

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra veterinárních disciplín



**Fixační metody pro sledování fosforylovaných proteinů
v kančích spermích pomocí imunofluorescenční
mikroskopie**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Petra Černá

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

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

Konzultant: Ing. Ondřej Šimoník, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci „**Fixační metody pro sledování fosforylovaných proteinů v kančích spermích pomocí imunofluorescenční mikroskopie**“ 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: 9.4. 2019

Bc. Petra Černá

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucí mé práce RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce, poskytnutí materiálů, cenných rad a za její trpělivost. Také bych chtěla poděkovat svému konzultantovi Ing. Ondřeji Šimoníkovi, Ph.D. za pomoc se statistickým zpracováním výsledků. Zvláštní poděkování patří mé rodině a příteli za podporu při studiu a psaní této práce. Nakonec bych chtěla poděkovat mým kolegům za motivaci a užitečné rady.

Fixační metody pro sledování fosforylovaných proteinů v kančích spermiích pomocí imunofluorescenční mikroskopie

SOUHRN

K získání schopnosti fertilizace kančích spermií je nezbytné, aby podstoupily kapacitaci a s ní spojené biochemické a biofyzikální změny na plazmatické membráně a uvnitř spermie. Kapacitace představuje konečné maturační kroky, které činí savčí spermie kompetentní k oplodnění oocyty, buď *in vivo* nebo *in vitro*. Umožňuje spermiím vázat se na oocyt a podstoupit akrosomální reakci v reakci na *zona pellucida*. Mezi další biochemické dráhy spojené s kapacitací patří hyperaktivace a tyrosinová fosforylace, která je stěžejní událostí v kapacitaci, ačkoli nejsou zcela známy její molekulární mechanismy. Fosforylace proteinů hraje důležitou roli v regulaci mnoha buněčných aktivit. Tyrosinová fosforylace je jeden z nejvyužívanějších a nejlepších markerů kapacitace.

Cílem práce byla optimalizace metody fixace pro imunofluorescenční mikroskopii pro sledování změn ve vzorech fosforylovaných proteinů v kančích spermiích před a po proběhlé *in vitro* kapacitaci. Cíl této práce vychází z hypotézy, že budou detekovány rozdíly ve vzorech tyrosinové (P-Tyr) a serinové (P-Ser) fosforylace v ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermiích za použití různých fixací.

V této diplomové práci byla detekována P-Tyr a P-Ser pomocí specifických protilátek. Pro detekci fosforylace proteinů ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií byly provedeny odlišné typy fixace za použití různých chemikálií. Fixace je jedním z nejdůležitějších kroků při imunoznačení proteinů. V této diplomové práci byly detekovány dvě skupiny fosforylačních vzorů, a to nekapacitované spermie (fosforylace v subekvatoriálním segmentu) a kapacitované spermie (fosforylace v subekvatoriálním segmentu a akrosomu). Dle našich výsledků jsme došli k závěru, že u všech provedených fixací nelze s jistotou tvrdit, že fosforylace detekovaná v akrosomu, je markerem kapacitace. U všech fixací byl u *in vitro* kapacitovaných spermií převažující vzor fosforylace v akrosomu, ale u ejakulovaných spermií byly četnosti fosforylačních vzorů vyrovnané, nebo také s převahou fosforylace v akrosomu. Pouze fixace formaldehydem ukázala jasnou rozdílnost ve fosforylačních vzorech mezi ejakulovanými a *in vitro* kapacitovanými spermiemi. Z našich výsledků tedy vyplývá, že nejlepší fixační systém pro detekci kapacitace dle

fosforylačních vzorů, je fixace formaldehydem. Úplně nejlépe vyšla fixace s 2% formaldehydem ve vodě s BSA.

Z našich výsledků také vyplývá, že díky velké různorodosti fosforylačních vzorů v rámci různých fixací, nelze usoudit, který fosforylační vzor je markerem kapacity u P-Ser. U všech fixací byla viditelně detekována zvýšená fosforylace proteinů u *in vitro* kapacitovaných spermíí. A pro kančí spermie je typická serinová fosforylace zvláště v bičíku.

Navíc byly detekovány proteiny v extraktech z ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermíí, které byly fosforylovány na tyrosinu a serinu. U kapacitovaných spermíí docházelo k silnějšímu signálu proteinových proužků, což dokládá zvýšení tyrosinové i serinové fosforylace na některých proteinech při kapacitaci spermíí.

Z celkových výsledků je patrné, že jsou přítomny rozdíly ve vzorech tyrosinové a serinové fosforylace kančích ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermíí. Ejakulované spermie vykazovaly signifikantní rozdíl v tyrosinové fosforylaci subekvatoriálního segmentu a akrosomu od *in vitro* kapacitovaných spermíí. Ve všech experimentech byl pozorován zvyšující se trend fosforylace proteinů během *in vitro* kapacity.

Klíčová slova: kančí spermie, fosfotyrosin, fosfoserin, kapacitace

Fixation methods for monitoring of phosphorylated proteins in boar spermatozoa using immunofluorescent microscopy

SUMMARY

In order to be fertile it is necessary for boar spermatozoa to undergo capacitation and related biochemical and biophysical changes in plasma membrane and inside of spermatozoa. Capacitation represents the final maturation steps that render mammalian spermatozoa competent to fertilize, either *in vivo* or *in vitro*. Capacitation enables sperm to bind the oocyte and undergo the acrosome reaction in response to the *zona pellucida*. Other biochemical pathways associated with capacitation include hyperactivation motility and tyrosine phosphorylation, which is crucial event in capacitation, although the molecular mechanisms involved are not fully understood. Protein phosphorylation plays an important role in regulating numerous cellular activities. Tyrosine phosphorylation is one of the most used and best marker of capacitation.

The aim of this thesis was to optimize the method of fixation for immunofluorescence microscopy to monitor the changes in patterns of phosphorylated proteins in boar spermatozoa before and after *in vitro* capacitation. The aim of this thesis is based on the hypothesis that differences in tyrosine (P-Tyr) and serine (P-Ser) phosphorylation patterns will be detected in ejaculated and *in vitro* capacitated spermatozoa using various fixations.

In this Diploma thesis P-Tyr and P-Ser were detected using specific antibodies. Different types of fixation were performed using various chemicals to detect tyrosine phosphorylation of both ejaculated and *in vitro* capacitated sperm proteins. Fixation is one of the most important steps in protein immunostaining. In this Diploma thesis two groups of phosphorylation patterns were detected, namely non-capacitated spermatozoa (phosphorylation in the subequatorial segment) and capacitated spermatozoa (phosphorylation in the subequatorial segment and acrosome). According to our results, we conclude that for all performed fixations it cannot be assured with certainty that phosphorylation detected in acrosome is a marker of capacitation. In all fixations, the pattern of acrosome phosphorylation was the predominant pattern of *in vitro* capacitated spermatozoa, but in ejaculated spermatozoa, the phosphorylation pattern rates were balanced, or even with acrosome phosphorylation. Only formaldehyde fixation showed clear differences in phosphorylation patterns

between ejaculated and *in vitro* capacitated spermatozoa. Therefore, our results show that the best fixation system for capacitation detection by phosphorylation patterns is formaldehyde fixation. Fixation with 2% formaldehyde in water with BSA was best.

Our results show that due to the wide variety of phosphorylation patterns in different fixations, it cannot conclude which phosphorylation pattern is a marker of P-Ser capacitation. In all fixations, increased protein phosphorylation was visibly detected in *in vitro* capacitated spermatozoa. And for boar spermatozoa, serine phosphorylation is typical, especially in flagella.

In addition, proteins were detected in extracts from ejaculated and *in vitro* capacitated spermatozoa that were phosphorylated on tyrosine and serine. In the case of capacitated spermatozoa, there was a stronger signal of the protein bands, demonstrating an increase in both tyrosine and serine phosphorylation on some proteins in the sperm capacitation.

The overall results show that there are differences in the patterns of tyrosine and serine phosphorylation of boar ejaculated and *in vitro* capacitated spermatozoa. Ejaculated sperms showed a significant difference in tyrosine phosphorylation of the subequatorial segment and acrosome from *in vitro* capacitated spermatozoa. In all experiments, an increasing trend of protein phosphorylation during *in vitro* capacitation was observed.

KEYWORDS: boar spermatozoa, phosphotyrosine, phosphoserine, capacitation

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZA	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	SAMČÍ POHLAVNÍ SOUSTAVA.....	3
3.1.1	Stavba varlete.....	3
3.2	GAMETOGENEZE	4
3.2.1	Vývoj spermie.....	4
3.3	STAVBA SPERMIE	8
3.3.1	Obecná stavba spermie	8
3.3.2	Hlavička spermie	9
3.3.3	Bičík spermie	10
3.4	MATURACE SPERMÍÍ.....	11
3.4.1	Epididymální maturace spermíí.....	11
3.4.2	Kapacitace spermíí.....	13
3.4.3	Hyperaktivace motility spermíí	14
3.5	PRŮBĚH A MECHANISMY FERTILIZACE	15
3.5.1	Interakce spermie se <i>Zona pellucida</i> a akrosomální reakce	16
3.5.2	Průnik spermie do oocytu	16
3.6	POSTTRANSLAČNÍ MODIFIKACE.....	18
3.7	FOSFORYLACE PROTEINŮ	18
3.7.1	Kinázy	20
3.7.2	Fosfatázy	22
3.8	FOSFORYLACE VE SPERMÍÍCH	22

3.8.1	Fosforylace během spermatogeneze	22
3.8.2	Fosforylace během maturace a kapacity.....	23
3.8.3	Fosforylace během fertilizace	24
3.8.4	Fosforylace na tyrosinu.....	25
3.8.5	Fosforylace na serinu a treoninu	27
3.8.6	Detekce fosforylace u spermií různých savčích druhů	28
3.9	METODY FIXACE SPERMIÍ	33
4	MATERIÁLY A METODIKA	34
4.1	ZPRACOVÁNÍ EJAKULOVANÝCH SPERMIÍ	34
4.2	KONCENTRACE SPERMIÍ	34
4.3	KAPACITY KANČÍCH SPERMIÍ.....	35
4.4	FIXACE SPERMIÍ.....	36
4.4.1	Fixace 2% formaldehydem ve vodě s BSA (dle Tardif et al., 2001).....	37
4.4.2	Fixace 2% formaldehydem ve vodě (suspenze)	37
4.4.3	Fixace formaldehydem na skle	37
4.4.4	Vlhká fixace	38
4.4.5	Zasušeni spermií s následnou fixací	38
4.5	NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE – DETEKCE FOSFOROVANÝCH PROTEINŮ.....	39
4.5.1	Detekce proteinů pomocí protilátky proti fosfotyrosinu a fosfoserinu.....	39
4.6	SDS ELEKTROFORÉZA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU (SDS-PAGE).....	40
4.7	WESTERN BLOT (ELEKTROPŘENOS)	42
4.8	IMUNODETEKCE POMOCÍ PROTILÁTKY PROTI FOSFOTYROSINU A FOSFOSERINU.....	42
4.9	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	43
5	VÝSLEDKY	44

5.1	DETEKCE FOSFORYLOVANÝCH PROTEINŮ	44
5.1.1	Detekce fosforylovaných proteinů pomocí protilátky proti fosfotyrosinu	44
5.1.2	Detekce fosforylovaných proteinů pomocí protilátky proti fosfoserinu.....	81
5.2	DETEKCE FOSFORYLOVANÝCH PROTEINŮ V EXTRAKTECH ZE SPERMÍÍ	100
6	DISKUZE	103
7	ZÁVĚR	113
8	SEZNAM LITERATURY	115
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	124

1 ÚVOD

Savčí spermie opouštějící semenotvorné kanálky nejsou způsobilé k oplodnění oocyty, proto musí podstoupit maturační procesy v epididymu. Tyto procesy zajišťují komplexní biochemické a fyziologické změny ve spermiích, díky kterým se spermie stanou zralými. Po ejakulaci musí prodělat další řadu změn, aby získaly schopnost navázat se na oocyt. Tyto změny jsou regulovány aktivací intracelulárních signalizačních drah, které řídí fosforylaci spermií. Je dobře známo, že fosforylace/defosforylace je jednou z nejčastějších postranslačních modifikací v eukaryotických buňkách a reguluje aktivitu protein-protein. V eukaryotických buňkách se většina fosforylací vyskytuje na serinových nebo treoninových zbytcích a v menším rozsahu také na tyrosinových a histidinových zbytcích. Konkrétně ve spermii dochází k fosforylaci na kyslíku tří aminokyselin, a to na serinu, treoninu a tyrosinu. Pouze tyrosinová fosforylace je považována za primární nebo dokonce výlučný indikátor signálních drah. Zvýšená tyrosinová fosforylace proteinů hraje důležitou roli v kapacitaci spermií, v hyperaktivní motilitě, interakci se *zona pellucida*, akrosomální reakci a membránové fúzi.

Kapacitaci lze definovat jako sérii událostí, které umožňují vazbu spermie na *zona pellucida* oocyty a provést akrosomální reakci. Při kapacitaci kančích spermií prochází spermatická membrána četnými modifikacemi, včetně strukturálních změn organizace proteinů-lipidů, zvýšení hyperpolarizace, koncentrace intracelulárních volných vápenatých iontů a dochází k odstranění cholesterolu z povrchové membrány, což vede ke zvýšení její fluidity.

Během kapacitace se zvyšuje koncentrace intracelulárního hydrogenuhličitanu a aktivita adenylyl cyklázy, čímž se zvyšuje i koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu cAMP, který aktivuje proteinkinázu A (PKA). Nárůst cAMP stimuluje cAMP dependentní protein kinázy, které následně fosforylují proteiny na tyrosinových zbytcích.

Tyrosinová fosforylace spermatických proteinů byla u savců detekována v akrosomální oblasti, v ekvatoriálním segmentu a v bičíku. V bičíku je spojena s hyperaktivním pohybem, ke kterému dochází v průběhu kapacitace, zatímco v ekvatoriálním segmentu je součástí organizačního centra multimolekulárních komplexů, které zprostředkovávají fúzi vedoucí k akrosomální reakci.

2 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZA

Cílem práce je optimalizace metody fixace pro imunofluorescenční mikroskopii pro sledování změn ve vzorech fosforylovaných proteinů v kančích spermích před a po proběhlé *in vitro* kapacitaci.

Cíl této práce vychází z hypotézy, že budou detekovány rozdíly ve vzorech tyrosinové a serinové fosforylace v ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermích za použití různých fixačních metod.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 SAMČÍ POHLAVNÍ SOUSTAVA

Reprodukční funkce samců zahrnuje tvorbu spermií a jejich transport do samičích pohlavních orgánů (Reece 2009). Základem samčích pohlavních orgánů je párová pohlavní žláza – varle. Pohlavní cesty, které pokračují za varlaty, pak z pohlavních žláz odvádějí zralé pohlavní buňky – spermie. Samčí pohlavní orgány se dělí na vnitřní a vnější (Weiss 2010). Za zevní pohlavní orgány se obecně označují zevně patrné útvary reprodukčního systému, které se vyvíjejí z jednotného indiferentního základu. K zevním pohlavním orgánům se řadí penis a šourek. Pro pohlavní žlázy a pohlavní cesty se využívá souhrnné označení jako vnitřní pohlavní orgány. Existuje ještě jiné rozdělení samčího pohlavního traktu. Orgány se dělí na primární a sekundární. Jako primární orgány jsou označena varlata a k sekundárním pohlavním orgánům patří párová nadvarlata a chámovody, přídatné pohlavní žlázy a penis (Weiss 2010; Jones & Lopez 2013).

3.1.1 STAVBA VARLETE

Samčí gonády jsou párové orgány, které jsou uloženy v šourku (*scrotum*). Úkolem párových varlat je tvorba spermií. Existují mezidruhové rozdíly ve tvaru, velikosti a umístění varlat, ovšem jejich struktura je velmi podobná (Reece 2009). Poloha v šourku a orientace podélné osy varlat se liší mezi jednotlivými druhy (Hafez & Hafez 2000).

Na vnější straně každého z varlat se nachází lesklý serózní obal *tunica vaginalis*, který má za úkol ochranu varlat. Varlata jsou ihned pod *tunicou vaginalis* obklopena tuhým a tenkým vazivovým obalem, který se nazývá bělavá blána *tunica albiginea*. Tato blána je dvouvrstevná a přirostlá k prvnímu vnějšímu obalu. Z bělavé blány vycházejí do nitra parenchymu varlete *septa trabeculae* neboli vazivové přepážky *septula testis*. Vazivové přepážky poté rozdělují varle na menší lalůčky, které se nazývají *lobuli testis* (Weiss 2010; Carlson 2013). Obecně se uvádí, že se ve varleti vyskytuje 200 – 300 lalůček, ovšem Jones & Lopez (2013) uvádějí přesný počet 250. Jednotlivé lalůčky se skládají z jednoho až tří vysoce svinutých semenotvorných kanálků *tubuli seminiferi contorti*, které se sbíhají na hrotu lalůčku do jednoho kanálku *tubulus seminifer rectus*. Spermie jsou produkovány právě v semenotvorných kanálcích, které jsou hlavní a největší součástí parenchymu varlat. Výstelku semenotvorných kanálků tvoří zárodečný epitel, který obsahuje samčí zárodečné buňky v různých stupních diference (Weiss 2010; Carlson 2013; Jones & Lopez

2013). Mimo různá vývojová stádia spermií jsou ve varleti další dva důležité typy buněk, a to Sertoliho buňky (podpůrné) a Leydigovy buňky (intersticiální) (Reece 2009).

Sertoliho buňky jsou buňky pyramidového tvaru ležící v semenotvorném epitelu, pracující pod kontrolou FSH. Poskytují ochranu a výživu vyvíjejícím se spermiím. Další funkcí Sertoliho buněk je fagocytóza zbytků degenerovaných zárodečných buněk a sekrece proteinu vázajícího androgen, inhibinu a anti – Mülleriánského hormonu. V jejich výběžcích probíhá spermiogeneze. Sertoliho buňky jsou spojeny těsným mezibuněčným kontaktem, který tvoří bariéru mezi vyvíjejícími se buňkami a intersticiálním prostorem varlete. Intersticiální část varlete obsahuje cévy, nervy, řídké vazivo a Leydigovy buňky, které produkují testosteron pod kontrolou hypofyzárního luteinizačního hormonu (Reece 2009; Weiss 2010; Jones & Lopez 2013).

3.2 GAMETOGENEZE

Gametogeneze představuje specializovanou a vysoce regulovanou sérii událostí buněčného cyklu zahrnující jak mitózu, tak meiózu a následnou diferenciaci gamet (Wolgemut et al. 1995). Gamety vznikají redukčním dělením, meiózou, ve varlatech (*testes*) samců. Zralé gamety obsahují poloviční, tedy haploidní počet chromozomů, čímž se liší od somatických buněk, které jsou diploidní. Haploidita je nepostradatelná při fertilizaci, kdy musí vzniknout vždy diploidní zygota (Moore & Persaund 2008).

Gametogeneze zahrnuje vysoce zorganizovanou sérii mitotických proliferací, meiotických rekombinací, následovanou redukčními děleními za vzniku vysoce specializovaných zárodečných buněk (Eddy et al. 1993; Wolgemut et al. 1995).

3.2.1 VÝVOJ SPERMIE

Vývoj spermií probíhá ve stočených semenotvorných kanálcích varlat. Tyto kanálky obsahují komplexní řadu vyvíjejících se zárodečných buněk, které nakonec formují samčí gamety. Spermatogeneze je komplexní proces zahrnující dělení mitotických buněk, redukční dělení, zrání a tvarové přeměny nediferencovaných zárodečných buněk v oplození schopné samčí pohlavní buňky (Weiss 2010). Spermie se začínají vyvíjet v období puberty a tento proces pokračuje po celý život jedince (Carlson 2013). U savců spermatogeneze jsou popsány dvě vývojové fáze,

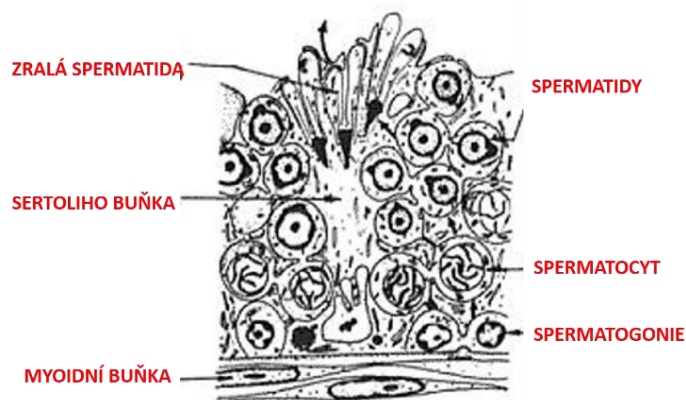
spermatogeneze (spermiocytogeneze) a spermatohistogeneze (spermiogeneze) (Jones & Lopez 2013).

3.2.1.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces, kterým se z buněk s diploidním počtem chromozomů stávají buňky s poloviční chromozomální výbavou (Weiss 2010).

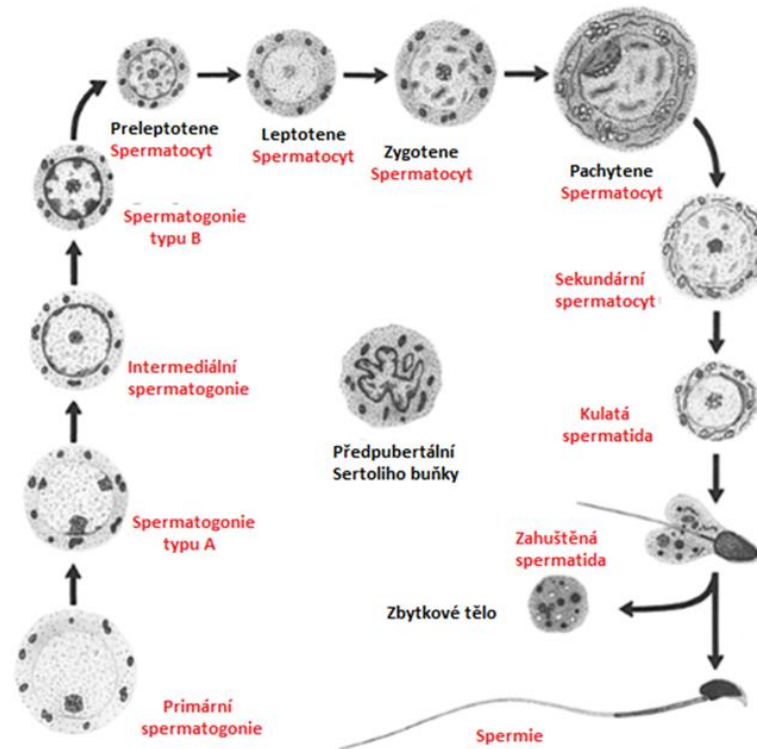
Regulace spermatogeneze zahrnuje jak endokrinní, tak parakrinní mechanismy. V endokrinní regulaci spermatogeneze působí folikuly stimulující hormon (FSH) i luteinizační hormon (LH), který působí prostřednictvím testosteronu produkovaného Leydigovými buňkami. Vzhledem k tomu, že zárodečné buňky neobsahují receptory pro FSH a testosteron, jsou hormonální signály transdukovány prostřednictvím Sertoliho buněk (De Kretser et al. 1998).

První fázi ve vývoji zastávají kmenové buňky, spermatogonie, které jsou uloženy v bazální části semenotvorných kanálků (obr. 1). Tyto buňky se množí mitózou, kdy vzniknou ze spermatogonie dvě buňky. První, která zůstává uložena na původním místě a druhá, která se nazývá spermatogonie typu A. Spermatogonie A poté migruje přes Sertoliho buněčnou bariéru a podléhá opět mitotickému dělení za vzniku spermatogonií typu B. Tyto buňky se naposledy mitoticky dělí a dávají vznik primárním spermatocytům (2n), které jsou oválného tvaru. Tyto buňky podstoupí konečnou replikaci jaderné DNA před svým vstupem do meiotické profáze (obr. 2) (Bellve et al. 1977; Hafez & Hafez, 2000; Rooij 2001; Reece 2009).



Obrázek 1: Spermatogeneze: Na tomto obrázku jsou znázorněna jednotlivá buněčná stadia zárodečných buněk v semenotvorném kanálku varle (převzato a upraveno dle Guraya 1987).

Poslední fází spermatogeneze jsou dvě na sebe navazující meiózy. Primární spermatocyt dokončuje první meiotické redukční dělení, kdy výsledné dceřiné buňky mají již 23 chromozomů. Tyto buňky rychle vstupují do druhého redukčního dělení bez další syntézy DNA za vzniku haploidních spermatid. Vzniklá haploidní buňka se nazývá sekundární spermatocyt. Posléze dochází k přeměně na 4 haploidní spermatidy (Bellve et al. 1977; De Kretser et al. 1998; Carlson 2013; Jones & Lopez 2013).



Obrázek 2: Spermatogeneze: Na tomto obrázku je znázorněn schematický diagram spermatogeneze vykazující charakteristickou morfologii jednotlivých buněčných typů (převzato a upraveno dle Bellve et al. 1977)

3.2.1.2 Spermiohistogeneze

Konečným procesem spermatogeneze je spermiohistogeneze (spermiohistogeneze). Spočívá v komplexní morfologické transformaci haploidních zárodečných buněk, která vrcholí uvolněním pozdních spermatid do lumen semenotvorného epitelu (Bellve et al. 1977). Kruhová spermatida, která vzniká z druhého meiotického dělení, prochází řadou důležitých progresivních

morfologických změn, které ji kolektivně přeměňují na spermie (De Kretser et al. 1998; Hafez & Hafez 2000).

Příběh spermií skutečně začíná na konci meiózy se vznikem spermatid. Jde o vysoce polarizované buňky (Kierszenbaum et al. 2011). Tyto haploidní kulaté buňky mají podobnou stavbu jako jakékoli nediferencované somatické buňky. Časné spermatidy obsahují rudimentální cytoskeleton z mikrotubulů a aktinových vláken (Weber & Russell 1987). Ve spermatidách dojde k několika důležitým procesům, zahrnujícím kondenzaci nukleárního chromatinu, zformování akrosomu a také tvorbu bičíku (Hafez & Hafez 2000). Tyto kroky zajišťují změnu tvaru spermatidy z kruhové na oválnou, která dále podstupuje morfologickým změnám za tvorby spermie (Guraya 1987).

Vývojová stádia transformace spermatidy ve spermii se dělí do čtyř fází, a to na Golgiho fázi, stádium akrosomové čepičky, stádium kaudální manžety a stádium zrání (maturační fáze) (Hafez & Hafez 2000). Golgiho fáze spermiogeneze je charakterizována tvorbou proakrosomálních granul v Golgiho komplexu, které postupně splynou v jediné akrosomální granulum obsažené v akrosomálním váčku. Dochází k adherenci výsledné akrosomální granuly na jadernou membránu. Proximální centriol migruje blíže k jádru, kde tvoří základ pro tvorbu bičíku spermie a slouží jako spojka s hlavičkou. Stádium akrosomové čepičky je charakteristické šířením adherentních akrosomálních granulí na povrch spermatidového jádra. Akrosomová čepička pokrývá apikální povrch jádra a vytváří tím akrosom. Obsah akrosomu tvoří několik hydrolytických enzymů, jako jsou glykosidázy, kyselé fosfatázy a proteázy. Tyto enzymy slouží jako specializovaný typ lysozomu. Předposledním stádiem je stádium kaudální manžety. Toto stádium je charakteristické protahováním a kondenzací jádra díky tzv. manžetě, což je věnec mikrotubulů obklopující jádro. Dochází zde také k výměně histonů za protaminy. Posledním stádiem je stádium zrání, jinak taky nazývané jako maturační stádium. V této fázi dochází ke ztrátě kaudální manžety, dokončování vývoje bičíku a akrosomu. Je zde tvořen mitochondriální oddíl bičíku. Nejpodstatnější funkcí tohoto stádia je odvržení zbylé cytoplazmy a následná fagocytóza Sertoliho buňkami. Tímto zásahem dochází k dehydrataci akrosomu. Následně je zralá spermie uvolněna ze svazku se Sertoliho buňkou a vyplavena do vývodných cest varlete (Hafez & Hafez 2000; Hess & de Franca 2009; Jones & Lopez 2013).

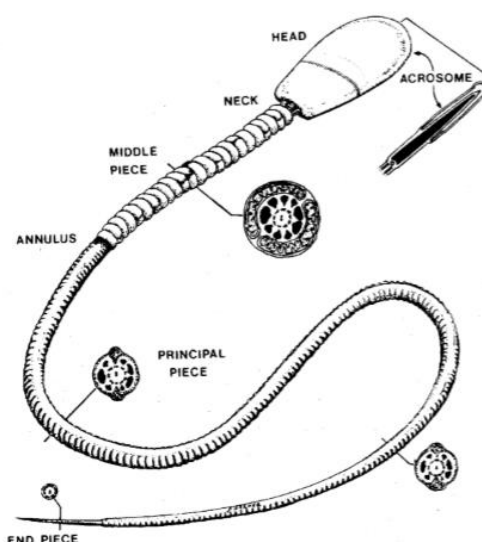
V závislosti na druhu proces diferenciacie spermatidy ve zralou spermii trvá dva až tři týdny. Tato metamorfóza vede k tvorbě vláknitých buněk s malou hlavičkou a dlouhým bičíkem, které jsou uloženy v lumenu semenotvorných kanálků. Při jejich dozrávání dochází k redukci cytoplazmy, která je posléze fagocytována Sertoliho buňkami (Carlson 2013). K dokončení dozrávání spermií dochází v nadvarleti (Fawcett 1975).

3.3 STAVBA SPERMIE

3.3.1 OBECNÁ STAVBA SPERMIE

Plně zformované spermie jsou prodloužené buňky a jsou tvořeny dvěma hlavními komponentami. Tvoří je zploštělá hlavička obsahující jádro, a bičík, který obsahuje aparát nezbytný pro buněčnou motilitu (obr. 3). Velikost a tvar jednotlivých částí spermie se druhově liší (Hafez & Hafez 2000). Ve srovnání s jinými buňkami obsahují spermie jen velmi málo cytoplazmy (Eddy & O'Brien 1994).

Celá spermie je pokryta plazmatickou membránou (Eddy & O'Brien 1994). Akrosom neboli akrosomální čepička je struktura obalená membránou a je umístěna v přední části hlavičky spermie. Krček spermie spojuje hlavičku s bičíkem, který je rozdělen na střední, hlavní a koncovou část (Hafez & Hafez 2000).



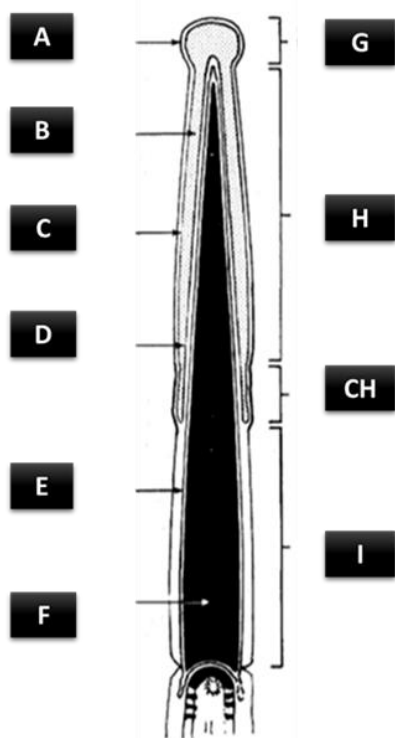
Obrázek 3: Stavba spermie: Na tomto obrázku je znázorněna morfologická stavba spermie. Spermie se skládá ze třech hlavních částí –hlavičky, krčku a bičíku (Hafez, & Hafez 2000).

3.3.2 HLAVIČKA SPERMIE

Hlavička je na hmotu největší část spermie (Toshimori & Ito 2003). Hlavním rysem hlavičky je oválné zploštělé jádro obsahující vysoce kompaktní chromatin. Kondenzovaný chromatin je tvořen deoxyribonukleovou kyselinou (DNA), která je spojena speciálními proteiny, které se nazývají protaminy (Hafez & Hafez 2000). Protaminy jsou malé molekuly obsahující hojné zastoupení aminokyselin argininu a cysteinu (Eddy 2006).

Hlavička je složena z kondenzovaného jádra, obrovského lysozomu (akrosomu) a kompartmentizovaného perinukleárního cytoskeletu (Fouquet & Kann 1994). Součástí hlavičky spermie je také i cytoplazma (Toshimori & Ito 2003).

Hlavička savčí spermie je zcela obklopena plazmatickou membránou a je ohraničena od bičíku charakteristickým prstencem (Toshimori & Ito 2003). Hlavička spermie se skládá ze dvou hlavních oblastí. Tyto dvě části se nazývají akrosomální oblast a postakrosomální oblast (Eddy & O'Brien 1994). Akrosomální oblast je dále rozdělena na dvě části (obr. 4), a to na apikální segment, hlavní segment a ekvatoriální segment. Apikální segment tvoří spolu s hlavním segmentem akrosomovou čepičku (Eddy & O'Brien 1994).



Obrázek 4: Hlavička spermie: Na tomto obrázku je znázorněna sagitální část hlavičky býčí spermie značící různé anatomické podskupiny. Akrosom zahrnuje apikální, hlavní a ekvatoriální segment. Vnější membrány apikálního a hlavního segmentu vytvářejí akrosomální čapku. Je zde i doložen vztah akrosomu s jeho vnější i vnitřní membránou s jadernou a plazmatickou membránou (Zdroj: převzato a upraveno dle Hafez & Hafez 2000).

A – plazmatická membrána; **B** – akrosomální obsah; **C** – vnější akrosomální membrána; **D** – vnitřní akrosomální membrána; **E** – jaderná membrána; **F** – jádro; **G** – apikální segment; **H** – hlavní segment; **CH** – ekvatoriální segment; **I** – postakrosomální úsek hlavičky spermie

Tvorba a organizace hlavičky savčí spermie probíhá prostřednictvím různých buněčných a molekulárních procesů během spermiogeneze (Kierszenbaum et al. 2003). Perinukleární theca, která je umístěna v perinukleární oblasti hlavičky spermie, obsahuje nejen cytoskeletární prvek, který udržuje tvar hlavičky spermie, ale také funkční molekuly vedoucí k aktivaci oocytů během fertilizace (Toshimori & Ito 2003).

3.3.2.1 Akrosom

Akrosom vzniká z Golgiho komplexu během procesu dozrávání spermie ze spermatid. Tato struktura pokrývá přední dvě třetiny hlavičky spermie (40–70 %) ovšem se tato velikost liší dle druhu zvířete (Eddy 2006). Akrosom je tenký dvojitý membránový vak, který je vrstven přes jádro během poslední fáze formování spermií. Je stabilizován akroplaxomem, což je cytoskeletární deska, která je zakotvená v jaderném obalu (Kierszenbaum et al. 2011). Tato struktura podobná čepici, která obsahuje množství hydrolytických enzymů, jako je akrosin, hyaluronidáza a jiné hydrolytické enzymy (Hafez 1976), se podílí na procesu fertilizace (Hafez & Hafez 2000).

Podobně jako jádro, je akrosom překryt dvojitou membránou, která se rozlišuje na vnější a vnitřní membránu. Ekvatoriální segment akrosomu společně se svým subekvatoriálním segmentem je součástí akrosomu spolu s apikální částí postakrosomální oblasti, která v počátku fertilizace splývá s membránou oocytu (Hafez & Hafez 2000).

Subekvatoriální segment (sEqS) má druhově specifickou velikost i tvar (Yanagimachi 1994) a prvně se objeví během pozdní fáze spermiogeneze, kdy se kulatá spermatida transformuje do prodloužené spermie. Topograficky se jeví jako polokruhová oblast uvnitř ekvatoriálního segmentu na spojení s postakrosomem (Jones et al. 2008).

3.3.3 BIČÍK SPERMIE

Eukaryotické bičíky jsou vysoce konzervované a všudypřítomné orgány přítomné u většiny zvířat, které jsou zodpovědné za pohon samčích gamet. Motilita hraje důležitou roli při transportu spermií v silném protiprurudu tekutiny sekretované samičími reprodukčními orgány (Lindemann & Lesich 2016). Bičík spermie se skládá ze čtyř hlavních morfologických segmentů. Tyto segmenty tvoří krček, střední část, hlavní část a koncová část (Millette 1999). Krček spermie slouží jako spojovací oddíl mezi hlavičkou a zbytkem bičíku spermie. Skládá se z proximálního centriolu

a zbytků distálního centriolu (Fouquet & Kann 1994). Toto spojení se jinak nazývá jako posteriorní prsteneček (Eddy & O'Brien 1994). Střední část bičíku je známá tím, že obsahuje vysokou koncentraci mitochondrií obklopených pouzdem. Mitochondrie dodávají energii pro pohyb bičíku ve formě adenosintrifosfátu (ATP). Hlavní oddíl je tvořen nejdelší částí bičíku (Millette 1999).

Savčí spermie má centrálně lokalizované uspořádání 9 + 2 mikrotubulových dubletů a stovky pomocných proteinů, které společně tvoří axonemu. Centrální axonema je viditelná se svými devíti vnějšími dublety obklopujícími pár centrálních mikrotubulů. Každý z vnějších mikrotubulových dubletů nese dvě řady spojů, které se nazývají vnitřní řada a vnější řada dyneinových ramen. Tato ramena se skládají z motorických dyneinů, které přenášejí energii. Dyneinová ramena jsou zdrojem hnací síly, která hýbou s bičíkem (Lindemann & Lesich 2016).

Centrálně umístěná axonema je obklopena dalšími strukturami. Jedná se o devět velkých vláken spárovaných s každým dubletem, které se nazývají jako vnější hustá vlákna a jsou převážně ve střední části bičíku. V hlavní části bičíku se nachází fibrózní pochva (Lindemann & Lesich 2016).

3.4 MATURACE SPERMIÍ

V dalších částech pohlavního ústrojí samce dochází k několika maturačním procesům, jejichž narušení může ovlivnit plodnost. Epididymální maturace, kapacitace a akrosomální reakce navozují celulózní a chromatinové modifikace v zárodečných buňkách pro jejich přeměnu v plně funkční spermie (Cooper 2012).

3.4.1 EPIDIDYMÁLNÍ MATURACE SPERMIÍ

Při dozrávání spermii dochází k souběžným změnám ve struktuře, metabolismu a ve fyziologii spermii (Műjica et al. 2003). Po opuštění varlete se spermie stávají během průchodu epididymem funkčně zralými, s fertilizační schopností za rozpoznání *zona pellucida* (ZP) a pohyblivostí, ačkoli se nepohybují pod vlastní kontrolou. Tento proces je označován jako epididymální maturace (Yoshinaga & Toshimori 2003).

Nadvarle (*epididymis*) patří mezi vývodné reprodukční orgány navazující na varle. Je umístěno podél dorsolaterálního okraje každého z varlat. Funkcí nadvarlete je shromažďování a ukládání spermii do zásoby. V nadvarletí dochází také k dozrávání spermii se získáním schopnosti pohybu a oplození. Nadvarle se skládá ze třech částí – hlava (*caput*), tělo (*corpus*) a ocas (*cauda*). V hlavě

nadvarlete dochází k resorpci tekutiny ze semenotvorných kanálek, což značně zvyšuje koncentraci spermií. *Corpus* je zodpovědné za epididymální maturaci a cauda slouží jako zásobárna spermiím která umožňuje bohaté ejakulace (Reece 2009; Weiss 2010).

Je doloženo, že funkční zrání není vlastní vlastností spermie, ale je způsobeno interakcí spermií s různými androgen-dependentními proteiny, které jsou vylučovány epididymálním epitelem a následně asociovány s povrchem spermií (Brooks et al. 1986).

Změny ve spermii závisí na epididymální sekreci a době transportu, které jsou nezbytné pro oplodnění oocyty. Pro dosažení schopnosti fertilizace a fúzi gamet, spermie projde několika maturačními změnami, které vedou ke kapacitaci a akrosomální reakci (Hafez & Hafez 2000).

Epididymální maturace je doprovázena mnoha změnami v lipidovém a proteinovém složení plazmatické membrány spermií, včetně přidání nových proteinů, odstranění nebo translokace určitých proteinů nebo modifikací struktury proteinu (Cosentino & Cockett 1986; Akbarsha et al. 2015).

Během epididymální maturace mnoho složek v akrosomu i nadále podstupuje biochemické nebo imunocytochemické modifikace. U většiny druhů jsou spermie zcela zralé, když dosáhnou distálního konce epididymu (Yoshinaga & Toshimori 2003).

Jde o maturační proces, ve kterém epididymální spermie dosáhnou progresivní motility pomocí změn v metabolickém aparátu a strukturního stavu specifických organel bičíku. Rychlý progresivní pohyb se nejprve objevuje v těle (*corpus*) nadvarlete a stane se převládajícím typem pohybu spermií od ocasu (*cauda*) nadvarlete do chámovodu (*vas deferens*) (Hafez & Hafez 2000; Cooper 2012).

Průchod epididymem je spojen s významnými změnami v chromatinu spermatického jádra. Tento komplex DNA s proteiny, který byl dosud považován za relativně inertní, prochází dalším zhutněním (kondenzací). Taktéž dochází ke změně v povaze povrchu plazmatické membrány, zvláště ve složení membránových proteinů, obsahu fosfolipidů a mastných kyselin. Změna se týká i imunoreaktivity, aktivity adenylátcyklázy a ztráty protoplazmatických kapek (Hafez & Hafez 2000).

3.4.2 KAPACITACE SPERMIÍ

Před fertilizací musí savčí spermie podstoupit kapacitaci, což je proces v samičím reprodukčním traktu, během kterého dochází k řadě biochemických změn. Jejím cílem je dosáhnout schopnosti penetrace do oocyty (Breitbart et al. 2005). Savčí spermie nemají schopnost oplodnit oocyt bezprostředně po ejakulaci, přestože jsou motilní (Visconti et al. 1995a). Pouze kapacitované spermie mohou podstoupit akrosomální reakci po vazbě spermie na ZP oocyty (Breitbart et al. 2005).

