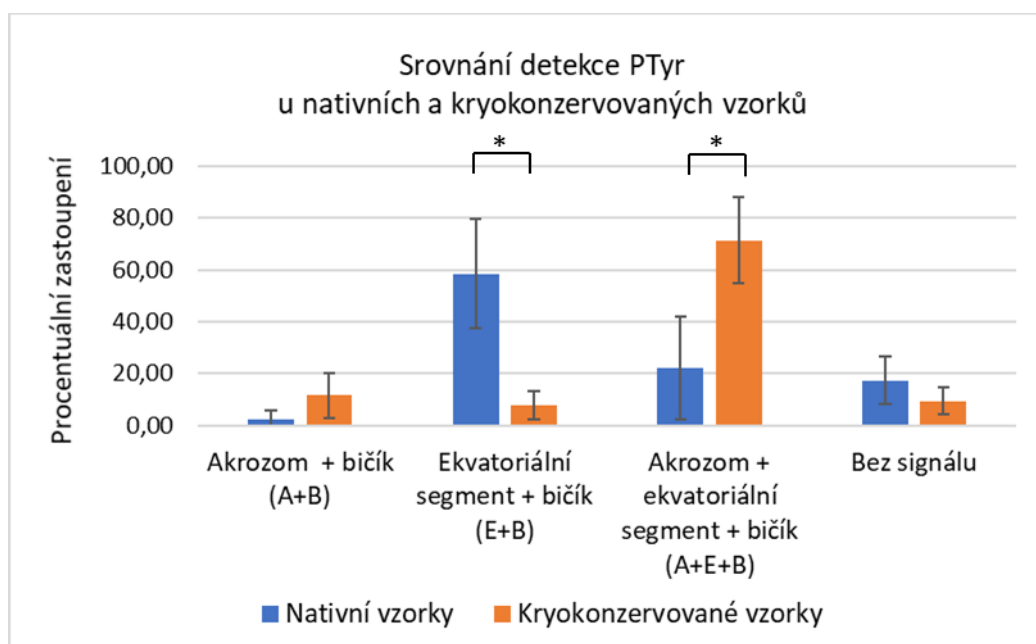
Tabulka č.9: Korelace na hladině významnosti ($p < 0,05$) mezi kategoriemi spermií rozdělených podle lokalizace signálu proti fosfotyrosinu.

Proměnná	Spearmanovy korelace (Tabulka3) ChD vynechány párově Označ. korelace jsou významné na hl. $p < ,05000$			
	A+ B+	E+ B+	A+ E+ B+	FOS-
A+ B+	1,000000	-0,744776	0,677830	-0,133892
E+ B+	-0,744776	1,000000	-0,950000	0,466667
A+ E+ B+	0,677830	-0,950000	1,000000	-0,583333
FOS-	-0,133892	0,466667	-0,583333	1,000000

A+B+ signál v oblasti akrozomu a bičíku

E+B+ signál v oblasti ekvatoriálního segmentu a bičíku

A+E+B+ signál v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku



Graf č.9: Průměrné procentuální zastoupení lokalizace signálu protilátky proti fosfotyrosinu u nativních a kryokonzervovaných vzorků hřebčích spermií se směrodatnou odchylkou.

Index * značí statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi nativními a kryokonzervovanými hřebčimi spermiemi v zastoupení jednotlivé kategorie signálu proti fosfotyrosinu.

5.2.6 Srovnání přítomnosti akrozomu a signálu proti fosfotyrosinu nativních a kryokonzervovaných vzorků

Nejčastěji byly u nativních i kryokonzervovaných vzorků pozorovány spermie s akrozomem a detekovaným signálem proti fosfotyrosinu (PNA+, FOS+). Spermie bez přítomnosti akrozomu, ale s detekovaným signálem proti fosfotyrosinu (PNA-, FOS+)

převažovaly u kryokonzervovaných vzorků. Nativní vzorky měly vyšší procento spermií bez detekovaného akrozomu a bez signálu proti fosfotyrosinu (PNA-, FOS-). Procentuální zastoupení kategorií PNA+, FOS+ a PNA-, FOS+ bylo u kryokonzervovaných vzorků velmi vyrovnané (graf č. 10).

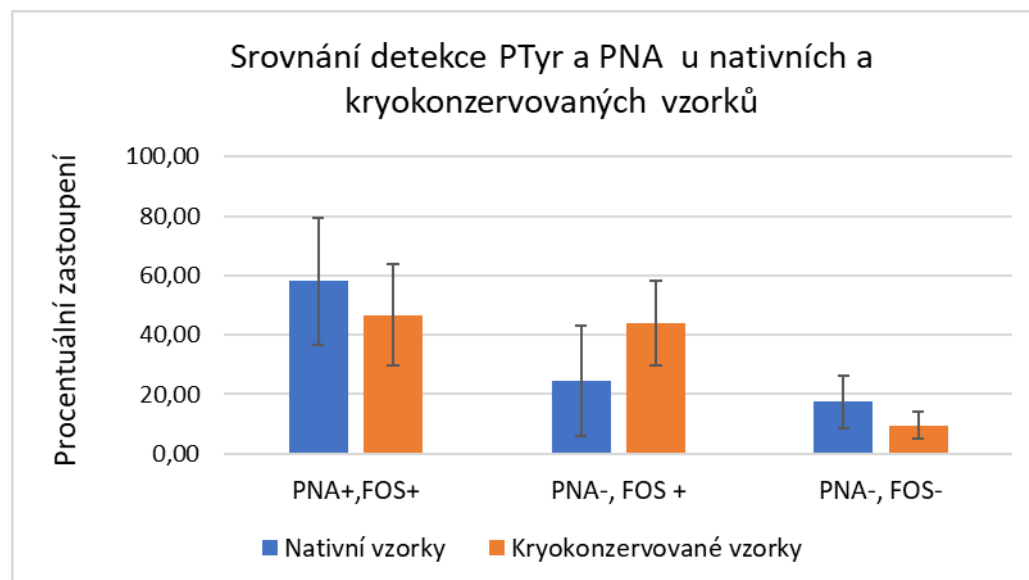
Přestože byly pozorovány rozdíly mezi nativními a kryokonzervovanými vzorky, post-hoc testy neprokázaly statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$) v zastoupení jednotlivých signálů přítomnosti akrozomu a detekce signálu protilátky proti fosfotyrosinu mezi nativními a kryokonzervovanými vzorky.

Na hladině významnosti $p < 0,05$ byla zaznamenána negativní korelace (tab č.10) mezi zastoupením spermií s akrozomem a zároveň signálem proti fosfotyrosinu (PNA+, FOS+) a spermie bez akrozomu, ale se signálem proti fosfotyrosinu (PNA-, FOS+). Podle negativní korelace s růstem jedné kategorie druhá kategorie klesá. Signály bez korelace (PNA-, FOS-) se mění nezávisle na ostatních kategoriích.

Tabulka č.10: Korelace mezi signálem protilátky proti fosfotyrosinu a přítomností akrozomu.

Proměnná	Spearmanovy korelace (Tabulka45) ChD vynechány párově Označ. korelace jsou významné na hl. $p < ,05000$		
	PNA+, FOS+	PNA-, FOS +	PNA-, FOS-
PNA+, FOS+	1,000000	-0,836827	-0,125524
PNA-, FOS +	-0,836827	1,000000	-0,133333
PNA-, FOS-	-0,125524	-0,133333	1,000000

PNA +, FOS+ – spermie s akrozomem a signálem proti fosfotyrosinu
PNA-, FOS+ – spermie bez akrozomu se signálem proti fosfotyrosinu
PNA-, FOS- – spermie bez akrozomu a bez signálu proti fosfotyrosinu



Graf č.10: Srovnání detekce akrozomu a lokalizace signálu protilátky proti fosfotyrosinu u nativních a kryokonzervovaných vzorků hřebčích spermií s přidanou směrodatnou odchylkou.

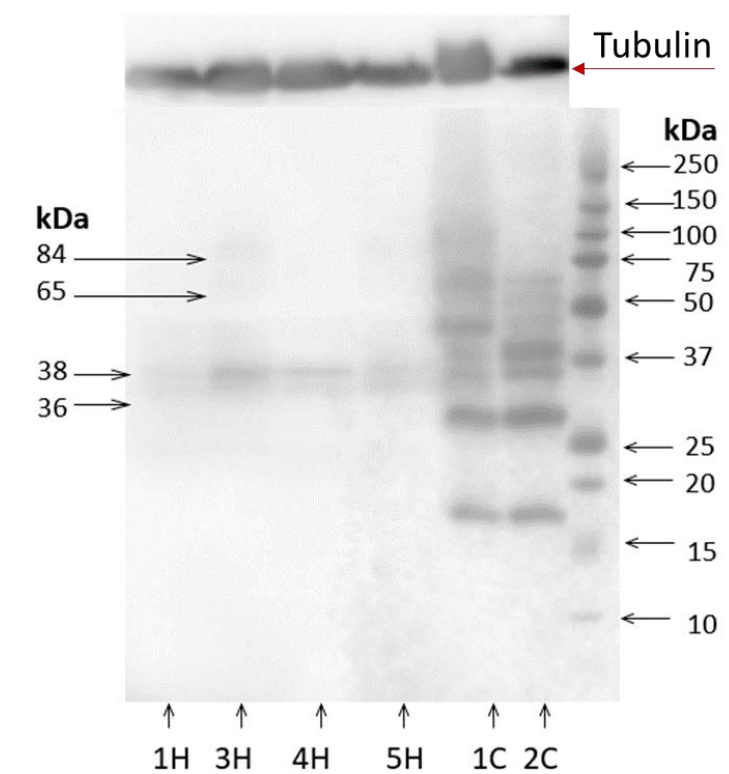
PNA +, FOS+ – spermie s akrozomem a signálem proti fosfotyrosinu
PNA-, FOS+ – spermie bez akrozomu se signálem proti fosfotyrosinu
PNA-, FOS- – spermie bez akrozomu a bez signálu proti fosfotyrosinu

5.2.7 Hodnocení míry fosforylace hřebčích spermií

K hodnocení míry fosforylace hřebčích spermií byly využity membrány získané metodou Western blot. Vzorky byly rozděleny do 3 skupin: první skupina zahrnovala nativní vzorky 1H, 3H, 4H, 5H. Druhá skupina obsahovala kryokonzervované vzorky kryokonzervované vzorky 1A, 2B, 1C a 2C. Třetí skupina zahrnovala kryokonzervované vzorky 3A, 3B, 3C, 3D, 7A, 7B, 7C, 7D, SDE 61. Z každé skupiny byly hodnoceny 3 membrány. Ve všech vzorcích byl detekován signál protilátky proti fosfotyrosinu. Výsledná hodnota byla vztažena ke zvolenému srovnávacímu proteinu. Výsledky byly porovnány.

