

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Detekce a lokalizace estrogenových receptorů během funkčního vývoje kančích spermií a v pohlavních orgánech kanců

Doktorská disertační práce

Autor práce: MVDr. Romana Krejčířová

Školitel: doc. MVDr. Radko Rajmon, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. MVDr. Radkovi Rajmonovi, Ph.D. za trpělivé vedení během mého doktorského studia a za důvěru, kterou ve mne na začátku vložil, i když zdaleka neměl jistotu, že studium zdárně dokončím.

Děkuji školiteli specialistovi RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za neutuchající energii a trpělivost při provázení mé osoby všemi úskalími výzkumu a za velmi povzbuzující přístup při řešení problémů souvisejících s experimenty v laboratoři i při psaní mé disertační práce. Její velmi milý a optimistický přístup a nekonečná odolnost mi nedovolily ani na chvíli polevit a pochybovat o smyslu celého mého snažení.

Děkuji Dr. Hasmik Margaryan z Biocevu Vestec za vstřícnost a pomoc při zhotovení kryorezů z reprodukčních tkání a Ing. Marii Maňasové, Ph.D. z Katedry ochrany rostlin FA PPZ ČZU za laskavé poskytnutí výsledků týkajících se exprese mRNA, které byly zároveň součástí společného projektu CIGA20162027.

Poděkování náleží i studentkám magisterského studia Ing. Veronice Sommerové za pomoc při práci s parafínovými řezy i kryorezy a Bc. Evě Langhamerové za spolehlivou a zodpovědnou práci při extrakci proteinů.

Své rodině děkuji za posilující podporu a optimismus, pokud jsem snad měla někdy pocit, že jsem přecenila své možnosti.

Obsah

1	Úvod	1
2	Literární rešerše.....	2
2.1	Estrogeny a estrogenové receptory	2
2.1.1	Klasické (jaderné) estrogenové receptory ER α a ER β	4
2.1.1.1	Estrogenové receptory ER α a ER β ve tkáních reprodukčních orgánů samců.....	7
2.1.1.2	Estrogenové receptory ER α a ER β v ejakulovaných spermích	12
2.1.2	Estrogenový membránový receptor GPER	17
2.1.2.1	Receptor GPER ve varleti a nadvarleti	18
2.1.2.2	Receptor GPER v ejakulovaných spermích	19
3	Hypotézy a cíle práce.....	21
4	Materiál a metody.....	22
4.1	Materiál	22
4.1.1	Spermie a reprodukční orgány (varle, nadvarle) prasete	22
4.1.2	Seznam protilátek.....	24
4.2	Použité metody.....	25
4.2.1	Histologické preparáty	25
4.2.1.1	Parafínové řezy a kryorezy z tkání varlat a nadvarlat	25
4.2.1.2	Základní přehledné barvení hematoxylinem a eosinem.....	26
4.2.2	Imunohistochemie – detekce ERs v tkáni varlete a nadvarlete.....	26
4.2.2.1	Peroxidázové barvení – detekce ERs na parafínových řezech.....	26
4.2.2.2	Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie – detekce ERs na kryorezech.....	27
4.2.2.3	Detekce jednotlivých typů testikulárních buněk spolu s detekcí ERs.....	28
4.2.3	Zpracování spermíí pro imunofluorescenci	29
4.2.3.1	Počítání spermíí.....	29
4.2.3.2	Fixace spermíí na podložním mikroskopickém skle	29
4.2.4	Kapacitace ejakulovaných spermíí <i>in vitro</i>	30
4.2.4.1	Hodnocení kapacitačního stavu spermíí.....	30
4.2.4.2	Indukce akrozomální reakce spermíí kapacitovaných <i>in vitro</i>	31
4.2.4.3	Hodnocení integrity akrozomu.....	31

4.2.5	Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie – detekce ERs ve spermích	32
4.2.5.1	Lokalizace ERs u spermíí fixovaných na podložním mikroskopickém skle	32
4.2.5.2	Lokalizace ERs v suspenzi spermíí.....	33
4.2.6	Příprava vzorků tkání a spermíí pro izolaci proteinů.....	33
4.2.6.1	Příprava proteinového extraktu z tkání varlat a nadvarlat	33
4.2.6.2	Příprava proteinového extraktu ze spermíí	34
4.2.6.3	Extrakce proteinů (subproteom) ze spermie	34
4.2.6.4	Imunoprecipitace ERs pomocí specifických protilátek.....	35
4.2.7	SDS-PAGE elektroforéza – jednosměrná elektroforéza v polyakrylovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (dle Laemmli, 1970).....	35
4.2.7.1	Vizualizace proteinů v polyakrylovém gelu pomocí barvení Coomassie Brilliant Blue.....	36
4.2.7.2	Vizualizace proteinů v polyakrylovém gelu pomocí barvení stříbrem	37
4.2.8	Elektropřenos proteinů separovaných SDS elektroforézou na nitrocelulózovou membránu (Western blot).....	37
4.2.8.1	Vizualizace proteinů na nitrocelulózové membráně pomocí barvení Ponceau	38
4.2.9	Imunodetekce ERs na NC-membráně.....	38
4.2.10	Extrakce RNA a PCR spojená s reversní transkripcí (RT-PCR)	39
4.2.10.1	Optimalizace PCR (Polymerase Chain Reaction)	39
4.2.10.2	Kvantitativní PCR (qRT-PCR)	39
5	Výsledky.....	41
5.1	Histologické preparáty varlat a nadvarlat	41
5.2	Imunolokalizace estrogenových receptorů ve tkáních varlat, nadvarlat a epididymálních spermíích.....	42
5.2.1	Lokalizace membránového estrogenového receptoru GPER ve tkáni varlat, nadvarlat a epididymálních spermíích.....	44
5.2.2	Lokalizace estrogenového receptoru ER α ve tkáni varlat, nadvarlat a epididymálních spermíích.....	47
5.2.3	Lokalizace ER β ve tkáni varlat a nadvarlat ve tkáni varlat, nadvarlat a epididymálních spermíích.....	50

5.3	Imunolokalizace ERs v ejakulovaných a kapacitovaných spermích a spermích po akrozomální reakci	52
5.3.1	Hodnocení kapacity a akrozomální reakce spermí.....	52
5.3.2	Imunolokalizace receptoru GPER v ejakulovaných a kapacitovaných spermích a spermích po akrozomální reakci.....	53
5.4	Imunolokalizace receptoru ER α a ER β u ejakulovaných spermí	55
5.5	Izolace a separace proteinů z tkání a spermí.....	56
5.6	Detekce estrogenových receptorů v tkáni varlete a nadvarlete a spermích	58
5.6.1	Detekce estrogenového receptoru GPER.....	58
5.6.2	Detekce estrogenových receptorů ER α a ER β	60
5.6.3	Imunoprecipitace proteinů ERs pomocí specifických protilátek.....	64
5.7	Expres mRNA pro receptor GPER ve tkáni varlete a nadvarlete a v epididymálních spermích prasete	65
6	Diskuze.....	66
7	Závěr	79
8	Seznam literatury.....	81
	Příloha.....	95

Seznam použitých zkratk

ERs	estrogenové receptory
GPER	estrogenový receptor spojený s G-proteinem
PNA	z angl. Peanut agglutinin
NC-membrána	nitrocelulósová membrána
IgG	imunoglobuliny
anti-R	sekundární protilátka proti králičím IgG
anti-M	sekundární protilátka proti myším IgG
Ej	ejakulované spermie
Kap	kapacitované spermie
AR	spermie po akrozomální reakci
T	tkáň varlete
EP1	tkáň hlavy nadvarlete
EP2	tkáň těla nadvarlete
EP3	tkáň ocasu nadvarlete
Ep1	spermie z hlavy nadvarlete
Ep2	spermie z těla nadvarlete
Ep3	spermie z ocasu nadvarlete
AMK	aminokyselinová

1 Úvod

Estrogeny jsou skupinou hormonů významných zejména pro svou úlohu v reprodukci u samic i samců a schopných ovlivňovat jejich fertilitu. Účinek přirozených endogenních estrogenů v organismu je velmi různorodý s ohledem na typ cílové tkáně. Hormony se po svém vstupu do krevního řečiště dostávají do celého těla, avšak podmínkou jejich účinku je přítomnost specifických receptorů v buňkách. Estrogenové receptory se vyskytují v cytosolu i jádře buňky, jejich přítomnost byla prokázána rovněž na buněčných membránách. Na estrogenové receptory se hormony váží a iniciují intracelulární reakce genomickým nebo negenomickým způsobem buněčné signalizace.

Schopnost navázat se v cílové tkáni k estrogenovým receptorům nemají pouze estrogeny endogenního původu, ale také látky z vnějšího prostředí, které se svým účinkem na organismus estrogenním hormonům podobají. Tyto environmentální estrogeny, xeno- a fytoestrogeny, jsou tzv. endokrinními disruptory, schopnými svým působením imitovat působení přirozených endogenních hormonů a ovlivnit fyziologické procesy v organismu.

Pro pochopení účinku přirozených i environmentálních estrogenů na organismus je nezbytnou podmínkou estrogenové receptory v buňce detekovat a lokalizovat.

Dizertační práce je zaměřena na detekci a lokalizaci estrogenových receptorů v reprodukčních tkáních kanců a ve spermiích v různých stádiích jejich vývoje, protože tato zjištění jsou zásadní pro pochopení působení estrogenů na vývoj, zrání a fyziologické funkce spermií.

2 Literární rešerše

2.1 Estrogeny a estrogenové receptory

Estrogeny jsou steroidní hormony, které v organizmu ovlivňují široké spektrum fyziologických funkcí včetně těch, které se týkají reprodukčních orgánů (Rosseli et al., 2000; Hess, 2003). Schopnost ovlivňovat reprodukci mají estrogeny nejen u samic, ale i u samců (Carreau et al., 2003; Carreau et al., 2012; Gibson et Saunders, 2012). Estrogeny jsou u samců syntetizovány v zárodečných buňkách varlat a dostávají se v relativně vysokých koncentracích do testikulární tekutiny (Joseph et al., 2011). Ačkoli byly estrogeny poprvé detekovány v moči hřebců již ve 30. letech 20. století, teprve v 60. letech byla věnována větší pozornost zkoumání jejich potenciální funkce v samčích pohlavních orgánech (Joseph et al., 2011; Cooke et al., 2017). Estrogeny zastávají důležitou roli ve spermatogenezi, v procesu zrání spermatických buněk, jejich kapacitaci, akrozomální reakci a fertilizaci (Pelletier et El-Alfy, 2000a; Lukoseviciute et al., 2005; Kotula-Balak et al., 2012). Spermie jsou estrogeny fyziologicky ovlivňovány také během svého transportu samičím reprodukčním traktem (Dostálová et al., 2017). V souvislosti s rozvojem nových laboratorních metod byly získány přesnější údaje o hladinách estrogenů v krevním séru a dalších tělních tekutinách samců různých druhů včetně člověka (Cooke et al., 2017).

Účinek podobný estrogenům mají rovněž tzv. environmentální estrogeny, xenoestrogeny a fytoestrogeny (Shemes et Shore, 2012). Mechanismus účinku těchto sloučenin je velmi variabilní. Mohou ovlivňovat transaktivaci jaderných estrogenových receptorů ($ER\alpha$ a $ER\beta$), ale i aktivaci z membrány iniciované signalizace prostřednictvím membránových estrogenových receptorů ($ER\alpha$, $ER\beta$ a GPER) (Cooke et al., 2017). Environmentální estrogeny mohou vůči estrogenům přirozeným působit agonisticky i antagonisticky a ovlivňovat reprodukční procesy a gametogenezi (Shemes et Shore, 2012).

Působení estrogenních hormonů je podmíněno přítomností specifických estrogenových receptorů (ERs – estrogen receptors) v buňkách cílových tkání, na které se estrogeny váží (Carpino et al., 2004b; Chimento et al., 2010a,b). Detekce a lokalizace ERs je tudíž nezbytná pro pochopení účinku estrogenů na organizmus (Razandi et al., 2004). Molekulární mechanismus aktivity ERs je úzce svázán s jejich lokalizací v buňce. Přítomnost ERs byla prokázána v cytosolu i buněčném jádře, ale také v plazmatické membráně nebo endoplazmatickém retikulu (Acconcia et Kumar, 2006; Pedram et al., 2007; Levin et al.,

2009). Klasická signalizace steroidních hormonů je spojena s jadernými a cytosolickými ERs (Levin et al., 2009). Po kontaktu hormonu s receptorem se receptor naváže ke specifickému úseku DNA, a tak ovlivní genovou transkripci a následně i buněčnou aktivitu (Beato et al., 1996).

V současné době jsou v somatických buňkách známy tři estrogenové receptory. Nejdříve byly postupně objeveny klasické estrogenové receptory ve dvou funkčních izoformách: ER α (ESR1 podle současné nomenklatury) a ER β (ESR2 podle současné nomenklatury) (Kuiper et al., 1996; Mosselmann et al., 1996). Oba tyto ERs mají podobnou strukturu (Ogawa et al., 1998; Zhao et al., 2008), ale jsou kódovány dvěma odlišnými geny (Luconi et al., 2002). Oba subtypy klasických ERs patří mezi receptory jaderné (Kumar et al., 2011). Klasické estrogenové receptory jsou zprostředkovateli efektu estrogenů v genomické (jaderné) signalizaci, ale zdá se, že jsou zapojeny rovněž v negenomickém způsobu buněčné signalizace (Kang et al., 2010; Whiting et al., 2000). Mohou účinkovat jako transkripční faktory, ale mohou aktivovat i mimojadernou signalizaci za spoluúčasti kináz (Kulkoyluoglu et Madak-Erdogan, 2016). Jejich exprese je tkáňově specifická a jejich funkce může být odlišná (Kulkoyluoglu et Madak-Erdogan, 2016; Grober et al., 2011).

V samčích tkáních nejsou klasické ERs distribuovány rovnoměrně, jejich největší koncentrace je v reprodukčních orgánech (Lombardi et al., 2001). Lokalizaci ERs u různých savčích druhů se dosud věnovalo několik autorů. Specifičtější výskyt má ER α , receptor ER β je ve tkáních reprodukčního traktu přítomen rovnoměrněji (Eddy et al., 1996; Franca et al., 2005; Carreau et Hess, 2010). Distribuce obou ERs subtypů je v samčím reprodukčním traktu nejen odlišná v jeho různých úsecích, ale liší se také mezidruhově a v rámci druhu může být věkově variabilní (Carpino et al., 2004b, Solakidi et al., 2005). Přítomnost ERs v samčím reprodukčním traktu, především ve varlatech a nadvarlatech, byla popsána u mnoha savčích druhů ve vztahu k efektu endogenních estrogenů na reprodukci (Prelusky et al., 1994).

V literatuře jsou informace o distribuci izoform ERs často protichůdné. V reprodukčních tkáních a spermiích různých druhů savců byly ERs lokalizovány při použití polyklonálních i monoklonálních protilátek pomocí imunohistochemických a imunocytochemických metod a Western blot analýzy. Variabilita publikovaných výsledků by mohla být pravděpodobně způsobena použitím odlišných metod přípravy tkání nebo výběrem monoklonálních či polyklonálních specifických protilátek.

Několik let po objevu klasických ERs byl popsán s membránou spojený 7-transmembránový estrogenový receptor GPER: G-protein coupled estrogen receptor, dříve označovaný jako GPR30 (Filardo et al., 2007), který je podle současných vědeckých zjištění dáván do souvislosti s dosud ne zcela uspokojivě vysvětlenou rychlou negenomickou mimojadernou signalizací (Wang et al., 2014). Tento negenomický způsob účinku je oproti genomickému velmi rychlý, probíhá během několika vteřin až minut (Gruber et al., 2002; Heldring et al., 2007).

GPER je receptor strukturálně odlišný od klasických ERs ($ER\alpha$ a $ER\beta$). Některými autory je považován za striktně cytosolický nebo s endoplazmatickým retikulem spojený receptor, avšak existují i odlišné názory, kdy je popisován jako estrogenový receptor asociovaný s plazmatickou membránou (Olde et Leeb-Lundberg, 2009; Schwartz et al., 2016). Biologická funkce GPER zřejmě souvisí s buněčným typem a lokalizací v buňce (Filardo et al., 2007; Prossnitz et al., 2007).

Bylo prokázáno, že součástí signální kaskády iniciované z GPER je uvolnění intracelulárních vápníkových iontů (Prossnitz et al., 2008), což velmi úzce souvisí s kapacitací spermií a jejich akrozomální reakcí (Publicover et al., 2007). Uvedené zjištění proto poukazuje na předpokládanou přítomnost GPER ve spermiích. Potvrzením uvedeného předpokladu je prokazatelná detekce GPER ve spermiích člověka i prasete (Rago et al., 2014).