Molekulární podstata kapacitace není stále dostatečně pochopena (Visconti et al. 1998). Spermie během kapacitace podstoupí sekvenci biochemických změn, které ji nakonec umožní oplodnit oocyt. Kapacitaci lze definovat jako sérii událostí, které umožňují vazbu spermie na *zona pellucida* oocyty a provést akrosomální reakci. Při kapacitaci prochází spermatická membrána četnými modifikacemi, včetně strukturálních změn organizace proteinů-lipidů a zvýšení hyperpolarizace. Zvyšuje se také koncentrace intracelulárních volných vápenatých iontů, čímž se zvýší intracelulární hladiny pH. Buněčná membrána spermií se reorganizuje, aby podpořila následnou akrosomální reakci (Tardif et al. 2001; Visconti 2009; Santi et al. 2010). Dochází k odstranění cholesterolu (cholesterolový efflux) z povrchové membrány, což vede ke zvýšení fluidity membrány (Osheroff et al. 1999). Dále dochází ke změně metabolismu, motility, fosforylaci proteinů a produkci reaktivních forem kyslíku (peroxid vodíku, oxid dusnatý) (Yanagimachi 1994).

Transmembránové a intracelulární signalizační události regulující kapacitaci spermií, nejsou zcela pochopeny, ačkoli se zdá, že se účastní různé složky signálních transdukčních drah (Yanagimachi 1994), včetně proteinkinázy A (PKA), proteinkinázy C (PKC), proteinové tyrosinkinázy (PTK) a prvky rodiny signálně regulované kinázy (ERK) v dráze mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) (Awda & Buhr 2010). Během kapacitace se zvyšuje koncentrace intracelulárního hydrogenuhličitanu a aktivita adenylyl cyklázy, čímž se zvyšuje i koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu cAMP, který aktivuje PKA (Langlais & Roberts 1985; Jabbari et al. 2009). Nárůst cAMP stimuluje cAMP dependentní protein kinázy, které následně fosforylují proteiny na tyrosinových zbytcích (Visconti et al. 1995b; Breitbart 2003).

U lidských a myších spermiích se PKA nachází na akrosomální oblasti hlavičky a v bičíku spermie (Visconti et al. 1995a; Signorelli et al. 2012). Úlohou proteinkinázy C (PKC) je pohyb

spermií a akrosomální reakce (Breitbart & Naor 1999). Bylo zjištěno, že tyrosinová fosforylace v kapacitované kančí, myší a lidské spermii je závislá na cAMP a inhibována antagonisty tohoto systému (Lewis & Aitken 2001).

HCO^{3-} vstupuje do spermií přes kotransportér $\text{Na}^+/\text{HCO}^{3-}$ (Demarco et al. 2003). Toto zvýšení koncentrace HCO^{3-} vyvolává zvýšení intracelulárního pH a aktivaci jedinečného typu adenylylcyklázy přítomné ve spermiích, rozpustné adenylylcyklázy (SACY). Je aktivována HCO^{3-} a Ca^{2+} . Fyziologické hladiny HCO^{3-} způsobují rychlý kolaps asymetrie plazmatické membrány spermií (Gadella & Harrison 2000), což způsobuje zvýšení dostupnosti cholesterolu externím akceptorům (Salicioni et al. 2007). Současně SACY zvyšuje intracelulární hladiny cAMP a aktivuje PKA. Aktivace PKA moduluje odpověď vápenatých kanálů, které způsobují změny v membránovém potenciálu (Wennemuth et al. 2003) a zvyšuje intracelulární koncentraci Ca^{2+} (Signorelli et al. 2012).

Kapacitace je definována jako maturační proces spermií, který vede k fertilizaci buď *in vivo* v samičím pohlavním traktu nebo za definovaných podmínek *in vitro* (Galantino-Homer et al. 1997; Brener et al. 2003). Kapacitace může být imitována *in vitro* inkubací ejakulovaných spermií v definovaném médiu v rovnovážných solných roztocích s odpovídající koncentrací elektrolytů, metabolických zdrojů energie, Ca^{2+} , HCO^{3-} a zdrojem bílkovin (obvykle bovinní sérový albumin BSA). Toto složení se podobá složení oviduktální tekutiny (Yanagimachi 1994). Potřeba BSA při regulaci kapacitace je kvůli jeho schopnosti odstranit cholesterol z plazmatické membrány spermie (Visconti et al. 1999). Taktéž způsobí rozvolnění membrány, což umožní snadnější splnutí spermie s oolemou oocyty a influx extracelulárního vápníku, který je nutný pro indukci akrosomální reakce (Martinez & Morros 1996).

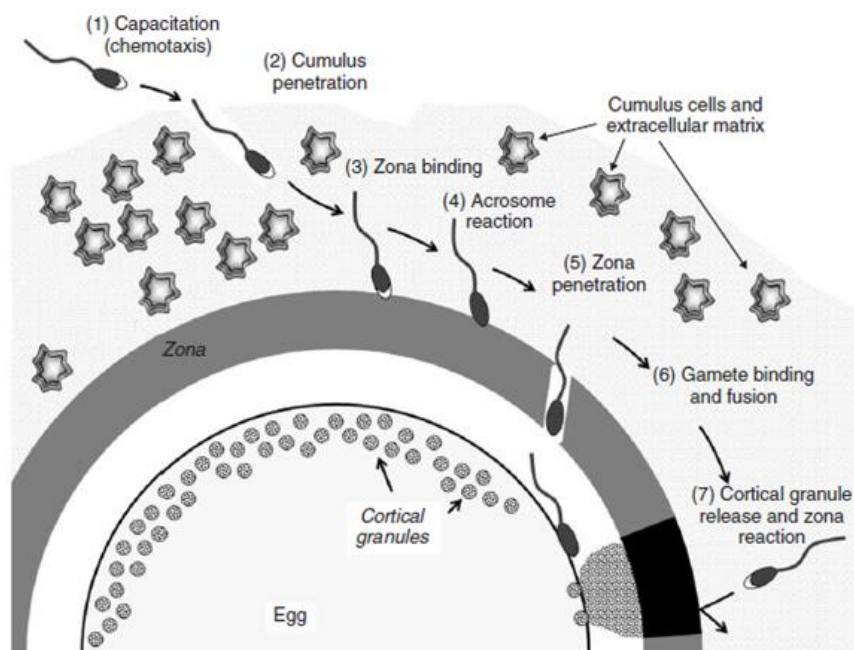
3.4.3 HYPERAKTIVACE MOTILITY SPERMIÍ

Součástí kapacitace je jev zvaný hyperaktivace motility spermií. Hyperaktivace je definována jako specifický pohybový vzorec spermií. Dochází ke změně charakteru pohybu spermií, kdy se asymetricky zvyšuje vlnění bičíku. Spermie se pohybují rychleji a do kruhu (Marquez & Suarez 2004). Tento typ pohybu je nezbytný pro fertilizaci, protože zvyšuje schopnost spermií oddělit se od oviduktální stěny. Dále umožňuje pohyb v lumen vejcovodu, penetraci v mukózních substancích a ZP oocyty (Ho & Suarez 2001).

Jedním z názorů bylo, že hyperaktivní motilita není aktivována fosforylací prostřednictvím proteinkinázy A (PKA) (Marquez & Suarez 2004), ale je řízena pouze extracelulárním vápníkem, cAMP, hydrogenuhličitanem a dalšími metabolickými substráty. V této době se již ví, že to není pravda. Fosforylace dependentní na PKA reguluje homeostázu aktivací napětově řízených Ca^{2+} CatSper kanálových komplexů, které hrají klíčovou roli při zprostředkování hyperaktivní motility. CatSper jsou kationtové kanály, které se aktivují změnou koncentrace iontů a jsou typické pro spermie (Orta et al. 2018). Klíčovým místem působení extracelulárního vápníku je axonema (Ho & Suarez 2001).

3.5 PRŮBĚH A MECHANISMY FERTILIZACE

Fertilizace je definována jako proces spojení dvou gamet, oocytu a spermie. Když se savčí oocyt a spermie dostanou do kontaktu s vejcovodem, spustí se řada kroků, které mohou vést k fertilizaci, a nakonec k vývoji nových jedinců. Tato cesta začíná druhově specifickou vazbou spermie na oocyt a končí fúzí spermie s oocytem (obr. 5) (Wassarman et al. 2001).



Obrázek 5: Mechanismy fertilizace: (1) – kapacitace; (2) – penetrace cumulem; (3) – vazba na zonu; (4) – akrosomální reakce; (5) – penetrace zónou; (6) – vazba a fúze gamet; (7) – zonární reakce (Knobil 2006).

3.5.1 INTERAKCE SPERMIE SE ZONA PELLUCIDA A AKROSOMÁLNÍ REAKCE

Pouze spermie, které prošly kapacitací, jsou schopny zdolat první vrstvu oocytu *corona radiata* (Spungin & Breitbart 1996). Spermie se váže na *zona pellucida* s neporušenou plazmatickou membránou přes specifické receptory, které jsou lokalizovány na apikální části hlavičky spermie (Yanagimachi 1994). Dojde k fúzi vnější akrosomální membrány a plazmatické membrány spermie. Tato fúze je následována akrosomální reakcí, což je událost charakterizovaná uvolňováním hydrolytických enzymů z hlavičky spermie (Breitbart & Spungin 1997).

Akrosomální reakce

Akrosomální reakce je forma exocytózy, která dává spermiím schopnost prostupovat skrz *zona pellucida*, která je považována za fyziologický iniciátor akrosomální reakce u savčích spermiích (Guraya 2000) a připravuje je pro fúzi s membránou oocytu. Tento proces pomáhá rozptýlit obsah akrosomu, včetně povrchových antigenů a enzymů pro úspěšnou fertilizaci. Pro indukci akrosomové reakce je zapotřebí jak Ca^{2+} , tak NaHCO_3^- (Yanagimachi 1994). Je závislá na pH a vyžaduje intracelulární alkalizaci spermií (Darszon et al. 2006).

Zona pellucida

Zona pellucida (ZP) je jedinečná specializovaná extracelulární matrice složená ze tří nebo čtyř silně glykosylovaných proteinů, z nichž některé mají schopnost vázat spermie a vyvolat spermatickou akrosomální exocytózu. Glykosylace a proteolýza zónových proteinů určují interakci spermií a oocytů a zajišťují obranu proti polyspermii (Sutovsky 2014).

Po rozkladu vnější akrosomové membrány po akrosomální reakci, je hlavička spermie pokryta pouze vnitřní akrosomální membránou. Zadní oblast hlavičky (posteriorní) je pokryta pouze jednou membránou, známou jako postnukleární čepička. Akrosom a postnukleární čepička se překrývají a vytvářejí ekvatoriální segment, který se neúčastní akrosomové reakce a je důležitý při vazbě a fúzi plazmatických membrán gamet (Yanagimachi 1994; Wassarman et al. 2001; Patrat et al. 2012).

3.5.2 PRŮNIK SPERMIE DO OOCYTU

Po integraci membránových receptorů dojde k adhezi obou gamet a splynutí membrán. Dlouho byl tento proces spojován pouze s integríny, jakožto membránovými receptory. Ovšem v roce 2005

byl proveden průlom při identifikaci nového proteinu na povrchu akrosomálně zreagovaných spermíích. Ukázal, že spermie postrádající tento receptor, nebyly schopny fúzovat s oocyty. Tento protein byl pojmenován jako Izumo podle japonské svatební svatyně. Až za několik let byl objeven jeho partner, který je součástí povrchu oocyty. Tento protein byl pojmenován jako Juno po římské bohyni manželství a plodnosti. V jiných studiích bylo doloženo, že také absence Juna na oocyty zamezuje fúzi, což dokazuje, že interakce mezi Izumo a Juno je nezbytná pro úspěšnou fertilizaci savců. Tato vazba může také přispívat k zamezení polyspermie (Inoue et al. 2005; Bianchi & Wright 2014). Mechanismus jejich rozpoznávání však zůstává nedostatečně definován (Ohto et al. 2016).

Spermie se připojí k vitelinní membráně v oblasti postnukleární čapky a spojí se s membránou oocyty. Následně se rozlomí bičík a oddělí se od hlavičky. Tento proces je následován dekonduzací hlavičky, což slouží k uvolnění samčích chromatid. Fúze oocyty s první spermíí vyvolá exocytózu kortikálních granulí oocyty, které obsahují enzymy modifikující glykoproteiny *zona pellucida*, čímž zamezí v pronikání dalších spermíí (ochrana proti polyspermii). Tento proces je pojmenován jako zonární reakce. Po splynutí gamet dojde k dokončení meiózy II v oocyty (Yanagimachi 1994; Wassarman et al. 2001; Patrat et al. 2012).

V posledním stádiu fertilizace se z jádra spermie i jádra oocyty vytvoří prvojádra (*pronucleus*). Fertilizace je ukončena až po zmizení prvojader, které jsou nahrazeny skupinami chromozomů spojených v profázi prvního dělení (Reece 2009).

3.6 POSTTRANSLAČNÍ MODIFIKACE

Fosforylace je jednou z forem posttranslační modifikace proteinů (PTM). PTM proteinů kontrolují mnoho biologických procesů a zkoumání jejich diverzity je podstatné pro pochopení mechanismů regulace buněk (Witze et al. 2007). PTM jsou události kovalentního charakteru, které mění vlastnosti proteinu proteolytickým štěpením nebo přidáním modifikační skupiny na jednu nebo více aminokyselin. Mohou určit aktivitu a lokalizaci proteinu a interakce s jinými proteiny (Mann & Jensen 2003). Jde o úpravu proteinů po jejich nasyntetizování ribozomem. Dodávají proteinům nové vlastnosti, stabilizují jejich konformace, pomáhají regulovat jejich funkce a přispívají k imunitnímu rozpoznávání (Witze et al. 2007). Jedná se o klíčovou regulační událost v mnoha buněčných procesech, včetně rozpoznávání, signalizaci a metabolismu (Jensen 2000).

Většina proteinů je po své biosyntéze chemicky modifikována buď v kovalentním připojení funkčních skupin (např. hydroxylace, methylace), kompletních molekul (např. glykosylace) nebo jde o proteolytické úpravy, při kterých se vyštěpují určité části primárního translačního produktu jako součást maturačních přeměn. Jde o období úprav primárního RNA transkriptu (Matouš et al. 2010).

Proteolytické štěpení je nejobvyklejší posttranslační modifikací a je vždy nevratné, zatímco kovalentní modifikace jsou reverzibilní (Matouš et al. 2010). Mezi kovalentní modifikace patří především acetylace, glykosylace, hydroxylace, methylace, fosforylace a mnoho dalších reakcí (Voet & Voet 1990).

3.7 FOSFORYLACE PROTEINŮ

Mezi posttranslační modifikace proteinů patří fosforylace proteinů, která umožňuje kontrolovat a řídit různé buněčné procesy a podílí se na přenosu signálu v buňce. V eukaryotických buňkách se většina fosforylací vyskytuje na serinových nebo treoninových zbytcích a v menším rozsahu také na tyrosinových a histidinových zbytcích (Urner & Sakkas 2003). Udává se, že více než 90 % savčího fosfoproteomu tvoří fosfoserin a fosfotreonin. Relativní poměr fosfoserinu, fosfotreoninu a fosfotyrosinu v buňce je 1800:200:1 (Manning et al. 2002). Mezi další aminokyseliny, které mohou být fosforylovány, patří lysin, arginin a glutamát (Thomason & Kay 2000).

Fosforylace je reverzibilní modifikace proteinů za použití zbytku kyseliny fosforečné, který se přidává na kyslíkový atom příslušného aminokyselinového zbytku (Klumpp & Krieglstein 2002). Fosforylace probíhá na mnoha substrátech, ale tato práce pojednává pouze o fosforylaci na proteinech, která patří pod nejdůležitější a nejlépe prostudované posttranslační modifikace proteinů. Fosforylace proteinů je důležitá pro buněčnou signalizaci a modulaci funkce proteinů v každém systému, včetně reprodukčního systému. Strategie pro úspěch druhů vedly k vývoji jedinečných proteinkináz uvnitř fylogenetického stromu (Sutovsky 2014).

Většina proteinů v savčí buňce je fosforylována na jednom nebo více místech (Hunter 2007). Hraje klíčovou roli v regulaci mnoha procesů včetně buněčného cyklu, diferenciace, růstu, dělení, metabolismu a transportu. Pomocí signálních kaskád umožňuje přijímat podněty z okolí i z buňky samotné a pomocí kináz a fosfatáz na ně adekvátně odpovídat. Fosforylace je tedy klíčová pro buněčné dělení, z čehož je zřejmé, že jakékoli poruchy nebo špatná interpretace a šíření signálu může způsobit velmi vážné následky jak pro jednotlivou buňku, tak pro celý organismus (Pinna & Ruzzene 1996).

V eukaryotických buňkách je třetina až polovina proteinů fosforylována, což je důsledkem pečlivě regulovaných protein kinázových a fosfatázových aktivit (Witze et al. 2007). Některé proteiny obsahují jen jeden fosforylovaný zbytek, jiné desítky. Reverzibilní fosforylace a defosforylace hydroxyaminokyselin, mezi které patří tyrosin, serin a treonin, zprostředkovávaná proteinkinázami a fosfatázami, je jedním z nejúčinnějších nástrojů, jak měnit aktivitu proteinů. Fosfát dodá proteinu dva nové negativní náboje, které vyvolávají narušení dosavadních intramolekulárních interakcí spolu se vznikem jiných, takže dochází ke změně prostorové struktury, a tím i změně funkce proteinu. V proteinu se akumuluje i část energie uvolněné při fosforylaci, což přispívá rovněž ke změně funkčního stavu proteinu (Matouš et al. 2010). Úloha fosfotreoninu a fosfoserinu je spíše strukturní, ale fosfotyrosin podléhá mnohým regulačním interakcím (Hunter 2009).

Pro naprostou většinu proteinů je fosforylace úzce spjata s jejich aktivitou a funkcí, protože ovlivňuje jejich konformační změnu. Tato konformační změna ovlivňuje protein dvěma způsoby. Díky katalytickým funkcím může být protein aktivován nebo inaktivován, nebo může být identifikován konkrétním enzymem jako vhodný substrát při interakci s jinou bílkovinou. To vše je způsobeno jen drobnými změnami v terciální nebo kvartérní konformační struktuře, která je

způsobena v různém rozsahu chemickofyzikálními vlastnostmi fosfátového zbytku, zvláště velkým nábojem, pH a prostorem, na kterém je rozložen (Hunter 2012).

Z molekuly ATP (adenosin trifosfát) se může přenášet fosforylovaná skupina na alkoholové, karboxylové a amidové skupiny za uvolnění ADP (adenosin difosfát). Enzymy, které katalyzují tyto transfosforylační děje, se nazývají kinázy. V některých případech katalyzují i zpětnou syntézu ATP z ADP (např. kreatinkinasa) (Vodrážka 1996).

3.7.1 KINÁZY

Kinázy jsou fosforylující enzymy, jinak taky nazývané jako proteinkinázy a patří mezi transferázy. Tento druh transferáz katalyzuje připojení fosfátové skupiny k substrátu. Substráty účastníci se fosforylace jsou velmi rozmanité a tvoří je sacharidy, lipidy, nukleotidy a bílkoviny (Manning et al. 2002).

Proteinkinázy jsou zpravidla dvou typů, a to kinázy fosforylující na serinech a treoninech a kinázy fosforylující na tyrosinu. Toto rozdělení je založeno na typu fosforylované aminokyseliny, které mají odlišné katalytické domény. Existuje i dvojná aktivita kináz. V tomto případě jde o schopnost fosforylace tyrosinu i treoninu nebo serinu. Avšak jde pouze o autofosforylaci nebo se projevuje jen výjimečně za pomoci silně specifických faktorů. Jde tedy o vzácné kinázy (Pinna & Ruzzene 1996). V bazálním stavu je naprostá většina proteinkináz defosforylovaná a tedy neaktivní. K aktivaci dojde fosforylací. Při signalizaci, jsou kinázové kaskády zapínány a vypínány reverzibilním přidáním a odstraněním fosfátových skupin (Cohen 2000).

Kinázy se skládají z regulačních podjednotek využívající různé substráty. Jejich funkcí je aktivace nebo inhibice ostatních domén. Kinázová aktivita je regulována jejich fosforylací (Johnson & Lewis 2001).

Pro téměř všechny proteinové kinázy je substrátem ATP, avšak pro malou skupinu kináz je substrátem guanosin trifosfát (GTP). Kinázové domény eukaryotických proteinkináz poskytují katalytickou aktivitu. Kinázovým doménám se dají připsat tři oddělené role. Za prvé jde o vazbu a orientaci donoru fosfátu ATP (nebo GTP) jako komplexu s dvojmocným kationtem, obvykle hořečnatým nebo manganatým iontem. Za druhé jde o vazbu a orientaci proteinového (nebo peptidového) substrátu. A naposledy jde o přenos γ -fosfátu z ATP (nebo GTP) na akceptor

hydroxylového zbytku (Ser, Tyr, Thr) proteinového substrátu (Hanks & Hunter 1995). Touto cestou vzniká kovalentní esterová vazba. Přenos fosfátu na aminokyselinu (AMK) má za následek vznik fosfoaminokyseliny a ADP, což jsou produkty této reakce (Pinna & Ruzzene 1996).

Kovalentní esterové vazby, které se účastní fosforylace, jsou v prostředí s neutrálním pH velmi stabilní. Jen díky své vysoké energii, nepodléhá vazba bílkoviny a fosfátu spontánní hydrolyze, a tedy nedochází k defosforylaci (Hunter 2012).

Eukaryotické proteinkinázy (ePK) tvoří jednu z největších superrodin homologních proteinů a genů. Jsou příbuzné kvůli svým početným kinázovým doménám (také známých jako katalytické domény), které sestávají z 250 až 300 aminokyselinových zbytků. Kinázy byly rozděleny na rodiny a podrodiny analýzou aminokyselinových sekvencí katalytických domén (Hanks & Hunter 1995).

Eukaryotické proteinkinázy obsahují osm recentně uznávaných kinázových skupin (Manning et al. 2002):

- 1) TKL (tyrosin like kináza)
- 2) TK (tyrosin kinázy): členění na receptorové a nereceptorové kinázy; jména rodin podle kináz
- 3) CAMK: má dvě rodiny: Snfl/AMPK (AMP aktivovaná proteinkináza), Ca²⁺/kalmodulin dependentní proteinkinázy a jim blízké příbuzné
- 4) STE (homolog kvasinkových kináz – Sterile)
- 5) CK1 (kasein kináza)
- 6) RGC (receptor gyanylát cykláza)
- 7) CMGC: zahrnuje hlavně rodiny: glykogen syntetázy aktivující kinázy 3, MAPK (mitogenem aktivovaná kináza), CLK (Cdc-2 like kináza a příbuzné), GSK3 (glykogen syntáza kináza), CDK a příbuzné (cyklin dependentní kinázy; kinázy buněčného cyklu)
- 8) AGC skupina: kinázy fosforylující s receptory spřažené G proteiny, kinázy regulované cyklickým nukleotidem (PKG = proteinkináza G, PKA = proteinkináza A)

3.7.2 FOSFATÁZY

Fosfoproteiny provádějící zpětnou defosforylaci se nazývají fosfatázy a patří mezi hydrolázy. Tyto enzymy mají také různou míru specifity. Během defosforylace proteinfosfatázy katalyzují hydrolýzu vazby mezi fosfátem a aminokyselinou, což má za následek uvolnění anorganického fosfátu (Pinna & Ruzzene 1996).

Proteinfosfatázy jsou také zpravidla dvou druhů, a to fosfoserinové/fosfotreoninové a fosfotyrosinové. Defosforylace je u těchto dvou druhů dosažena pomocí odlišných mechanismů. Tyrosinové fosfatázy jsou zdrojem kovalentního meziprojektu thiofosforylu, který pomáhá při odstraňování tyrosinového zbytku. Zatímco serin/treoninové fosfatázy zajišťují přímou hydrolýzu fosfátové skupiny za pomoci bimetalového centra (Fe/Zn) (Sacco et al. 2012).

Ve srovnání množství obsahují organismy prokazatelně nižší množství fosfatáz než kináz. Fosfatázy jsou však velmi důležité z hlediska svého regulačního významu. Nadbytek, nedostatek či úplná nepřítomnost fosfatáz dokáže vážně ohrozit buněčné funkce. Přestože kináz je mnohonásobně víc než fosfatáz, tyrosinfosfatázy jsou naopak o dost početnější než tyrosinkinázy. Tento fakt je známkou toho, že tyrosinová fosforylace má významnou úlohu v regulačních pochodech a interakcích (Mustelin 2007).

3.8 FOSFORYLACE VE SPERMIÍCH

Konkrétně ve spermii dochází k fosforylaci na serinu, treoninu a tyrosinu, ale bylo identifikováno pouze pár fosforylovaných proteinů. Proteinkináza A závislá na cAMP hraje hlavní roli ve funkci spermií a byla podrobně studována. Zatímco znalosti o tyrosinkinázách, serinkinázách a treoninkinázách zůstaly omezené (Urner & Sakkas 2003).

3.8.1 FOSFORYLACE BĚHEM SPERMATOGENEZE

Jedním z klíčových mechanismů během spermatogeneze je také fosforylace. Typická je pro meiózu, která je řízena kinázami, které fosforylují nebo defosforylují serin nebo treonin (Ser/Thr kinázy) (Sutovsky 2014). Zajímavé je, že spermie, jako jedna z nejdiferencovanějších buněk v těle, tráví více než polovinu svého vývoje bez schopnosti biosyntézy jaderných proteinů. Což je neuvěřitelné, protože syntéza bílkovin je vypnuta dlouho před zralostí spermie (Baker 2016).

Během spermatogeneze byla popsána fosforylace/defosforylace kináz aktivovaných mitogenem (MAP). V různých stádiích spermatogenních buněk byly popsány dvě MAP kinázy, a to ERK1 a ERK2. Byly exprimovány v podobném množství. ERK1 a ERK2 byly fosforylovány v časných spermatogenních buňkách až po primární spermatocyty ve stádiu zygotene. Zatímco ve stádiu pachytene bylo možno detekovat pouze malé množství fosforylovaných MAP kináz (Lu et al. 1999).

3.8.2 FOSFORYLACE BĚHEM MATURACE A KAPACITACE

Aby spermie dosáhly plné funkčnosti, musí projít posttranslační modifikací proteinů. Bylo prokázáno, že mnoho PTM hrálo roli ve vývoji spermií. Zahrnují fosforylační a glykosylační události, které se vyskytují jak v epididymu, tak při kapacitaci spermií (Baker 2016).

Epididymální maturace spermií zahrnuje posttranslační modifikace strukturálních proteinů spermií, stejně jako modifikace na povrchových proteinech spermií pomocí sekrece apokrinních proteinů a cíleným proteolytickým zpracováním (Sutovsky 2014).

Během kapacitace pak probíhá ve spermii řada biochemických a molekulárních změn, které činí savčí spermie kompetentní pro správnou interakci s oocytem (Yanagimachi 1994). Během kapacitace jsou aktivovány signální dráhy, které vedou k tyrosinové fosforylaci proteinů. Tyrosinová fosforylace proteinů hraje důležitou roli v kapacitaci spermií, v hyperaktivní motilitě, interakci se *zona pellucida*, akrosomální reakci a membránové fúzi. Hodnocení tyrosinové fosforylace je důležité pro další pochopení molekulárních mechanismů fertilizace (Jabbari et al. 2009; Ashrafzadeh et al. 2013).

Začátek kapacitace je typický odstraněním cholesterolu z membrány, čímž se zvýší fluidita membrány a sníží se poměr cholesterol/fosfolipidy. Pohyb cholesterolu je úzce spjat s transmembránovými signalizačními událostmi ve spermích, které regulují tyrosinovou fosforylaci (Visconti et al. 1998).

PKA fosforyluje několik proteinů ve zbytcích Ser a Thr. Aktivují, buď přímo nebo nepřímo, několik proteinkináz, které povedou ke zvýšení fosforylace na tyrosinových zbytcích. Všechny tyto změny vedou ke kapacitaci spermií (Signorelli et al. 2012).

Zvýšení tyrosinové fosforylace je závislé na přítomnosti BSA, Ca^{2+} a HCO_3^- v médiu a koncentrace těchto složek, které jsou potřebné pro tyrosinovou fosforylaci proteinů, jsou korelovány s koncentracemi potřebnými pro kapacitaci (Visconti et al. 1995a; Salicioni et al. 2007).

P-Tyr probíhá spontánně ve spermiích *in vitro*, za předpokladu, že jsou zředěny v kultivačním médiu, které podporuje kapacitaci (Urner et al. 2001) a jsou zbaveny semenné plasmy (Urner & Sakkas 2003). *In vivo* je výskyt kapacitace asociované s P-Tyr regulován vazbou spermií na ovidukální epitelální buňky před fertilizací (Petrunkina et al. 2001).

P-Tyr proteinů bičíku je spojena s hyperaktivitou spermie (Mahony & Gwathmey 1999), což je typ motility potřebný pro pronikání cumulem a ZP oocyty. Hyperaktivní motilita a přidružená P-Tyr v bičíku jsou iniciovány během *in vitro* kapacitace. Jejich udržování u spermií navázaných na ZP je velmi důležité a vysvětluje proč ZP podporuje P-Tyr proteinů v bičíku spermie (Urner & Sakkas 2003).

Pro samotnou fosforylaci je nezbytně nutné ATP produkované glykolýzou nebo oxidační respirací. Na regulaci P-Tyr se během kapacitace *in vitro* také podílí glukóza. V nepřítomnosti glukózy jsou hlavními zdroji ATP mitochondrie ze střední části bičíku, a proto je P-Tyr v hlavní části bičíku zpžděna a v mitochondriální části zcela inhibována. Absence glukózy inhibuje fúzi gamet, což zabraňuje fertilizaci. Z čehož se usoudilo, že přesné načasování indukce P-Tyr při navázání spermie na oocyt a také P-Tyr v celém bičíku, je kritické pro úspěšné oplodnění (Urner & Sakkas 2003).

3.8.3 FOSFORYLACE BĚHEM FERTILIZACE

Během fertilizace je funkce spermií regulována aktivací intracelulárních signalizačních systémů, které kontrolují fosforylaci proteinu (Urner & Sakkas 2003). V procesu fertilizace hrají významné role proteinové tyrosinové kinázy (PTKs) (Sutovsky 2014). Získání hyperaktivované motility a nástup akrosomální reakce ve spojení s různými kinázami, jako jsou PKC, PKA, PTK a ERK kinázy a jejich interakce podporují koncepci, že více paralelních cest přispívá k včasné koordinaci různých funkcí spermií potřebných k oplodnění oocyty (Awda & Buhr 2010).

Vazba spermie na *zona pellucida* způsobuje aktivaci cAMP/PKA a protein kinázy C (PKC). PKC otevírá vápníkový kanál v plazmatické membráně. PKA spolu s inositoltrifosfátem aktivují

vápníkové kanály ve vnější akrosomové membráně, což vede ke zvýšení hladiny vápníku (Breitbart 2003).

Nezbytným předpokladem pro oplodnění vajíčka, je fosforylace tyrosinových proteinů ve spermii (Visconti et al. 1995a; Urner & Sakkas 2003), ale i samotný oocyt vykazuje tyrosinovou fosforylaci (P-Tyr). Většina spermií navázaných na oolemu vykazují P-Tyr v hlavní části bičíku, zatímco P-Tyr v mitochondriální části bičíku je stimulována a udržována až do fúze s oocytem (Urner & Sakkas 2003).

U kanců se zjistilo, že ve srovnání s fosforylovanými proteiny celé spermie jsou proteiny plazmatické membrány, které vážou ZP, minoritní skupinou fosforylovaných proteinů, i když mohou stále hrát klíčovou roli v interakci spermie na ZP (Flesch et al. 2001).

Byla identifikována extracelulární signálně regulovaná dráha kináz v kančích spermích, které regulují tyrosinovou fosforylaci membránových proteinů během kapacitace, kdy se ukázalo, že fosforylují membránové proteiny spermie a hrají roli v interakci se *zona pellucida* (Flesch et al. 2001; Jabbari et al. 2009; Awda & Buhr 2010).

3.8.4 FOSFORYLACE NA TYROSINU

Pouze tyrosinová fosforylace je považována za primární nebo dokonce výlučný indikátor signálních drah (Naz a Rajesh 2004). Je obstarávána a zvyšována aktivací specifických enzymů tyrosinkináz (TK). TK jsou zapínány přímo nebo nepřímo PKA, což bylo popsáno u kapacitovaných spermích myši, býka, kance a člověka (Kaláb et al. 1998; Tardif et al. 2001). Tyrosinkinázy se všeobecně dělí na dvě skupiny, a to na receptorové a nereceptorové (volné). Receptorové tyrosinkinázy (RTKs) jsou buď s intracelulární TK doménou nebo extracelulární vazebnou doménou k ligandu. U nereceptorových kináz (PTKs) se domény váží na receptory, které postrádají enzymatickou aktivitu. PTKs jsou lokalizovány v cytoplazmě, jádru nebo vnitřní straně plazmatické membrány. Při šíření signálu pomocí kaskádovité fosforylace kináz dochází k aktivaci receptorů extracelulárními ligandy (př. růstový faktor), které jsou následovány fosforylací kináz receptorových nebo asociovaných s receptorem bez enzymatické aktivity (Pinna & Ruzzene 1996; Signorelli et al. 2012).

Aktivace tyrosinkináz proběhne pouze za silně specifických podmínek, protože podléhají výrazné negativní regulaci. Bez stabilizace fosfotyrosinu s doménou dojde k téměř okamžitému odbourání za příčiny vysoké dynamiky fosfatáz. Aromatický kruh způsobuje značnou stabilitu mezi vazebnou interakcí fosfotyrosinu s doménou, což stojí za významnou regulační rolí tyrosinové fosforylace (Hunter 2009).

Signální dráha zahrnující extracelulární signálně regulovanou kinázu (ERK) a mitogenem aktivovanou proteinkinázu (MAPK) byla poprvé identifikována v kančích spermiích a je spojena s kapacitací a tyrosinovou fosforylací (P-Tyr) (Awda & Buhr 2010). MAPK je jedinečná mezi Ser/Thr kinázami, protože vyžaduje pro svou úplnou aktivaci fosforylaci jak na treoninu, tak na tyrosinu. Inhibice MAPK zabraňuje P-Tyr (Urner & Sakkas 2003; Helfenberger et al. 2018). Podstatná část kančích spermií podléhá P-Tyr i během kryokonzervace. Existují časové změny P-Tyr v kryokonzervovaných spermiích v reakci na ovidukální tekutinu (Kumaresan et al. 2012).

Tyrosinová fosforylace spermatických proteinů byla u savců detekována v akrosomální oblasti, v ekvatoriálním segmentu a v bičíku (Jones et al. 2008). Je nezbytné rozlišovat lokalizaci tyrosinových fosforylovaných proteinů, aby bylo možné porozumět vazbě mezi různými fosforylovanými proteiny. S výjimkou kanců (Tardif et al. 2001) se zdá, že hlavní částí spermie představující tyrosinovou fosforylaci, je bičík (Urner & Sakkas 2003). P-Tyr detekovatelná v bičíku je spojena s hyperaktivním pohybem, ke kterému dochází v průběhu kapacitace (Mahony & Gwathmey 1999; Jabbari et al. 2009), zatímco tyrosinová fosforylace v ekvatoriálním segmentu spermatické hlavičky je součástí organizačního centra multimolekulárních komplexů, které zprostředkovávají fúzi vedoucí k akrosomální reakci (Jones et al. 2008).

Včlenění ATP do kančího a býčího spermatu ukázalo, že se P-Tyr zdá během kapacitace u kance nesouvisející se změnami pohyblivosti spermií (Tardif et al. 1999). Naproti tomu fosforylované proteiny býčích spermiích se mohou podílet na změnách motility v průběhu kapacitace (Chamberland et al. 2001).

Poměr spermií s fosforylovanými proteiny v celém bičíku se zvyšuje s kapacitací a fosforylace v hlavní části bičíku je nezbytnou podmínkou pro fosforylaci v mitochondriální části bičíku myší spermie. Podobné zvýšení bylo pozorováno i u lidské spermie, ale bylo omezeno pouze na hlavní část bičíku (Urner & Sakkas 2003).

U lidských ejakulovaných i kapacitovaných spermii vázaných na ZP se vyskytuje specifický vzorec pro expresi fosfotyrosinu ve vnitřních strukturách bičíku permeabilizovaných buněk, ale také na vnějším povrchu hlavičky spermie (Asquith et al. 2004). U myších spermii představuje P-Tyr v hlavičce minoritní populaci fosforylací (Urner & Sakkas 2003). Expozice progesteronu, který indukuje akrosomální reakci podporuje a zvyšuje P-Tyr v hlavičce lidské spermie (Tesarik et al. 1993).

Ve studii Tardif et al. (2001) byla věnována pozornost P-Tyr kančích spermii. Před inkubací v kapacitačním médiu bylo již izolováno několik proteinů z ejakulovaných kančích spermii, které vykazovaly fosforylaci na tyrosinových zbytcích. Tyto proteiny byly detekovány pomocí monoklonální anti-tyrosinové protilátky. Detekovali fosforylované proteiny s molekulovými váhami 60 kDa, 44 kDa a 42 kDa, které byly fosforylovány nezávisle na době inkubace a použitím médiu. Po delší době inkubace v kapacitačním médiu byl detekován ještě jeden protein o velikosti 32 kDa. Tento protein byl detekován i u vzorku s ejakulovanými spermii, což bylo pravděpodobně způsobeno spontánní kapacitací.

3.8.5 FOSFORYLACE NA SERINU A TREONINU

Přestože bylo publikováno četné množství prací na tyrosinovou fosforylaci, tak na Ser/Thr pouze malé množství prací, což odráží obtíže při provádění těchto studií (Signorelli et al. 2012). Jedna z prvních prací, která popsala fosforylaci na serinových nebo treoninových zbytcích proteinů kapacitovaných lidských spermii, byla od Naz (1999). Ve své práci detekoval, že alespoň čtyři skupiny proteinů o molekulových hmotnostech 43–55 kDa, 94 kDa, 110 kDa a 190 kDa, jsou fosforylovány na serinu. Fosforylované proteiny na treoninu byly ve stejném rozmezí velikostí. V obou případech se fosforylace zvýšila během kapacitace a po vystavení ZP. Některé z těchto proteinů byly fosforylovány i na tyrosinových zbytcích.

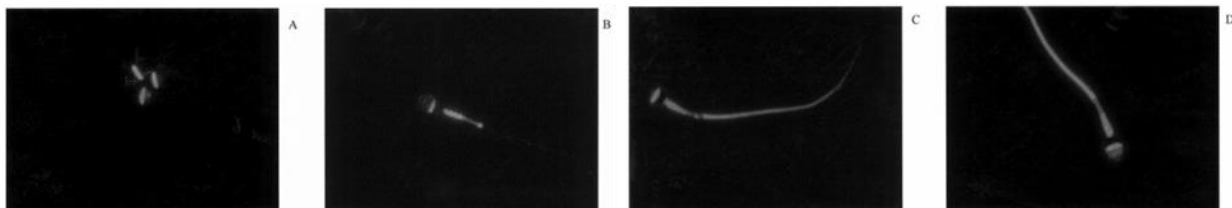
Beddu-Addo et al. (2005) hodnotili fosforylaci na kapacitovaných lidských spermii na Ser, Thr a Tyr a zjistili, že jsou tyto fosforylace závislé na inkubační době. Fosforylace na Ser/Thr nastupuje rychleji než u Tyr.

U kančích spermii je velká skupina proteinů fosforylována na Ser/Thr zbytcích během kapacitace (Harayama & Nakamura 2008). Nekapacitované kančí spermie mají detekovatelné fosforylované proteiny Ser/Thr v postakrosomální oblasti. Při zvyšování kapacitace se

postakrosomální fosforylace snižuje nebo zcela mizí a fluorescence těchto proteinů se zvyšuje směrem k bičíku (Harayama 2003).

3.8.6 DETEKCE FOSFORYLACE U SPERMIÍ RŮZNÝCH SAVČÍCH DRUHŮ

Petrunkina et al. (2003) se zabývali tyrosinovou fosforylací u kapacitovaných spermií psa. Porovnávali vzory spermií v průběhu inkubace v kapacitačním médiu (obr. 6).



Obrázek 6: Vzory tyrosinové fosforylace u kapacitovaných spermiích psa: A – silný signál v sEqS, na začátku inkubace $t= 3 \text{ min}$; B – signál v mitochondriální části bičíku a střední signál v hlavičce, $t= 30\text{-}60 \text{ min}$; C – signál v celém bičíku, bez signálu v oblasti hlavičky, $t= 60\text{-}180 \text{ min}$; D – signál v celém bičíku a intenzivní fluorescence v oblasti hlavičky, $t= 180 \text{ min}$ (Petrunkina et al. 2003).

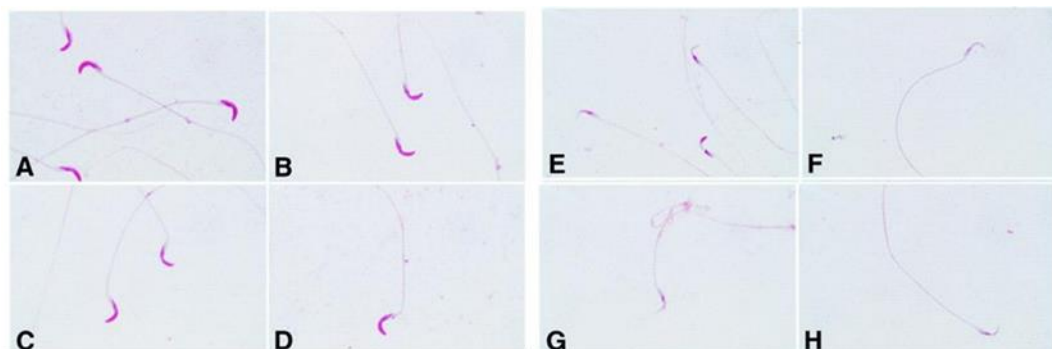
Mahony & Gwathmey (1999) se věnovali detekci tyrosinové fosforylace u makaka (*macaca fascicularis*). Spermie byly fixovány metanolem. Imunolokalizace byla detekována v bičíku spermií (obr. 7). Konkrétně šlo o hlavní část bičíku a malé oblasti v krčku spermie.



