

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Vliv inhibice proteasomu na degradaci proteinů kančích spermií
během in vitro kapacity
Diplomová práce**

Autor práce: Bc. Vonšovská Hana

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

Konzultant: prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Vliv inhibice proteasomu na degradaci proteinů kančích spermií během in vitro kapacitace" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. dubna 2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D, za vedení praktické části práce a za vyčerpávající pomoc při sestavování celé diplomové práce. Dále chci poděkovat mé konzultantce Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za pomoc při psaní mé diplomové práce a za pomoc v praktické části.

Vliv způsobu inhibice proteasomu na průběh kapacitace spermií

Souhrn

Kapacitace spermií je klíčovým procesem pro úspěšné splynutí samčí a samičí pohlavní buňky. Během kapacitace prodělává spermie mnoho změn, přičemž jednou z nejdůležitějších je degradace proteinů navázaných na povrchu hlavičky spermie. Předpokládá se, že degradace proteinů na spermiích je zprostředkována ubiquitin-proteasomovým systémem. Nejprve je protein, který je určený k degradaci, označen polyubiquitinovým řetězcem, jenž je následně vystaven proteasomu, který polyubiquitinový řetězec deubiquitínuje a následně degraduje samotný protein. Cílem této práce bylo potvrdit, zda se na degradaci povrchových proteinů spermií podílí ubiquitin-proteasomový systém. Pro inhibici proteasomu byl využit inhibitor MG-132 rozpuštěný v DMSO. Inhibice proteasomu byla testována na základě imunodetekce mono-/poly-ubiquitinace v proteinových extraktech spermií před a po kapacitaci separovaných SDS elektroforesou a přenesených na nitrocelulosovou membránu. K vyhodnocení imunodetekce mono-/poly-ubiquitinovaných proteinů spermií byla použita denzitometrická analýza a byl pozorován statisticky významný rozdíl v mono-/poly-ubiquitinaci proteinů u spermií kapacitovaných v nemodifikovaném médiu a v mono-/poly-ubiquitinaci proteinů spermií kapacitovaných v modifikovaném médiu s inhibitorem MG-132 ($p < 0,05$). Byla provedena imunolokalizace ubiquitinace na fixovaných kančích spermiích před a po in vitro kapacitaci. Spermie byly hodnoceny pod fluorescenčním a konfokálním mikroskopem a na základě denzitometrické analýzy byl pozorován rozdíl v intenzitě imunofluorescenčního signálu detekce ubiquitinace mezi spermii kapacitovanými v nemodifikovaném médiu a spermii kapacitovanými v médiu s přídavkem inhibitoru proteasomu MG-132. Ubiquitin-proteasomový systém se tedy s velkou pravděpodobností podílí na degradaci některých proteinů spermií během jejich in vitro kapacitace.

Klíčová slova: spermie, kapacitace, proteasom, ubiquitin, inhibice

Effect of proteasomal inhibition on boar sperm protein degradation during in vitro capacitation

Summary

Sperm capacitation is the key process for a successful fusion of male sperm and female oocyte. During capacitation, sperm undergoes many changes, one of the most important being the degradation of proteins bound to the sperm head surface. Sperm degradation of proteins is believed to be mediated by the ubiquitin-proteasome system. First, the protein to be degraded is labelled with a polyubiquitin chain that is subsequently exposed to a proteasome that deubiquitinates the polyubiquitin chain and subsequently degrades the protein itself. The aim of this work is to confirm whether the ubiquitin-proteasome system is involved in degradation of sperm surface proteins. To inhibit proteasome, an MG-132 inhibitor dissolved in DMSO was used. Proteasome inhibition was tested by immunodetection of mono-/poly-ubiquitination in protein sperm extracts before and after capacitation separated by SDS electrophoresis and transferred to nitrocellulose membrane. Densitometric analysis was used to evaluate the immunodetection of mono-/poly-ubiquitinated sperm proteins, and a statistically significant difference was observed in mono-/poly-ubiquitination of spermatozoa proteins capacitated in unmodified medium and in mono-/poly-ubiquitination of spermatozoa proteins capacitated in the modified medium with MG-132 inhibitor ($p < 0.05$). Immunolocalization of ubiquitination was performed on fixed boar sperm before and after in vitro capacitation. Sperms were evaluated under fluorescence and confocal microscopy and a difference in the intensity of immunofluorescence signal detection of ubiquitination between spermatozoa capacitated in unmodified medium and spermatozoa capacitated in medium with the addition of proteasome inhibitor MG-132 was observed based on densitometric analysis. The ubiquitin-proteasome system is likely to contribute to the degradation of sperm proteins during their in vitro capacitation.

Keywords: sperm, capacitation, proteasom, ubiquitin, inhibition

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Hypotéza a cíl práce	1
3	Přehled literatury	2
3.1	Spermie.....	2
3.1.1	Morfologie spermie.....	2
3.1.2	Morfologie kančí spermie	3
3.1.3	Vývoj spermie	4
3.1.4	Epididymální maturace	5
3.1.5	Ejakulace.....	6
3.1.6	Spermie v oviduktu	8
3.1.7	Kapacitace spermií	10
3.1.8	Biologie kapacitace in vivo vs in vitro.....	11
3.2	Vazba na oocyt a oplození	12
3.3	Systém ubiquitin-proteasom	12
3.3.1	Ubiquitinace	12
3.3.2	Proteasom.....	13
3.3.3	Sytém ubiquitin-proteasom	13
3.4	Savčí spermie a proteasom	15
3.5	Inhibitory proteasomu	16
3.5.1	MG-132.....	17
3.5.2	Další inhibitory proteasomu	17
4	Materiál a metodika	19
4.1	Materiál.....	19
4.2	Metodika	19
4.2.1	Promytí spermií před kapacitací	19
4.2.2	Kapacitace spermií	19
4.2.3	Příprava vzorku spermií pro elektroforesu v polyakrylamidovém gelu s přídavkem SDS (dodecylsulfát sodný)	20
4.2.4	SDS elektroforesa	21
4.2.5	Elektropřenos proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu (Western blot)	21
4.2.6	Imunodetekce ubiquitinovaných proteinů.....	22
4.2.7	Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie	23
4.2.8	Imunofluorescence v suspenzi spermií	24
4.2.9	Statistické šetření	24
5	Výsledky	25
5.1	Detekce ubiquitinovaných proteinů v extraktech spermií	25

5.2	Detekce ubiquitinovaných proteinů v extraktech spermií v průběhu kapacitace	29
5.3	Lokalizace ubiquitinovaných proteinů ve spermiích	38
5.3.1	Vazba protilátky v suspenzi spermií	49
6	Diskuze	50
7	Závěr	54
8	Zdroje	56

1 Úvod

Spermie, jakožto pohlavní buňky samců, slouží k oplodnění samičích pohlavních buněk s cílem reprodukovat svou genetickou informaci v podobě nového jedince. Pro tento cíl musí ovšem spermie projít velkou řadou změn. Ke spermiu, která stále není in vivo oplození schopná, ale již má haploidní sadu chromosomů, vede složitá cesta spermatogeneze. Poté musí spermie projít epididymální maturací, při níž získá schopnost progresivního pohybu a velmi důležitou schopnost vazby na zona pellucida oocyty. Vývoj spermie ovšem stále ještě není dokončen, a proto spermie prochází dalšími změnami v samotném reprodukčním traktu samice, kde nastává kapacitace spermií v ovidukálním rezervoáru. Kapacitace je finální přeměnou spermie v hyperaktivovanou spermiu schopnou vazby a oplodnění vajíčka.

Všechny výše zmíněné procesy jsou spojeny se spoustou proteinových změn, a to jak uvnitř spermatické buňky, tak na jejím povrchu. Většina proteinů z povrchu spermie mizí během kapacitace. K degradaci proteinů slouží ubiquitin-proteasomový komplex. Tento systém pracuje na základním procesu označení proteinu ubiquitinem. Takto označené proteiny jsou následně vyhledány složitým proteinovým komplexem proteasomu, který má za úkol proteiny degradovat.

Spermie právě díky ubiquitin-proteasomovému systému může nahradit ve svém jádře histony za protaminy, formovat akrosom, a především během kapacitace degradovat proteiny ze semenné plasmy, které doposud chránily vazebná místa na povrchu spermie. Proteasomy jsou po kapacitaci vystaveny na akrosomu a váží se k polyubiquitinovým řetězcům prezentovaným na zona pellucida, takže ubiquitin-proteasomový systém má důležité uplatnění i v momentu oplození a i po něm.

2 Hypotéza a cíl práce

Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že se na degradaci proteinů spermie během kapacitace podílí ubiquitin-proteasomový systém.

Cílem práce byla detekce a lokalizace ubiquitinovaných proteinů v kančích spermiích během in vitro kapacitace v modifikovaném médiu s přidavkem inhibitoru proteasomu MG132.

3 Přehled literatury

3.1 Spermie

Spermie jsou samčí pohlavní buňky (gamety) tvořené v semenotvorných kanálcích, které se nacházejí ve varlatech samce. Jsou určené k oplození samičích oocytů. Tvorba spermií se nazývá spermatogeneze, která se dále dělí na spermatocytogenesi a po ní následující spermatohistogenesi. Při spermatogenesi dochází k přeměně z dosti nediferenciované diploidní buňky na silně specializovanou haploidní buňku. Buňky jsou zprvu nepohyblivé a později získávají schopnost pohybu a oplození (Reece 2011; Gadella & Luna 2014).

3.1.1 Morfologie spermie

Spermie je tvořena dvěma základními částmi, a to hlavičkou a bičíkem. Tvar a velikost hlavičky spermie je druhově specifická. Hlavičku spermie tvoří jádro, cytoplasma, cytoskelet a akrosom (Gadella 2017).

V jádru spermie je uložena genetická informace ve formě kondenzovaného chromatinu na protaminech. Protaminy dávají výhodu vysoké schopnosti kondenzovat a stabilizovat chromozom využitím vzniku disulfidických můstků mezi protaminy (Yanagimachi 1994). Během spermatogeneze dochází k vytlačení většiny cytoplasmy z hlavičky, to se projevuje jako protoplasmatická kapka u nezralých spermií. Cytoplasma je odstraněna s většinou organel, jako jsou ribosomy a endoplasmatické retikulum. Akrosom je specifickou membránovou organelou spermie, která se na jiných buňkách nevyskytuje. Při normální morfologii spermie je akrosom uložen v přední části hlavičky a má tvar jakési čapky. Jedná se o cytoplasmatický útvar tvořený dvojitou membránou (vnitřní a vnější). V akrosomu jsou uloženy lytické enzymy (hyaluronidasa, proakrosin atd.) potřebné pro navázání a průnik spermie do oocytu. Akrosom je velmi citlivý na osmotické změny (Gadella & Luna 2014; Gadella 2017).

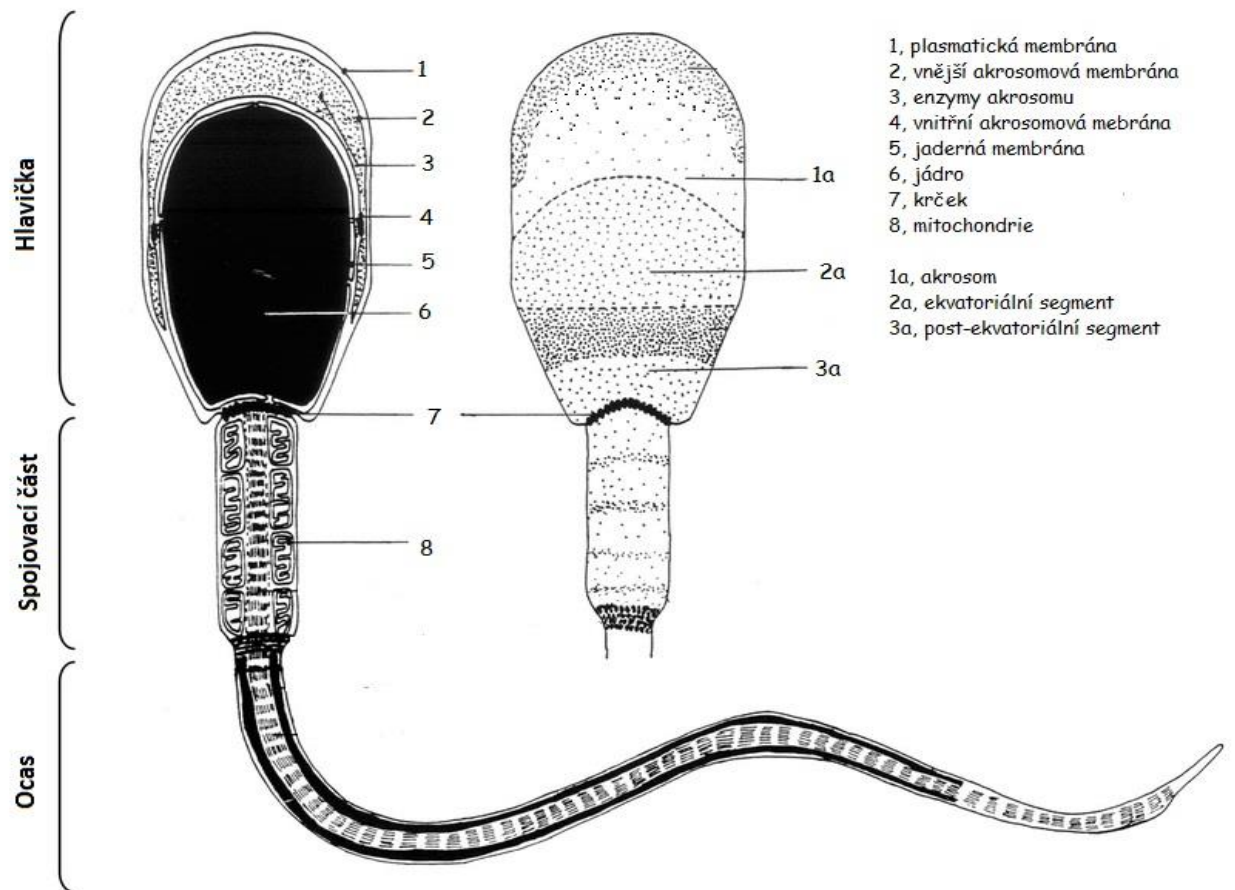
Hlavičku spermie dělíme na již zmíněný akrosom, postakrosomální čapku a ekvatoriální segment. Postakrosomální čapka je vymezena v prostoru od báze hlavičky po ekvatoriální segment a přiléhá těsně k cytoplasmatické membráně. Na rozdíl od akrosomu ovšem neobsahuje membránu a je mnohem rezistentnější vůči okolním osmotickým změnám působících na spermie (Gadella 2017).

Bičik spermie je určen pro pohyb celé spermie. Bičik je tvořen čtyřmi hlavními částmi: krček, mitochondriální oddíl, hlavní část a koncová část bičíku. Celým bičíkem prostupuje svazek mikrotubulů–axonema. Axonema vyrůstá z centriolu a tvoří ji jeden pár centrálních mikrotubulů, který je obklopen devíti páry mikrotubulů. Mitochondriální oddíl obsahuje velké množství mitochondrií, které tvoří ATP pro pohyb spermie (Gadella 2017).

3.1.2 Morfologie kančí spermie

Kančí spermie jsou kratší a užší oproti například býčím spermii. Kančí spermie mají zploštělou hlavičku oválného tvaru (viz Obr. 1, str. 4). Spermie kance je dlouhá obvykle 48 μm . Hlavička tvoří polovinu hmotnosti celé spermie, u kance je hlavička dlouhá 8,7 μm , široká 4,6 μm a tloušťka činí 0,8 μm (Gadella 2017). Akrosom zaujímá až 75 % hlavičky. Na bičik tedy u kance zbývá 40 μm , přičemž 10 μm tvoří spojovací (mitochondriální) část (Gadella & Luna 2014).

Variabilita mezi spermii není jen mezidruhovou otázkou, ale také mezi jednotlivými kanci jsou pozorovány rozdíly. Tyto morfologické rozdíly jsou dokonce spojovány s lepší fertilitou u kanců, jejichž spermie jsou oproti ostatním statisticky menší a jejich hlavička je méně protáhlá (Hairai et al. 2001).



Obr.1: Morfologie kančí spermie (Gadella et al. 2008).

3.1.3 Vývoj spermie

Při spermatocytogenesi se opakovaně mitoticky dělí diploidní zárodečná buňka spermatogonie na diferencované spermatogonie, které ve fázi růstu dospějí ve spermatocyty I. řádu. Po fázi růstové nastává fáze zrání, kdy za meiotického dělení dochází k přeměně spermatocyty I. řádu na spermatocyt II. řádu a je nazývána prespermatidou. Poté následuje druhé meiotické dělení a ze spermatocytů druhého řádu se vytvoří spermatidy, které jsou haploidními buňkami. Celý proces spermatocytogenese se odehrává okolo Sertoliho buněk přisedlých na basální lamině semenotvorných kanálků. Sertoliho buňky zajišťují více funkcí během spermatogenese. Mezi hlavní funkce patří výživa a ochrana spermatických buněk, dále se podílejí na regulaci tvorby a zrání spermií, jelikož vylučují androgen vázající protein, anti-mülleriánský hormon a inhibin (Franca et al. 2005; Parrish et al. 2017).

Po spermatocytogenesi musí spermie tzv. dozrát, nastává spermatohistogenese. Při tomto procesu spermie dostávají svůj charakteristický tvar i funkci nezbytnou pro oplodnění vajíčka, tedy samičí gamety (Parrish et al. 2017).

Při spermatohistogenezi následuje několik fází:

- Golgiho fáze – Golgiho komplex prochází výraznými změnami, tvoří se akrosomová granula v blízkosti jádra. Centrioly se přesouvají na periferii a jedna z centriol se přiloží na membránu spermatidy a dá tak základ bičíku.
- Fáze akrosomové čepičky – charakteristická růstem akrosomového váčku. Centrioly jsou na opačných pólech: distální a proximální. Vlivem pohybu centriol do blízkosti jádra se stahuje cytoplazma.
- Fáze kaudální manžety – dochází k pevné kondenzaci chromozomů jádra, především jsou histony nahrazeny protaminy.
- Maturační fáze – zbavení se cytoplazmy, kdy u nezralých spermií můžeme pozorovat zbytek cytoplazmy ve formě cytoplasmatické kapky na různých částech bičíku, přičemž cytoplasmatická kapka se posouvá směrem ke koncové části bičíku. Dále pozorujeme tvorbu mitochondriálního segmentu bičíku a dokončení vývoje bičíku, dokončení vývoje akrosomu obsahující enzymy, uvolnění ze svazku se Sertoliho buňkou a vyplavení do vývodných cest (Franca et al. 2005, Reece et al. 2011, Parrish et al. 2017).

3.1.4 Epididymální maturace

Po uvolnění prochází mladé, morfologicky zralé, ale bez schopnosti progresivního pohybu a vazby na zona pellucida, spermie nadvarletem. Změny během epididymální maturace zajišťují stabilizaci plasmatické membrány, ochranu receptorů na vazbu zona pellucida a zabraňují předčasné akrosomové reakci (Gatti et al. 1999). V nadvarleti je velmi specifické prostředí, které je nezbytné pro zrání spermií, specifické pH 6,5, teplota, iontové složení a další chemické a fyzikální vlastnosti (Dacheux et al. 2003).

Epitel vytváří mikroklky (stereocílie), které jsou v kontaktu se spermii a zvyšují tak celkový povrch epitelu nadvarlete. Epididymální tekutina obsahuje membránové váčky, které jsou apokrinně sekretovány, nazývané epididymosomy. Epididymosomy obsahují proteiny

a jsou spojovány s eliminací poškozených či jinak defektních spermií (Sutovsky 2001, Frenette et al. 2002). Proteiny epididymosomů se váží do plasmatické membrány spermií a během maturace se mohou měnit jejich sacharidové řetězce glykosylací či deglykosylací. Negativní náboj na povrchu membrány spermie se zvyšuje, čímž se mění lektin-vázající schopnosti spermií (Dacheux et al. 2003, Tulsiani 2003). Proteiny, které se váží v nadvarleti, jsou například laktoferrin, clusterin, cholesterol přenášející protein a mnoho dalších, pro kance jsou typické protein velmi blízké lidským proteinům (Gatti et al. 2004, Sullivan & Saez 2013).

Během cesty od hlavy nadvarlete k ocasu dochází k posunu protoplasmatické kapky, která obsahuje přebytečné mitochondrie a váčky Golgiho komplexu, ke konci bičíku až do úplné ztráty. V buňky nadvarlete, které vystylají jeho vnitřní povrch, zároveň vylučují glycerofosfocholin, který inhibuje kapacitaci spermií (Yuan et al. 2013). Zralé spermie jsou uchovávány v ocasu nadvarlete až do ejakulace (Sutovsky 2003).

3.1.5 Ejakulace

Během ejakulace jsou spermie vypuzeny z ocasu nadvarlete za pomoci hladké svaloviny a prochází skrze přídatné pohlavní žlázy (Barret et al. 2017). V koncové části ampula chámovodu vyústí první přídatné pohlavní žlázy semenné váčky, které produkují nažloutlý sekret, který obsahuje látky, které spermie aktivují. Mezi vylučované, spermie aktivující látky semenných váček, patří fruktosa, citrát, inositol, prostaglandiny a vylučovány jsou i některé proteiny. Sekretované sacharidy jsou důležité pro tvorbu energie k pohybu spermií. Další přídatnou pohlavní žlázou, která vytváří sekret především pro zvětšení objemu, jsou Cowperovy žlázy, které mají hlavní funkcí tvorbu lubrikačního sekretu (Reece 2011, Barret et al. 2017).

Semenná plasma, tedy kompletní sekret z přídatných pohlavních žláz samce, hraje důležitou roli ve finálním procesu zrání spermie. Některé proteiny obsažené v semenné plasmě jsou specifické pro funkci spermií a jejich oplození schopnosti. Celkově všechny molekuly v ní obsažené pokrývají povrch hlavičky spermie a ochraňují ji před vnějším prostředím a brání předčasné kapacitaci a akrosomální reakci (Muino-Blanco et al. 2008).

Vazba povrchových proteinů na spermii

Během ejakulace se ze semenné plasmy vážou komponenty, které spermii celkově podporují, ale také zabraňují spontánní akrosomové reakci, což je důležité neopomenout především při fertilizaci in vivo. Proteiny pocházející ze semenné plasmy se váží na fosfolipidy obsažené v plasmatické membráně (Petrunina et al. 2001). U kanců se ve velkém množství vyskytují proteiny zvané spermadhesiny. Jsou to proteiny o malé velikosti (12-16 kDa) a jejich funkcí je stabilizovat akrosom. Spermadhesiny na sebe vážou další komponenty jako fosfolipidy, proteinasové inhibitory, cukry a další, čímž ovlivňují celý proces oplodnění na několika různých úrovních. Během kapacitace se většina spermadhesinů uvolňuje z povrchu spermie. Spermadhesiny vázané přes fosfolipidy zůstávají na akrosomu a účastní se primární vazby spermie na zona pellucida (Töpfer-Petersen et al. 1998, Haase et al. 2005).