2.1.1 Klasické (jaderné) estrogenové receptory $ER\alpha$ a $ER\beta$

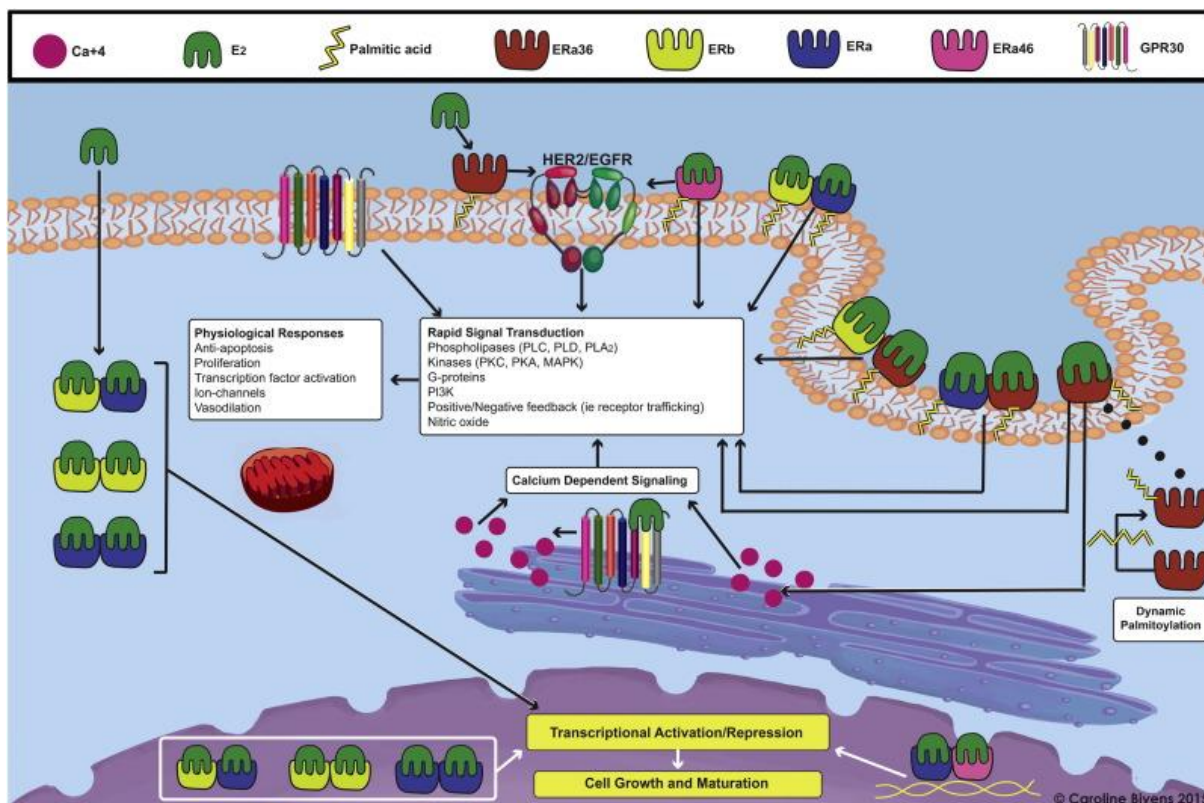
Estrogenové receptory (ERs) jsou nomenklaturně řazeny do rodiny jaderných receptorů typu I, kterou tvoří klasické steroidní receptory aktivované estradiolem (E_2 ; převládající estrogenový hormon). Receptory $ER\alpha$ i $ER\beta$ mohou účinkovat jako transkripční faktory nebo mohou spustit extranukleárně iniciované kinázové signální dráhy. Tyto ERs jsou kódovány geny umístěnými na odlišných chromozómech, jsou svou expresí tkáňově specifické a mají odlišnou funkci (Morito et al., 2001; Ho et Liao, 2002; Grober et al., 2011; Jia et al., 2015; Kulkoyluoglu et Madak-Erdogan, 2016).

Receptory $ER\alpha$ a $ER\beta$ mají podobnou strukturu; jsou složeny z rozdílných ale funkčně propojených domén: z N-terminální domény, DNA-vázací domény a ligand vázací domény. Bylo prokázáno, že u lidí $ER\alpha$ a $ER\beta$ mají méně než 20% aminokyselinovou identitu. Důsledkem toho lze mluvit o poměrně vysoké specifitě účinků působících na cílové

geny v závislosti na subtypu ERs (Ogawa et al., 1998; Zhao et al., 2008). ER α a ER β mají rozdílnou ligandovou specifitu a také transkripční aktivitu (Acconcia et Kumar, 2006).

Existují informace o lokalizaci ER α a ER β v plazmatické membráně, kdy se tyto ERs účastní negenomických reakcí zde iniciovaných (Razandi et al., 2004; Pedram et al., 2006; Levin, 2009). Historii objevu membránového ESR1 (ER α) a jeho významu ve vývoji a funkci reprodukčního traktu samců se ve své práci věnuje Hess et Cooke (2018). Jako o převážně cytoplazmatickém a jaderném se o receptoru ER α zmiňuje také Nanjappa et al. (2016) a říká, že přibližně 5 – 10 % z celkového množství ER α v buňce je lokalizováno na buněčných membránách. Razandi et al. (2002) popisuje membránový ER α jako velmi podobný nebo dokonce totožný s jaderným receptorem ER α . Membránové ERs postrádají DNA-vazebná místa, jsou tudíž funkčně odlišné od svých klasických protějšků cytozolických receptorů (Schwartz et al., 2016).

Klasické ERs jsou zřejmě přesunovány od jádra k plazmatické membráně. Tento proces je dán palmytoilací ERs (palmitová kyselina je prostředníkem pro asociaci receptoru s caveolinem-1) a asociací receptoru s transportním proteinem caveolinem-1 s následným přesunem do oblasti kaveoly v plazmatické membráně (Acconcia et al., 2003; Marino et al., 2006; Pedram et al., 2007; Pedram et al., 2012; Schwartz et al., 2016 - obrázek 1), kde receptor může komunikovat s mnoha signálními proteiny a velmi rychle tak aktivovat podjednotky GPER (Razandi et al., 2002; Kumar et al., 2007).



Obrázek 1: Lokalizace klasických a membránových receptorů. Na membráně vázané estrogenové receptory (ERs), včetně ER α 36, GPR30 a HER2/EGFR, zprostředkovávají rychlou aktivaci na kalcium závislé signalizace a fosfolipázové a kinázové dráhy přežití buněk. Díky aktivní palmytoilaci se receptory přesunují z cytosolu k membráně. Klasická ER signalizace začíná v cytosolu a jádře a aktivuje transkripci proteinů spojených s růstem a zráním buněk (Schwartz et al., 2016).

Tradiční estrogenový receptor ER α plné délky je označován jako ER α 66. Byl popsán v reprodukčních i nereprodukčních tkáních některých živočišných druhů, například u člověka ve tkáni mléčné žlázy, dělohy, ledvin a kosterních svalů (Flouriot et al., Wang et al., 2005), ve spermiiích hřebce (Arkoun et al., 2014), u kance ve varlatech a epididymu (Rago et al., 2004; Gunawan et al., 2011). V některých odborných člancích jsou však uváděny o molekulové hmotnosti ER α plné délky mírně odlišné údaje. Například Parlevliet et al. (2006) ve tkáni nadvarlete hřebce udává hmotnost 65 kDa a tento receptor nazývá ER α 65, taktéž Pearl et al. (2007) ve tkáni nadvarlete kance popisuje ER α 65. Další v literatuře uváděnou variantou molekulové hmotnosti u ER α plné délky je ER α 67 u člověka v reprodukčních orgánech (Barraille et al., 1999; Acconcia et al., 2005) a ve spermiiích (Aquila et al., 2004; Rago et al., 2006). V plazmatické membráně buňky byly však objeveny také některé zkrácené formy ER α . Jedná se o ER α 46 s molekulovou hmotností 46 kDa, který byl u člověka popsán Flouriotem et

al. (2000). Poslední dosud objevenou formu s molekulovou hmotností 36 kDa (ER α 36) ve své práci popsal Wang et al. (2005; 2015) ve tkáni dělohy a rakovinných buňkách mléčné žlázy u žen. Zdá se, že minimálně tato varianta je odpovědná za rychlé účinky E2 (Schwartz et al., 2016).

I v případě receptoru ER β plné délky existují v literárních zdrojích odlišné údaje o jeho molekulové hmotnosti. Aquila et al. (2004) v ejakulovaných spermiiích člověka udávají hodnotu 55 kDa. Rago et al. (2006) u lidských zralých spermiiích zjistili molekulovou hmotnost ER β 59 kDa a u nezralých ejakulovaných spermiiích mimo pruhu o hmotnosti 59 kDa ještě další ve výši 50 kDa. Ve tkáni epididymu potkana byla prokázána molekulová hmotnost proteinu ER β 53 kDa (Hess et al., 2011). Byla objevena zkrácená forma ER β o molekulární hmotnosti 50 kDa (Rago et al., 2006; 2007) a varianty tohoto receptoru: ER β 2 – prokázané v ovariích a hypofýze potkanů (Petersen et al., 1998), ER β 4 v lidských varlatech (Aschim et al., 2004) a ER β 5 také v lidských varlatech (Inoue et al., 2000). V odborných zdrojích existují informace o přítomnosti homodimerů a heterodimerů jak v případě klasických jaderných receptorů ER α a ER β , tak i ER α a ER β lokalizovaných na membráně (Razandi et al., 2004).

2.1.1.1 Estrogenové receptory ER α a ER β ve tkáních reprodukčních orgánů samců

V samčím reprodukčním traktu je koncentrace klasických ERs ve srovnání s jinými tělními tkáněmi vyšší, ale ani v této tkáni nejsou distribuovány rovnoměrně (Lombardi et al., 2001). Výskyt ER α je více tkáňově specifický, zatímco ER β je v celém samčím reprodukčním traktu všudypřítomný (Eddy et al., 1996; Franca et al., 2005; Carreau et Hess, 2010; Hess et al., 2011). ERs byly zkoumány v samčích reprodukčních orgánech, převážně ve varlatech a nadvarlatech, u mnoha savčích druhů, především u malých laboratorních zvířat a zejména ve spojitosti s výzkumem zaměřeným na příčiny zvyšujícího se počtu neplodných párů také u lidí. Výzkum věnující se expresi ERs je v souvislosti s efektem estrogenů látek nezbytný také v chovu dobytka. Informace o detekci a lokalizaci ERs byly publikovány i u prasat a koní. Velmi významná je skutečnost, že u prasat byla popsána jejich vysoká senzitivita k nízkým dávkám xenoestrogenů (Prelusky et al., 1994).

Na téma distribuce izoform ERs se objevují protichůdné informace. Důvodem odlišnosti publikovaných výsledků může být použití různých metod přípravy tkání nebo volba konkrétních protilátek, ale i přítomnost jiných detekovaných proteinů, které jsou do určité míry shodné s klasickými ERs (Luconi et al., 2002).

Z odborné literatury lze získat o klasických jaderných ERs rozdílné informace. Publikované údaje ukazují na vyšší intenzitu exprese ER α i ER β v dospělých varlatech ve srovnání s tkáněmi prepubertálních jedinců, což ale nelze aplikovat na všechny buněčné typy. Lze například konstatovat, že v Sertoliho buňkách přítomnost ER α s věkem klesá, zatímco v případě ER β stoupá (Hess et al., 2001; 2003; Carreau et Hess, 2010).

ER β se vyskytuje pravděpodobně v celém samčím reprodukčním traktu, ve varlatech pak zejména v Sertoliho a zárodečných buňkách, u většiny druhů savců (Eddy et al., 1996; Carreau et Hess, 2010; Hess et al., 2011). ER α se však jen ve dvou částech samčích varlat vyskytuje vždy, a to v Leydigových buňkách a epitelu vývodných kanálků varlete (Carreau et Hess, 2010). ER α má v této oblasti zásadní roli v regulaci reabsorpce převážné části seminální tekutiny (Hess et al., 2011). Absence estrogenových receptorů má negativní vliv na spermatogenezi (Siriani et al., 2008). Například absence ER α vede k redukci obsahu spermií v nadvarleti, snížení jejich motility a schopnosti oplození (Couse et Korach, 1999), zatímco nízká exprese ER β má za následek zastavení buněčného cyklu nebo apoptózu buněk a následnou neplodnost (Selva et al., 2004).

Publikované výsledky o lokalizaci klasických ERs ve varlatech a nadvarlatech u myši, potkanů, lidí, hřebců a prasat jsou souhrnně uvedeny v tabulce 1 pro detekci ER α (strana 15) a v tabulce 2 pro detekci ER β (strana 16).

Varle

U **člověka** byla přítomnost ER α a ER β prokázána v zárodečném epitelu stočených kanálků varlat i v intrersticiální tkáni, ale shoda publikovaných výsledků v různých odborných zdrojích je jen částečná. ER α byl detekován v primárních a sekundárních spermatocytech (Pentikäinen et al., 2000; Aquila et al., 2004), ale ne ve spermiích. Exprese tohoto receptoru byla potvrzena ve spermatidách (Pentikäinen et al., 2000; Aquila et al., 2004; Fietz et al., 2014), některé odborné zdroje uvádějí jeho přítomnost v Sertoliho (Fietz et al., 2014) a Leydigových buňkách (Pelletier et al., 2000a; Solakidi et al., 2005; Fietz et al., 2014). Přítomnost ER β byla prokázána v lidských spermatogoniích (Pentikäinen et al., 2000; Mäkinen et al., 2001) a Fietz et al. (2014) prokázali ER β v jejich jádre. Stejní autoři detekovali ER β i v primárních spermatocytech. Tento receptor byl nalezen rovněž v kulatých spermatidách, ale v prodloužených spermatidách byl výsledek negativní (Pentikäinen et al., 2000; Mäkinen et al., 2001; Fietz et al., 2014). Stejní autoři popsali ER β pozitivitu v Sertoliho buňkách, ale v Leydigových buňkách byl jejich nález negativní (Fietz et al., 2014).

Mäkinenem et al. (2001) ve své práci uvádějí jako negativní jak Sertoliho, tak i Leydigovy buňky.

V lidských zárodečných buňkách varlat byly určeny dva proteiny pro ER α . První plné délky v očekávané molekulové hmotnosti 66 kDa a druhý kratší 46 kDa (Mäkinen et al., 2001; Lambard et al., 2004; Carreau et al., 2006). Pro ER β byly v zárodečných buňkách taktéž zjištěny dva proteiny. Jeden o molekulové hmotnosti 60 kDa a druhá kratší forma o hmotnosti 50 kDa (Carreau et al., 2011).

U dospělých **potkanů** byl ER α detekován ve veškeré tkáni varlat. Převážně se jednalo o zárodečné buňky, a to zejména cytoplazmu kulatých spermatid a spermatocytů, pozitivní byla i jádra Leydigových buněk (Pelletier et al., 2000b). Lucas et al. (2008) poukázali na pozitivní značení v jádrech Sertoliho a Leydigových buněk i některých peritubulárních hladkosvalových buněk 15-denních potkanů, zárodečné buňky však byly negativní. U dospělých potkanů stejná skupina autorů popsala ER α pozitivitu jen v Sertoliho buňkách a některých spermatidách. Receptor ER β byl detekován v jádrech buněk na periferii semenných kanálků, pravděpodobně se jednalo o Sertoliho buňky (Pelletier et al., 2000b; Carreau et al., 2011). Lucas et al. (2008) zdokumentovali ER β jako pozitivní v Leydigových buňkách a některých buňkách zárodečných.

U **myši** Mäkinen et al. (2001) detekovali ER α pouze v jádre Leydigových buněk. Ostatní buňky varlat byly negativní. Zhou et al. (2002) i Siriani et al. (2008) prokázali pozitivitu ER α nejen v Leydigových buňkách, ale i v některých peritubulárních myoidních buňkách. Zárodečné buňky všech stádií a Sertoliho buňky byly negativní. ER β byl detekován v myších spermatogoniích, ve všech stádiích spermatocytů (mimo těch v meiotickém dělení), v Leydigových a Sertoliho buňkách (Zhou et al., 2002; Carreau et Hess, 2010). Podobné výsledky byly dokumentovány Mäkinenem et al. (2001), kdy pozitivní značení pro ER β bylo detekováno ve vývojových stádiích spermatických buněk, od spermatogonií ke spermatocytům, a také v jádre Sertoliho buněk.

V případě **hřebce** byl ER α nalezen v Leydigových i zárodečných buňkách u prepubertálních a postpubertálních jedinců, ale v Sertoliho buňkách pouze u nedospělých zvířat. U postpubertálních hřebců byl tento receptor detekován jen v peritubulárních myoidních buňkách (Pearl et al., 2011). Receptor ER β byl lokalizován v Sertoliho i Leydigových buňkách u hřebců všech věkových kategorií, u prepubertálních zvířat také v zárodečných buňkách. ER β nebyl detekován v peritubulárních myoidních buňkách u žádné věkové kategorie (Pearl et al., 2011; Arkoun et al., 2014).

U **prasat** ohledně výskytu ERs v reprodukčních tkáních existují značně kontroverzní údaje. Jako první se lokalizací ERs v testikulárních buňkách kanců věnovala skupina Rago et al. (2004). Pomocí imunohistochemických metod byla zjištěna odlišná exprese těchto ERs u nedospělých jedinců ve srovnání s dospělými kanci. V práci Rago et al. (2004) byl nález ER α v testikulární tkáni (v somatických i zárodečných buňkách) u nedospělých kanečků (3 měsíce stáří) negativní. U dospělých kanců (věk 18 měsíců) bylo pozitivní značení ER α detekováno v některých zárodečných buňkách - slabě ve spermatogoniích, silně ve spermatocytech, ale negativní ve spermatidách. Sertoliho buňky byly také pro ER α negativní, avšak Leydigovy buňky se zdály být pro ER α nepatrně pozitivní (Rago et al., 2004). Gunawan et al. (2011) naopak publikovali pozitivní nález ER α v cytoplasmě Sertoliho buněk. Slabý signál byl detekován v zárodečných a Leydigových buňkách. Jiná skupina (Mutembei et al., 2005) detekovala signifikantní ER α signál ve spermatogoniích a primárních spermatocytech, slabší v ostatních zárodečných a v Leydigových buňkách, negativní bylo značení ve spermích dospělých kanců. U nedospělých zvířat se spermatogonie, Leydigovy buňky a Sertoliho buňky jeví jako negativní. Ramesh et al. (2007) dokumentovali přítomnost ER α v Sertoliho buňkách prepubertálních kanečků, ER α byl rovněž detekován v buňkách intersticia u stejné věkové kategorie. Zárodečné buňky byly nepatrně pozitivní pro ER α ve všech věkových kategoriích počínaje 3 měsíci věku (Ramesh et al., 2007). Míra exprese ER β v Sertoliho buňkách s rostoucím věkem kanců klesala, v intersticiální tkáni byla přítomnost tohoto receptoru konstantní a na věku zvířat nezávislá. Zárodečné buňky byly slabě pozitivní ve všech věkových skupinách (Ramesh et al., 2007).