Obrázek 7: Imunolokalizace tyrosinové fosforylace u makaka: Viditelný signál v hlavní části bičíku; fixace metanolem (Mahony & Gwathmey 1999).

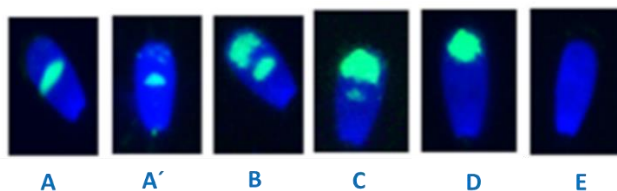
Lewis & Aitken (2001) se věnovali vzorům tyrosinové fosforylace u krysích epididymálních spermií kultivovaných v kapacitačním médiu v různých časových intervalech. Porovnávali mezi sebou fosforylací proteinů spermií z *caput* a *cauda epididymu* (obr. 8). Imunolokalizace proteinů spermií z hlavy nadvarlete (*caput*) vykazovala silné značení přes celou akrosomální doménu hlavičky spermie (obr A – D). Toto značení se v průběhu času inkubace neměnilo. Navzdory tomu,

imunolokalizace proteinů u spermií z ocasu (*cauda*) nadvarlete vykazovala značení pouze na zadním okraji akrosomu (obr E – H).



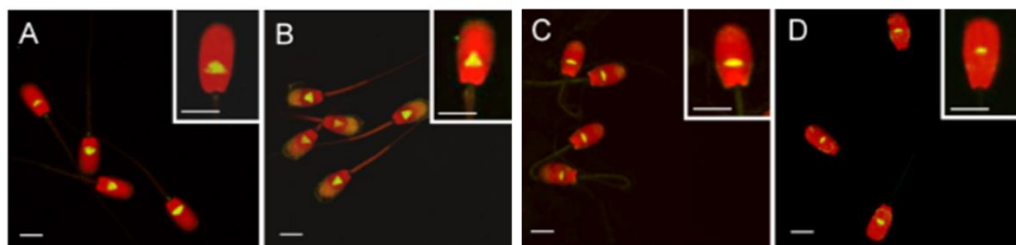
Obrázek 8: Imunolokalizace tyrosinové fosforylace ve spermiích krysy získaných z hlavy (*caput*) a ocasu (*cauda*) nadvarlete: Fixace: 1% paraformaldehyd; A – *caput*, inkubace 0 hod; B – *caput*, 1 hod; C – *caput*, 2 hodiny; D – *caput*, 3 hodiny; E – *cauda*, 0 hod; F – *cauda*, 1 hod; G – *cauda*, 2 hod; H – *cauda*, 3 hod (Lewis & Aitken 2001).

Jankovičová et al. (2018) detekovali fosforylaci pomocí fosfotyrosinových protilátek u býčích spermií během jejich epididymální maturace. Vzory fosforylace byly rozděleny do šesti kategorií podle místa fluorescenčního signálu (obr. 9).



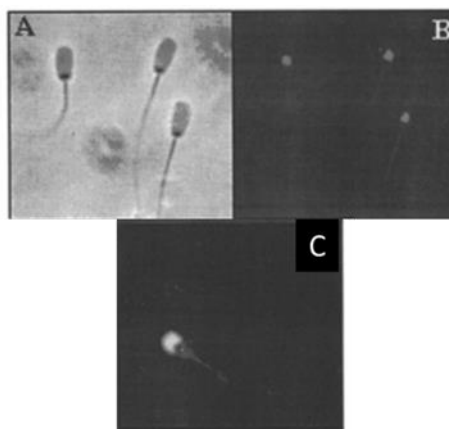
Obrázek 9: Detekce tyrosinové fosforylace u býčích spermií: A – celý ekvatoriální úsek; A' - subekvatoriální segment sEqS; B – celý ekvatoriální úsek + Akrosom (*Akr*); C – *Akr* + sEqS; D – *Akr*; E – bez signálu (Jankovičová et al. 2018).

Jones et al. (2008) se zabývali tyrosinovou fosforylací u kančích, býčích a beraních spermií. Po fixaci a permeabilizaci ejakulovaných spermií v horkou fixaci (aceton/metanol) se většina spermií u kanců, býků a beranů silně obarvila v subekvatoriálním segmentu (sEqS) (obr. 10). Popsali, že u všech tří druhů je sEqS obohacen tyrosinovou fosforylací, a že tyto proteiny jsou přístupné pouze protilátkám po permeabilizaci plazmatické membrány.



Obrázek 10: Imunofluorescenční detekce P-Tyr v sEqS ejakulovaných spermii za použití monoklonální protilátky 4G10: Fluorescence protilátky je žlutozelená; DNA je červená; fixace vlhká (metanol/acetone); A – kančí spermie; B – kančí spermie; C – beraní spermie; D – býčí spermie (Jones et al. 2008).

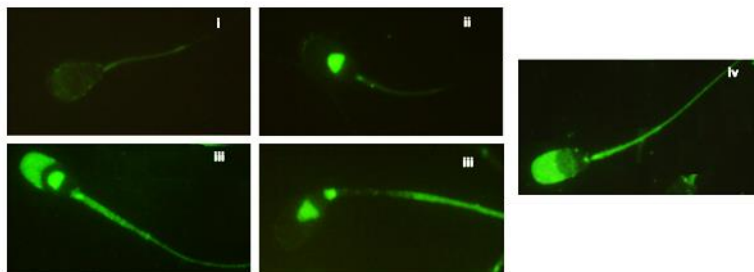
Tardif et al. (2001) ve své práci popsali vzory kančích spermii inkubovaných v kapacitačním médiu (CM) a nekapacitačním médiu (NCM) (obr. 11). Některé vzorky byly následně permeabilizovány etanolem. Spermie inkubované v CM vykazovaly anti-fosfotyrosinové značení přes střední akrosom a v sEqS. Tento specifický signál v akrosomu se vyskytoval také u spermii inkubovaných v NCM, ale v mnohem menší míře. Před inkubací vykazovala většina spermii slabou fluorescence na subekvatoriálním signálu. Když byly spermie permeabilizovány etanolem, tak byla ztracena specifičnost tohoto vzoru a všechny spermie vykazovaly značení na akrosomu, slabě na subekvatoriálním segmentu a mitochondriální oblasti bičíku.



Obrázek 11: Nepřímá imunofluorescence proteinů zafixovaných kančích spermii značených anti-fosfotyrosinem: Před nebo po inkubaci v nekapacitačním médiu (NCM; I. - A a B) byla méně patrná fluorescence v akrosomu. U spermii inkubovaných v kapacitačním médiu (CN; I. - C) proběhla znatelná fosforylace v akrosomu (Převzato a upraveno dle Tardif et al. 2001).

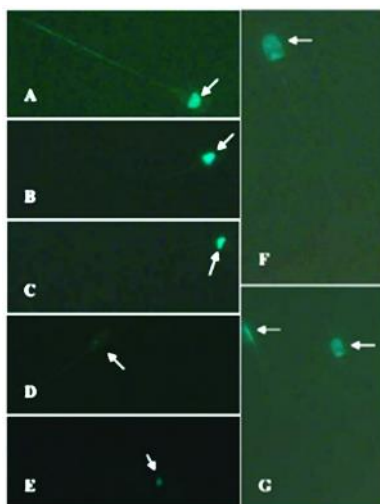
Matás et al. (2011) rozdělili kančí spermie do čtyř skupin podle umístění anti-fosfotyrosinového protilátkového signálu (obr. 12). První skupinu (i) tvořily spermie bez signálu. Ve druhé skupině

(ii) byl přítomen fluorescenční signál pouze v sEqS, tvar trojúhelníku (Jones et al. 2008). Třetí skupina (iii) obsahovala spermie se signálem v oblasti akrosomu a sEqS nebo/a bičíku. Ve čtvrté skupině (iv) byl detekován signál pouze v akrosomu nebo/a v bičíku.



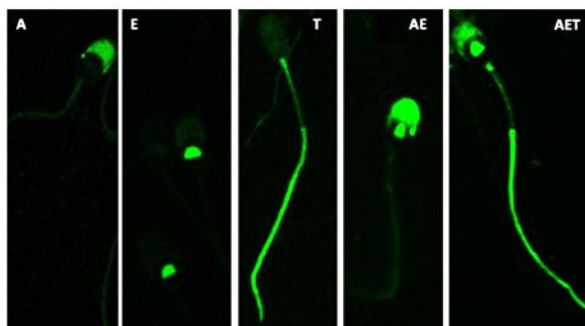
Obrázek 12: Kančí spermie rozdělené do čtyř skupin podle lokalizace fluorescenčního signálu: i – žádný signál Ab; ii – signál pouze v sEqS; iii – signál v sEqS a akrosomu a/nebo bičíku; iv – signál v akrosomu a/nebo v bičíku (Matás et al. 2011).

Fàbrega et al. (2011) se ve své práci věnovali popisu a porovnání vzorů P-Tyr epididymálních, ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných kančích spermií z hlediska exprese a lokalizace. Odhalili různé modely intenzity podle oblasti epididymu a kapacitačního stavu (obr. 13).



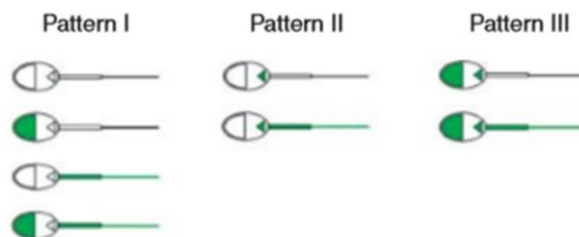
Obrázek 13: Imunolokalizace tyrosinové fosforylace u kančích spermií (nekapacitované a kapacitované): Ne kapacitované spermie (A-E), kapacitované spermie (F-G); A – proximální část hlavy nadvarlete; B – distální část hlavy nadvarlete; C – tělo nadvarlete; D – distální část ocasu nadvarlete; E – ejakulované spermie; F – kapacitované spermie z distální části nadvarlete; G – ejakulované spermie (Fàbrega et al. 2011).

Kumaresan et al. (2012) ve své práci popisovali vzory tyrosinové fosforylace u kančích kryokonzervovaných spermíích. Popsali, že se liší účinek oviduktní tekutiny na fosforylaci proteinů dle použité metody zmrazení buněk. Detekovali pět různých vzorů P-Tyr (obr. 14). Vzorky byly zasušeny na vzduchu a poté fixovány etanolem.



Obrázek 14: Imunolokalizace tyrosinové fosforylace u kančích spermíích: A – fluorescence v akrosomální oblasti; E – fluorescence v subekvatoriálním segmentu; T – fluorescence v bičíku; AE – fluorescence v akrosomu i subekvatoriálním segmentu; AET – fluorescence v akrosomu, subekvatoriálním segmentu a bičíku (Kumaresan et al. 2012).

Luño et al. (2013) ve své práci popsali vzory tyrosinové fosforylace kančích spermíích. Pro lepší analýzu rozdělili spermie do tří odlišných kategorií dle Petrunkina et al. (2003) (obr. 15). Do vzoru I patřily spermie s nízkou kapacitační úrovní – spermie bez fluorescence v sEqS, s/nebo bez fluorescence v akrosomálním regionu nebo bičíku. Vzor II byly spermie se střední kapacitační úrovní – se signálem v sEqS, bez signálu v akrosomu a s nebo bez signálu v bičíku. Vzor III byl typický pro spermie s vysokou kapacitační úrovní – signál v sEqS a akrosomu a s nebo bez signálu v bičíku.



Obrázek 15: Vzory tyrosinové fosforylace u kančích spermíích: Pattern I – nízká kapacitační úroveň; pattern II – střední kapacitační úroveň; pattern III – vysoká kapacitační úroveň (Luño et al. 2013)

3.9 METODY FIXACE SPERMIÍ

Za účelem detekce intracelulárních antigenů musí být buňky nejprve permeabilizovány, zejména po fixaci zesíťovacími činidly, jako je formaldehyd a glutaraldehyd (Larsson 2000). Permeabilizace poskytuje přístup k intracelulárním nebo intraorganelárním antigenům. Běžně se používají dva obecné typy činidel: organická rozpouštědla, jako je metanol a aceton, a detergenty, jako saponin, Triton X-100 a Tween-20. Organická rozpouštědla rozpouštějí lipidy z buněčných membrán, což je činí propustné pro protilátky. Protože organická rozpouštědla také koagulují proteiny, mohou být použity k fixaci a permeabilizaci buněk ve stejnou dobu. Tato rozpouštědla však mohou také extrahovat lipidové antigeny z buněk (Jamur & Oliver 2010a).

Saponin je rostlinný glykosid, který interaguje s membránovým cholesterolem a vytváří otvory v membráně. Nevýhodou detergentů, jako Triton X-100 a Tween-20 je to, že mají neselektivní povahu a mohou spolu s lipidy extrahovat proteiny (Jamur & Oliver 2010a).

Fixace je jedním z nejdůležitějších kroků při imunoznačení. Jejím cílem je dosažení dobré morfologické konzervace a zároveň zachování antigenicity (Jamur & Oliver 2010b). Spermie jsou pokryty několika membránami, z nichž každá je pravděpodobně antigeně jedinečná. Předpokládá se, že některé fixační látky a okolnosti přípravy preparátů vystavují vnitřní spermatické antigeny, a proto nejsou vhodné pro demonstraci povrchově specifických antigenů imunocytochemickými testy (Haas et al. 1988).

Fixace by měla být prováděna šetrným způsobem, na jedné straně by terciální struktura antigenní molekuly neměla být denaturována a na druhé straně by měla být struktura a ultrastruktura buněk dobře udržována (Van Ewijk et al. 1984).

V některých studiích se zkoumaly schopnosti fixačních činidel – glutaraldehyd, aceton, metanol, paraformaldehyd a jodistan-lysin-paraformaldehyd (PLP). Používají se vždy dva styly přípravy preparátů, a to sušení vzduchem nebo udržování spermií v kapalné fázi (suspenze) k udržení integrity spermatických membrán na ultrastrukturální úrovni (Haas et al. 1988).

4 MATERIÁLY A METODIKA

4.1 ZPRACOVÁNÍ EJAKULOVANÝCH SPERMIÍ

Vzorky ejakulovaných spermií pocházely z inseminačních dávek od dospělých kanců plemene *Landrace* ze společnosti Proagro Nymburk a.s. Jednalo se vždy o vzorky odebírané ten samý den, co nám byly dovezeny. Spermie byly převáženy v odběrové plastové nádobě uložené v polystyrenovém přenašeči, aby se předešlo chladovému šoku a znehodnocení vzorku. Veškerá další manipulace se spermiemi probíhala v prostorách laboratoře na KVD ČZU. Prvním krokem bylo odstříhnutí vršku odběrové nádoby a opatrné přelití obsahu do sterilní falkony. Suspenze spermií byla dále uložena v inkubátoru při 17 °C.

Pro další zpracování spermií byl použit promývací roztok PBS (0,01 M Phosphate-buffered saline, 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA). V tomto roztoku byly spermie promývány a centrifugovány (Eppendorf 5702) 3x po dobu 10 minut při 250 x g při laboratorní teplotě. Spermie byly promývány v 8 ml PBS. Po zpracování spermií byla provedena *in vitro* kapacitace a byly připraveny preparáty pro imunochemické metody detekce pomocí specifických protilátek. Preparáty spermií byly připraveny různými fixacemi a poté byla provedena detekce fosforylace pomocí specifické protilátky nepřímou imunofluorescenční mikroskopií. Vzorky spermií byly taktéž zpracovány pro Western blot analýzu.

4.2 KONCENTRACE SPERMIÍ

Pro další práci se vzorky spermií byla spočítána správná koncentrace. Stanovení koncentrace bylo provedeno hematocytometricky s využitím Bürkerovy komůrky. Bürkerova komůrka představuje speciálně upravené podložní sklo se dvěma počítacími ploškami, oddělených zářezem. V každé počítací plošce je mikromřížka o přesně definovaných rozměrech:

Hloubka: 0,1 mm

Plocha malého čtverce: $1/400 \text{ mm}^2 = 0,0025 \text{ mm}^2$

Plocha velkého čtverce: $1/25 \text{ mm}^2 = 0,04 \text{ mm}^2$

Před vlastním úkonem byla prvně zapnuta výhřevná destička mikroskopu na 37 °C. Do připravené mikroskopavky bylo přidáno 10 µl naředěného ejakulátu a 990 µl destilované vody. Vzniklý roztok byl lehce protřepán.

A) Postup počítání v komůrce

Na čistou a suchou komůrku bylo přiloženo krycí sklíčko tak, aby těsně přiléhalo k ploškám po stranách. Dobře protřepaná suspenze buněk byla nanesena po 10 µl ze strany na hranu krycího skla do obou mřížek. Poté byly mřížky sledovány pod světelným mikroskopem Nikon za použití objektivu 20x. Postupuje se vždy čtverec po čtverci směrem zleva doprava a shora dolů.

B) Hodnocení

Počet buněk v 1 mm³ (mikrolitru) suspenze lze určit vzorcem:

$$b = \frac{n}{c * v * h} * z$$

b = počet buněk v 1 mm³; **n** = celkový počet napočítaných buněk; **c** = počet čtverců, ve kterých se počítalo (40); **v** = plocha použitého čtverce; **h** = hloubka komůrky; **z** = použité ředění suspenze

4.3 KAPACITACE KANČÍCH SPERMIÍ

Byla spočítána koncentrace spermií, která byla v dávkách přibližně 5–8 x 10⁷ spermií/ml.

Příprava spermií pro *in vitro* kapacitaci:

- 1) suspenze spermií byla nejprve stočena na centrifuze (Eppendorf 5702, 250 g, 10 min, pokojová teplota)
- 2) suspenze byla 2x promyta v PBS (Sigma-Aldrich, USA) (pokaždé centrifugace 250 g, 10 minut)
- 3) po každé centrifugaci byl odsán supernatant pipetou

4) po druhém promytí byla peletka rozsuspendována v 10 ml TBM (Tris Buffer Medium, 1x koncentrovaný) (Ded et al. 2010) + 10 mg BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, USA), do konečné koncentrace buněk $2,5-5 \times 10^7$ spermií/ml

TBM (10x koncentrované)

20 mM TRIS (Sigma-Aldrich, USA)	2,422 g
3 mM KCl (Lach: Ner, ČR)	223,6 mg
10 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich, USA)	1,11 g
113,1 mM NaCl (Lach: Ner, ČR)	6,61 g
11 mM glukoza (Penta, ČR)	2,18 g
5 mM pyruvát (Sigma-Aldrich, USA)	550 mg
1 amp. Gentamycin (1 ml ATK) (Sigma-Aldrich, USA)	

Tabulka 1: *Komponenty pro přípravu 10x koncentrovaného TBM.*

Chemikálie byly rozpuštěny ve 100 ml H₂O a pH bylo upraveno pomocí HCl na 7,7. Roztok byl poté zfiltrován.

5) suspenze byla napipetována do mikrozkušavek po 500 μ l a vložena do termostatu (Sanyo CO₂ Incubator)

6) kapacitace: 38 °C, 1,5 hod (spermie z inseminační dávky), 5 % CO₂

7) kapacitace byla zhodnocena na základě proběhlé akrosomální reakce indukované pomocí kalcium ionoforu v koncentraci 5 μ M (Sigma-Aldrich, USA)

4.4 FIXACE SPERMIÍ

Fixace slouží k ochraně vzorku před degradací a zároveň uchovává přirozený tvar a uspořádání makromolekul uvnitř buňky. Díky fixaci spermií jsou ukončeny všechny probíhající biologické pochody a je zvýšena mechanická stabilita. V rámci této práce byla použita chemická fixace za použití preparátů ejakulovaných spermií a *in vitro* kapacitovaných spermií.

4.4.1 FIXACE 2% FORMALDEHYDEM VE VODĚ S BSA (DLE TARDIF ET AL., 2001)

Do připravené mikrozkušavky bylo napipetováno 1 ml suspenze spermií. Tato suspenze byla stočena na centrifuze (Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, 258 g, 20 °C, 10 minut). Po stočení byl odsán supernatant a k peletce bylo napipetováno 1000 µl nekapacitačního média TL-HEPES-PVA (CaCl₂·2H₂O 2 mM, KCl 3,2 mM, MgCl₂·6H₂O 0,5 mM, NaH₂PO₄·H₂O 0,4 mM, Lactic Acid 10 mM, NaCl 114 mM, NaHCO₃ 2 mM, Hepes 10 mM, Na pyruvate 0,2 mM, BSA 3mg/ml, gentamycin 50 µg/ml). Takto vzniklá suspenze byla stočena na centrifuze (Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, 258 g, 20 °C, 10 minut). Po stočení byla suspenze 2x promyta v TL-HEPES-PVA. Po druhém promytí byl odsán supernatant a k peletce bylo napipetováno 1000 µl 2% formaldehydu (Lach: Ner, ČR) ve vodě. Takto vzniklá suspenze byla inkubována 1 hodinu při 48 °C na třepačce (DLAB). Po inkubaci byla suspenze stočena na centrifuze (Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, 258 g, 20 °C, 10 min). Po odsátí supernatantu bylo k peletce přidáno 2% BSA-H₂O (Sigma-Aldrich, USA). Poté byla mikrozkušavka inkubována přes noc při 48 °C na třepačce (DLAB, SK-L 180-E). Druhý den byla suspenze stočena na centrifuze (Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, 258 g, 20 °C, 10 min), a promyta v 1 ml PBS. Tato suspenze byla poté napipetována na sklíčko a byl proveden roztěr. Po zaschnutí roztěru bylo přidáno 150 µl etanolu (AppliChem, Německo) a inkubováno po dobu jedné minuty. Poté byl etanol smyt pomocí PBS a sklíčko se nechalo zachnout.

4.4.2 FIXACE 2% FORMALDEHYDEM VE VODĚ (SUSPENZE)

Na vyznačená kolečka bylo napipetováno 20 µl suspenze spermií a 100 µl 2% formaldehydu (Lach: Ner, ČR) ve vodě. Tato suspenze byla inkubována po dobu 30 minut. Po uplynutí inkubační doby byla sklíčka opláchnuta PBS a posléze vysušena. Poté byla uložena do lednice.

4.4.3 FIXACE FORMALDEHYDEM NA SKLE

Do připravené mikrozkušavky bylo napipetováno 1 ml suspenze spermií. Tato suspenze byla stočena na centrifuze (Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, 258 g, 20 °C, 5 minut). Po stočení byl odstraněn supernatant a k peletce bylo přidáno 500 µl 2% formaldehydu (Lach: Ner, ČR). Takto připravená suspenze byla fixována 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubační doby byla suspenze znovu zcentrifugována a 2x promyta v PBS. Po druhém promytí byl odsán supernatant a peletka byla rozsuspendována v 500 µl PBS. Následně bylo napipetováno do

připravených koleček pomocí PAN Pen liquid rocker 20 µl suspenze spermií a byl proveden roztěr. Takto provedený roztěr se nechal zaschnout a poté byla skříčka uložena do lednice.

4.4.4 VLHKÁ FIXACE

Po promytí suspenze spermií (2x) byl odstraněn supernatant. Ke vzniklým peletám bylo přidáno 5 ml PBS a suspenze byla rozsuspendována. Pro všechny druhy fixací byla na podložní skříčko vymezena plocha pomocí hydrofobní fixy PAN Pen liquid rocker (Sigma-Aldrich, USA). Tato plocha byla ve tvaru dvou koleček. Jedno bylo pro další vyhodnocení použito jako detekční vzorek a druhé sloužilo jako kontrola. Do obou koleček bylo nanášeno 20 µl suspenze spermií v PBS a 50 µl aceton (Lach: Ner, ČR): metanol (VWR, BDH Chemicals, Francie) v poměru 1:1. Tato suspenze byla inkubována 5 minut. Po inkubaci bylo skříčko opláchnuto PBS (Sigma-Aldrich, USA) a po zaschnutí uloženo do lednice.

Následující čtyři druhy fixací byly pouze modifikací této vlhké fixace. Postup přípravy byl stejný, lišil se pouze v přidávaném druhu a koncentraci chemikálie. Pracovalo se zvláště s metanolem a acetonem, jako fixačními prostředky. U obou látek byla použita různá koncentrace, a to 70% a 35%. U 70% fixace bylo použito 20 µl suspenze spermií a 50 µl vymraženého acetonu nebo metanolu. U 35% fixace bylo použito 20 µl suspenze spermií a 25 µl vymraženého acetonu nebo metanolu.

4.4.5 ZASUŠENÍ SPERMIÍ S NÁSLEDNOU FIXACÍ

V tomto případě se jednalo o roztěry spermií pozvolna zaschlých na podložním skříčku na vzduchu. Do vyznačených koleček pomocí PAN Pen liquid rocker bylo napipetováno 20 µl suspenze spermií a byl proveden roztěr. Takto provedený roztěr se nechal zaschnout a poté byl uložen do lednice.

Následující dvě fixace byly taktéž modifikací této fixace. Po zasušení spermií byla provedena ještě následná fixace vymraženým metanolem a acetonem. Po zaschnutí roztěru byla skříčka vložena do kyvet s vymraženým 100% metanolem a 100% acetonem. V kyvetě byla inkubována 10 minut. Po uplynutí inkubační doby byla skříčka opláchnuta PBS a posléze vysušena. Poté byla uložena do lednice.

4.5 NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE – DETEKCE FOSFORYLOVANÝCH PROTEINŮ

Imunofluorescenční mikroskopie je imunohistochemická technika pro detekci a lokalizaci antigenů po jejich reakci s protilátkami označenými fluorescenčními látkami. Nepřímá imunofluorescence spočívá ve značení buněčné struktury pomocí primární specifické protilátky proti proteinu s následným zviditelněním pomocí sekundární protilátky konjugované s fluochromem.

Detekce fosforylovaných proteinů byla provedena pomocí dvou protilátek, a to pomocí protilátky proti fosfotyrosinu (klon 4G10; EMD Millipore, USA) a proti fosfoserinu (AB1603; EMD Millipore, USA). Postup detekce byl u obou protilátek stejný.

Vyhodnocení detekce fosforylace bylo provedeno imunofluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E 600. Nafocení preparátů bylo provedeno pomocí kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi 1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

4.5.1 DETEKCE PROTEINŮ POMOCÍ PROTILÁTKY PROTI FOSFOTYROSINU A FOSFOSERINU

Detekce proteinů byla provedena na již připravených sklíčkách se zafixovanými spermii, které byly uloženy v ledničce. Sklíčka byla opláchnuta PBS pomocí Pasteurovy pipety a poté byla vysušena. Po vysušení byla provedena blokáce Super Blockem (Thermo Scientific, USA). Do obou koleček bylo napipetováno 150 μ l SuperBlocku. Preparáty byly vloženy do vlhké komůrky, kde byly inkubovány 30 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí inkubační doby byly preparáty opět promyty PBS a poté vysušeny. Dále proběhla inkubace primární monoklonální myší protilátky proti fosfotyrosinu (klon 4G10) v PBS v poměru 1:300 nebo polyklonální králičí protilátky proti fosfoserinu ředěné v PBS v poměru 1:100. Do levého kolečka bylo napipetováno 100 μ l protilátky, do pravého kolečka, představující negativní kontrolu, bylo napipetováno 100 μ l PBS. Preparáty byly poté inkubovány přes noc ve vlhké komůrce v lednici. Další den byly preparáty promyty v PBS a poté vysušeny. Dále byla provedena inkubace se sekundární protilátkou anti-mouse konjugovanou s FITC (Alexa FluorTM 488, Invitrogen, USA). Sekundární protilátka byla zředěna v PBS v poměru 1:400. Nebo byla provedena inkubace se sekundární protilátkou anti-rabbit (Alexa FluorTM 488, Invitrogen, USA) ředěnou 1:300 v PBS. Takto naředěný roztok byl napipetován po 100 μ l na obě kolečka. Preparáty byly inkubovány stále ve vlhké komůrce v lednici po dobu jedné

hodiny. Po inkubaci byly preparáty promyty v PBS a poté vysušeny. Do levého kolečka bylo nanášeno 100 µl roztoku PNA s rhodaminem (Rhodamin Peanut Agglutinin, Vector Laboratories, USA) v PBS v poměru 1:500. Do negativní kontroly bylo nanášeno 100 µl PBS. Byla provedena inkubace ve vlhké komůrce a tmě 30 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí inkubační doby byly preparáty promyty v PBS a destilované vodě a následně vysušeny. Na obě kolečka bylo napipetováno 2 µl VectaShield DAPI (Antifade Mounting Medium, Vector Laboratories, USA) a preparát byl překryt krycím sklíčkem. Tím byla prodloužena doba imunofluorescence preparátů a současně označena jaderná DNA. Krycí sklíčko bylo zafixováno lakem na nehty. Preparáty byly posléze ještě uloženy do vlhké komůrky na 10 minut. Následovala imunofluorescenční mikroskopie.

4.6 SDS ELEKTROFORÉZA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU (SDS-PAGE)

SDS-PAGE je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS) (GE Healthcare, Life Sciences, Švédsko), což je detergent, který rozbaluje proteiny a uděluje jim uniformní záporný náboj. Proteiny putují v elektrickém poli ke kladné elektrodě a jsou rozděleny podle své molekulové hmotnosti.

Pro chod SDS elektroforézy byla sestavena aparatura od Bio-Rad se skly a vložena do stojanu. Následně byl připraven 15% separační gel (spodní).

15% separační gel:

Resolving gel buffer (1,5M TRIS-HCl buffer, pH 8,8; Bio-Rad, USA)	2.5 ml
Acrylamide/bis-acrylamide 30% solution (Bio-Rad, USA)	5,0 ml
H₂O	2,5 ml
100 µl 10% SDS (dodecyl sulfát sodný; 10 g SDS rozpustit ve 100 ml H ₂ O; Bio-Rad, USA)	
Těsně před aplikací 4,5 µl TEMEDu (Pharmacia Biotech, Švédsko)	
70 µl 10% APS (persíran amonný – 1 g APS do 10 ml dH ₂ O, Amersham Biosciences, Švédsko)	

Tabulka 2: Komponenty pro přípravu 15% separačního gelu.

Separací gel byl pipetován mezi skla a byl převrstven destilovanou vodou (dH₂O). Poté proběhla polymerace gelu asi 30 minut. Následně byl připraven roztok pro zaostřovací gel.

Příprava zaostřovacího gelu (horního s jamkami) 4%

dH₂O	1,52 ml
Stacking gel buffer (0,5M Tris-HCl, pH 6,8; Bio-Rad, USA)	0,625 ml
Acrylamidelbis-acrylamide 30% solution (Sigma-Aldrich, USA)	0,325 ml
10 % SDS (dodecylsulfát sodný; Bio-Rad, USA)	0,025
Těsně před aplikací 3,8 µl TEMEDu (Pharmacia Biotech, Švédsko)	
50 µl 10% APS (persíran amonný; Amersham Biosciences, Švédsko)	

Tabulka 3: Komponenty pro přípravu zaostřovacího gelu.

Ihned byly do zaostřovacího gelu vloženy hřebínky a byly v něm nechány po dobu cca 10 minut, než došlo k polymeraci. Aparatura s připraveným gelem byla vložena do vany, která byla zalita elektrodoým puřrem (Tris 15 g, glycin 72 g, SDS 5 g; ředit 1:4 s dH₂O). Po zalití byly vyndány hřebínky a do vzniklých jamek bylo naneseo 15 µl lyzátu buněk a 4 µl molekulárních proteinových standardů (Dual Color, Bio-Rad, USA). Elektroforéza probíhala cca 20 minut při 80 V (průchod vzorku před zaostřovací gel), pak cca 1 hodinu při 140 V.

Příprava vzorku

Po promytí buněčné suspenze byl odstraněn supernatant. Ke zbylé peletce bylo přidáno 5 ml PBS a peletka byla rozsuspendována. Suspenze buněk byla rozdělena po 1 ml do mikrozkuavek a proběhla centrifugace (Eppendorf 5702, 250 g, 10 min, pokojová teplota).

Extrakce proteinů byla připravena lyzací ve vzorkovém puřru (0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8; glycerol; 2% SDS; 0,05% bromfenolová modř; Sigma-Aldrich, USA) pro SDS elektroforézu. Extrakce probíhala na ledu 30 minut, vzorek byl každých 5 min protřepán a pak 5 minut povařen při 100 °C. Nakonec proběhla centrifugace pro odstředění zbytků buněk (10 000 g, 4 °C, 3 min) a vzorek byl uchováván v mrazáku při -20 °C.

4.7 WESTERN BLOT (ELEKTROPŘENOS)

Western blot navazuje na proteinovou elektroforézu (SDS-PAGE). Jde o elektropřenos proteinů rozdělených pomocí SDS-PAGE na nitrocelulózovou (NC) membránu (HybondTM-C Extra, Amersham Biosciences, Švédsko).

Transferový pufr:

Pro výrobu transferového pufru bylo použito 3,03 g Tris (Sigma-Aldrich, USA) a 14,4 g glycin (Sigma-Aldrich, USA). Tyto dvě složky byly rozpuštěny ve 200 ml destilované vody, bylo k nim přidáno 200 ml metanolu a doplněno do 1 litru destilovanou vodou.

Příprava membrány pro elektropřenos:

- 4 výstrižky chromatografického papíru Whatman,
- NC membrána,
- 2 houbičky byly namočený na 15 minut do transferového pufru.

„Sendvič“ byl orientován tak, aby proteiny z gelu, které mají stále záporný náboj, putovaly směrem k membráně, tedy k záporné elektrodě. Kazeta byla vložena do blotovacího rámu a ten pak do vaničky s transferovým pufrem. Aparatura byla chlazena gelem a elektropřenos probíhal po dobu 1,5 hodiny při konstantním elektrickém proudu 500 mA. Po elektropřenosu byla kazeta vyjmuta, rozebrána a membrána vyndána a byla provedena imunodetekce proteinů pomocí specifické protilátky.

4.8 IMUNODETEKCE POMOCÍ PROTILÁTKY PROTI FOSFOTYROSINU A FOSFOSERINU

NC membrána byla po elektropřenosu omyta destilovanou vodou a poté PBS (0,01 M Phosphate-buffered saline, 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA). Kontrola průběhu SDS elektroforézy a elektropřenosu byla provedena pomocí barvení proteinů na membráně barvičkou Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA) po dobu jedné minuty. Poté bylo obarvené pozadí odmyto destilovanou vodou a PBS do odmytí Ponceau. Deaktivace volných míst na membráně bylo provedeno pomocí 5% sušeného mléka (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad,

USA) v PBS 1 hodinu při RT na třepačce. Následně byla membrána 2x promyta po pěti minutách v PBS s 0,1 % Tweenem pro odstranění nespecifických interakcí. Promývání stále probíhalo na třepačce. Následovala inkubace s primární myší monoklonální protilátkou proti fosfotyrosinu (klon 4G10) ředěnou v PBS v poměru 1:5000 nebo s polyklonální králičí protilátkou proti fosfoserinu ředěnou v PBS v poměru 1:500. Inkubace proběhla přes noc v lednici. Membrána byla poté promyta 3x po 10 minutách v PBS s 0,1 % Tweenem. Dále byla provedena inkubace se sekundární protilátkou (anti-mouse/ anti-rabbit) proti myším nebo králičím imunoglobulinům konjugované s křenovou peroxidázou (Bio-Rad, USA) 1 hodinu při RT na třepačce. Sekundární protilátky byly ředěny v PBS v poměru 1:3000. Poté byla membrána promyta 4x po pěti minutách v PBS s 0,1 % Tweenem a 2x po pěti minutách v PBS bez Tweenu. Následovala vizualizace specifické detekce proteinu protilátkou – chemiluminiscence se substrátem PierceTM ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fischer Science, USA) při použití přístroje Azure c600 Gel Imaging System (Azure Biosystems, USA).

Pro kontrolu proteinové koncentrace v jednotlivých vzorcích byla použita detekce α -tubulinu pomocí myší monoklonální protilátky (DM1A; Sigma-Aldrich, USA) v koncentraci 1:5000 v PBS). Denzitometrická analýza byla provedena v programu Image Studio Digits 4.0 (C-Digit, USA).

4.9 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

Pro statistické vyhodnocení zpracovaných výsledků byly použity dva statistické programy, a to STATISTICA 12 (StatSoft, Česká republika) a GraphPad (USA). Statisticky významné rozdíly byly zjištěny provedením analýzy rozptylu ANOVA, konkrétně byl použit Tukeyuv test.

5 VÝSLEDKY

5.1 DETEKCE FOSFORYLOVANÝCH PROTEINŮ

Za účelem detekce fosforylace proteinů kančích spermiích před a po kapacitaci *in vitro* (kap. 4.3.), byly provedeny chemické fixace pomocí různých metod za použití různých chemikálií v různé koncentraci (kap. 4.4.). Pro detekci fosforylovaných proteinů ve spermiích kance byla použita metoda nepřímé imunofluorescenční mikroskopie s použitím zafixovaných spermií (kap. 4.5.1.). Fixované buňky byly inkubovány s myší monoklonální (protilátka proti fosfotyrosinu) a králičí polyklonální (protilátka proti fosfoserinu) primární protilátkou ředěnou v PBS a vhodnou sekundární protilátkou.

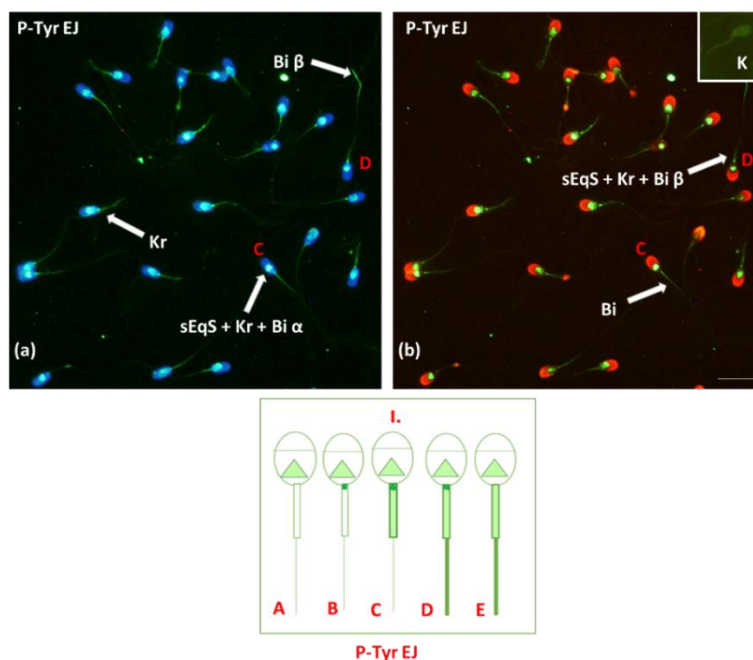
5.1.1 DETEKCE FOSFORYLOVANÝCH PROTEINŮ POMOCÍ PROTILÁTKY PROTI FOSFOTYROSINU

Výsledky detekce fosforylovaných proteinů pomocí protilátky proti fosfotyrosinu ve spermiích kance jsou ukázány na následující sérii snímků. U každé fixace je doložena fosforylace proteinů jak u vzorků s ejakulovanými spermiemi, tak u vzorků s *in vitro* kapacitovanými spermiemi. Obě tyto skupiny vzorků byly rozděleny na dvě podskupiny, které byly označeny jako nekapacitované (I.) a kapacitované spermie (II.) podle proběhlé fosforylace. Toto rozdělení na podskupiny bylo provedeno podle Tardif et al. (2001), který popsal proběhlou fosforylaci v *in vitro* kapacitované spermii v akrosomu. U nekapacitované spermie se fosforylace v akrosomu nevyskytuje. Pro lepší přehlednost zde nejsou zařazeny obrázky se značením všech třech fluochromů (DAPI, FITC, PNA), kvůli překrývání vrstev a špatné viditelnosti fosforylovaných míst. Imunolokalizace byla provedena dle metodiky (kap. 4.5.1.) pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie. Snímky jsou označeny jako (a) DAPI + FITC a (b) FITC + PNA. Ke všem snímkům jsou doloženy ještě obrázky specifických fosforylačních vzorů.

Fixace 2% formaldehydem ve vodě s BSA (dle Tardif et al. 2001)

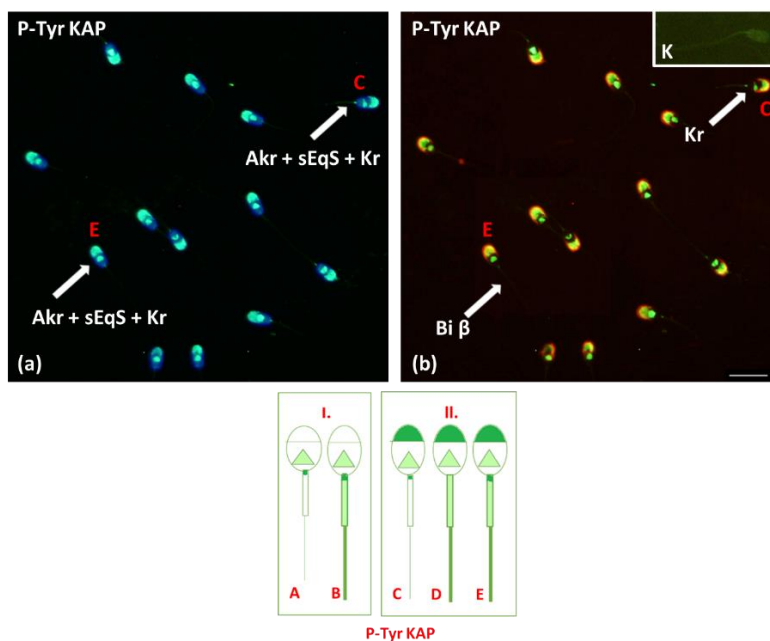
V první řadě snímků (obr. 16) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u ejakulovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI a FITC. Značení pomocí DAPI (modře) vykresluje hlavičku spermie (jádro) a zelené značení FITC detekuje fosforylaci. Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou

lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. U všech fixací nebyla negativní kontrola inkubována s primární protilátkou a nevykazovala žádnou imunofluorescenci proteinů. Fosforylace je viditelně detekována v subekvatoriálním segmentu a v některých případech i v bičíku. Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvláště znázorněné na třetím obrázku. U spermie označené vzorem C je viditelná fosforylace v subekvatoriálním segmentu (sEqS), krčku (Kr) a střední (mitochondriální) části bičíku (Bi α). U vzoru D probíhala fosforylace navíc ještě v koncové části bičíku (Bi β). U této fixace se u ejakulovaných spermií vyskytovaly ještě další tři vzory, které jsou znázorněny na posledním obrázku. U všech fosforylace proběhla v subekvatoriálním segmentu. U vzoru A byla detekována fosforylace pouze v subekvatoriálním segmentu (sEqS), u vzoru B v sEqS a krčku (Kr) a u posledního vzoru E proběhla fosforylace v sEqS a v celé délce bičíku (Bi β). Dle rozdělení na dvě podskupiny dle Tardif et al. (2001) lze bez přítomnosti fosforylace v akrosomu (Akr) považovat všechny spermie jako nekapacitované (I.).