Ejakulované spermie při průchodu samičím reprodukčním traktem postupují další fyziologickou přípravu pro konečné oplození, bezprostředně po ejakulaci nejsou oplození schopné. V oviduktu získají schopnost vázat se na zona pellucida a podstoupit akrosomální reakci. Všechny změny zahrnující funkční biochemické změny se souhrnně nazývají kapacitace (Franca et al 2005, Gadella & Luna 2014).

Proteiny na spermii kance

Proteinů na hlavičce spermie bylo doposud detekováno velké množství, Kwon et al. (2014), detekovali 224 proteinových míst, z nichž ovšem pouze deset proteinů vykazovalo rozdíl v expresi před a po kapacitaci spermii. Zajímavé je, že tři proteiny prodělali během kapacitace snížení exprese, zatímco zbylých sedm proteinů prodělalo zvýšení exprese.

Protein, který po kapacitaci snížil svou expresi, byl RAB2 (z angl. Ras associated binding protein), PHGPx (z angl. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase) a PDHB (z angl. Pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit) (Ursini et al. 1999, Stenmark Olkkonen 2001, Kwon et al. 2014). Rodina proteinů RAB hraje klíčovou roli v membránové fúzi a jsou lokalizovány na akrosomální membráně (Pereira-Leal Seabra 2001). Zdá se tedy, že tento protein je zapojen do modifikace akrosomu vedoucí k indukci exocytosy akrosomu po kapacitaci spermie (Mountjoy et al. 2008). Protein PHGPX (22 kDa) podporuje strukturální stabilitu mitochondriím, nachází se tedy především v bičíku spermie (Kwon et al. 2014). Třetím proteinem, který snižuje svou expresi je protein PDHB, jedná se o fosforylovaný protein, který

pravděpodobně reguluje produkci energie a celkově metabolismus spermie během hyperaktivace. Nachází se také v bičíku spermie (Flesch et al. 1999, Kwon et al. 2014).

Co se týče malých proteinových molekul spermadhesinů (8-16 kDa) agregovaných na povrchu spermií ze semenné plasmy, je potvrzeno, že všechny spermadhesiny a kančí povrchový protein DQH, tedy BSP1 (z angl. Binding protein of Synaptojanin Polyphosphoinositide phosphatase domain), jsou polyubiquitinovány a degradovány během kapacitace proteasomem (Sanz et al. 1992, Jonáková et al. 1998, Zigo et al. 2019). AQN protein (angl. Zona pellucida-binding protein) se vyskytuje na akrosomu spermií. Předpokládá se, že je důležitý pro vazbu spermie v oviduktním rezervoáru a jedná se o vazebný protein na zona pellucida (Mann et al. 1992, Gohr et al. 2005, Yi et al. 2010). Spermadhesin AWN (angl. Sperm associated AWN protein) je hlavní protein kančí semenné plasmy asociovaný s povrchem spermií. AWN se váže na beta-galaktosidy a na glykoproteiny prasečí zona pellucida, což naznačuje úlohu tohoto proteinu v primární interakci s oocytem (Rodríguez-Martinez et al. 1998). PSP I (z angl. Phosphoserine phosphatase I) a PSP II (z angl. Phosphoserine phosphatase II) jsou proteiny zabráňující předčasné kapacity a předčasnému vylití akrosomu (Töpfer-Petersen 1998).

Miles et al. (2013) ve své práci uvádí několik dalších proteinů, které jsou asociované s proteasomem. Patří k nim protein ACRBP (z angl. Acrosin-binding protein), který funguje jako vazebný protein pro proakrosin. Dále pak protein pB1, inhibitor motility spermií ze semenné plasmy (Seminal Plasma Sperm Motility Inhibitor) a inhibitor akrosinu ze semenné plasmy (Seminal Plasma Acrosin Inhibitor A1), u něhož se předpokládá, že chrání spermie před proteolytickým účinkem degradace (Fritz et al. 1976, Miles et al. 2013). Lactadherine je dalším z proteinů, který byl detekován v semenné plasmě kanců. Předpokládá se, že slouží pro spermie jako ochrana při styku s bakteriemi a zvyšuje schopnost oplodnění (Miles et al. 2013, González-Cadavid et al. 2014).

3.1.6 Spermie v oviduktu

Jakmile spermie vstoupí do reprodukčního traktu samice, začne na ni působit spousta negativních vlivů, které je vyřazují z šance na oplození oocyty (Yanagimachi 1994). Mezi první patří nepříznivé kyselé pH v pochvě, hlen v děložním krčku a buňky imunitního systému. Spermie, které zvládnou kyselé prostředí pochvy se velmi rychle dostávají do děložního krčku, který obsahuje hlen. Ten je velmi hustý a spermie musí „plavat proti proudu“. Děložním krčkem

neprojdou spermie nezralé a je tedy selekčním prvkem. Prostupnost děložního krčku také závisí na estrálním cyklu, kdy v době estru je krček pro spermie prostupnějším. Krček obsahuje ve svém povrchu krypty, kde je průchod pro spermie snazší (Barros et al. 1988). Po průchodu děložním krčkem prochází spermie dělohou k vejcovodu. Průchod dělohou je velmi rychlý díky kontrakcím dělohy, které pohyb usnadňují. V ústí vejcovodu vzniká díky spermiím oviduktální rezervoár, který slouží k uchování spermií do doby, než nastane ovulace vajíčka (Talevi 2010). Spermie jsou zde navázány na epiteliální buňku za pomoci sacharidových zbytků přítomných na epiteliálních buňkách oviduktu a k nim vázajícím se proteinům, podobným lektinům, přítomných na hlavičkách spermií (Suarez 2002). Právě molekuly zahrnuté v tomto procesu jsou silně druhově specifické. Pro prasata jsou typické galaktosylové a mannosylové zbytky (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005). Spermie zde tedy čekají na správný okamžik, aby se setkaly s oocyt/y. Navíc je zde zpomalena jejich aktivita a blokována kapacitace, čímž se prodlužuje jejich životnost. Kapacitace je blokována sníženou schopností absorbovat Ca^{2+} a téměř nulovou tyrosinovou fosforylací (Talevi 2010).

Uvolnění spermií z oviduktálního rezervoáru způsobuje pravděpodobně hormonální impulz během ovulace, ovšem přesné mechanismy nejsou doposud známy. Okolo uvolnění spermií z oviduktálního rezervoáru je mnoho teorií. Uvolnění spermií může být způsobeno díky hyperaktivaci motility spermií, díky čemuž uniknou z vazby za využití vyšší síly. Ovšem je možnost, že uvolnění je způsobeno ztrátou proteinů z povrchu hlavičky spermie, které jsou nezbytné pro vazbu na oocyt. Ve výsledku s největší pravděpodobností probíhají oba mechanismy zároveň a jsou koordinovány z epitelu oviduktu, ovšem teorií stále přibývá. Například u skotu byl velmi podrobně popsán mechanismus působení enzymů na specifické sacharidové zbytky, které jsou potřebné pro vazbu spermie na oviduktální epitel, ty tak přispívají k uvolnění spermií z rezervoáru (Coy et al. 2012). S jistotou lze říct, že záleží na kapacitačním stavu spermie, který je ovlivněn impulzem, při kterém dojde ke změně složení oviduktální tekutiny, díky čemuž nastává kapacitace spermií. Každá spermie dosahuje kapacitace za jinak dlouho dobu, spermie jsou tedy uvolňovány z rezervoáru postupně (Hunter 1996).

3.1.7 Kapacitace spermií

Kapacitaci spermií poprvé nezávisle popsali Austin (1951) a Chang (1951) před více jako 50 lety. Oba zjistili funkční změny na spermiích, které odebrali ze samičího pohlavního ústrojí po kopulaci se samcem. Podobných změn si všimli i u spermií odebraných z ocasu nadvarlete, které inkubovali se sekrety získanými z vejcovodu samice-jako neúčinnější se potvrdil průchod spermií celým pohlavním ústrojím samice a poté inkubace se sekrety od říjné samice.

Kapacitace je druhově specifická, především co se týče místa a doby k ní potřebné. Výsledkem jsou však vždy hyperaktivní spermiie schopné vázat se na oocyt a podstoupit akrosomální reakci, která jim umožní proniknout zona pellucida a spojit se s oocytem. Změny během kapacitace zahrnují modifikace jak uvnitř, tak vně spermiie. Dochází k odstranění proteinů semenné plasmy, glykoproteinů vázaných na povrch spermiie, reorganizace plasmatické membrány. Co se týče hlavičky spermiie, jsou na její přední části lokalizované receptorové molekuly odpovědné za spuštění signální kaskády vedoucí k akrosomální reakci, zatímco molekulární změny na bičíku spermiie způsobují její hyperaktivaci (Tulsiani et al. 2007).

Je mnoho výzkumů prokazujících, že kapacitaci spouští eflux cholesterolu z plasmatické membrány spermiie. Cholesterolový eflux zvyšuje permeabilitu membrány a zároveň vyvolává influx vápenatých iontů, ty dále spouští signální kaskádu vedoucí ke kapacitaci. Pokud dojde k vazbě kapacitované spermiie na zona pellucida oocytu, zvyšuje se vnitřní koncentrace vápenatých kationtů a spouští se další signální kaskáda, která vede ke zvýšení koncentrace vápenatých kationtů ve vnější akrosomální membráně. Poté spermiie podstoupí akrosomální exocytosu. Hydrolytická aktivita enzymů z akrosomu, včetně hyperaktivního pohybu spermiie, je významným faktorem při penetraci zona pellucida oocytu (Abou & Tulsiani 2009). Hyperaktivace je termín používaný pro rychlé a silné rotace bičíku spermiie, a přestože je tento projev spojen s kapacitací, je prokázáno, že lze zabránit kapacitaci bez současného vyblokování hyperaktivace či jeho současným vyblokováním. Toto poznání vede k předpokladu většího počtu signálních drah při kapacitaci (Zeng 2003).

3.1.8 Biologie kapacity in vivo vs in vitro

Při kopulaci dochází k deponaci milionů spermií do samičího pohlavního traktu, avšak většina z deponovaných spermií je eliminována. Malé procento z nich proniká do hlenem vyplněného krčku – ten brání vniknutí semenné plasmy do dělohy, eliminuje abnormální spermie, eliminuje mikroby a uchovává spermie pro pozdější transport (Yanagimachi 1994).

Hlen v krčku je bohatý na různé glykoproteiny a spermie se skrz něj pohybují velmi rychle na základě aktivního a pasivního procesu, směrem k děloze a vejcovodu. V distální oblasti vejcovodu je ampula vejcovodu, kde se kapacitovaná spermie setkává s ovulovaným oocytom obklopeným kumulárními buňkami (Meyers & Rosenberger 1999).

Kumulární matrix je rozvolňován hyaluronidasou přítomnou na povrchu spermie, která zabezpečuje průnik skrz kumulární komplex (Meyers & Rosenberger 1999). Albumin je pravděpodobně spouštěč celé kapacity – vyvolává eflux sterolů (zejména cholesterolu) z plasmatické membrány spermie. Eflux vede k alteracím membránových potenciálů, zvyšuje propustnost a fluiditu membrány, umožňující influx vápenatých kationtů a hydrogen uhličitánových iontů s následnou aktivací sekundárních poslů (Abou-Haila 2009 Gadella & Luna 2014).

Nejvíce povrchových změn podstupuje přední část hlavičky spermie. Právě kapacitované spermie podstupují také změny ve schopnosti vázat lektiny. Lektiny se vážou na koncové cukerné zbytky s vysokou afinitou i specifitou. Změny ve schopnosti vázat se k lektinu jsou ovlivněny změnami v glykanových jednotkách v apikální části spermie (Abou-Haila 2009).

Spermie odebrané z ocasu nadvarlete nebo spermie ejakulované lze kapacitovat v laboratorních podmínkách. Spermie se inkubují v chemicky definovaném médiu, které obsahuje bovinní sérový albumin (BSA), nebo cyklodextrin, s energetickou substancí jako je glukosa a pyruvát. Dále médium vyžaduje hydrogenuhlíčitan a vápník. (Abou-Haila 2009, Coy et al 2012).

3.2 Vazba na oocyt a oplození

Oplození je souhrnný proces mnoha dějů, při kterém se zúčastněné gamety podrobí nevratným změnám, aby vznikla zygota. Poté co spermie projde skrz kumulus, který je okolo oocytu, dojde k navázání spermie na zona pellucida a akrosomové reakci. Během akrosomové reakce se uvolní akrosomové enzymy a dojde k vystavení sady antigenů na povrchu hlavičky spermie (vystaveny jsou bílkoviny pokrývající vnitřní akrosomální membránu, jako jsou IAM38 a ZPBP2), které zprostředkovávají interakce mezi hlavičkou spermie a glykoproteiny na zona pellucida během penetrace. Akrosomovou reakci spouští protein na zona pellucida označený ZP3 – ten udává druhovou specifitu, ke kterému jsou přiřazena dvě vazebná místa na membráně spermie, a to ZBR (primary zona binding region) a ARPR (acrosome reaction promotin region). Po spojení vazebných míst je zahájena fúze membrán. Poté následuje vyhlití akrosomových enzymů a jejich působení. Když spermie projde skrz zona pellucida, dojde ke splynutí plasmatické membrány spermie s oolemou vajíčka. Při tomto procesu jsou nezbytné minimálně dva plasmatické proteiny – IZUMO (spermie) a CD9 (oocyt). Procesu se účastní i další proteiny. A to v oolemě zakotvené integriny a tetraspanin CD81 (úzce příbuzný s CD9). Disintegriny spermie a proteiny epididymálního původu – CRISP 1 a CRISP2 (z angl. Cystein rich protein) (Sutovsky 2009).

3.3 Systém ubiquitin-proteasom

3.3.1 Ubiquitinace

Ubiquitinace proteinů je jedním z klíčových faktorů pro stabilitu a aktivitu proteinů. Tato posttranslační modifikace má rozhodující roli v široké řadě buněčných funkcí, mezi něž patří: buněčná diferenciaci, proliferace buňky, signální transdukce, přenos proteinů, apoptosa či imunitní odpověď. Konjugace ubiquitinu s cílovým proteinem je zprostředkována třemi ubiquitinačními enzymy: aktivující enzym (E1), konjugující enzym (E2) a ubiquitin ligáza (E3) – enzym E3 určují substrátovou specifitu, proto je například v lidském genomu kódována více než v 600 variacích. Proteiny mohou být označeny za pomoci jediného ubiquitinu, či za pomoci polymeru, tedy polyubiquitinace. Sám ubiquitin obsahuje sedm různých lysinových zbytků (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63), kde všechny mohou konjugovat s jiným ubiquitinem, tudíž polyubiquitinace je tvořena ze sedmi různých vazeb. Řetězec polyubiquitinu spojený

pomocí K48 slouží jako signál pro degradaci proteinu proteasomem. Ubiquitinace je potlačována deubiquitinačními enzymy, které dokáží odstranit ubiquitin z proteinů. Velký význam má ubiquitinace při samčí gametogenezi a oplození (Leestemaker & Ovaa 2017, Nakamura 2013).

3.3.2 Proteasom

Proteasomy jsou proteinové komplexy vyskytující se u eukaryot i prokaryot. Proteasom je zodpovědný za většinu degradací proteinů, likviduje chybně syntetizované proteiny a celkově řídí koncentrace jednotlivých proteinů (Leestemaker & Ovaa 2017, Nakamura 2013)

Struktura proteasomu:

Proteasom je velký (26S) proteolytický komplex, který obsahuje jádro ze čtyř kruhů (20S), tvořících centrální pór. Každý kruh je pak složen se sedmi jednotlivých proteinů. Dva vnitřní kruhy jsou tvořeny sedmi p-podjednotkami, které uvnitř sebe obsahují tři až sedm aktivních proteasomových míst-polyubiquitovaný protein musí vstoupit dovnitř, aby mohl být degradován. Vnější dva kroužky (19S) o sedmi α podjednotkách udržují "bránu" přes kterou vstupují degradované proteiny do proteasomu, α podjednotky pak rozpoznávají polyubiquitinové značky připojené k proteinům určených k degradaci-regulační podjednotky (Nakamura 2013, Collins & Goldberg 2017, Leestemaker & Ovaa 2017).

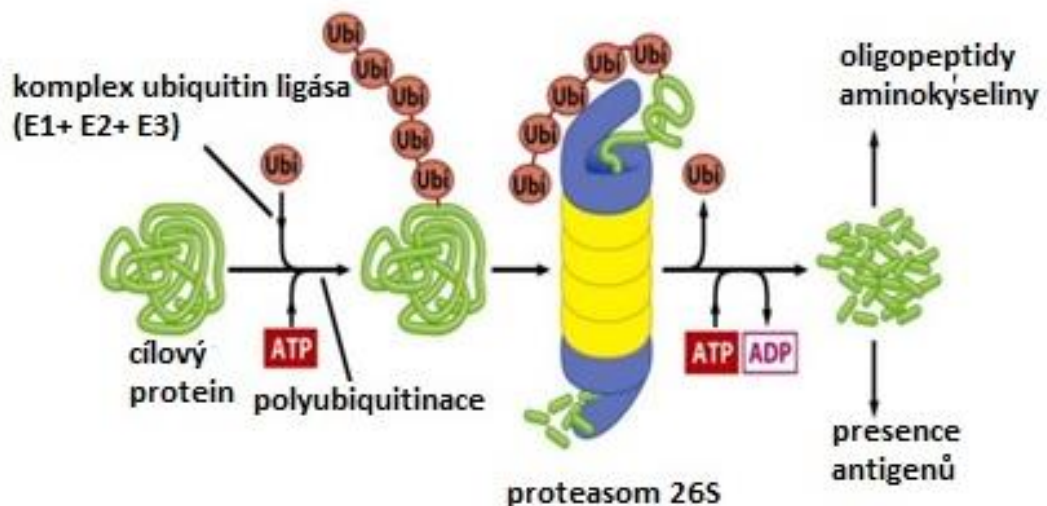
Ubiquitinace mnoha proteinů působí jako signál, který způsobuje jejich degradaci za pomoci ubiquitin-proteasomového systému. Ukázalo se, že proteasomy jsou přítomny ve všech savcích spermích a hrají významnou roli během fertilizace. Fosforylace některých podjednotek je pak důležitým mechanismem regulace proteasomu (Smith et al. 2007, Collins & Goldberg 2017).

3.3.3 Systém ubiquitin-proteasom

Systém ubiquitin-proteasom (UPS) degraduje většinu dlouhých a krátkých intracelulárních proteinů (viz Obr. 2, str. 14). V UPS je většina substrátu nejdříve označena pro degradaci větším počtem molekul ubiquitinu–polyubiquitinace. Ubiquitinace je katalyzována enzymy ubiquitin ligasami. Při označení první molekulou ubiquitinu dojde k signálu pro další

ligasy. Ubiquitin je kovalentně spojen s proteiny v několikastupňovém procesu zahrnujícím ubiquitin-aktivační enzym E1, ubiquitin-konjugující enzym E2 a ubiquitin ligasu E3. Díky lysinovým zbytkům v molekule ubiquitinu se vytváří různě dlouhé polyubiquitinové řetězce. Řetězce z více jak 4 ubiquitinových molekul jsou známé jako signál pro proteasomem zprostředkovanou proteolýzu (Nandi 2006). Jako signál po proteolýze jsou speciálně i řetězce obsahující vazbu z lysinových zbytků K48 (Nakamura 2013). Degradací proces poskytuje z degradovaných proteinů peptidy o sedmi až osmi aminokyselinách, které mohou být dále štěpeny a jednotlivé aminokyseliny mohou být recyklovány pro tvorbu nových proteinů. Proces ubiquitinace je vyvážen procesem deubiquitinace, který je zprostředkován další řadou enzymů (Nandi 2006).

Po ubiquitinaci proteinu dojde k jeho rozpoznání proteasomem a protein vstupuje do vnitřku proteasomu, kde se dostane do kontaktu a proteolyticky aktivními místy. Před vstupem do jádra je potřeba protein alespoň částečně rozvinout. Celý průchod rozvinutého proteinu do jádra proteasomu nazýváme translokace (Nandi 2006).



Obr. 2: Ubiquitin-proteasomový systém (Bharat 2016).

3.4 Savčí spermie a proteasom

Poprvé byly proteasomy u spermií identifikovány v 90. letech, a to konkrétně u sumek (Saitoh et al. 1993). Od té doby se prokázala přítomnost v tělech savců, a i v savčích spermiích, kde regulují oplození a jsou zapotřebí především při průniku spermie skrz zona pellucida (Sutovsky 2011).

Ubiquitinace i deubiquitinace je důležitou součástí během spermatogenese. Během spermatogenese je zapotřebí u savců asi 30 ubiquitinačních enzymů a 90 deubiquitinačních, jejichž možné mutace jsou spojovány se závažnými abnormalitami ve vývoji spermií. Úlohou ubiquitinu ve spermiích je ubiquitinace histonu pro účely jaderné kondenzace. Předpokládá se, že kondenzace jádra je dosažena procesy specifickými pro spermatogenesi: kondenzace chromatinu, tvorba akrosomu a remodelace cytoskeletálních struktur. Kondenzace chromatinu je způsobena odstraněním histonů z nukleosomu, kde ve výsledku jsou histony nahrazeny protaminy (malé proteiny bohaté na arginin), které lépe váží a neutralizují DNA, což vede k výraznějšímu sbalení chromatinu. A zde hraje velkou roli právě ubiquitinace histonů. Histon je ubiquitinován ve spermatocytech během první meiosis a ve spermatidách těsně před přechodem z histonů na protaminy. Odstranění ubiquitovaných proteinů zajišťuje proteasom (Nakamura 2013).

Ubiquitin-proteasom systém se podílí na většině událostí během kapacitace spermií. Ve vztahu k oplodnění akrosom nese proteasomy extracelulárně navázané, a proto jsou schopny reagovat se zona pellucida přímo. Proteasomy se váží na akrosom během spermatogenese. Proteiny receptorů pro spermii na zona pellucida (u prasete receptor ZPA/B/C) je před oplodněním ubiquitinován a následně jsou proteasomy přítomnými na akrosomu rozštěpeny, a tím vzniká štěrbina pro vstup spermie do oocyty (Sutovsky 2011).

Také se zdá, že ubiquitinace je důležitá při odstranění otcovské mitochondriální DNA (mtDNA) z embrya. Otcovská mtDNA je selektivně eliminována ubiquitinací s následnou degradací proteasomem či lysozomem (Sutovsky 2000). Mitochondrie z otcovy spermie jsou tak degradovány během raných stádií embrya (4-8 buněčné) (Nakamura 2013).

Přestože je stále role ubiquitinace proteinů u spermií stále málo známá, je prokázáno, že enzymy de/ubiquitinace regulují biogenezi, udržování, stabilitu a funkci všech membránových organel, a to včetně tvorby akrosomu, jaderné kondenzace a vylučování otcovských mitochondrií (Nakamura 2013).

System ubiquitin-proteasom je také důležitý při regulačních procesech vedoucích k oplodnění, především pro interakci spermie se zonou pelucidou na oocyt (Sutovsky et al. 2009).