U prepubertálních kanců byl ER β detekován ve spermatogoniích, peritubulárních hladkosvalových buňkách a Leydigových buňkách, velmi slabé nebo negativní značení bylo doloženo v Sertoliho buňkách. U dospělých kanců byl receptor pro ER β nalezen v různých stádiích zárodečných buněk. Silný signál byl detekován v myoidních buňkách, ale Sertoliho a Leydigovy buňky byly pro ER β negativní (Rago et al., 2004). Jiná skupina detekovala ER β receptor u prepubertálních kanečků pouze ve spermatogoniích, Sertoliho buňky byly negativní. U dospělých kanců byly zárodečné buňky pro ER β pozitivní s výjimkou prodloužených spermatid a Sertoliho i Leydigových buněk (Mutembei et al., 2005). Gunawan et al. (2012) našli slabší ER β signál nejen ve spermatogoniích, primárních spermatocytech a spermatidách, ale také v cytoplasmě Sertoliho a Leydigových buněk.

Rago et al. (2004) současně ve své práci uvádějí i výsledky detekce proteinů obou receptorů. Byla zjištěna přítomnost proteinu ER α o molekulové hmotnosti 66 kDa, avšak pouze ve tkáni varlat dospělých kanců. U nedospělých zvířat protein ER α detekován nebyl.

Shodně s Rago et al. (2004) ve své práci popisuje protein ER α s molekulovou hmotností 66 kDa Mutembei et al. (2005), tento autor ve varlatech kanců potvrdil i expresi mRNA. Dalším skupinou, která se věnovala průkazu mRNA pro ER α , byl Lekhota et al (2006). Uvedli pozitivní nález ve spermatogoniích typu A i B a ve spermatocytech, ale ne v dalších zárodečných buňkách. V Leydigových buňkách nebyla mRNA pro ER α nalezena. V testikulární tkáni nedospělých i dospělých jedinců byl také určen protein ER β o molekulové hmotnosti 59 kDa (Rago et al., 2004). Nález proteinu ER β o molekulové hmotnosti 56 kDa publikovali Gunawan et al. (2012). Expresie mRNA pro protein ER β byla prokázána ve tkáni varlat pouze v Sertoliho buňkách (Lekhota et al., 2006).

Nadvarle

ER α a ER β byly identifikovány v nadvarletí mnoha savčích druhů (Hess et Carnes, 2004). Změny v koncentraci steroidů v nadvarletí souvisejí s věkem zvířat (Hess, 2003). Rozdíly v lokalizaci ERs v jednotlivých úsecích nadvarlete poukazují na dynamickou roli estrogenů v jeho vývoji a fyziologických funkcích (Parlevliet et al., 2006).

Saunders et al. (2001) u **člověka** uvádějí pouze nízkou přítomnost ER α v hlavních a bazálních buňkách sekrečního epitelu uvnitř kanálku nadvarlete ve všech třech jeho úsecích. ER β byl v celém nadvarletí nalezen v jádrech epiteliálních a podpůrných buněk.

U **potkana** byl ER α zjištěn v jádrech i cytoplasmě epiteliálních buněk všech segmentů nadvarlete, ve stejných regionech byl zaznamenán signál i pro ER β (Zaya et al., 2012). Hess (2003) však uvádí zcela odlišné údaje, kdy tkáň nadvarlete potkana se ukazují jako ER α negativní. Hess et al. (2011) uvádějí, že přítomnost ER α je ve tkáni nadvarlete potkana věkově variabilní. Nejvyšší hodnoty tohoto proteinu byly dokumentovány v těle, mnohem nižší byly v hlavě a ocasu nadvarlete. Stejných výsledků bylo dosaženo pro ER α mRNA. Zjištěná molekulární hmotnost proteinu ER α měla hodnotu 67 kDa. V práci Hesse et al. (2011) je také uvedeno, že protein ER β byl určen ve všech třech oblastech nadvarlete potkana, jeho molekulární hmotnost byla 53 kDa.

U **myši** byl ER α přítomný v epiteliálních buňkách zejména v hlavě, slaběji též v ostatních částech nadvarlete (Hess, 2003). Protilátkové značení ER β bylo detekováno v epiteliálních buňkách všech tří oblastí (hlava, tělo, ocas) nadvarlete (Zhou et al., 2002).

U **hřebce** Parlevliet et al. (2006) našli variabilní pozitivitu pro ER α při detekci pomocí protilátek v nadvarletí v závislosti na věku zvířat a části nadvarlete. Ve tkáni epididymu prepubertálních zvířat byl ER α detekován v hlavě a těle, nikoliv však v ocasu. U pubertálních zvířat bylo výrazné pozitivní značení ER α potvrzeno ve všech částech nadvarlete (včetně

vysokých hladin 17 β -estradiolu) indikující nezbytnou roli tohoto receptoru ve varlatech během dospívání. ER α pozitivní značení v buňkách hlavy nadvarlete dospělých jedinců. V těle a ocasu tkáně nadvarlete bylo nalezeno u přibližně 50 % buněk. Podle Parlevlieta et al. (2006) byl ER β přítomen v buňkách celého nadvarlete bez ohledu na věk.

V případě **kanců** Gunawan et al. (2011) detekovali ER α převážně v hlavě a těle, s nižší intenzitou i v ocase nadvarlete. Pearl et al. (2007a) publikovali ve své práci údaje o přítomnosti ER α zejména v hlavě, nižší intenzitu výskytu v těle nadvarlete a v kontrastu se zjištěním Gunawana et al. (2011) o jeho absenci v ocase nadvarlete. Pearl et al. (2007b) poukázali na výskyt ER α a ER β ve všech částech nadvarlete kance. ER β byl lokalizován v hlavních i bazálních buňkách kanálku všech tří částí nadvarlete (Pearl et al. 2007a). Gunawan et al. (2012) uvedli přítomnost ER β v epiteliálních buňkách na histologických řezech všech tří částí kančího nadvarlete. Carpino et al. (2004a) ve své práci uvedli obdobná data. U dospělých kanců (stáří 18 měsíců) anti-ER β protilátka označila buňky ve všech třech částech nadvarlete, ale u prepubertálních kanečků věku 2 měsíců byla pozitivní reakce jen velmi slabá v epiteliálních buňkách v těle epididymu, zatímco hlava a ocas byly negativní (Carpino et al., 2004a). Ve všech částech nadvarlete byl určen protein o molekulové hmotnosti 66 kDa, odpovídající estrogenovému receptoru ER α (Gunawan et al., 2011). Stejně tak byl týmiž autory (Gunawan et al., 2012) ve tkáni všech tří částí nadvarlete detekován i receptor ER β o molekulové hmotnosti 56 kDa. Ve všech úsecích epididymu byla potvrzena exprese mRNA pro ER α i ER β (Gunawan et al., 2011; 2012).

2.1.1.2 Estrogenové receptory ER α a ER β v ejakulovaných spermích

V posledních letech byly s novými poznatky o expresi klasických jaderných ERs (ER α a ER β) detekovaných v lidské a prasečí ejakulované spermii otevřeny nové možnosti pohledu na souvislost mezi působením hormonů na spermii a jejím fyziologickým vývojem (Aquila et De Amicis, 2014). Pozitivní nález ERs ve spermích by mohl znamenat, že steroidní hormony ovlivňují funkční vlastnosti spermií (Kotula-Balak et al., 2012).

Zralé spermie jsou považovány za buňky transkripčně neaktivní, ale schopné translace syntetizované mRNA (Gur et Breitbart, 2015). Proto je možné předpokládat, že se ve zralých spermích vyskytují negenomické rychlé efekty estrogenů (Dostálová et al., 2017). V ejakulovaných spermích byla prokázána mRNA pro ERs a detekovány klasické jaderné estrogenové receptory (Rago et al., 2014; Gur et Breitbart, 2015). Lokalizace těchto

klasických receptorů v ejakulovaných spermích některých savců je shrnuta v tabulce 1 (strana 15) pro ER α a tabulce 2 (strana 16) pro ER β .

Expres ER α a ER β (mRNA i protein) v **lidské** ejakulované spermii (Aquila et al., 2004) ukazuje, že estrogény jsou schopné modulovat proces spermatogeneze ve varlatech, zrání spermii i jejich stav po ejakulaci (Rochira et al., 2005; Carreau et al., 2011; Aquila et al., 2004; Aquila et de Amicis, 2014). Údaje týkající se lokalizace ERs v ejakulovaných spermích jsou v literatuře poměrně kontroverzní. ERs jsou většinou detekovány v odlišných částech spermie, ale v některých případech se oblasti jejich výskytu překrývají. Ve spermii člověka Aquila et al. (2004) potvrdili při použití imunofluorescence přítomnost ER α především v její střední části. Rago et al. (2006) detekovali ER α ve zralé spermii jedině ve střední části. U nezralé spermie byl tento receptor nalezen jen v reziduální cytoplasmě. Guido et al. (2011) poukázali na přítomnost ER α také jako Rago et al. (2006) pouze ve střední části spermie. Solakidi et al. (2005) identifikovali ER α v oblasti korespondující s ekvatoriálním segmentem hlavičky spermie, ve střední části byl nálezní negativní, slabé difúzní značení však bylo zjištěno v bičíku spermie. Naz et Sellamuthu (2006) u ejakulovaných lidských spermii poukázali na přítomnost ER α v postakrozomální oblasti, ve střední části a v hlavní m regionu bičíku spermie. Aquila et al. (2004) lokalizovali ER β pomocí imunofluorescenční mikroskopie jen v bičíku spermie s predominantní distribucí v proximální oblasti. Podle těchto autorů se ER α a ER β v proximální části bičíku překrývají. Rago et al. (2006) popisují přítomnost ER β v celém bičíku zralé lidské spermie. V nezralých ejakulovaných spermích se ER α a ER β nacházejí v reziduální cytoplasmě, ale také v bičíku. V odborné literatuře se ale objevují poměrně odlišné informace. Guido et al. (2011) popsali přítomnost ER β ve střední části a v bičíku. Solakidi et al. (2005) lokalizovali ER β v centrální části mitochondriální oblasti a slaběji v bičíku. Pozitivní přítomnost ER β byla v práci Naz et Sellamuthu (2006) uvedena v mitochondriální oblasti.

V extraktu lidských ejakulovaných spermii byla zjištěna molekulová hmotnost proteinu ER α v hodnotě 67 kDa (Aquila et De Amicis, 2014), tento výsledek byl potvrzen i v práci Rago et al. (2006), a to u lidských zralých i nezralých spermii. Solakidi et al. (2005) určili molekulovou hmotnost ER α u zralých spermii v hodnotě 66 kDa, přičemž byl zjištěn i další proteinový proužek s hodnotou molekulové hmotnosti 45 kDa. Stejný výsledek, tedy detekci dvou pruhů o molekulové hmotnosti 45 a 60 kDa proteinu ER α publikovali i Naz et Sellamuthu (2006). Molekulovou hmotnost proteinu ER β byla podle Aquila et De Amicis (2014) 55 kDa. Rago et al. (2006) udávají hodnotu proteinu ER β ve zralé i nezralé spermii člověka 59 kDa, u nezralé spermie byl navíc detekován i protein o molekulové hmotnosti

50 kDa. Solakidi et al. (2005) uvádí pro protein ER β dokonce poměrně odlišný údaj, a to hodnotu 64 kDa. S tímto výsledkem Solakidi et al. (2005) se shoduje i molekulová hmotnost proteinu ER β 64 kDa publikovaná v práci Naz et Sellamuthu (2006). Lambard et al. (2004) určili ve zralé lidské spermii mRNA pro ER β , protein ER β ale nalezen nebyl.

V ejakulovaných spermích **potkana** byl pozitivní signál pro ER α pouze ve střední části, ER β detekován nebyl (Zaya et al., 2012).

V **myších** ejakulovaných spermích ER α ani ER β popsány nebyly (Saunders et al., 2001).

U **hřebců** byl ER α v ejakulovaných spermích detekován na transmisním elektronovém mikroskopu (TEM) v hlavičce, střední části a bičíku spermie v blízkosti buněčné membrány (Gautier et al., 2016). ER β byl nalezen také v bičíku a v postakrozomálním regionu pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Při použití metod TEM byl tento receptor přesně lokalizován v hlavičce spermie, střední části a bičíku jako asociovaný s plazmatickou membránou (Arkoun et al. 2014). V extraktu z ejakulovaných spermíí byl detekován protein ER α s molekulovou hmotností 66 kDa. Molekulová hmotnost ER β proteinu v extraktu spermíí odpovídala 61 kDa (Arkoun et al, 2014).

U **kančích** ejakulovaných spermíí byly zatím publikovány pouze práce Rago et al. (2007). První publikace (Rago et al., 2007) popisuje lokalizaci obou typů jaderných estrogenových receptorů. Receptor ER α byl zjištěn v mitochondriální části bičíku spermie. Expres ER α by mohla u kance souviset s estrogenovou regulací motility spermíí, tak jak bylo prokázáno u lidských a potkaních spermíí. Molekulová hmotnost ER α byla 67 kDa. Estrogenový receptor ER β byl lokalizován v oblasti akrozomu, vykazoval při kvantifikaci dva proteiny; jeden slabší o velikosti 59 kDa a druhý silnější o velikosti 50 kDa, které by mohly korespondovat s dlouhou a krátkou formou ER β u lidské spermie (Rago et al., 2007).

Tabulka 1: Detekce ER α ve tkáni varlat a nadvarlat, v zárodečných buňkách a spermích u některých druhů savců

	Člověk	Myš	Potkan	Hřebec	Kanec
Varle – intersticiální tkáň	NP	+ (35)	+ im (12)	+ ad (22), - im (22)	+ im (30), - im (25)
Leydigovy buňky	- (6, 16, 31, 33)	+ (16, 35)	+ ad (12, 23), + im (12)	+ ad (22), + NB im (22)	+ s ad (9, 17, 25), + im (30), - im (17, 25)
Sertoliho buňky	- (6, 16, 31)	- (16, 35)	+ ad (12), + im (12)	- ad (22), + im (22)	+ ad (9), + NB ad (17), - ad (25), + im (30), - im (17, 25)
Zárodečné buňky	+ NB (6, 8, 24), - (16, 31)	- (16, 35)	+ ad (23), + NB ad (12) - im (12)	+ NB ad (22), + im (22)	+ NB ad (25), + s ad (9), + NB ad (17), + NB im (17), - im (25)
E1 epiteliální buňky	+ s (31)	+ ad (7, 35), + im (35)	+ ad (34), + im (34)	+ ad (19), + NB im (19)	+ ad (9, 20, 21), + im (21)
E2 epiteliální buňky	+ s (31)	+ s ad (7, 35), + im (35)	+ ad (34), + im (34)	+ NB ad (19), + NB im (19)	+ ad (21), + s ad (9, 20), + im (21)
E3 epiteliální buňky	+ s (31)	+ s ad (7, 35), + im (35)	+ ad (34), + im (34)	+ NB ad (19), - im (19)	+ ad (9, 21), - ad (20), + im (21)
E1 spermie v lumen	NP	NP	NP	- (19)	+ (9)
E2 spermie v lumen	NP	NP	NP	- (19)	+ PA (9)
E3 spermie v lumen	NP	NP	NP	- (19)	+ (9)
Ej spermie nezralé	+ RC (26)	NP	NP	NP	NP
Ej spermie zralé - hlavička	+ ES, PA (33)	NP	- (34)	+ PA (2,7)	- (27)
Ej spermie zralé střední část	+ (1, 26), + s (8), - (31)	NP	+ (34)	+ (2,7)	+ (27)
Ej spermie zralé bičík	+ s (33)	NP	- (34)	+ (2,7)	+ (9), + s (27)

E1 – hlava nadvarlete; E2 – tělo nadvarlete; E3 – ocas nadvarlete; s – slabě; NB – některé buňky; ad – dospělá zvířata; im – nedospělá zvířata nebo nezralé spermie; NP – nepopsáno; RC – reziduální cytoplazma; ES – ekvatoriální segment; PA – postakrozomální region

1 – Aquila et al., 2004; 2 – Arkoun et al., 2014; 6 – Fietz et al., 2014; 7 – Gautier et al., 2016; 8 – Guido et al., 2011; 9 – Gunawan et al., 2011; 12 – Lucas et al., 2008; 16 – Mäkinen et al., 2001; 17 – Mutembei et al., 2005; 19 – Parlevliet et al., 2006; 20 – Pearl et al., 2007a; 21 – Pearl et al., 2007b; 22 – Pearl et al., 2011; 23 – Pelletier et al., 2000; 25 – Rago et al., 2004; 26 – Rago et al., 2006; 27 – Rago et al., 2007; 30 – Ramesh et al., 2007; 31 – Saunders et al., 2001; 33 – Solakidi et al., 2005; 34 – Zaya et al., 2012; 35 – Zhou et al., 2002.