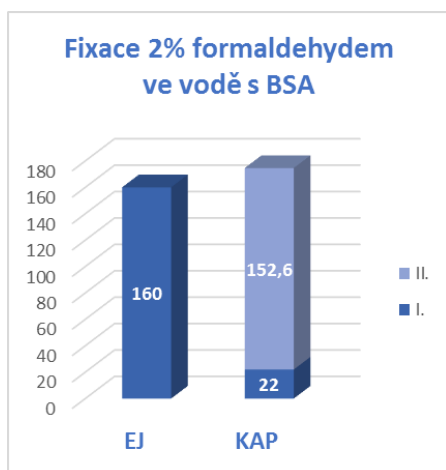
Obrázek 16: Ejakulované spermie – fixace 2% formaldehydem ve vodě s BSA: Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermiích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Kr krček, sEqS subekvatoriální segment, Bi bičík (α – mitochondriální část bičíku, β – celá délka bičíku), K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V další řadě snímků (obr. 17) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u *in vitro* kapacitovaných spermíí. Na prvním snímku (a) je značena hlavička (jádro) spermie pomocí DAPI (modře) a fosforylace pomocí FITC (zeleně). Na druhém snímku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr značené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně) a také je do pravého horního rohu vložena negativní kontrola (K). Fosforylace je viditelně detekována v akrosomu a v subekvatoriálním segmentu hlavičky spermie. U některých vzorů se vyskytovala i v bičíku. Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace. U vzoru označeného C proběhla fosforylace v akrosomu, subekvatoriálním segmentu a krčku. U vzoru E proběhla fosforylace ještě navíc v celé délce bičíku (Bi β). Taktéž se u této fixace *in vitro* kapacitovaných spermíí vyskytovaly další tři vzory, které jsou znázorněny na třetím obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A a B, se nevyskytovala fosforylace v akrosomu (Akr), proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru A byla detekována fosforylace v sEqS a Kr, u vzoru B ještě v celé délce bičíku (Bi β). Druhá podskupina (II.) obsahovala spermie kapacitované, díky fosforylaci v akrosomu. U vzoru D proběhla fosforylace v Akr a v celé délce bičíku (Bi β).



Obrázek 17: Kapacitované spermie – fixace 2% formaldehydem ve vodě s BSA: Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermíích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, sEqS subekvatoriální segment, Kr krček, Bi β celá délka bičíku; K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μl, zvětšení 400x.

V grafu 1 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií zařazených do dvou podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermií proběhla fosforylace u 160 spermií z 200 napočítaných buněk (80 %). U *in vitro* kapacitovaných spermií proběhla u 174,6 spermií z 200 napočítaných buněk (87,3 %). U ejakulovaných spermií se vyskytovala pouze první podskupina vzorů (I) – nekapacitované spermie (160 buněk), díky absenci fosforylace v akrosomu spermie. U *in vitro* kapacitovaných spermií první podskupina vzorů (I.), označována jako nekapacitované spermie, obsahovala 22 spermií (12,6 %). U těchto spermií kapacitace neproběhla. Druhá skupina (II.), kapacitované spermie, obsahovala 152,6 spermií (87,4 %). U této fixace dle výrazně převažující podskupiny II. u *in vitro* kapacitovaných spermií a pouze samotné podskupiny I. u ejakulovaných lze bezpečně detekovat kapacitaci kančích spermií určenou dle fosforylace v akrosomu spermie.

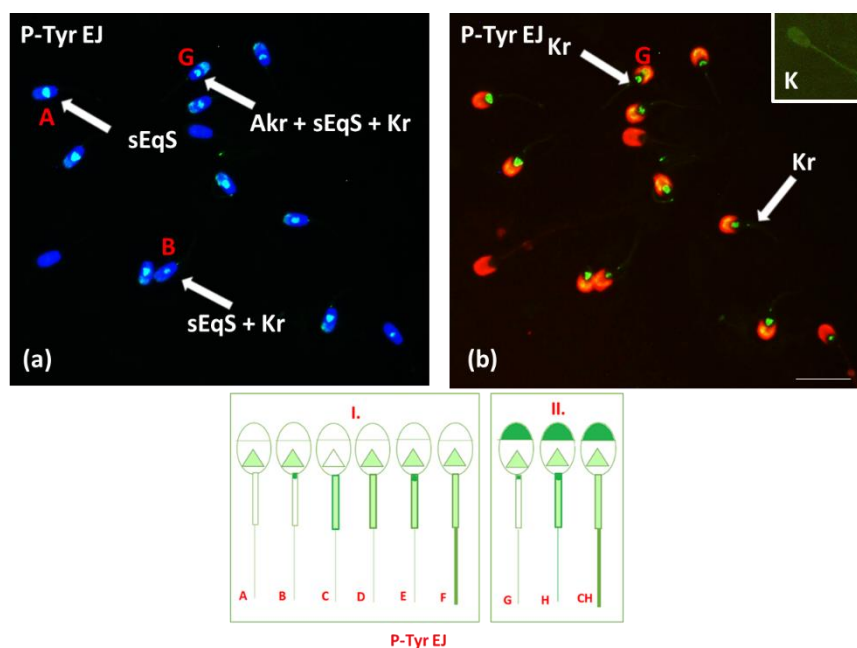


Graf 1: Průměrné četnosti dvou podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermií: U ejakulovaných (EJ) spermií se vyskytuje pouze podskupina vzorů I. 160 buněk a u kapacitovaných spermií (KAP) tvoří podskupinu I. 22 buněk a podskupinu II. 152,6 buněk.

Fixace 2% formaldehydem ve vodě

V první řadě snímků (obr. 18) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u ejakulovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Fosforylace je viditelně detekována v subekvatoriálním segmentu, v bičíku a v některých případech i v akrosomu. Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvláště znázorněny na třetím obrázku. U spermie označené

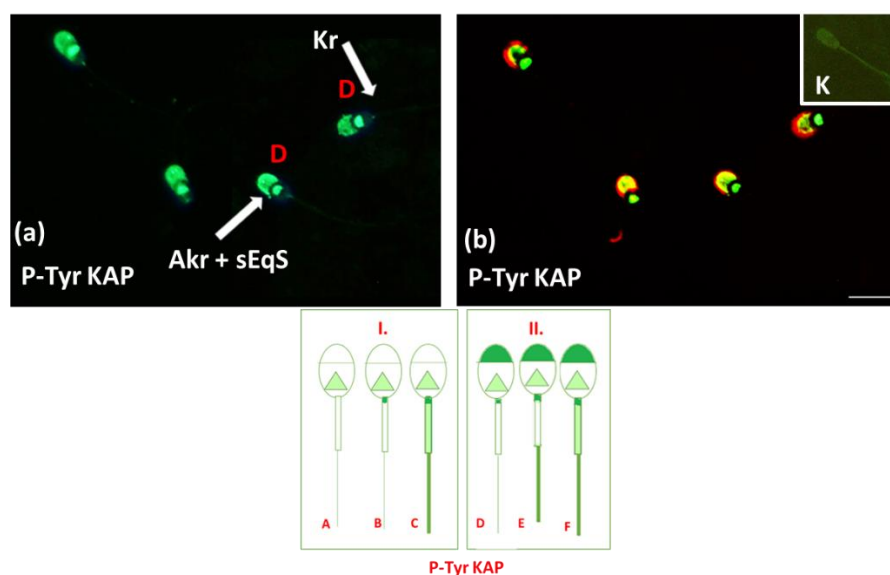
vzorem A byla detekována fosforylace pouze v sEqS. U vzoru B probíhala fosforylace navíc ještě v Kr. Vzor D se od nich lišil tím, že obsahoval fosforylaci i v Akr. U této fixace se u ejakulovaných spermií vyskytovalo ještě dalších šest vzorů, které jsou znázorněny na posledním obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až F, se nevyskytovala fosforylace v Akr, proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru C byla detekována fosforylace pouze v mitochondriální části bičíku (Bi α), u vzorů D až F proběhla fosforylace v sEqS a v různé míře v Bi a Kr. Ve druhé podskupině (II.), kam patří G až CH, byla detekována fosforylace v akrosomu, tudíž se jevíly jako kapacitované. U vzoru H navíc proběhla fosforylace v krčku a Bi α a u vzoru CH v Bi β .



Obrázek 18: Ejakulované spermie – fixace 2% formaldehydem ve vodě: Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, Kr krček, sEqS subekvatoriální segment, K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V další řadě snímků (obr. 19) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u *in vitro* kapacitovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie označeny pomocí DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na druhém snímku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označeny pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně) a také je do pravého horního rohu vložena negativní kontrola (K). Fosforylace je viditelně detekována v akrosomu a subekvatoriálním segmentu

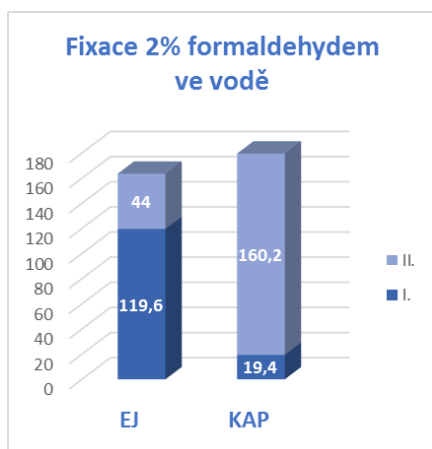
hlavičky spermie. U některých vzorů se vyskytovala i v bičíku. Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace. U vzoru označeného jako D proběhla fosforylace v Akr, sEqS a Kr. Taktéž se u této fixace *in vitro* kapacitovaných spermii vyskytovalo dalších pět vzorů, které jsou znázorněny na třetím obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až C, se nevyskytovala fosforylace v akrosomu (Akr), proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru A byla detekována fosforylace pouze v sEqS, u vzoru B ještě v Kr. Vzor C se vyznačoval fosforylací v sEqS, Kr a v Bi β. Druhá podskupina (II.) obsahovala spermie kapacitované, díky fosforylaci v akrosomu (vzory D až F). U vzoru E proběhla fosforylace v Akr, Kr a koncové části Bi. Vzor F se vyznačoval fosforylací v Akr, sEqS, Kr a Bi β.



Obrázek 19: *Kapacitované spermie – fixace 2% formaldehydem ve vodě: Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermii (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, sEqS subekvatoriální segment, Kr krček; K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.*

V grafu 2 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermii zařazených do dvou podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermii proběhla fosforylace u 163,6 spermii z 200 napočítaných buněk (81,8 %). U *in vitro* kapacitovaných spermii proběhla u 179,6 spermii z 200 napočítaných buněk (89,8 %). U ejakulovaných spermii první podskupina (I.), nekapacitované spermie, obsahovala 119,6 buněk (73,1 %) díky absenci fosforylace v akrosomu spermie.

Podskupina II., spermie jeví se jako kapacitované, obsahovala 44 buněk (26,9 %). U *in vitro* kapacitovaných spermii první podskupina fosforylačních vzorů (I.), označována jako nekapacitované spermie, obsahovala 19,4 spermii (10,8 %). U těchto spermii kapacitace neproběhla. Druhá skupina (II.), kapacitované spermie, obsahovala 160,2 spermii (89,2 %). U této fixace dle výrazně převažující podskupiny II. u *in vitro* kapacitovaných spermii a převažující podskupiny I. u ejakulovaných spermii lze bezpečně detekovat kapacitaci kančích spermii určenou dle fosforylace v akrosomu spermie.

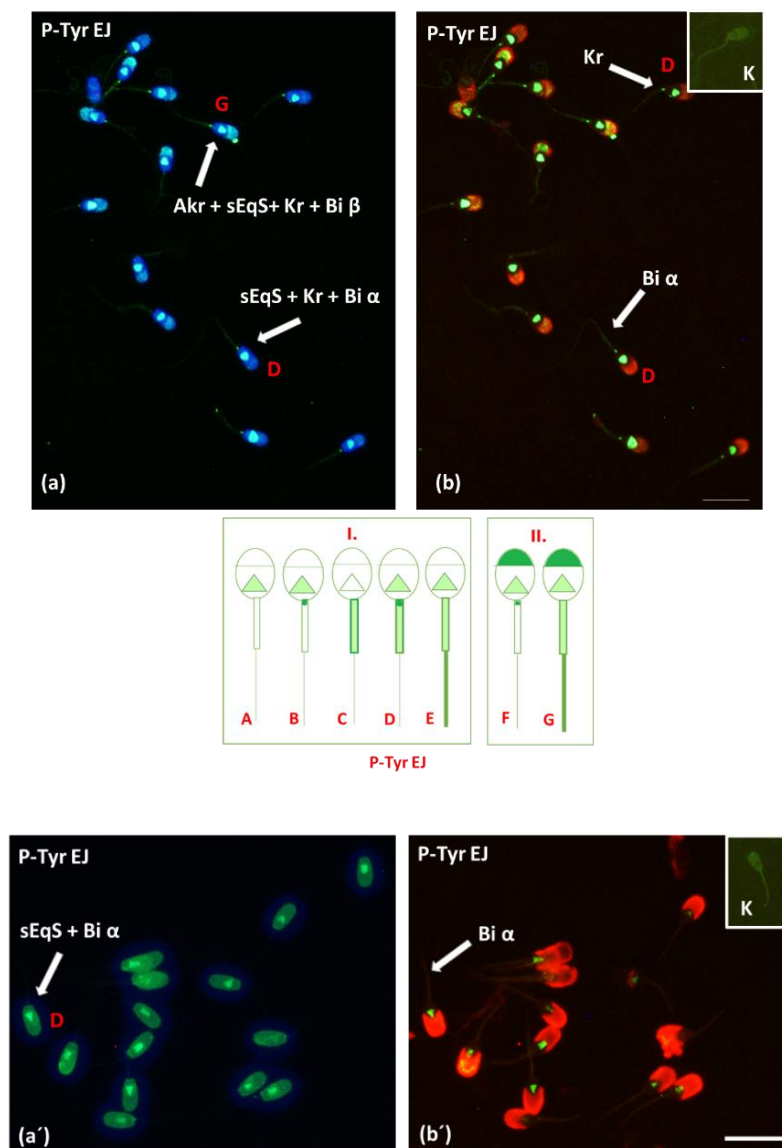


Graf 2: Průměrné četnosti dvou podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermii: U ejakulovaných (EJ) spermii se v podskupině I. vyskytuje 119,6 buněk, u podskupiny II. 44 buněk a u kapacitovaných spermii (KAP) tvoří podskupinu I. 19,4 buněk a podskupinu II. 160,4 buněk.

Fixace 2% formaldehydem na skle

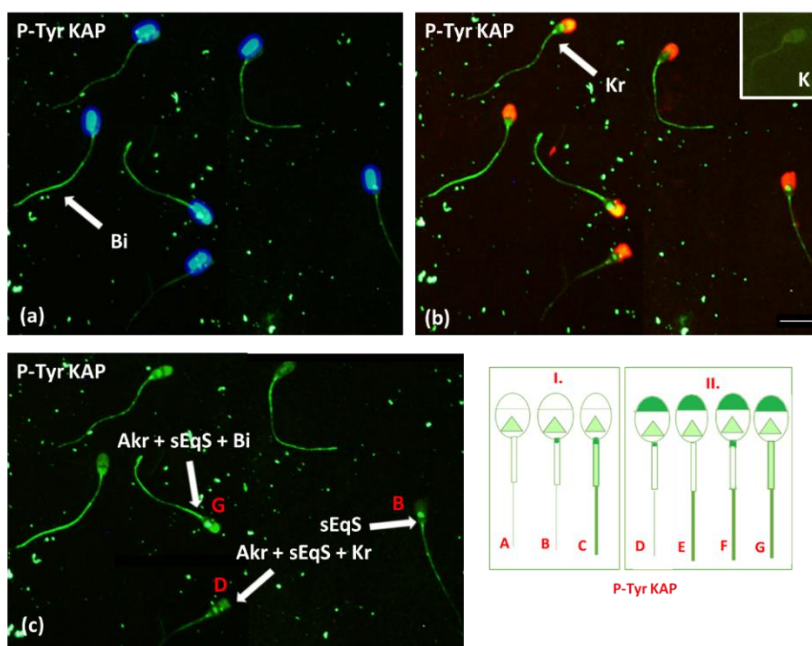
V první řadě snímků (obr. 20) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u ejakulovaných spermii. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Fosforylace je viditelně detekována v subekvatoriálním segmentu, v bičíku a v některých případech i v akrosomu. Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvláště znázorněny na třetím obrázku. U spermie označené vzorem D byla detekována fosforylace v sEqS, kr a Bi α . U vzoru G proběhla v Akr, sEqS, Bi β . U této fixace se u ejakulovaných spermii vyskytovalo ještě dalších pět vzorů, které jsou znázorněny na posledním obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až E, se nevyskytovala fosforylace v Akr, proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru A proběhla fosforylace pouze v sEqS, u B ještě v Kr. U vzoru C byla detekována fosforylace pouze

v mitochondriální části bičíku (Bi α). U vzoru E v sEqS a Bi β . Ve druhé podskupině (II.), kam patří F až G, byla detekována fosforylace v akrosomu, takže se jeví jako kapacitované. U vzoru F navíc proběhla fosforylace v sEqS a Kr.



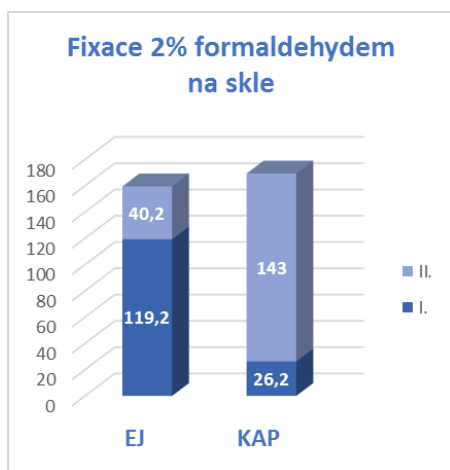
Obrázek 20: Ejakulované spermie – fixace 2% formaldehydem na skle: Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA; (a') – DAPI + FITC; (b') – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, Kr krček, sEqS subekvatoriální segment, Bi bičík (α – mitochondriální část bičíku, β – celá délka bičíku), K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V další řadě snímků (obr. 21) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u *in vitro* kapacitovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie označené pomocí DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na druhém snímku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně) a také je do pravého horního rohu vložena negativní kontrola (K). Fosforylace je viditelně detekována v akrosomu a subekvatoriálním segmentu hlavičky spermie. U některých vzorů se vyskytovala i v bičíku. Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace. U vzoru označeného B proběhla fosforylace v sEqS a Kr, u vzoru D v Akr, sEqS a Kr a u vzoru G v Akr, sEqS a Bi β . Taktéž se u této fixace *in vitro* kapacitovaných spermií vyskytovaly další čtyři vzory, které jsou znázorněny na třetím obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až C, se nevyskytovala fosforylace v Akr, proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru A byla detekována fosforylace pouze v sEqS, u vzoru C ještě v Kr a Bi β . Druhá podskupina (II.) obsahovala spermie kapacitované, díky fosforylaci v akrosomu (vzory D až G). U vzoru E proběhla fosforylace v Akr, sEqS a koncové části Bi. Vzor F se vyznačoval fosforylací v Akr, sEqS, Kr a koncové části Bi.



Obrázek 21: Kapacitované spermie – fixace 2% formaldehydem na skle: Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermiích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA; (c) - FITC); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, sEqS subekvatoriální segment, Kr krček, Bi bičík; K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V grafu 3 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií zařazených do dvou podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermií proběhla fosforylace u 159,4 spermií z 200 napočítaných buněk (79,7 %). U *in vitro* kapacitovaných spermií proběhla u 169,2 spermií z 200 napočítaných buněk (84,6 %). U ejakulovaných spermií první podskupina (I.), nekapacitované spermie, obsahovala 119,2 buněk (74,8 %) díky absenci fosforylace v akrosomu spermie. Podskupina II., spermie jevící se jako kapacitované, obsahovala 40,2 buněk (25,2 %). U *in vitro* kapacitovaných spermií první podskupina vzorů (I.), označována jako nekapacitované spermie, obsahovala 26,2 spermií (15,5 %). U těchto spermií kapacitace neproběhla. Druhá skupina (II.), kapacitované spermie, obsahovala 143 spermií (84,5 %). U této fixace dle výrazně převažující podskupiny II. u *in vitro* kapacitovaných spermií a převažující podskupiny I. u ejakulovaných spermií lze bezpečně detekovat kapacitaci kančích spermií určenou dle fosforylace v akrosomu spermie.

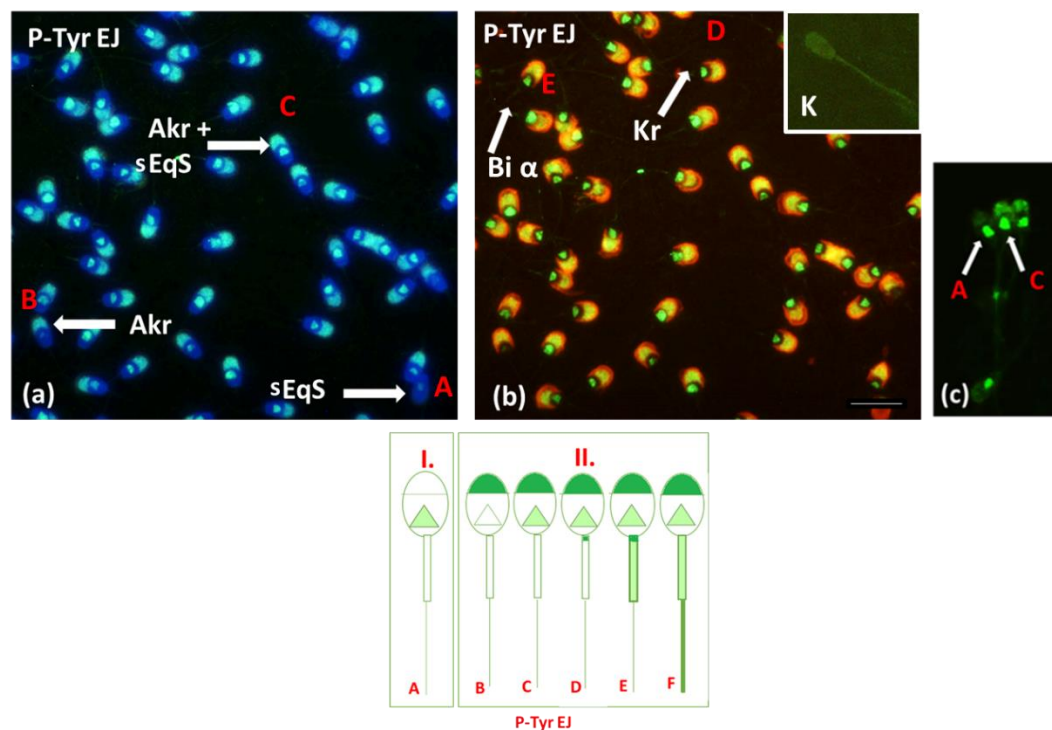


Graf 3: Průměrné četnosti dvou podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermií: U ejakulovaných (EJ) spermií se v podskupině I. vyskytuje 119,2 buněk, u podskupiny II. 40,2 buněk a u kapacitovaných spermií (KAP) tvoří podskupinu I. 26,2 buněk a podskupinu II. 143 buněk.

Vlhká fixace (aceton/metanol)

V první řadě snímků (obr. 22) je vložena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u ejakulovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu, Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Na obrázku (c) jsou spermie označeny pouze FITC.

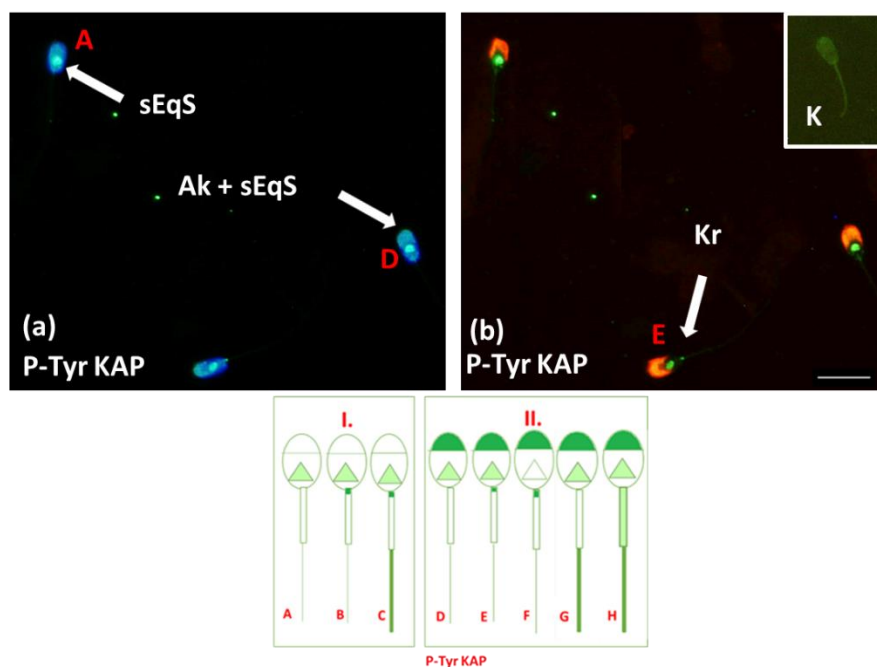
Fosforylace je viditelně detekována v sEqS a v Akr. Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvláště znázorněné na třetím obrázku. U spermie označené vzorem A byla detekována fosforylace pouze v sEqS a proto patří do první podskupiny (I.) nekapacitovaných spermií. Ostatní vzory spadající do druhé podskupiny (II.) se jeví jako kapacitované. Ve vzoru B proběhla pouze v Akr. U vzoru C v Akr a sEqS, u D v Akr, sEqS a Kr a u E v ještě navíc v Bi α . U vzoru F byla detekována fosforylace v Akr, sEqS a Bi β .



Obrázek 22: Ejakulované spermie – fixace vlhká (aceton/metanol): Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA; (c) FITC); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, Kr krček, sEqS subekvatoriální segment, Bi bičík (α – mitochondriální část bičíku), K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V další řadě snímků (obr. 23) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u *in vitro* kapacitovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené pomocí DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na druhém snímku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně) a také je do pravého horního rohu vložena negativní kontrola (K). Fosforylace je viditelně detekována v akrosomu a subekvatoriálním segmentu hlavičky spermie. U některých vzorů se vyskytovala i v bičíku. Pomocí šipek jsou označeny

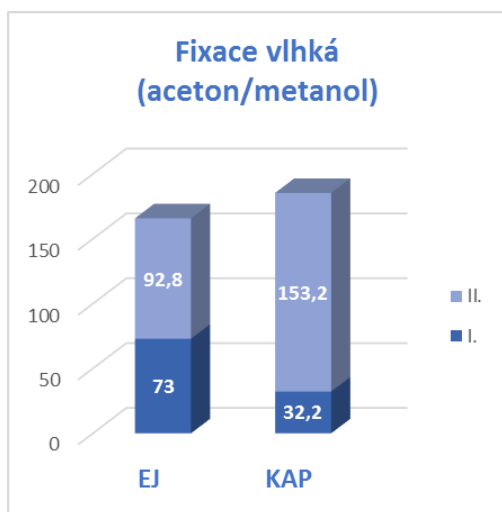
jednotlivé vzory této fixace. U vzoru A proběhla fosforylace v sEqS, u vzoru D v Akr, sEqS a u vzoru E v Akr, sEqS a Kr. Taktéž se u této fixace *in vitro* kapacitovaných spermií vyskytovalo dalších pět vzorů, které jsou znázorněny na třetím obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až C, se nevyskytovala fosforylace v Akr, proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru B byla detekována fosforylace v sEqS a Kr, u vzoru C v sEqS, Kr a koncové části Bi. Druhá podskupina (II.) obsahovala spermie kapacitované, díky fosforylaci v akrosomu (vzory D až H). U vzoru F proběhla fosforylace v Akr a Kr. Vzor G se vyznačoval fosforylací v Akr, sEqS a koncové části Bi a vzor H v Akr, sEqS a Bi β .



Obrázek 23: Kapacitované spermie – fixace vlhká (aceton/metanol): Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, sEqS subekvatoriální segment, Kr krček; K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V grafu 4 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií zařazených do dvou podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermií proběhla fosforylace u 165,8 spermií z 200 napočítaných buněk (82,9 %). U *in vitro* kapacitovaných spermií proběhla u 185,4 spermií z 200 napočítaných buněk (92,7 %). U ejakulovaných spermií první podskupina (I.), nekapacitované

spermie, obsahovala 73 buněk (44,1 %) díky absenci fosforylace v akrosomu spermie. Podskupina II., spermie jevící se jako kapacitované, obsahovala 92,8 buněk (55,9 %). U *in vitro* kapacitovaných spermii první podskupina vzorů (I.), označována jako nekapacitované spermie, obsahovala 32,2 spermii (17,4 %). U těchto spermii kapacitace neproběhla. Druhá skupina (II.), kapacitované spermie, obsahovala 153,2 spermii (82,6 %). U této fixace už nelze bezpečně detekovat kapacitaci kančích spermii určenou dle fosforylace v akrosomu spermie. U *in vitro* kapacitovaných spermii sice výrazně převažuje podskupina II., ale u ejakulovaných spermii jsou podskupiny celkem vyrovnané a vyskytuje se zde velký počet spermii z podskupiny II.

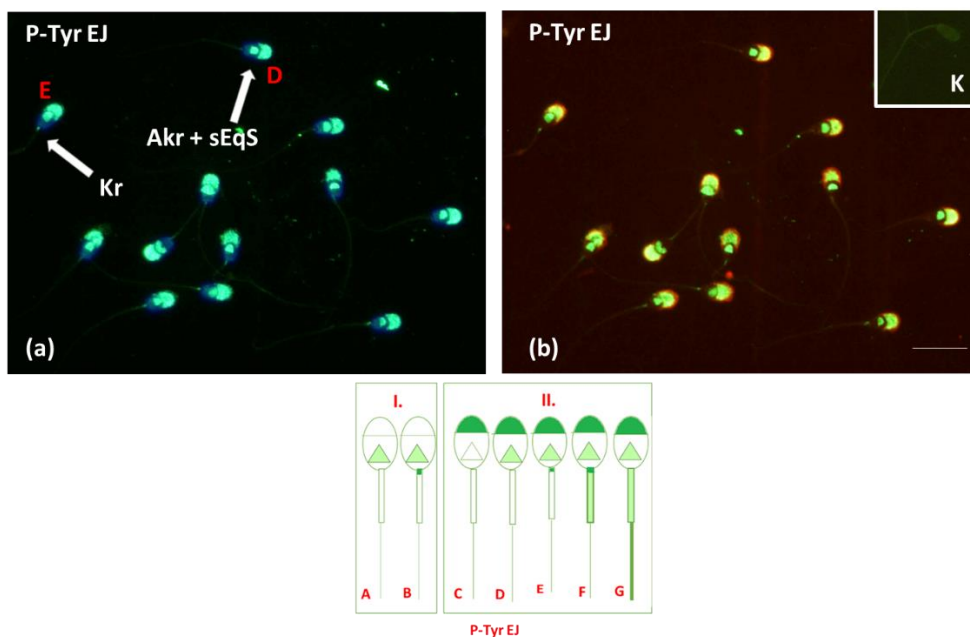


Graf 4: Průměrné četnosti dvou podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermii: U ejakulovaných (EJ) spermii se v podskupině I. vyskytuje 73 buněk, u podskupiny II. 92,8 buněk a u kapacitovaných spermii (KAP) tvoří podskupinu I. 32,2 buněk a podskupinu II. 153,2 buněk.

Vlhká fixace metanol 70%

V první řadě snímků (obr. 24) je vložena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u ejakulovaných spermii. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Fosforylace je viditelně detekována v sEqS a v Ak. Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvláště znázorněné na třetím obrázku. U spermie označené vzorem D byla detekována fosforylace v Ak a sEqS. U vzoru E proběhla fosforylace ještě navíc v Kr. U této fixace se u ejakulovaných spermii vyskytovalo ještě dalších pět vzorů, které jsou znázorněny na posledním obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až B, se nevyskytovala fosforylace v Ak, proto byly zařazeny

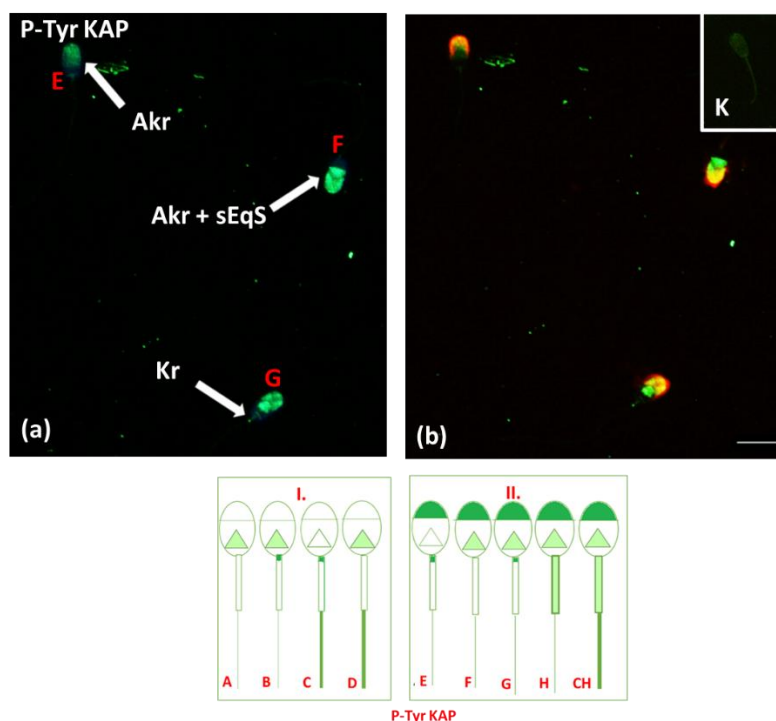
do skupiny nekapacitovaných. U vzoru A proběhla fosforylace pouze v sEqS, u B ještě v Kr. Ve druhé podskupině (II.), kam patří C až G, byla detekována fosforylace v akrosomu, tudíž se jeví jako kapacitované. U vzoru C proběhla fosforylace pouze v Akr, u F v Akr, sEqS, Kr a Bi α a u G v Akr, sEqS a Bi β .



Obrázek 24: Ejakulované spermie – fixace vlhká metanol 70%: Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, Kr krček, sEqS subekvatoriální segment, K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V další řadě snímků (obr. 25) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u *in vitro* kapacitovaných spermíí. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené pomocí DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na druhém snímku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně) a také je do pravého horního rohu vložena negativní kontrola (K). Fosforylace je viditelně detekována v akrosomu a subekvatoriálním segmentu hlavičky spermie. U některých vzorů se vyskytovala i v bičíku. Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace. U vzoru E proběhla fosforylace v Akr a Kr, u vzoru F v Akr a sEqS a u vzoru G v Akr, sEqS a Kr. Taktéž se u této fixace *in vitro* kapacitovaných spermíí vyskytovalo dalších šest vzorů, které jsou znázorněny na třetím obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam

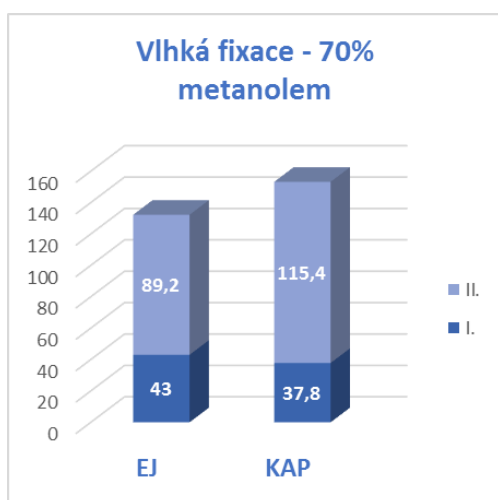
patří A až D, se nevyskytovala fosforylace v Akr, proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru A byla detekována fosforylace pouze v sEqS, u vzoru B v sEqS a Kr, u C v Kr a koncové části Bi a u D v sEqS a koncové části Bi. Druhá podskupina (II.) obsahovala spermie kapacitované, díky fosforylaci v akrosomu (vzory E až CH). U vzoru H proběhla fosforylace v Akr a sEqS a Bi α . Vzor CH se vyznačoval fosforylací v Akr, sEqS a Bi β .



Obrázek 25: Kapacitované spermie – fixace vlhká metanol 70%: Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, sEqS subekvatoriální segment, Kr krček; K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V grafu 5 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií zařazených do dvou podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermií proběhla fosforylace u 132,2 spermií z 200 napočítaných buněk (66,1 %). U *in vitro* kapacitovaných spermií proběhla u 153,2 spermií z 200 napočítaných buněk (76,6 %). U ejakulovaných spermií první podskupina (I.), nekapacitované spermie, obsahovala 43 buněk (32,5 %) díky absenci fosforylace v akrosomu spermie. Podskupina II., spermie jevící se jako kapacitované, obsahovala 89,2 buněk (67,5 %). U *in vitro* kapacitovaných

spermií první podskupina vzorů (I.), označována jako nekapacitované spermie, obsahovala 37,8 spermií (24,7 %). U těchto spermií kapacitace neproběhla. Druhá skupina (II.), kapacitované spermie, obsahovala 115,4 spermií (75,3 %). U této fixace už nelze bezpečně detekovat kapacitaci kančích spermií určenou dle fosforylace v akrosomu spermie. U *in vitro* kapacitovaných spermií sice výrazně převažuje podskupina II., ale u ejakulovaných spermií také převažuje podskupina II. Tato podskupina II. obsahuje mnohem víc buněk než předešlá fixace (Vlhká aceton/metanol) a z toho důvodu je na ni horší spoleh.

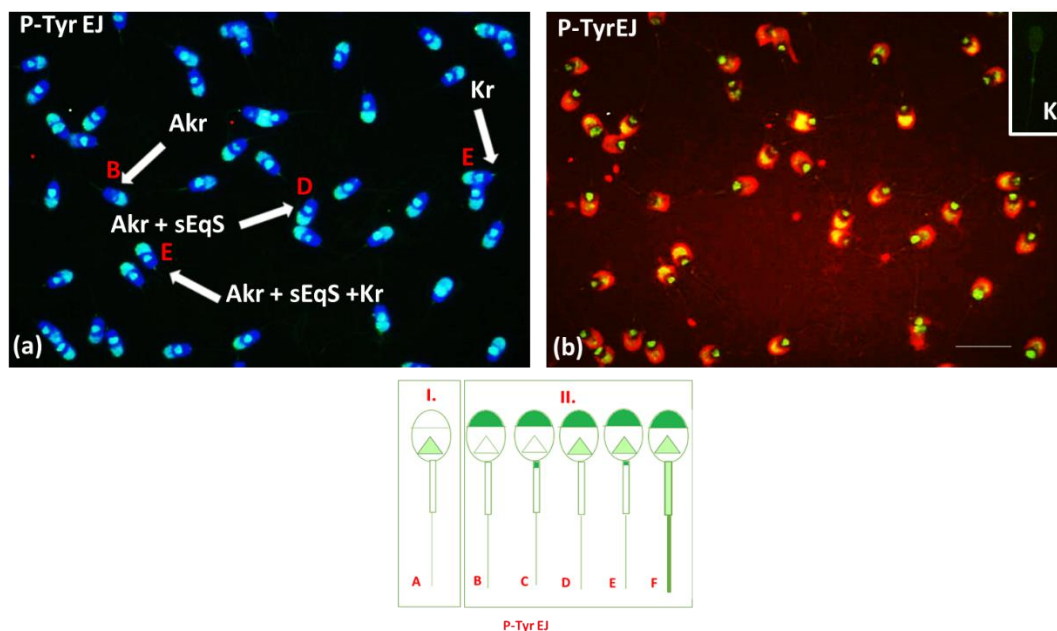


Graf 5: Průměrné četnosti dvou podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermií: U ejakulovaných (EJ) spermií se v podskupině I. vyskytuje 43 buněk, u podskupiny II. 89,2 buněk a u kapacitovaných spermií (KAP) tvoří podskupinu I. 37,8 buněk a podskupinu II. 115,4 buněk.