Přestože o funkci a fungování proteasomálního komplexu během fertilizace je známo méně než například v ostatních tělních buňkách, víme, že inhibice proteolytických aktivit spojených s proteasomem přítomným na akrosomu spermií, zabraňuje oplodnění jak u savců, tak i u dalších živočichů (Yi et al. 2010). Proteasomy se podílejí na procesu akrosomální exocytosy až po fúzi gamet. Proteasom usnadňuje vazby spermie a pronikání do vitelinního prostoru oocytu (Sakai et al., 2004, Baska a Sutovsky 2005).

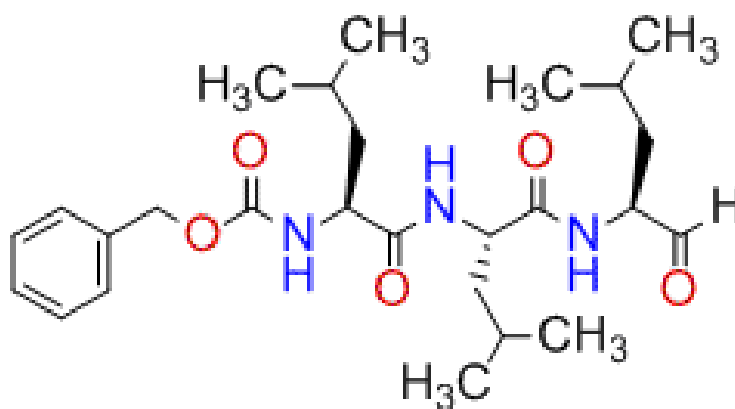
3.5 Inhibitory proteasomu

Inhibitory proteasomu našly široké uplatnění při laboratorním výzkumu, ale také při léčbě některých vážných onemocnění, mezi něž patří především rakovina (Johnsová 2012). Proteasom je primární částí v dráze buněčné degradace, a proto eliminace proteasomu je klíčem k aktivaci nebo potlačení buněčných procesů, včetně progresu buněčného cyklu a apoptosy. Úplná blokáda proteasomové aktivity inhibitorem má za následek smrt buněk až celého organismu. Ovšem každá buňka je jinak citlivá na stejný způsob inhibice proteasomu. Došlo k zjištění, že transformované buňky jsou citlivější na blokaci proteasomu, než buňky netransformované, jelikož u buněk netransformovaných existují silné kontrolní mechanismy, které při porušení proteasomové aktivity přerušují dělení a dokud se aktivita neobnoví, zatímco maligní buňky (geneticky pozměněné) ztrácí tyto ochranné mechanismy (Adams 2002). Při léčbě právě myelomu a lymfomu je schválen inhibitor PS-341, Velcade a MG – 341 a mnoho dalších inhibitorů prochází klinickými testy pro jejich využití k léčbě rakoviny (Johnsová 2012). Hovoří se ovšem i o možnosti léčby Chagasovy choroby, leishmaniózy a spavé nemoci (Khare et al. 2016).

Všechny inhibitory jsou při vysokých koncentracích silně toxické pro buňky a způsobí buněčnou smrt. Buněčnou smrt způsobí i při nepřiměřeně dlouhé době inkubace. Proto je nejen při léčbě, ale i ve vědě potřeba dodržovat stanovené koncentrace (Johnsová 2012).

3.5.1 MG-132

Jedná se o inhibitor, který je nejvíce citovaný a nejvíce využívaný pro laboratorní testy (Johnsová 2012). MG-132 (carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal; viz Obr. 3, str. 17) je peptidový aldehyd, který blokuje proteolytickou aktivitu 26 S proteasomu. Silný, reversibilní inhibitor proteasomu, který dobře prostupuje buňkami. Snižuje degradaci ubiquitinovaných proteinů v savčích buňkách (a kvasinkách) proteasomem 26S bez ovlivnění proteasomové ATPasy či isopeptidasy. Inhibitor MG-132 aktivuje c-Jun N-terminální kinázu (JNK1), která iniciuje apoptosu (Bunuccelli et al. 2003).



Obr. 3: Inhibitor proteasomu MG-132 (Datasheet MG-132 Merk Millipore).

Inhibitor MG-132 inhibuje oplodnění u širokého spektra živočichů, včetně savců, a tedy i prasat. Pokusy s odstraněním zona pellucida ukázaly, že tento inhibitor specificky inhibuje důležitý krok při oplodnění, vazbu mezi spermií a zona pellucida. Inhibitor nijak neovlivňuje vazebná místa na spermiu nebo na zona pellucida (Sutovsky 2011).

3.5.2 Další inhibitory proteasomu

Lactacystin

Jedná se o antibiotikum, které je izolováno ze *Streptomyces* a není komerčně chemicky syntetizováno. Jedná se o silný selektivní a reverzibilní inhibitor proteasomu. Díky vysoké

specifitě kovalentní vazby, nedochází k ovlivnění proteáz u jiných aminokyselin, a proto je Lactacystin specifitější než peptidové aldehydy jako MG-132 (Johnsová 2012).

PS-341

Jedná se o jeden z prvních objevených inhibitorů proteasomu, je pro něj zavedeno více názvů: Bortezomib, Velcade a PS-341. V případě tohoto inhibitoru se jedná o průlomový objev v léčbě mnohočetných myelomů a jeho léčebné funkce se zkoumají od roku 1994, v roce 2003 dokonce došlo ke schválení užití PS-341 v léčbě (Teicher & Tomaszewski 2015). PS-341 je malá molekula, která je velmi silným selektivním inhibitorem proteasomu. Výhodou tohoto inhibitoru je jeho rychlý výstup z buněk i celého organismu a obnovení proteasomové aktivity během 48-72 hodin (Adams 2002).

Další inhibitory jsou Carfilzomib a Oprozomib, ty však jsou nevratnými inhibitory proteasomu. Mezi další reversibilní inhibitory patří Ixazomib a Delanzomib (Teicher & Tomaszewski 2015).

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

K experimentům pro tuto diplomovou práci bylo použito kančí sperma. Byl používán nativní ejakulát nebo komerčně vyráběná inseminační dávka. Inseminační dávky byly dodávány firmou ProAgro Nymburk a.s. (ČR) a ejakulát byl odebrán z kanců plemene Landrase.

Inseminační dávky byly po odběru vyráběny z ejakulátu za pomoci ředidla Solusem. Do laboratoře byly dávky transportovány při běžné přepravní teplotě pro kančí sperma, tedy 17°C.

Během našich experimentů byla použita běžná laboratoř s běžnou pokojovou teplotou a osvětlením. Při práci s luminiscenčními přípravky se pracovalo za šera.

Sperma bylo hodnoceno za pomoci systému CASA (Computer-Assited Sperm Analysis). Hodnocením motility spermií během kapacitace se věnují podrobně diplomové práce Bc. Lenky Hackerové a Bc. Lenky Malinové.

4.2 Metodika

4.2.1 Promytí spermií před kapacitací

Prvním krokem po zhodnocení motility bylo promytí spermií a tím jejich příprava pro kapacitaci. Nejprve byla spočítána koncentrace spermií v Bürkerově komůrce. V inseminačních dávkách se pohybovala koncentrace spermií mezi $5-8 \times 10^7$ na ml. Bylo odebráno 2×5 ml vzorků z ejakulátu. Tyto vzorky byly centrifugovány po dobu 10 minut při $300 \times g$ (Hettich Zentrifugen Mikro 22 R) a při laboratorní teplotě. Po centrifugaci byl odsán supernatant, vzorky byly doplněny zpět do 5 ml za pomoci PBS (Phosphate buffered saline: 0,01 M Phosphate buffer, 0,0027 M KCl a 0,137 M NaCl, pH 7,3-7,4; Sigma-Aldrich, USA). Celý proces byl zopakován třikrát po sobě.

4.2.2 Kapacitace spermií

Po promytí byly spermie kapacitovány. Pro samotnou kapacitaci byly spermie rozděleny na 3 vzorky po 10 ml. První vzorek obsahoval suspenzi spermií v nemodifikovaném

kapacitačním médiu. Druhý vzorek suspenze spermií obsahoval modifikované kapacitační médium s přídatkem 100 μ M inhibitoru proteasomu MG-132 (Calbiochem/USA), který byl rozpuštěn v 70 μ l DMSO (dimethylsulfoxid; Sigma/USA). Poslední třetí vzorek představoval kontrolní suspenzi spermií v kapacitačním médiu s přídatkem 70 μ l DMSO.

Kapacitační médium bylo vyrobeno z látek od Sigma-Aldrich/USA, není-li uvedeno jinak. Kapacitační médium bylo připraveno z 50 ml média Basic TL-Hepes (6,6634 g NaCl; + 0,2386 g KCl + 0,0408 g NaH₂PO₄, + 1,4 ml laktát sodný, + 0,10018 g MgCl₂*6H₂O + 2,383 g Hepes + 0,0220 g pyruvát sodný + 2,186 g sorbitol + 0,025 ml gentamicin, sodná sůl, + 0,065 g penicilin, draselná sůl, + 0,1 g PVA Poly (vinyl alcohol) + 1000 ml H₂O + filtrace), do kterého bylo přidáno 0,099 g glukózy (Penta/ČR), 0,0275 g pyruvát sodný, 1,00 g 2 % BSA (Bovine Serum Albumin;), 0,0084 g NaHCO₃, 0,0147 g CaCl₂*2H₂O. Kapacitačním médiem byly spermie naředěny do výsledné koncentrace 2,5 – 5 \times 10⁷ spermií/ml. Vzorky byly rozděleny po 0,5 ml do mikrozkušavek Eppendorf pro lepší prostupnost CO₂, kapacitovány byly po dobu 1,5 hodiny v termostatu MCO-19AIC při 38 °C a v atmosféře 5% CO₂.

Během kapacitace byly odebírány vzorky spermií po časových intervalech 30, 60 a 90 minut.

Po dokončení kapacitace byla suspenze spermií opět sloučena do zkumavky po 10 ml a centrifugovány (centrifuga Hettich zentrifugen Mikro 22 R). Centrifugovány byly v třikrát po sobě jdoucích cyklech při 300 x g, po dobu 10 minut, vždy byl odsán supernatant a bylo doplněno PBS do 5 ml. Zkapacitované spermie byly dále zpracovávány jako suspenze pro preparáty na fluorescenční mikroskopii nebo byly vytvořeny peletky, a ty byly skladovány ve zkumavkách při -20 °C.

4.2.3 Příprava vzorku spermií pro elektroforesu v polyakrylamidovém gelu s přídatkem SDS (dodecylsulfát sodný)

Ejakulované a *in vitro* kapacitované spermie v nemodifikovaném médiu, v médiu s inhibitoru proteasomu MG-132 a v médiu s DMSO byly lyzovány. Ke spermiím (5 \times 10⁷ buněk) bylo přidáno 95 μ l vzorkového pufru pro SDS-PAGE (4,2 ml vody + 1 ml 0,5 M Tris. HCl o pH 6,8; Bio-Rad/USA + 0,8 ml glycerolu; Sigma-Aldrich/USA + 1,6 ml 10% SDS; GE Healthcare/Sweden + 1,4 ml 0,05% bromfenolové modře; Sigma-Aldrich/USA) spolu s 5 μ l

merkptoetanolu (Sigma-Aldrich/USA), který zajistil redukující podmínky. Po řádném rozsuspendování vzorku byly spermie lyzovány po dobu 1 hodiny v ledové tříšti a každých 5 minut důkladně protřepány. Poté byly vzorky povařeny při 100 °C po dobu 5 minut v termolázni a centrifugovány při 10 000 xg 5 minut v chlazené centrifuze (Hettich zentrifugen Mikro 22 R).

4.2.4 SDS elektroforesa

Pro SDS (dodecylsulfát sodný) elektroforézu v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) byly připraveny gely. První separační gel byl vyroben o 12% hustotě polyakrylamidu. K jeho výrobě bylo použito 2,5 ml destilované vody, 4 ml roztoku 30% akrylamidu/bis akrylamidu (30% Acrylamide/Bis Acrylamide Solution 37.5:1 (2.7% crosslinker); Bio-Rad/USA), 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (Resolving Gel Buffer; Bio-Rad/USA) a 100 µl 10 % SDS. Těsně před aplikací gelu bylo přidáno 4,5 µl Temed (GE Healthcare/Sweden) a 70 µl 10 % persíranu amonného (APS; GE Healthcare/Sweden). Roztok byl okamžitě aplikován mezi skla určená pro SDS-PAGE, sestavených do běžné aparatury a roztok byl převrstven destilovanou vodou. Následovala příprava 4 % zaostřovacího gelu: 1,52 ml destilované vody+0,625 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (Stacking Gel Buffer; Bio- Rad/USA) + 0,325 ml 30% akrylamidu/bis akrylamidu + 0,025 ml 10 % SDS. Těsně před aplikací bylo přidáno 3,8 µl Temed a 50 µl 10 % APS. Zaostřovací gel byl po 30 minutách polymerace separačního gelu nanesen na gel a byly do něj vnořeny hřebínky na tvorbu 15 jamek pro aplikaci vzorků. Polymerace zaostřovacího gelu probíhala asi 10 minut.

Po 10 minutách byla skla s gely přenesena do elektroforesové aparatury a zalita elektrodovým pufrům o pH 8,3 (15 g Tris, 72 g glycinu, 5 g SDS, ředěno destilovanou vodou 1:4). Do vytvořených jamek byly aplikovány vzorky po 15 µl a proteinové molekulární standardy (Precision Plus Protein standard Dual Color; Bio-Rad/USA) po 4 µl. Po dokončení aplikace vzorků probíhala elektroforesa při konstantním napětí 80 V po dobu cca 20 minut, poté při 120 V, dokud neproběhla kompletní separace proteinů (cca 1,5 hodiny).

4.2.5 Elektropřenos proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu (Western blot)

Po dokončení elektroforesy byl připraven elektropřenos proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu. Gel se separovanými proteiny byl promyt v destilované vodě

a inkubován asi 15 minut v transferovém pufru (3,03 g Tris, 14,4 g glycinu, 200 ml metanolu a doplněno na 1 l destilovanou vodou). Pro elektropřenos byla použita plastová kazeta obsahující po obou vnitřních stranách houbičku a 2 výstřižky chromatografického papíru Whatman (Whatman chromatography paper-GE Healthcare/China), nitrocelulosevá membrána (Hybond C Extra membrane-Amersham Biosciences /UK), ke které byl přiložen gel. Všechny komponenty byly před tím namočeny 15 minut v transferovém pufru. Takto sestavená kazeta byla vložena do vaničky naplněné transferovým pufrům a celá vanička byla chlazená v nádobě s vodou a ledem. Po zapojení do zdroje byl nastaven konstantní elektrický proud na 500 mA. Elektropřenos probíhal 1,5 h. Po dokončení elektropřenosu proteinů byla kazeta vyjmuta a membrána byla krátce opláchnuta v destilované vodě a následně obarvena na proteiny pomocí Ponceau (Ponceau S Solution; Sigma-Aldrich/USA) po dobu 60 s.

4.2.6 Imunodetekce ubiquitinovaných proteinů

Nitrocelulosevá membrána s přenesenými proteiny byla využita k imunodetekci. Barva Ponceau byla odmyta destilovanou vodou a poté PBS. Poté byla deaktivována volná místa na membráně za pomoci 5% blokovacího mléka (Grade Blocker Blotting; Bio-Rad/USA) v PBS. Membrána v blokovacím mléku byla ponechána přes noc v lednici. Po inkubaci v mléce byla membrána promyta 2× po 5 minutách PBS s 0,05 % Tweenem 20 (Sigma-Aldrich/USA) (PBS-T). Po promytí byly připraveny primární protilátky.

Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc (2 ml roztoku s protilátkou/membránu). Byla použita myší monoklonální protilátka FK2 (mono- and polyubiquitylated conjugates, mAb FK2; Enzo/USA). Protilátka FK2 byla nanášena v koncentraci 1:250, rozředěna v PBS. Druhá membrána byla použita jako kontrolní, na tu byla aplikována myší monoklonální protilátka proti α -tubulinu (DM1A; Sigma-Aldrich/USA) v koncentraci 1:5000 v PBS. Pro negativní kontrolu byla membrána s proteiny inkubována pouze v PBS.

Po inkubaci primární protilátky byla membrána promyta 3x v PBS-T po 10 minutách a inkubována se sekundární protilátkou konjugovanou s křenuvou peroxidázou proti myším imunoglobulinům (anti-mouse HRP; Bio-Rad/USA) v koncentraci 1:3 000 v PBS. Inkubace byla provedena po dobu 1 h při pokojové teplotě.

Po inkubaci byla provedena vizualizace. Prvně byla membrána 4 x promyta po dobu 5 minut v PBS-T a 2 x po 5 minutách v PBS. Pro samotnou vizualizaci byla využita metoda chemiluminiscence, která je velmi citlivou metodou. Byl použit chemiluminiscenční substrát Super Signal West Pico (Thermo Scientific/USA) a přístroj Azure c600 (Azure Biosystems/USA; Biocev, Vestec). Pro odhad molekulových hmotností ubiquitinovaných proteinů byly vytvořeny příslušné kalibrační křivky a podle nich určena přibližná molekulová hmotnost jednotlivých proteinů. Denzitometrická analýza ubiquitinovaných proteinů po imunodetekci byla provedena v programu Image Studio Lite Ver 5.2 (LI-COR Biosciences/USA).

4.2.7 Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie

Pro preparáty byly použity spermie nekapacitované, kapacitované, kapacitované s inhibítorem MG-132, které byly promyty centrifugací 3× po dobu 5 minut při 300 x g.

Pro fixaci byla zkontrolována hustota spermií. Hustota spermií byla odhadována subjektivně odhadem za pomoci mikroskopu (zvětšení 40x), kdy nebyly překrývány hlavičky jednotlivých spermií.

Na podložní sklíčka byla nakreslena dvě kolečka za pomoci hydrofobní fixy PAP Pen (Sigma-Aldrich/USA), který brání tekutinám opustit vymezený prostor. Do koleček bylo kápnuto 10 µl naředěných spermií a 50 µl vymraženého acetonu a metanolu v poměru 1:1. Vzorky byly ponechány 5 minut a poté byly důkladně opláchnuty PBS. Do každého kolečka na nátěr spermií bylo nanášeno 150 µl blokovacího roztoku (SuperBlock Blocking Buffer in PBS; Thermo Scientific/USA), inkubace trvala 30 minut. Po inkubaci byla skla opláchnuta v PBS a byly aplikovány primární protilátky proti ubiquitinu: myší monoklonální protilátka FK2 (mono-and polyubiquitinylated conjugates, mAb FK2; Enzo/USA), králičí polyklonální protilátka Abcam (Anti-Ubiquitin antibody ab7780; Abcam/UK) a králičí polyklonální protilátka NBP2 (Ubiquitin antibody NBP2-30132SS; Novus biologicals/UK), ředěné v PBS v koncentraci 1:20. Primární protilátky byly inkubovány přes noc v lednici ve vlhké komůrce. Druhý den byla skla opět omyta PBS a bylo nanášeno 100 µl sekundární protilátky konjugované s fluorochromem. Byly použity protilátky proti králičím i myším imunoglobulinům (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit/anti-mouse IgG H+L, Invitrogen/USA) ředěné 1:300 v PBS. Sekundární protilátka byla inkubována ve vlhké komůrce po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byla skla omyta PBS, bylo přidáno 100 µl lektinu PNA konjugovaného s rhodaminem (Rhodamine

peanut agglutinin-Vector Laboratories/USA) v koncentraci 1:500 v PBS. Opět vše omyto PBS, ponecháno oschnout a závěrem bylo přidáno 5 μ l montovacího média s DAPI (Antifade Mounting Medium with DAPI; Vectashield Laboratories/USA). Skla s vytvořenými nátery byla ihned překryta vrchním krycím sklíčkem a byla zalakována. Skla byla vyhodnocena pod fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E600 a programu NIS-Elements za pomoci analýzy obrazu, na které bylo hodnoceno min. 100 spermií pro každou skupinu vzorků. Další vyhodnocení skel proběhlo na konfokálním mikroskopu Zeiss.

4.2.8 Imunofluorescence v suspenzi spermií

Detekce ubiquitinovaných proteinů byla provedena také v suspenzi nekapacitovaných a kapacitovaných spermií. Ke 100 μ l promytých spermií byly přidány 2 μ l protilátky myší monoklonální FK2 (mono-and polyubiquitinylated conjugates, mAb FK2; Enzo/USA). Suspenze spermií s protilátkou byla inkubována po dobu 2 hodin při 37 °C a za stálého třepání. Po inkubaci byla suspenze spermií 2 \times promyta za pomoci PBS a následně byla provedena fixace vzorků.

Při fixaci byl vzorek 40 μ l rozdělen po 20 μ l na dvě kolečka na sklíčku a byl přidán vymražený aceton-metanol (1:1) o objemu 50 μ l/sklíčko a do druhého dne ponecháno v lednici. Druhý den byla sklíčka opláchnuta PBS a byla aplikována sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s fluorechromem (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) Invitrogen/USA) v poměru 1:300. Do každého kolečka bylo aplikováno 100 μ l roztoku protilátky. Sekundární protilátka byla inkubována ve vlhké komůrce po dobu 1 h. Po inkubaci bylo na preparáty aplikováno 5 μ l montovacího média s DAPI (Antifade Mounting Medium with DAPI; Vectashield Laboratories/USA). Zhodnocení bylo provedeno na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse E 600.

4.2.9 Statistické šetření

Statistické výpočty byly vytvářeny za pomoci programu GraphPad Prism 8. Veškeré získané hodnoty byly převáděny na procenta a vztaženy k hodnotám ejakulovaných spermií. Následně byla podle potřeby použita jednofaktorová analýza rozptylu ANOVA nebo nezávislý dvouvýběrový t-test. Výsledky byly sestaveny do grafu a zhodnoceny podle statistické významnosti.

5 Výsledky

5.1 Detekce ubiquitinovaných proteinů v extraktech spermií

Byla provedena in vitro kapacitace kančích spermií v nemodifikovaném kapacitačním médiu, v modifikovaném kapacitačním médiu s přidavkem 100 μ M inhibitoru proteasomu MG-132 a v modifikovaném kapacitačním médiu s DMSO (viz kap. 4.2.2 Kapacitace spermií).

Byly připraveny proteinové extrakty ze spermií: ejakulovaných, kapacitovaných, kapacitovaných s inhibitem MG-132 a kapacitovaných s DMSO (viz kap. 4.2.3 Příprava vzorku spermií pro elektroforesu v polyakrylamidovém gelu s přidavkem SDS).