Tabulka 2: Detekce ER β ve tkáni varlat a nadvarlat, v zárodečných buňkách a spermích u některých druhů savců

	Člověk	Myš	Potkan	Hřebeč	Kanec
Varle – intersticiální tkáň	+ (31)	+ (35)		- im, ad (22)	+ im, ad (25, 30)
Leydigovy buňky	+ (31), - (6, 16)	+ (35), - (16)	+ ad (12)	+ im (22), + ad (22)	+ ad (10, 17, 30), - ad (25), + im (25, 30), - im (17)
Sertoliho buňky	+ (6, 31), - (16)	+ (16, 35)	+ ad (12, 23)	+ im (22), + ad (22)	+ ad (10, 17), - ad (25), + s im (25, 30), - im (17)
Zárodečné buňky	+ NB (6, 8, 16, 24, 31)	+ (16, 35)	+ ad NB (12)	+ im (22), - ad (22)	+ s ad (10, 30), + NB ad (17, 25), + im (17, 25)
E1 epiteliální buňky	+ (31)	+ (35)	+ ad (7, 34), + im (34)	+ im (19), + ad (19)	+ ad (4, 10, 20, 21), + im (21), - im (4)
E2 epiteliální buňky	+ (31)	+ (35)	+ ad (7, 34), + im (34)	+ im (19), + ad (19)	+ ad (4, 10, 20, 21), + im (21), + s im (4)
E3 epiteliální buňky	+ (31)	+ (35)	+ ad (7, 34), + im (34)	+ im (19), + ad (19)	+ ad (4, 10, 20, 21), + im (21), - im (4)
E1 spermie v lumen	NP	NP	NP	- (19)	+ (10)
E2 spermie v lumen	NP	NP	NP	- (19)	+ AR (10)
E3 spermie v lumen	NP	NP	NP	- (19)	+ (10)
Ej spermie nezralé	+ bičík, RC (26), - hlavička (26)	NP	NP	NP	NP
Ej spermie zralé - hlavička	- (26)	NP	NP	+ PA (2)	+ AR (27)
Ej spermie zralé krček	- (26)	NP	NP	- (2)	- (27)
Ej spermie zralé střední část	+ (8, 31), - (26)	NP	NP	+ (2)	- (27)
Ej spermie zralé bičík	+ (1, 8, 26), + s (31)	NP	NP	+ (2)	- (27)

E1 – hlava nadvarlete; E2 – tělo nadvarlete; E3 – ocas nadvarlete; s – slabě; NB – některé buňky; ad – dospělá zvířata; im – nedospělá zvířata nebo nezralé spermie; NP – nepopsáno; RC – reziduální cytoplazma; ES – ekvatoriální segment; AR – akrozomální oblast

1 – Aquila et al., 2004; 2 – Arkoun et al., 2014; 4 – Carpino et al., 2004; 6 – Fietz et al., 2014; 7 – Gautier et al., 2016; 8 – Guido et al., 2011; 10 – Gunawan et al., 2012; 12 – Lucas et al., 2008; 16 – Mäkinen et al., 2001; 17 – Mutembei et al., 2005; 19 – Parlevliet et al., 2006; 20 – Pearl et al., 2007a; 21 – Pearl et al., 2007b; 22 – Pearl et al., 2011; 23 – Pelletier et al., 2000; 24 – Pentikäinen et al., 2000; 25 – Rago et al., 2004; 26 – Rago et al., 2006; 27 – Rago et al., 2007; 30 – Ramesh et al., 2007; 31 – Saunders et al., 2001; 34 – Zaya et al., 2012; 35 – Zhou et al., 2002.

2.1.2 Estrogenový membránový receptor GPER

S G-proteinem spojený receptor (GPER/GPR30) je 7-transmembránový receptor (Prossnitz et al., 2007; 2008; Olde et Leeb-Lundberg, 2009; Wang et al., 2014) kódovaný genem GPER1 (Otto et al., 2009). Tento receptor je členem nadrodiny GPCR, což jsou buněčné membránové proteiny vážící své ligandy na povrch buňky. GPER-vázající doména receptoru byla nalezena v plazmatické membráně i v intracelulárních membránách jako je endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát (Filardo et al., 2007). Někteří autoři považují GPER za striktně cytosolický nebo s endoplazmatickým retikulem spojený receptor, zatímco jiní trvají na názoru, že je spojený pouze s plazmatickou membránou (Olde et Leeb-Lundberg, 2009; Schwartz et al., 2016). Jeho intracelulární lokalizace koresponduje s předpokladem prostupu ligandů přes plazmatickou membránu (Prossnitz et al., 2007; 2008). GPER není strukturálně příbuzný s klasickými receptory ER α a ER β (Wang et al., 2014; Qian et al., 2016). Předpokládá se, že biologická funkce receptoru by mohla být spojena s typem buňky a tkáně, ve které se nachází (Filardo et al., 2007; Prossnitz et al., 2007). Estradiol (E2) se jako predominantní typ estrogenu váže k receptoru GPER s vysokou afinitou (Prossnitz et al., 2008), je jeho přirozeným ligandem. Další 2 jeho izoformy (estron E1 a estriol E3) mají tuto afinitu mnohem nižší (Jacenik et al., 2016; Qian et al., 2016). GPER zprostředkovává rychlé reakce jako je aktivace kináz a stimulace intracelulární cAMP produkce (Smith et al., 2016). Bylo potvrzeno, že signální kaskáda GPER zahrnuje mobilizaci iontů intracelulárního kalcia (Prossnitz et al., 2008), což je úzce spojeno s procesem kapacity a akrozomální reakce spermií (Publicover et al., 2007), a toto zjištění tudíž poukazuje na přítomnost GPER ve spermiích. Předpokládá se, že GPER je zapojen v negenomické signalizaci účinku estrogenu bez účasti transkripčního mechanismu (Gruber et al., 2002). GPER se účastní nejen rychlých negenomických reakcí probíhajících v buňce, ale také dějů genomických. Společný výskyt estrogenových receptorů GPER i klasických ERs ukazuje možnost interakce mezi těmito receptory. Signální dráhy jimi aktivované mohou mít charakter antagonistický nebo synergický, mohou však probíhat i nezávisle na sobě. Byla prokázána komunikace nejen mezi GPER a ERs nejen plné délky, ale také zkrácenými formami ERs, jako je ER α 46 a zejména ER α 36. V různých typech buněk se závislost v komunikaci mezi GPER a ERs odlišuje (Jacenik et al., 2016).

Existují však také názory, že tento receptor není zodpovědný za negenomickou signalizaci E2 a dokonce že E2 není fyziologický agonista tohoto receptoru (Schwartz et al., 2016).

2.1.2.1 *Receptor GPER ve varleti a nadvarleti*

Receptor GPER byl studován ve varlatech a nadvarlatech mnoha savců jako je myš (Siriani et al., 2008; Otto et al., 2009), potkan (Lucas et al., 2010; Martínez-Traverso et Pearl, 2015), ovce (Lu et al., 2016) a člověk (Hess et al., 2011; Fietz et al., 2014).

Údaje o přítomnosti receptoru GPER/GPR30 ve tkáni varlat a nadvarlat jsou poměrně omezené a navíc velmi kontroverzní. Publikované výsledky o lokalizaci GPER v samčích reprodukčních orgánech a ve spermiích jsou reprezentovány živočišnými druhy uvedenými v tabulce 3 (strana 20).

V zárodečných buňkách dospělých **lidských** varlat GPER podle Rago et al. (2011) nalezen nebyl. Slabá exprese ve stejných typech buněk byla nalezena autory Franco et al. (2011), jasně prokazatelné značení uvádějí Chevalier et al. (2012). Leydigovy a Sertoliho buňky Rago et al. (2011) udávají pro GPER pozitivní. Fietz et al. (2014) poukazují na pozitivní zbarvení rovněž v Sertoliho buňkách, zatímco zárodečné buňky byly zbarveny velmi slabě. Oliveira et al. (2014) potvrzují distribuci GPER nejen v cytoplasmě Leydigových a Sertoliho buněk, ale také ve spermatogoniích. O detekci receptoru GPER v nadvarleti člověka údaje nejsou.

U **potkanů** byl GPER ve varlatech detekován v Leydigových buňkách (Vaucher et al.; 2014), Sertoliho buňkách (Lucas et al., 2010; 2011), spermatocytech a oblých spermatidách (Siriani et al., 2008; Chimento et al., 2010b; Lucas et al., 2010). V nadvarlatech dospělých jedinců byla přítomnost GPER doložena zejména v těle a ocase, slaběji v hlavě nadvarlete (Martínez-Traverso et Pearl, 2015). Cao et al. (2017) detekovali receptor GPER v histologických řezech u juvenilních zvířat z tkáně ocasu nadvarlete zejména v epiteliálních buňkách kanálku.

Přítomnost GPER v zárodečných buňkách varlat byla prokázána u **myši** (Siriani et al., 2008), o detekci GPER ve tkáni nadvarlete v dostupných odborných zdrojích informace nejsou.

Ve tkáni varlat a nadvarlat **hřebců** receptor GPER podle dostupné vědecké literatury dosud detekován nebyl.

U **kanců** byly nálezy membránového receptoru GPER zatím potvrzeny pouze ve tkáni nadvarlete postnatálních jedinců. Pozitivní značení bylo detekováno v epiteliálních buňkách kanálků nadvarlete, slabší signál byl ve stromatu a peritubulárních myoidních buňkách (Katlaba et al., 2015). Ve tkáních reprodukčních orgánů dospělých kanců doposud GPER

detekován nebyl. Aktuální zdroje věnující se detekci a lokalizaci GPER v samčích reprodukčních tkáních nebyly ověřeny a plně doloženy.

Protože podíl zralých spermií v těle nadvarlete, v jehož tkáni je exprese receptoru GPER nejvyšší, stoupá, nabízí se úvaha o roli GPER v procesu zrání spermií. Důležitá je patrně i úloha GPER z hlediska ochranné funkce, kdy GPER signalizace může být určující při depozici spermií v ocase nadvarlete (Martínez-Traverso et Pearl, 2015).

Protein odpovídající receptoru GPER měl u člověka molekulovou hmotnost okolo 42 kDa (Rago et al., 2011), u potkana byly detekovány dva pruhy, a to 43 kDa a další 55 kDa (Lucas et al., 2010). Hess et al. (2011) publikovali informaci o pozitivním nálezu mRNA pro GPER v nadvarletu dospělých potkanů s převažující expresí v jeho těle.

2.1.2.2 Receptor GPER v ejakulovaných spermiích

Přítomnost GPER v ejakulovaných spermiích byla dosud studována jen zcela omezeně. Důležitým faktorem je i skutečnost, že distribuce ERs nebyla sledována u jednotlivých stádií vývoje spermií jednotnými metodami.

O přítomnosti receptoru GPER v ejakulovaných spermiích **potkana** a **myši** v dostupných odborných zdrojích informace nejsou.

Při použití detekce pomocí protilátek Rago et al. (2014) našli membránový estrogenový receptor GPER u **lidských i kančích** ejakulovaných spermií. Jedná se tak pravděpodobně o první zprávu o pozitivním nálezu GPER ve zralé savčí spermii. V ejakulované **lidské** spermii byl GPER lokalizován ve střední části bičíku spermie, ale v hlavičce a v bičíku bylo značení negativní (Rago et al., 2014). U **kančích spermií** byl GPER lokalizován v akrozomální oblasti a v ekvatoriálním segmentu hlavičky a v mitochondriální oblasti bičíku u spermie s permeabilizovanou mebránou. Žádné imunofluorescenční značení nebylo detekováno v jádře (Rago et al., 2014). V ejakulované spermii **hřebce** byl GPER nalezen ve střední části bičíku, v krčku, bičíku a hlavičce subcelulární metodou lokalizace (Gautier et al., 2016). Arkoun et al. (2014) detekovali tento receptor ve spojovací části spermie.

V extraktu z ejakulovaných lidských i kančích spermií byl detekován protein GPER s molekulovou hmotností 42 kDa (Rago et al., 2014). Ve stejné práci autoři uvádějí i průkaz GPERmRNA taktéž v lidských i kančích ejakulovaných spermiích.

Tabulka 3: Detekce GPER ve tkáni varlat a nadvarlat, v zárodečných buňkách a spermích u některých druhů savců

	Člověk	Myš	Potkan	Hřebec	Kanec
Varle – intersticiální tkáň	NP	NP	NP	NP	NP
Leydigovy buňky	+ (5, 18, 28)	- (32)	- (13, 14)	NP	NP
Sertoliho buňky	+ (5, 18, 28), + s (6)	- (32)	+ (13, 14)	NP	NP
Zárodečné buňky	+ (5), + s (6), + NB (18), - (28)	+ (32)	- (13, 14)	NP	NP
E1 epiteliální buňky	NP	NP	+ ad s (15), - im (15)	NP	NP
E2 epiteliální buňky	NP	NP	+ ad (15), + s im (15)	NP	NP
E3 epiteliální buňky	NP	NP	+ ad (15), + im (15)	NP	+ im (11)
E1 spermie v lumen	NP	NP	NP	NP	NP
E2 spermie v lumen	NP	NP	NP	NP	NP
E3 spermie v lumen	NP	NP	NP	NP	NP
Ej spermie nezralé		NP	NP		
Ej spermie zralé hlavička	- (29)			+ (7), - (2)	+ ES, AR (29), - J (29)
Ej spermie zralé krček	- (29)			+ (2, 7)	- (29)
Ej spermie zralé střední část	+ (29)			+ (2, 7)	+ (29)
Ej spermie zralé bičík	- (29)			+ (7), - (2)	- (29)

E1 – hlava nadvarlete; E2 – tělo nadvarlete; E3 – ocas nadvarlete; s – slabě; NB – některé buňky; ad – dospělá zvířata; im – nedospělá zvířata nebo nezralé spermie; NP – nepopsáno; ES – ekvatoriální segment; AR – akrozomální region; J – jádro.

2 – Arkoun et al., 2014; 5 – Chevalier et al., 2012; 6 – Fietz et al., 2014; 7 – Gautier et al., 2016; 11 – Katleba et al., 2015; 13 – Lucas et al., 2010; 14 – Lucas et al., 2011; 15 – Martínez-Traverso et al., 2015; 18 – Oliveira et al., 2014; 28 - Rago et al., 2011; 29 - Rago et al., 2014; 32 – Siriani et al., 2008.

3 Hypotézy a cíle práce

Publikované informace týkající se detekce a lokalizace estrogenových receptorů (ERs) v reprodukčním traktu a ve spermiích kanců nejsou dostatečné, výsledky uváděné různými autorskými týmy jsou velmi rozdílné.

Vzhledem k nízké četnosti publikovaných výsledků, týkajících se receptoru GPER ve tkáních a spermiích u dospělých kanců, se detekce a lokalizace tohoto receptoru stala hlavním úkolem dizertační práce.

Hypotézy:

- Ve spermiích kance budou lokalizovány estrogenové receptory GPER, ER α a ER β
- U jednotlivých typů estrogenových receptorů budou prokázány změny v posttestikulární distribuci při maturaci spermií
- Estrogenové receptory ER α , ER β a zejména GPER budou prokázány ve spermatogenním epitelu varlete a v sekrečním epitelu kanálku nadvarlete

Na základě výše uvedených hypotéz jsme stanovili cíle dizertační práce.

Cíle:

- Ověřit publikované údaje o lokalizaci jednotlivých typů estrogenových receptorů v reprodukčním traktu a ve spermiích prasete
- Zjistit expresi membránového estrogenového receptoru GPER v samčích reprodukčních orgánech prasete a v epididymálních a ejakulovaných spermiích
- Zmapovat změny v distribuci estrogenových receptorů v zárodečných buňkách a spermiích kanců během jejich vývoje, zrání a po absolvování kapacitace a akrozomální reakce

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Spermie a reprodukční orgány (varle, nadvarle) prasete

Při laboratorním zpracování byly používány ejakulované spermie dospělých kanců a epididymální spermie z tkání nadvarlete. V případě ejakulovaných spermií se jednalo o komerční a nativní dávky získávané z inseminačních stanic kanců. Komerční dávky pocházely ze stanice CHOVSERVIS a.s. Kout na Šumavě a PROAGRO Nymburk a.s., nativní ejakulát z inseminační stanice LIPRA PORK, a. s. Skršín. Epididymální spermie i vzorky reprodukčních tkání (varlat a nadvarlat) pocházely od dospělých kanců miniprasat chovaných pro experimentální účely v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i. v Liběchově (2 kanci, porážková hmotnost 70 – 100 g, stáří 7 – 12 měsíců) a z experimentálních jatek Výzkumného ústavu živočišné výroby, v. v. i., Praha-Uhřetěves (4 kanci plemene bílé ušlechtilé, porážková hmotnost 110 – 115 kg, stáří 9 – 12 měsíců).

Konzervované komerční dávky spermií byly převáženy a uchovávány v temperovaném termoboxu při 17 °C, zpracovány byly druhý den po odběru. Nativní ejakulát byl převezen v izolovaném boxu při teplotě okolo 30 °C a zpracován ihned po doručení do laboratoře, tzn. nejpozději do 2,5 hod po odběru kance.

V rámci zavádění metodik byly pro jejich standardizaci používány komerční inseminační dávky kančích spermií, pro samotnou experimentální práci byly určeny pouze nativní spermie bez přídavku dalších látek.

V laboratoři KVD ČZU byly zpracovávány komerční dávky ejakulovaných spermií, nativní ejakulované spermie, spermie z cauda epididymis, *in vitro* kapacitované spermie (kapitola 4.2.4, strana 30) a spermie po *in vitro* indukované akrozomální reakci (kapitola 4.2.4.1, strana 31).

K získání kvalitních vzorků ejakulovaných spermií z komerčních dávek i dávek nativních spermií byla nejdříve zkontrolována jejich viabilita pomocí stolního mikroskopu Nikon Eclipse E200 (Nikon, Japonsko) při 100 x zvětšení. Dalším krokem zpracování kančího ejakulátu bylo oddělení semenné plazmy od spermií odstředěním na centrifúze (NF 400R, Merci, ČR) při 250 x g a laboratorní teplotě po dobu 10 min. Získaná peleta spermií byla

dvakrát po sobě promyta PBS (Phosphate-buffered saline, Sigma-Aldrich, USA) a pokaždé odstředěna při 250 x g po 10 min.

Epididymální spermie byly získávány z ocasu nadvarlete přímo na místě odběru tkání v ÚŽFG AV ČR odsátím pomocí injekční jehly a stříkačky. Spermie z dalších částí nadvarlete byly vymývány z tkáně přímo v laboratoři KVD ČZU: celý orgán byl převezen na ledu. Hlava a tělo nadvarlete byly nastříhány na kousky do roztoku PBS (Phosphate Buffered Saline) a po 30 min inkubace v termostatu při 37°C byly filtrací odstraněny zbytky tkáně. Menší kousky tkání byly separovány centrifugací (5 min při 50 x g). Po následující centrifugaci suspenze spermií (20 min při 300 x g) byly spermie odděleny, dvakrát promyty PBS a odstředěny při 250 x g po dobu 10 min.

Ze spermií byly extrahovány celkové proteiny pomocí detergentu SDS (dodecylsírán sodný, P-Lab, ČR), proteiny z jednotlivých částí spermatické buňky – cytosolární (cytoplasma a obsah akrozomu), membránové (včetně vnitřních membrán), nukleární a cytoskeletální pomocí kitu od firmy Calbiochem (Subcellular Protein Fractionation Kit, Merck, Německo) a proteiny z povrchu spermií s využitím kitu od firmy ThermoFisher Science (Cell Surface extraction Protein Kit).