5.2.7.1 Hodnocení míry fosforylace první skupiny hřebčích spermií

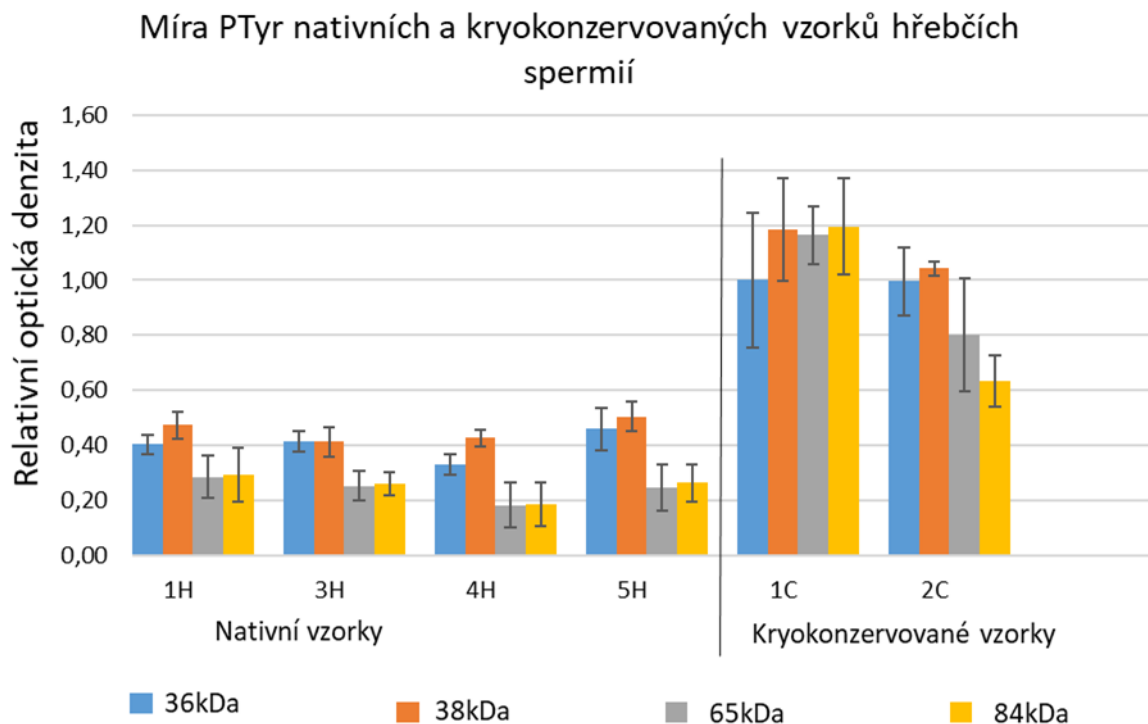
Tato skupina zahrnovala nativní vzorky 1H, 3H, 4H, 5H a kryokonzervované vzorky 1C a 2C nanesené na membránu jako srovnávací. Na první pohled byla patrná rozdílná síla signálu u nativních a kryokonzervovaných vzorků (obr. č.5). Nejsilnější míru signálu měl vzorek 1C. Nejsilnější signály z nativních vzorků měly vzorky 3H a 5H. Signály vzorků 1H a 5H byly slabší. Proteiny se signálem pTyr byly detekovány v molekulové hmotnosti 84, 65, 38 a 36 kDa. Referenční protein α -tubulin byl detekován v molekulové hmotnosti 51 kDa.



Obrázek č.5: Snímek imunodetekce fosfotyrosinu a referenčního proteinu α -tubulin v extraktech spermií u nativních vzorků (1H, 3H, 4H, 5H) a srovnávacích kryokonzervovaných vzorků 1C a 2C.

V naměřených hodnotách relativní optické denzity byl detekován rozdíl mezi nativními a kryokonzervovanými vzorky (graf č.11). Kryokonzervované vzorky 1C, 2C měly mnohem vyšší hodnoty relativní optické denzity než vzorky nativní. Mezi nativními vzorky byly hodnoty

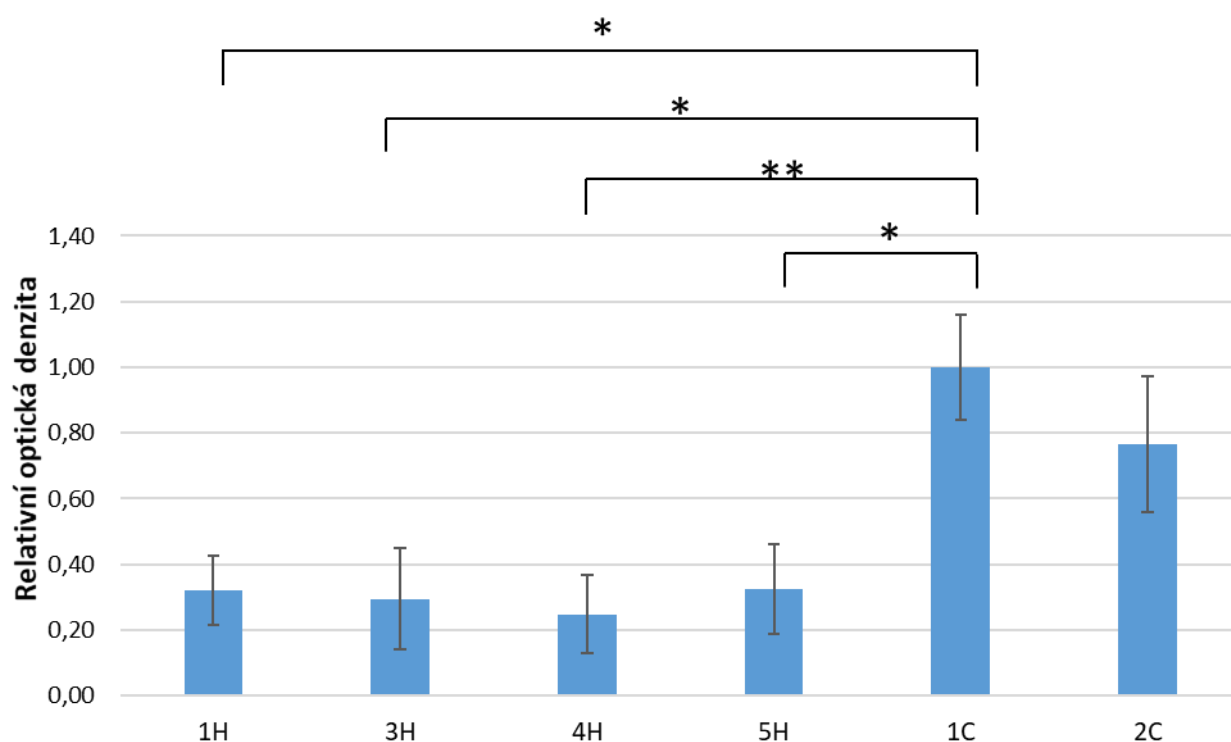
poměrně vyrovnané. Nejvyšší hodnotu u všech vzorků měl protein s mol. hm. 38 kDa. Pouze vzorek 1C měl nejvyšší hodnoty detekovaného signálu u proteinu s mol. hm. 84 kDa. Nejnižší hodnota byla naměřena u proteinu s mol. hm. 65 kDa. Výjimkou byl vzorek 2C, který měl nejnižší míru detekovaného signálu u proteinu s mol. hm. 84 kDa.



Graf č.11: Relativní optická denzita se směrodatnou odchylkou u nativních vzorků 1H, 3H, 4H, 5H a kryokonzervovaných vzorků 1C, 2C nanesených na membránu pro srovnání. Hodnoty vztaheny k proteinu 36kDa vzorku 1C, který slouží jako srovnávací. Barevně rozlišeny detekované proteiny.

Celková hodnota všech proteinů byla u kryokonzervovaných vzorků mnohem vyšší než u vzorků nativních (graf č.12). Mezi nativními vzorky měl nejvyšší celkovou hodnotu relativní optické denzity vzorek 1H. Nejnižší celkový signál relativní optické denzity měl vzorek 4H. Bylo hodnoceno, zda existuje statisticky významný rozdíl mezi srovnávanými vzorky. Mezi vzorky 1H, 3H, 5H a vzorkem 1C existuje signifikantní rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$ (v grafu č.12 značení *). Mezi vzorkem 4H a vzorkem 1C existuje signifikantní rozdíl na hladině významnosti $p < 0,01$ (v grafu č.12 značení **). Rozdíly mezi ostatními vzorky nebyly signifikantní.