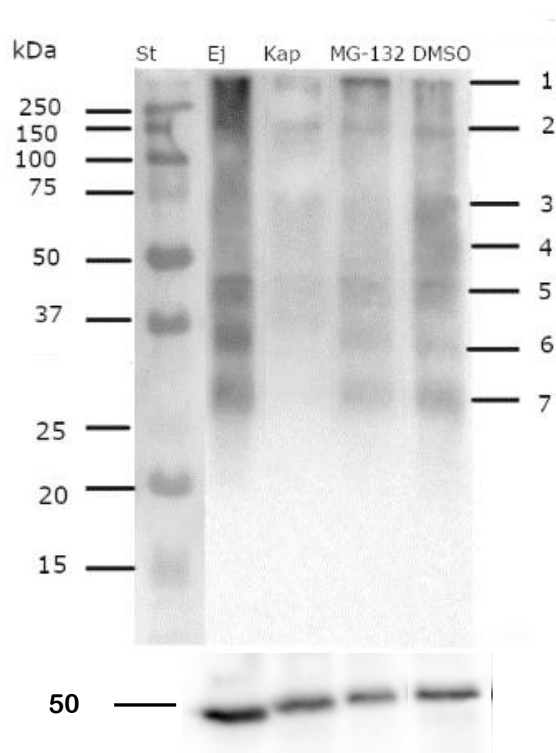
Proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE (viz kap. 4.2.4 SDS elektroforesa) a proběhl elektropřenos proteinů z gelu na nitroceluloseovou membránu (viz kap. 4.2.5 Elektropřenos proteinů z gelu na nitroceluloseovou membránu).

Následně byly proteiny na membráně inkubovány s primární myší monoklonální protilátkou FK2 pro detekci mono-/poly-ubiquitinovaných řetězců vázaných na proteinech (viz kap. 4.2.6 Imunodetekce ubiquitinovaných proteinů). Byla provedena vizualizace pomocí chemiluminiscenčního substrátu. Pro kontrolu proteinové nanášky bylo použito barvení proteinů pomocí Ponceau nebo detekce referenčního proteinu α -tubulinu pomocí specifické protilátky (viz kap. 4.2.6 Imunodetekce ubiquitinovaných proteinů).

Ze získaných dat ze 4 membrán byla určena přibližná molekulová hmotnost 7 detekovaných ubiquitinovaných proteinů spermií (viz tab. 1, str. 26), a to z kalibračních křivek vytvořených podle proteinových molekulových standardů a také byla provedena denzitometrická analýza na základě detekce 7 ubiquitinovaných proteinů v každé skupině vzorků (vzorek ejakulovaných spermií, vzorek kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu, vzorek kapacitovaných spermií v médiu s inhibitem MG-132 a vzorek kapacitovaných spermií s DMSO v médiu). Na Obr. 4 (viz str. 26) je reprezentativní vzorek membrány se separovanými proteiny detekovanými protilátkou proti ubiquitinu a jako kontrola proteinové nanášky je detekce α -tubulinu.

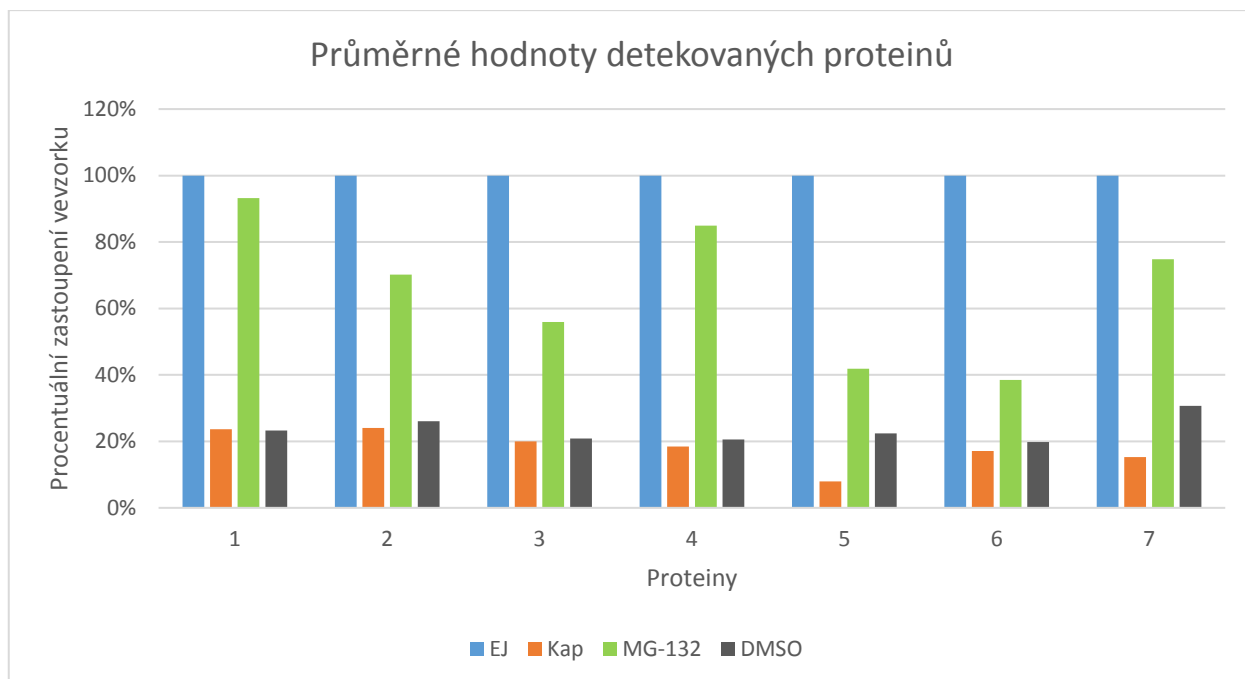
Tabulka 1: Přibližná molekulová hmotnost detekovaných proteinů.

Protein 1	≥ 250 kDa
Protein 2	120 kDa
Protein 3	67 kDa
Protein 4	58 kDa
Protein 5	46 kDa
Protein 6	33 kDa
Protein 7	27 kDa



Obr. 4: Membrána s detekovanými proteiny (1-7.) Přiložená tubulinová kontrola síly nanášky.

Výsledky denzitometrické analýzy detekovaných proteinů byly vztaženy k nanášce proteinů přes detekci α -tubulinu a jsou znázorněny v následujícím grafu (viz graf 1, str. 27) shrnujícím průměrné hodnoty ze 4 hodnocených membrán. Výsledná data jsou vyjádřena v procentech a vztažena ke vzorku ejakulovaných spermií jako výchozí hodnoty (tedy 100 %). Hodnoceno bylo: mono-/poly-ubiquitinace detekovaných proteinů na ejakulovaných spermiích, na kapacitovaných spermiích v nemodifikovaném médiu, kapacitovaných spermiích v modifikovaném médiu s inhibitorem proteasomu MG-132 a kapacitovaných spermiích v modifikovaném médiu s DMSO.

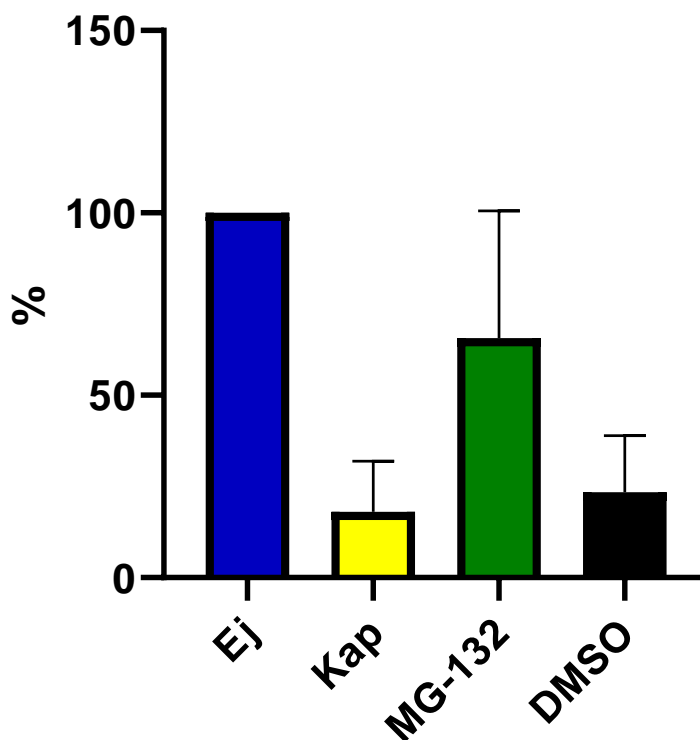


Graf 1: Graf průměrných denzitometrických hodnot mono-/poly-ubiquitinace proteinů ze všech měření. 1-7 detekované proteiny v ejakulovaných spermích (Ej), kapacitovaných spermii v nemodifikovaném médiu (Kap), v modifikovaném médiu s inhibítorem proteasomu MG-132 (MG-132) a v modifikovaném médiu s DMSO (DMSO).

Výsledky denzitometrie byly dále zpracovány za pomoci analýzy rozptylu, tedy ANOVA jednovýběrového testu. Ve statistickém vyhodnocení byly hledány statisticky významné rozdíly mezi všemi hodnocenými skupinami na základě intenzity detekce celkových ubiquitinovaných proteinů ve vzorcích ve vztahu k ejakulovaným spermii, které nám představují výchozích 100 %. Hodnocenými skupinami byla mono-/poly/ ubiquitinace na ejakulovaných spermii, kapacitovaných spermii v nemodifikovaném médiu, kapacitovaných spermii v modifikovaném médiu s inhibítorem proteasomu MG-132 a kapacitované spermie v modifikovaném médiu s DMSO.

Z výsledků statistického šetření jednovýběrovým testem ANOVA byl sestaven graf (viz graf 2, str. 28) a byl pozorován statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

ANOVA jednovýběrový test



Graf 6: Vyhodnocení jednotlivých skupin výsledků: celkové mono-/poly-ubiquitinované proteiny ejakulovaných spermií (Ej), které slouží jako výchozí (100 %) hodnota, mono-/poly-ubiquitinované proteiny kapacitované spermie v nemodifikovaném médiu (Kap), mono-/poly-ubiquitinované proteiny kapacitovaných spermií v modifikovaném médiu s inhibítorem proteasomu MG-132 (MG-132), mono-/poly-ubiquitinované proteiny na spermiích v modifikovaném médiu s přísávkem rozpoušáá DMSO.

Dále byly porovnány vztahy mezi jednotlivými skupinami a ty byly hodnoceny za pomoci nepárového t-testu. Prvním výsledkem statistického vyhodnocení je porovnání vzorku kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu se vzorkem kapacitovaných spermií v modifikovaném médiu s DMSO, aby bylo zjišááno, zda platí předpoklad, že DMSO nikterak neovlivňuje průběh kapacitace, jelikož v DMSO je rozpoušáen inhibítor MG-132, který je používán pro inhibici proteasomů.

Výsledek nepárového t-testu uvádí, že mezi těmito dvěma skupinami není statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$). Výsledek nám tedy potvrzuje, že DMSO neovlivňuje nijak průběh kapacitace spermií.

Dále byl zpracován výsledek porovnávající výsledky od spermií kapacitovaných v modifikovaném médiu s inhibitorem MG-132 a od spermií kapacitovaných v nemodifikovaném médiu. Hodnoty byly zpracovány nepárovým t-testem. Předpoklad je, že inhibitor inhibuje proteasomy, proto by měl být mezi skupinami rozdíl.

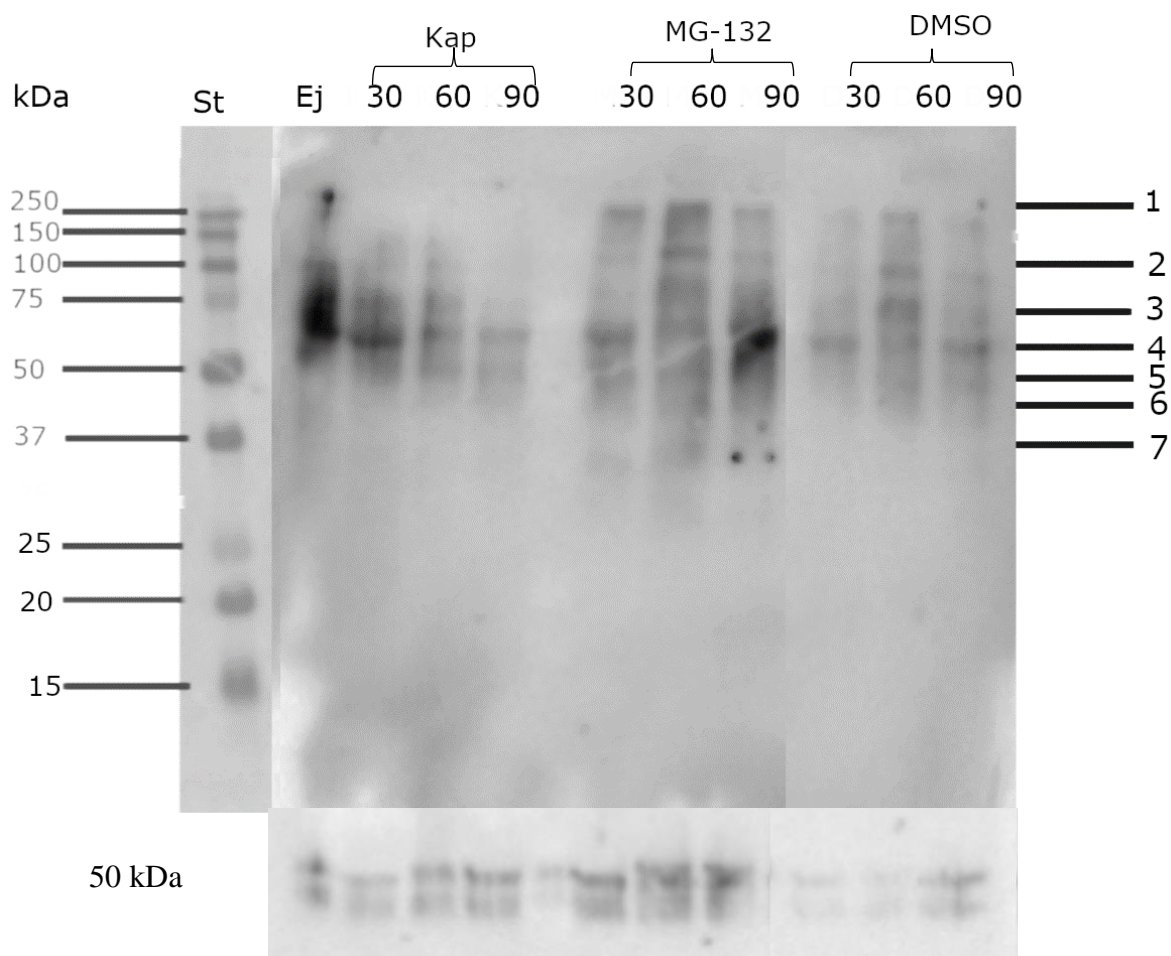
Výsledek nepárového t-testu uvádí, že mezi těmito dvěma skupinami je statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Je tedy znatelný rozdíl v množství degradovaných proteinů vlivem inhibice proteasomu.

5.2 Detekce ubiquitinovaných proteinů v extraktech spermií v průběhu kapacitace

Byla provedena *in vitro* kapacitace kančích spermií v nemodifikovaném kapacitačním médiu, v modifikovaném kapacitačním médiu s přidavkem 100 μ M inhibitoru proteasomu MG-132 a v modifikovaném kapacitačním médiu s DMSO. Vzorky spermií byly odebírány během kapacitace v časových intervalech 30 minut, 60 minut a 90 minut (viz kap. 4.2.2 Kapacitace spermií).

Byly extrahovány proteiny ze spermií ejakulovaných a kapacitovaných v modifikovaném a nemodifikovaném médiu a proteiny byly separovány pomocí SDS elektroforézy a přeneseny na NC membránu. Ubiquitinované proteiny ve vzorcích byly detekovány pomocí specifické monoklonální protilátky proti ubiquitinu FK2.

Ze získaných dat z membrány (viz Obr. 5, str. 30) byla určena přibližná molekulová hmotnost sedmi detekovaných proteinů, které se shodují s proteiny z předešlých membrán, a to z kalibračních křivek vytvořených podle proteinových molekulových standardů (viz tab. 2 str. 30). Byla provedena denzitometrická analýza 7 proteinů v každé skupině vzorků: vzorek ejakulovaných spermií (Ej), vzorek kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu po 30-60-90 minutách inkubace (K30, K60, K90), vzorek kapacitovaných spermií v médiu s inhibitorem MG-132 po 30-60-90 minutách inkubace (M30, M60, M90) a vzorek kapacitovaných spermií s DMSO v médiu po 30-60-90 minutách inkubace (D30, D60, D90). Denzitometrické hodnoty detekce ubiquitinovaných proteinů byly vztaženy k celkové nanášce proteinů hodnocenou na základě detekce tubulinu.

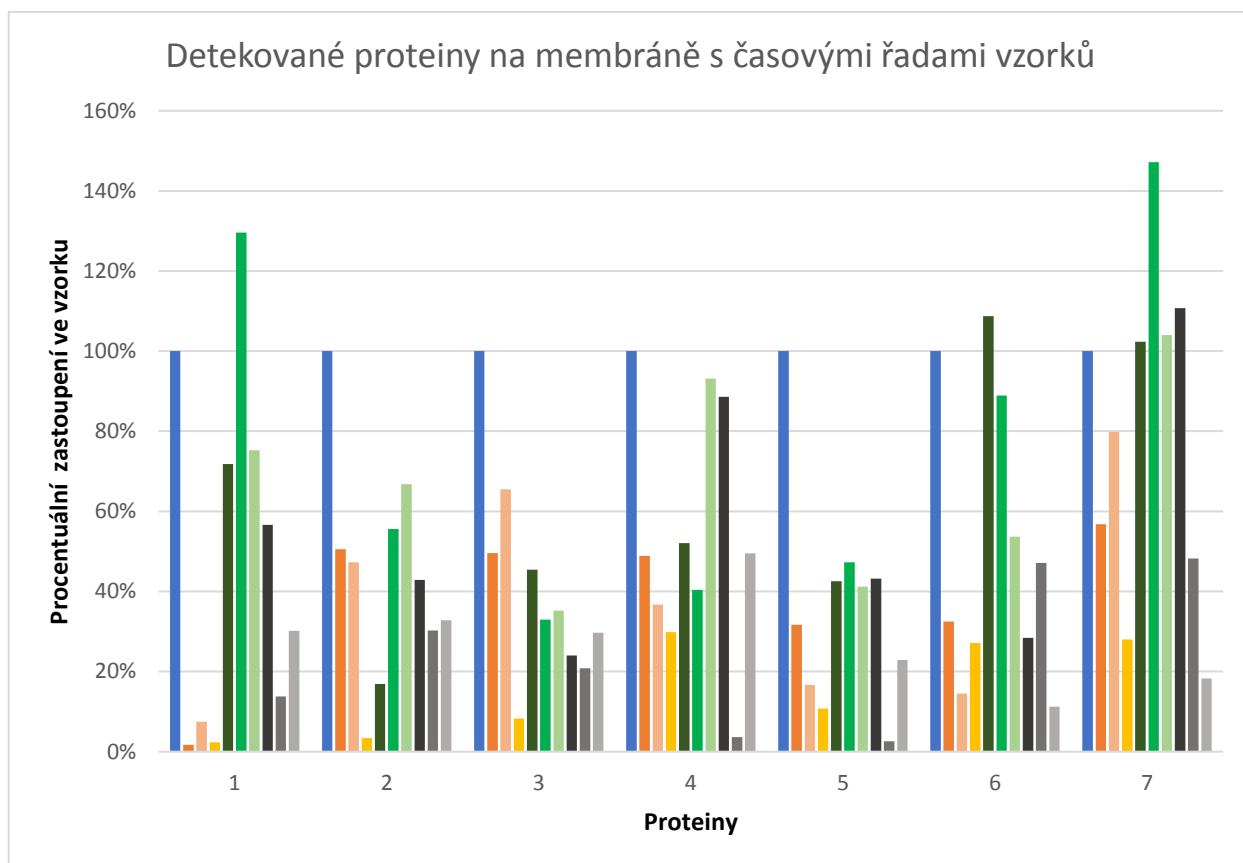


Obr. 5:2 Detekované proteiny (1-7) na membráně v extraktech ejakulovaných spermií (Ej), kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, 60, 90), v modifikovaném médiu s inhibítozem proteasomu MG-132 inkubovaných 30, 60 a 90 minut (MG-132 30, 60, 90), v modifikovaném médiu s DMSO inkubovaných 30, 60 a 90 minut (DMSO 30, 60, 90). Přiložena tubulinová kontrola síly nanášky.

Protein 1	≥ 250 kDa
Protein 2	105 kDa
Protein 3	67 kDa
Protein 4	59 kDa
Protein 5	47 kDa
Protein 6	34 kDa
Protein 7	28 kDa

Tabulka 2 Odhadovaná velikost detekovaných proteinů 1-7.

Výsledky denzitometrie jsou znázorněny v grafu 2. Výsledná data jsou vyjádřena v procentech a vztažena k vzorku ejakulovaných spermií jako výchozí hodnoty (tedy 100 %).

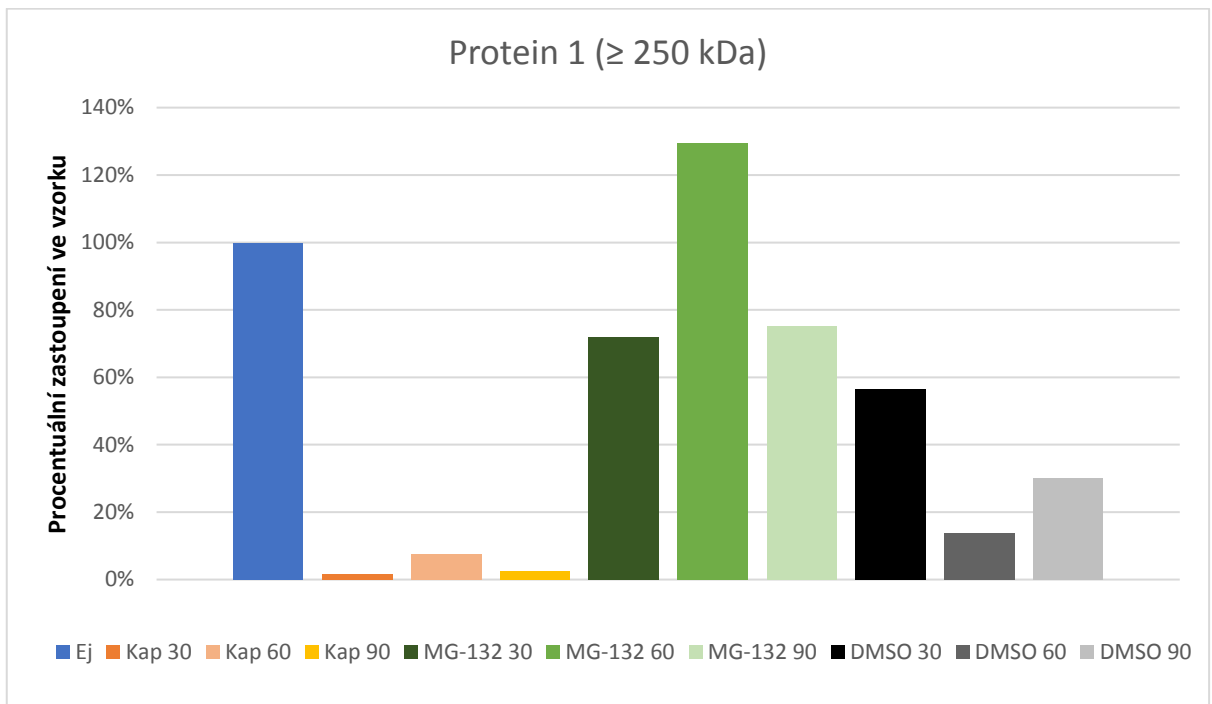


Graf 2:3 Denzitometrická analýza ubiquitinovaných proteinů (1-7) detekovaných v extraktu ejakulovaných spermií (Ej), kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), v modifikovaném médiu s inhibitorem proteasomu MG-132 inkubovaných 30, 60 a 90 minut (MG-132 30, MG-132 60, MG-132 90), v modifikovaném médiu s DMSO inkubovaných 30, 60 a 90 minut (DMSO 30, DMSO 60, DMSO 90).