Pro separaci izolovaných proteinů byla použita SDS-elektroforéza v polyakrylamidovém gelu následovaná elektropřenosem proteinů na nitrocelulózovou membránu (Western blot), kde byly poté pomocí protilátek detekovány estrogenové receptory ER α , ER β a GPER. Použité sekundární protilátky byly značené křenovou peroxidázou, vizualizace proteinů byla provedena buď pomocí přeměny substrátu TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine; Sigma-Aldrich, Německo), nebo chemiluminiscenčního substrátu ECL Select (Amersham, UK).

Lokalizace estrogenových receptorů ve spermiích v různých fázích jejich funkčního vývoje byla sledována nepřímou fluorescenční mikroskopií pomocí specifických protilátek s použitím sekundárních protilátek značených fluorescein isothiokyanátem (FITC). Pro rozlišení lokalizace ERs na povrchu nebo uvnitř buňky byly spermie zpracovány metodami buď bez porušení jejich plazmatické membrány nebo po její permeabilizaci.

4.1.2 Seznam protilátek

Primární protilátky (pokud není uvedeno jinak, jedná se o Santa Cruz Biotechnology, USA):

ER α (HC-20): sc-543, králičí polyklonální protilátka proti C-konci aminokyselinové sekvence lidského proteinu

ER α (C-311): sc-787, myší monoklonální protilátka proti aminokyselinám 495-595 bovinního proteinu

ER β (1531): sc-53494, myší monoklonální protilátka proti C-konci (aminokyseliny 256-505) lidského proteinu

ER β (L-20): sc-6822, kozí polyklonální protilátka proti oblasti v blízkosti C-konce aminokyselinové sekvence lidského proteinu

GPR30 (K-19-R): sc-48524-R, králičí polyklonální protilátka proti vnitřní části aminokyselinové sekvence lidského proteinu

GPR30 (H-300): sc-134576, králičí polyklonální protilátka proti aminokyselinám 76-375 lidského proteinu

Myší monoklonální protilátka proti fosfotyrosinu (klon **4G10**), Merck Millipore, Německo

Wt1: polyklonální králičí protilátka proti Wt1 (Wilms tumor gene) (C-19): sc-192, proti C-koncové aminokyselinové sekvenci lidského proteinu Wt1 specificky exprimovanému v Sertoliho buňkách (Wang a kol., 2013)

Ki-67: monoklonální králičí protilátka proti Ki-67 (SP6) (MA5-14520), pro vizualizaci jaderného proteinu Ki-67 ve spermatogoniích (Steger a kol., 1998), Thermo Fisher, USA

VEGF: monoklonální myší protilátka proti VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (C-1): sc-7269 proti aminokyselinové sekvenci 1-140 lidského proteinu, pro vizualizaci meiotických buněk (Guo a kol., 2004)

Sekundární protilátky:

Imunofluorescence:

Anti-R: kozí protilátka proti králičím IgG (celá molekula) s FITC, Sigma-Aldrich, USA

Anti-M: kozí protilátka proti myším IgG (celá molekula) s FITC, Sigma-Aldrich, USA

Anti-G: kozí polyklonální protilátka proti myším IgG (H+L) s FITC, Merck Millipore, Německo

Anti-M_A: oslí protilátka proti myším IgG (H+L), Alexa Fluor 555, Invitrogen, USA

Anti-R_A: oslí protilátka proti králičím IgG (H+L), Alexa Fluor 555, Invitrogen, USA

Western blot:

Anti-R_O: oslí protilátka proti králičím IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou, Amersham, UK

Anti-M_O: ovčí protilátka proti myším IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou, Amersham, UK

Anti-R_G: kozí protilátka proti králičím IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou Bio-Rad, USA

Anti-M_G: kozí protilátka proti myším IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou Bio-Rad, USA

4.2 Použité metody

4.2.1 Histologické preparáty

Kančí reprodukční orgány byly získávány postmortálně z dospělých kanců miniaturních plemen a transportovány na ledu do laboratoře ČZU. Vzorčky tkáně byly po převozu za účelem zhotovení parafinových histologických preparátů ihned po odběru z nativních orgánů fixovány v 10 % formolu (vodný roztok z 36 – 38% formaldehydu; Penta, ČR). Tkáně určené pro zhotovení kryořezů byly ošetřeny přípravkem TissueTek (OCT Compound for Cryostat Sectioning, Austrálie), zamrazeny v tekutém dusíku a až do samotného zpracování na přístroji cryo-cut (Biocev, Vestec) uchovávány hluboce zmražené při teplotě -80 °C.

4.2.1.1 Parafinové řezy a kryořezy z tkání varlat a nadvarlat

Vzorčky tkání pro zhotovení parafinových řezů po fixaci v 10 % formolu prošly vzestupnou alkoholovou řadou (70 – 96% etylalkohol), poté následoval toluen (P-Lab, ČR) a xylen (Penta, ČR) a nakonec dvě lázně v parafinu (parafin Leica, USA); celková doba zpracování byla 12 hod. Byly zhotoveny parafinové bločky. Po zatmelení na dřevěné špalíčky byly bločky krájeny na mikrotomu (prototyp BD-RM70, Čína), poloténkové řezy (5 – 7 µm) byly nataženy a napnuty na sklo. Po usušení preparátů následovalo základní barvení hematoxylinem a eosinem.

Krájení zamražených tkání (bločků) probíhalo na přístroji Cryo-cut (Leica, Biocev, Vestec). Ploušťka kryorezů se pohybovala v závislosti na typu tkáně od 3 do 5 μm . Každý řez byl nalepen na vytemperované speciální podložní sklo Superfrost Plus (Thermo Scientific, USA). Hotová skla s řezy byla skladována v mrazicím boxu při teplotě -20°C . Preparáty kryorezů byly barveny hematoxylinem a eosinem a použity k detekci ERs v tkáni pomocí specifických protilátek při imunofluorescenční mikroskopii.

4.2.1.2 Základní přehledné barvení hematoxylinem a eosinem

Metoda barvení hematoxylinem a eosinem (HE) využívá kombinaci dvou barviv, bazického hematoxylinu a kyselého eosinu. Jedná se o přehledné základní barvení určené pro polotenké řezy, při kterém jsou obarvena jádra a cytoplazma buněk rozdílným barevným tónem a zároveň se obarví i mezibuněčná hmota pojivové tkáně.

Vzhledem k použití vodných roztoků barviv bylo nutné řez tkáně nejdříve odparafinovat xylenem a následně sestupnou řadou alkoholu (96-70 %). Postupně jsme preparáty obarvili hematoxylinem a poté eosinem. Před zamontováním obarveného řezu pod podložní sklo byl preparát odvodněn alkoholem (vzestupná řada 70-96 %) a karboxylenem. Nakonec v lázni xylenu došlo k projasnění řezu, kdy řez získal index lomu blízký indexu lomu skla. Kryorezy tkání byly barveny hematoxylinem a eosinem s vynecháním kroků odparafinování. Takto získané řezy byly zamontovány pod krycí sklo pomocí kanadského balzámu. Mikroskopické snímky byly zhotoveny pomocí mikroskopu (Nicon Eclipse E600 s kamerou Nikon Digital Sight DS-Fi1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

4.2.2 Imunohistochemie – detekce ERs v tkáni varlete a nadvarlete

4.2.2.1 Peroxidázové barvení – detekce ERs na parafínových řezech

Parafínové řezy tkání (5 μm) napnuté na sklech byly odparafinovány při průchodu: dvěma lázněmi v koncentrovaném xylenu, sestupnou řadou koncentrací etanolu (2 x 96 % etanol, 1 x 70 % a 1 x 50 % etanol) a opakovaně promyty v destilované vodě. Následně byly povařeny v citrátovém pufru, zchlazeny v Tritonu (0,1 % v PBS, Phosphate Buffered Saline) a propláchnuty v PBS. Preparáty byly fixovány na podložních sklíčkách po dobu 5 min

fixačním roztokem (metanol : aceton = 1 : 1) vymraženým při -20 °C. Poté byly 3x po dobu 5 min promyty v PBS ve vertikální kyvetě. Na každý vzorek byla následně přidána směs 18 % vody, 80 % metanolu a 2 % H₂O₂. Po inkubaci při 37 °C po 20 min a promytí 3 x po 5 min v PBS bylo použito 1 % BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, USA) v PBS k deaktivaci volných míst. Po 20 min inkubace při 37 °C byl přebytek tekutiny ze skel odstraněn setřepáním. Na skla s preparáty byly přidány primární protilátky proti ERs (ředěné 1 : 100 v PBS; Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24) a následovala inkubace přes noc při 4 °C ve vlhké komůrce. V negativní kontrole byla primární protilátka nahrazena PBS. Skla byla 5 x po 5 min promyta v PBS ve vertikální kyvetě. Po přidání sekundární protilátky značené peroxidázou (ředěné 1 : 1000 v PBS; Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24) byly vzorky inkubovány po dobu 45 min při 37 °C, promyty 3 x po 5 min v PBS a následně barveny 0,06 % DAB (3,3'-diaminobenzidín tetrahydrochlorid) (Sigma-Aldrich, USA) po dobu 10 - 15 min. Po oplachu byl preparát 1 min dobarvován Harrisovým hematoxylinem a 4 x po 5 min promyt v PBS. Sklo s preparátem bylo vyhodnoceno pomocí světelného mikroskopu (mikroskop Nikon Eclipse E600 s kamerou Nikon Digital Sight DS-Fi1, Japonsko).

4.2.2.2 *Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie – detekce ERs na kryořezech*

Metoda nepřímé imunofluorescence byla použita k detekci a lokalizaci estrogenových receptorů pomocí specifických protilátek ve varlatech a částech epididymu.

Kryořezy (3 až 5 µm) tkání byly fixovány ve vymraženém acetonu 10 min. Po promytí PBS byly řezy blokovány blokačním činidlem SuperBlock (ThermoFischer, USA) po dobu 30 min při laboratorní teplotě a pak inkubovány ve vlhké komůrce s primární protilátkou proti ERs (Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24) zředěné v PBS (1 : 100) přes noc v lednici. Po promytí v PBS byly tkáňové řezy inkubovány s příslušnou sekundární protilátkou konjugovanou s FITC (Sigma-Aldrich, USA) ředěnou v PBS (1 : 300/1 : 500) po dobu 1 h při laboratorní teplotě. Jako kontroly byly použity řezy inkubované bez primární protilátky pouze s PBS, aplikována byla jen příslušná sekundární protilátka. Po opláchnutí PBS a destilovanou vodou byly tkáňové řezy osušeny a zamontovány médiem VectaShield-DAPI (Vector Laboratories, USA) pod krycí sklo. Preparáty byly vyhodnoceny pod fluorescenčním mikroskopem (Nikon Eclipse E600), snímány pomocí kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

4.2.2.3 Detekce jednotlivých typů testikulárních buněk spolu s detekcí ERs

Detekce jednotlivých typů testikulárních buněk (Sertoliho buňky, spermatocyty a spermatogonie) byla provedena pomocí specifických protilátek (Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24) na kryořezech varletní tkáně.

Skla s kryořezy po vyjmutí z mrazicího boxu byla přibližně 5 min temperována na laboratorní teplotu a poté fixována v kyvetě ve vymraženém (-20 °C) acetonu - metanolu (1 : 1) po dobu 10 min. Po fixaci byla skla promyta v kyvetě v PBS 3 x po 5 min na třepačce. Poté byly řezy blokovány nanesením blokačního činidla SuperBlock (ThermoFischer, USA) 30 min při laboratorní teplotě. Po omytí PBS a osušení byly na řezy aplikovány primární protilátky proti estrogenovým receptorům ředěné v PBS; ředění jednotlivých primárních protilátek v PBS: GPR30 (K-19-R) (1 : 100), ER α (HC-20) (1 : 50), ER β (1531) (1 : 50). Skla s primárními protilátkami byla inkubována ve vlhké komůrce po dobu 4 hod v termostatu při 37 °C. Na řez určený jako kontrolní byl nanesen jen PBS. Po inkubaci byla skla omyta PBS. Po osušení skel byly nanесeny primární protilátky ředěné v PBS značící jednotlivé buňky: Wt1 králičí polyklonální protilátka, 1 : 50 (značící Sertoliho buňky), VEGF myší monoklonální protilátka, 1 : 100 (značící cytoplazmu spermatocytů), Ki-67 králičí monoklonální protilátka, 1 : 25 (značící spermatogonie). Pro negativní kontroly byl použit samotný PBS. Inkubace proběhla ve vlhké komůrce přes noc při 4 °C. Poté byla skla omyta v kyvetě v PBS 2 x po 5 min na třepačce a osušena. Na skla byly nanесeny sekundární protilátky konjugované s FITC ředěné v PBS (anti-M 1 : 300, anti-R 1 : 500). Inkubace preparátů probíhala ve vlhké komůrce v lednici při 4 °C ve tmě po dobu 1 hod. Po vyjmutí z lednice byla skla omyta v PBS a osušena. Poté byly na skla nanесeny sekundární protilátky konjugované s Alexa Fluor 555 ředěné v PBS: anti-M_A (1 : 500) a anti-R_A (1 : 800). Inkubace preparátů probíhala ve vlhké komůrce v lednici při 4 °C ve tmě po dobu 1 hod. Po inkubaci byla skla opakovaně promyta v PBS v kyvetě na třepačce ve tmě a nakonec promyta v detilované vodě. Po osušení byla skla zamontována pomocí média VectaShield-DAPI (Vector Laboratories, USA) pod krycí sklo. Vyhodnocení bylo provedeno na imunofluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse E600. Preparáty byly nafoceny pomocí kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi 1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

4.2.3 Zpracování spermií pro imunofluorescenci

4.2.3.1 Počítání spermií

Suspenze spermií naředěných v destilované vodě (10 μ l suspenze spermií a 990 μ l destilované vody) v množství 20 μ l byla aplikována pod krycí sklíčko Bürkerovy komůrky. Pod mikroskopem jsou počítány jednotlivé buňky ve 40 velkých čtvercích. Výpočet podle vzorce: počet spermií ve 40 čtvercích násobený faktorem konverze (1000) / velikost pole (0,04) x počet čtverců (40) x 0,1 (hloubka komůrky) x ředění suspenze (1/100). Tímto výpočtem byl získán počet spermatických buněk v 1 ml suspenze.

4.2.3.2 Fixace spermií na podložním mikroskopickém skle

Fixací roztěru spermií na podložním skle dojde v závislosti na typu použité fixační látky k úplnému nebo částečnému narušení integrity plazmatické membrány a tím její prostupnosti pro protilátku. Permeabilizace umožní použitým specifickým protilátkám proniknout do buňky a navázat se na estrogenové receptory ve spermiích. Porušení integrity plazmatické membrány bylo dosaženo několika způsoby. Metoda vlhké fixace (aceton : metanol = 1 : 1) navodí úplnou permeabilizaci plazmatické membrány, jen částečné permeabilizace je pravděpodobně dosaženo zasušením roztěrů spermií na podložním skle ponořením skel do lázně s vymraženým metanolem.

Skla s fixovanými spermiemi byla použita ihned pro aplikaci specifických primárních protilátek nebo pro pozdější využití uchovávána v lednici při 4 °C.

- **Fixace spermií zasušením na skle**

Suspenze spermií v PBS (cca 10^7 buněk/ml) v objemu 20 μ l byla napipetována do kroužku nakresleného speciálním fixem na mikroskopické podložní sklo. Spermie byly na skle opatrně rozetřeny a zasušeny při laboratorní teplotě.

- **Zpracování preparátů spermií vlhkou fixací**

Suspenze spermií v PBS (cca 10^7 buněk/ml) v objemu 20 μ l byla napipetována do kroužku nakresleného parafinovou tužkou (Liquid Blocker, PAP - pen for immunostaining, Sigma-Aldrich, USA) na mikroskopické podložní sklo. Ke kapce spermií byla přidána směs

acetonu a metanolu (poměr 1 : 1) v množství 50 μ l. Po inkubaci 5 min při laboratorní teplotě byla skla opláchnuta PBS a osušena.

- **Fixace spermií metanolem**

Mikroskopická podložní skla se zasušenými spermiemi byla vložena do kyvety s vymraženým metanolem na dobu 10 min, poté opláchnuta v PBS a osušena při laboratorní teplotě.

4.2.4 Kapacitace ejakulovaných spermií *in vitro*

Suspenze ejakulovaných kančích spermií zbavená semenné plazmy byla 2 x promyta roztokem PBS a odstředěna při 250 x g po dobu 10 min při laboratorní teplotě na centrifuze NF 400R (Merci, ČR). Po odstředění byl odstraněn supernatant. Byl určen počet spermií v suspenzi (kapitola 4.2.3.1, strana 29). Peleta promytých spermií byla resuspendována ve 40 ml kapacitačního média připraveného ze zásobního 10 x koncentrovaného TBM (113,1 mM NaCl; 3 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 20 mM TRIS; 11 mM glukóza; 5 mM pyruvát; 1 amp. gentamycin; do 100 ml H₂O, pH 7,7) s BSA (1 mg/ml) (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, USA) na koncentraci asi 5 x 10⁷ buněk/ml. Suspenze spermií v kapacitačním médiu byla následně rozdělena do mikrozkušavek po 500 μ l. Kapacitace probíhala v termostatu s 5 % CO₂ při 38,5 °C po dobu 3 h. Po kapacitaci byly spermie odstředěny při 250 x g při teplotě místnosti po dobu 10 min. Získané pelety spermií byly opakovaně promyty v PBS.

4.2.4.1 Hodnocení kapacitačního stavu spermií

Po *in vitro* kapacitaci spermií byl jejich kapacitační stav hodnocen podle stupně tyrozinové fosforylace ve spermatické buňce pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie s využitím specifické primární myši monoklonální protilátky proti fosfotyrozinu 4G10 a sekundární protilátky s navázaným fluoroforem.