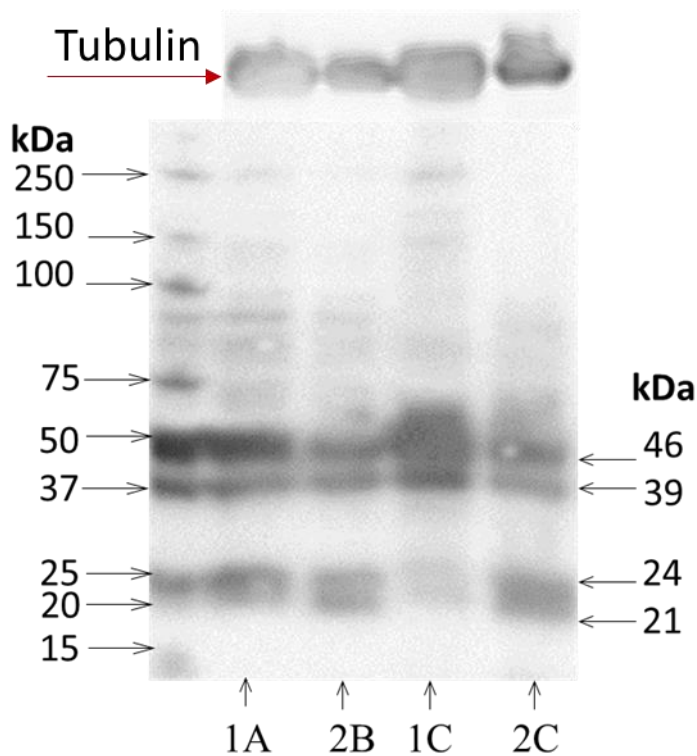
Celková míra PTyr u nativních a kryokonzervovaných vzorků hřebčích spermií



Graf č.12: Celková míra relativní optické denzity fosforylace proteinu tyrosinu (PTyr) u jednotlivých nativních (1H, 3H, 4H, 5H) a kryokonzervovaných vzorků (1C, 2C) se směrodatnou odchylkou a statistickými rozdíly mezi vzorky. PTyr = fosforylace proteinu tyrosinu. Hodnoty z grafu byly vztaženy ke vzorku 1C, který slouží jako srovnávací. Index * značí signifikantní rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$. Index ** značí signifikantní rozdíl na hladině významnosti $p < 0,01$.

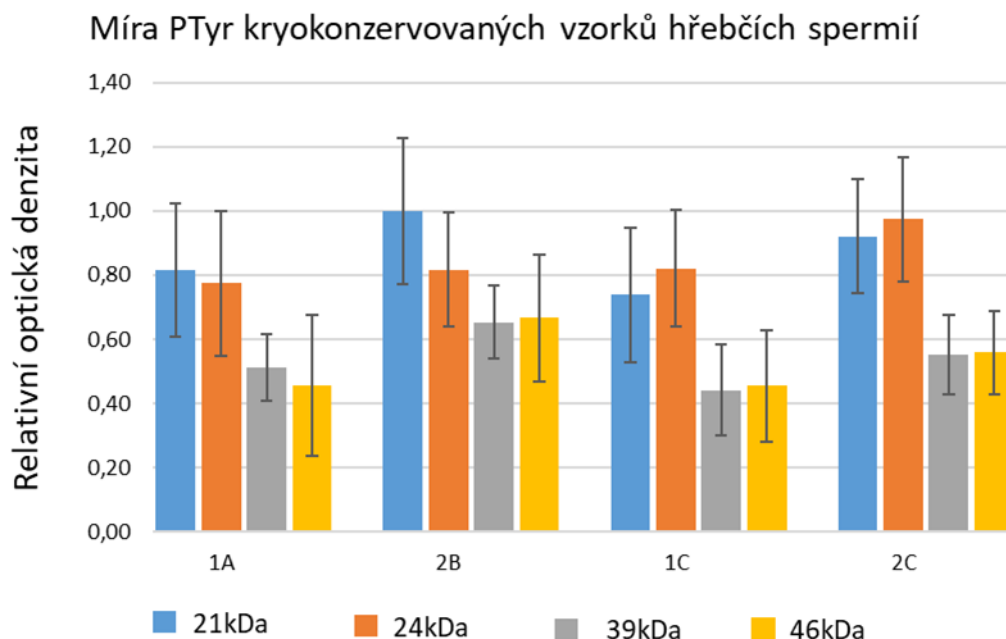
5.2.7.2 Hodnocení míry fosforylace druhé skupiny hřebčích spermií

Tato skupina zahrnovala kryokonzervované vzorky 1A, 2B, 1C, 2C. Signály detekovaných proteinů těchto vzorků byly naměřeny v molekulové hmotnosti 21, 24, 39 a 46 kDa (obr. č.6). U vzorku 1C byl signál u proteinů v molekulové hmotnosti 21 a 24 kDa z hodnocených vzorků nejméně viditelný. Tyto proteiny byly výrazné i u vzorku 1A. U proteinů v molekulové hmotnosti 39 a 46 kDa byly signály u vzorku 1C naopak nejvýraznější. Signály detekovaných proteinů u vzorků 2B a 2C vypadaly poměrně vyrovnaně.



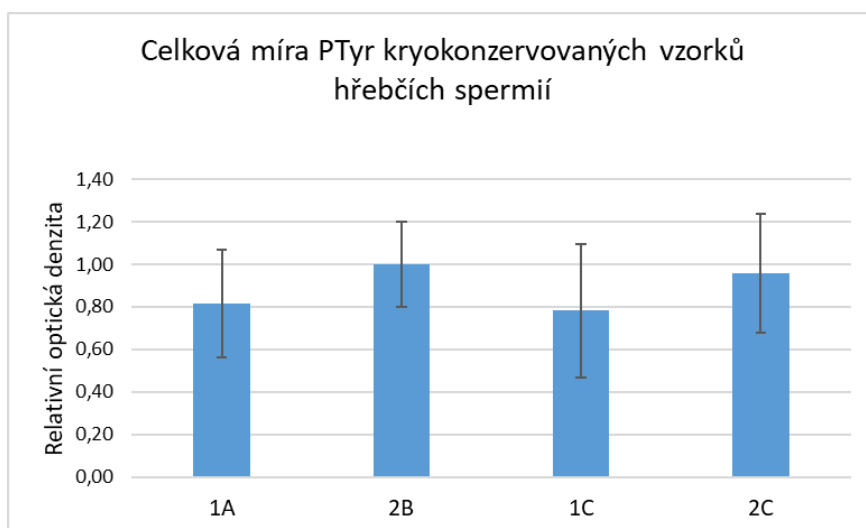
Obrázek č.6: Imunodetekce fosfotyrosinu v extraktech spermií u kryokonzervovaných vzorků druhé skupiny 1A, 2B, 1C, 2C s referenčním proteinem α -tubulinem.

Hodnoty relativní optické denzity byly vztaženy k proteinu s mol. hm. 21 kDa vzorku 2B. Nejvyšší relativní optickou denzitu měl u vzorků 1A a 2B protein s mol. hm. 21 kDa (graf č.13). Vzorky 1C a 2C měly nejvyšší hladinu relativní optické denzity detekovanou u proteinu s mol. hm. 24 kDa. Středně vysokou hodnotu signálu měl u většiny vzorků protein s mol. hm. 46 kDa. Nejslabší hodnota signálu byla naměřena u vzorků 2B, 1C, 2C u protein s mol. hm. 39 kDa. Pouze u vzorku 1A měl nejslabší detekovaný signál u proteinu s mol. hm. 46 kDa. Hodnoty relativní optické denzity jednotlivých proteinů u této skupiny vzorků byly poměrně vyrovnané.



Graf č.13: Relativní optická denzita tyrosinové fosforylace proteinů (PTyr) kryokonzervovaných vzorků druhé skupiny – vzorky 1A, 2B, 1C, 2C. Hodnoty byly vztaženy k proteinu 21 kDa vzorku 2B. Barevně značeny detekované proteiny.

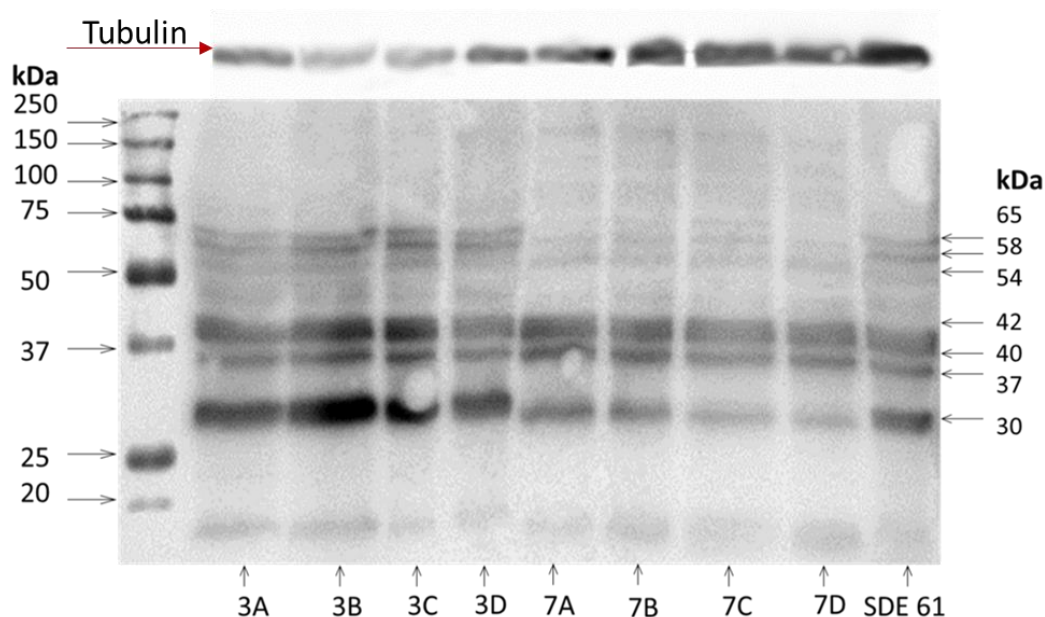
Hodnoty celkové míry fosforylace všech detekovaných proteinů kryokonzervovaných vzorků druhé hodnocené skupiny byly poměrně vyrovnané (graf č.14). O něco vyšší optická denzita než u srovnávacího vzorku 2B, byla naměřena u vzorků 2C a 1A. Nejnižší hodnota relativní optické denzity v porovnání se vzorkem 2B byla u vzorku 1C. Mezi hodnotami vzorků nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl.



Graf č.14: Graf celkové míry relativní optické denzity tyrosinové fosforylace proteinů (PTyr) druhé hodnocené skupiny kryokonzervovaných hřebčích spermií s přidáním směrodatnou odchylkou. Kryokonzervované vzorky druhé hodnocené skupiny 1A, 2B, 1C a 2C. Hodnoty vztaženy ke vzorku 2B.