Dalších 7 grafů (viz Obr. 3-9, str. 32-38) je vytvořeno pro samostatné detekované proteiny a detekce jejich ubiquitinace v čase 30 minut, 60 minut a 90 minut v ejakulovaných spermiích, jejichž hodnota je brána jako výchozí k ostatním skupinám výsledků tedy 100 %, kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu, kapacitovaných spermií v modifikovaném médiu s inhibitorem MG-132 a v modifikovaném médiu s DMSO.

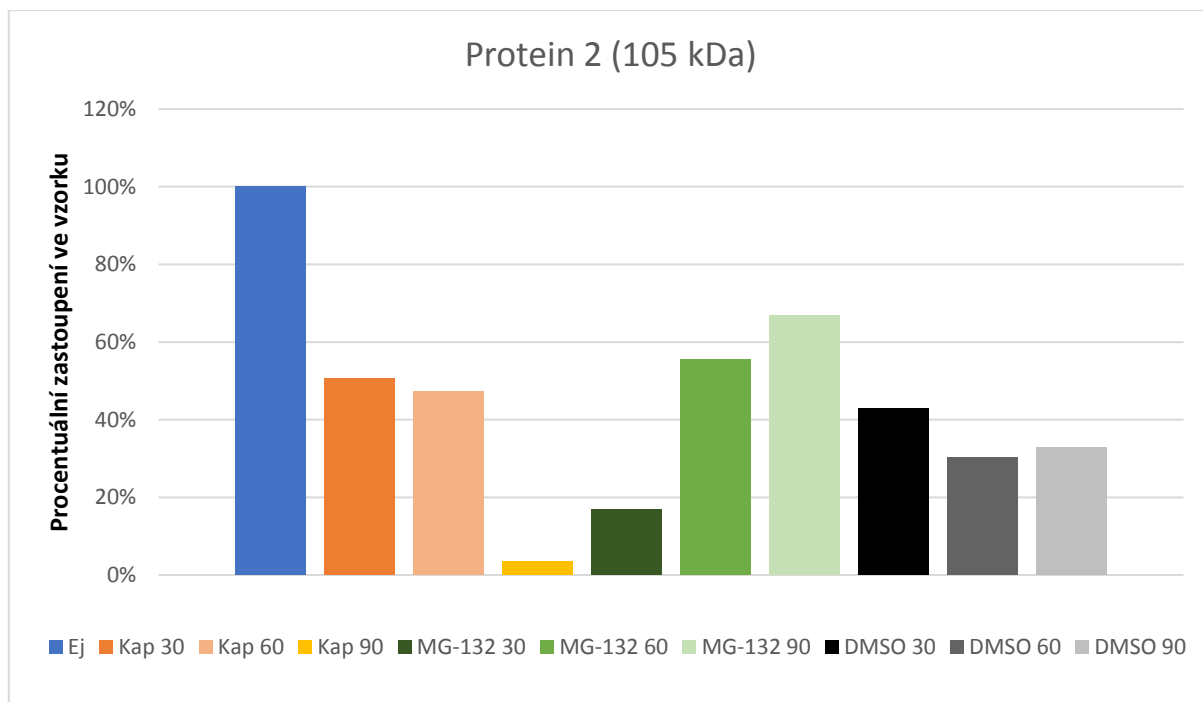
V grafu číslo 3 (viz str. 2) pozorujeme průběh mono-/poly-ubiquitinace proteinu detekovaného na membráně a označeného jako protein č. 1 (≥ 250 kDa). Hodnoty jsou vztaženy k hodnotám z ejakulovaných spermií (pozitivní kontrola). Pozorujeme výrazný pokles mono-

/poly-ubiquitinace proteinu během kapacitace v nemodifikovaném médiu. Nepozorujeme závislost na čase, k degradaci proteinu č. 1 dochází do 30 minut doby kapacitace v nemodifikovaném médiu. Při kapacitaci v modifikovaném médiu s inhibitorem MG-132 pozorujeme oproti kapacitovaným spermii v nemodifikovaném médiu výrazné zvýšení detekované mono-/poly-ubiquitinace proteinu č. 1. Není pozorována závislost na době kapacitace.



Graf 3: Densitometrické zhodnocení ubiquitinovaného proteinu č. 1 detekovaného v extraktu ejakulovaných spermii (Ej), kapacitovaných spermii v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), kapacitovaných spermii v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), v modifikovaném médiu s inhibitorem proteasomu MG-132 inkubovaných 30, 60 a 90 minut (MG-132 30, MG-132 60, MG-132 90), v modifikovaném médiu s DMSO inkubovaných 30, 60 a 90 minut (DMSO 30, DMSO 60, DMSO 90).

Na detekovaném proteinu č. 2 (105 kDa) pozorujeme o 50 % nižší mono-/poly-ubiquitinaci během prvních 60 minut kapacitace spermii v nemodifikovaném médiu a až po 90 minutách kapacitace spermie v nemodifikovaném médiu je viditelný pokles na minimální hodnoty mono-/poly-ubiquitinace. Během kapacitace spermie v modifikovaném médiu s inhibitorem MG-132 není pozorován výrazný rozdíl oproti kapacitaci v nemodifikovaném. Detekce mono-/poly-ubiquitinace během kapacitace v modifikovaném médiu s DMSO nevykazuje významný rozdíl oproti kapacitaci spermii v nemodifikovaném médiu (viz graf 4, str. 33).



Graf 4: Densitometrické zhodnocení ubiquitinovaného proteinu č. 2, detekovaného v extraktu ejakulovaných spermií (Ej), kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), v modifikovaném médiu s inhibítozem proteasomu MG-132 inkubovaných 30, 60 a 90 minut (MG-132 30, MG-132 60, MG-132 90), v modifikovaném médiu s DMSO inkubovaných 30, 60 a 90 minut (DMSO 30, DMSO 60, DMSO 90).

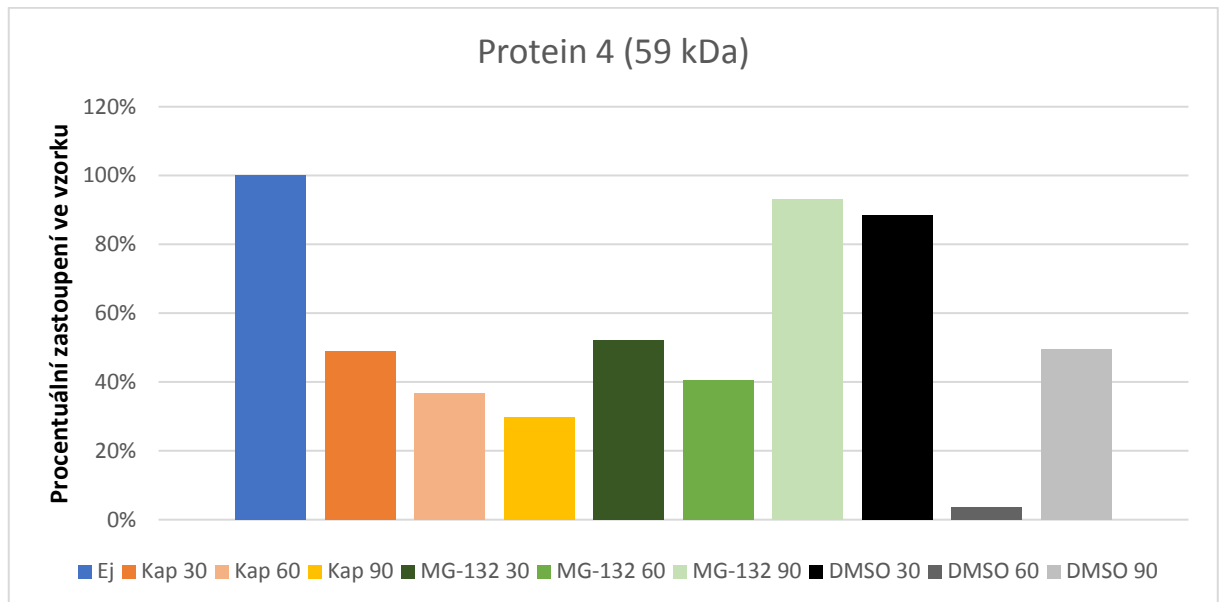
U proteinu č. 3 (67 kDa) je detekce mono-/poly-ubiquitinace v průběhu kapacitace podobná jako u proteinu č. 2, což znamená, že kapacitace spermií v nemodifikovaném médiu má významný rozdíl na mono-/poly-ubiquitinaci proteinu až po 60 minutách inkubace. Stejně tak kapacitace v modifikovaném médiu s inhibítozem MG-132 neměla žádný významný vliv na mono-/poly-ubiquitinace proteinu, protože je intenzita reakce s protilátkou je podobná jako u vzorku kapacitace v médiu s přidavkem DMSO (viz graf 5, str. 34).



Graf 5: : Denzitometrické zhodnocení ubiquitovaného proteinu č. 3. detekovaného v extraktu ejakulovaných spermií (Ej), kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), v modifikovaném médiu s inhibítoem proteasomu MG-132 inkubovaných 30, 60 a 90 minut (MG-132 30, MG-132 60, MG-132 90), v modifikovaném médiu s DMSO inkubovaných 30, 60 a 90 minut (DMSO 30, DMSO 60, DMSO 90).

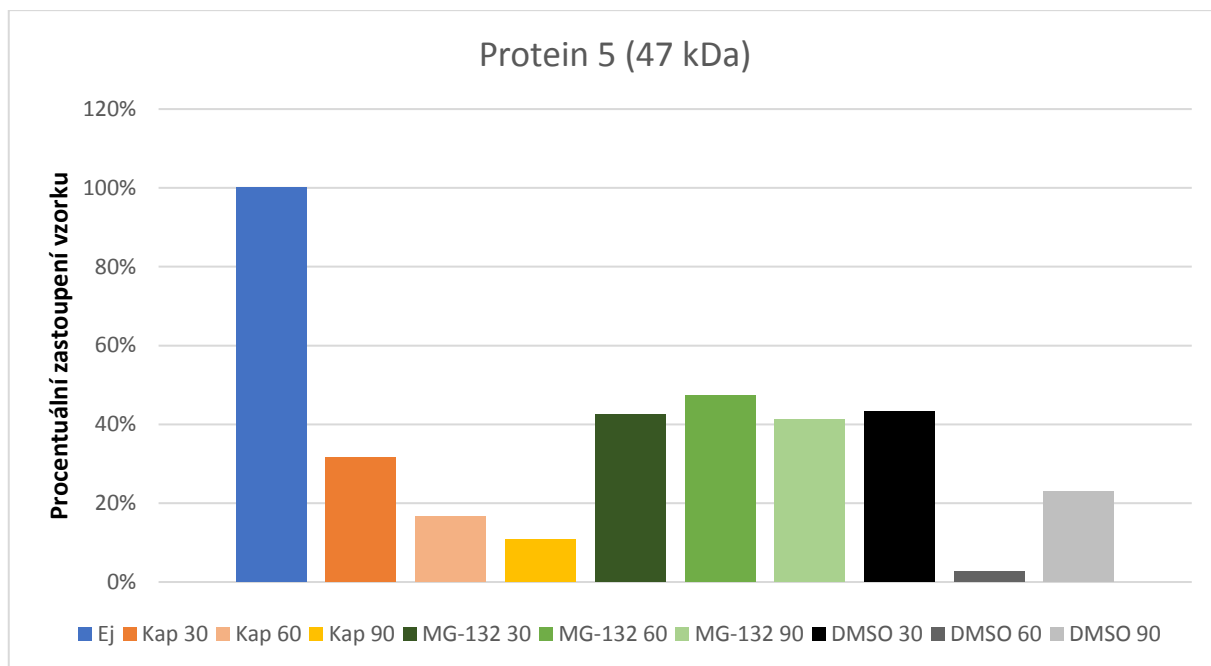
U proteinu č. 4 (59 kDa), během kapacitace spermií v nemodifikovaném médiu, pozorujeme snižující se mono-/poly-ubiquitinaci v čase a tím rostoucí stupeň degradace proteinu. Během kapacitace v modifikovaném médiu s inhibítoem MG-132 vidíme rozdíl v míře mono-/poly-ubiquitinace oproti kapacitaci v nemodifikovaném médiu. Mono-/poly-ubiquitinace detekujeme ve vyšší intenzitě. Kontrola kapacitace v modifikovaném médiu s DMSO značí, tak jako u proteinu č. 1, že během prvních 30 minut je kapacitace zpomalena,

později se hodnoty mono-/poly-ubiquitinace vyrovnávají hodnotám kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu (viz graf 6).



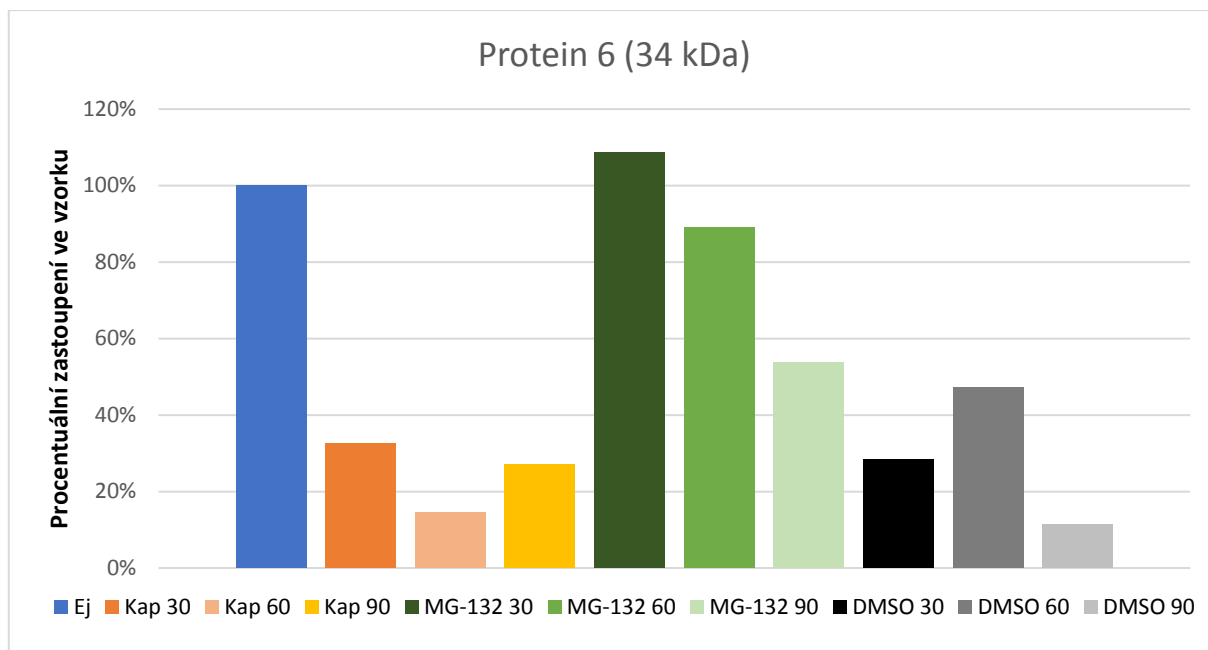
Graf 6: Densitometrické zhodnocení ubiquitinovaného proteinu č. 4. detekovaného v extraktu ejakulovaných spermií (Ej), kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), v modifikovaném médiu s inhibitorem proteasomu MG-132 inkubovaných 30, 60 a 90 minut (MG-132 30, MG-132 60, MG-132 90), v modifikovaném médiu s DMSO inkubovaných 30, 60 a 90 minut (DMSO 30, DMSO 60, DMSO 90).

U detekovaného proteinu č. 5 (47 kDa) pozorujeme výrazný úbytek mono-/poly-ubiquitinace a s ní i proteinu během kapacitace v nemodifikovaném médiu s postupným snižováním intenzity detekce mono-/poly-ubiquitinace v čase. Kapacitace v modifikovaném médiu s MG-132 vykazuje vyšší hodnoty mono-/poly-ubiquitinace na proteinu, než je tomu u spermií kapacitovaných v nemodifikovaném médiu. Kontrola kapacitace s modifikovaným médiem s DMSO opět ukazuje na vyšší mono-/poly-ubiquitinaci během prvních 30 minut inkubace a až po dalších 30 minutách pokles na úroveň mono-/poly-ubiquitinace kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu (viz graf 7, str. 36).



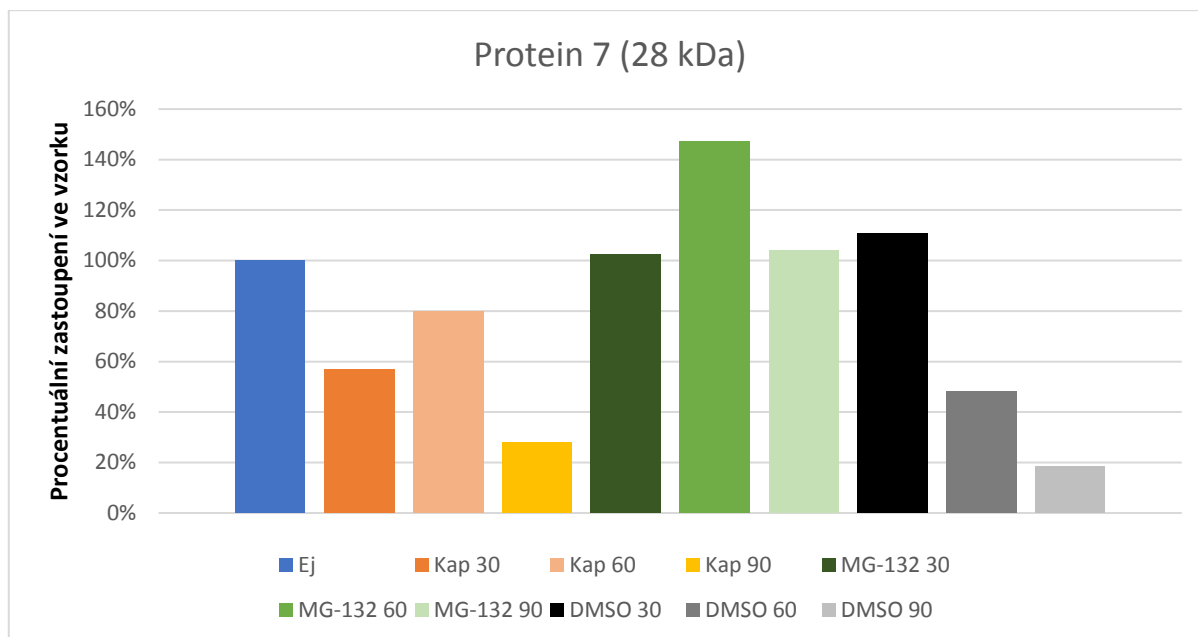
Graf 7: Densitometrické zhodnocení ubiquitinovaného proteinu č. 5. detekovaného v extraktu ejakulovaných spermií (Ej), kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), v modifikovaném médiu s inhibítorem proteasomu MG-132 inkubovaných 30, 60 a 90 minut (MG-132 30, MG-132 60, MG-132 90), v modifikovaném médiu s DMSO inkubovaných 30, 60 a 90 minut (DMSO 30, DMSO 60, DMSO 90).

Protein č. 6 (34 kDa) během kapacitace spermií v nemodifikovaném médiu vykazuje nízkou hladinu mono-/poly-ubiquitinace, která se nemění v čase. Oproti tomu detekujeme vysoké hodnoty mono-/poly-ubiquitinace na proteinu během kapacitace spermií v modifikovaném médiu s inhibítorem MG-132, zde je vidět postupné snižování intenzity detekce mono-/poly-ubiquitinace v čase, která však nedosahuje hodnot mono-/poly-ubiquitinace spermií kapacitovaných v nemodifikovaném médiu. Kontrola mono-/poly-ubiquitinace proteinu během kapacitace v modifikovaném médiu s DMSO se blíží hodnotám mono-/poly-ubiquitinace detekované na spermiích kapacitovaných v médiu nemodifikovaném. (Viz graf 8, str 37).



Graf 8: Denzitometrické zhodnocení ubiquitinovaného proteinu č. 6. detekovaného v extraktu ejakulovaných spermií (Ej), kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), v modifikovaném médiu s inhibítozem proteasomu MG-132 inkubovaných 30, 60 a 90 minut (MG-132 30, MG-132 60, MG-132 90), v modifikovaném médiu s DMSO inkubovaných 30, 60 a 90 minut (DMSO 30, DMSO 60, DMSO 90).

Detekovaný protein č. 7 (28 kDa) vykazuje vyšší hodnoty mono-/poly-ubiquitinace během kapacitace spermií v nemodifikovaném médiu do 60 minut, než je tomu u proteinů č. 1-6. Po 60 minutách kapacitace vykazuje hodnoty mono-/poly-ubiquitinace proteinu podobné jako proteiny předchozí. U tohoto proteinu ve vzorku kapacitovaných spermií v modifikovaném médiu s inhibítozem MG-132 je vidět detekce vysokých hodnot mono-/poly-ubiquitinace, dosahující hodnot detekovaných na spermiích ejakulovaných. Kontrola mono-/poly-ubiquitinace během kapacitace v modifikovaném médiu s DMSO se shoduje s hodnotami, které vykazuje tento protein během kapacitace v médiu nemodifikovaném, prvních 30 minut je pozorované zpoždění, tak jako u většiny detekovaných proteinů (viz graf 9, str. 38).



Graf 9: Denzitometrické zhodnocení ubiquitinovaného proteinu č. 7. detekovaného v extraktu ejakulovaných spermií (Ej), kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), kapacitovaných spermií v nemodifikovaném médiu inkubovaných 30, 60 a 90 minut (Kap 30, Kap 60, Kap 90), v modifikovaném médiu s inhibítozem proteasomu MG-132 inkubovaných 30, 60 a 90 minut (MG-132 30, MG-132 60, MG-132 90), v modifikovaném médiu s DMSO inkubovaných 30, 60 a 90 minut (DMSO 30, DMSO 60, DMSO 90).