K peletce promytých spermií byl přidán formaldehyd (36 – 38 % vodný roztok, Penta, ČR) v poměru 1 : 5 a po mírném roztřepání byly spermie inkubovány po dobu 1 h při laboratorní teplotě. Po odstředění (při 220 x g po dobu 7 min) a opakovaném promytí v PBS byla suspenze nanášena na podložní mikroskopická skla do kroužků napsaných parafínovou tužkou (Liquid Blocker, PAP - pen for immunostaining, Sigma-Aldrich, Japan) v množství

20 μ l, rozprostřena po celé ploše kroužku a zasušena na vyhřívané ploténce Dual Thermo (P-Lab). Fixace formaldehydem by měla integritu plazmatické membrány zachovat, avšak každý výrobce (např. Penta, ČR) uvádí v distribuovaném 36 – 38 % vodném roztoku formaldehydu obsah metanolu do výše 3 - 10 % z celkového objemu, pocházející z výrobního procesu (tento obsah metanolu je příčinou navození prostupnosti plazmatické membrány a formalínem fixované spermie nesplňují podmínku pro detekci povrchových estrogenových receptorů). Po fixaci byla skla opláchnuta PBS a poté destilovanou vodou. Po osušení byla na spermie na skle nanášena primární myší monoklonální protilátka 4G10 (ředění 1 : 300 v PBS). Jako negativní kontrola byl použit samotný PBS. Následovala inkubace ve vlhké komůrce po dobu 1 h při 4 °C. Po inkubaci byla skla omyta PBS a osušena. Na všechna skla (včetně negativních kontrol) byla nanášena sekundární protilátka proti myším IgG konjugovaná s FITC (ředění 1 : 400 v PBS). Po inkubaci ve tmě ve vlhké komůrce po dobu 1 h při 4 °C byla skla opakovaně omyta PBS a destilovanou vodou. Po osušení byly preparáty zafixovány pomocí montovacího média Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, USA) a překryty krycím sklíčkem. Vyhodnocení bylo provedeno na imunofluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse E600. Preparáty byly nafoceny pomocí kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi 1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

4.2.4.2 Indukce akrozomální reakce spermií kapacitovaných *in vitro*

Pro indukci akrozomální reakce bylo k suspenzi kapacitovaných spermií o objemu 500 μ l přidáno 10 μ l ionoforu (100 μ M Calcium Ionophore, Sigma-Aldrich, USA). Akrozomální reakce *in vitro* probíhala v termostatu s 5 % CO₂ při 38,5 °C po dobu 1,5 h. Suspenze spermií byla odstředěna při 250 x g při teplotě místnosti po dobu 10 min a 2x promyta v PBS.

4.2.4.3 Hodnocení integrity akrozomu

Ke zjištění integrity akrozomu byla využita schopnost vazby lektinu PNA (Peanut agglutinin) na sacharidové struktury přítomné na vnější akrozomální membráně. Pro ověření zachování integrity akrozomu byly spermie inkubovány s lektinem PNA značeným fluorochromem rhodaminem, produkujícím fluorescenční signál (Rhodamine Peanut Agglutinin, anti-M, Vector Laboratories, USA), ředěným v PBS 1 : 500, ve tmě ve vlhké

komůrce po 30 min při laboratorní teplotě. Poté byla skla opakovaně omyta PBS a destilovanou vodou, osušena a zafixována do montovacího média Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, USA), překryta krycím sklíčkem a hodnocena pod imunofluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E600. Preparáty byly nafoceny pomocí kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

4.2.5 Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie – detekce ERs ve spermiích

Pro lokalizaci estrogenových receptorů ve/na spermiích byla použita nepřímá imunofluorescenční mikroskopie s využitím monoklonálních a polyklonálních komerčních protilátek proti ERs.

4.2.5.1 Lokalizace ERs u spermií fixovaných na podložním mikroskopickém skle

Epididymální, ejakulované a kapacitované spermie (kapitola 4.2.4, strana 30) a spermie po akrozomální reakci (kapitola 4.2.4.1, strana 31) byly opakovaně promyty v PBS. Na preparátu ejakulovaných spermií byly testovány protilátky proti ERs, a to buď pouze po zasušení na skle nebo následně fixovány vymraženým metanolem po dobu 10 min. Po vyhodnocení použitých metod byla pro přípravu všech preparátů spermií zvolena metoda vlhké fixace. Po oplachu PBS následovalo nanesení blokačního činidla SuperBlock (ThermoFischer, USA) na dobu 30 min. Po oplachu PBS byly preparáty spermií na skle aplikovány primární monoklonální a polyklonální protilátky proti ERs (ředěné 1 : 100 / 1 : 50) v PBS; viz. Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24). U negativních kontrol byly primární protilátky nahrazeny PBS. Inkubace probíhala ve vlhké komůrce přes noc v lednici při 4 °C nebo v suspenzi 2 h při 37 °C. Příslušné sekundární protilátky konjugované s fluorescein isothiokyanátem FITC (ředěné 1 : 300 / 1 : 500) v PBS; Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24) byly po nanesení inkubovány 1 h ve vlhké komůrce v termostatu při 37 °C. Jako negativní kontrola byla určena skla bez použití primárních protilátek, jen s protilátkami sekundárními. Po osušení skel byl na některé preparáty aplikován PNA lektin značený rhodaminem v PBS ředěný 1 : 500. Inkubace s PNA lektinem probíhala 30 min ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě ve tmě. Poté byla skla omyta 3 x 5 min v PBS a následně opláchnuta destilovanou vodou. Po osušení byla skla zamontována pomocí média Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, USA). Tímto způsobem bylo dosaženo prodloužení

doby imunofluorescence preparátu a zároveň byla označena jaderná DNA. Vyhodnocení bylo provedeno imunofluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E600. Preparáty byly snímány pomocí kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

4.2.5.2 Lokalizace ERs v suspenzi spermií

Cílem této metody bylo zjistit přítomnost ERs na povrchu spermií, který je při tomto způsobu provedení neporušený. K suspenzi ejakulovaných promytých spermií byla přidána protilátka v poměru 1 : 100. Po 1,5 h trvající inkubaci v termostatu při 37 °C byly spermie dvakrát po sobě promyty v PBS a vždy po promytí odstředěny (5 min při 250 x g). Po promytí byla suspenze spermií s primární protilátkou použita pro zpracování na mikroskopických sklech. Suspenze spermií v PBS (o objemu 20 µl) byla opatrně rozetřena do parafinovou tužkou (Liquid Blocker, PAP - pen for immunostaining, Sigma-Aldrich, USA) nakreslených kroužků na podložním mikroskopickém skle a zasušena při pokojové teplotě. Skla byla zpracována ihned po zasušení suspenze spermií nebo uložena před dalším zpracováním v chladničce.

Před dalším zpracováním byla skla se zasušenými spermiemi omyta PBS a osušena. Na skla byla aplikována sekundární protilátka konjugovaná s FITC ředěná v PBS (1 : 400). Po inkubaci ve vlhké komůrce ve tmě po dobu 1 h při laboratorní teplotě byla skla omyta v PBS, osušena a zamontována pomocí média Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, USA) pod krycí sklíčko. Preparáty byly uchovávány v lednici ve tmě a nejpozději druhý den vyhodnoceny na imunofluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse E600. Snímány byly pomocí kamery Nikon Digital Sight DS-Fi1 a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

4.2.6 Příprava vzorků tkání a spermií pro izolaci proteinů

4.2.6.1 Příprava proteinového extraktu z tkání varlat a nadvarlat

Tkáně z hlavy, těla a ocasu nadvarlete (každý vzorek o hmotnosti 100 mg) byly homogenizovány pomocí homogenizéru IKA T10 basic (IKA Werke, Staufen, Německo) v 500 µl 1% Tritonu X-100 v 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) s 30 mM KCl a vysráženy acetonem: vymražený aceton byl smíchán se vzorkem tkáně v poměru 1 : 5 a pečlivě roztřepán. Po

inkubaci po dobu 1 h při -20 °C byla suspenze odstředěna při 4 °C/5 000 x g. Po odstranění supernatantu byla peletka v mikrozkuhavce přibližně 10 min ponechána na ledu, aby došlo k odpaření nadbytečné tekutiny. Získaný extrakt byl rozpuštěn v neredukujícím vzorkovém pufru (2 % SDS v 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, bromfenolová modř), konečná koncentrace proteinů ve vzorku byla přibližně 1 mg/ml.

4.2.6.2 Příprava proteinového extraktu ze spermií

Pro přípravu proteinového extraktu ze spermií izolovaných z tkáně jednotlivých úseků nadvarlete (kapitola 4.1.1, strana 22), získaných zpracováním komerčních i nativních dávek (kapitola 4.1.1, strana 22), kapacitovaných spermií (kapitola 4.2.4, strana 30) a spermií po akrozomální reakci (kapitola 4.2.4.1, strana 31) byly použity vytvořené peletky. K peletě spermií (počet buněk přibližně 5×10^7) bylo přidáno 150 µl neredukujícího vzorkového pufru (0,5 M Tris.HCl pH 6,8; glycerol; 2 % SDS; 0,05 % bromfenolová modř). Vzniklá suspenze byla několikrát po sobě (celkem po dobu 1 h) roztřepána a chlazená na ledu, nakonec centrifugována při 10 000 x g. Po extrakci byl vzorek inkubován po dobu 5 min při 100 °C v termobloku CH-100, Heating/Cooling Dry Block (Biosan, Litva). Takto zpracované spermie byly použity pro SDS-PAGE elektroforézu (kapitola 4.2.7, strana 37), nebo byly pro pozdější použití uchovávány v mrazicím boxu.

4.2.6.3 Extrakce proteinů (subproteom) ze spermie

Cílem metody byla extrakce proteinů z odlišných částí spermie a zjištění, zda se v těchto frakcích nacházejí proteiny hledané molekulové hmotnosti, která odpovídá jednotlivým typům estrogenových receptorů.

Peleta spermií o objemu 50 µl (5×10^7 buněk) byla zpracována pomocí komerčního kitu ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Merck, Německo) podle výrobcem přiloženého protokolu. Izolovány byly jednotlivé frakce spermií:

Frakce I – cytosolární proteiny

Frakce II – membránové proteiny

Frakce III – jaderné proteiny

Frakce IV – cytoskeletální proteiny

4.2.6.4 Imunoprecipitace ERs pomocí specifických protilátek

Lyzát proteinů extrahovaných z ejakulovaných spermií pomocí 1 % Tritonu v 50 mM Tris.HCl, pH 7,8 a 30 mM KCl byl inkubován se specifickými protilátkami proti ERs (ER α (HC-20), ER β (1531) a GPR30 (K-19-R)) přes noc v lednici při 4 °C. Druhý den bylo k lyzátu přidáno 50 μ l proteinu A/G na agarózových kuličkách (Protein A/G PLUS-Agarose Immunoprecipitation Reagent: sc-2003; Santa Cruz Biotechnology, USA). Při průběžném protřepávání vzorků probíhala inkubace (2 h) v termostatu při 37 °C. Vzorek byl poté odstředěn během 5 min při 1000 x g a 4 °C. Získaná peletka byla opakovaně promyta v PBS-T (PBS s 0,05 % Tweenem 20). Poté byl k peletce přidán redukující vzorkový pufr (2 % SDS v 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 5 % merkptoetanol, bromfenolová modř), vzorek byl promíchán, 5 min povařen, rozřepán a stočen 5 min při 1000 x g a 4 °C. Supernatant byl použit pro SDS-PAGE elektroforézu.

4.2.7 SDS-PAGE elektroforéza – jednosměrná elektroforéza v polyakrylovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (dle Laemmli, 1970)

Dodecylsírán sodný (SDS) je detergent, který uděluje proteinům uniformní záporný náboj. Díky tomuto náboji jsou proteiny od sebe separovány v polyakrylamidovém gelu podle své molekulové hmotnosti. Elektroforetické dělení bylo provedeno za účelem kontroly úspěšnosti extrakce proteinů, pro elektropřenos a následnou imunodetekci estrogenových receptorů na nitrocelulóзовé membráně.

Elektroforéza probíhala v aparatuře Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad, USA). Pomocí SDS-PAGE byly separovány extrahované proteiny. Byl použit 12 % a 15 % separační gel a zaostřovací 4 % gel. Molekulová hmotnost separovaných proteinů byla určena porovnáním s barevnými molekulovými proteinovými standardy Precision Plus Protein Standards All Blue (Bio-Rad, USA) nebo Standard Dual Xtra Standards (Bio-Rad, USA).

Příprava 12/15 % separačního gelu:

2,5 ml / 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) (Bio-Rad, USA)

4,0 ml / 5,0 ml 30 % akrylamid (Bio-Rad, USA)

3,5 ml / 2,5 ml destilovaná H₂O

100 μ l 10 % SDS (dodecylsírán sodný; P-Lab, ČR)

4,5 µl TEMED (tetramethylethan-1,2-diamin; GE Healthcare, Švédsko)

70 µl APS (10 % persíran amonný; Merci, ČR)

Separací gel byl nalit mezi skleněné desky a poté na něj byla navrstvena destilovaná voda. Po přibližně 40 min, během nichž proběhla polymerace gelu, byla destilovaná voda odstraněna a místo ní navrstven zaostřovací gel.

Příprava 4 % zaostřovacího gelu:

1,52 ml destilovaná H₂O

625 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) (Bio-Rad, USA)

325 µl 30 % akrylamid

25 µl 10 % SDS

3,8 µl TEMED

35 µl 10 % APS

Pro vytvoření jamek v zaostřovacím gelu byl ihned po jeho nalití použit 10 nebo 15-jamkový hřeben. Po polymeraci gelu (asi 20 min) byl hřeben odstraněn a do jamek byly nanášeny vzorky pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky. Objem nanášených vzorků do jednotlivých jamek byl 8 - 20 µl (jednotlivé vzorky spermatických buněk obsahovaly ekvivalent $5 \times 10^7 / 150$ µl). Vzorky proteinů pro elektroforetické rozdělení byly připraveny v neredukujícím/redukujícím vzorkovém pufru. Elektroforéza probíhala nejdříve po dobu přibližně 30 min při napětí 80 V, posléze asi hodinu při napětí 140 V. Pro odečet přibližné molekulové hmotnosti byly použity předbarvené molekulové standardy Precision Plus Protein™ Dual Color (Bio-Rad, USA).

4.2.7.1 Vizualizace proteinů v polyakrylovém gelu pomocí barvení Coomassie Brilliant Blue

Po elektroforéze byl gel odebrán ze skel sestavy a propláchnut destilovanou vodou. Pro vizualizaci proteinů po SDS elektroforéze bylo využito modré barvivo Coomassie Brilliant Blue (CBB R-250; Sigma-Aldrich, USA) (0,25 g CBB; 45 ml metanol; 9 ml kyselina octová; 45 ml destilovaná H₂O), které se váže na proteiny v polyakrylamidovém gelu. Barvení probíhalo minimálně 1 h a následně byl gel opakovaně promyt odbarvovacím roztokem (250 ml metanol, 100 ml kyselina octová, 650 ml destilovaná H₂O). Po odmytí přebytečného

CBB zůstala místa v gelu, kde jsou separované proteiny, označena viditelnými modrými proužky.

4.2.7.2 Vizualizace proteinů v polyakrylovém gelu pomocí barvení stříbrem

Pro lepší vizualizaci separovaných proteinů v polyakrylamidovém gelu byla další variantou metoda barvení stříbrem, která je citlivější. Principem vizualizace proteinů je vazba kationtů stříbra na -SH a -COOH funkční skupiny některých aminokyselin. Po redukcí na kovové stříbro jsou místa obsahující proteiny v gelu značena tmavými proužky.

Po proběhlé elektroforéze byl gel odebrán ze skel sestavy a propláchnut destilovanou vodou. Následovala jeho fixace v roztoku (25 ml metanol, 12 ml kyselina octová, doplnění do 50 ml destilovanou H₂O) přes noc při 4 °C.

Po fixaci byl gel inkubován:

3 x 20 min ve 50 % etanolu (Penta, ČR)

1 min v roztoku Na₂S₂O₃ · 5 H₂O (0,02 g/100 ml) (P-Lab, ČR)

3 x 20 s v destilované vodě

20 min v roztoku AgNO₃ (0,1 g AgNO₃ – Penta, ČR, 37,5 µl 37 % formaldehydu – Lach-Ner, ČR, doplněno do 50 ml destilované H₂O)

2 x 20 s v destilované vodě

Vizualizace (doba do objevení barevných změn je přibližně 10 min) probíhala v roztoku Na₂CO₃: 3 g Na₂CO₃ (P-Lab, ČR), 25 µl 37 % formaldehydu, doplněno do 50 ml destilovanou H₂O a poté následovalo promytí v destilované vodě 2 x 2 min. Na závěr byla reakce zastavena promytím po dobu přibližně 10 min v roztoku 25 ml metanolu s 6 ml kyseliny octové (Lach-Ner, ČR) doplněného do 50 ml destilovanou vodou.

4.2.8 Elektropřenos proteinů separovaných SDS elektroforézou na nitrocelulózovou membránu (Western blot)

Elektropřenos (Western blot) proteinů separovaných pomocí SDS-PAGE na nitrocelulózovou (NC) membránu byl využit pro následnou detekci proteinů v extraktu z tkání nebo spermií pomocí specifických protilátek.

Gel byl po elektroforéze přiložen na NC-membránu (GE Healthcare Amersham Hybond-ECL, USA) a pomocí soustavy filtračních papírů, porézních houbiček a perforované dvojdestičky byl vytvořen sendvič, který byl vložen do elektroforetické aparatury (Bio-Rad, USA). Nádoba sestavy byla naplněna blotovacím pufrem (10 x TG Buffer, Bio-Rad, USA) 10x ředěným s 20 % metanolu. Přenos proteinů z gelu na NC-membránu probíhal po dobu přibližně jedné hod při proudu 0,5 A. NC-membrána byla následně použita pro imunodetekci proteinů.

4.2.8.1 Vizualizace proteinů na nitrocelulózové membráně pomocí barvení Ponceau

Po přenosu proteinů na nitrocelulózovou membránu byla zkontrolována účinnost přenosu a přítomnost proteinů v dostatečné koncentraci v jednotlivých vzorcích pomocí barvení Ponceau S red (0.1 % Ponceau S v 5 % kyselině octové; Sigma Aldrich, USA). Barvení pomocí Ponceau S z NC-membrány bylo poté odstraněno promytím destilovanou vodou a následně roztokem PBS.