5.2.7.3 Hodnocení míry fosforylace třetí skupiny hřebčích spermií

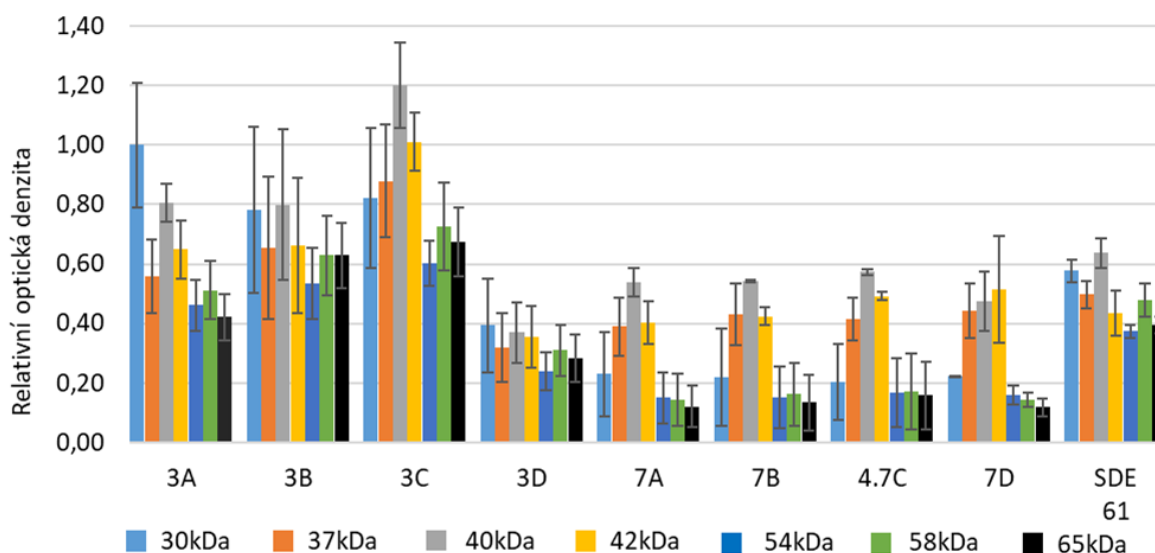
V této skupině byly kryokonzervované vzorky 3A, 3B, 3C, 3D, 7A, 7B, 7C, 7D a SDE 61. Na membráně z obrázku č.7 jsou vyznačené detekované proteiny. Signály těchto proteinů byly detekovány v molekulové hmotnosti 30, 37, 40, 42, 54, 58 a 65 kDa. Patrné jsou výrazné signály ve všech vzorcích u proteinů v molekulové hmotnosti 30, 37, 40 a 42 kDa. Vzorky 7A, 7B, 7C, 7D měly slabší míru signálu u proteinu v molekulové hmotnosti 54, 58 a 65 kDa než vzorky 3A, 3B, 3C, 3D a SDE 61 kde byl signál výraznější.



Obrázek č.7: Imunodetekce fosfotyrosinu a referenčního proteinu α -tubulinu v extraktech spermií u kryo-konzervovaných vzorků spermií 3A, 3B, 3C, 3D, 7A, 7B, 7C, 7D, SDE 61.

U vzorků 3D, 7A, 7B, 7C, 7D byla patrná nižší optická denzita než u ostatních vzorků (graf č.15). Nejvyšší hodnoty optické denzity měl protein s mol. hmotností 40 kDa u všech vzorků, s výjimkou 3D, kde měl nejvyšší naměřenou hodnotu protein s mol. hm. 30 kDa. Nejnižší hodnotu měl u vzorků 7A, 7B, 7C, 7D protein s mol. hm. 65 kDa. U vzorků 3A, 3B, 3C, SDE 61 měl nejnižší hodnotu relativní optické denzity protein s mol. hm. 54 kDa. Hodnoty byly vztaženy k proteinu s mol. hm. 30 kDa u vzorku 3A.

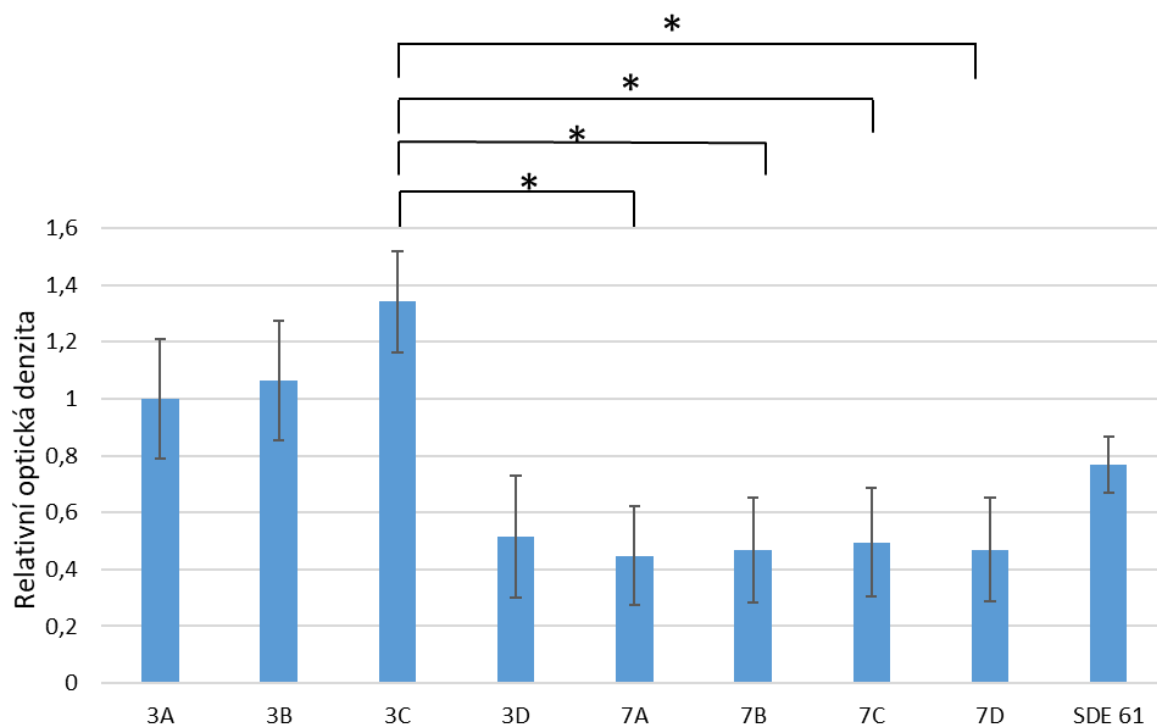
Míra PTyr kryokonzervovaných vzorků hřebčích spermií



Graf č.15: Relativní optická denzita fosforylace proteinu tyrosinu (PTyr) kryokonzervovaných vzorků třetí skupiny – 3A, 3B, 3C, 3D, 7A, 7B, 7C, 7D, SDE 61. U každého vzorku bylo hodnoceno 7 proteinů. Hodnoty byly vztaženy k proteinu s 30 kDa ve vzorku 3A. Barevně byly rozlišeny detekované proteiny.

Celková míra relativní optické denzity u jednotlivých kryokonzervovaných vzorků třetí hodnocené skupiny je zobrazena v grafu č. 16. U vzorků 3A, 3B, 3C a SDE 61 byla patrná vyšší relativní optická denzita než u vzorků 3D, 7A, 7B, 7C a 7D. Mezi většinou vzorků není statisticky signifikantní rozdíl. Pouze mezi vzorkem 3C a vzorky 7A, 7B, 7C, 7D existuje signifikantní rozdíl na hladině významnosti $p > 0,05$ (v grafu č.16 značení *).

Celková míra P_{Tyr} u kryokonzervovaných vzorků hřebčích spermií



Graf č.16: Celková míra relativní optické denzity u jednotlivých kryokonzervovaných vzorků třetí skupiny s přidanou směrodatnou odchylkou a statistickou závislostí.

P_{Tyr} = fosforylace proteinu tyrosinu

Index * značí signifikantní rozdíl na hladině významnosti $p > 0,05$ mezi jednotlivými vzorky kryokonzervovaných hřebčích spermií.

6 Diskuze

Aby se spermie staly schopnými oplození, musí projít změnami souhrnně označovanými jako kapacitace. Mezi tyto změny patří změny fluidity a složení plazmatické membrány, různé posttranslační modifikace proteinů a hyperaktivace motility. Důležitým indikátorem kapacitace je fosforylace proteinů (Naresh & Atreja 2015). Fosforylace má také zásadní vliv na hyperaktivaci motility a následnou akrozomální reakci spermie. V *in vivo* podmínkách je kapacitace zahájena kontaktem spermie s reprodukčním traktem samice. K zahájení kapacitace v *in vitro* podmínkách je potřeba vhodné médium. Bohužel přesné složení média vhodného pro kapacitaci *in vitro* hřebčích spermií nebylo zatím objeveno (McPartlin et al. 2008).

Kryokonzervování inseminačních dávek je běžný postup v reprodukci hospodářských zvířat. U koní dosahuje zabřeznutí z inseminace kryokonzervovanými dávkami nižší úspěšnosti než při inseminaci čerstvým spermatem, jen asi 40–60 % (Graham 1996). U kryokonzervovaných dávek dochází k vyšší míře fosforylace než u nativních vzorků. Kryokonzervace ovlivňuje mitochondriální proteiny, oxidativní fosforylaci a proteiny s oxidoreduktázovou aktivitou zodpovědné za přenos iontů. Také má vliv na specifické proteiny důležité pro vazbu spermie na oocyt lokalizované v oblasti akrozomu (Martin-Cano et al. 2020). Kryokonzervace má negativní vliv na životnost a oplozovací schopnost spermií (Thomas et al. 2006).