Vlhká fixace metanol 35%

V první řadě snímků (obr. 26) je vložena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u ejakulovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Fosforylace je viditelně detekována v Akr a sEqS. Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvlášť znázorněné na třetím obrázku. U spermie označené vzorem B byla detekována fosforylace v Akr, u D v Akr a sEqS a u E v Akr, sEqS a Kr. U této fixace se u ejakulovaných spermií vyskytovaly ještě dalších tři vzory, které jsou znázorněny na posledním obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří pouze A, se nevyskytovala fosforylace v Akr, proto byl zařazen do skupiny nekapacitovaných. U vzoru A proběhla fosforylace pouze v sEqS. Ve druhé podskupině (II.), kam

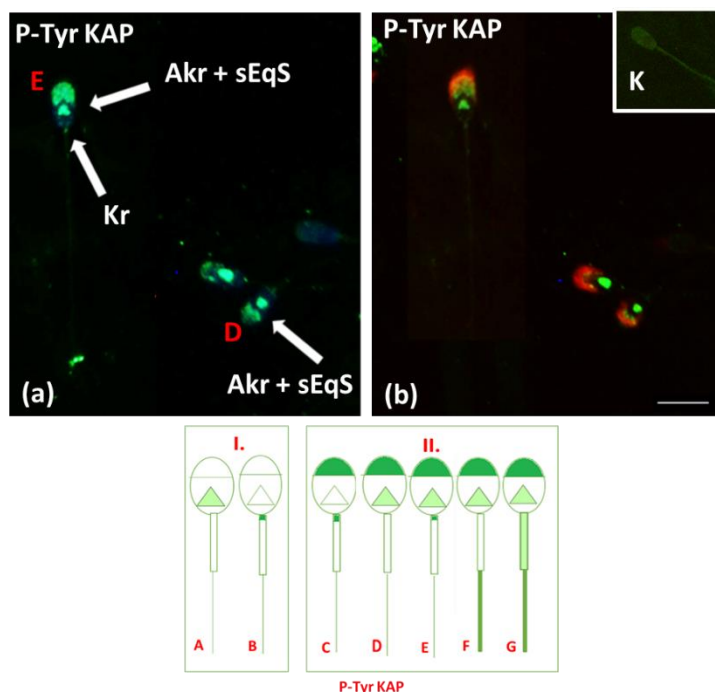
patří B až F, byla detekována fosforylace v akrosomu, tudíž se jevíly jako kapacitované. U vzoru C proběhla fosforylace v Akr a Kr, a u vzoru F v Akr, Kr a Bi β.



Obrázek 26: Ejakulované spermie – fixace vlhká metanol 35%: Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akrs akrosom, Kr krček, sEqS subekvatoriální segment, K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V další řadě snímků (obr. 27) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u *in vitro* kapacitovaných spermí. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené pomocí DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na druhém snímku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně) a také je do pravého horního rohu vložena negativní kontrola (K). Fosforylace je viditelně detekována v akrosomu a subekvatoriálním segmentu hlavičky spermie. Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace. U vzoru označeného jako D proběhla fosforylace v Akr, sEqS, u vzoru E ještě navíc v Kr. Taktéž se u této fixace *in vitro* kapacitovaných spermí vyskytovalo dalších pět vzorů, které jsou znázorněny na třetím obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až B, se nevyskytovala fosforylace v Akr, proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru A byla detekována fosforylace pouze v sEqS, u vzoru B pouze v Kr. Druhá podskupina (II.) obsahovala spermie kapacitované, díky fosforylaci

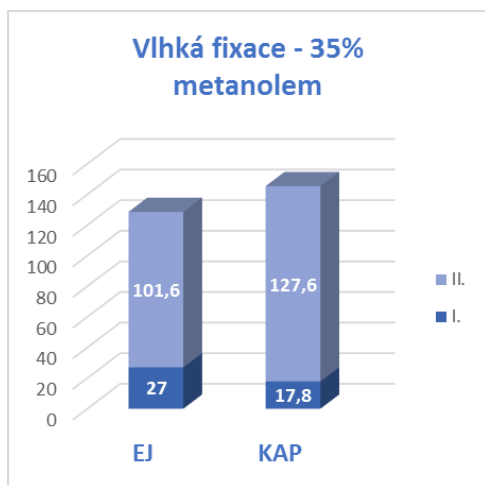
v akrosomu (vzory C až G). U vzoru C proběhla fosforylace v Akr a Kr. Vzor F se vyznačoval fosforylací v Akr, sEqS a koncové části Bi a vzor F v Akr, sEqS a Bi β.



Obrázek 27: Kapacitované spermie – fixace vlhká metanol 35%: Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, sEqS subekvatoriální segment, Kr krček; K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V grafu 6 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií zařazených do dvou podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermií proběhla fosforylace u 128,6 spermií z 200 napočítaných buněk (64,3 %). U *in vitro* kapacitovaných spermií proběhla u 145,4 spermií z 200 napočítaných buněk (72,7 %). U ejakulovaných spermií první podskupina (I.), nekapacitované spermie, obsahovala 27 buněk (21 %) díky absenci fosforylace v akrosomu spermie. Podskupina II., spermie jevící se jako kapacitované, obsahovala 101,6 buněk (79 %). U *in vitro* kapacitovaných spermií první podskupina vzorů (I.), označována jako nekapacitované spermie, obsahovala 17,8 spermií (12,3 %). U těchto spermií kapacitace neproběhla. Druhá skupina (II.), kapacitované spermie, obsahovala 127,6 spermií (87,7 %). U této fixace už nelze bezpečně detekovat kapacitaci

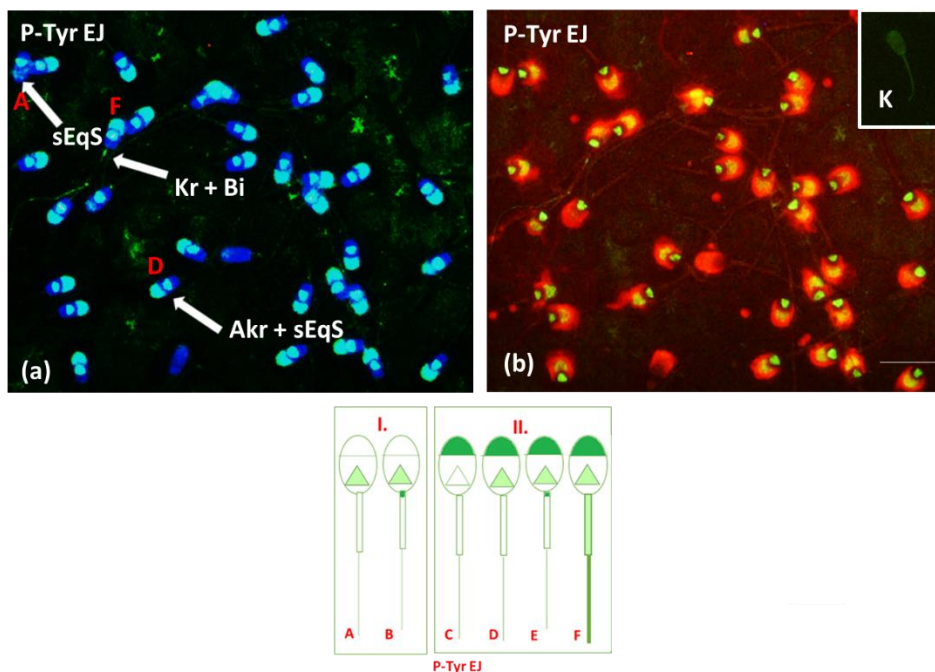
kančích spermii určenou dle fosforylace v akrosomu spermie. U *in vitro* kapacitovaných spermii sice výrazně převažuje podskupina II., ale u ejakulovaných spermii také převažuje podskupina II.



Graf 6: Průměrné četnosti dvou podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermii: U ejakulovaných (EJ) spermii se v podskupině I. vyskytuje 27 buněk, u podskupiny II. 101,6 buněk a u kapacitovaných spermii (KAP) tvoří podskupinu I. 17,8 buněk a podskupinu II. 127,6 buněk.

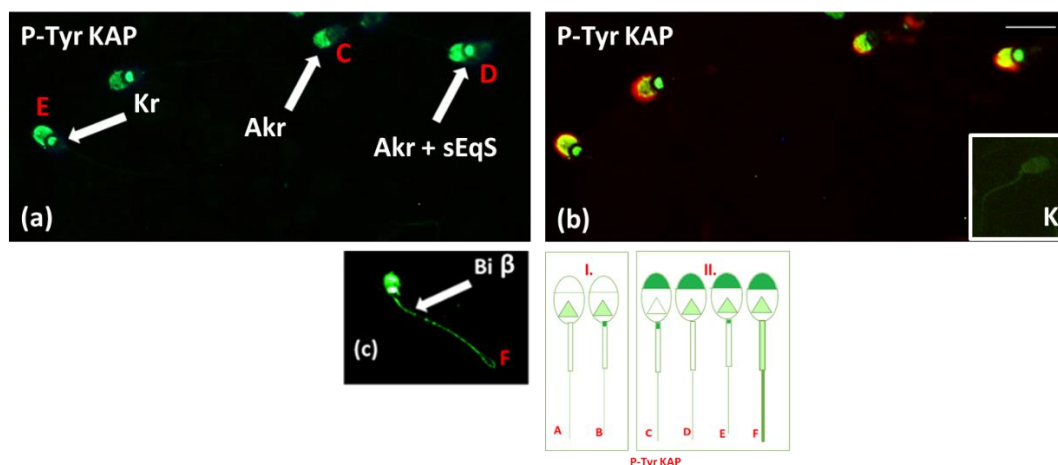
Vlhká fixace aceton 70%

V první řadě snímků (obr. 28) je vložena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u ejakulovaných spermii. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Fosforylace je viditelně detekována v Akr a sEqS. Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvláště znázorněné na třetím obrázku. U spermie označené vzorem A byla detekována fosforylace pouze v sEqS, u D v Akr a sEqS a u F v Akr, sEqS a Bi β. U této fixace se u ejakulovaných spermii vyskytovaly ještě dalších tři vzory, které jsou znázorněny na posledním obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až B, se nevyskytovala fosforylace v Akr, proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru B proběhla fosforylace v sEqS a Kr. Ve druhé podskupině (II.), kam patří C až F, byla detekována fosforylace v akrosomu, tudíž se jevíly jako kapacitované. U vzoru C proběhla fosforylace jen v Akr a u vzoru E v Akr, sEqS a Kr.



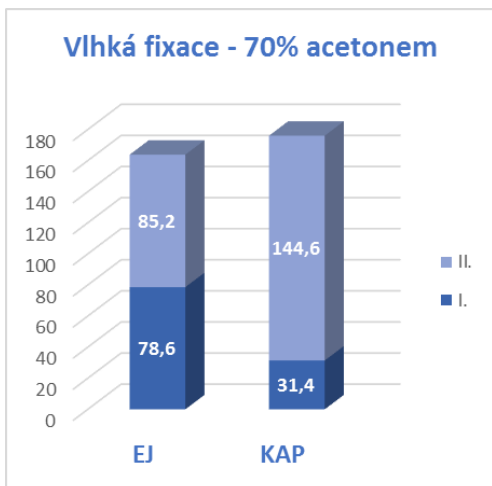
Obrázek 28: Ejakulované spermie – fixace vlhká aceton 70%: Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Kr krček, sEqS subekvatoriální segment, Bi bičík, K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V další řadě snímků (obr. 29) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u *in vitro* kapacitovaných spermíí. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené pomocí DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na druhém snímku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně) a také je do pravého dolního rohu vložena negativní kontrola (K). Na obrázku (c) je spermie značena pouze pomocí FITC (zeleně). Fosforylace je viditelně detekována v akrosomu a subekvatoriálním segmentu hlavičky spermie. Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace. U vzoru označeného jako C proběhla fosforylace v Ak + Kr, u vzoru D v Ak + sEqS a u vzoru E v Ak, sEqS a Kr. Taktéž se u této fixace *in vitro* kapacitovaných spermíí vyskytovaly další tři vzory, které jsou znázorněny na třetím obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až B, se nevyskytovala fosforylace v Ak, proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru A byla detekována fosforylace pouze v sEqS, u vzoru B ještě navíc v Kr. Druhá podskupina (II.) obsahovala spermie kapacitované, díky fosforylaci v akrosomu (vzory C až F). U vzoru F proběhla fosforylace v Ak + sEqS a Bi β .



Obrázek 29: Kapacitované spermie – fixace vlhká aceton 70%: Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA; (c) – FITC); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, sEqS subekvatoriální segment, Kr krček, Bi β celá délka bičíku; K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

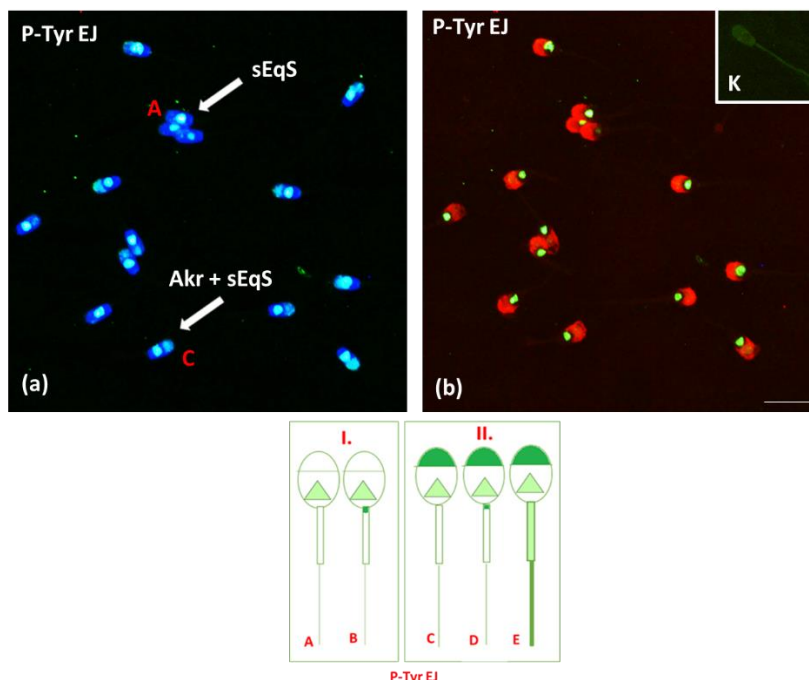
V grafu 7 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermíí zařazených do dvou podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermíí proběhla fosforylace u 163,8 spermíí z 200 napočítaných buněk (81,9 %). U *in vitro* kapacitovaných spermíí proběhla u 176 spermíí z 200 napočítaných buněk (88 %). U ejakulovaných spermíí první podskupina (I.), nekapacitované spermie, obsahovala 78,6 buněk (48 %) díky absenci fosforylace v akrosomu spermie. Podskupina II., spermie jeví se jako kapacitované, obsahovala 85,2 buněk (52 %). U *in vitro* kapacitovaných spermíí první podskupina vzorů (I.), označována jako nekapacitované spermie, obsahovala 31,4 spermíí (17,8 %). U těchto spermíí kapacitace neproběhla. Druhá skupina (II.), kapacitované spermie, obsahovala 144,6 spermíí (82,2 %). U této fixace už nelze bezpečně detekovat kapacitaci kančích spermíí určenou dle fosforylace v akrosomu spermie. U *in vitro* kapacitovaných spermíí sice výrazně převažuje podskupina II., ale u ejakulovaných spermíí jsou obě podskupiny velmi vyrovnané.



Graf 7: Průměrné četnosti dvou podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermíí: U ejakulovaných (EJ) spermíí se v podskupině I. vyskytuje 78,6 buněk, u podskupiny II. 85,2 buněk a u kapacitovaných spermíí (KAP) tvoří podskupinu I. 31,4 buněk a podskupinu II. 144,6 buněk.

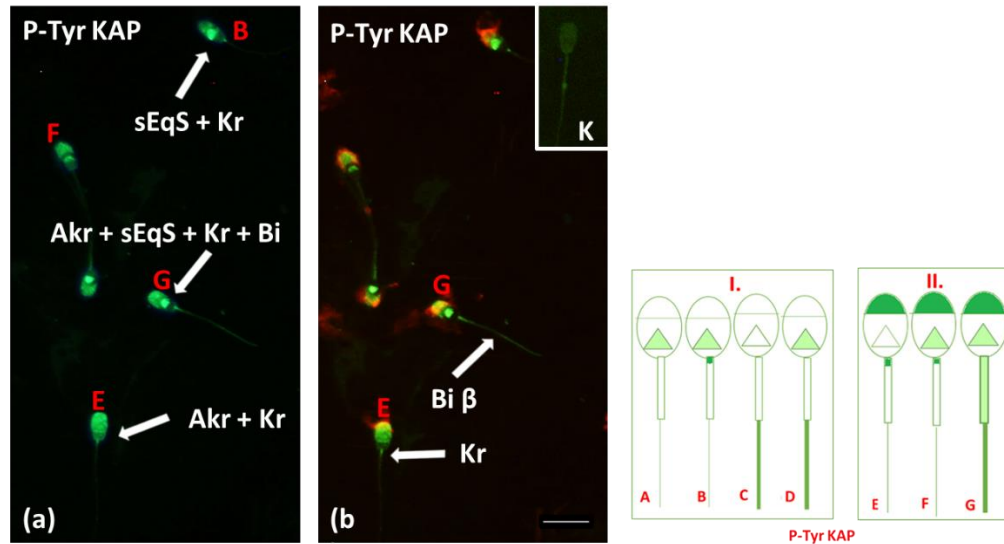
Vlhká fixace aceton 35%

V první řadě snímků (obr. 30) je vložena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u ejakulovaných spermíí. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Fosforylace je viditelně detekována v Akr a sEqS. Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvlášť znázorněné na třetím obrázku. U spermie označené vzorem A byla detekována fosforylace pouze v sEqS, u C v Akr a sEqS. U této fixace se u ejakulovaných spermíí vyskytovaly ještě dalších tři vzory, které jsou znázorněny na posledním obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až B, se nevyskytovala fosforylace v Akr, proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru B proběhla fosforylace v sEqS a Kr. Ve druhé podskupině (II.), kam patří C až E, byla detekována fosforylace v akrosomu, tudíž se jevíly jako kapacitované. U vzoru D proběhla fosforylace v Akr, sEqS a Kr a u vzoru E v Akr, sEqS a Bi β.



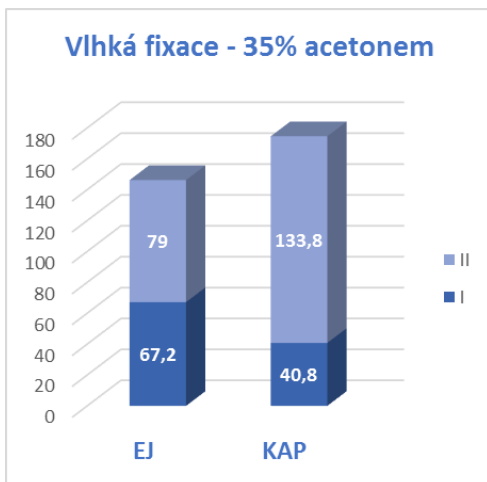
Obrázek 30: Ejakulované spermie – fixace vlhká aceton 35%: Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, sEqS subekvatoriální segment, K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 µl, zvětšení 400x.

V další řadě snímků (obr. 31) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u *in vitro* kapacitovaných spermíí. Na prvním snímku (a) jsou spermie označené pomocí DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na druhém snímku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně) a také je do pravého horního rohu vložena negativní kontrola (K). Fosforylace je viditelně detekována v subekvatoriálním segmentu a v některých případech v akrosomu hlavičky spermie. Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace. U vzoru označeného jako B proběhla fosforylace v sEqS a Kr, u vzoru E v Akr a Kr, u vzoru F v Akr, sEqS a Kr a u vzoru G v Akr, sEqS a Bi β. Taktéž se u této fixace *in vitro* kapacitovaných spermíí vyskytovaly další tři vzory, které jsou znázorněny na třetím obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až D, se nevyskytovala fosforylace v Akr, proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru A byla detekována fosforylace pouze v sEqS, u vzoru C pouze v koncové části bičíku a u vzoru D v sEqS a koncové části Bi. Druhá podskupina (II.) obsahovala spermie kapacitované, díky fosforylaci v akrosomu (vzory E až G).



Obrázek 31: Kapacitované spermie – fixace vlhká aceton 35%: Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šípky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, sEqS subekvatoriální segment, Kr krček, Bi β celá délka bičíku; K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

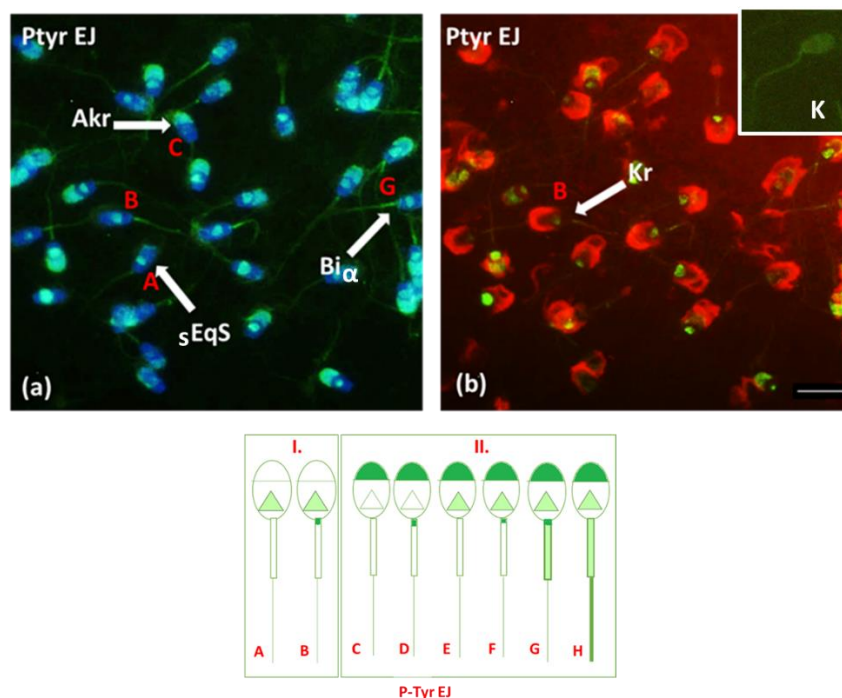
V grafu 8 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermíí zařazených do dvou podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermíí proběhla fosforylace u 146,2 spermíí z 200 napočítaných buněk (73,1 %). U *in vitro* kapacitovaných spermíí proběhla u 174,6 spermíí z 200 napočítaných buněk (87,3 %). U ejakulovaných spermíí první podskupina (I.), nekapacitované spermie, obsahovala 67,2 buněk (46 %) díky absenci fosforylace v akrosomu spermie. Podskupina II., spermie jevící se jako kapacitované, obsahovala 79 buněk (54 %). U *in vitro* kapacitovaných spermíí první podskupina vzorů (I.), označována jako nekapacitované spermie, obsahovala 40,8 spermíí (23,4 %). U těchto spermíí kapacitace neproběhla. Druhá skupina (II.), kapacitované spermie, obsahovala 133,8 spermíí (76,6 %). U této fixace už nelze bezpečně detekovat kapacitaci kančích spermíí určenou dle fosforylace v akrosomu spermie. U *in vitro* kapacitovaných spermíí sice výrazně převažuje podskupina II., ale u ejakulovaných spermíí jsou obě podskupiny velmi vyrovnané.



Graf 8: Průměrné četnosti dvou podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermií: U ejakulovaných (EJ) spermií se v podskupině I. vyskytuje 67,2 buněk, u podskupiny II. 79 buněk a u kapacitovaných spermií (KAP) tvoří podskupinu I. 40,8 buněk a podskupinu II. 133,8 buněk.

Zasušení spermií s následnou fixací

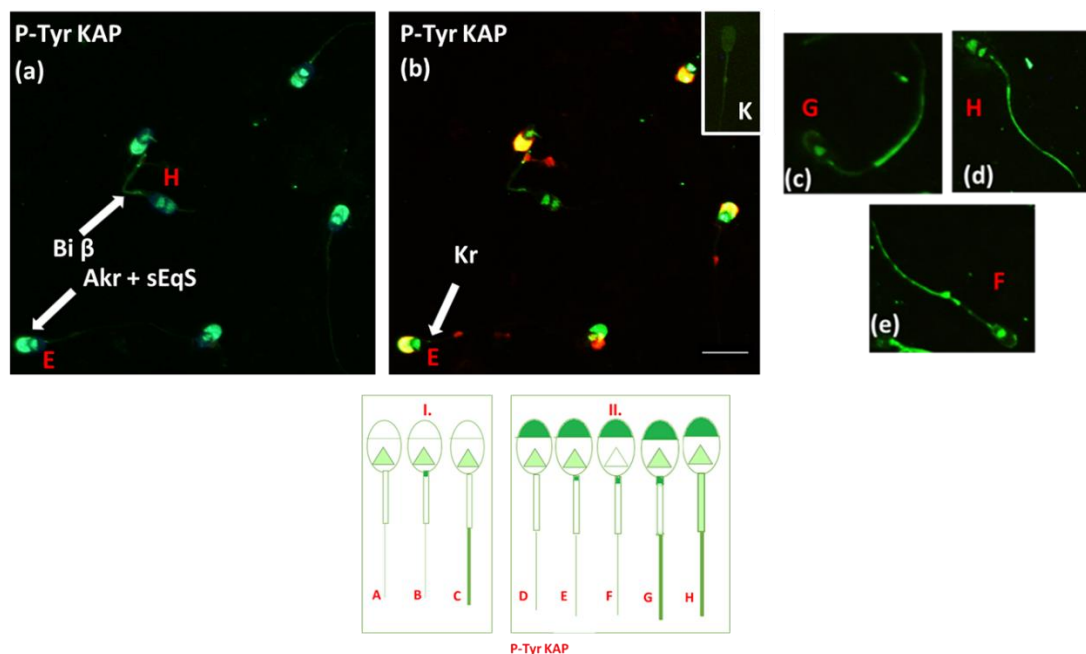
V první řadě snímků (obr. 32) je vložena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u ejakulovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Fosforylace je viditelně detekována v Akr a sEqS. Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvlášť znázorněné na třetím obrázku. U spermie označené vzorem A byla detekována fosforylace pouze v sEqS, u B v sEqS a Kr, u G v Akr, sEqS, Kr a Bi α . U této fixace se u ejakulovaných spermií vyskytovalo ještě dalších pět vzorů, které jsou znázorněny na posledním obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až B, se nevyskytovala fosforylace v Akr, proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. Ve druhé podskupině (II.), kam patří C až H, byla detekována fosforylace v akrosomu, tudíž se jevíly jako kapacitované. U vzoru C proběhla fosforylace jen v Akr, u vzoru D v Akr a Kr, u E v Akr a sEqS, u F v Akr, sEqS a Kr a u H v Akr, sEqS a Bi β .



Obrázek 32: Ejakulované spermie – zasušení spermii s následnou fixací: Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akkr akrosom, Kr krček, sEqS subekvatoriální segment, Bi bičík (α – mitochondriální část bičíku), K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V další řadě snímků (obr. 33) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u *in vitro* kapacitovaných spermii. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené pomocí DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na druhém snímku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně) a také je do pravého horního rohu vložena negativní kontrola (K). Na obrázcích (c), (d) a (e) jsou spermie značeny pouze pomocí FITC (zeleně). Fosforylace je viditelně detekována v akrosomu a subekvatoriálním segmentu hlavičky spermie. Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace. U vzoru označeného jako E proběhla fosforylace v Akkr, sEqS a Kr u vzoru F v Akkr a Kr. U vzoru G proběhla fosforylace v Akkr, sEqS, Kr a koncové části Bi a u vzoru H v Akkr, sEqS a Bi β . Taktéž se u této fixace *in vitro* kapacitovaných spermii vyskytovaly další čtyři vzory, které jsou znázorněny na třetím obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až C, se nevyskytovala fosforylace v Akkr, proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru A byla detekována fosforylace pouze v sEqS, u vzoru B ještě navíc v Kr. U vzoru C v sEqS a koncové části Bi. Druhá podskupina (II.)

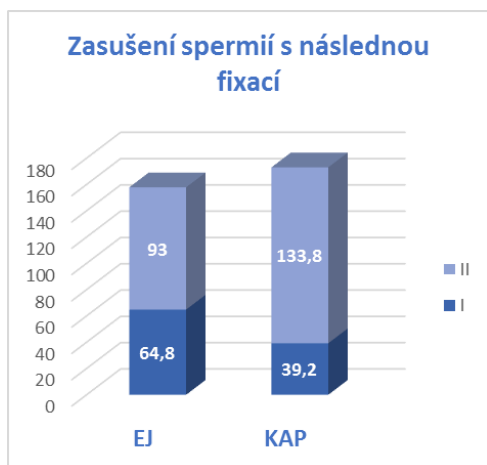
obsahovala spermie kapacitované, díky fosforylaci v akrosomu (vzory C až G). U vzoru D proběhla fosforylace v Akr a sEqS.



Obrázek 33: Kapacitované spermie – zasušení spermií s následnou fixací: Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermiích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA; (c), (d), (e) - FITC); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akkr akrosom, sEqS subekvatoriální segment, Kr krček, Bi β celá délka bičíku; K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V grafu 9 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií zařazených do dvou podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermií proběhla fosforylace u 157,8 spermií z 200 napočítaných buněk (78,9 %). U *in vitro* kapacitovaných spermií proběhla u 173 spermií z 200 napočítaných buněk (86,5 %). U ejakulovaných spermií první podskupina (I.), nekapacitované spermie, obsahovala 64,8 buněk (41,1 %) díky absenci fosforylace v akrosomu spermie. Podskupina II., spermie jeví se jako kapacitované, obsahovala 93 buněk (58,9 %). U *in vitro* kapacitovaných spermií první podskupina vzorů (I.), označována jako nekapacitované spermie, obsahovala 39,2 spermií (22,7 %). U těchto spermií kapacitace neproběhla. Druhá skupina (II.), kapacitované spermie, obsahovala 133,8 spermií (77,3 %). U této fixace už nelze bezpečně detekovat kapacitaci kančích spermií určenou dle fosforylace v akrosomu spermie. U *in vitro*

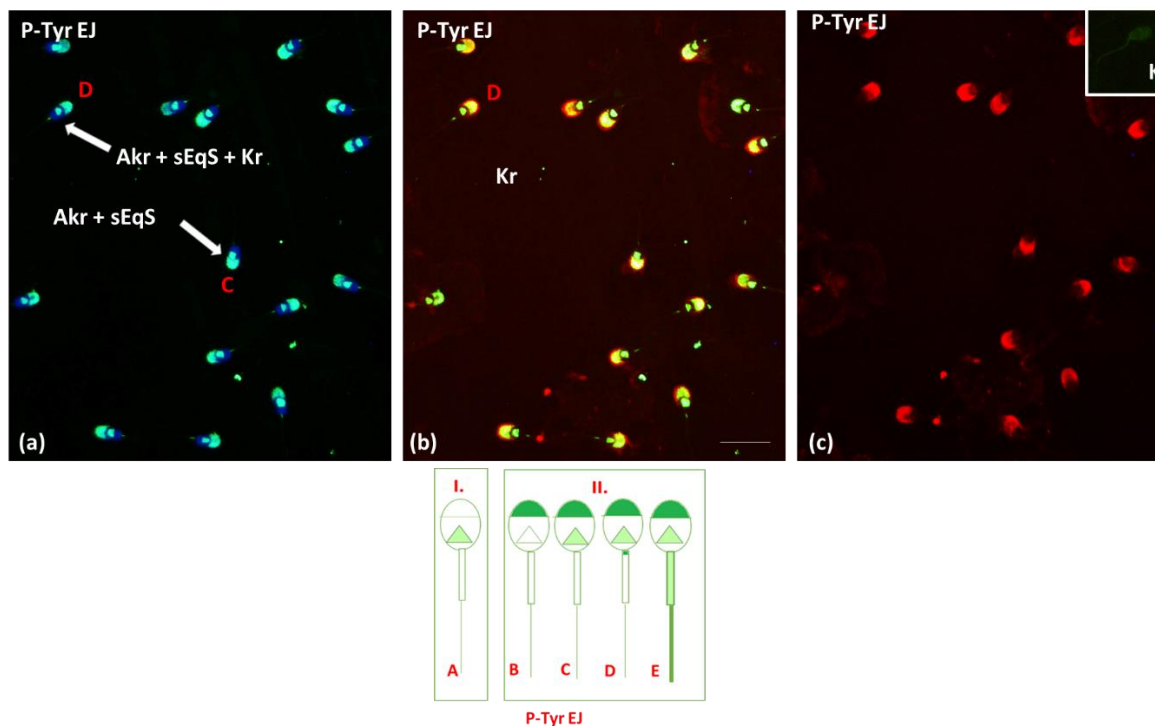
kapacitovaných spermii sice výrazně převažuje podskupina II., ale u ejakulovaných spermii jsou obě podskupiny relativně vyrovnané s převahou podskupiny II.



Graf 9: Průměrné četnosti dvou podskupin vzorů ejakulovaných i kapacitovaných spermii: U ejakulovaných (EJ) spermii se v podskupině I. vyskytuje 64,8 buněk, u podskupiny II. 93 buněk a u kapacitovaných spermii (KAP) tvoří podskupinu I. 39,2 buněk a podskupinu II. 133,8 buněk.

Zasušení spermii s následnou fixací metanolem

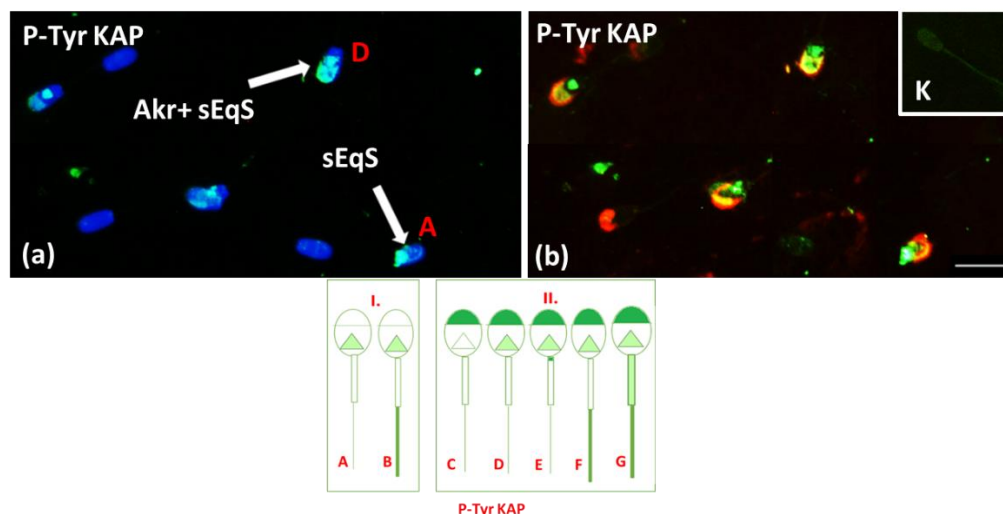
V první řadě snímků (obr. 34) je vložena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u ejakulovaných spermii. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu a na obrázku (c) jsou označeny akrosomy pomocí PNA (červeně). Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Fosforylace je viditelně detekována v sEqS a v Akr. Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvláště znázorněny na třetím obrázku. U spermie označené vzorem C byla detekována fosforylace v Akr a sEqS. U vzoru D proběhla fosforylace ještě navíc v Kr. U této fixace se u ejakulovaných spermii vyskytovaly ještě další tři vzory, které jsou znázorněny na posledním obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří pouze A, se nevyskytovala fosforylace v Akr, proto byl zařazen do skupiny nekapacitovaných. U vzoru A proběhla fosforylace pouze v sEqS. Ve druhé podskupině (II.), kam patří B až E, byla detekována fosforylace v akrosomu, tudíž se jeví jako kapacitované. U vzoru B proběhla fosforylace pouze v Akr, u E v Akr, sEqS a Bi β.



Obrázek 34: Ejakulované spermie – zasušení spermií s následnou fixací metanolem: Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermiích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA; (c) PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, Kr krček, sEqS subekvatoriální segment, Bi bičík, K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V další řadě snímků (obr. 35) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u *in vitro* kapacitovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené pomocí DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na druhém snímku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně) a také je do pravého horního rohu vložena negativní kontrola (K). Fosforylace je viditelně detekována v akrosomu a subekvatoriálním segmentu hlavičky spermie. Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace. U vzoru označeného jako A proběhla fosforylace pouze v sEqS, u vzoru D v Akr a sEqS. Taktéž se u této fixace *in vitro* kapacitovaných spermií vyskytovalo dalších pět vzorů, které jsou znázorněny na třetím obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až B, se nevyskytovala fosforylace v Akr, proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru B byla detekována fosforylace v sEqS a koncové části Bi. Druhá podskupina (II.) obsahovala spermie kapacitované, díky fosforylace v akrosomu

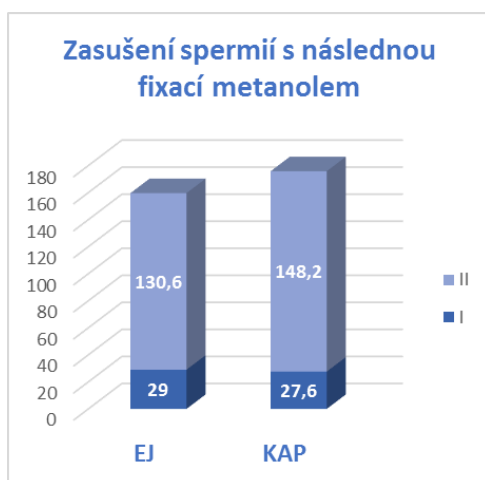
(vzory C až G). U vzoru C proběhla fosforylace pouze v Akř. Vzor E se vyznačoval fosforylací v Akř, sEqS a Kr, vzor F v Akř, sEqS a koncové části Bi a vzor G v Akř, sEqS a Bi β.



Obrázek 35: Kapacitované spermie – zasušení spermii s následnou fixací metanolem: Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermii (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akř akrosom, sEqS subekvatoriální segment; K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V grafu 10 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermii zařazených do dvou podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermii proběhla fosforylace u 159,6 spermii z 200 napočítaných buněk (79,8 %). U *in vitro* kapacitovaných spermii proběhla u 175,8 spermii z 200 napočítaných buněk (87,9 %). U ejakulovaných spermii první podskupina (I.), nekapacitované spermie, obsahovala 29 buněk (18,2 %) díky absenci fosforylace v akrosomu spermie. Podskupina II., spermie jevící se jako kapacitované, obsahovala 130,6 buněk (81,8 %). U *in vitro* kapacitovaných spermii první podskupina vzorů (I.), označována jako nekapacitované spermie, obsahovala 27,6 spermii (15,7 %). U těchto spermii kapacitace neproběhla. Druhá skupina (II.), kapacitované spermie, obsahovala 148,2 spermii (84,3 %). U této fixace už nelze bezpečně detekovat kapacitaci kančích spermii určenou dle fosforylace v akrosomu spermie. U *in vitro* kapacitovaných spermii sice výrazně převažuje podskupina II., ale u ejakulovaných spermii také

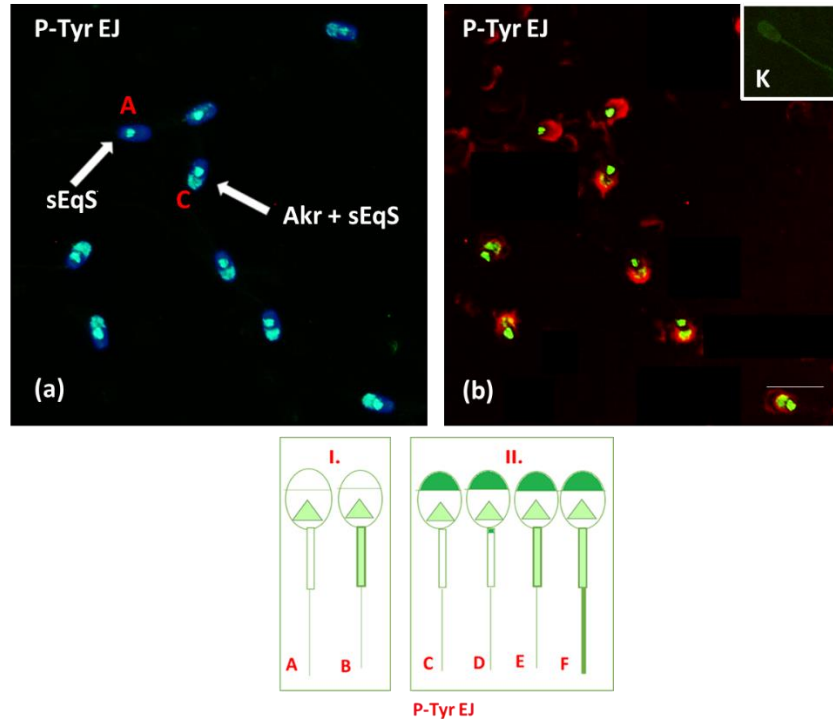
převažuje podskupina II. Tato podskupina II. obsahuje mnohem víc buněk než předešlá fixace (Zasušení spermií s následnou fixací) a z toho důvodu je na ni horší spoleh.



Graf 10: Průměrné četnosti dvou podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermií: U ejakulovaných (EJ) spermií se v podskupině I. vyskytuje 29 buněk, u podskupiny II. 130,6 buněk a u kapacitovaných spermií (KAP) tvoří podskupinu I. 27,6 buněk a podskupinu II. 148,2 buněk.

Zasušení spermií s následnou fixací acetonem

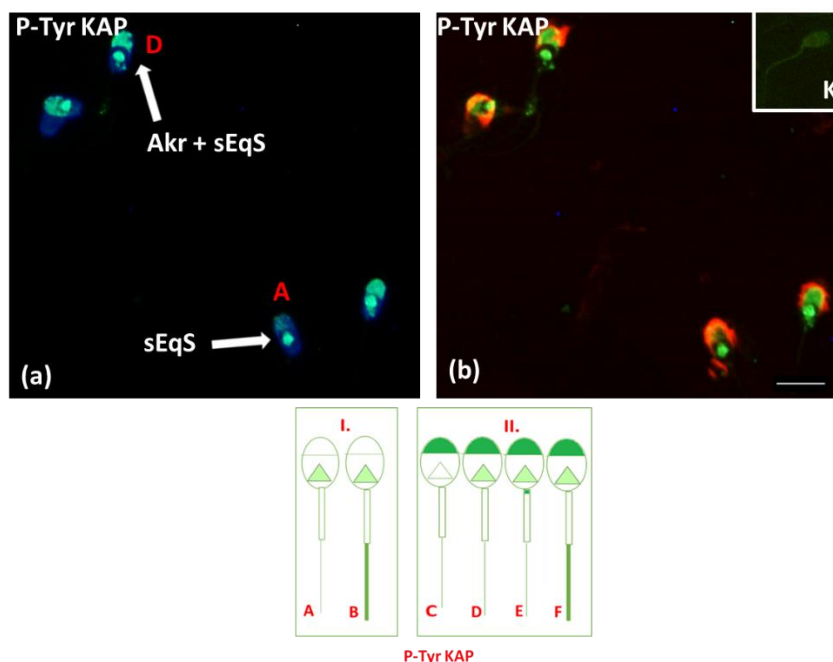
V první řadě snímků (obr. 36) je vložena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u ejakulovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Fosforylace je viditelně detekována v sEqS a v Akr. Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvlášť znázorněné na třetím obrázku. U spermie označené vzorem A byla detekována fosforylace pouze v sEqS. U vzoru C v Akr a sEqS. U této fixace se u ejakulovaných spermií vyskytovaly ještě další čtyři vzory, které jsou znázorněny na posledním obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až B, se nevyskytovala fosforylace v Akr, proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru B proběhla fosforylace pouze v sEqS a Bi α . Ve druhé podskupině (II.), kam patří C až F, byla detekována fosforylace v akrosomu, tudíž se jevíly jako kapacitované. U vzoru D proběhla fosforylace v Akr, sEqS a Kr, u vzoru E v Akr, sEqS, Bi α a u vzoru F v Akr, sEqS a Bi β .