4.2.9 Imunodetekce ERs na NC-membráně

Detekce sledovaných proteinů byla prováděna na NC-membráně pomocí specifických protilátek. Po elektropřenosu proteinů rozdělených SDS-elektroforézou na NC-membránu následovala deaktivace volných vazebných míst na povrchu membrány 5 % roztokem sušeného mléka (Blocking agent, Bio-Rad, USA) v PBS (přes noc při 4 °C). Po opakovaném promytí membrány PBS s 0,05 % Tweenem 20 (PBS-T) byly použity primární protilátky proti ERs (polyklonální a monoklonální protilátky, Santa Cruz Biotechnology, USA; Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24) ředěné v PBS (1 : 500/1 : 250). Po inkubaci přes noc při 4 °C a následném promytí membrány PBS-T byly přidány příslušné sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24) ředěné v PBS. Po inkubaci 1 h při laboratorní teplotě a opakovaném promytí PBS-T po dobu 1 h následovala detekce proteinů buď vizuálně pomocí roztoku substrátu TMB (Thermo Fisher Scientific, USA) nebo metodou chemiluminiscence se substrátem Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fischer Science, USA) při použití přístroje Azure c600 Gel Imaging System (Sierra Ct, USA).

Kvantifikace imunodetekce byla podrobena denzitometrické analýze v programu Image Studio Digits Ver 4.0 (LI-COR, USA). Signál protilátky byl vztažen k celkové koncentraci proteinu ve vzorcích podle barvení Ponceau.

4.2.10 Extrakce RNA a PCR spojená s reversní transkripcí (RT-PCR)

4.2.10.1 Optimalizace PCR (Polymerase Chain Reaction)

Za použití Hybrid RTM (GeneAll Biotechnology, Co., Ltd., Korea) byla z určeného objemu spermií a tkání (tkáň a spermie z hlavy, těla a ocasu nadvarlete, tkáň varlete) podle pokynů výrobce izolována celková RNA a byla fluorometricky (Qubit 3.0, Invitrogen, Thermofisher) kvantifikována. Vlákně cDNA bylo syntetizováno z RNA za použití HyperScriptTM (GeneAll Biotechnology). Amplifikace cDNA byla provedena pomocí specifického kódujícího a reverzního primeru (GPER1 [Sus scrofa] kódující: 5'CTGAGCTICAAGGCCGATGT3' a reverzní: 5'CCCTTAAGTAGGCGCAGAGC3'; GenBank accession: NC_010445.4) pocházejícího z prasečí sekvence GPER. Amplifikace byla prováděna při počáteční teplotě 95 °C po dobu 5 min, následovalo 35 cyklů při 94 °C po 1 min, žíhací teplota 70 °C po 45 sek, 72 °C po dobu 1 min a terminální amplifikace při 72 °C po 5 min v PCR Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Produkty PCR byly zpracovány při elektroforéze v 1,5 % agarózovém gelu a vizualizovány barvením ethidium bromidem.

4.2.10.2 Kvantitativní PCR (qRT-PCR)

Stejně primery jako při optimalizaci PCR byly použity také při qRT-PCR. Materiál získaný při PCR byl 5 x zředěn a použit jako templát pro zhotovení standardní křivky. Pro zajištění opakovatelnosti experimentů byly všechny vzorky zhotoveny v 9 replikacích. Při spuštění qRT-PCR bylo použito 2 µl jednovláknového cDNA templátu, 7,75 µl deionizované vody, 0,25 M kódujícího a reverzního primeru a 10 µl 1 x SYBR Green Supermix (Bio Rad, USA). Teplotní podmínky cyklů byly: 2 min při 50 °C, 10 min při 95 °C, následovalo 45 cyklů 30 sek při 95 °C, 30 sek při 70 °C a 45 sek při 70 °C. Na konci byla vytvořena gradientová křivka od 65 °C do 95 °C při zvyšování teploty o 0.5 °C po 5 sek. Experimenty byly prováděny pomocí CFX ConnectTM, Real-Time System (Bio-Rad, USA).

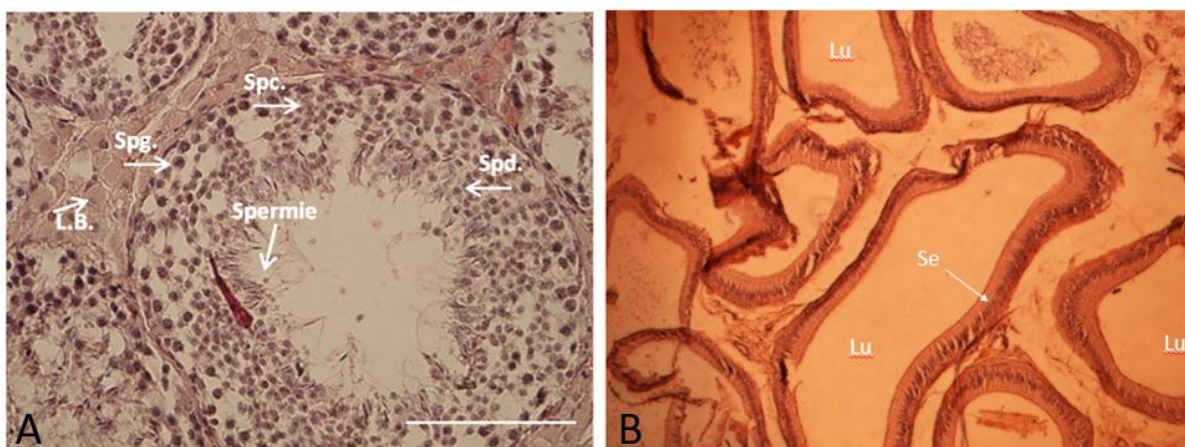
GAPDH referenční gen (kódující: 5'ACCCAGAAGACTGTGGATGG3' a reverzní 5'ACGCCTGCTTCACCACCTTC3') pocházející z prasečí sekvence (GenBank accession No. AF017079; [Gunawan et al., 2011]) byl použit pro normalizaci výsledků. Finální výsledky byly uvedeny jako míra relativního množství po normalizaci s hladinou exprese mRNA referenčního genu.

Data získaná RT-qPCR byla analyzována pomocí programu STATISTICA 12 (StatSoft, Česká republika) jednofaktorové analýzy rozptylu ANOVA s post-hoc Tukeyovým testem.

5 Výsledky

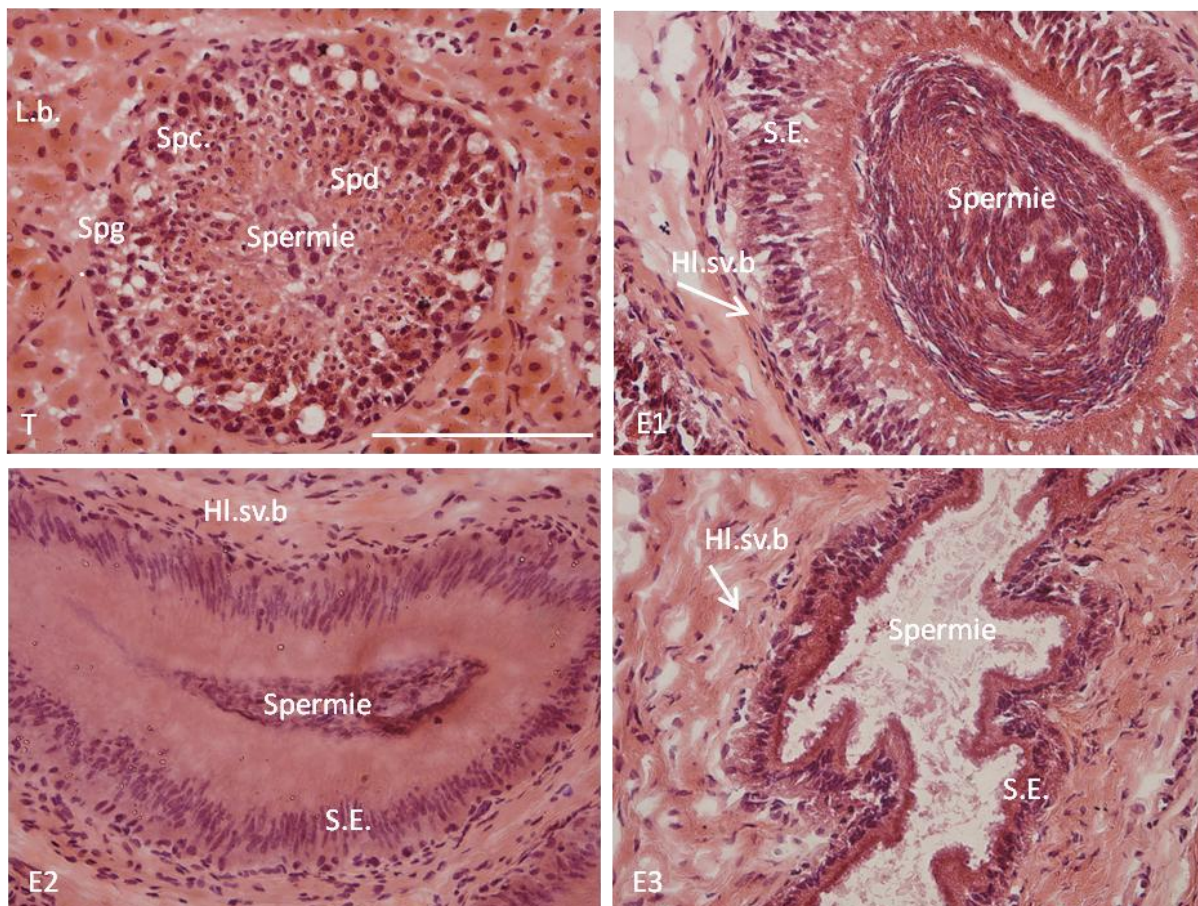
5.1 Histologické preparáty varlat a nadvarlat

Z tkáně varlat a nadvarlat byly zhotoveny parafínové histologické preparáty (kapitola 4.2.1.1, strana 25) a obarveny základním přehledným barvením hematoxylinem a eosinem (kapitola 4.2.1.2, strana 26), (obrázek 2). Tkáň varlete a zejména nadvarlete se při krájení parafínových bločků štěpila, proto parafínové řezy pro zpracování dalšími metodami (detekce ERs metodou peroxidázového barvení, kapitola 4.2.2.1, strana 26) nebyly použity a výchozím materiálem pro detekci a lokalizaci ERs ve tkáních se staly kryořezy.



Obrázek 2: (A) Parafínový řez varlete (barvení hematoxylin-eosin); L.B. Leydigovy buňky, Spg. spermatogonie, Spc. spermatocyty, Spd. spermatidy; zvětšení 400x, měřítko 100 μ m; (B) Parafínový řez ocasu nadvarlete (barvení hematoxylinem a eosinem), poškozená struktura tkáně; Se sekreční epitel, Lu lumen kanálku; zvětšení 100x.

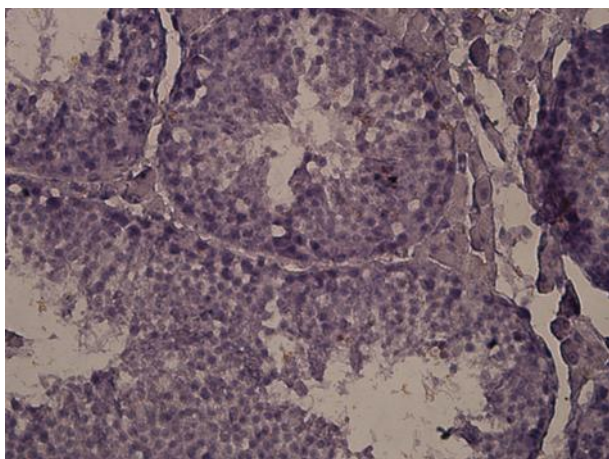
Kryořezy byly vytvořeny z tkáně varlat i nadvarlat (kapitola 4.2.1.1, strana 25). Po obarvení hematoxylinem a eosinem (kapitola 4.2.1.2, strana 26) byly použity pro základní morfologickou orientaci (obrázek 3). Ve tkáni varlete (T) je semenotvorný kanálek s různými stádii vyvíjejících se spermií, uvolňujících se do jeho lumen. Kanálek je obklopen intersticiální tkání se zřetelně obarvenými Leydigovými buňkami. Na řezech tkání hlavy, těla a ocasu nadvarlete (E1-E3) jsou v lumen kanálku viditelné spermie, stěna kanálku je tvořena sekrečním epitelem s vnější vrstvou hladkosvalových buněk.



Obrázek 3: Morfologie tkání testes (T), hlavy (E1), těla (E2) a ocasu (E3) epididymu na kryořezech, barvení hematoxylinem a eosinem: L.b. Leydigovy buňky, Spg. spermatogonie, Spc. spermatocyty, Spd. spermatidy, spermie; Hl.sv.b. hladkosvalové buňky, S.E. sekreční epitel; zvětšení 400x; měřítko 100 μ m.

5.2 Imunolokalizace estrogenových receptorů ve tkáních varlat, nadvarlat a epididymálních spermích

Pro imunodetekci ERs ve tkáni varlete a nadvarlete byly určeny parafínové řezy a kryořezy. Parafínové řezy byly zpracovány metodou peroxidázového barvení (kapitola 4.2.2.1, strana 26). Princip hodnocení imunodetekce ERs: pozitivním značením je hnědé zbarvení signalizující reakci antigenu s protilátkou, negativní nereagující okrsky preparátu jsou zbarvené modře. Na parafínových řezech se nepodařilo peroxidázovým barvením získat specifické výsledky, proto s ohledem na problémy s kvalitou řezů byly nadále pro detekci ERs jen kryořezy tkání (obrázek 4, strana 43).



Obrázek 4: Tkáň varlete s peroxidázovým barvením. Řez tkáně je nepřehledný, při peroxidázovém barvení není viditelné specifické značení ERs; zvětšení 400x.

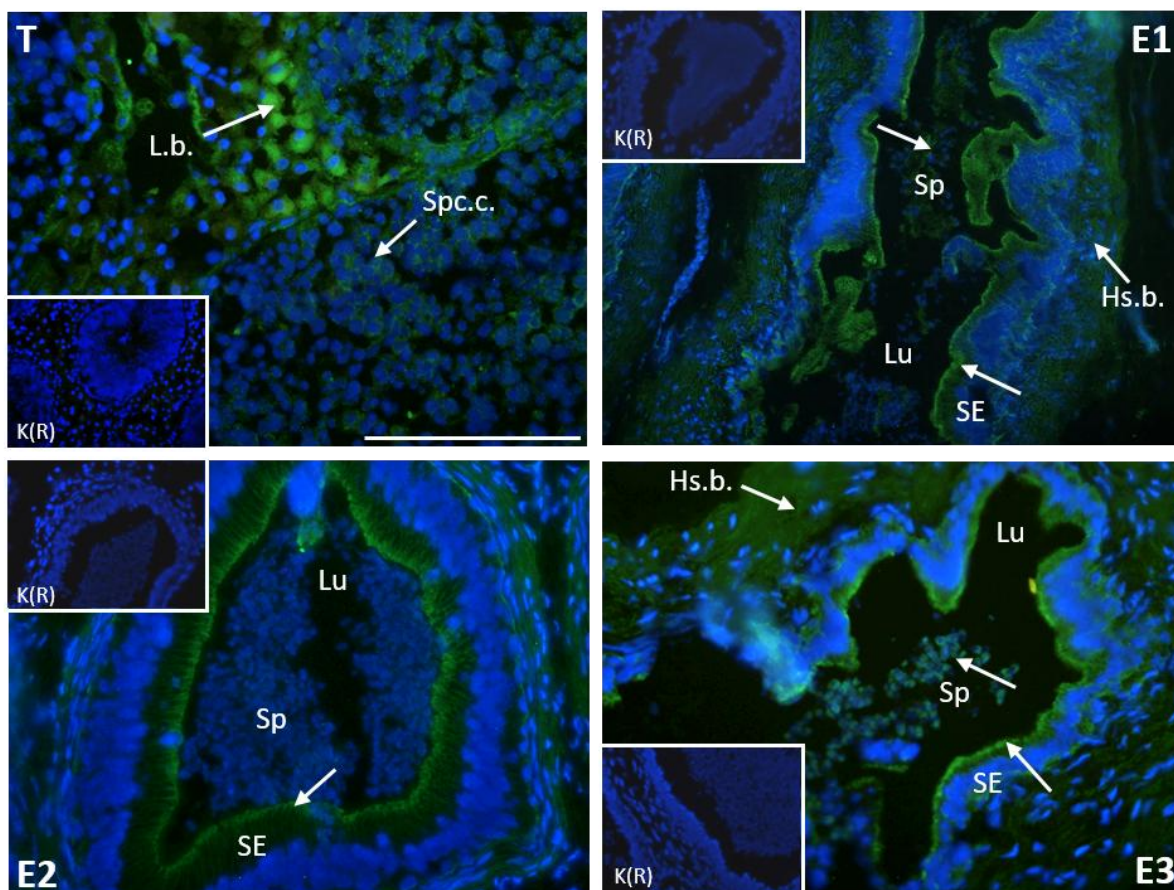
Pro lokalizaci ERs v kryořezech tkání varlat a nadvarlat (kapitola 4.2.1.1, strana 25) i spermií izolovaných z jednotlivých částí kanálku nadvarlete fixovaných na skle pomocí vlhké fixace (kapitola 4.2.3.2, strana 29) byla zvolena imunofluorescenční metoda (kapitola 4.2.2.2, strana 27). Vyzkoušeli jsme specifické primární protilátky proti jednotlivým estrogenovým receptorům GPR30 (K-19-R), GPR30 (H-300), ER α (HC-20), ER α (C-311), ER β (1531), ER β (L-20) (Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24). Spolehlivě značily protilátky GPR30 (K-19-R), ER α (HC-20) a ER β (1531). Jako negativní kontrola ve tkáních i spermiích byla pro protilátky GPR30 (K-19-R) a ER α (C-311) použita sekundární protilátka proti králičím IgG (anti-R), negativní kontrolou pro protilátku anti- ER β (1531) byla sekundární protilátka proti myším IgG (anti-M).