Kryokonzervace způsobuje poškození plazmatické membrány. V běžném postupu výroby kryokonzervovaných inseminačních dávek u hřebců je jedním z kroků odstranění většiny semenné plazmy. Bylo prokázáno, že její odstranění vede k aktivaci signálů podobných kapacitaci (Gadella et al. 2008, Rathi et al. 2003). Přidání proteinů semenné plazmy při kryokonzervaci zpět ke spermatu mělo vliv na zlepšení přežitelnosti a funkčních parametrů spermií hřebců (Bubenickova et al. 2020). Tato zjištění by mohla vést ke zlepšení postupu tvorby inseminačních mražených dávek a zvýšení úspěšnosti inseminace klisen s těmito dávkami.

Chlad a osmotické jevy během mražení vyvolávají destabilizaci a dehydrataci buněk, což vede k přeskupování lipidových složek membrány a ztráty cholesterolu, a tím zvýšení fluidity membrány (Bailey et al. 2000). Ta se tak stává propustnější pro ionty Ca^{2+} do buňky. Nárůst hladiny Ca^{2+} spouští kapacitační dráhy a vyvolává kryokapacitaci (Naresh & Atreja 2015). Ca^{2+} přímo reguluje rozpustné adenylátcyklázy ovlivňující produkci cAMP a aktivaci PKA. Aktivace PKA je nutná k fosforylaci tyrosinu (Signorelli et al. 2012).

V této práci byla pomocí imunofluorescenční mikroskopie a metody Western Blot imunodetekce potvrzena rozdílná míra fosforylace proteinů u nativních a kryokonzervovaných hřebčích spermií. Nejprve byla zkoumána lokalizace fosforylovaných proteinů. Nativní vzorky měly fosforylované proteiny lokalizované v největší míře v oblasti ekvatoriálního segmentu a bičíku (E+B) zároveň. Kryokonzervované vzorky měly nejčastěji detekci v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku (A+E+B). Proteiny z oblasti ekvatoriálního segmentu patří do skupiny proteinů umožňujících fúzi spermie s oocytem po akrozomální reakci (Jones et al. 2008). Byly pozorovány rozdíly v signálu v oblasti ekvatoriálního segmentu u nativních a kryokonzervovaných vzorků. Nativní vzorky měly signál v celé oblasti ekvatoriálního segmentu, zatímco kryokonzervované vzorky měly signál uprostřed a signál připomínal tvar trojúhelníku. Lokalizace tohoto silně fosforylovaného trojúhelníku byla popisována jako subekvatoriální segment na hlavičce spermií kance, berana a býka (Jones et al. 2008).

Fosforylace v oblasti bičíku souvisí s hyperaktivací motility během kapacitace (Naz 1999). Právě bičík je považován za hlavní oblast tyrozinové fosforylace u spermii (Petrunina et al. 2001). V této práci byla fosforylace bičíku pozorována u všech hodnocených spermii se signálem proti fosfotyrosinu, a to jak u nativních, tak u kryokonzervovaných vzorků. Nativní vzorky měly výraznější signál ve spojovací části bičíku (midpiece) než kryokonzervované vzorky, u kterých byl signál v celém bičíku rovnoměrný. Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi nativními a kryokonzervovanými vzorky u signálů protilátky proti fosfotyrosinu v kategorii ekvatoriální segment a bičík (E+B) a kategorii akrozom, ekvatoriální segment a bičík (A+E+B). Také byla potvrzena závislost mezi jednotlivými kategoriemi. Mezi signálem v oblasti akrozomu a bičíku (A+B) a signálem v ekvatoriálním segmentu a bičíku (E+B) byla potvrzena záporná korelace. Mezi signálem v oblasti ekvatoriálního segmentu a bičíku (E+B) a signálem v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku (A+E+B) byla potvrzena pozitivní korelace. Mezi signálem v oblasti akrozomu (A) a signálem v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku (A+E+B) byla potvrzena negativní korelace. Kladné hodnoty korelace znamenají, že s růstem jedné veličiny roste i druhá a naopak. Záporná korelace znamená, že zatímco jedna kategorie roste, druhá kategorie se snižuje. Fosforylace v oblasti akrozomu by mohla souviset s vazbou na ZP oocytu a následnou fúzí membrán během akrozomální reakce, jak bylo popsáno u prasat (Flesch et al. 1999; Flesch et al. 2001). V ekvatoriálním segmentu jsou nejspíš lokalizovány organizační centra molekulárních komplexů, která podstupují fosforylaci a pravděpodobně se podílejí na fúzi membrán během akrozomální reakce (Jones et al. 2008). Fosforylace v oblasti bičíku souvisí s hyperaktivací motility, jak dokázal ve své studii kančích, křeččích a lidských spermii Fujinoki et al. (2006).

Dále byla pomocí imunofluorescenční mikroskopie hodnocena přítomnost akrozomu a signálu protilátky proti fosfotyrosinu. V této práci byly detekované spermie rozděleny do tří kategorií: spermie s akrozomem a zároveň signálem proti fosfotyrosinu (PNA+, FOS+), spermie bez akrozomu, ale se signálem proti fosfotyrosinu (PNA-, FOS+) a spermie bez akrozomu a bez signálu proti fosfotyrosinu (PNA-, FOS-). U nativních i kryokonzervovaných převažovalo množství spermii PNA+, FOS+. Mezi přítomností akrozomu a signálem protilátky proti fosfotyrosinu nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi nativními a kryokonzervovanými vzorky. Mezi kategoriemi PNA+, FOS+ a PNA-, FOS+ byla potvrzena záporná korelace. Fosforylované proteiny byly lokalizovány v oblasti akrozomu i u spermii bez detekovaného akrozomu. Z toho vyplývá, že přítomnost akrozomu neměla vliv na fosforylované proteiny, protože se pravděpodobně nacházejí na vnitřní membráně, nebo pod vnitřní membránou akrozomu. Tuto domněnku potvrzuje u myši a prasat Jones et al. (2008).

V naší studii byl pozorován nárůst množství fosforylovaných proteinů u kryokonzervovaných vzorků. U nativních vzorků byly pomocí metody Western blot detekovány 4 fosforylované proteiny s molekulovou hmotností 36, 38, 65 a 85 kDa. Nejsilnější signál byl detekován u proteinů s molekulovou hmotností 36 a 38 kDa. U kryokonzervovaných vzorků byly detekovány fosforylované proteiny s molekulovou hmotností 21, 24, 30, 37, 40, 42, 46, 48, 54, 58 a 65 kDa. Byly pozorovány rozdíly ve fosforylaci mezi jednotlivými vzorky. Protein s mol. hm. 85 kDa byl detekován pouze u nativních vzorků. Proteiny 21, 24, 39 a 46 kDa byly detekovány pouze u první skupiny kryokonzervovaných vzorků, proteiny s mol. hm. 30, 40, 42, 54 a 58 kDa byly detekovány pouze u druhé skupiny kryokonzervovaných vzorků. Detekce proteinů s molekulovou hmotností kolem 37–40 kDa byla detekována u nativních i obou

kryokonzervovaných vzorků. Thomas et al. (2006) ve své studii srovnávající fosforylaci kapacitovaných, kryokonzervovaných a čerstvých hřebčích spermii pozoroval výraznou fosforylaci u proteinu s mol. hm. 100 kDa a skupiny proteinů s mol. hm. 44–52 kDa. Protein o velikosti 100 kDa sice nebyl detekován v této práci, ale u kryokonzervovaných vzorků byly detekovány proteiny s mol. hm. 42, 46, 48 a 54 kDa, které by mohly odpovídat proteinům, které detekoval Thomas et al. (2006). V této práci byly detekovány u kryokonzervovaných vzorků fosforylované proteiny s mol. hm. 30 a 25 kDa, které by mohly odpovídat proteinům s mol. hm. 32 a 25 kDa ze zmíněné studie (Thomas et al. 2006). Mírné rozdíly v molekulové hmotnosti mohou být způsobené pracovním postupem nebo nepřesností detekce jednotlivých proteinů během jednotlivých experimentů. Flesch et al. 1999 detekoval v membráně kančích spermii proteiny o velikosti 27, 37 a 40 kDa, které pravděpodobně souvisejí s fluiditou membrány. Proteiny s mol. hm. 27 kDa a 40 kDa by mohly odpovídat proteinům s mol. hm. 24 a 39 kDa detekovaným v této práci. V jiné studii na kapacitovaných hřebčích spermii detekoval Flesch et al. (2001b) u fosforylovaných proteinů v oblasti akrozomu s mol. hm. 35 a 46 kDa vysokou vazebnou afinitu k ZP. Tyto proteiny by mohly být klíčové pro navození akrozomální reakce. Protein s mol. hm. 35 kDa by mohl odpovídat proteinům s mol. hm. 36 kDa (u nativních vzorků) a 37 kDa (u kryokonzervovaných vzorků) detekovaných v této práci. Jak již bylo diskutováno, nepřesnosti v molekulové váze mohly být ovlivněny pracovním postupem.