5.3 Lokalizace ubiquitinovaných proteinů ve spermiích

Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie

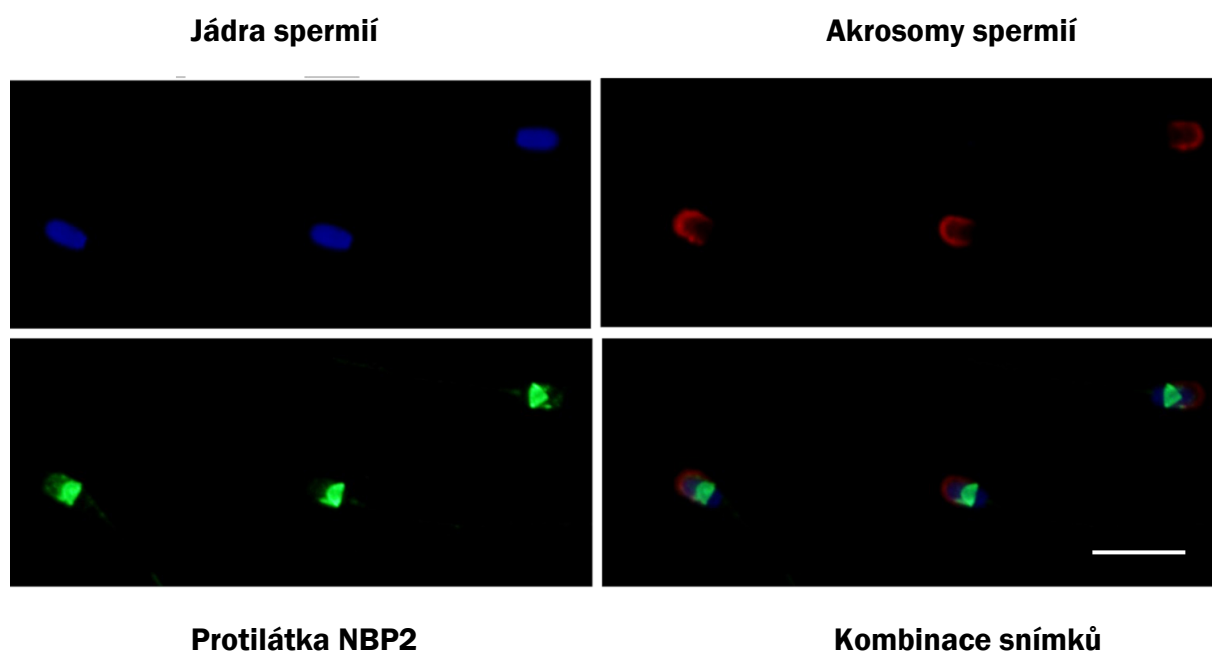
Pro lokalizaci ubiquitinovaných proteinů na ejakulovaných a in vitro kapacitovaných spermiích byla provedena kapacitace in vitro. Pro pokusy byla kapacitace provedena v: nemodifikovaném kapacitačním médiu, v modifikovaném kapacitačním médiu obohaceného o 90 μ l inhibitoru proteasomu MG-132 a v modifikovaném kapacitačním médiu s přidáním 70 μ l DMSO (viz kapitola 4.2.2 Kapacitace).

Po vytvoření fixovaných preparátů ze všech variant vzorků byla použita primární polyklonální protilátka NBP2 (1:50) pro lokalizaci na mono-i poly-ubiquitinových řetězců v proteinech přítomných ve spermiích. Fixované nátěry byly pozorovány fluorescenčním a konfokálním mikroskopem (viz kapitola 4.2.7 Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie).

Snímky spermií vždy znázorňují: jádra spermií obarvená pomocí Dapi (modré zbarvení), akrosomy obarvené za pomoci lektinu PNA (červené zbarvení), reakci s protilátkou

(zelené zbarvení) a nakonec prolnutí všech sledovaných částí pro celkový náhled. Ke každé fotce je přiloženo měřítko o délce 10 μm .

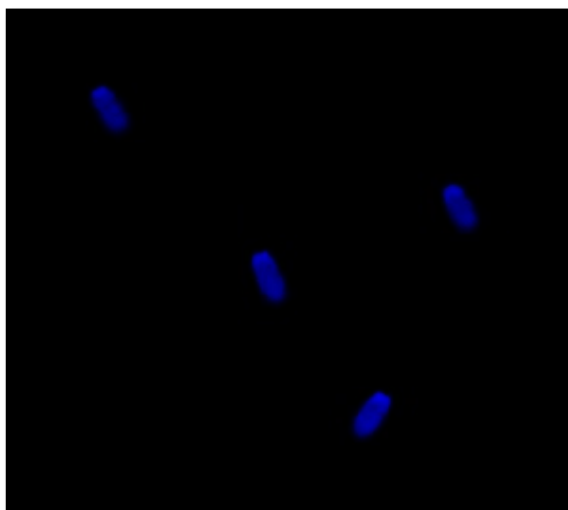
Vzorek ejakulovaných spermií (viz Obr. 8) ukazuje výraznou mono-/poly-ubiquitinaci na proteinech přítomných v oblasti subequatoriálního segmentu.



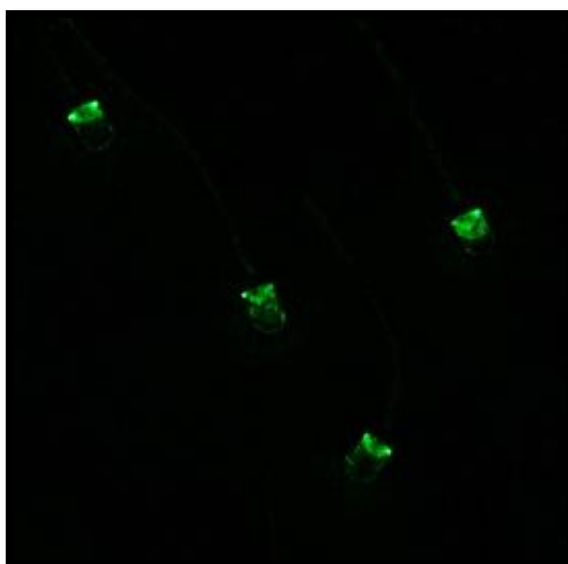
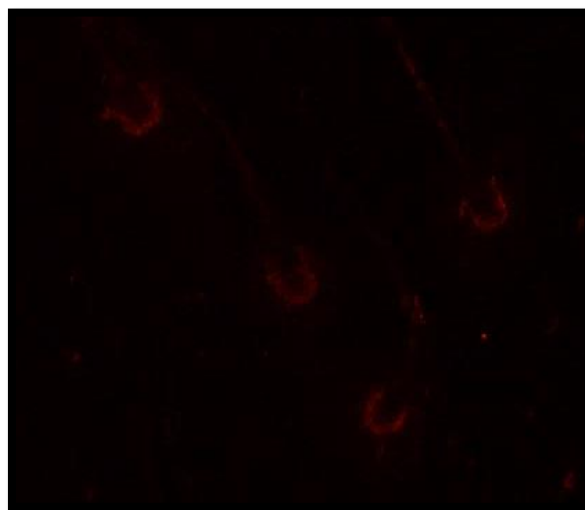
Obr. 8: Vzorek ejakulovaných spermií pozorovaných pod fluorescenčním mikroskopem. Jádra spermií obarvená pomocí Dapi (modré zbarvení), akrosomy obarvené za pomoci PNA lektinu (červené zbarvení). Protilátka NBP2 označuje mono-/poly-ubiquitinované proteiny v subequatoriálním segmentu hlavičky spermie (zelené zbarvení) a překrytí všech sledovaných částí spermie pro celkový náhled. Měřítko 10 μm .

Další snímky ejakulovaných spermií (viz Obr. 9, str. 40) byly pořízeny za pomoci konfokálního mikroskopu. Snímky potvrzují, že na ejakulovaných spermiích je označena mono-/poly-ubiquitinace proteinů nacházejících se v subekvatoriálním segmentu. Akrosomy a jádra spermií jsou nenarušené.

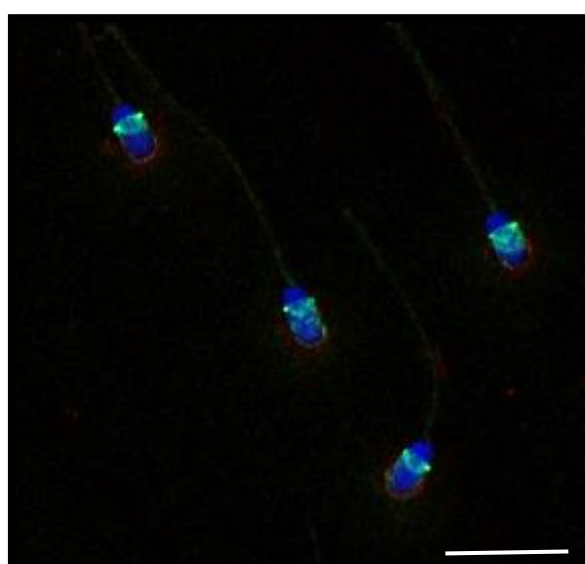
Jádra spermíí



Akrosomy spermíí



Protilátka NBP2

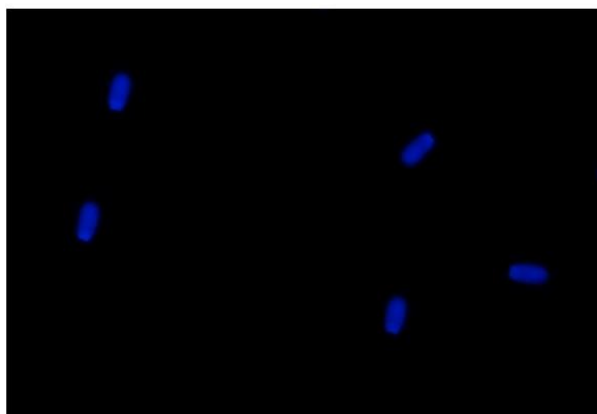


Kombinace snímků

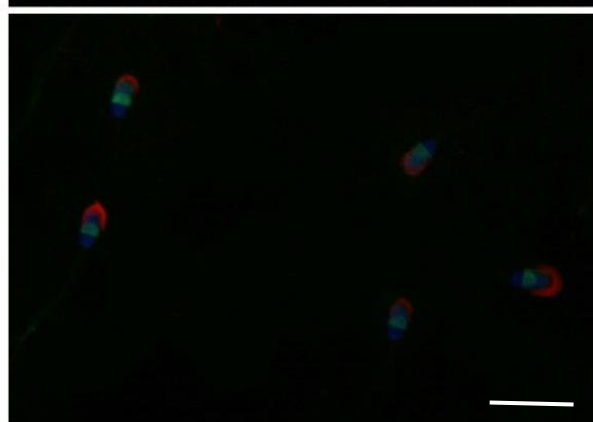
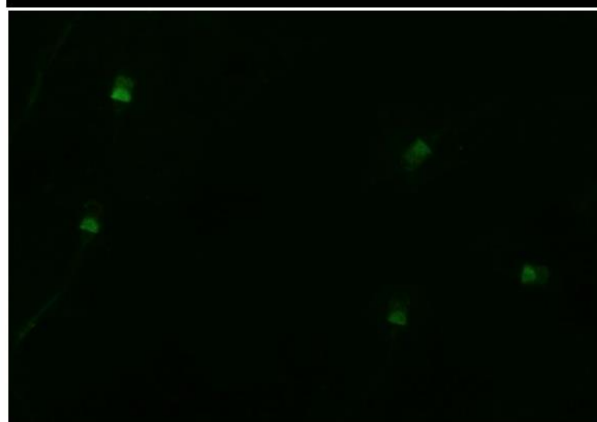
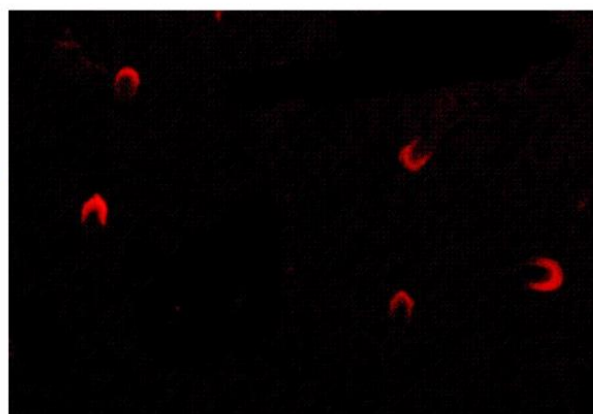
Obr. 9: Ejakulované spermie pozorované konfokálním mikroskopem. Jádra spermíí obarvená pomocí Dapi (modré zbarvení), akrosomy obarvené za pomoci PNA (červené zbarvení). Protilátka NBP2 označuje mono-/poly-ubiquitinované proteiny v subequatoriálním segmentu hlavičky spermie (zelené zbarvení) a překrytí všech sledovaných částí spermie pro celkový náhled. Měřítka 10 μ m.

Lokalizace mono-/poly-ubiquitinované proteinů ve spermíích kapacitovaných v nemodifikovaném médiu je zobrazena na Obr. 10 (viz str. 41). Kapacitované spermie mají jádra a akrosomy nenarušené, protilátka NBP2 značí mono-/poly-ubiquitinované proteiny v subekvatoriálním segmentu viditelně slaběji, než je tomu u spermíí ejakulovaných. Snímky jsou pořízené na fluorescenčním mikroskopu.

Jádra spermíí



Akrosomy spermíí



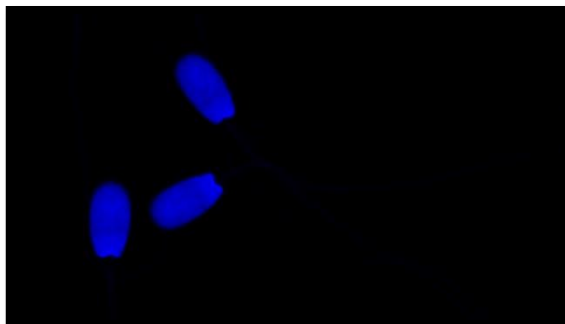
Protilátka NBP2

Kombinace snímků

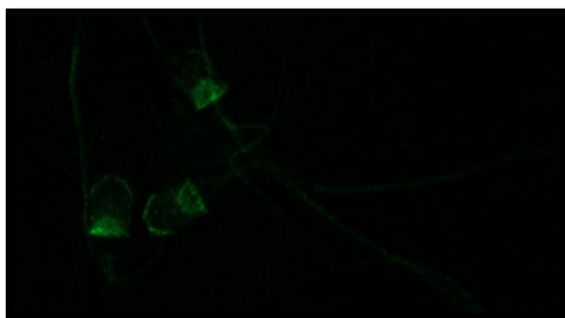
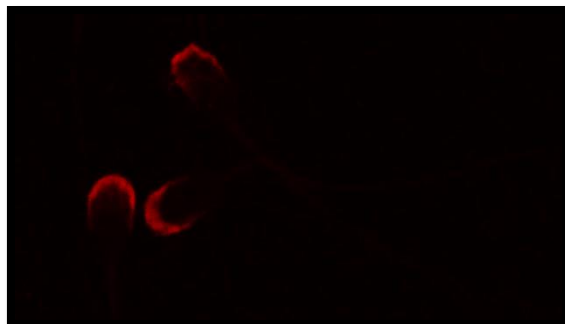
Obr. 10: Kapacitované spermie v nemodifikovaném médiu pozorované pod fluorescenčním mikroskopem. Jádra spermíí obarvená pomocí Dapi (modré zbarvení), akrosomy obarvené za pomoci PNA (červené zbarvení). Protilátka NBP2 označuje mono-/poly-ubiquitinované proteiny v subekvatoriálním segmentu hlavičky spermie (zelené zbarvení) a překrytí všech sledovaných částí spermie pro celkový náhled. Měřítko 10 μ m.

Následující snímky znázorňují také lokalizaci mono-/poly-ubiquitinovaných proteinů v kapacitovaných spermích v nemodifikovaném médiu, snímky jsou pořízeny na konfokálním mikroskopu (viz Obr. 11, str. 42). Můžeme vidět nenarušená jádra i akrosomy a protilátku, která značí mono-/poly-ubiquitinace v proteinech subekvatoriálního segmentu hlavičky spermie viditelně slaběji, než tomu bylo u spermíí ejakulovaných.

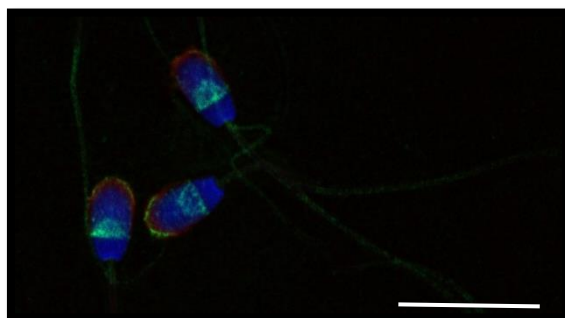
Jádra spermíí



Akrosomy spermíí



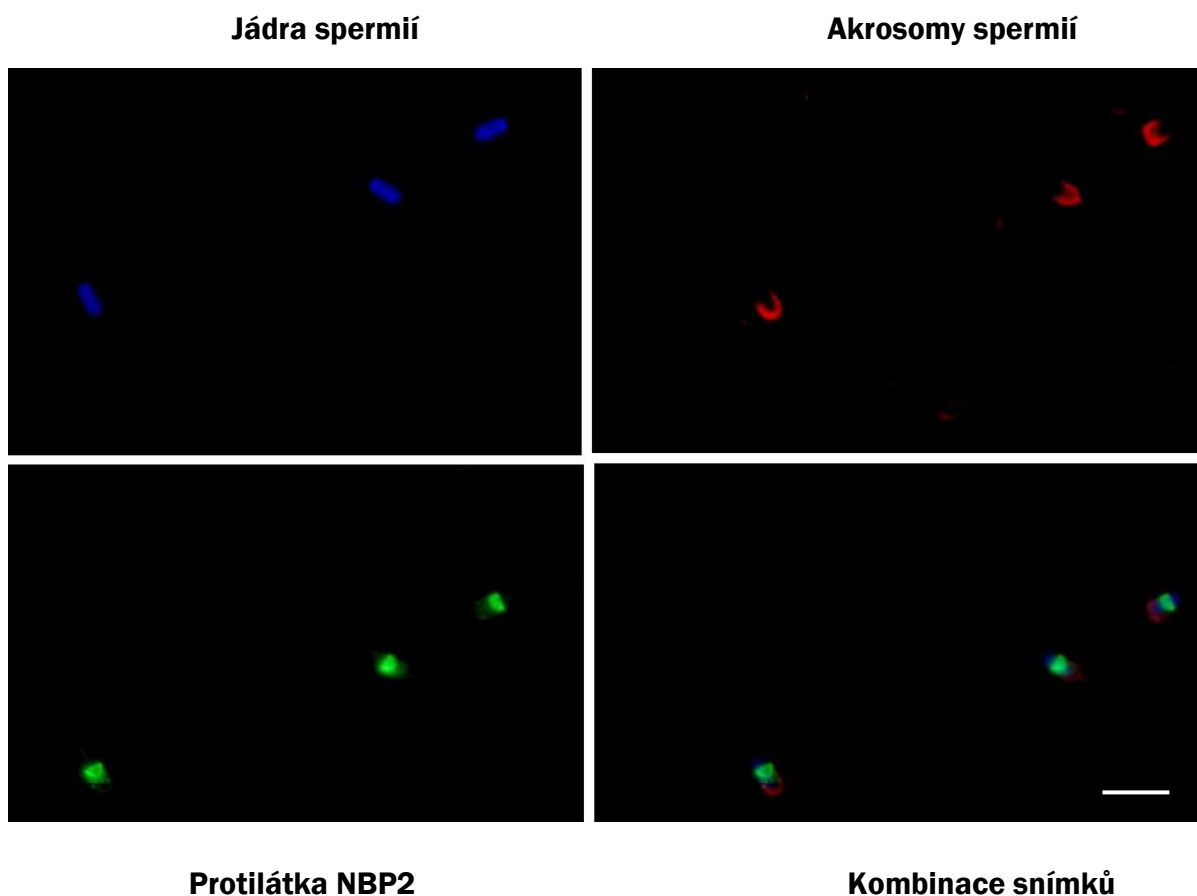
Protilátka NBP2 na spermíích



Kombinace snímků

Obr. 11: Kapacitované spermie v nemodifikovaném médiu pozorované pod konfokálním mikroskopem. Jádra spermíí obarvená pomocí Dapi (modré zbarvení), akrosomy obarvené za pomoci PNA (červené zbarvení). Protilátka NBP2 označuje mono-/poly-ubiquitinované proteiny v subekvatoriálním segmentu hlavičky spermie (zelené zbarvení) a překrytí všech sledovaných částí spermie pro celkový náhled. Měřítko 10 μ m.

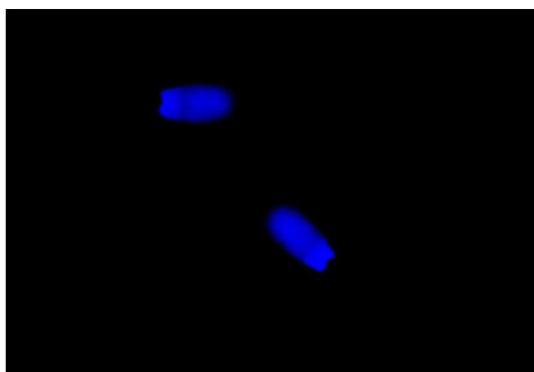
Spermie kapacitované v modifikovaném médiu s inhibítozem MG-132 (viz Obr. 12, str. 43) mají jádra spermíí kompaktní, akrosomy nenarušené a subekvatoriální segment vykazuje výraznou přítomnost mono-/poly-ubiquitinových řetězců vázaných na proteiny hlavičky spermie, které nebyly díky inhibítozu MG-132 degradovány proteasomem. Detekce ubiquitinových řetězců je viditelně silnější, než je tomu u spermíí kapacitovaných v nemodifikovaném médiu, podobá se detekci na spermíích ejakulovaných.



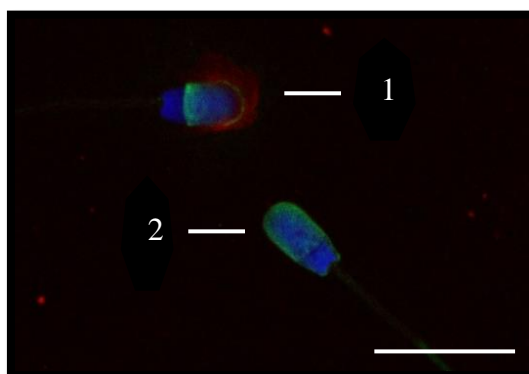
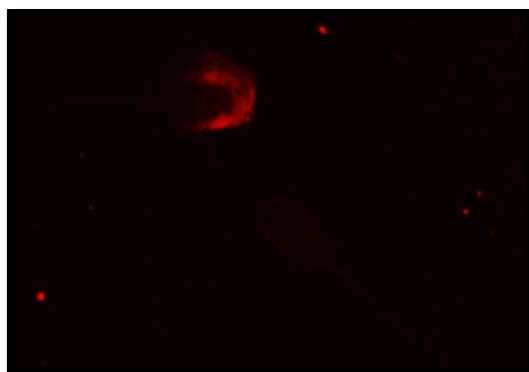
Obr. 12: 4 Kapacitované spermie v modifikovaném médiu s inhibitorem MG-132 pozorované fluorescenčním mikroskopem. Jádra spermíí obarvená pomocí Dapi (modré zbarvení), akrosomy obarvené za pomoci PNA (červené zbarvení). Protilátka NBP2 označuje mono-/poly-ubiquitinované proteiny v subekvatoriálním segmentu hlavičky spermie (zelené zbarvení) a překrytí všech sledovaných částí spermie pro celkový náhled. Měřítka 10 μ m.