Obrázek 36: Ejakulované spermie – zasušení spermií s následnou fixací acetonem: Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermiích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, sEqS subekvatoriální segment, K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V další řadě snímků (obr. 37) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Tyr u *in vitro* kapacitovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené pomocí DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na druhém snímku (b) jsou spermie s detekcí P-Tyr označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně) a také je do pravého horního rohu vložena negativní kontrola (K). Fosforylace je viditelně detekována v akrosomu a subekvatoriálním segmentu hlavičky spermie. Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace. U vzoru označeného jako A proběhla fosforylace pouze v sEqS, u vzoru D ještě navíc v Akr. Taktéž se u této fixace *in vitro* kapacitovaných spermií vyskytovaly další čtyři vzory, které jsou znázorněny na třetím obrázku. V první podskupině vzorů (I.), kam patří A až B, se nevyskytovala fosforylace v Akr, proto byly zařazeny do skupiny nekapacitovaných. U vzoru B byla detekována fosforylace v sEqS a koncové části bičíku. Druhá podskupina (II.) obsahovala spermie kapacitované, díky fosforylaci

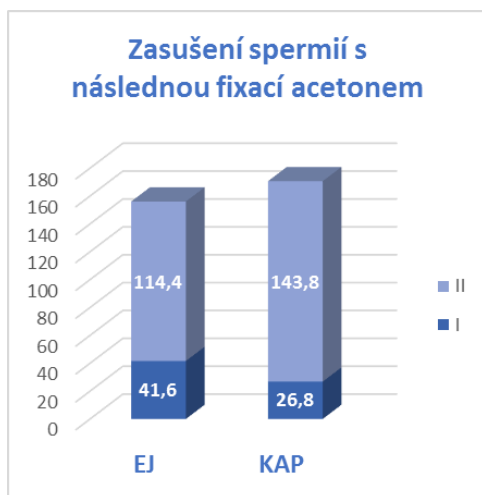
v akrosomu (vzory C až F). U vzoru C proběhla fosforylace pouze v Akr. Vzor E se vyznačoval fosforylací v Akr, sEqS a Kr a vzor F v Akr, sEqS a koncové části Bi.



Obrázek 37: Kapacitované spermie – zasušení spermií s následnou fixací acetonem: Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermiích (P-Tyr), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, sEqS subekvatoriální segment; K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

Na grafu 11 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií zařazených do dvou podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermií proběhla fosforylace u 156 spermií z 200 napočítaných buněk (78 %). U *in vitro* kapacitovaných spermií proběhla u 170,6 spermií z 200 napočítaných buněk (85,3 %). U ejakulovaných spermií první podskupina (I.), nekapacitované spermie, obsahovala 41,6 buněk (26,7 %) díky absenci fosforylace v akrosomu spermie. Podskupina II., spermie jevící se jako kapacitované, obsahovala 114,4 buněk (73,3 %). U *in vitro* kapacitovaných spermií první podskupina vzorů (I.), označována jako nekapacitované spermie, obsahovala 26,8 spermií (15,7 %). U těchto spermií kapacitace neproběhla. Druhá skupina (II.), kapacitované spermie, obsahovala 143,8 spermií (84,3 %). U této fixace už nelze bezpečně detekovat kapacitaci kančích spermií určenou dle fosforylace v akrosomu spermie. U *in vitro*

kapacitovaných spermií sice výrazně převažuje podskupina II., ale u ejakulovaných spermií také převažuje podskupina II. Ve srovnání s předešlou fixací (Zasušeni spermií s následnou fixací metanolem) je na tom o něco lépe z důvodu většího počtu buněk podskupiny I. u ejakulovaných spermií.



Graf 11: Průměrné četnosti dvou podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermií: U ejakulovaných (EJ) spermií se v podskupině I. vyskytuje 41,6 buněk, u podskupiny II. 114,4 buněk a u kapacitovaných spermií (KAP) tvoří podskupinu I. 26,8 buněk a podskupinu II. 143,8 buněk.

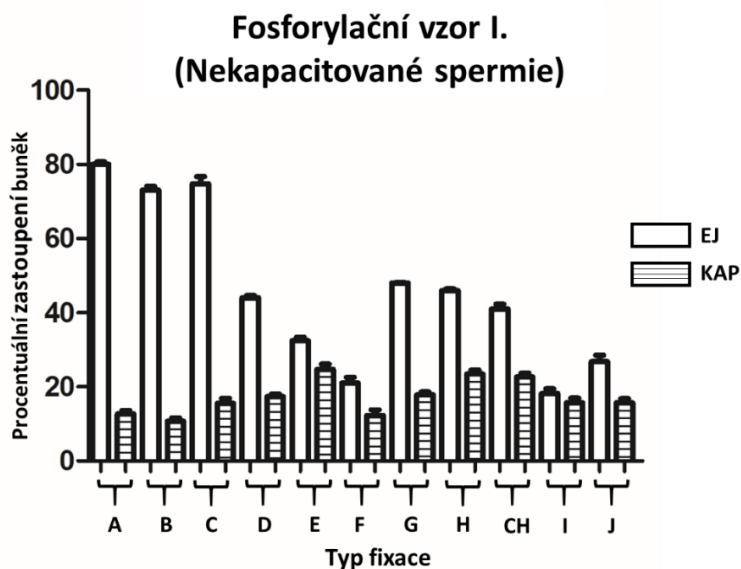
Tyto fixační látky byly vybrány, protože jsou často používané v imunofluorescenční mikroskopii. Výsledky této práce ukazují, že těchto 11 fixačních metod reaguje jinak na membránové antigeny.

Statistické vyhodnocení tyrosinové fosforylace

U všech vzorků byly fosforylační vzory vyhodnocovány u 200 spermatických buněk. Průměrná hodnota každého pozorovaného vzorku byla vypočtena z dat normalizovaných na procenta. Každá fixace (pokus) byla provedena pětkrát. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny provedením analýzy rozptylu ANOVA pomocí dvou statistických programů, a to STATISTICA a GraphPad. Testování rozdílů mezi skupinami bylo provedeno za použití Tukeyuv test s hladinou významnosti nastavenou na $p < 0,05$.

Zaměřili jsme se na porovnání skupiny ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií. Celkově byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi ejakulovanými a *in vitro* kapacitovanými spermiemi (ANOVA, $p < 0,05$). Zajímali nás rozdíly v kapacitačním stavu (II.).

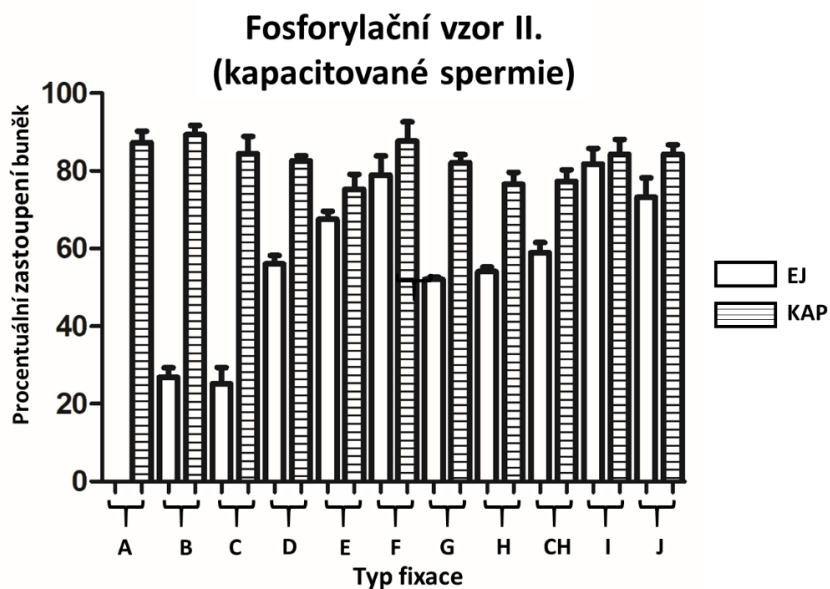
V rámci nekapacitovaných spermií (fosforylačního vzoru I.) (graf 12) byl zjištěn signifikantní rozdíl (ANOVA, $p < 0,05$) mezi formaldehydovými fixacemi s vlhkou fixací 35% metanolem (F) a zasušením spermií s následnou fixací metanolem (I). Mezi jednotlivými formaldehydovými fixacemi (formaldehyd v suspenzi A/B a formaldehyd na sklíčku C) nebyl žádný rozdíl. V rámci fixací 70% (G) a 35% (H) aceton nebyl detekován žádný rozdíl. Taktéž nebyl detekován žádný rozdíl mezi vlhkou fixací (aceton/metanol) (D) a zasušením spermií s následnou fixací (CH).



Graf 12: Procentuální zastoupení buněk jednotlivých fixací s fosforylačním vzorem I. (nekapacitované spermie). EJ ejakulované spermie, KAP kapacitované spermie; A – fixace 2% formaldehydem ve vodě s BSA, B – fixace 2% formaldehydem ve vodě, C – fixace 2% formaldehydem na skle, D – vlhká fixace (aceton/metanol), E – vlhká fixace metanol 70%, F – vlhká fixace metanol 35%, G – vlhká fixace aceton 70%, H – vlhká fixace aceton 35%, CH – zasušení spermií s následnou fixací, I – zasušení spermií s následnou fixací metanolem, J – zasušení spermií s následnou fixací acetonem.

V rámci kapacitovaných spermií (fosforylační vzor II.) (graf 13) byl opět detekován signifikantní rozdíl (ANOVA, $p < 0,05$) mezi formaldehydovými fixacemi (A, B, C) a všemi ostatními fixacemi. Mezi fixacemi vlhká fixace 70% metanol (E), vlhká fixace 35% metanol (F) a zasušení spermií s následnou fixací metanolem nebyl detekován žádný rozdíl (I). Dále nebyl detekován rozdíl mezi fixacemi vlhká fixace aceton 35% (H) a zasušení spermií s následnou fixací (CH). Statisticky významný rozdíl (ANOVA, $p < 0,05$) byl detekován mezi zasušení spermií

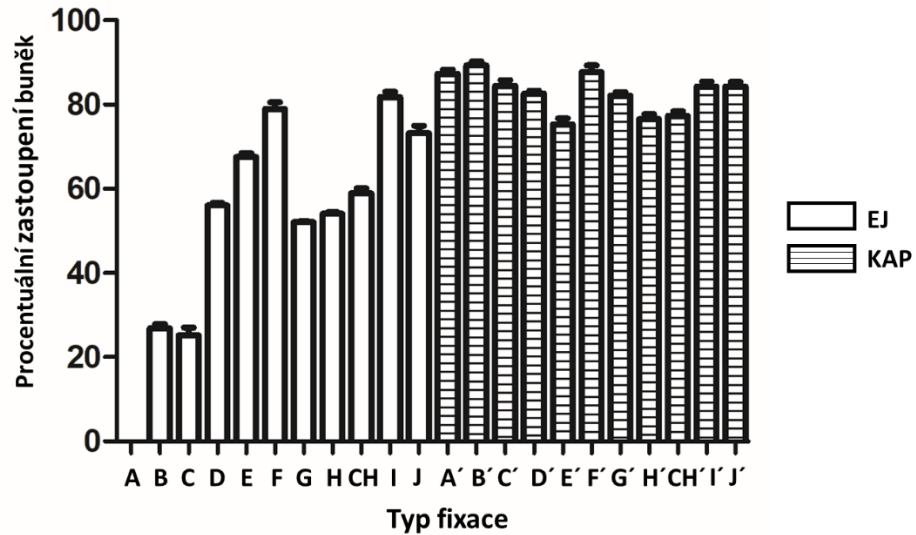
s následnou fixací (CH) a jejími modifikacemi zasušení spermií s následnou fixací metanolem (I) a acetonem (J).



Graf 13: Procentuální zastoupení buněk jednotlivých fixací s fosforylačním vzorem II. (kapacitované spermie). EJ ejakulované spermie, KAP kapacitované spermie; A – fixace 2% formaldehydem ve vodě s BSA, B – fixace 2% formaldehydem ve vodě, C – fixace 2% formaldehydem na skle, D – vlhká fixace (aceton/metanol), E – vlhká fixace metanol 70%, F – vlhká fixace metanol 35%, G – vlhká fixace aceton 70%, H – vlhká fixace aceton 35%, CH – zasušení spermií s následnou fixací, I – zasušení spermií s následnou fixací metanolem, J – zasušení spermií s následnou fixací acetonem.

V grafu 14 jsou znázorněny fixace fosforylačního vzoru II. Jednalo se o kapacitační stav, který byl pro nás klíčový. Jde o stejné zpracování dat jako u grafu 13. Pro lepší přehlednost byla od sebe rozdělena skupina fixací ejakulovaných a kapacitovaných spermií. Je zde viditelné, že mezi fixacemi je signifikantní rozdíl (ANOVA, $p < 0,05$) mezi ejakulovanými a *in vitro* kapacitovanými spermii. V rámci *in vitro* kapacitovaných spermií docházelo pouze k malým rozdílům, ovšem u ejakulovaných spermií byly rozdíly signifikantní (ANOVA, $p < 0,05$).

Fosforylační vzor II.



Graf 14: Procentuální zastoupení buněk jednotlivých fixací s fosforylačním vzorem II. (nekapacitované spermie). Pro lepší přehlednost jsou zde zvlášť odděleny ejakulované spermie od kapacitovaných spermii. EJ ejakulované spermie, KAP kapacitované spermie; A (EJ) a A' (KAP) – fixace 2% formaldehydem ve vodě s BSA, B (EJ) a B' (KAP) – fixace 2% formaldehydem ve vodě, C (EJ) a C' (KAP) – fixace 2% formaldehydem na skle, D (EJ) a D' (KAP) – vlhká fixace (aceton/metanol), E (EJ) a E' (KAP) – vlhká fixace metanol 70%, F (EJ) a F' (KAP) – vlhká fixace metanol 35%, G (EJ) a G' (KAP) – vlhká fixace aceton 70%, H (EJ) a H' (KAP) – vlhká fixace aceton 35%, CH (EJ) a CH' (KAP) – zasušení spermii s následnou fixací, I (EJ) a I' (KAP) – zasušení spermii s následnou fixací metanolem, J (EJ) a J' (KAP) – zasušení spermii s následnou fixací acetonem.

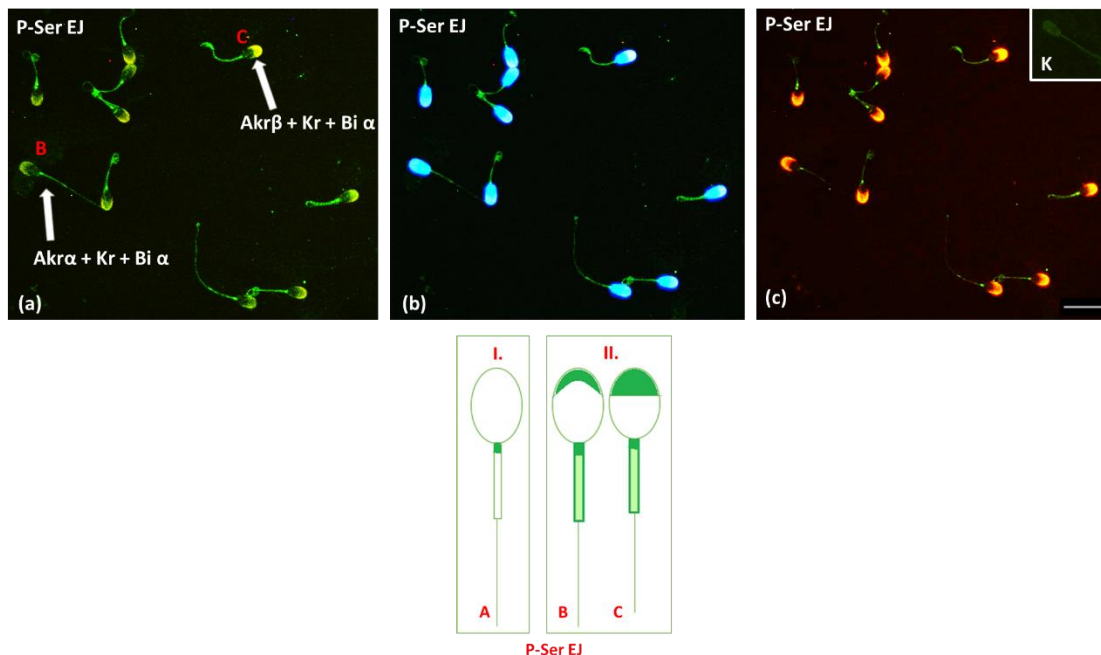
5.1.2 DETEKCE FOSFORYLOVANÝCH PROTEINŮ POMOCÍ PROTILÁTKY PROTI FOSFOSERINU

Výsledky detekce fosforylovaných proteinů pomocí protilátky proti fosfoserinu ve spermiích kance jsou ukázány na následující sérii snímků. U každé fixace je doložena fosforylace proteinů jak u vzorků s ejakulovanými spermii, tak u vzorků s *in vitro* kapacitovanými spermii (kap. 4.3.). Obě tyto skupiny vzorků byly rozděleny na podskupiny, které byly označeny jako (I.), (II.) a (III.) podle proběhlé fosforylace. Všechny tři podskupiny se vyskytovaly pouze u pár fixací, většinou se mezi sebou lišily. Odlišnosti v podskupinách se vyskytovaly i mezi ejakulovanými a *in vitro* kapacitovanými spermii té samé fixace. Toto rozdělení na podskupiny bylo provedeno podle fosforylace v bičíku, protože je pro serin typická. Podskupina (I.) je typická svou fosforylací v bičíku, podskupina (II.) v bičíku i akrosomu a podskupina (III.) pouze v akrosomu. Pro lepší přehlednost zde nejsou zařazeny obrázky se značením všech třech fluochromů (DAPI, FITC, PNA), kvůli překrývání vrstev a špatné viditelnosti fosforylovaných míst. Imunolokalizace byla provedena dle metodiky (kap. 4.5.1.) pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie. Většina snímků je označena jako (a) DAPI + FITC a (b) FITC + PNA, ovšem se zde vyskytují i další snímky, které jsou značené pouze FITC nebo PNA. Ke všem snímkům jsou doloženy ještě obrázky specifických fosforylačních vzorů, které se vyskytují u dané fixace.

Fixace 2% formaldehydu ve vodě s BSA

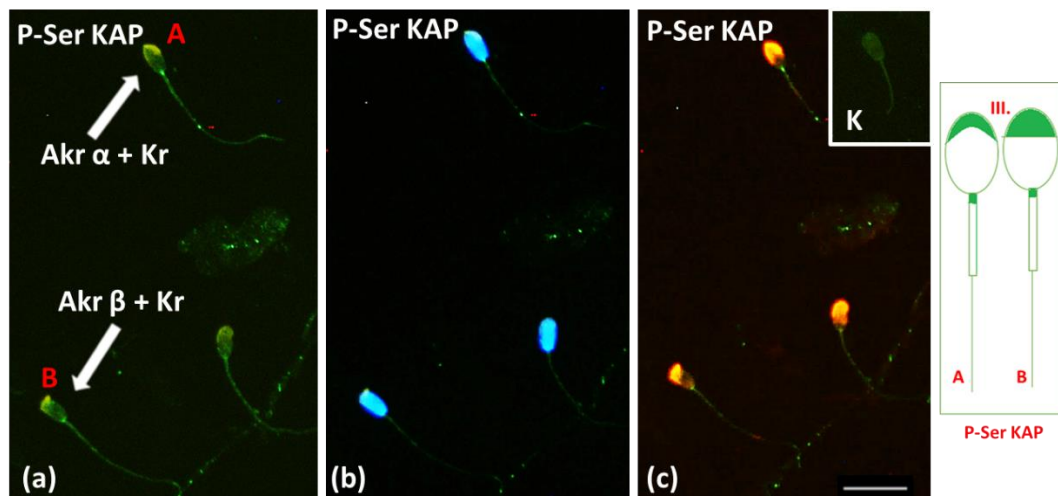
V první řadě snímků (obr. 38) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Ser u ejakulovaných spermii. Na prvním snímku (a) jsou spermie s detekcí P-Ser značené pouze FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Značení pomocí DAPI (modře) vykresluje hlavičku spermie (jádro) a zelené značení FITC detekuje fosforylaci. Na obrázku (c) jsou spermie značené FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Fosforylace je viditelně detekována v krčku (Kr), bičíku (Bi) a v některých případech i v akrosomu (Akr). Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvláště znázorněny na třetím obrázku. U spermie označené vzorem B je viditelná fosforylace v akrosomu (Akr α – část akrosomu), krčku (Kr) a střední (mitochondriální) části bičíku (Bi α). U vzoru C probíhala fosforylace podobně, lišila se pouze tím, že byl imunolokalizován celý akrosom (Akr β). Oba tyto vzory vykazovaly fosforylaci jak v Akr, tak v Bi, a proto byly zařazeny

do podskupiny II. U této fixace se u ejakulovaných spermií vyskytoval ještě jeden vzor, který je znázorněn na posledním obrázku. U vzoru A byla detekována fosforylace pouze v Kr, a proto byl zařazen do podskupiny I.



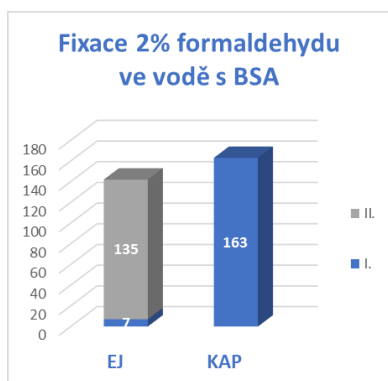
Obrázek 38: Ejakulované spermie – fixace 2% formaldehydu ve vodě s BSA: Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermiích (P-Ser), ((a) – FITC; (b) – DAPI + FITC; (c) – FITC + PNA;); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom (α – část akrosomu; β – celý akrosom), Kr krček, Bi α – mitochondriální část bičíku, K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V další řadě snímků (obr. 39) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Ser u *in vitro* kapacitovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie s detekcí P-Ser značené pouze FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Značení pomocí DAPI (modře) vykresluje hlavičku spermie (jádro) a zelené značení FITC detekuje fosforylaci. Na obrázku (c) jsou spermie značené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Do pravého horního rohu je vložena negativní kontrola (K). Fosforylace je viditelně detekována v Akr a Kr. Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace, které jsou zvláště zobrazeny na dalším obrázku. U této fixace se vyskytovaly pouze dva vzory zařazené do první podskupiny (III.), protože vykazovaly fosforylaci v akrosomu. U vzoru označeného A proběhla fosforylace v Akr α a Kr. U vzoru B proběhla fosforylace v Akr β a Kr.



Obrázek 39: Kapacitované spermie – fixace 2% formaldehydu ve vodě s BSA: Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermích (P-Ser), ((a) – FITC; (b) – DAPI + FITC; (c) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom (α – část akrosomu, β – celý akrosom), Kr krček; K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

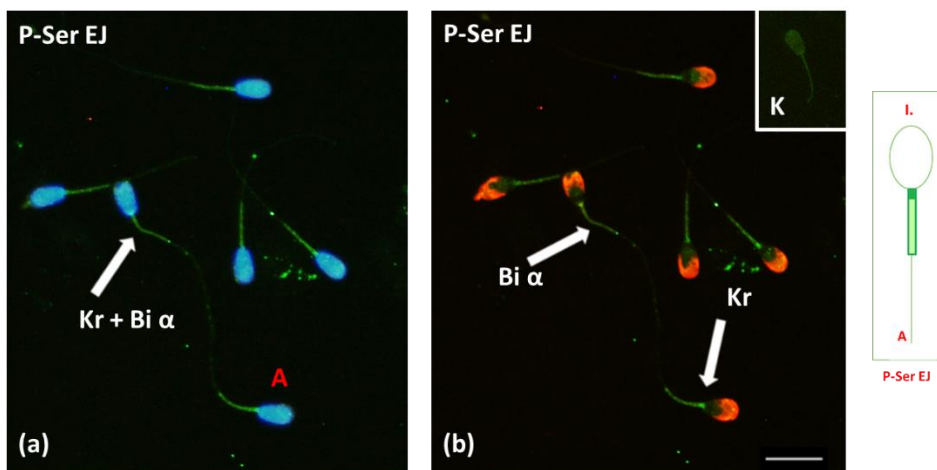
V grafu 15 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermíí zařazených do podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermíí proběhla fosforylace u 142 spermíí z 200 napočítaných buněk (71 %). U *in vitro* kapacitovaných spermíí proběhla u 163 spermíí z 200 napočítaných buněk (81,5 %). U ejakulovaných spermíí obsahovala první podskupina (I.) 7 buněk (4,9 %) díky fosforylaci v bičíku spermie. Podskupina II. s fosforylací v Akr i Bi obsahovala 135 buněk (95,1 %). U *in vitro* kapacitovaných spermíí se vyskytovala pouze jedna podskupina vzorů (III. – fosforylace v akrosomu; Graf – I.) a obsahovala 163 spermíí (81,5 %).



Graf 15: Četnosti podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermíí: U ejakulovaných EJ) spermíí se v podskupině I. vyskytuje 7 buněk, u podskupiny II. 135 buněk a u kapacitovaných spermíí (KAP) tvoří podskupinu I. 163 buněk.

Fixace 2% formaldehydu ve vodě

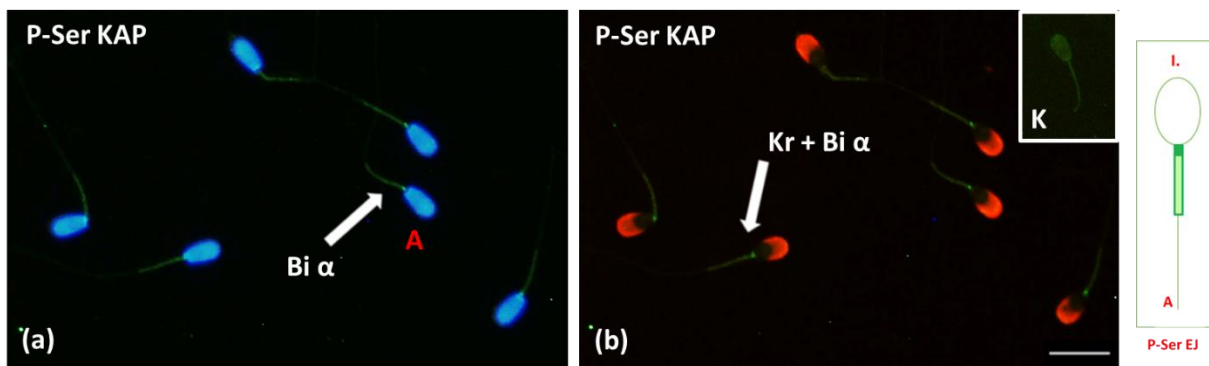
V první řadě snímků (obr. 40) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Ser u ejakulovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Ser označené pomocí FITC a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Fosforylace je viditelně detekována v krčku a mitochondriální části bičíku. Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvláště znázorněné na třetím obrázku. V rámci této fixace byl detekován pouze jeden vzor A z podskupiny I. (fosforylace v bičíku). U spermie označené vzorem A byla detekována fosforylace v Kr a (Bi α).



Obrázek 40: Ejakulované spermie – fixace 2% formaldehydu ve vodě: Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermích (P-Ser), (a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA; šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Kr krček, Bi α – mitochondriální část bičíku, K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

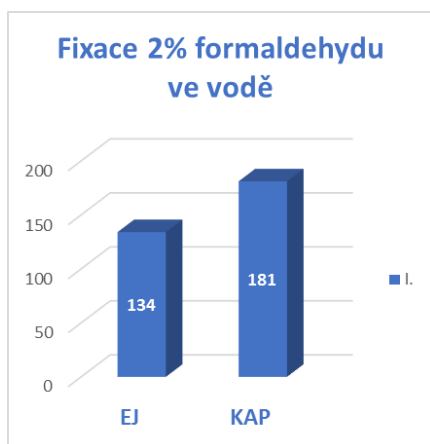
V další řadě snímků (obr. 41) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Ser u *in vitro* kapacitovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie označené pomocí DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na druhém snímku (b) jsou spermie s detekcí P-Ser označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně) a také je do pravého horního rohu vložena negativní kontrola (K). Fosforylace je viditelně detekována v Kr a Bi α . Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace. V rámci této fixace byl detekován pouze jeden vzor A ze skupiny I.

(fosforylace v bičíku). U spermie označené vzorem A byla detekována fosforylace v Kr a (Bi α). Šlo tedy o stejný vzor jako u ejakulovaných spermií.



Obrázek 41: Kapacitované spermie – Fixace 2% formaldehydu ve vodě: Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermích (P-Ser), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Kr krček, Bi α – mitochondriální část bičíku; K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

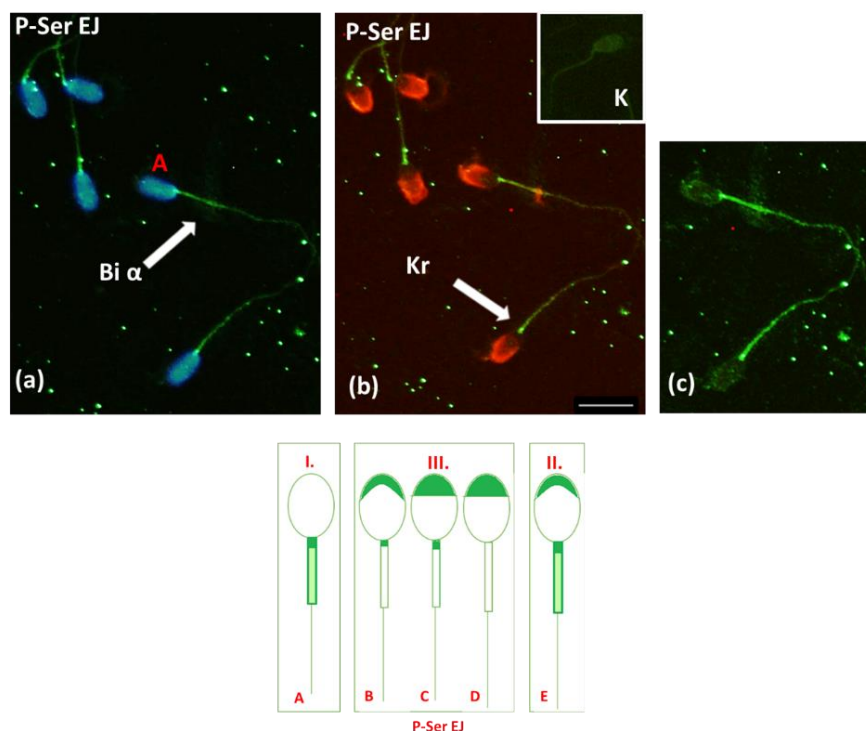
V grafu 16 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií zařazených do podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermií proběhla fosforylace u 134 spermií z 200 napočítaných buněk (67 %). U *in vitro* kapacitovaných spermií proběhla u 181 spermií z 200 napočítaných buněk (90,5 %). U ejakulovaných i *in vitro* kapacitovaných spermií se vyskytoval pouze jeden vzor fosforylace.

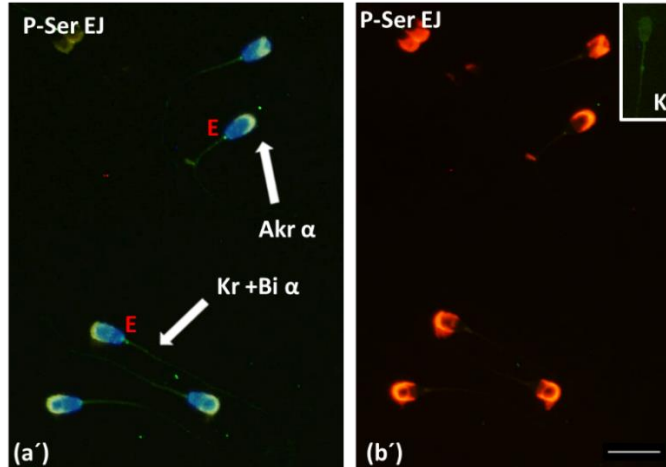


Graf 16: Četnosti podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermií: U této fixace se vyskytoval pouze podskupina I. U ejakulovaných (EJ) spermií se v podskupině I. vyskytuje 134 buněk a u kapacitovaných spermií (KAP) tvoří podskupinu I. 181 buněk.

Fixace vlhká (aceton/metanol 1:1)

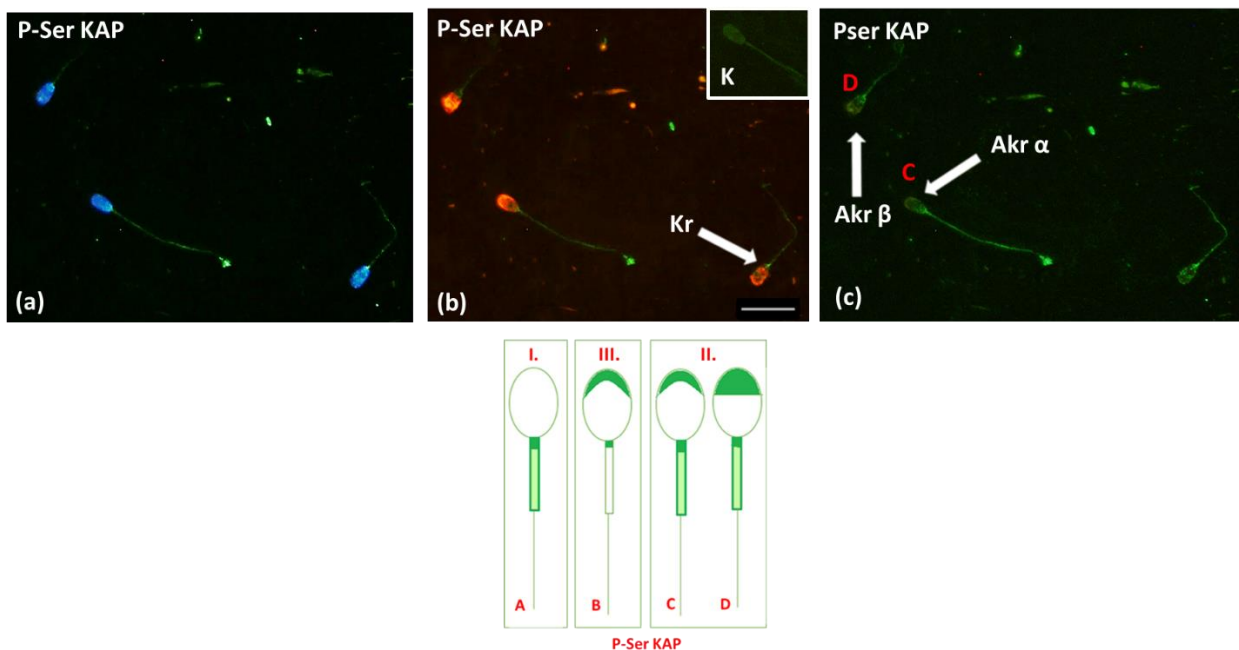
V první řadě snímků (obr. 42) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Ser u ejakulovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Ser označené pomocí FITC a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Na obrázku (c) jsou spermie značené pouze FITC (zeleně). Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Na obrázku (a') jsou spermie také označené DAPI a FITC a na (b') pouze PNA. U této fixace je fosforylace je viditelně detekována zvláště v Akr, v Kr a v některých případech i v Bi α . Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace. U spermie označené vzorem A, který patří do podskupiny I. (fosforylace v Bi), byla detekována fosforylace v Kr a Bi α . U vzoru E, který patří do podskupiny II. (fosforylace v Bi i Akr), proběhla fosforylace v Akr α , Kr, Bi α . U této fixace se u ejakulovaných spermií vyskytovaly ještě další tři vzory, které jsou znázorněny na dalším obrázku. Ve třetí podskupině (III.), kam patří B až D, byla detekována fosforylace v Akr. U vzoru B a C ještě v Kr.





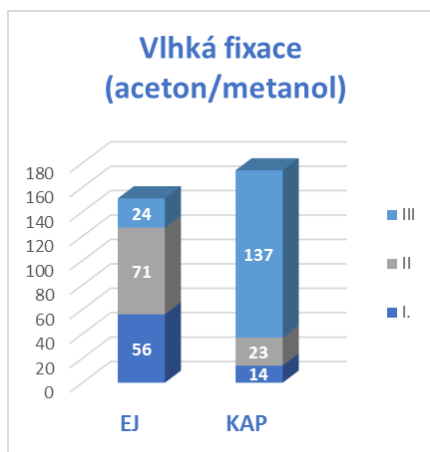
Obrázek 42: Ejakulované spermie – fixace vlhká (aceton/metanol): Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermích (P-Ser), ((a, a') – DAPI + FITC; (b, b') – FITC + PNA; (c) - FITC); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom (α – část akrosomu), Kr krček, Bi α – mitochondriální část bičíku, K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V další řadě snímků (obr. 43) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Ser u *in vitro* kapacitovaných spermíí. Na prvním snímku (a) jsou spermie označené pomocí DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na druhém snímku (b) jsou spermie s detekcí P-Ser označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně) a také je do pravého horního rohu vložena negativní kontrola (K). Na obrázku (c) jsou spermie značené pouze FITC (zeleně). Fosforylace je viditelně detekována v Kr a Bi α a v některých případech i v Akr. Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace. U spermie označené vzorem C se vyskytovala fosforylace v Akr α , Kr a Bi α . Vzor D vykazuje stejnou fosforylaci, ale jde o Akr β . Oba tyto vzory jsou zařazeny do podskupiny II. (fosforylace v Bi i Akr). V rámci této fixace u *in vitro* kapacitovaných spermíí se vyskytovaly ještě další dva vzory, které jsou znázorněny na posledním obrázku. V první podskupině vzorů (I. – fosforylace v Bi), kam patří pouze A, se vyskytovala fosforylace v Kr a Bi α . Ve třetí podskupině (III. – fosforylace v Akr), kam patří B, se vyskytovala fosforylace v Akr α a Kr.



Obrázek 43: Kapacitované spermie – fixace vlhká (aceton/metanol): Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermích (P-Ser), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA; (c) - FITC); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom (α – část akrosomu, β – celý akrosom), Kr krčček; K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

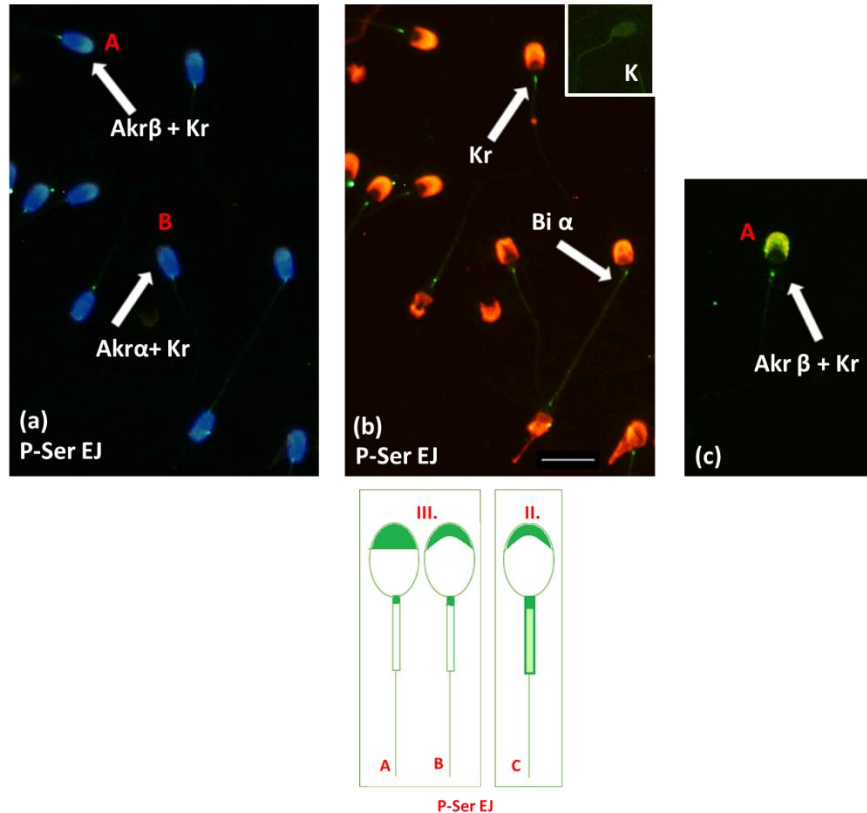
V grafu 17 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermíí zařazených do podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermíí proběhla fosforylace u 151 spermíí z 200 napočítaných buněk (75,5 %). U *in vitro* kapacitovaných spermíí proběhla u 174 spermíí z 200 napočítaných buněk (87 %). U ejakulovaných spermíí obsahovala první podskupina (I.) 56 buněk (37,1 %) díky fosforylaci v bičíku spermie. Podskupina III. (fosforylace v Akr; Graf – II.) obsahovala 71 buněk (47 %) a podskupina II. (fosforylace v Bi i Akr; Graf – III.) obsahovala 24 buněk (15,9 %). U *in vitro* kapacitovaných spermíí první podskupina vzorů (I. – fosforylace v Bi) obsahovala 14 buněk (8,1 %). Další podskupina (III. – fosforylace v Akr; Graf – II.) obsahovala 23 buněk (13,2 %) a poslední podskupina (II. – fosforylace v Bi i Akr; Graf – III.) obsahovala 137 buněk (78,7 %).