Detekce proteinu s mol. hm. 37 kDa v naší studii se shoduje s detekcí na kančích spermii u Flesch et al. (1999). Fosforylované proteiny s molekulovou hmotností 37 kDa u hřebčích spermii detekoval také McPartlin et al. (2008). V jeho práci měly nejvyšší hodnotu signálu proteiny s molekulovou hmotností 114 a 150 kDa, které v našich experimentech vůbec nebyly detekovány. Roy & Atreja (2008) identifikovali PTyr proteiny s mol. hm. 20 a 38 kDa u kapacitovaných spermii buvola. Protein 38 kDa byl lokalizován v oblasti střední a hlavní části bičíku (Roy & Atreja 2008). Protein o této molekulové hmotnosti jsme detekovali u nativních vzorků, z kryokonzervovaných vzorků s velkou pravděpodobností odpovídá detekovaný protein s mol. hm. 37, 39 nebo 40 kDa. Fujinoki et al. (2006) detekoval fosforylované proteiny v membráně bičíku u kance (20, 38, 40, 44 kDa), křečka (40, 43, 50 kDa) a člověka (18, 43, 55 kDa). Pravděpodobně se jedná o proteiny podílející se na hyperaktivaci. V naší práci byly u kryokonzervovaných vzorků detekovány proteiny s mol. hm. 21, 40, 42, 46 a 54 kDa, které by mohly těmto proteinům odpovídat. U býčích spermii zaznamenali Naresh & Atreja (2015) zvýšenou hodnotu PTyr u proteinu s mol. hm. 56 kDa. Ten by mohl odpovídat detekovaným proteinům s mol. hm. 54 a 58 kDa. Naresh & Atreja (2015) detekovali u buvolých nativních vzorků proteiny s mol. hm. 72 a 86 kDa. Je možné, že se jedná o stejné, jen nepřesně zhodnocené proteiny s mol. hm. 65 a 84 kDa, které jsme našli u nativních vzorků (85 kDa) a u nativních i kryokonzervovaných vzorků hřebčích spermii (65 kDa). Proteiny s mol. hm. 65 kDa a proteiny s mol. hm. 36–40 kDa byly určeny u nativních i obou kryokonzervovaných skupin. Je pravděpodobné, že se tyto proteiny nacházejí na bičíku nebo v ekvatoriálním segmentu, jelikož tam měly jak nativní, tak kryokonzervované vzorky spermii často lokalizovaný signál. Detekce PTyr u proteinů s mol. hm. 36–40 kDa se často shodovala s jinými studiemi na toto téma, například u kanců ve studii Flesch et al. (1999).

Celková míra tyrosinové fosforylace ve spermii byla statisticky srovnávána mezi jednotlivými skupinami vzorků. Ačkoli byly mezi většinou vzorků pozorovány rozdílné hodnoty, statisticky signifikantní byly jen některé. Mezi kryokonzervovaným vzorkem 1C a nativními

vzorky 1H, 3H, 4H, 5H byl statisticky signifikantní rozdíl. Také byl pozorován statisticky signifikantní rozdíl mezi vzorkem 3C a vzorky 7A, 7B, 7C, 7D. Nicméně převažovaly vzorky, mezi nimiž nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl. Rozdíly v míře detekovaného signálu mezi jednotlivými vzorky mohou být vysvětleny individuálními rozdíly mezi hřebci. Tuto domněnku potvrdil ve své studii Aurich et al. (2020). Podle výsledků této studie má vliv na citlivost spermií vůči kryokonzervaci řada faktorů. Některá plemena vykazují lepší odolnost vůči mrazení a rozmrazování. Také bylo dokázáno, že ejakuláty mladých hřebců snášely kryokonzervaci lépe než ejakuláty stejných hřebců ve vyšším věku. Patrná byla i individuální citlivost jednotlivých hřebců na kryokonzervaci. Většina hřebčích spermií kryokonzervaci špatně snáší a až u 20 % hřebců není kryokonzervace možná (Aurich et al. 2020). Kvůli rozdílné citlivosti na kryokonzervaci se mohla u hřebčích vzorků využitých pro tuto práci projevit různá míra fosforylace. Vliv mohla mít také plemenná příslušnost hřebců a věk. Konkrétní zastoupení použitých vzorků bohužel není známé, ale vzorky pocházely ze Zemského hřebčince Písek s.r.o., kde je široké zastoupení plemen, od pony přes teplokrevníky a plnokrevníky až po chladnokrevníky. Pro stanovení průkaznějších a statisticky lépe hodnotitelných výsledků, by bylo nutné využití většího počtu vzorků různých konkrétních hřebců.

Nativní vzorky inseminačních dávek by měly být co nejméně fosforylované, jelikož se spermie musí dostat do místa kapacitace v samičím reprodukčním traktu a je tedy žádoucí, aby nedocházelo ke kapacitaci předčasně, ale až ve správný čas na správném místě. Z průměrných hodnot detekce PTyr vyplývá, že spermií bez signálu bylo u nativních vzorků necelých 20 % a u kryokonzervovaných 10 %. U kryokonzervovaných je toto číslo nižší, vzhledem k výše zmíněným negativním vlivům procesu kryokonzervace a rozmrazení na spermie. Stejně tak ale i nativní vzorky prošly dlouhou přípravou a manipulací, takže hodnoty spermií bez projevu kapacitace, respektive bez zvýšené fosforylace proteinů, mohly být ovlivněny.

Čím vyšší zastoupení spermií bez kryokapacitace, tím by se dalo o daném hřebci říci, že by mohl mít vyšší pravděpodobnost úspěšného oplodnění klisny. Navíc by pravděpodobně mohly spermie s nižší mírou fosforylace lépe snášet další manipulaci potřebnou k biotechnologickým postupům reprodukce, a tudíž by takové spermie mohly být vhodnější k využití v asistované reprodukci u koní.

Kapacitace hřebčí spermie není na rozdíl od většiny hospodářských zvířat přesně známá. Patrný je u hřebce druhově specifický průběh kapacitace. Porozumění kapacitaci hřebčích spermií by mohlo mít velký význam v reprodukci koní. Tato znalost by byla klíčová pro zjednodušení a zlepšení metod IVF, vytvoření vhodného média pro kryokonzervaci a média pro *in vitro* kapacitaci. Zabránění kryokapacitaci a dalším negativním vlivům kryokonzervace na hřebčí spermie by mohlo mít významný přínos pro reprodukci koní. V posledních letech je výzkumu kapacitace hřebčích spermií věnováno více pozornosti, přesto je ale potřeba na toto téma dalších studií.

7 Závěr

Cílem práce bylo pomocí fosforylace proteinů vyhodnotit kapacitní stav u hřebčích spermií před a po kryokonzervaci. Při porovnání nativních a kryokonzervovaných vzorků bylo detekováno větší množství fosforylovaných proteinů u kryokonzervovaných spermií.

- U nativních vzorků spermií převládala detekce fosforylovaných proteinů v oblasti ekvatoriálního segmentu a zároveň bičíku.
- U kryokonzervovaných vzorků spermií byla nejčastěji detekována fosforylace v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku zároveň, a to bez ohledu na přítomnost akrozomu.
- Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi nativními a kryokonzervovanými vzorky u signálů protilátky proti fosfotyrosinu v kategoriích ekvatoriální segment a bičík a akrozom, ekvatoriální segment a bičík. Také v rámci nativních a kryokonzervovaných vzorků byly statisticky významné rozdíly.
- Mezi signálem v oblasti akrozomu a bičíku a signálem v ekvatoriálním segmentu a bičíku byla potvrzena negativní korelace. Mezi signálem v oblasti ekvatoriálního segmentu a bičíku a signálem v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku byla potvrzena pozitivní korelace. Mezi signálem v oblasti akrozomu a signálem v oblasti akrozomu, ekvatoriálního segmentu a bičíku byla potvrzena negativní korelace.
- Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v zastoupení jednotlivých signálů přítomnosti akrozomu a detekce signálu protilátky proti fosfotyrosinu mezi nativními a kryokonzervovanými vzorky. V rámci nativních a kryokonzervovaných vzorků byly statisticky významné rozdíly.
- Byla potvrzena negativní korelace mezi zastoupením spermií PNA+, FOS+ (spermie s akrozomem a zároveň signálem proti fosfotyrosinu) a PNA-, FOS+ (spermie bez akrozomu, ale se signálem proti fosfotyrosinu).
- U nativních vzorků spermií byla detekována fosforylace u proteinů s molekulovou hmotností 36, 38, 65 a 84 kDa. Fosforylace u kryokonzervovaných vzorků byla detekována u proteinů s molekulovou hmotností 21, 24, 30, 37, 39, 42, 46, 48, 54, 58 a 65 kDa. Imunodetekce potvrdila nárůst počtu fosforylovaných proteinů a také celkovou míru fosforylace u kryokonzervovaných vzorků spermií.
- Mezi jednotlivými vzorky byly pozorovány rozdíly v míře detekovaného signálu, ale pouze u některých byl potvrzen statisticky významný rozdíl.

8 Literatura

- Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, Irvine S. 1997. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol. Reprod. Dev.* **47**:468-482.
- Aurich J, Kuhl J, Tichy A, Aurich Ch. 2020. Efficiency of semen Cryopreservation in Stallions. *Animals* **10(6)**: 1033.
- Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J of Sci Res, Series B* **4**:581.
- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology* **21**:1–7.
- Baumber J, Sabeur K, Vo A, Ball BA. 2003. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology* **60**:1239–1247.
- Boerke A, Tsai PS, Garcia-Gil N, Brewis IA, Gadella BM. 2008. Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology*. **70**:1188–1196.
- Brener E, Rubinstein S, Cohen G, ShternallK, Rivlin J. 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction, *Biol. Reprod.* **68**:837–845.
- Bubenickova F, Postlerova P, Simonik O, Siroshi J. 2020. Effect of Seminal Plasma Protein Fractions on Stallion Sperm Cryopreservation. *Int. J. Mol. Sci.* **21**:6415.
- Buschiazzo J, Ialy-Radio C, Auer J, Wolf JP, Serres C, Lefevre B, Ziyat A. 2013. Cholesterol depletion disorganizes oocyte membrane rafts altering mouse fertilization. *PLoS One* **8** (e62919) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062919>.
- Calvette JJ, Nassau S, Mann K, Sanz L, Sieme H, Klug E, Töpfer-Petersen E. 1994. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. *Reproduction of Domestic Animals* **29**:411-426.
- Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* **168**: 997–998.
- Colleoni S, Barbacini S, Necchi D, Duchi R, Lazzari G, Galli C. 2007. Application of ovum pick-up, intracytoplasmic sperm injection and embryo culture in equine practise. *Proceedings of the 53rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners* **2007**:554-559.
- Contreras L, Drago I, Zampese E, Pozzan T. 2010. Mitochondria: the calcium connection. *Biochimica and Biophysica Acta* **1797**:607–618.
- Cross NL, Razy-Faulkner P. 1997. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol Reprod* **56**: 1169-1174.