Snímky kapacitovaných spermíí v modifikovaném médiu s inhibitorem MG-132 byly pořízeny i na konfokálním mikroskopu (viz Obr. 13, str 44). Zde jsou vidět dvě spermie. Spermie č. 1 má nenarušený akrosom i jádro a je vidět detekce mono-/poly-ubiquitinových řetězců na proteinech v subekvatoriálním segmentu. Detekce je viditelně výraznější než u spermíí kapacitovaných v nemodifikovaném médiu. Spermie č. 2 má chybějící akrosom, je tedy poškozená. Zde není viditelná výrazná detekce ubiquitinových řetězců v subekvatoriálním segmentu, nýbrž je ubiquitin detekován rovnoměrně na vnitřní akrosomální membráně hlavičky spermie.

Jádra spermií



Akrosomy spermií



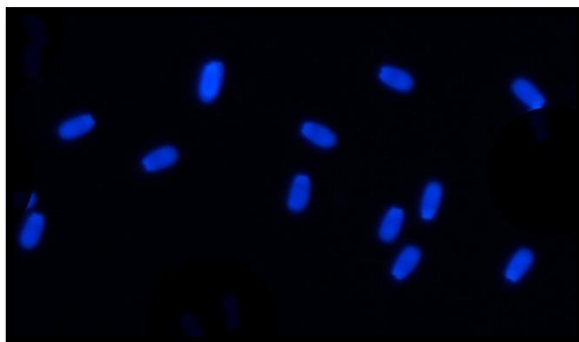
Protilátka NBP2

Kombinace snímků

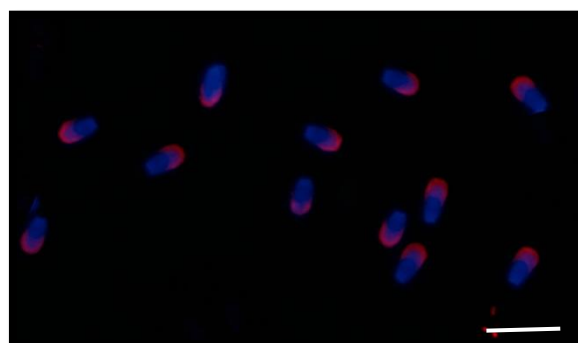
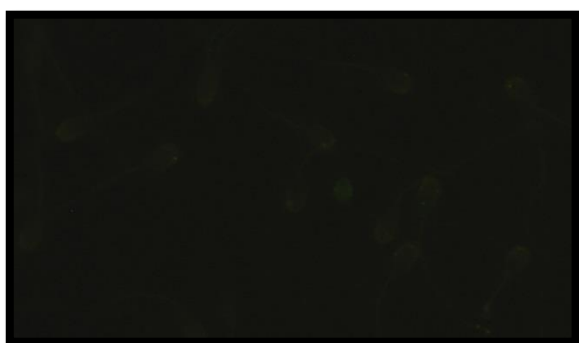
Obr. 13: Kapacitované spermie v modifikovaném médiu s inhibítozem MG-132 pozorované konfokálním mikroskopem. Jádra spermií obarvená pomocí Dapi (modré zbarvení), akrosomy obarvené za pomoci PNA (červené zbarvení). Protilátka NBP2 označuje mono-/poly-ubiquitinové proteiny v hlavičce spermie (zelené zbarvení) a překrytí všech sledovaných částí spermie pro celkový náhled. Měřítko 10 μ m.

Kontrolou pro vzorky spermií, zda nedochází k autofluorescenci nebo nespecifické vazbě sekundární protilátky konjugované s fluorochromem, byla varianta fixovaných spermií, které byly místo primárních protilátek inkubovány pouze s PBS, ve kterém se primární protilátky ředily. Jádra spermií obarvená pomocí Dapi (modrá) jsou kompaktní, akrosomy obarvené pomocí PNA (červená) jsou neporušené, ubiquitinace na spermích není detekována. Poslední snímek je složením předchozích tří pro celkový náhled na spermie (viz Obr. 14, str. 45).

Jádra spermií



Akrosomy spermií



Sekundární protilátka Alexa 488

Kombinace snímků

Obr. 14: Negativní kontrola pro vzorky detekce mono-/poly-ubiquitinace. Jádra spermií obarvená pomocí Dapi (modré zbarvení), akrosomy obarvené za pomoci PNA (červené zbarvení). Detekce fluorescence (zelené zbarvení) a překrytí všech sledovaných částí spermie pro celkový náhled. Měřítko 10 μm .

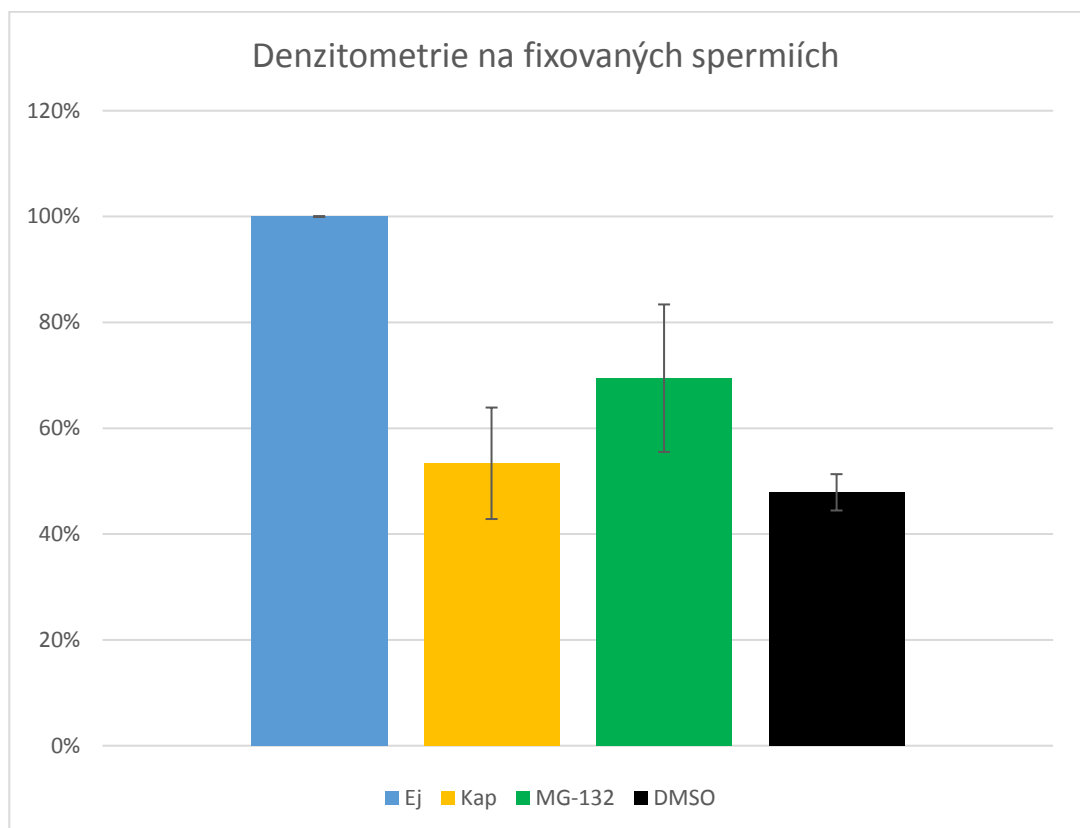
Intenzita mono-/poly-ubiquitinace detekované na spermiích byla vyhodnocena za pomoci denzitometrického měření analýzy obrazu a zpracována do grafu (viz graf 10, str. 46), kde ejakulované spermie představují výchozí hodnotu (tedy 100 %). Od nich se odvíjí procentuální zastoupení detekované mono-/poly-ubiquitinace na proteinech spermií kapacitovaných v nemodifikovaném médiu, na proteinech spermií kapacitovaných v modifikovaném médiu s inhibátorem proteasomu MG-132 a na proteinech spermií kapacitovaných v modifikovaném médiu s přídatkem DMSO.

Výsledky denzitometrie byly dále zpracovány za pomoci analýzy rozptylu, tedy ANOVA jednovýběrového testu. Ve statistickém vyhodnocení byly hledány statisticky významné rozdíly mezi všemi hodnocenými skupinami na základě intenzity detekce celkových ubiquitinovaných proteinů ve vzorcích ve vztahu k ejakulovaným spermiím, které

nám představují výchozích 100 %. Hodnocenými skupinami byla mono-/poly/ ubiquitinace na ejakulovaných spermích, kapacitovaných spermích v nemodifikovaném médiu, kapacitovaných spermích v modifikovaném médiu s inhibítoem proteasomu MG-132 a kapacitované spermie v modifikovaném médiu s DMSO. Ze statistického vyhodnocení vyplývá, že mezi jednotlivými skupinami je statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

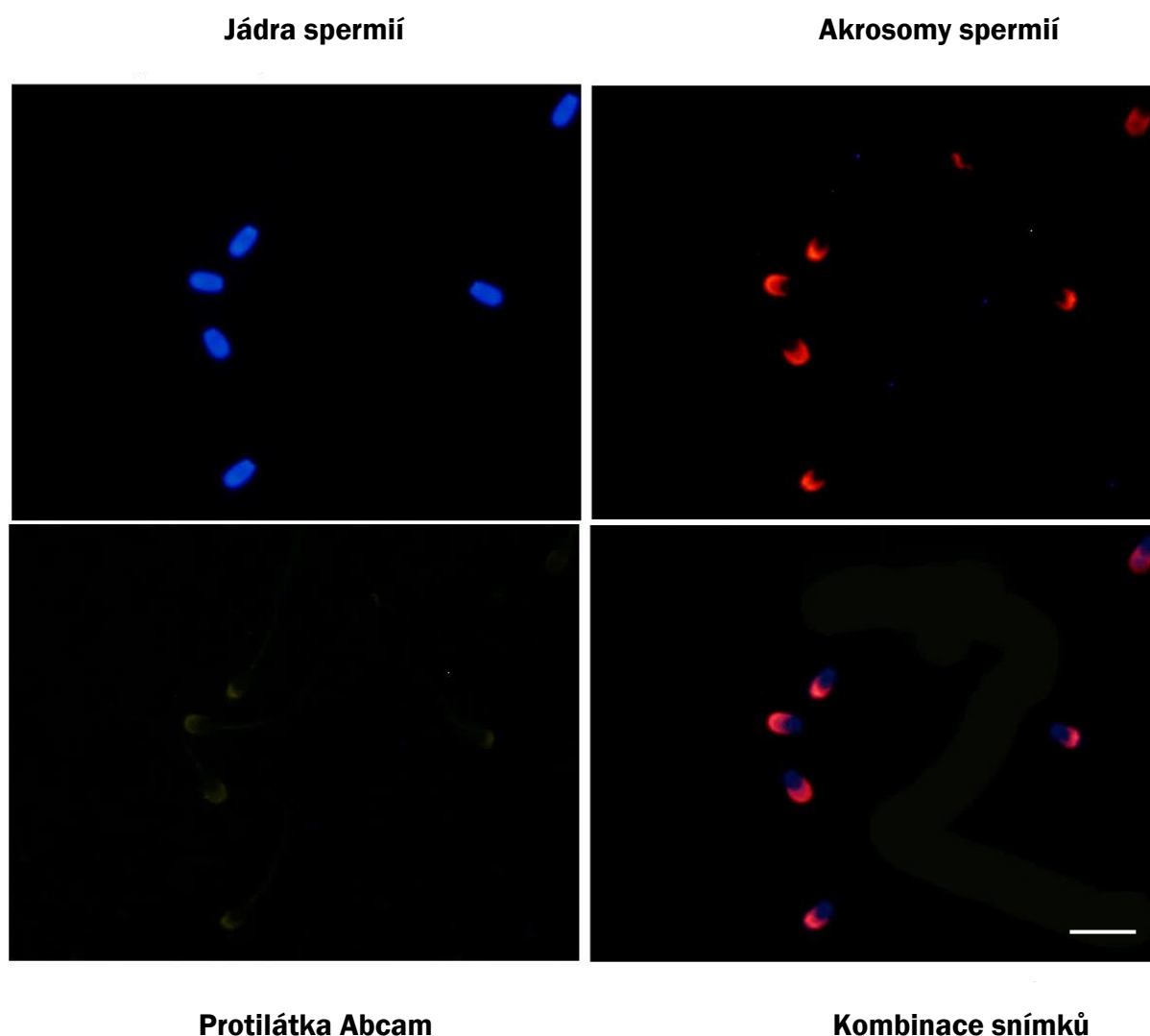
Dále byly porovnány hodnoty mezi spermii kapacitovanými v nemodifikovaném médiu a spermii kapacitovanými v modifikovaném médiu s inhibítoem MG-132. Byl použit nepárový t-test, který vypovídá o statisticky významném rozdílu mezi těmito dvěma hodnocenými skupinami ($p < 0,05$).

Z výsledků tedy vyplývá, že inhibítoem proteasomu skutečně inhibuje degradaci povrchových proteinů na hlavičce spermie.



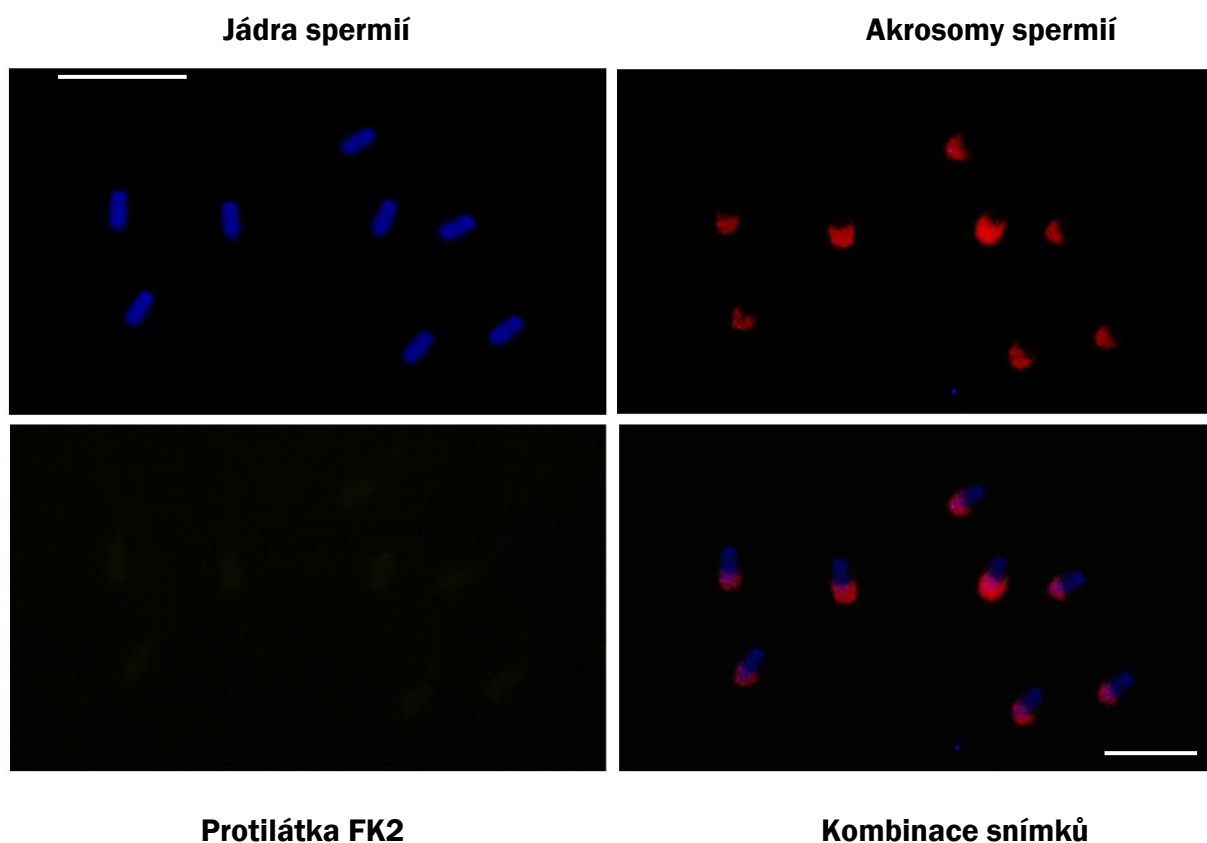
Graf 10: Denzitometrická analýza mono-/poly-ubiquitinace na fixovaných spermích: vzorek mono-/poly-ubiquitinace proteinů ejakulovaných spermii (Ej) sloužící jako výstupní 100% hodnota pro vzorky další. Mono-/poly-ubiquitované proteiny na spermích kapacitovaných v nemodifikovaném médiu (Kap), mono-/poly-ubiquitinace proteinů na spermích kapacitovaných v modifikovaném médiu s inhibítoem MG-132 a poslední vzorek mono-/poly-ubiquitinace přítomné na proteinech spermii kapacitovaných v modifikovaném médiu s DMSO. Je vyznačena směrodatná odchylka.

Dalším provedeným pokusem bylo použití primární polyklonální protilátky proti ubiquitinu od firmy Abcam (ab7780) na nátěry tvořené stejným postupem jako výše zmíněným. Ta byla nanášena v koncentraci 1:500 (ředěno v PBS), a to na vzorky: ejakulovaných spermií, kapacitovaných spermií, kapacitovaných spermií s inhibítorem MG-135 a kapacitovaných spermií s DMSO. Na žádném ze vzorků nebyla pozorována detekce mono-/poly-ubiquitinu, pokus byl tedy vyhodnocen s negativním výsledkem. Na Obr. 15 je vzorek ejakulovaných spermií, na kterých by měly být polyubiquitinované řetězce detekovány s nejvyšší pravděpodobností.



Obr. 55: Ejakulované spermie inkubované s protilátkou proti ubiquitinu od firmy Abcam pozorované pod fluorescenčním mikroskopem. Jádra spermií obarvená pomocí Dapi (modré zbarvení), akrosomy obarvené za pomoci PNA (červené zbarvení). Protilátka Abcam by měla značit mono-/poly-ubiquitinaci, ovšem bez výsledku (zelené zbarvení) a překrytí všech sledovaných částí spermie pro celkový náhled.

Další pokus se stejnou přípravou vzorků jako je popsáno výše byl proveden s primární monoklonální protilátkou FK2 v koncentraci 1:20 (viz Obr. 16). Opět nebyl pozorován žádný pozitivní výsledek. Stejně jako u protilátky Abcam je přiložen snímek s ejakulovanými spermii.



Obr. 16: Ejakulované spermie inkubované s protilátkou proti ubiquitinu FK2 pozorované pod fluorescenčním mikroskopem. Jádra spermii obarvená pomocí Dapi (modré zbarvení), akrosomy obarvené za pomoci PNA (červené zbarvení). Protilátka FK2 by měla značit mono-/poly-ubiquitinaci, ovšem bez výsledku (zelené zbarvení) a překrytí všech sledovaných částí spermie, pro celistvý náhled. Měřítka 10 μm .

Protilátka FK2 byla použita také pro detekci ubiquitinovaných proteinů na povrchu spermii inkubací v suspenzi (viz kapitola 4.2.8 Imunofluorescence v suspenzi spermii), kdy nebyla pozorována žádná pozitivní reakce.

Pro všechny variace fixovaných nátěrů byla vždy vytvořena negativní kontrola inkubovaná s PBS místo primární protilátky, ta vždy byla bez pozitivních reakce.

5.3.1 Vazba protilátky v suspenzi spermíí

Detekce ubiquitinyvaných proteinů na povrchu spermíí byla provedena v suspenzi nekapacitovaných a kapacitovaných spermíí. Pro pokusy byla provedena kapacitace in vitro v: nemodifikovaném kapacitačním mediu (viz kap. 4.2.2 Kapacitace).

Ke 100 μ l promytých spermíí byly přidány 2 μ l protilátky myší monoklonální FK2 (mono-and polyubiquitylated conjugates, mAb FK2; Enzo/USA) (viz kap. 5.3.2 Imunofluorescence v suspenzi spermíí).

Suspenze ze spermíí nekapacitovaných i kapacitovaných s primární monoklonální protilátkou FK2 a nebyla pozorována žádná pozitivní reakce.

6 Diskuze

Kapacitace spermií je složitým procesem, jehož všechny zákonitosti zatím nejsou zcela známé. Během kapacitace spermií dochází k degradaci povrchových proteinů, které se na spermie naváží během epididymální maturace a ejakulace.

Buňky v těle běžně potřebují degradovat řadu proteinů, aby nedocházelo k jejich hromadění, často se jedná o proteiny nepotřebné či poškozené. Proces degradace proteinů zprostředkovává ubiquitin-proteasomový systém, který rozpoznává polyubiquitinovým řetězcem označené proteiny, které následně deubiquitínuje a degraduje. Proteasom rozbalení nejvyšší strukturu proteinu na řetězec, který jím prochází a je štěpen na menší proteiny, které v buňce slouží jako stavební materiál pro nové proteiny. Mnoho potřebných informací k pochopení mechanismu ubiquitin proteasomového systému stále chybí, je však jasné, že je zcela nezbytný pro celý proces oplození. Otázkou tedy je, zda tento systém degraduje během kapacitace i proteiny navázané na hlavičce spermií.

Z výsledků, které jsme získali, lze vyhodnotit, že hypotéza o tom, jestli proteiny navázané na spermie jsou degradovány ubiquitin-proteasomovým systémem, je správná. Pozorovali jsme statisticky významný rozdíl v míře mono-/poly-ubiquitinace proteinů při kapacitaci spermií s inhibitorem proteasomu MG-132 a bez inhibitoru proteasomu, kde intenzita detekce ubiquitinace na proteinech jsou vyšší u spermií inkubovaných s inhibitorem.

Ve spermiích jsme detekovali celkem 7 proteinů (≥ 250 kDa, 120 kDa, 67 kDa, 58 kDa, 46 kDa, 33 kDa a 27 kDa), které byly značeny mono-/poly-ubiquitinací a byly odhadnuty jejich molekulární váhy. U odhadovaných molekulárních vah je třeba počítat se zvýšením hmotnosti proteinu vlivem různého stupně ubiquitinace, kde jeden ubiquitin je o velikosti 8.5 kDa. Vzhledem k výzkumům, které provedl Miles et al. (2013) a Zigo (2019) lze předpokládat, že by se mohlo jednat o spermadhesiny AQN (12 kDa), AWN (16,9 kDa), PSP I (z angl. Phosphoserine phosphatase I) a PSP II (z angl. Phosphoserine phosphatase II) (14,5 kDa), které jsou degradovány ubiquitin-proteasomovým systémem, ovšem zvětšené o polyubiquitinové řetězce. Případně by se mohlo jednat o některé z dalších povrchových proteinů, které jsou také asociovány s proteasomem jako BSP1 (kančí DQH/pB1 precursor; 13 kDa), inhibitor akrosinu ze semenné plasmy (z angl. Seminal plasma acrosin inhibitor A1; 7,6 kDa), Lactadherin (47,8 kDa), inhibitor motility spermií ze semenné plasmy (z angl. Seminal plasma sperm motility

inhibitor; 15 kDa) nebo akrosin vázající protein (z angl. Acrosin binding protein; 60 kDa) (Miles et al 2013). Bylo by dobré se zaměřit na konkrétní povrchové proteiny použitím specifických protilátek a podle molekulových vah určit kolik je na nich vázáno ubiquitinových podjednotek.