Graf 17: Četnosti podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermii: U ejakulovaných (EJ) spermii se v podskupině I. vyskytuje 56 buněk, u podskupiny II. 71 buněk a u podskupiny III. 24 buněk. U kapacitovaných spermii (KAP) tvoří podskupinu I. 14 buněk, podskupinu II. 23 buněk a podskupinu III. 137 buněk.

Fixace vlhká metanol 70%

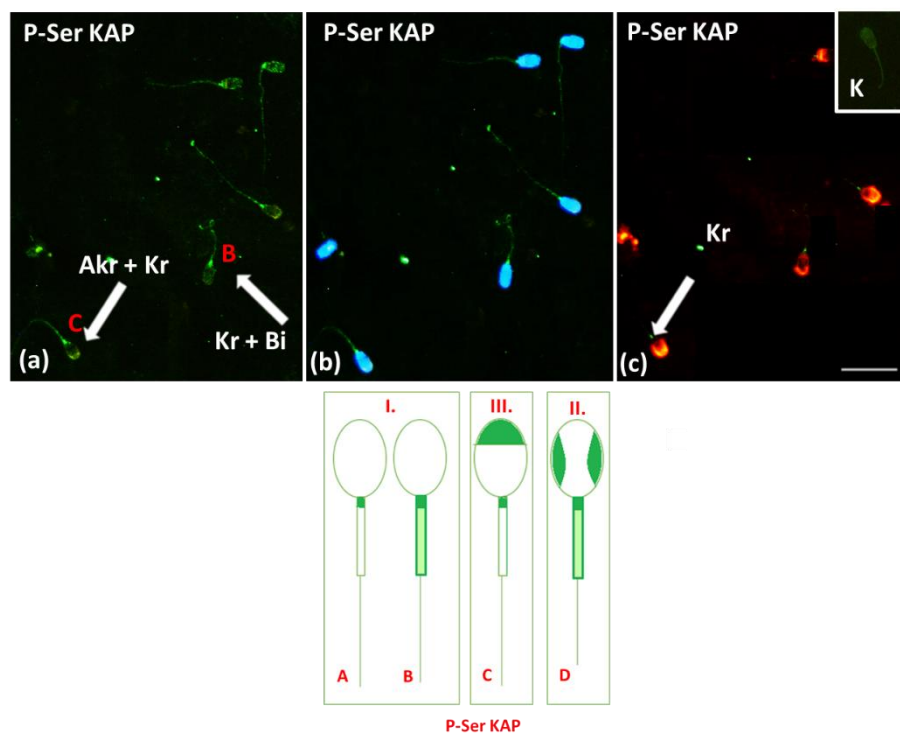
V první řadě snímků (obr. 44) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Ser u ejakulovaných spermii. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Ser označené pomocí FITC a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Na obrázku (c) jsou spermie značené pouze FITC. Fosforylace je viditelně detekována v Kr a Akr. Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvláště znázorněny na třetím obrázku. Na spermii označené vzorem A, byla detekována fosforylace v Akr β a Kr. U B podobně, s tím rozdílem, že šlo o Akr α . Oba tyto vzory patřily do podskupiny III. (fosforylace v Akr). V rámci této fixace u ejakulovaných spermii se vyskytoval ještě jeden vzor, a to C. Pro něj byla typická fosforylace v Akr α , Kr a Bi α . Patřil do podskupiny II. (fosforylace v Bi i Akr).



Obrázek 44: Ejakulované spermie – fixace vlhká metanol 70%: Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermích (P-Ser), (a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA; (c) - FITC; šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akrr akrosom (α – část akrosomu; β – celý akrosom), Kr krček, Bi α – mitochondriální část bičičku, K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

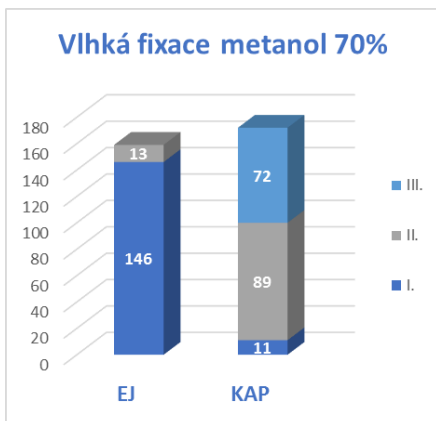
V další řadě snímků (obr. 45) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Ser u *in vitro* kapacitovaných spermíí. Na prvním snímku (a) jsou spermie s detekcí P-Ser značené pouze FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Značení pomocí DAPI (modře) vykresluje hlavičku spermie (jádro) a zelené značení FITC detekuje fosforylaci. Na obrázku (c) jsou spermie značené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Do pravého horního rohu je vložena negativní kontrola (K). Fosforylace je viditelně detekována v Kr, v některých případech ještě v Akrr a Bi α . Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace, které jsou zvláště zobrazeny na dalším obrázku. Na spermii označené vzorem B, byla detekována fosforylace v Kr a Bi α . Na C byla detekována v Akrr a Kr (III. podskupina – fosforylace v Akrr). Vzory A až B patří do podskupiny I. (fosforylace v Bi).

Pro A je typická fosforylace pouze v Kr. Do II. podskupiny (fosforylace v Bi i Akr) patří vzor D, pro který byla typická fosforylace v Kr, Bi a speciální typ imunofluorescence v Akr (Akr γ).



Obrázek 45: Kapacitované spermie – fixace vlhká metanol 70%: Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermiih (P-Ser), ((a) – FITC; (b) – DAPI + FITC; (c) – FITC + PNA); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, Kr krček, Bi bičík; K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

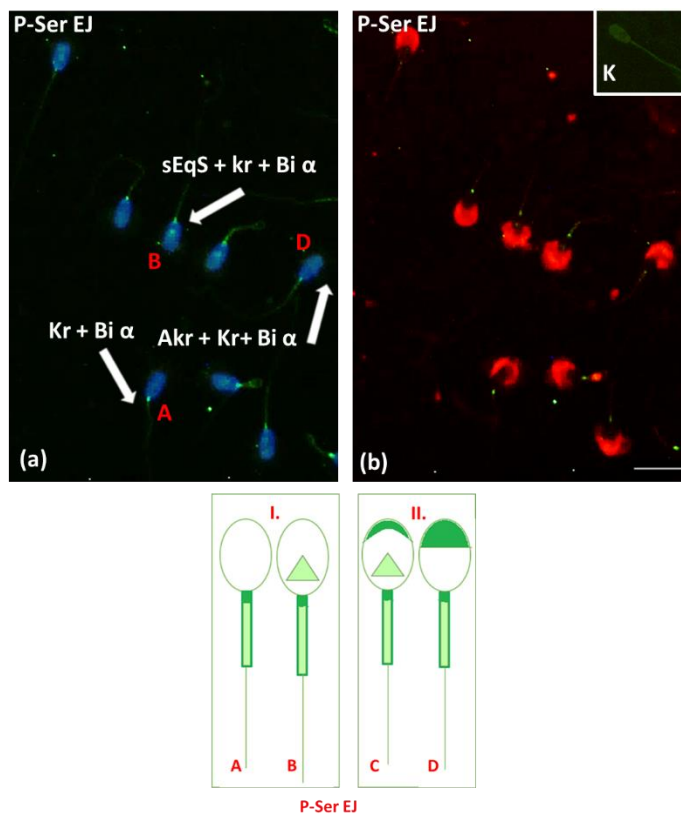
V grafu 18 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermiih zařazených do podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermiih proběhla fosforylace u 159 spermiih z 200 napočítaných buněk (79,5 %). U *in vitro* kapacitovaných spermiih proběhla u 172 spermiih z 200 napočítaných buněk (86 %). U ejakulovaných spermiih první podskupina označená III. (fosforylace v Akr; Graf – I.) obsahovala 146 buněk (91,8 %). Podskupina II. (fosforylace v Bi i Akr; Graf – II.) obsahovala 13 buněk (8,2 %). U *in vitro* kapacitovaných spermiih první podskupina vzorů (I. – fosforylace v Bi), obsahovala 11 spermiih (6,4 %). Další podskupina (III. – fosforylace v Akr; Graf – II.) obsahovala 89 buněk (51,7 %) a poslední skupina (II. – fosforylace v Bi i Akr; Graf – III.) obsahovala 72 buněk (41,9 %).



Graf 18: Četnosti podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermií: U ejakulovaných (EJ) spermií se v podskupině I. vyskytuje 146 buněk, u podskupiny II. 13 buněk. U kapacitovaných spermií (KAP) tvoří podskupinu I. 11 buněk, podskupinu II. 89 buněk a podskupinu III. 72 buněk.

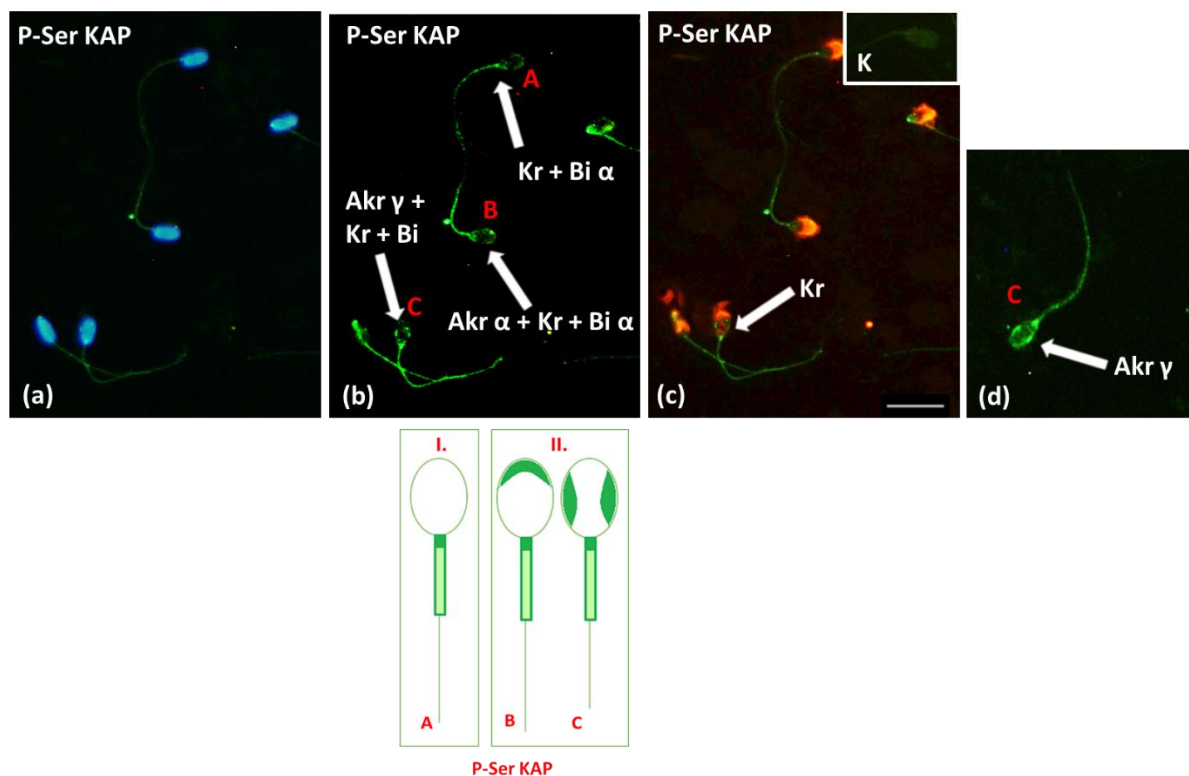
Vlhká fixace aceton 70%

V první řadě snímků (obr. 46) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Ser u ejakulovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Ser označené pomocí FITC a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Fosforylace je viditelně detekována v Kr a Bi α , v některých případech i v Akr a sEqS. Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvlášť znázorněny na třetím obrázku. Na spermii označené vzorem A, byla detekována fosforylace v Kr a Bi α . Pro vzor B byla typická fosforylace v sEqS, Kr a Bi α . Oba tyto vzory patří do podskupiny I. (fosforylace v Bi). Do podskupiny II patří vzory C až D. Ve vzoru D se vyskytovala fosforylace v Akr, Kr a Bi α a v C v Akr α , sEqS, Krk a Bi α .



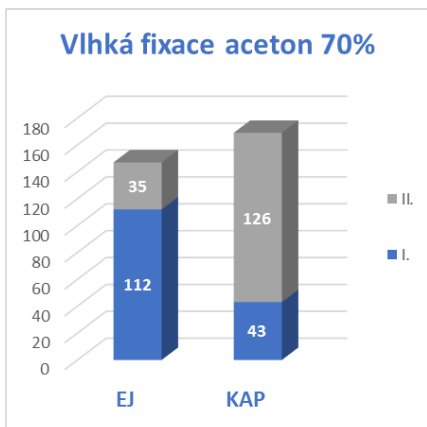
Obrázek 46: Ejakulované spermie – fixace vlhká aceton 70%: Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermích (P-Ser), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA;); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom, sEqS ekvatoriální segment, Kr krček, Bi α – mitochondriální část bičiku, K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V další řadě snímků (obr. 47) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Ser u *in vitro* kapacitovaných spermii. Na prvním snímku (a) jsou spermie označené pomocí DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na druhém snímku (b) a (d) jsou spermie s detekcí P-Ser označené pouze pomocí FITC (zeleně). Na obrázku (d) jsou spermie označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně) a také je do pravého horního rohu vložena negativní kontrola (K). Fosforylace je viditelně detekována v Kr a Bi α a v některých případech i v Akr. Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace. Na spermii označené vzorem A (podskupina I – fosforylace v Bi) se vyskytovala fosforylace v Kr a Bi α . Další dva vzory jsou ze skupiny II (fosforylace v Bi a Akr). Na vzoru B byla detekována fosforylace v Akr α , Kr a Bi α a na C v Akr γ , Kr a Bi α .



Obrázek 47: Kapacitované spermie – fixace vlhká aceton 70%: Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermích (P-Ser), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC; (c) – FITC + PNA; (d) – FITC); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); Akr akrosom (α – část akrosomu, γ – specifický tvar akrosomu), Kr krček, Bi (α – mitochondriální část bičíku); K negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

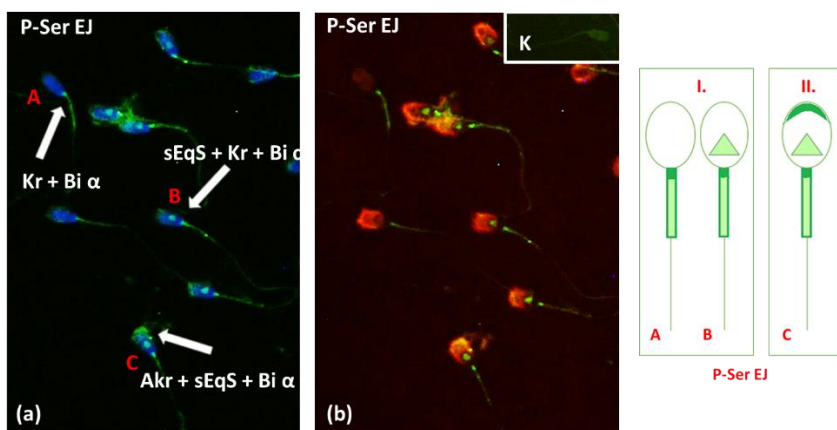
V grafu 19 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermíí zařazených do podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermíí proběhla fosforylace u 147 spermíí z 200 napočítaných buněk (73,5 %). U *in vitro* kapacitovaných spermíí proběhla u 169 spermíí z 200 napočítaných buněk (84,5 %). U ejakulovaných spermíí první podskupina (I. – fosforylace v Bi) obsahovala 112 buněk (76,2 %). Podskupina II. (fosforylace v Bi i Akr) obsahovala 35 buněk (23,8 %). U *in vitro* kapacitovaných spermíí první podskupina vzorů (I. – fosforylace v Bi) obsahovala 43 spermíí (25,4 %). Druhá skupina (II. – fosforylace v Bi i Akr) obsahovala 126 spermíí (74,6 %).



Graf 19: Četnosti podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermií: U ejakulovaných (EJ) spermií se v podskupině I. vyskytuje 112 buněk, u podskupiny II. 35. U kapacitovaných spermií (KAP) tvoří podskupinu I. 43 buněk a podskupinu II. 126.

Zasušení spermií s následnou fixací

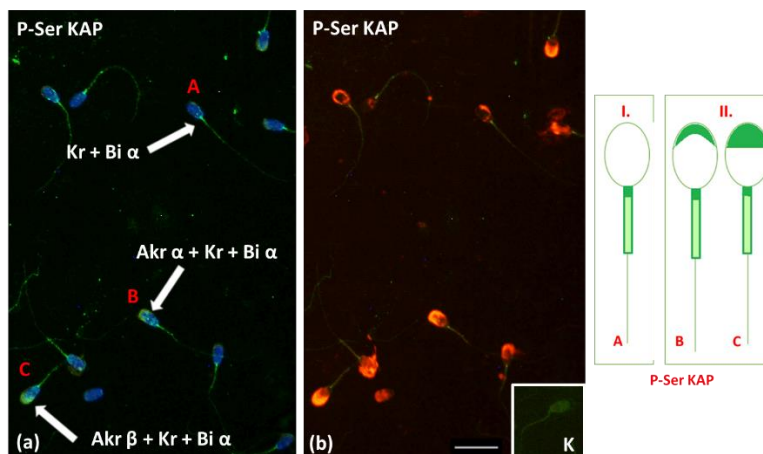
V první řadě snímků (obr. 48) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Ser u ejakulovaných spermií. Na prvním snímku (a) jsou spermie značené DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na obrázku (b) jsou spermie s detekcí P-Ser označené pomocí FITC a vazbou lektinu PNA (červeně), kterým je detekována integrita akrosomu. Obsahuje také negativní kontrolu (K), která slouží k porovnání fosforylace. Fosforylace je viditelně detekována v Kr a Bi α , v některých případech i v Akr a sEqS. Pomocí šipek jsou znázorněny jednotlivé detekované vzory této fixace, které jsou zvláště znázorněné na třetím obrázku. Na spermii označené vzorem A byla detekována fosforylace v Kr a Bi α . Pro vzor B byla typická fosforylace v sEqS, Kr a Bi α . Oba tyto vzory patří do podskupiny I. (fosforylace v Bi). Posledním vzorem této fixace je vzor C (podskupina II. – fosforylace v Bi i Akr), který vykazuje fosforylaci v Akr, sEqS, Kr a Bi α .



Obrázek 48: Ejakulované spermie – zasušení spermií s následnou fixací: Lokalizace fosforylovaných míst na ejakulovaných spermiích (P-Ser), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC +

PNA;); šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); *Akr* akrosom, *sEqS* subekvatoriální segment, *Kr* krček, *Bi α* – mitochondriální část bičíku, *K* negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

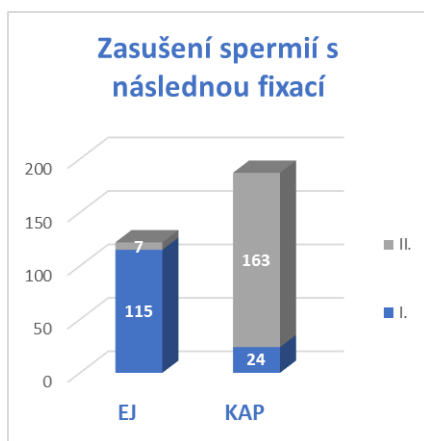
V další řadě snímků (obr. 49) je zobrazena detekce fosforylovaných proteinů P-Ser u *in vitro* kapacitovaných spermii. Na prvním snímku (a) jsou spermie označené pomocí DAPI (modře) a FITC (zeleně). Na druhém snímku (b) jsou spermie s detekcí P-Ser označené pomocí FITC (zeleně) a vazbou lektinu PNA (červeně) a také je do pravého dolního rohu vložena negativní kontrola (K). Fosforylace je viditelně detekována v *Kr* a *Bi α* a v některých případech i v *Akr*. Pomocí šipek jsou označeny jednotlivé vzory této fixace. Na spermii označené vzorem A (podskupina I. – fosforylace v *Bi*) byla detekována fosforylace v *Kr* a *Bi α*. Další dva vzory patří do podskupiny II. (fosforylace v *Bi* i *Akr*). Pro vzor B byla typická fosforylace v *Akr α*, *Kr* a *Bi α* a pro C v *Akr β*, *Kr* a *Bi α*.



Obrázek 49: Kapacitované spermie – zasušení spermii s následnou fixací: Lokalizace fosforylovaných míst na kapacitovaných spermii (P-Ser), ((a) – DAPI + FITC; (b) – FITC + PNA; šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře), akrosomy jsou označeny PNA (červeně, rhodamin); *Akr* akrosom (α – část akrosomu, β – celý akrosom), *Kr* krček, *Bi α* – mitochondriální část bičíku; *K* negativní kontrola; jednotlivými písmenky jsou označeny fosforylační vzory této fixace; měřítko 10 μ l, zvětšení 400x.

V grafu 20 je znázorněno početní zastoupení ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermii zařazených do podskupin. Pracovalo se s daty z pěti pokusů, z nichž byly vypočteny průměry, které zobrazuje graf níže. U ejakulovaných spermii proběhla fosforylace u 122 spermii z 200 napočítaných buněk (61 %). U *in vitro* kapacitovaných spermii proběhla u 187 spermii z 200

napočítaných buněk (93,5 %). U ejakulovaných spermií první podskupina (I. – fosforylace v Bi) obsahovala 115 buněk (94,3 %). Podskupina II. (fosforylace v Bi i Akr) obsahovala 7 buněk (5,7 %). U *in vitro* kapacitovaných spermií první podskupina vzorů (I. – fosforylace v Bi) obsahovala 24 buněk (12,8 %). Druhá podskupina (II. – fosforylace v Bi i Akr) obsahovala 163 buněk (87,2 %).

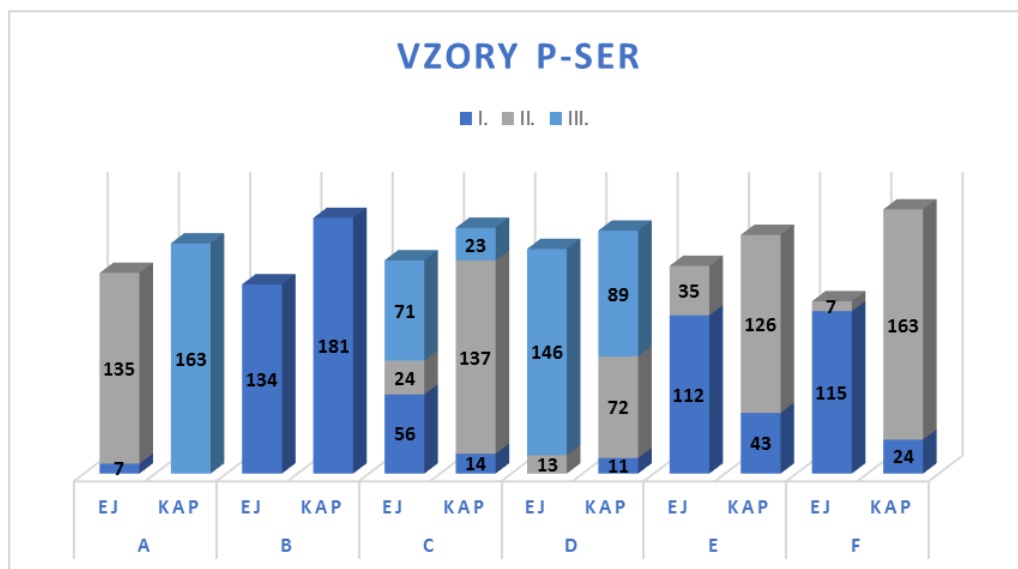


Graf 20: Četnosti podskupin vzorů u ejakulovaných i kapacitovaných spermií: U ejakulovaných (EJ) spermií se v podskupině I. vyskytuje 115 buněk, u podskupiny II. 7. U kapacitovaných spermií (KAP) tvoří podskupinu I. 24 buněk a podskupinu II. 163.

5.1.2.1 Souhrnné vyhodnocení P-Ser

Vzhledem k tomu, že u kančích spermií nebyl jasný vzor detekce fosforylace na serinových zbytcích, tak tyto fixace nebyly vyhodnocovány statisticky. Byly zde pouze popsány vyskytující se vzory fosforylace u ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermiích. K souhrnnému porovnání fixací, byl vytvořen graf, který obsahuje tři vzory fosforylace: I. – fosforylace pouze v bičíku, II. – fosforylace v bičíku i akrosomu a III. – fosforylace pouze v akrosomu.

V grafu 21 jsou znázorněny absolutní četnosti detekovaných vzorů fosforylace u šesti fixací. U všech vzorků byly fosforylační vzory vyhodnocovány u 200 spermatických buněk. Sledovalo se, o kolik procent se zvýší fosforylace (výskyt fosforylačních vzorů) při přechodu do kapacitačního stavu a jak se změní typy vzorů. Pokus byl proveden pětkrát a ze vzniklých dat byly vypočteny průměry, které jsou zde popisovány jako absolutní četnosti.



Graf 21: Vzory fosforylace na serinu (P-Ser) u kančích spermii: Souhrnné porovnání fixací kančích spermii (ejakulovaných i kapacitovaných) s následnou detekcí P-Ser po inkubaci s polyklonální králičí protilátkou AB1603 a příslušnou sekundární protilátkou (anti-rabbit). EJ – ejakulované spermie, KAP – *in vitro* kapacitované spermie; A – fixace 2% formaldehydem ve vodě s BSA, B – fixace 2% formaldehydem ve vodě, C – vlhká fixace (aceton/metanol), D – vlhká fixace (metanol 70%), E – vlhká fixace (aceton 70%), F – zasušení spermii s následnou fixací. Legenda: I. – fosforylace pouze v bičíku, II. – fosforylace v bičíku i akrosomu, III. – fosforylace pouze v akrosomu.

V rámci fixací se vyskytovaly různé vzory na pomezí ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermii. Z prvního pohledu je patrné, že nejčastěji se u všech fixací bez ohledu na to, zda šlo o ejakulované nebo *in vitro* kapacitované spermie, vyskytoval vzor II, kdy šlo o fosforylaci v bičíku i akrosomu zároveň. Hned potom se jen s malým rozdílem vyskytoval vzor I., kde byla detekována fosforylace pouze v bičíku. Vzor III., kde byla detekována fosforylace pouze v akrosomu, se vyskytoval méně často.

Zajímavé je, že u fixace B (2% formaldehyd ve vodě) se vyskytoval pouze vzor I., a to u ejakulovaných i *in vitro* kapacitovaných spermii. To u žádné jiné fixace nebylo. Pro fixaci C (vlhká fixace aceton/metanol) bylo typické, že u obou skupin (EJ i KAP) byly detekovány všechny tři vzory fosforylace. U ejakulovaných spermii převažoval vzor III a v nejmenší množství se vyskytoval vzor II. U kapacitovaných spermii výrazně převažoval vzor II, další dva byly v zanedbatelném množství.

Fixace E (vlhká fixace – aceton 70%) a F (zasušení spermií s následnou fixací) vyšly velmi podobně. U obou fixací i obou skupin (EJ a KAP) byly detekovány dva fosforylační vzory (I. a II.). U ejakulovaných spermií výrazně převažoval vzor I. (fosforylace pouze v bičíku) a u *in vitro* kapacitovaných spermií zase výrazně převažoval vzor II. (fosforylace v bičíku i akrosomu).

Fixace A (2% formaldehyd ve vodě s BSA) se v rámci fosforylačních vzorů úplně odlišovala od ostatních. U ejakulovaných spermií obsahovala naprostá většina buněk fosforylaci v bičíku i akrosomu (vzor II.), až na nepatrné množství buněk ze vzoru I. U *in vitro* kapacitovaných spermií se vyskytoval pouze vzor III. (fosforylace pouze v akrosomu), což byla naprostá výjimka ve srovnání s ostatními fixacemi.

Poslední fixace D (vlhká fixace – metanol 70%) se zase vyznačovala naprostým převládáním vzoru III. (fosforylace pouze v akrosomu). U ejakulovaných spermií bylo detekováno pouze nepatrné množství vzoru II. (fosforylace v bičíku i akrosomu). U *in vitro* kapacitovaných spermií se vyskytovaly všechny tři fosforylační vzory. Vzor I. (fosforylace pouze v bičíku) zde hrál pouze malou roli. Ve větším zastoupením se vyskytoval vzor II. (fosforylace v bičíku i akrosomu). Vzor III. (fosforylace pouze v akrosomu) převažoval.

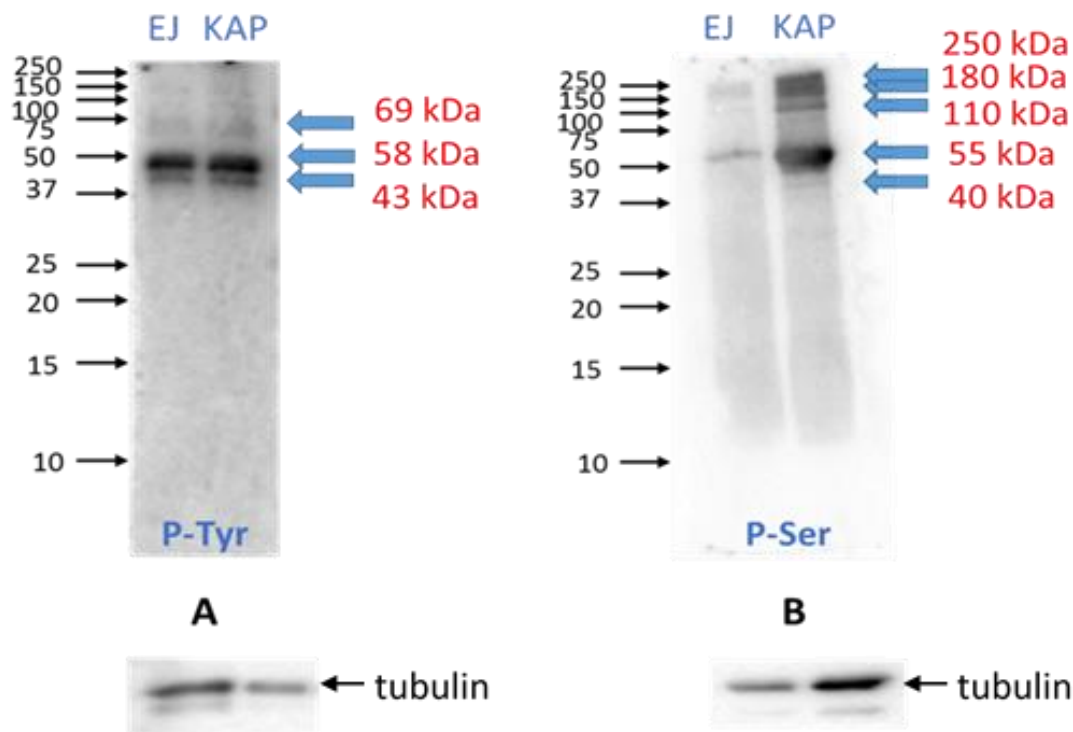
Díky velké různorodosti fosforylačních vzorů v rámci různých fixací, nelze usoudit, který fosforylační vzor je markerem kapacity u P-Ser. U všech fixací je viditelně detekována zvýšená fosforylace proteinů u *in vitro* kapacitovaných spermií. Z výsledků je patrné, že u kančích spermií je pro serin typická fosforylace zvláště v bičíku.

5.2 DETEKCE FOSFORYLOVANÝCH PROTEINŮ V EXTRAKTECH ZE SPERMIIÍ

Výsledky získané imunofluorescenčním barvením byly také podpořeny Western blot analýzou proteinových extraktů kančích spermií za použití anti-fosfotyrosinové protilátky (klon 4G10) a anti-serinové protilátky (AB1603). Proteinové extrakty byly vyrobeny z ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií (kap. 4.3.). Po extrakci byly proteiny separovány pomocí SDS elektroforézy (kap. 4.6.) a přeneseny z gelu na NC membránu (kap. 4.7.). Po elektropřenosu byla provedena inkubace se specifickými primárními i sekundárními protilátkami (kap. 4.8.) a byla provedena vizualizace. Nanáška proteinů byla vždy ověřena pomocí barvení Ponceau na proteiny.

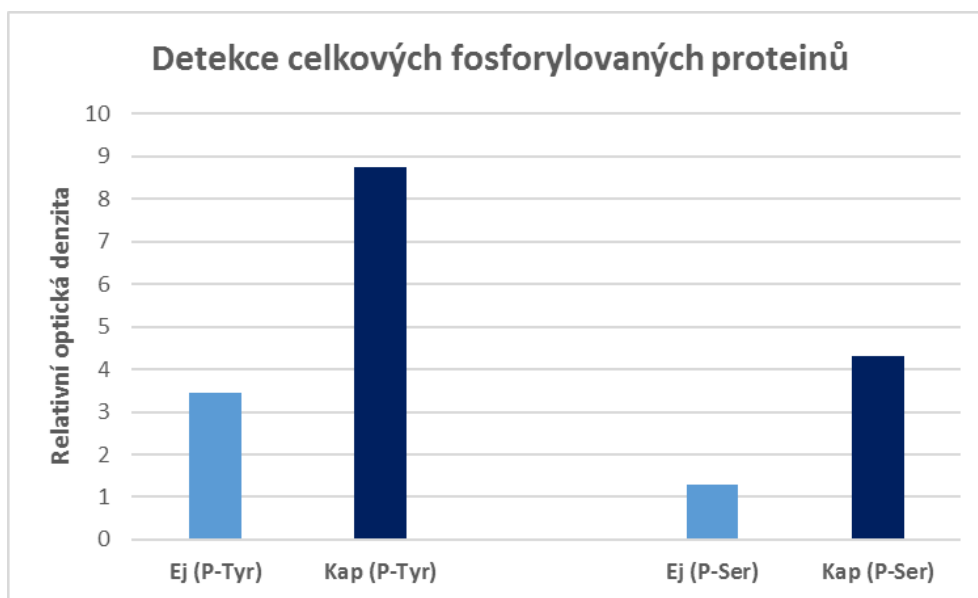
Na obrázku 50 jsou zobrazeny membrány s celkovými proteiny ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií po inkubaci se specifickými protilátkami. V extraktech ze spermií kance se po vizualizaci proteinů podařilo pomocí specifických protilátek prokázat fosforylaci na tyrosinu i serinu. Za použití kalibrační křivky podle molekulových proteinových standardů byly odečteny přibližné molekulové hmotnosti detekovaných proteinů. Při použití anti-tyrosinové protilátky (A) byly v extraktech detekovány proteiny o velikosti 69 kDa, 58 kDa a 43 kDa. Tyto proteiny se vyskytovaly jak u extraktu z ejakulovaných spermií (EJ), tak u extraktu z *in vitro* kapacitovaných spermií (KAP), takže se mezi sebou nelišily v molekulových váhách. U kapacitovaných spermií (KAP) byl detekován silnější signál fosforylovaných proteinů, což dokládá o zvýšení tyrosinové fosforylace při kapacitaci spermií na těchto proteinech.

Při použití anti-serinové protilátky (B) se v extraktech detekované proteiny mírně lišily mezi ejakulovanými (EJ) a *in vitro* kapacitovanými (KAP) spermiemi. U extraktu s ejakulovanými spermiemi (EJ) vykazoval nejsilnější značení proteinový proužek o velikosti 55 kDa. Tento protein se vyskytoval i u *in vitro* kapacitovaných spermií, jen s několikanásobně větší intenzitou. U ejakulovaných (EJ) spermií byly detekovány ještě tři slabší molekulové proužky o velikosti 110 kDa, 180 kDa a 250 kDa. Tyto proteiny byly taktéž detekovány i u *in vitro* kapacitovaných (KAP) spermií, ale s několikanásobně větší intenzitou. U *in vitro* kapacitovaných (KAP) spermií byl detekován ještě jeden protein o nejmenší velikosti 40 kDa. Opět je zde viditelné, že dochází ke zvýšení serinové fosforylace při kapacitaci spermií na těchto proteinech.



Obrázek 50: Reprezentační imunodetekce: Detekce P-Tyr pomocí monoklonální myší protilátky klon 4G10 (A) a P-Ser (B) pomocí polyklonální králičí protilátky AB1903 na NC membráně v proteinových extraktech z kančích spermií: EJ – ejakulované spermie, KAP – kapacitované spermie; byly použity primární protilátky klon 4G10 v ředění 1:5000 a AB1603 v ředění 1:500 a sekundární protilátky anti-mouse/anti-rabbit konjugované s křenovou peroxidázou v ředění 1:3000; modré šipky označují specifické protilátkové označení proteinu, černé šipky označují molekulovou hmotnost proteinových standardů v kDa; kontrola proteinové nanášky ve vzorcích pomocí detekce s myší monoklonální protilátkou proti α -tubulinu.

Pro stanovení míry fosforylace proteinů před a po kapacitaci ve vzorcích spermií byla provedena denzitometrická analýza. Podle denzitometrického hodnocení (graf 22) je viditelně detekován nárůst ve fosforylaci proteinů u *in vitro* kapacitovaných spermií. Relativní optická denzita celkových fosforylovaných proteinů v extraktech spermií byla vztažena k nanášce tubulinu (viz obr. 50).



Graf 22: Denzitometrická analýza: detekce fosforylovaných proteinů vztažená k množství α tubulinu ve vzorcích.

6 DISKUZE

Zralé spermie jsou vysoce specializované buňky, které nejsou moc transkripčně aktivní. Tudíž musí podléhat posttranslačním modifikacím, jako je fosforylace, aby regulovaly důležité procesy, mezi které patří kapacitace, hyperaktivace a akrosomální reakce. Tyto procesy jsou nezbytné pro navázání, proniknutí a fúzi spermie s oocytem (Yanagimachi 1994).

Kapacitace byla objevena nezávisle v roce 1951 Austinem (1951) a Changem (1951) u krys a králíků. Molekulární podstata kapacitace není stále dostatečně pochopena (Visconti et al. 1998). Savčí spermie nemají schopnost oplodnit oocyt bezprostředně po ejakulaci, přestože jsou motilní (Visconti et al. 1995a). Kapacitace probíhá v *in vivo* podmínkách v samičím genitálním traktu nebo *in vitro* pomocí kapacitačních medií (Tardif et al. 2001). Používají se definovaná média v rovnovážných solných roztocích s odpovídající koncentrací elektrolytů, metabolických zdrojů energie, Ca^{2+} , HCO_3^- a zdrojem bílkovin (obvykle bovinní sérový albumin BSA). Toto složení se podobá složení ovidukální tekutiny (Yanagimachi 1994).

Existují mezidruhové rozdíly v látkách potřebných pro indukci *in vitro* kapacitace v kapacitačních médiích vzhledem k mezidruhové rozdílnosti fyzikálních a chemických vlastností plazmatické membrány spermií. Tato diplomová práce byla zaměřena na kapacitaci kančích spermií, proto jsme používali kapacitační médium dle Ded et al. (2010), kde zdrojem bílkovin bylo BSA a bylo s ním dosaženo dobrých výsledků. Dodání BSA do kapacitačních medií je důležité z hlediska jeho schopnosti odstraňovat cholesterol z plazmatické membrány spermie (Visconti et al. 1999). Tento cholesterolový efflux je jeden z nejdůležitějších procesů v kapacitaci, protože zvyšuje fluiditu membrány (Osheroff et al. 1999). Tyto změny v plazmatické membráně způsobí odhalení receptorů pro rozpoznání a vazby *zona pellucida*.

Rozvolnění membrány způsobené BSA způsobí snadnější splnutí spermie s oolemou oocytu a influx extracelulárního vápníku, který je nutný pro indukci akrosomální reakce (Martinez & Morros 1996).

Kromě cholesterolového effluxu probíhá během kapacitace další řada událostí na plazmatické membráně spermií a také uvnitř. Mezi molekulární změny patří například aktivace specifických iontových kanálů, influx vápníku a zvýšení hyperpolarizace (Tardif et al. 2001; Naz a Rajesh 2004). Dochází k zvýšení aktivity adenylyl cyklázy, čím se zvýší i koncentrace cAMP, který

aktivuje PKA (Langlais & Roberts 1985; Jabbari et al. 2009). PKA následně fosforyluje proteiny na tyrosinových zbytcích (Visconti et al. 1995b).

Fosforylace je jednou z forem posttranslační modifikace proteinů, které kontrolují a řídí mnoho biologických procesů a podílí se na přenosu signálu v buňce (Witze et al. 2007). Je to reverzibilní modifikace proteinů za použití zbytku kyseliny fosforečné, který se přidává na kyslíkový atom příslušného aminokyselinového zbytku (Klumpp & Krieglstein 2002). Ve spermii dochází k fosforylaci na serinu, treoninu a tyrosinu, ale bylo identifikováno pouze pár fosforylovaných proteinů (Urner & Sakkas 2003). Úloha fosfotreoninu a fosfoserinu je spíše strukturní, ale fosfotyrosin podléhá mnohým regulačním interakcím (Hunter 2009) a je jako jediný považován za výlučný indikátor signálních drah (Naz a Rajesh 2004).

Tyrosinová fosforylace proteinů hraje důležitou roli v kapacitaci spermií, v hyperaktivaci motility, interakci se *zona pellucida*, akrosomální reakci a membránové fúzi. Jde tedy o velmi významnou fosforylaci a její hodnocení nám může pomoci dalšímu pochopení molekulárních mechanismů fertilizace.

Tyrosinová fosforylace probíhá spontánně ve spermiích *in vitro* za předpokladu, že jsou zředěny v kapacitačním médiu (Urner et al. 2001) a jsou zbaveny semenné plasmy (Urner & Sakkas 2003). Konkrétně je zvýšení tyrosinové fosforylace závislé na přítomnosti BSA, Ca^{2+} a HCO_3^- (Visconti et al. 1995a; Salicioni et al. 2007)., což je patrné z našich výsledků, když jsme detekovali zvýšení tyrosinové fosforylace v *in vitro* kapacitovaných spermiích oproti spermiím ejakulovaným.