- Cummins JM, Woodall PF. 1985. On mammalian sperm dimensions. *J. Reprod. Fertil.* **75**:153-175.
- Davila MP, Muñoz PM, Tapia JA, Ferrusola CO, Da Silva C, Peña CBFJ. 2015. Inhibition of mitochondrial complex I leads to decreased motility and membrane integrity related to increased hydrogen peroxide and reduced ATP production, while the inhibition of glycolysis has less impact on sperm motility. *PLoS One* **10**:1-21.
- Davila MP, Muñoz PM, Bolaños JM, Stout TA, Gadella BM, Tapia JA, da Silva CB, Ferrusola CO, Peña FJ. 2016. Mitochondrial ATP is required for the maintenance of membrane integrity in stallion spermatozoa, whereas motility requires both glycolysis and oxidative phosphorylation. *Reproduction* **152**:683–694.
- de Andrade AFC, Zaffalon FG, Celeghini ECC, Nascimento J, Bressan FF, Martins SMMK, de Arruda RP. 2012. Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation, *Theriogenology* **77**:1866–1872.
- du Plessis SS, Agarwal A, Mohanty G, van der Linde M. 2015. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian Journal of Andrology* **17**: 230–235.
- Fazeli A, Duncan AE, Watson PF, Holt WV. 1999. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol. Reprod.* **60**:879-886.
- Flesch FM, Colenbrander B, van Golde LM, Gadella BM. 1999. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **262**:787–792.
- Flesch FM, Gadella BM. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA) - Rev. Biomembr.* **1469**:197-235.
- Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PF, Verkleij AJ, van Golde LM, Colenbrander B, Gadella BM. 2001a. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal of Cell Science* **114**:3543–3555.
- Flesch FM, Wijnand E, Van de Lest CHA, Colenbrander B, Van Golde LMG, Gadella BM. 2001b. Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. *Molecular of reproduction and development: Incorporating gamete research* **60**:107-115.
- Friend DS. 1982. Plasma-membrane diversity in a highly polarized cell. *J. Cell Biol.* **93**:243-249.
- Fujinoki M, Suzuki T, Takayama T, Shibahara H, Ohtake H. 2006. Profiling of proteins phosphorylated or dephosphorylated during hyperactivation via activation on hamster spermatozoa. *Reprod Med Biol.* **5**(2):123-135.

- Gadella BM, Miller NGA, Colenbrander B, Van Golde LMG, Harrison RAP. 1999. Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: Elimination of labeling artifacts. *Mol. Reprod. Dev.* **53**:108-125.
- Gadella BM, Harrison RAP. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* **127**:2407-2420.
- Gadella BM, Harrison RAP. 2002. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cell. *Biol. Reprod.*, **67**:340-350.
- Gadella BM, Rupali R, Brouwers JF, Stout TAE. 2002. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science* **68**:249-65.
- Gadella BM. 2008. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Animal Reproduction Science* **107**:229-236.
- Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *International Journal of Developmental Biology* **52**:473-480.
- Galli C, Colleoni S, Duchi R, Lagutina I, Lazzari G. 2007. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by *in vitro* procedures ranging from *in vitro* maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci* **98(1-2)**:39-55.
- Galli C, Colleoni S, Claes A, Beitsma M, Deelen C, Necchi D, Duchi R, Lazzari G, Stout TAE. 2016. Overnight shipping of equine oocytes from remote locations to an ART laboratory enables access to the flexibility of Ovum Pick Up-ICSI and embryo cryopreservation technologies. *J Equine Vet Sci* **41**:82.
- Gerton GL. 2002. Function of the sperm acrosome. Pages 265-302 in Hardy DM, editor. *Fertilization*. Academic Press, San Diego.
- Gibb Z, Lambourne SR, Aitken RJ. 2014. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biology of Reproduction* **91**:77.
- Gibb Z, Aitken RJ. 2016. The impact of sperm metabolism during *in vitro* storage: the stallion as a model. *BioMed Res. Int.* (e9380609) <https://doi.org/10.1155/2016/9380609>.
- Gonzalez-Fernandez L, Macias-Garcia B, Velez IC, Varner DD, Hinrichs K. 2012. Calcium-calmodulin and pH regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. *Reproduction* **144**:411-422.
- Graham JK. 1996. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract.* **12**: 131-47.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* **11**:73-88.
- Harayama H, Noda T, Ishikawa S, Shidara O. 2012. Relationship between cyclic AMP-dependent protein tyrosine phosphorylation and extracellular calcium during

- hyperactivation of boar spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* **79**:727-739.
- Harrison RAP. 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* **8**:581-594.
- Hinrichs K, Love CC, Brinsko SP, Choi YH, Varner DD. 2002. *In vitro* fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization *in vivo* after oviductal transfer. *Biology of Reproduction* **67**:256–262.
- Hinrichs K, Choi YH, Love CC, Spacek S. 2014. Use of *in vitro* maturation of oocytes, intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* culture to the blastocyst stage in a commercial equine assisted reproduction program. *J Equine Vet Sci* **34**(1):176.
- Ho HC, Suarez SS. 2001. An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca²⁺ store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biology of Reproduction* **65**:1606–1615.
- Ho HC, Granish KA, Suarez SS. 2002. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Developmental Biology* **250**:208–217.
- Hunter RHF, Fléchon B, Fléchon JE. 1987. Pre-and peri-ovulatory distribution of viable spermatozoa in the pig oviduct: A scanning electron microscope study. *Tissue Cell*, **19**:423-436.
- Hunter RHF, Coy P, Gadea J, Rath D. 2011. Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilisation. *J. Assist. Reprod. Genet.* **28**:191-197.
- Hwang JY, Mannowetz N, Zhang Y, Bewersdorf J, Lishko PV, Chung JJ. 2019. Dual Sensing of Physiologic pH and Calcium by EFCAB9 Regulates Sperm Motility. *Cell* **177**:1480-1494.
- Chamberland A, Fournier V, Tardif S, Sirard MA, Sullivan R, Bailey JL. 2001. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology* **55**:823–835.
- Johnson L, Blanchard TL, Varner DD, Scrutchfield WL. 1997. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology* **48**: 1199-1216.
- Jones R, James PS, Oxley D, Coadwell J, Suzuki-Toyota F, Howes EA. 2008. The equatorial subsegment in mammalian spermatozoa is enriched in tyrosine phosphorylated proteins. *Biology of reproduction* **79**: 421-431.
- Juhász J, Nagy P, Kulcsár M, Huszenicza GY. 2000. Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: A review. *Acta Vet. Brno* **69**:247-259.
- Katila T. 1997. Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology* **48**(7):1217-1227.
- Katila T. 2001. Sperm-uterine interactions: a review. *Anim. Reprod. Sci.*, **68**:267-272.
- Killian G. 2011. Physiology and endocrinology symposium: evidence that oviduct secretions influence sperm function: a retrospective view for livestock. *J. Anim. Sci.*, **89**:1315-1322.

- Kopf GS, Ning XP, Visconti PE, Purdon M, Galantino-Homer H, Fornés M. 1999. Signalling mechanisms controlling mammalian sperm fertilization competence and activation. In Gagnon C, editor. Pages 105-118 in *The male gamete: From basic science to clinical applications*. Cache River Press. Vienna IL, USA.
- Kumar R, Singh VK, Chhillar S, Atreja SK. 2012. Effect of supplementation of taurine or trehalose in extender on immunolocalization of tyrosine phosphoproteins in buffalo and cattle (Karan Fries) cryopreserved spermatozoa, *Reprod. Domest. Anim.* **48**:407–415.
- Kumaresan A, Siqueira AP, Hossain MS, Johannisson A, Eriksson I, Wallgren M, Bergqvist AS. 2012. Quantification of kinetic changes in protein tyrosine phosphorylation and cytosolic Ca²⁺ concentration in boar spermatozoa during cryopreservation, *Reprod. Fertil. Dev.* **24**:531–542.
- Lange-Consiglio A, Cremonesi F. 2012. 163 Hyperactivation of stallion sperm in follicular fluid for *in vitro* fertilization of equine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development* **24**:193–194.
- Leemans B, Gadella BM, Sostaric E, Nelis H, Stout TA, Hoogewijs M, Van Soom A. 2014. Oviduct binding and elevated environmental pH induce protein tyrosine phosphorylation in stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction* **91**:13.
- Leemans B, Gadella BM, Stout TA, Heras S, Smits K, Ferrer-Buitrago M, Claes E, Heindryckx B, De Vos WH, Nelis H et al. 2015a. Procaine induces cytokinesis in horse oocytes via a pH dependent mechanism. *Biology of Reproduction* **93**:23.
- Leemans B, Gadella BM, Stout TA, Nelis H, Hoogewijs M, Van Soom A. 2015b. An alkaline follicular fluid fraction induces capacitation and limited release of oviduct epithelium-bound stallion sperm. *Reproduction* **150**:193–208.
- Leemans B, Gadella BM, Stout TA, De Schauwer C, Nelis H, Hoogewijs M, Van Soom A. 2016a. Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. *Reproduction* **152**:233–245.
- Leemans B, Gadella BM, Stout TA, Sostaric E, Schauwer CD, Nelis H, Hoogewijs M, Van Soom A. 2016b. Combined albumin and bicarbonate induces head-to-head sperm agglutination which physically prevents equine sperm-oviduct binding. *Reproduction* **151**:313–330.
- Leemans B, Stout TAE, De Shauwer K, Heras S, Nelis H, Hoogewijs M, Van Soom A, Gadella BM. 2019a. Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species? *Reproduction* **157**:181-197.
- Leemans B, Stout TAE, Soom A, Van, Gadella BM. 2019b. pH-dependent effects of procaine on equine gamete activation. *Biol. Reprod.* **101**:1056-1074.
- Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* **471**:387–391.
- Loux SC, Crawford KR, Ing NH, Gonzalez-Fernandez L, Macias-Garcia B, Love CC, Varner DD, Velez IC, Choi YH, Hinrichs K. 2013. CatSper and the relationship