Proteiny, které detekoval jako degradující v průběhu kapacitace Kwon et al (2014) PHGPx (z angl. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase), RAB2 (z angl. Ras associated binding protein) a PDHB (z angl. Pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit) by bylo vhodné prozkoumat, zda právě u nich nedochází k jejich degradaci proteasomem.

Pro detekci přítomnosti ubiquitinů v proteinech byla použita primární protilátka FK2, která ovšem značila mono- i poly-ubiquitinaci. Pro přesnost získaných dat by bylo vhodné provést detekci ubiquitinů na základě rozdělení protilátek detekující pouze monoubiquitinace a pouze polyubiquitinace a následně zopakovat pokusy, aby se zjistilo, zda jsou tyto proteiny určeny pro degradaci proteasomem, jelikož z práce Hicke (2001) vyplývá, že monoubiquitinace nebo ubiquitinace řetězcem kratším, než jsou čtyři podjednotky, neznají degradaci proteinů, ale pouze upravují jejich procesy a to od membránového transportu k regulaci transkripce.

Hodnotila se také časová závislost na degradaci proteinů v průběhu kapacitace. Zde je patrný rozdíl mezi některými proteiny, kdy u některých proteinů (protein č. 1) dochází k téměř 100% degradaci během prvních 30 minut kapacitace, zatímco u jiných (protein č. 7) dochází k degradaci velmi pozvolna a rozdíly jsou patrné okolo 60 minut inkubace v kapacitačním médiu. Proto se zdá, že v případě tohoto proteinu trvá déle, než dojde k jeho degradaci během kapacitace. Bylo by vhodné provést další experimenty zaměřené na detekci jednotlivých ubiquitovaných proteinů, kdy by byla inkubace v kapacitačním médiu po delší časovou dobu a vzorky by byly odebírány v kratších časových intervalech pro získání přesné křivky degradace u jednotlivých proteinů. Doba, po kterou degradace proteinů trvá, má vliv na celkovou dobu potřebnou pro kapacitaci spermie. Otázkou zůstává, zda je degradace všech těchto detekovaných proteinů potřebná ke kapacitaci spermie a tím získání schopnosti oplodnit vajíčko.

Stejně tak proteiny vykazují rozdíly v účinnosti inhibitoru proteasomu, u některých proteinů nedošlo k výrazným změnám oproti kapacitaci bez inhibitoru. Je možné, že na těchto proteinech degradaci zajišťuje jiný systém, například lysozomy, které se v semenné plasmě vyskytují a u lidí je potvrzeno spojení zhoršené plodnosti s nižší aktivitou enzymů v lysozomech obsažených (Dandekar & Harikumar 1997). I zde by bylo vhodné provést další

experimenty. U dalších proteinů (protein č. 6) byla míra inhibice velmi vysoká. Je tedy významně inhibován proteasom, který se podílí na jejich degradaci (Sutovsky 2015).

Bohužel nebylo provedeno dostatečné opakování u experimentů zaměřených na detekci ubiquitovaných proteinů v průběhu kapacitace. Proto pravděpodobně došlo v některých jednotlivých hodnot k chybám, které mohou zkreslit celkový výsledek. Příkladem je příliš vysoká hodnota míry reakce s protilátkou u proteinu č. 1 a č. 7 u vzorku s MG-132, který byl vyšší než u ejakulovaných spermií. Pravděpodobná chyba je i u proteinů č. 4 a č. 5 v rámci kapacitace s DMSO po dobu 60 minut. Všechny tyto odchylky mohly být způsobeny nepřesnou nanáškou jednotlivých vzorků. Přestože byla celková proteinová nanáška kontrolována pomocí detekce alfa-tubulinu, mohlo dojít k chybě nanášky, protože z důvodu překrytí proteinů detekovaných oběma protilátkami (proti ubiquitinu a tubulinu) byly pro detekci použity 2 odlišné membrány.

Inhibitor MG-132 byl rozpouštěn v DMSO, proto byla provedena kontrola, zda DMSO neovlivňuje průběh kapacitace a s ní spojenou degradaci proteinů. Nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$), avšak z grafů vyplývá, že prvních 30 minut inkubace s kapacitačním médiem s DMSO, dochází k pozastavení degradace proteinů, tedy degradace proteinů je mírně opožděna. Bylo by vhodné provést další výzkum se zaměřením na tento poznatek, zda se nejednalo pouze o náhodnou chybu. Pro další výzkum by bylo možné vycházet z práce Yoshimoto et al. (2017), kde je uvedeno DMSO jako vhodná látka pro prodloužení doby skladování oplození schopného spermatu, jelikož zvyšuje hladinu fosforylace tyrosinu. Ovšem jejich pokus byl založen na podmínkách inkubace za nízkých teplot. DMSO tedy mohlo způsobit krátkodobé odložení procesů vedoucích ke kapacitaci a s tím opozdit i degradaci proteinů.

Vytvořené fixované nátěry spermií pro mikroskopii byly inkubovány s několika primárními protilátkami. Primární monoklonální protilátka FK2 (mono- and polyubiquitinated conjugates, mAb FK2), která detekuje mono-/poly-ubiquitinaci proteinů, a není druhově specifická, detekovala ubiquitin na nitroceluloseových membránách s přenesenými proteiny po elektroforetické separaci, ovšem na nátěrech nebyla detekována žádná imunofluorescence. Proto byly testovány i jiné primární protilátky. Po vyzkoušení polyklonální protilátky od firmy Abcam (Anti-Ubiquitin antibody ab7780), která detekuje mono-/poly-ubiquitin na myších, krysách, lidech, také nevedla k pozitivním výsledkům, byla testována polyklonální protilátka NBP2 (Ubiquitin antibody NBP2-30132SS; Novus

biologicals), která značila ubiquitinované proteiny na kančích spermích. Protilátka NBP2 byla doposud potvrzena jako funkční pro člověka, myš, kočku, krysy a primáty. Detekce mono-/poly-ubiquitinace na proteinech byla pozitivní u spermíí ejakulovaných a u spermíí kapacitovaných s inhibitorem MG-132. Detekce imunofluorescence ukazuje na výraznou ubiquitinaci v oblasti subequatoriálního segmentu. Bohužel k zjištění, že tato protilátka detekuje ubiquitin na fixovaných spermích jsme došli až v závěru našich experimentů, proto z časových důvodů neproběhl patřičný počet opakování.

Statistické výsledky detekce síly signálu primární protilátky NBP2 na fixovaných spermích říkají, že je statisticky významný rozdíl jak mezi všemi hodnocenými skupinami, tedy ejakulované spermie, spermie kapacitované v nemodifikovaném médiu, spermie kapacitované s inhibitorem MG-132 a s DMSO, tak i mezi skupinou kapacitovaných v nemodifikovaném médiu a kapacitovaných v modifikovaném médiu s inhibitorem MG-132 ($p > 0,05$). Proto tedy můžeme říct, že proteiny na spermii byly degradovány během kapacitace, a inhibitor proteasomu MG-132 této degradaci zabránil. Z čehož vyplývá, že alespoň většina proteinů spermíí během kapacitace, je degradována za pomoci ubiquitin-proteasomového systému.

Je potřebné zdůraznit, že jak při imunodetekci ubiquitinovaných proteinů, tak při jejich lokalizaci pomocí imunofluorescence, byly prováděny detekce v celkových proteinových extraktech spermíí, respektive na fixovaných buňkách. Vzhledem k tomu, že díky ubiquitin-proteasomovému systému působícímu na povrchové proteiny spermie dochází k remodelaci akrosomu (Kerns et al. 2016), bylo by vhodné se zaměřit na cílenou izolaci pouze povrchových spermíí a inkubaci spermíí s protilátkou v suspenzi a následnou detekci ubiquitinovaných proteinů.

7 Závěr

Pro tuto práci se vycházelo z teoretického předpokladu, že spermie během kapacitace prochází mnoha změnami. Jednou z nejdůležitějších změn je degradace povrchových proteinů navázaných na hlavičce spermie, která může být zprostředkována ubiquitin-proteasomovým systémem. Tato hypotéza byla testována za pomoci inhibitoru proteasomu MG-132 v kapacitačním médiu během *in vitro* kapacitace kančích spermií a následnou detekcí ubiquitinových proteinů.

Získané výsledky podpořily zmíněnou hypotézu. Bylo detekováno 7 proteinů při extrakci spermií o odhadovaných molekulových hmotnostech ≥ 250 kDa, 120 kDa, 67 kDa, 58 kDa, 46 kDa, 33 kDa a 27 kDa. Byl pozorován rozdíl mezi mono-/poly-ubiquitinací proteinů na spermiích, které byly kapacitovány v nemodifikovaném médiu a mono-/poly-ubiquitinací proteinů na spermiích, které byly kapacitovány v modifikovaném médiu s inhibitorem proteasomu MG-132. Celková mono-/poly-ubiquitinace na proteinech spermií kapacitovaných s inhibitorem MG-132 vykazovala vyšší hodnoty a s nimi statisticky významný rozdíl oproti mono-/poly-ubiquitinaci na proteinech spermií kapacitovaných bez inhibitoru.

Dále byly tytéž proteiny hodnoceny v rámci časových intervalů odběrů během kapacitace po 30, 60 a 90 minutách. Byl pozorován rozdíl mezi mono-/poly-ubiquitinací proteinů na spermiích, které byly kapacitovány v nemodifikovaném médiu a mono-/poly-ubiquitinací proteinů na spermiích, které byly kapacitovány v modifikovaném médiu s inhibitorem proteasomu MG-132. U proteinů 2-7 byla pozorována časová závislost na postupné degradaci těchto proteinů během kapacitace. U proteinu číslo 2 nebyla detekována významná inhibice proteasomu za pomoci inhibitoru MG-132. U ostatních proteinů byl pozorován rozdíl v míře polyubiquitinace, kde hodnoty kapacitovaných spermií v modifikovaném médiu s MG-132 byly vyšší než u spermií kapacitovaných v nemodifikovaném médiu.

Hypotézu potvrdily i lokalizace ubiquitovaných proteinů ve spermiích za pomoci nepřímé imunofluorescenční mikroskopie. Protilátka NBP2 lokalizovala ubiquitované proteiny převážně v subekvatoriálním segmentu kančích spermií. Opět byla hodnocena míra mono-/poly-ubiquitinací proteinů na spermiích, které byly ejakulované, kapacitovány v nemodifikovaném médiu a mono-/poly-ubiquitinací proteinů na spermiích, které byly

kapacitovány v modifikovaném médiu s inhibítozem proteasomu MG-132, která byla značena primární polyklonální protilátkou NBP2. Byl pozorován rozdíl v míře intenzity imunofluorescence mono-/poly-ubiquitinace, kdy na spermích kapacitovaných v nemodifikovaném médiu byla intenzita fluorescenčního signálu nižší než u ejakulovaných spermí. V porovnání mono-/poly-ubiquitinace na spermích kapacitovaných v nemodifikovaném médiu a modifikovaném s inhibítozem MG-132, byla detekována vyšší intenzita při inhibítozu MG-132. Byla vyzkoušena monoklonální protilátka FK2 (mono- and polyubiquitinated conjugates, mAb FK2), kde nebyl detekován pozitivní výsledek a stejně tak byla bez výsledku imunofluorescence s polyklonální primární protilátkou od firmy Abcam (Anti-Ubiquitin antibody ab7780; Abcam).

Vzhledem k výsledkům z imunofluorescenční mikroskopie by bylo dobré využít polyklonální protilátku NBP2 pro detekci mono-/poly-ubiquitinace i na detekci proteinů z extraktů spermí. Stejně tak by bylo vhodné navrhnout pokus, kde by došlo k odlišení mono-ubiquitinace a poly-ubiquitinace, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků. Jelikož detekce proteinů z extrakce spermí zahrnuje proteiny jako povrchové tak uvnitř buňky, je potřeba prozkoumat možnosti detekce pouze proteinů povrchových a porovnat molekulární váhy bez polyubiquitinace a s polyubiquitinací, jelikož navázání různých ubiquitinových jednotek ovlivňuje molekulární váhy detekovaných proteinů.

8 Zdroje

- Abou A, Tulsiani DR. 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **485**:72-81.
- Adams J. 2002. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist*. **7**:9-16.
- Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Biological sciences*. **4**:581-596.
- Barros C, Jedlicki A, Fuenzalida I, Herrera E, Arguello B, Vigil P, Leontic E. 1988. Human sperm–cervical mucus interaction and the ability of spermatozoa to fuse with zona-free hamster oocytes. *Journal of reproduction and fertility*. **82**:477-484.
- Baska KM, Sutovsky P. 2005. Protein modification by ubiquitination and its consequences for spermatogenesis, sperm maturation, fertilization and pre-implantation embryonic development. Kerala: Research Singpost. 83-114.
- Blanco TM, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA. 2008. Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. *Reproduction in Domestic Animals*. **4**:18-31.
- Bonuccelli G, Sotgia F, Schubert W, Park DS, Frank PG, Woodman SE, Insabato L, Cammer M, Minetti C, Lisanti MP. 2003. Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins. *The American Journal of Pathology*. **163**:1663-75.
- Braun RE. 2001. Packaging paternal chromosomes with protamine. *National Genet*. **28**:10–12.
- Collins GA, Goldberg AL. 2017. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell*. **169**:792-806.
- Coy P, García-Vázquez F A, Visconti P E, Avilés M. 2012. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction*. **144**:649-660.
- Dacheux JL, Gatti JL, Dacheux F. 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation, *Microscopy Research. Technique*. **61**:7-17.
- Dandekar S P, Harikumar P. 1997. Seminal profiles of lysosomal enzymes in normal and infertile men . *Journal of Postgraduate Medicine*. **43**:33-37.
- Data sheet MG-132, ≥95% by HPLC - CAS 133407-82-6 – Calbiochem. Available from: <http://www.merckmillipore.com> (accessed January 2019).

- De Andrade JP, Lorenzen AW, Wu VT, Bogachek MV, Park JM, Gu VW, Sevenich CM, Cassady VC, Beck AC, Kulak MV, Robinson RA, Lal G, Weigel RJ. 2017. Targeting the SUMO pathway as a novel treatment for anaplastic thyroid cancer. *Oncotarget*. **70**:114801-114815.
- Ekhlasi-Hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsoleva M, Petrunina A, Töpfer-Petersen E. 2005. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biology of Reproduction*. **73**:536–545
- Ekhlasi-Hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsoleva M, Petrunina A, Töpfer-Petersen E. 2005. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biology of Reproduction*. **73**:536-545.
- 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*. **7**: 787–792.
- Franca GR, Avelar FF, Almeida FL. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*. **15**;63: 300-318.
- Frenette G, Lessard C, Sullivan R. 2002. Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biology of Reproduction*. **67**:308-13.
- Fritz H, Tschesche H, Fink E .1976. Proteinase inhibitors from boar seminal plasma. *Methods Enzymol*. **45**:834–847.
- Gadella BM. 2014. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology*. **81**: 74-84.
- Gadella BM. 2017. Reproductive tract modifications of the boar sperm surface. *Theriogenology*. **84**: 822-831.
- Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Metayer S, Dacheux JL. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal. Reproduction Science*. **82–83**: 321–339.
- Gatti JL, Druart X, Guérin Y, Dacheux F, Dacheux JL. 1999. A 105-to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting

enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE, *Biology of Reproduction* **60**:937-45.

- Haase B, Schlötterer C, Hundrieser ME, Kuiper H, Distl O, Töpfer-Petersen E, Leeb T. 2005. Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene*. **352**:20-9.
- Hay RT. 2005. SUMO: a history of modification. *Molecular Cell*. **18**:1-12.
- Hicke L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Molecular Cell Biology*. **50**:195-201.
- Hirai M, Boersma A, Hoeflich A, Wolf E, Foll J, Aumuller R, Braun J. 2001. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): Relation to fertility and seminal plasma growth factors. *Journal of andrology*. **22**: 104-110
- Hunter RHF. 1996. Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilisation to avoid polyspermy. *Molecular reproduction and development*. **44**:417-422.
- Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. **168**:697-698.
- Johnson M. 2012. Proteasome Inhibitors. *Synatom Research*. **2**:133.
- Jonáková V, Kraus M, Veselský L, Cechová D, Bezouska K, Tichá M. 1998. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility*. **114**:25-34.
- Kerns K, Morales P, Sutovsky P. Regulation of Sperm Capacitation by the 26S Proteasome: An Emerging New Paradigm in Spermatology. *Biology of Reproduction*. **94**: 1-9.
- Khare S, Nagle AS, Biggart A, Lai YH, Liang F, Davis L C, Barnes SW, Mathison CJ, Myburg E, Gao MY, Gillespie JR, Liu X, Tan JL, Stinson M, Rivera IC, Ballard J, Yeh V, Groessl T, Federe G, Koh HX, Venable JD, Bursulaya B, Shapiro M, Mishra PK, Spraggon G, Brock A, Mottram JC, Buckner F S, Rao SP, Wen BG, Walker JR, Tuntland T, Molteni V, Glynn RJ, Supek F. 2016. Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. *Nature*. **8**; **537**:229-233.

- Kwon W-S, Rahman MS, Lee J-S, Kim J, Yoon S-J, Park Y-J, You Y-A, Hwang S, Myung-Geol. 2014. A comprehensive proteomic approach to identifying capacitation related proteins in boar spermatozoa. *Genomics*. **15**:897.
- Leestemaker Y, Ovaas H. 2017. Tools to investigate the ubiquitin proteasome system. *Drug Discovery Today Technologies*. **26**:25-31.
- Meyers SA, Rosenberger AE. 1975. Cell-to-Cell Binding Induced by Different Lectins. *Journal of cell biology*. **65**:247-257.
- Miles EL, O'Gorman C, Zhao J, Samuel M, Walters E, Yi YJ, Sutovsky M, Prather RS, Wells KD, Sutovsky P. 2013. Transgenic pig carrying green fluorescent proteasomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **110**:6334-6339.
- Mountjoy JR, Xu W, McLeod D, Hyndman D, Oko R. 2008. RAB2A: a major subacrosomal protein of bovine spermatozoa implicated in acrosomal biogenesis. *Biology of Reproduction* **79**: 223-232.
- Nakamura N. 2013. Ubiquitination Regulates the Morphogenesis and Function of Sperm Organelles. *Cells*. **2**:732-750.
- Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. 2006. The ubiquitin proteasome system. *Journal of Biosciences*. **31**:137–155.
- Pereira-Leal JB, Seabra MC. 2001. Evolution of the Rab Family of Small GTP-binding Proteins. *Molecular Biology*. **313**: 889-901.
- Petrunkina AM, Gehlhaar R, Drommer W, Waberski D, Töpfer-Petersen E. 2001. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Reproduction*. **121**:889-96.
- Reece W. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Grada.
- Rodriguez-Martinez H, Iborra H, Martínez P, Calvete JJ. 1998. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. *Reproduction Fertility and Development* **10**:491-497.
- Saitoh Y, Sawada H, Yokosawa H. 1993. High molecular weight protease complexes (proteasomes) of sperm of the ascidian, *Halocynthia roretzi*: isolation, characterization, and physiological roles in fertilization. *Developmental Biology*. **158**: 238-244.
- Sakai, MT, Sawada, H. 2004. Non-traditional roles of ubiquitin-proteasome system in fertilization and gametogenesis. *Cell Biol.*, **36**:776-784.

- Sanz L, Calvete JJ, Mann K, Schäfer W, Schmid ER, Amselgruber W, Sinowatz F, Ehrhard M, Töpfer-Petersen E. 1992. The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. *Febs Lett.* **300**: 213-218.
- Sanz L, Calvete JJ, Mann K, Schäfer W. 1992. The complete primary structure of the boar spermadhesin AQN-1, a carbohydrate-binding protein involved in fertilization. *Eur J Biochem.* **205**:645-652.
- Smith DM, Chang SC, Park S, Finley D, Cheng Y, Goldberg AL. 2007. Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Molecular Cell.* **27**:731-44.
- Stenmark H, Olkkonen V M. 2001. The Rab GTPase family. *Genome Biol.* **5**
- Suarez S. 2002. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reproduction in Domestic Animals.* **37**:140-143.
- Sullivan R, Saez F. 2013. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction.* **146**:21-35.
- Sutovsky P, 2009. Sperm-egg adhesion and fusion in mammals. *Expert rev. Mol. Med.* **11**:1-11.
- Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE, Schatten GA. 2001. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J Cell Sci.* **114**:1665-1675.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. 2000. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biological Reproduction.* **63**:582-590.
- Sutovsky P. 2003. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone. *Microscopy Research Technique.* **61**:88-102.
- Teicher BA, Tomaszewski JE. 2015. Proteasome inhibitors. *Biochemical Pharmacology.* **96**:1-9.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostálová Z, Sanz L, Calvet, J J. 1998. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia.* **30**:217-24.

- Töpfer-Petersen E, Wagner A, Friedrich J, Petrunkina A, Ekhlasi-Hundrieser M, Waberski D, Drommer W. 2002. Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 292: 210-215
- Tulsiani DR, Zeng HT, Abou-Haila A. 2007. Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signalling pathways. *Society of Reproduction and Fertility supplement*. **63**:257-272.
- Tulsiani DR. 1999. A plasma membrane-associated hyaluronidase is localized to the posterior acrosomal region of stallion sperm and is associated with spermatozoal function. *Biology of Reproduction*. **61**:444-451.
- Yanagimachi R. 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*. **2**:371-372.
- Yi Y-J, Manandhar G, Sutovsky M, Jonáková V, Park C-S, Sutovský P. 2010. Inhibition of 19S proteasomal regulatory complex subunit PSMD8 increases polyspermy during porcine fertilization in vitro. *Journal of Reproductive Immunology*. **84**: 154-163.
- Yoshimoto H, Takeo T, Nakagata N. 2017. Dimethyl sulfoxide and quercetin prolong the survival, motility, and fertility of cold-stored mouse sperm for 10 days. *Biology of Reproduction*. **2**: 195-201.
- Zeng HT, 2003. Calmodulin antagonists differentially affect capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation of mouse sperm components. *Journal of cell science*. **116**:1981-1989.
- Zigo M, Jonakova V, Manaskova-Postlerova P, Kerns K, Sutovsky P. 2019. Ubiquitin-proteasome system participates in the de-aggregation of spermadhesin and DQH protein during boar sperm capacitation. *Reproduction*. **157**:283-295.
- Zigo M, Kerns K, Sutovsky M, Sutovsky P. 2018. Modifications of the 26S proteasome during boar sperm capacitation. *Cell Tissue*. **372**:591-601.

Zdroje obrázků:

- Obr.1: Gadella B, Tsai J p-S, Boerke A, Brewis A I. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. The International journal of Developmental Biology. **52**:473-478.
- Obr.2: Bharat, S. 2016. Proteosomes inhibitor. Pharmacology GMC Haldwani.
- Obr.3: MG-132, $\geq 95\%$ by HPLC - CAS 133407-82-6. Available from: <http://www.merckmillipore.com> (accessed January 2019).