V této diplomové práci jsme se zaměřili na optimalizaci metody fixace pro imunofluorescenční mikroskopii pro sledování změn ve vzorech fosforylovaných proteinů v kančích spermiích před a po proběhlé *in vitro* kapacitaci. Detekovali jsme tyrosinové fosforylační vzory napříč 11 typům fixací a serinové fosforylační vzory u vybraných šesti fixací. U kančích spermií byla tyrosinová fosforylace pro imunofluorescenční mikroskopii již několikrát zkoumána, ovšem serinová fosforylace nikoli, a proto tato práce přináší nové poznatky v detekovaných serinových fosforylačních vzorech kančích spermií.

Fixační techniky mohou mít použití v experimentálních a klinických studiích o kapacitaci spermií, akrosomální reakci a fertilizaci savců, včetně člověka. Fixace je jedním z nejdůležitějších kroků při imunoznačení. Jejím cílem je dosažení dobré morfologické konzervace a zároveň

zachování antigenicity (Jamur & Oliver 2010b). Haas et al. (1988) došli k závěru, že imunocytochemie může znamenat chybné interpretace týkající se interakcí antigen/protilátka na povrchu plazmatické membrány spermie, pokud není věnována pozornost tomu, aby se ověřilo, že požadované protilátky se váží na antigenně intaktní plazmatickou nebo akrosomální membránu.

Permeabilizace poskytuje přístup k intracelulárním nebo intraorganelárním antigenům, proto je nezbytná. Běžně se používá spousta organických rozpouštědel a detergentů (Jamur & Oliver 2010a). V naší práci se kromě formaldehydu používala ještě organická rozpouštědla, jako je metanol a aceton.

Tyrosinová fosforylace spermatických proteinů byla u vybraných druhů savců detekována v akrosomální oblasti, v subekvatoriálním segmentu a v bičíku (Jones et al. 2008). S výjimkou kanců (Tardif et al. 2001) se zdá, že hlavní částí spermie představující tyrosinovou fosforylaci, je bičík (Urner & Sakkas 2003). Je nezbytné rozlišovat lokalizaci tyrosinových fosforylovaných proteinů, aby bylo možné porozumět signalizaci, která v buňce probíhá. Lokalizaci fosforylovaných proteinů v těchto částech buňky u kančích spermií jsme zaznamenali u všech provedených fixací. Rozdíl se pak vyskytovaly až u jednotlivého zastoupení fosforylačních vzorů mezi skupinami fixací, přičemž fosforylace v bičíku se vyskytovala nejméně často.

Imunolokalizace fosforylačních vzorů ukázala v kančích spermiích jednotlivá zastoupení již popsaných vzorů. Naše výsledky ukazují místa lokalizace a četnost fosforylačních vzorů v kančích spermiích. U tyrosinové fosforylace jsme se opírali o tvrzení Tardif et al. (2001), který popsal proběhlou fosforylaci v *in vitro* kapacitované spermii v akrosomu. U nekapacitované spermie se fosforylace v akrosomu nevyskytuje. Proto jsme v této práci rozdělili spermie do dvou skupin podle vzorů, a to na nekapacitované spermie (I.) a kapacitované spermie (II.) podle detekce fosforylace právě v akrosomu. Náš výzkum ukázal, že existuje signifikantní rozdíl tyrosinové fosforylace ($p < 0,05$) v oblasti akrosomu nekapacitovaných od kapacitovaných spermií.

Naší první provedenou fixací byla fixace formaldehydem ve vodě s BSA, která byla provedena dle metodiky Tardif et al. (2001). Výsledky Tardif et al. (2001) se shodují s našimi výsledky detekce fosforylačních vzorů, kdy jsme detekovali významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi ejakulovanými a *in vitro* kapacitovanými spermiemi. Pro ejakulované spermie byl typický fosforylační vzor v subekvatoriálním segmentu bez přítomnosti fosforylace v akrosomu (I.) a v některých případech

i v bičíku. Důležité je, že se zde nevyskytovala fosforylace v akrosomu a tím jsme potvrdili zjištění, které popsali Tardif et al. (2001).

Fosforylace v subekvatoriálním segmentu je součástí organizačního centra multimolekulárních komplexů, které zprostředkovávají fúzi vedoucí k akrosomální reakci (Jones et al. 2008), a z toho vyplývající její detekce důležitá k pochopení celého procesu fertilizace. Fosforylace v bičíku má také svůj důležitý úkol. Je spojena s hyperaktivním pohybem, ke kterému dochází v průběhu kapacitace (Mahony & Gwathmey 1999; Jabbari et al. 2009).

Po fixaci formaldehydem se *in vitro* kapacitované spermie vyznačovaly fosforylací jak v subekvatoriálním segmentu, tak v akrosomu. Vyskytovala se zde i nepatrná skupina buněk bez fosforylace v akrosomu (fosforylační vzor I.) (12,6 %). U těchto buněk můžeme tvrdit, že zde kapacitace neproběhla. K tomuto jevu může dojít z různých důvodů, kdy spermie nemusí na kapacitační médium vůbec reagovat. Je také možné, že se zde vyskytuje určitá subpopulace spermií, které potřebují delší čas inkubace v kapacitačním médiu, a proto nevykazují fosforylaci. Toto tvrzení se opírá i o práci Cohen-Davag et al. (1995), který popsal, že spermie nekapacitují všechny najednou, po určité minimální době inkubace v kapacitačním se ustanoví populace kapacitovaných spermií (od 1-10 % z počtu spermií, závislé na druhu i konkrétním jedinci), která se po určité době (než se spermie vyčerpají) udržuje.

Tato fixace je tedy velmi spolehlivá. U ejakulovaných spermií nebyla zaznamenána žádná spontánní kapacitace ani jiné nežádoucí jevy, což může být poškození akrosomu či jádra. U *in vitro* kapacitovaných spermiích mělo jen nepatrné množství spermií fosforylační vzor odpovídající nekapacitovaným spermii. U této fixace lze tedy bezpečně detekovat kapacitaci kančích spermií dle proběhlé fosforylace v akrosomu.

Další dvě fixace byly taktéž formaldehydové. Jedna byla také v suspenzi, jen bez přidání BSA. Ta druhá byla připravena fixací spermií formaldehydem přímo na skle. Zajímalo nás, zda bude mít na výsledcích velkou roli typ přípravy fixace, a to, jak se mezi sebou budou lišit fixace připravené v suspenzi nebo přímo přidáním fixačního činidla do kapky suspenze spermií. Z našich výsledků je patrné, že se u obou fixací vyskytují pouze malé rozdíly oproti první formaldehydové fixaci v suspenzi s přídatkem BSA. Rozdíl byl v tom, že se u ejakulovaných spermií u obou fixací objevila nepatrná skupina spermií, které se podle fosforylačního vzoru jevíly jako kapacitované.

Ovšem stále převažovala skupina nekapacitovaných spermií (73,1 % a 74,8 %). U *in vitro* kapacitovaných spermií stále bezpečně převažovaly spermie s fosforylačním vzorem v akrosomu (89,2 % a 84,5 %). Můžeme tedy podotknout, že mezi fixací v suspenzi a v kapce suspenze spermií přímo na skle není téměř žádný rozdíl. Avšak na rozdíl od fixace spermií v suspenzi není fixace v kapce přímo na skle tak časově a experimentálně náročná. Navíc jsou výsledky u této fixace stejně kvalitní jako u fixací připravovaných v suspenzích.

Další fixací, která je také velmi často používána, byla vlhká fixace (aceton/metanol). Zdá se, že vlhká fixace určitým činidlem fixuje všechny buňky stejně. Dokáže velmi dobře porušit plazmatickou membránu a dojde k fixaci skrz celou buňku narušením v membráně. Takže u této fixace nebyly patrné rozdíly mezi jednotlivými buňkami z pohledu intenzity fluorescence. U této fixace již nešlo bezpečně detekovat proběhlou kapacitaci dle fosforylace v akrosomu. U ejakulovaných spermií byla zaznamenána poměrně velká skupina s fosforylací detekovanou v akrosomu (55,9 %). Ovšem u *in vitro* kapacitovaných spermií významně převažovala skupina s kapacitačním vzorem (82,6 %).

U této fixace se vyskytovala naprostá převaha fosforylačních vzorů zároveň v akrosomu i subekvatoriálním segmentu. Jones et al. (2008) uvádějí podobné výsledky při detekci tyrosinové fosforylace u kančích, býčích a beraních spermií za použití vlhké fixace. U všech těchto druhů je většina proteinů fosforylována v subekvatoriálním segmentu a akrosomu. V naší metodice i v metodice Jones et al. (2008) byla použita primární protilátka 4G10. Fosforylací jsme detekovali také v mitochondriální části bičíku a v celé délce bičíku.

Další čtyři fixace byly modifikací vlhké fixace v kapce suspenze spermií přímo na skle. Zaměřili jsme se na detekci rozdílů mezi samostatnou fixací pouze metanolem a acetonem. Chtěli jsme zjistit, zda bude významný rozdíl mezi prvotní vlhkou fixací s oběma rozpouštědly a fixací pouze s jedním rozpouštědlem. Taktéž jsme pracovali se dvěma koncentracemi s cílem, zda bude ve výsledné detekci fosforylace hrát roli koncentrace použité fixační látky.

U fixace 70% metanolem bylo u ejakulovaných spermií celkově detekováno méně fosforylovaných spermií než u předcházející fixace (66,1 %). Také se zde ale vyskytovala ve velké převaze skupina spermií jevících se jako kapacitované (67,5 %). Proto je tato fixace také nespolehlivá v detekci kapacity. U *in vitro* kapacitovaných spermií byla stále detekována výrazná

převaha spermií s kapacitačním vzorem fosforylace (II.) (75,3 %) až na nepatrné množství spermií se vzorem I (24,7 %). Celkový počet fosforylovaných buněk u ejakulovaných spermií u fixace 35% metanolem byl přibližně stejný jako u 70% fixace (64,3 %). Také u ejakulovaných spermií výrazně převažovala skupina spermií s fosforylací v akrosomu, a dokonce jich zde bylo v porovnání s předešlou fixací více (79 %). Naproti tomu u *in vitro* kapacitovaných spermií byla převaha spermií s kapacitačním vzorem II. ještě větší než u 70% fixace (87,7 %). Celkově se u této fixace vyskytovala podskupina nekapacitovaných spermií (I.) v mnohem menší četnosti než kapacitované spermie (II.). Tyto výsledky nám ukázaly, že se mezi odlišnými koncentracemi fixační látky vyskytovaly nepatrné rozdíly, proto by stálo za to, aby se v dalších studiích provedly další koncentrační škály.

Dále jsme se věnovali fixaci 70% acetonem. U této fixace u ejakulovaných spermií bylo celkově detekováno přibližně stejné množství fosforylovaných spermií (81,9 %) jako u první vlhké fixace (aceton/metanol), a tedy o dost více než u přecházejících dvou fixací. U ejakulovaných fixací byly obě skupiny nekapacitované a spermie s kapacitačním vzorem II. vyrovnané, takže u této fixace nelze vůbec konstatovat, zda jde o ejakulované spermie. Ovšem u *in vitro* kapacitovaných spermií byla stále mnohonásobná převaha spermií s kapacitačním fosforylačním vzorem v akrosomu (82,2 %). 35% verze této fixace se téměř vůbec nelišila od 70% fixace. Četnosti jednotlivých skupin vycházely přibližně stejně, a proto zde můžeme tvrdit, že mezi těmito koncentracemi u fixace acetonem není významný rozdíl v detekovaných fosforylačních vzorech.

Poslední skupinou fixací byly zasušené preparáty spermií s následnou fixací. Nejprve jsme se zaměřili na obecné zasušení spermií bez žádných dalších přidaných fixačních látek. Poté jsme tuto přípravu preparátů spermií podpořili ještě následnou fixací metanolem a acetonem. Tady nás taktéž zajímal možný rozdíl v detekci fosforylovaných proteinů mezi fixacemi s a bez přidaného rozpouštědla.

Zasušení spermií s následnou fixací také nepřineslo pozitivní výsledky v detekci kapacitace. U této fixace nešlo bezpečně detekovat proběhlou kapacitaci dle fosforylace v akrosomu. U ejakulovaných spermií opět docházelo k převaze spermií s kapacitačním vzorem fosforylace v akrosomu (58,9 %). U *in vitro* kapacitovaných spermií byla také mnohonásobně větší převaha spermií s kapacitačním vzorem II. (77,3 %).

Celkově je příprava preparátů spermií pro detekci fosforylace ne zcela spolehlivá, protože nejsou regulovány žádnou fixační látkou a může dojít k nestejněměrné přípravě vzorku z důvodu popraskání membrány buněk (Haas et al., 1988). To má za následek, že každá buňka může vykazovat jiný fosforylační vzor podle propustnosti membrány pro protilátky. U této fixace jsme zjistili, že zasušení způsobí pouze jemné popraskání plazmatické membrány spermie a tím slabší vazbu protilátky na vnitřní struktury buňky. Během kapacitace ale dochází ke změně fluidity membrány, a proto může protilátka pronikat do buňky snáze a značit příslušné proteiny uvnitř (Haas et al., 1988). To opět zvýší fosforylační signál v buňkách.

Při modifikaci přípravy preparátu spermií ještě následnou fixací metanolem jsme detekovali nepatrné rozdíly od předcházející přípravy. U *in vitro* kapacitovaných spermií sice výrazně převažuje skupina spermií s kapacitačním vzorem (84,3 %), nicméně u ejakulovaných spermií tato skupina převažuje také (81,8 %). Protože bylo v této skupině detekováno mnohem více buněk než u předešlé fixace, je z tohoto důvodu tato metoda méně spolehlivá.

Poslední fixace byla modifikace zasušení buněk s následnou fixací acetonem. V četnostech fosforylovaných buněk u jednotlivých skupin vyšla velmi podobně jako předcházející fixace metanolem, nepatrně se pouze lišila v četnostech skupin fosforylačních vzorů. U *in vitro* kapacitovaných spermií opět převažovala skupina spermií s kapacitačním vzorem fosforylace (84,3 %), ale u ejakulovaných spermií tato skupina také výrazně převažovala (73,3 %). V tomto ohledu se tedy tato fixace od předcházející neliší, ale je možná o něco vhodnější z důvodu většího počtu buněk s nekapacitačním vzorem u ejakulovaných spermií.

U všech těchto fixací byla dobře detekovatelná fosforylace proteinů spermií. Nicméně počet buněk s fosforylačními vzory I. a II. se mezi skupinou ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií významně neliší. Během přípravy tohoto typu preparátu spermií je nejvíce patrná změna fluidity membrány spermií po jejich kapacitaci a stává se tak více prostupnější pro průnik protilátek. Zatímco u ejakulovaných spermií s rigidnější membránou jsou fosforylované proteiny hůře značeny.

Z našich výsledků vyplývá, že naprosto nejlepší fixací pro detekci tyrosinové fosforylace ve spermiích po *in vitro* kapacitaci je fixace formaldehydem, u kterého se jednoznačně vyskytuje nejmenší procento spermií vykazujících kapacitační vzor fosforylace v akrosomu.

Dále jsme v této diplomové práci detekovali serinovou fosforylací v kančích spermích. U kanců v rámci imunofluorescenčních studií dosud nebyl tento typ fosforylace zdokumentován, proto přinášíme jedinečné výsledky detekce fosforylačních vzorů. U kančích spermíí je velká skupina proteinů fosforylována na Ser/Thr zbytcích během kapacitace (Harayama & Nakamura 2008). Nekapacitované kančí spermie mají detekovatelné fosforylované proteiny Ser/Thr v postakrosomální oblasti. Při zvyšování kapacitace se postakrosomální fosforylace snižuje nebo zcela mizí a fluorescence těchto proteinů se zvyšuje směrem k bičíku (Harayama 2003). Z našich výsledků bylo patrné, že pro kance je typická fosforylace v bičíku, proto jsme rozdělili fosforylační vzory do třech skupin. Do první skupiny (I.) patřily spermie pouze s fosforylací v bičíku, do druhé (II.) s fosforylací v bičíku i akrosomu a do třetí (III.) pouze s fosforylací v akrosomu. Ne všechny skupiny fosforylačních vzorů se vyskytovaly u všech fixací. Proto jsme se zaměřili na četnosti těchto tří skupin v rámci šesti vybraných fixací. Porovnávali jsme, jak se změny fosforylační vzory při přechodu do kapacitačního stavu.

V rámci fixací se vyskytovaly různé vzory na pomezí ejakulovaných i *in vitro* kapacitovaných spermíí. Z našich výsledků je patrné, že nejčastěji se vyskytovala, ať už u ejakulovaných nebo *in vitro* kapacitovaných spermíí, skupina fosforylačních vzorů II. Fosforylační vzor III. (fosforylace pouze v akrosomu) se vyskytovala nejméně častěji. Z našich výsledků je nejzajímavější, že u fixace 2% formaldehydem ve vodě se vyskytoval pouze fosforylační vzor I. (fosforylace pouze v bičíku), což u žádné jiné fixace detekováno nebylo. Pracovalo se ještě s jednou formaldehydovou fixací (2% formaldehyd ve vodě), která byla doplněna o BSA (Tardif et al., 2001). Ta vykazovala naprosto odlišné výsledky než výše zmíněná formaldehydová fixace bez BSA. U *in vitro* kapacitovaných spermíí se vyskytoval pouze fosforylační vzor III (fosforylace pouze v akrosomu) (81,5 %), což byla naprostá výjimka ve srovnání s ostatními fixacemi. U ejakulovaných spermíí zase naprostá většina buněk obsahovala fosforylací v bičíku i akrosomu (vzor II.) (95,1 %). Paradoxem je, že u tyrosinové fosforylace vykazují formaldehydové fixace nejlepší výsledky v detekci rozdílu mezi spermii nekapacitovanými a kapacitovanými. Naproti tomu u detekce serinové fosforylace, buňky takto fixované u obou typů přípravy preparátů, vykazují naprosté odlišnosti a nepodporují náš předpoklad, že serinová fosforylace v bičíku je u kance hlavním ukazatelem kapacitace a během ní se zvyšuje.

Tato domněnka je podpořena u následujících zkoumaných fixací. Vlhká fixace (78,7 %), vlhká fixace 70% aceton (74,6 %) a zasušení spermií s následnou fixací (87,2 %) vykazovaly převažující fosforylaci v bičíku a akrosomu (vzor II.) u *in vitro* kapacitovaných spermií. U těchto fixací lze podotknout, že při *in vitro* kapacitaci dochází k mnohonásobnému zvýšení fosforylace na serinových zbytcích v bičíku i akrosomu oproti ejakulovaným spermiím.

Na závěr podotýkáme, že díky velké různorodosti serinových fosforylačních vzorů nelze usoudit, který fosforylační vzor je markerem kapacitace, ale předpokládáme, že půjde o fosforylaci v bičíku, případně v akrosomu.

Výsledky získané imunofluorescenčním barvením jsme také podpořili Western blot analýzou proteinových extraktů kančích spermií. V extraktech ze spermií kance se po vizualizaci proteinů podařilo pomocí specifických protilátek prokázat fosforylaci na tyrosinu i serinu. Ve studii Tardif et al. (2001) detekovali u kapacitovaných spermií proteiny pomocí monoklonální anti-tyrosinové protilátky (klon 4G10) s molekulovými váhami 60 kDa, 44 kDa a 42 kDa a 32 kDa. Poslední z těchto proteinů byl detekován i u vzorku ejakulovaných spermií, což bylo pravděpodobně způsobeno spontánní kapacitací.

Naše výsledky pomocí anti-tyrosinové protilátky ukázaly fosforylované proteiny o velikostech 69 kDa, 58 kDa a 43 kDa. Tyto proteiny se vyskytovaly i u ejakulovaných spermií, jen s rozdílem, že u *in vitro* kapacitovaných spermií docházelo k silnějšímu signálu fosforylovaných proteinů, což dokládá zvýšení tyrosinové fosforylace při *in vitro* kapacitaci. Naše výsledky jsou velmi podobné výsledkům Tardif et al. (2001). Protein s nejvyšší molekulovou váhou je jen o 9 kDa vyšší než nejvyšší protein u porovnávané studie. Ostatní detekované proteiny měly také velmi podobné molekulové váhy. V našich výsledcích jsme ale nedetekovali popsany fosfoprotein o velikosti 32 kDa. Musíme vzít v úvahu, že jde stále pouze o přibližné výpočty molekulových vah proteinů a do určité velikosti se mohou lišit. Mírné odchylky od molekulové váhy mohou být také způsobeny způsobem extrakce proteinů u jednotlivých pokusů.

Přestože bylo publikováno četné množství prací na tyrosinovou fosforylaci, tak na detekci fosforylace na Ser/Thr existuje pouze malé množství prací (Signorelli et al. 2012). Jedna z prvních prací, která popsala fosforylaci na serinových nebo treoninových zbytcích proteinů kapacitovaných lidských spermií, byla od Naz (1999). Ve své práci detekoval proteiny o molekulových

hmotnostech 43–55 kDa, 94 kDa, 110 kDa a 190 kDa, které jsou fosforylovány na serinu. Také doložil, že se fosforylace zvýšila během kapacitace.

V našich výsledcích jsme zjistili rozdíl v detekci proteinů fosforylovaných na serinu v extraktu ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermii. U obou skupin jsme detekovali proteiny o velikosti 250 kDa, 180 kDa, 110 kDa a 55 kDa. U kapacitovaných spermii ale docházelo opět k několikanásobně větší intenzitě fosforylace proteinů. U kapacitovaných spermii jsme detekovali navíc protein, který se nevyskytoval u ejakulovaných spermii. Šlo o protein velikosti 40 kDa. Námi detekované proteiny byly přibližně stejně velké jako fosforylované proteiny lidských spermii ve studii od Naz (1999).

Na závěr můžeme potvrdit, že u všech našich provedených experimentů bylo detekováno zvýšení ve fosforylaci jak na tyrosinových, tak serinových zbytcích proteinů, a proto je zvláště tyrosinová fosforylace velmi důležitým markerem kapacitace spermii.

7 ZÁVĚR

Při hodnocení tyrosinové fosforylace pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie u kančích spermií byl prokázán signifikantní rozdíl ve fosforylačních vzorech u ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií.

Dle našich výsledků jsme došli k závěru, že u všech provedených fixací nelze s jistotou tvrdit, že fosforylace detekovaná v akrosomu je markerem kapacity. U všech fixací byl u *in vitro* kapacitovaných spermií převažující vzor fosforylace v akrosomu, ale u ejakulovaných spermií byly četnosti fosforylačních vzorů vyrovnané, nebo také s převahou fosforylace v akrosomu. Pouze fixace formaldehydem ukázala jasnou rozdílnost ve fosforylačních vzorech mezi ejakulovanými a *in vitro* kapacitovanými spermii. Z našich výsledků tedy vyplývá, že nejlepší fixační systém pro detekci kapacity dle fosforylačních vzorů, je fixace formaldehydem. Úplně nejlépe vyšla fixace s 2% formaldehydem ve vodě s BSA. Ovšem pro zjednodušení pracovního postupu lze použít i fixaci formaldehydu na sklíčku, a ne v suspenzi.

Z našich výsledků také vyplývá, že díky velké různorodosti fosforylačních vzorů v rámci různých fixací, nelze usoudit, který fosforylační vzor je markerem kapacity u P-Ser. U všech fixací byla viditelně detekována zvýšená fosforylace proteinů u *in vitro* kapacitovaných spermií. U kančích spermií je pro serin typická fosforylace zvláště v bičíku.

Byly detekovány proteiny fosforylované na tyrosinu a serinu v extraktech z ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií. Naše výsledky ukázaly tyrosinovou fosforylaci u proteinů ejakulovaných i *in vitro* kapacitovaných s molekulovou hmotností 69 kDa, 58 kDa a 43 kDa. U proteinů kapacitovaných spermií byla viditelná silnější reakce s protilátkou, což dokládá zvýšení tyrosinové fosforylace při kapacitaci spermií na těchto proteinech.

Hypotéza o detekci různých vzorů tyrosinové a serinové fosforylace v ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermii za použití různých fixací byla potvrzena.

Výsledky serinové fosforylace detekovaly rozdíly v míře fosforylace v proteinech mezi ejakulovanými a *in vitro* kapacitovanými spermii. Obě skupiny obsahovaly proteiny s molekulovou hmotností 250 kDa, 180 kDa, 110 kDa a 55 kDa, ovšem u kapacitovaných reagovaly s protilátkou s mnohem větší intenzitou. U *in vitro* kapacitovaných spermií byl

detekován ještě jeden protein, který byl fosforylován na serinu, o velikosti 40 kDa. Opět je zde viditelné, že dochází ke zvýšení serinové fosforylace při kapacitaci spermií na těchto proteinech.

Do budoucna by bylo vhodné ještě vyzkoušet jiné koncentrace chemikálií u různých typů fixací, protože dle našich výsledků vykazují odlišné koncentrace té samé chemikálie rozdílné fosforylační vzory. Mnoho autorů se zaměřilo na detekci tyrosinové fosforylace u kančích spermií, ovšem serinová fosforylace byla u kanců opomíjená. Proto by bylo vhodné se na ni blíže zaměřit a přesněji detekovat, který fosforylační vzor je markerem kapacitace. Tomu by mohlo pomoci sledování změn fosforylačních vzorů v průběhu inkubace v kapacitačním médiu, a ne až po proběhlé *in vitro* kapacitaci.

Dále by bylo vhodné u kančích spermií detekovat fosforylační vzory za použití anti-treoninové protilátky. Některé studie potvrdily, že u kanců probíhá fosforylace i na treoninových zbytcích pomocí Western blot analýzy, ale zatím to nebylo doloženo na zafixovaných preparátech pomocí imunofluorescenční mikroskopie.

8 SEZNAM LITERATURY

Akbarsha MA, Faisal K, Radha A. 2015. The epididymis: structure and function. Pages 119-120 in Singh SK, editor. Mammalian endocrinology and male reproductive biology. CRC/Taylor & Francis, Boca Raton.

Ashrafzadeh A, Karsani, SA, Nathan S. 2013. Mammalian sperm fertility related proteins. International journal of medical sciences **10**:1649–1657.

Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ. 2004. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. Journal of cell science **117**: 3645-3657.

Austin C. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Australian journal of biological sciences **4**: 581-596.

Awda BJ, Buhr MM. 2010. Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) pathway and reactive oxygen species regulate tyrosine phosphorylation in capacitating boar spermatozoa. Biology of reproduction **83**: 750-758.

Baker MA. 2016. Proteomics of post-translational modifications of mammalian spermatozoa. Cell and tissue research **363**: 279-287.

Bedu-Addo K, Lefièvre L, Moseley FLC, Barratt CLR, Publicover SJ. 2005. Bicarbonate and bovine serum albumin reversibly 'switch'capacitation-induced events in human spermatozoa. Molecular human reproduction **11**: 683-691.

Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. 1977. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse: isolation and morphological characterization. The Journal of cell biology **74**: 68-85.

Bianchi E, Wright GJ. 2014. Izumo meets Juno: preventing polyspermy in fertilization. Cell cycle **13**: 2019-2020.

Breitbart H. 2003. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. Cell Mol. Biol **49**: 321–327.

Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S. 2005. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. Reproduction **129**: 263-268.

Breitbart H, Naor Z. 1999. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. Reviews of reproduction **4**: 151-159.

Breitbart H, Spungin B. 1997. The biochemistry of the acrosome reaction. Molecular Human Reproduction **3**: 195-202.

Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J, Breitbart H. 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of reproduction* **68**: 837-845.

Brooks DE, Means AR, Wright EJ, Singh SP, Tiver KK. 1986. Molecular cloning of the cDNA for androgen-dependent sperm-coating glycoproteins secreted by the rat epididymis. *European journal of biochemistry* **161**: 13-18.

Carlson BM. 2013. *Human embryology and developmental biology*. Elsevier Health Sciences, China.

Chamberland A, Fournier V, Tardif S, Sirard MA, Sullivan R, Bailey JL. 2001. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology* **55**: 823-835.

Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* **168**: 697-698.

Cohen P. 2000. The regulation of protein function by multisite phosphorylation—a 25 year update. *Trends in biochemical sciences* **25**: 596-601.

Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Dor J, Mashiach S, Eisenbach M. 1995. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 11039-11043.

Cooper TG. 2012. *The epididymis, sperm maturation and fertilisation*. Springer Science & Business Media.

Cosentino MJ, Cockett ATK. 1986. Structure and function of the epididymis. *Urological research* **14**: 229-240.

Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernandez-Gonzalez EO, Nishigaki T, Treviño CL, Wood C, Beltrán C. 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* **131**: 977–988.

Ded L, Dostalova P, Dorosh A, Dvorakova-Hortova K, Peknicova J. 2010. Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology* **8**: 87.

De Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Human reproduction* **13**: 1-8.

Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De la Vega-Beltran JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti PE. 2003. Involvement of a Na⁺/HCO cotransporter in mouse sperm capacitation. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 7001-7009.

Eddy EM. 2006. The Spermatozoon. Pages 3-55 in Neill JD, Challis JRG, Pfaff DW, Plant TM, Kretser DM, Richards JS, Wassarman PM, editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier Academic Press, San Diego.

Eddy EM, O'Brien DA. 1994. The spermatozoon. Pages 189-232 in Neill JD, Challis JRG, Pfaff DW, Plant TM, Kretser DM, Richards JS, Wassarman PM, editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier Academic Press, San Diego.

Eddy EM, Welch JE, O'Brien DA. 1993. Gene expression during spermatogenesis. Pages 181-232 in De Kretser D, editor. *Molecular biology of the male reproductive system*. Academic Press.

Fàbrega A, Puigmulé M, Yeste M, Casas I, Bonet S, Pinart E. 2011. Impact of epididymal maturation, ejaculation and in vitro capacitation on tyrosine phosphorylation patterns exhibited of boar (*Sus domesticus*) spermatozoa. *Theriogenology* **76**: 1356-1366.

Fawcett, D. W. 1975. The mammalian spermatozoon. *Developmental biology* 44: 394-436.

Flesch FM, Wijnand E, Van de Lest CHA, Colenbrander B, Van Golde LMG, Gadella BM. 2001. Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* **60**: 107-115.

Fouquet, J. P., Kann, M. L. 1994. The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. *Biology of the Cell* **81**: 89-93.

Gadella BM, Harrison RA. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* **127**: 2407-2420.

Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. 1997. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent pathway. *Biology of reproduction* **56**: 707-719.

Guraya SS. 1987. *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*. Springer-Verlag, Berlin.

Guraya S.S. 2000. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in spermatozoa. *International Review of Cytology* **199**: 1-64.

Haas Jr GG, DeBault LE, D'Cruz O, Shuey R. 1988. The effect of fixatives and/or air-drying on the plasma and acrosomal membranes of human sperm. *Fertility and sterility* **50**: 487-492.

Hafez, E. S. 1976. The human semen and fertility regulation in the male. *International Conference in Andrology. The Journal of reproductive medicine* **16**: 91-96.

Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins, USA.

Hanks SK, Hunter T. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB journal* **9**: 576-596.

Harayama H. 2003. Viability and protein phosphorylation patterns of boar spermatozoa agglutinated by treatment with a cell-permeable cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate analog. *Journal of andrology* **24**: 831-842.

Harayama H, Nakamura K. 2008. Changes of PKA and PDK1 in the principal piece of boar spermatozoa treated with a cell-permeable cAMP analog to induce flagellar hyperactivation. *Molecular reproduction and development* **75**: 1396-1407.

Helpenberger KE, Villalba NM, Buchholz B, Boveris A, Poderoso JJ, Gelpi RJ, Poderoso C. 2018. Subcellular distribution of ERK phosphorylation in tyrosine and threonine depends on redox status in murine lung cells. *PloS one* (e0193022) DOI: 10.1371/journal.pone.0193022.

Hess RA, de Franca LR. 2009. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Pages 1-15 in Cheng Y, editor. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. Springer, New York.

Ho H, Suarez SS. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* **122**: 519-526.

Hunter T. 2007. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Molecular cell* **28**: 730-738.

Hunter T. 2009. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Current opinion in cell biology*. PubMed PMID (e19269802) DOI: 10.1016/j.ceb.2009.01.028.

Hunter T. 2012. Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**: 2513-2516.

Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* **434**: 234-238.

Jabbari S, Sadeghi MR, Akhondi MM, Habibi AE, Amirjanati N, Lakpour N, Asgharpour L, Ardekani AM. 2009. Tyrosine phosphorylation pattern in sperm proteins isolated from normospermic and teratospermic men. *Journal of reproduction & infertility* **10**: 185-191.

Jamur MC, Oliver C. 2010a. Permeabilization of cell membranes. Pages 63-66 in Javois LC 1999, editor. *Immunocytochemical methods and protocols*. Humana Press.

Jamur MC, Oliver C. 2010b. Cell fixatives for immunostaining. Pages 55-61 in Javois LC 1999, editor. *Immunocytochemical methods and protocols*. Humana Press.

Jankovičová J, Michalková K, Sečová P, Horovská Ľ, Maňásková-Postlerová P, Antalíková J. 2018. Evaluation of protein phosphorylation in bull sperm during their maturation in the epididymis. *Cell and tissue research* **371**: 365-373.

Jensen ON. 2000. Modification-specific proteomics: systematic strategies for analysing post-translationally modified proteins. *Trends in Biotechnology* **18**: 36-42.

Johnson LN, Lewis RJ. 2001. Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev* **101**: 2209-2242.

Jones R, James PS, Oxley D, Coadwell J, Suzuki-Toyota F, Howes EA. 2008. The equatorial subsegment in mammalian spermatozoa is enriched in tyrosine phosphorylated proteins. *Biology of reproduction* **79**: 421-431.

Jones RE, Lopez K. 2013. *Human reproductive biology*. Elsevier Academic Press, China.

Kaláb P, Pěkníková J, Geussová G, Moos J. 1998. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* **51**: 304-314.

Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. 2003. Acroplaxome, an F-actin–keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Molecular biology of the cell* **14**: 4628-4640.

Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. 2011. Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility. *Spermatogenesis* **1**: 221-230.

Klumpp S, Krieglstein J. 2002. Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *European journal of biochemistry* **269**: 1067-1071.

Kumaresan A, Johannisson A, Saravia F, Bergqvist AS. 2012. The effect of oviductal fluid on protein tyrosine phosphorylation in cryopreserved boar spermatozoa differs with the freezing method. *Theriogenology* **77**: 588-599.

Langlais J, Roberts KD. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Research* **12**: 183-224.

Larsson LI. 2000. *Immunocytochemistry: theory and practice*. CRC press.

Lewis B, Aitken RJ. 2001. Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. *Biology of reproduction* **64**: 1545-1556.

Lindemann CB, Lesich KA. 2016. Functional anatomy of the mammalian sperm flagellum. *Cytoskeleton* **73**: 652-669.

Lu Q, Sun QY, Breitbart H, Chen DY. 1999. Expression and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases during spermatogenesis and epididymal sperm maturation in mice. *Archives of andrology* **43**: 55-66.

Luño V, López-Úbeda R, Garcia-Vázquez FA, Gil L, Matás C. 2013. Boar sperm tyrosine phosphorylation patterns in the presence of oviductal epithelial cells: in vitro, ex vivo, and in vivo models. *Reproduction* **146**: 315-324.

Mahony MC, Gwathmey T. 1999. Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biology of reproduction* **60**: 1239-1243.

Mann M, Jensen ON. 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology* **21**: 255-261.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**: 1912-1934.

Martínez P, Morros A. 1996. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front Biosci* **1**: 103-117.

Marquez B, Suarez SS. 2004. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of reproduction* **70**: 1626-1633.

Matás C, Vieira L, García-Vázquez FA, Avilés-López K, López-Úbeda R, Carvajal JA, Gadea J. 2011. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. *Animal reproduction science* **127**: 62-72.

Matouš B, Bubnová E, Buděšínská A, Černý R, Kazda A, Kleibl Z, Kotyza J, Křemen J, Kvasnička J, Pelouch V, Štípek S, Zima T. 2010. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Galén, Praha.

Millette CF 1999. Spermatozoa. *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, San Diego.

Moore KL, Persaud TVN. 2008. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. Saunders Elsevier, Philadelphia.

Mújica A, Navarro-García F, Hernández-González EO, de Lourdes Juárez-Mosqueda M. 2003. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microscopy research and technique* **61**: 76-87.

Mustelin TM. 2007. A brief introduction to the protein phosphatase families. *Methods in molecular biology* **365**: 9-22.

Naz RK 1999. Involvement of protein serine and threonine phosphorylation in human sperm capacitation. *Biology of reproduction* **60**: 1402-1409.

Naz RK, Rajesh PB. 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology* **2**: 75.

Knobil E. 2006. Knobil and Neill's physiology of reproduction (Vol. 2). Gulf Professional Publishing.

Ohto U, Ishida H, Krayukhina E, Uchiyama S, Inoue N, Shimizu T. 2016. Structure of IZUMO1–JUNO reveals sperm–oocyte recognition during mammalian fertilization. *Nature* **534**: 566.

Orta G, de la Vega-Beltran JL, Martín-Hidalgo D, Santi CM, Visconti PE, Darszon A. 2018. CatSper channels are regulated by protein kinase A. *Journal of Biological Chemistry* **293**: 6830-16841.

Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis AJ, Alvarez J, Kopf GS. 1999. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Molecular Human Reproduction* **5**: 1017-1026.

Patrat C, Serres C, Jouannet P. 2012. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the cell* **92**: 255-266.

Petrunkina AM, Friedrich J, Drommer W, Bicker G, Waberski D, Topfer-Petersen E. 2001. Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca²⁺ concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. *Reproduction* **122**: 469-480.

Petrunkina AM, Simon K, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E. 2003. Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation. *Journal of andrology* **24**: 423-437.

Pinna LA, Ruzzene M. 1996. How do protein kinases recognize their substrates? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1314**: 191-225.

Reece O. 2009. Functional anatomy and physiology of domestic animals. Wiley-Blackwell, USA.

Rooij DG. 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* **121**: 347-354.

Sacco F, Perfetto L, Castagnoli L, Cesareni G. 2012. The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. *FEBS letters* **586**: 2732-2739.

Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Society of Reproduction and Fertility supplement* **65**: 245-260.

Santi CM, Martínez-López P, de la Vega-Beltrán JL, Butler A, Alisio A, Darszon A, Salkoff L. 2010. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS letters* **584**: 1041-1046.

Signorelli J, Diaz ES, Morales P. 2012. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell and tissue research* **349**: 765-782.

Spungin B, Breitbart H. 1996. Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *Journal of Cell Science* **109**: 1947-1955.

Sutovsky P. 2014. Posttranslational protein modifications in the reproductive system (Vol. 759). Springer.

Tardif S, Dubé C, Chevalier S, Bailey JL. 2001. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biology of reproduction* **65**: 784-792.

Tardif S, Sirard MA, Sullivan R, Bailey JL 1999. Identification of capacitation-associated phosphoproteins in porcine sperm electroporated with ATP- γ -32P. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* **54**: 292-302.

Tesarik J, Moos J, Mendoza C. 1993. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology* **133**: 328-335.

Thomason P, Kay R. 2000. Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *Journal of cell science* **113**: 3141-3150.

Toshimori K, Ito C. 2003. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Archives of histology and cytology* **66**: 383-396.

Urner F, Leppens-Luisier G, Sakkas D. 2001. Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. *Biology of reproduction* **64**: 1350-1357.

Urner F, Sakkas D. 2003. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction* **125**: 17-26.

Van Ewijk W, Van Soest, PL, Verkerk A, Jongkind JF. 1984. Loss of antibody binding to prefixed cells: fixation parameters for immunocytochemistry. *The Histochemical Journal* **16**: 179-193.

Visconti PE. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 667-668.

Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. 1995a. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121**: 1129-1137.

Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning X, Fornes M, Kopf GS. 1998. The molecular basis of sperm capacitation. *Journal of Andrology* **19**: 242-248.

Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvares JG, Kopf GS. 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm β -cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 3235-3242.

Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. 1995b. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* **121**: 1139-1150.

Vodrážka Z. 1996. *Biochemie*. Academia, 2. opr. vyd. Praha.

Voet D, Voet JG. 1990. *Biochemie*. Victoria Publishing, Praha.

Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature cell biology* **3**: 59-64.

Weber JE, Russell LD. 1987. A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat. *American journal of anatomy* **180**: 1-24.

Weiss P. 2010. *Sexuologie*. Grada Publishing a.s, Praha.

Wennemuth G, Carlson AE, Harper AJ, Babcock DF. 2003. Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺-channel responses: initial events in sperm activation. *Development* **130**: 1317-1326.

Witze ES, Old WM, Resing KA, Ahn NG. 2007. Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nature methods* **4**: 798-806.

Wolgemuth DJ, Rhee K, Wu S, Ravnik SE. 1995. Genetic control of mitosis, meiosis and cellular differentiation during mammalian spermatogenesis. *Reproduction, Fertility and Development* **7**: 669-683.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. Pages 189-317 in Knobil E, Neil JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York.

Yoshinaga K, Toshimori K. 2003. Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microscopy research and technique* **61**: 39-45.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ADP	adenosin difosfát
Akr	akrosom
Akr α	část akrosomu
Akr β	celý akrosom
Akr γ	specifický typ akrosomu
AMK	aminokyselina
ATP	adenosin trifosfát
Bi	bičík
Bi α	mitochondriální část bičíku
Bi β	koncová část bičíku
BSA	bovinní sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EJ	ejakulované spermie
ERK	extracelulární signálně regulovaná kináza
FSH	folikulostimulační hormon
GTP	guanosin trifosfát
K	negativní kontrola
KAP	kapacitované spermie
Kr	krček
LH	luteinizační hormon
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
NC	membrána nitrocelulósová membrána
NCM	nekapacitační médium
PBS	phosphate-buffered saline (fosfátový pufr)
PKA	proteinkináza A

PKC	proteinkináza C
PNA	rhodamine peanut agglutinin
P-Ser	fosforylace na serinu
PTK	protein tyrosinkináza
PTM	posttranslační modifikace
P-Tyr	fosforylace na tyrosinu
RNA	ribonukleová kyselina
SACY	rozpustná denylycycláza
SDS	dodecylsulfát sodný
sEqS	subekvatoriální segment
Ser	serin
Thr	treonin
TK	tyrosinkináza
Tyr	tyrosin
ZP	zona pellucida