- of hyperactivated motility to intracellular calcium and pH kinetics in equine sperm. *Biology of Reproduction* **89**:123.
- Loux SC, Macias-Garcia B, Gonzalez-Fernandez L, Canesin HD, Varner DD, Hinrichs K. 2014. Regulation of axonemal motility in demembrated equine sperm. *Biology of Reproduction* **91**:152.
- Love CC, Varner DD, Thompson JA. 2000. Intra-and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **56**:93-100.
- Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD. 2005. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology* **63**:1584–1591.
- Macias Garcia B, Gonzalez Fernandez L, Loux SC, Rocha AM, Guimaraes T, Pena FJ, Varner DD, Hinrichs K. 2015. Effect of calcium, bicarbonate and albumin on capacitation-related events in equine sperm. *Reproduction* **149**:87–99
- Maitan P, Bromfield EG, Stout TAE, Gadella BM, Leemans B. 2021a. A stallion spermatozoon's journey through the mare's genital tract: In vivo and in vitro aspects of sperm capacitation. *Animal Reproduction Science*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106848>.
- Maitan PP, Bromfield EG, Hoogendijk R, Leung MR, Zeev-Ben-Mordehai T, van de Lest CH, Jansen JWA, Leemans B, Guimarães JD, Stout TAE, Gadella BM, Henning H. 2021b. Bicarbonate-Stimulated Membrane Reorganization in Stallion Spermatozoa. *Front Cell Dev (e772254)* DOI: 10.3389/fcell.2021.772254.
- Marquez B & Suarez SS. 2004. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of Reproduction* **70**:1626–1633.
- Martín-Cano FM, Gaitskell-Phillips G, Ortiz-RodríguezA JM, Silva-Rodríguez A, Román A, Rojo-Domínguez P, Alonso-Rodríguez E, Tapia JA, Gil MC, Ortega-Ferrusola C, Peña FJ. 2020. Proteomic profiling of stallion spermatozoa suggests changes in sperm metabolism and compromised redox regulation after cryopreservation. *Journal of Proteomics* 221 (e103765). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103765>.
- Maserati M, Mutto A. 2016. *In Vitro* Production of Equine Embryos and Cloning: Today's Status. *J Equine Vet Sci* **41**:42-50.
- Matsukawa K, Akagi S, Adachi N, Sato F, Hasegawa T, Takahashi S. 2007. *In vitro* development of equine oocytes from preserved ovaries after intracytoplasmic sperm injection. *J Reprod Dev* **53(4)**:877-85.
- McPartlin LA, Littell J, Mark E, Nelson JL, Travis AJ, Bedford-Guaus SJ. 2008. A defined medium supports changes consistent with capacitation in stallion sperm, as evidenced by increases in protein tyrosine phosphorylation and high rates of acrosomal exocytosis. *Theriogenology* **69**:639–650.
- McPartlin LA, Suarez SS, Czaya CA, Hinrichs K, Bedford-Guaus SJ. 2009. Hyperactivation of stallion sperm is required for successful *in vitro* fertilization of equine oocytes. *Biology of Reproduction* **81**:199–206.

- McPartlin LA, Visconti PE & Bedford-Guaus SJ. 2011. Guanine-nucleotide exchange factors (RAPGEF3/RAPGEF4) induce sperm membrane depolarization and acrosomal exocytosis in capacitated stallion sperm. *Biology of Reproduction* **85**:179–188.
- Morris LHA. 2018. The development of *in vitro* embryo production in the horse. *Equine Vet J.* **50** (6): 712-720.
- Mukai C & Okuno M. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of Reproduction* **71**: 540–547.
- Naresh S, Atreja SK. 2015. The protein tyrosine phosphorylation during *in vitro* capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology* **70**: 211-216.
- Naz RK 1999. Involvement of protein serine and threonine phosphorylation in human sperm capacitation. *Biology of reproduction* **60**: 1402-1409.
- Okabe M. 2016. The Acrosome Reaction: A Historical Perspective pages 1-13 in Buffone GM, Böckers TM, Clasca F, Kmiec Z, Singh B, Sutovsky P, Timmermans JP, editors. *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*. Springer International Publishing, Switzerland.
- Ortega-Ferrusola C, Anel-Lopez L, Martin-Munoz P, Ortiz-Rodriguez JM, Gil MC, Alvarez M, de Paz P, Ezquerro LJ, Masot AJ, Redondo E et al. 2017. Computational flow cytometry reveals that cryopreservation induces spermptosis but subpopulations of spermatozoa may experience capacitation-like changes. *Reproduction* **153**:293–304.
- Palmer E, Bezaud J, Magistrini M, Duchamp G. 1991. *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* **44**:375–384.
- Petrunkina A, Gelhaar R, Drommer W, Waberski D, Topfer-Petersen E. 2001. Selective sperm binfing to pig oviductal epithelium *in vitro*. *Biology medicine of reproduction.* **121**(6):889-96.
- Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA. 2003. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biology of Reproduction* **68**:1208–1214.
- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL. 2003. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *PNAS* **100**:14869–14874.
- Rall TW, Sutherland EW. 1958. Formation of a cyclic by tissue.J. Biol. Chem. **232**:1065-1076.
- Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. 2001. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction* **65**:462–470.
- Rathi R, Colenbrander B, Stout TA, Bevers MM, Gadella BM. 2003. Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. *Molecular Reproduction and Development* **64**:120–128.

- Rigby S, Derczo S, Brinsko SP, Blanchard TL, Taylor T, Forrest DW, Varner DD. 2000. Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. *Proc. Am. Ass. Equine Practns.* **46**:332-334.
- Roy SC, Atreja SK. 2008. Tyrosine phosphorylation of a 38-kDa capacitation-associated buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm protein is induced by L-arginine and regulated through a cAMP/PKA- independent pathway. *Int J Androl.* **1**:12-24.
- Saccary L, She YM, Oko R, Kan FWK. 2013. Hamster oviductin regulates tyrosine phosphorylation of sperm proteins during in vitro capacitation, *Biol. Reprod.* **89**:1–11.
- Sati L, Cayli S, Delpiano E, Sakkas D, Huszar G. 2013. The pattern of tyrosine phosphorylation in human sperm in response to binding to zona pellucida or hyaluronic acid, *Reprod. Sci.* **21 (5)**:573–581.
- Scott MA. 2000. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Anim. Reprod. Sci.* **60–61**:337-348.
- Scott MA, Overstreet JW. 1998. Sperm transport. Pages 610-615 in Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction*, vol. 4, Academic Press, New York.
- Signorelli J, Diaz ES & Morales P. 2012. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell and Tissue Research* **349**:765–782.
- Smith GD, Wolf DP, Trautman KC, da Cruz e Silva EF, Greengard P, Vijayaraghavan S. 1996. Primate sperm contain protein phosphatase 1, a biochemical mediator of motility. *Biology of Reproduction* **54**:719–727.
- Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS. 1995. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biology of Reproduction* **53**:1280–1285.
- Storey BT. 2008. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *International Journal of Developmental Biology* **52**:427–437.
- Suarez SS. 2002. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reproduction in Domestic Animals* **37**:140–143.
- Suarez SS. 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update* **14**:647-657.
- Šichtař J. 2018. *In vitro* produkce embryí u koní. *Veterinářství* **2018 (10)**: 716-720
- Tash JS. 1989. Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **14**:332–339.
- Tash JS & Bracho GE. 1994. Regulation of sperm motility: emerging evidence for a major role for protein phosphatases. *Journal of Andrology* **15**:505–509.
- Tateno H, Krapf D, Hino T, Sanchez-Cardenas C, Darszon A, Yanagimachi R, Visconti PE. 2013. Ca²⁺ ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing *in vitro* without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. *PNAS* **110**:18543–18548.

- Tremoleda JL, Gadella BM, Stout T, Colenbrander B, Bevers MM. 2003. Evaluation of Sperm-Oocyte Interaction During *in Vitro* Fertilization in the Horse. Utrecht University 67–91.
- Thomas AD, Meyers SA, Ball BA. 2006. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology* **65**: 1531-1550.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim. Reprod. Sci.* **89**:159–170.
- Toshimori K, Ito C. 2003. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Arch. Histol. Cytol.* **66**:383-396.
- Urner F, Leppens-Luisier G, Sakkas D. 2001. Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose, *Biol. Reprod.* **64**:1350–1357.
- van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Brouwers JF, Gadella BM. 2007. Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *Molecular Human Reproduction* **13**:445–454.
- Varner DD, Johnson L. 2007. From a sperm's eye view-revisiting our perception of this intriguing cell. *AAEP* **53**:104-177.
- Varner DD, Gibb Z, Aitken RJ. 2015. Grayson-Jockey Club Research Foundation: Review Article-Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. *Equine Veterinary Journal* **47**:16-24.
- Vijayaraghavan S, Stephens DT, Trautman K, Smith GD, Khatra B, da Cruz e Silva EF, Greengard P. 1996. Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. *Biology of Reproduction* **54**:709–718.
- Visconti PE. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**:667–668.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* **60–61**:481–492.
- Yanagimachi R. 1969. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* **18**:275-286.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. Pages 189-317 In Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press Ltd. New York

Zdroje obrázků

- Obr. č. 1 a obr. č. 2: Varner, DD, Johnson, L. 2007. From a sperm's eye view-revisiting our perception of this intriguing cell. *AAEP* **53**:104-177.

9 Použité zkratky

AKAP – protein kotvící kinázu A

APS – persíran amonný

ATP – adenosin trifosfát

BSA – bovinní sérový albumin

cAMP – cyklický 3',5'-adenosinmonofosfát

CatSper – kationtové kanály spermií

DAPI – diamidino-2-phenylindole

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ICSI – intracytoplazmatická injekce spermií

IF – imunofluorescenční mikroskopie

IVF – *in vitro* fertilizace

IBMX – fosfodiesterázový inhibitor

kDa – kilo Dalton, jednotka molekulové hmotnosti

mol. hm. – molekulová hmotnost

NC – nitrocelulózoza membrána

OPU – ovum pick up

PKA – proteinkináza A

PBS – phosphate buffered saline (fosfátový pufr)

PNA – peanut agglutinin

PM – plazmatická membrána

PTP – fosforylace tyrosinu v proteinech

PTyr – fosforylace proteinu tyrosinu

ROS – volné radikály kyslíku

SDS – dodecylsulfát sodný

WB – Western blot