Výsledky duálního značení a detekce jednotlivých typů spermatických buněk nejsou uvedeny, protože metodika (kapitola 4.2.2.3, strana 28) nebyla plně optimalizována a vývojová stádia spermií se nám zvolenými specifickými protilátkami nepodařilo detekovat. Zvolené protilátky (Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24) jsou specifické proti uvedeným stádiím spermií, avšak byly ověřeny pouze na myších spermiích. Pro model prasete pravděpodobně nejsou vhodné.

5.2.1 Lokalizace membránového estrogenového receptoru GPER ve tkáni varlat, nadvarlat a epididymálních spermích

K lokalizaci receptoru GPER byla ve tkáni varlat použita specifická králičí polyklonální protilátka GPR30 (K-19-R). Protilátkové značení je viditelné v cytoplazmě Leydigových buněk a ve spermatických buňkách zárodečného epitelu. Pozitivní signál byl detekován i u spermíí v kanálku, avšak v rámci buňky nebylo možné signál přesněji lokalizovat (obrázek 5; T, strana 45).

Na kryořezech zhotovených z tkáně nadvarlete byl estrogenový receptor GPER pomocí protilátky GPR30 (K-19-R) lokalizován ve všech jeho částech, v hlavě (E1), těle (E2) i ocasu (E3). V hlavě nadvarlete (obrázek 5; E1, strana 45) byl pozitivní signál pro GPER detekován v bazální membráně sekrečního epitelu a ve spermích uvnitř kanálku. Slabší intenzity byl signál v hladkosvalových buňkách vně bazální membrány. V těle epididymu (obrázek 5; E2, strana 45) bylo výrazné značení nalezeno v bazální membráně sekrečního epitelu kanálku. Slabší byl signál v myoidních buňkách. U spermíí v kanálku těla nadvarlete bylo zbarvení velmi slabé až negativní. Signál pro receptor GPER byl detekován rovněž v kryořezech tkáně ocasu nadvarlete (obrázek 5; E3, strana 45), a to zejména v membráně sekrečního epitelu kanálku a v hladkosvalových buňkách vně bazální membrány. Signál byl zachycen také ve spermích uvnitř kanálku, pravděpodobně se jednalo o oblast akrozomu spermie.



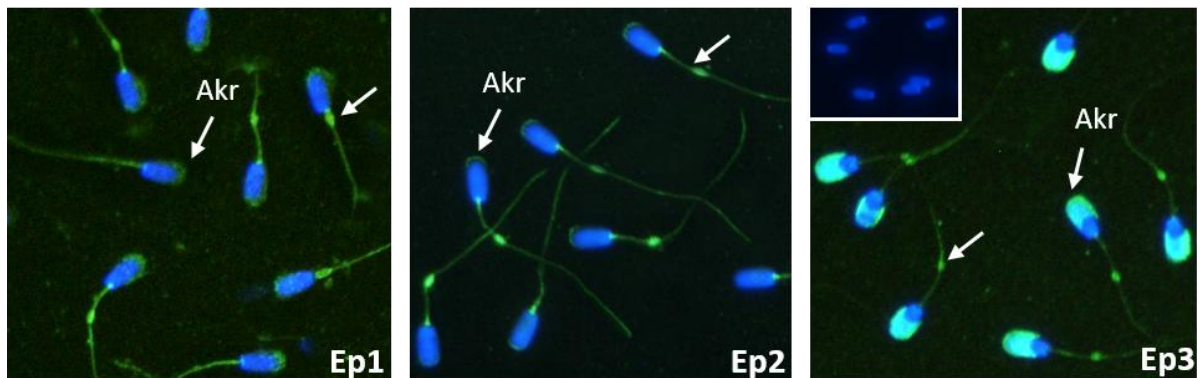
Obrázek 5: Lokalizace receptoru GPER ve varlatech a nadvarlatech: byla použita primární protilátka GPR30 (K-19-R) ředěná 1 : 100 a sekundární protilátka proti králičím IgG konjugovaná s FITC, ředěná 1 : 500; T – varle, E1 – hlava nadvarlete, E2 – tělo nadvarlete, E3 – ocas nadvarlete; L.b. Leydigovy buňky, Spc.c. spermatické buňky, SE sekreční epitel, Lu lumen kanálku, Sp spermie, Hs.b. hladkosvalové buňky; zelené značení (FITC) – imunofluorescence přítomná při reakci protilátky s GPER; modrá barva (DAPI) – obarvení buněčných jader; šipky označují protilátkové značení; negativní kontroly K(R), kdy byla použita pouze sekundární protilátka proti králičím IgG, jsou umístěny v rozích snímků; zvětšení 400x; měřítko 100 μ m.

Varle (T): šipky označují detekci GPER v Leydigových buňkách (L.b.) a spermatických buňkách (Spc.c.)

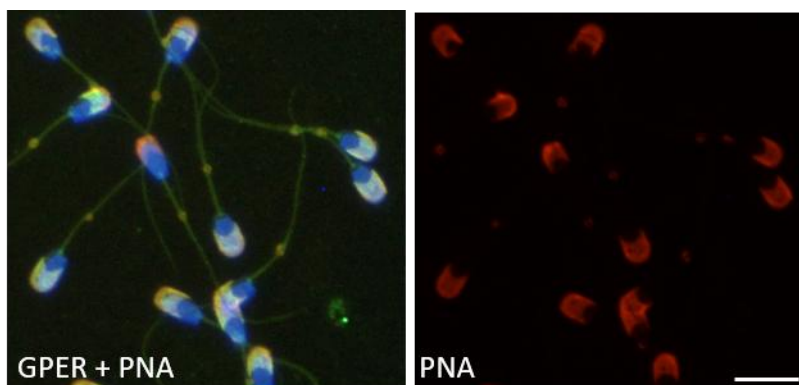
Nadvarle (E): E1 - šipky značí detekci GPER v místě sekrečního epitelu (SE) a ve spermích (Sp); E2 - šipky značí detekci GPER v místě sekrečního epitelu (SE), spermie (Sp) jsou negativní; E3 - šipky značí detekci GPER v místě sekrečního epitelu (SE) a ve spermích (Sp)

Receptor GPER byl lokalizován pomocí stejné polyklonální protilátky (K-19-R) jako ve tkáních také ve spermích izolovaných ze všech tří hlavních částí nadvarlete. Slabé značení korespondující s GPER proteinem bylo nalezeno v bičíku spermii izolovaných ze všech zkoumaných částí nadvarlete (hlava, tělo, ocas) (obrázek 6, strana 46). U většiny spermii z uvedených částí epididymu byla vyšší intenzita protilátkového značení v oblasti krčku

a v cytoplazmatických kapkách ve střední části. Ve spermiiích izolovaných z hlavy nadvarlete bylo navíc zachyceno slabě difúzní značení v akrozomu (obrázek 6; Ep1). U spermiiích z těla nadvarlete bylo imunofluorescenční značení koncentrováno pouze v apikální oblasti hlavičky spermie (obrázek 6; Ep2). U spermiiích izolovaných z ocasu nadvarlete byl zřetelný pozitivní nález značení protilátkou GPER v celé oblasti akrozomu (obrázek 6; Ep3 a obrázek 7). Na epididymálních spermiiích byla prokázána integrita akrozomu pomocí vazby lektinu PNA na vnější akrozomální membránu spermiiích (obrázek 7; příklad epididymálních spermiiích z ocasu nadvarlete).



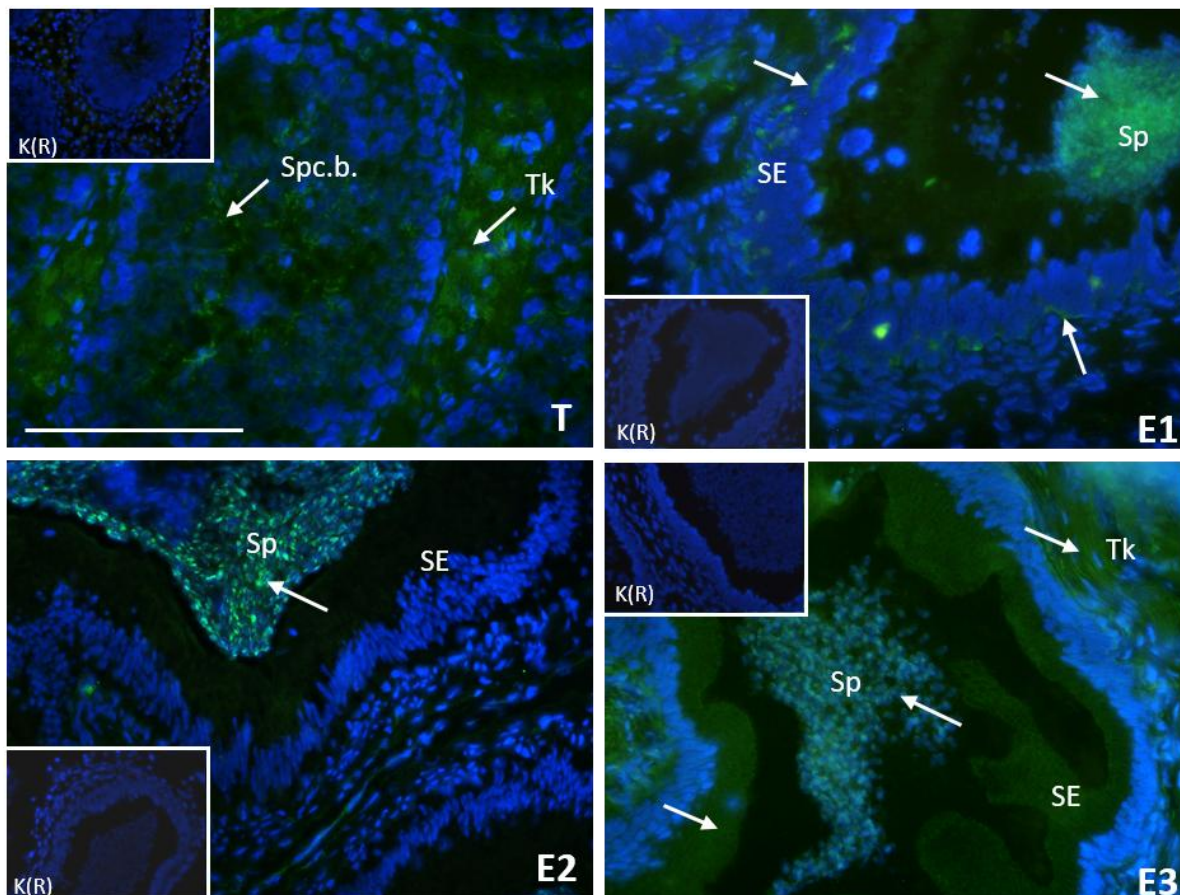
Obrázek 6: Spermie izolované z hlavy (Ep1), těla (Ep2) a ocasu (Ep3) nadvarlete. Byla použita primární protilátka GPER30 (K-19-R) ředěná 1 : 100 a sekundární protilátka proti králičím IgG konjugovaná s FITC, ředěná 1 : 500; zelené zbarvení (FITC) označuje pozitivní signál protilátky rozponávající GPER. Šipky označují pozitivní reakci s protilátkou ve střední části bičíku a akrozomu (Akr); negativní kontrola (inkubace pouze se sekundární protilátkou proti králičím IgG) je připojena v rohu snímku; měřítko 10 μ m.



Obrázek 7: Spermie izolované z ocasu nadvarlete. Na levém obrázku je zřetelný signál (FITC) GPER v oblasti akrozomu; obrázek spermiiích vznikl překrytím buňky s obarveným jádrem (DAPI), fluorescenčním zbarvením (FITC) v místě reakce protilátky s GPER a červeným zbarvením (PNA) v oblasti akrozomu. Červené zbarvení (PNA) akrozomu prokazuje jeho neporušenou integritu (pravý obrázek); měřítko 10 μ m.

5.2.2 Lokalizace estrogenového receptoru ER α ve tkáni varlat, nadvarlat a epididymálních spermích

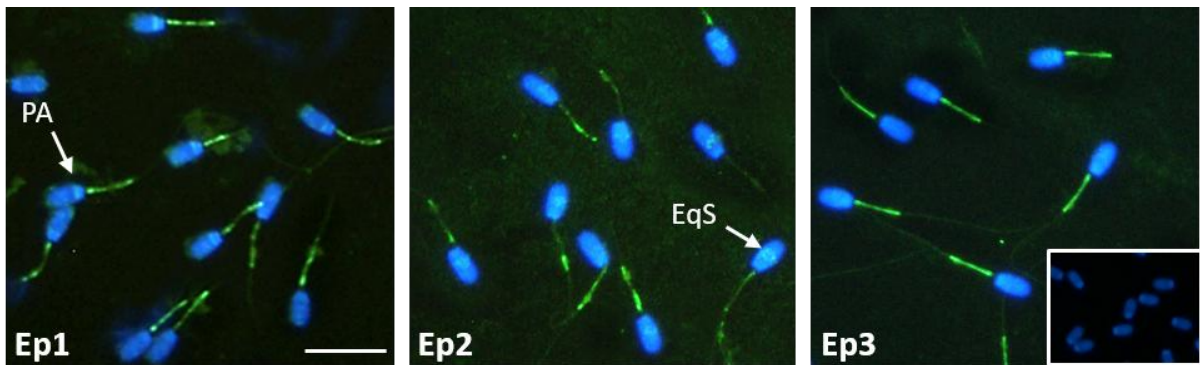
Receptor ER α byl detekován pomocí králičí polyklonální protilátky anti-ER α (HC-20) v intersticiální tkáni varlete, jedná se patrně o cytoplazmu Leydigových buněk. Signál byl viditelný i u spermíí uvnitř semenotvorných kanálků varlete (obrázek 8; T, strana 48). Přesnější lokalizaci v rámci spermatické buňky nebylo možné provést. V jednotlivých úsecích tkáně nadvarlete, to znamená v hlavě (E1), těle (E2), ocasu (E3), se lokalizace receptoru ER α lišila. V hlavě epididymu (obrázek 8; E1, strana 48) bylo pozitivní značení viditelné v bazální membráně, středně výrazný signál byl také v sekrečním epitelu kanálku. Výrazné pozitivní značení bylo detekováno u spermatických buněk v kanálku nadvarlete. V těle nadvarlete (obrázek 8; E2, strana 48) bylo pozitivní značení detekováno v sekrečním epitelu kanálku, a to zejména v hlavních buňkách. Přítomnost ER α byla zachycena i v intersticiální tkáni, pravděpodobně se jedná převážně o hladkosvalové buňky obklopující bazální membránu. Pozitivní byly i spermie v lumen kanálku. Na preparátu z ocasu nadvarlete (obrázek 8; E3, strana 48) bylo pozitivní značení detekováno jako velmi výrazné především v hlavních buňkách sekrečního epitelu kanálku, pozitivní byla i tkáň (pravděpodobně hladkosvalové buňky) a spermie uvnitř kanálku.



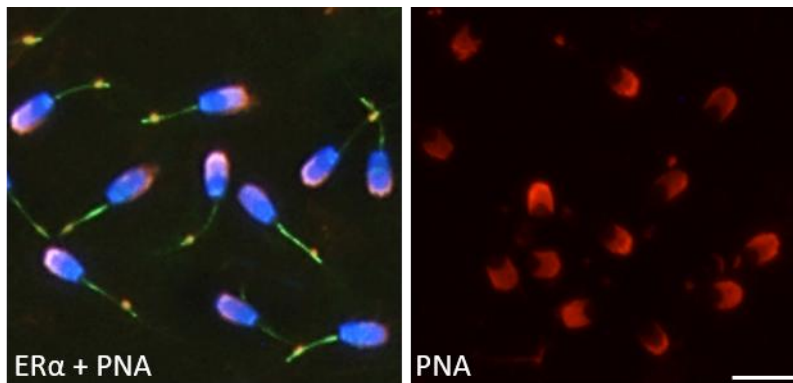
Obrázek 8: Lokalizace ER α : v tkáni testes (T): byla použita primární protilátka ER α (HC-20) ředěná 1 : 50 a sekundární protilátka proti králičím IgG konjugovaná s FITC, ředěná 1 : 500; šipky značí detekci receptoru ER α v místě spermatických buněk (Spc.b.) a v intersticiální tkáni (Tk); v tkáni hlavy nadvarlete – E1: šipky značí detekci receptoru ER α v sekrečním epitelu (SE) a spermiích (Sp); v tkáni těla nadvarlete – E2: šipka značí detekci receptoru ER α ve spermiích (Sp), sekreční epitel (SE) je negativní; lokalizace v tkáni ocasu nadvarlete – E3: šipky značí detekci receptoru ER α ve spermiích (Sp), v sekrečním epitelu (SE) a tkáni (Tk); negativní kontroly K(R), kdy byla použita pouze sekundární protilátka proti králičím IgG, jsou připojeny v rozích snímků; zvětšení 400x; měřítko 100 μ m.

Ve spermatických buňkách ze všech tří oblastí nadvarlete (obrázek 9, strana 49) bylo detekováno značení ER α pomocí králičí polyklonální protilátky anti-ER α (HC-20) ve střední části bičíku. U spermií izolovaných z hlavy nadvarlete bylo navíc detekováno slabší značení v postakrozomální oblasti (PA) hlavičky. Spermie z těla nadvarlete měly slabší signál pro ER α v ekvatoriálním segmentu (EqS) hlavičky spermie. Ve spermiích z ocasu nadvarlete mimo signál ve střední části bičíku žádné další značení detekováno nebylo. Jako negativní kontrola byla použita sekundární protilátka proti králičímu IgG (anti-R). U spermií izolovaných z ocasu nadvarlete byl zřetelný pozitivní nález fluorescenčního značení

protilátkou ER α ve střední části bičíku spermie (obrázek 9; Ep3 a obrázek 10). Na pravém obrázku (obrázek 10) je červeně (PNA) viditelný neporušený akrozom.



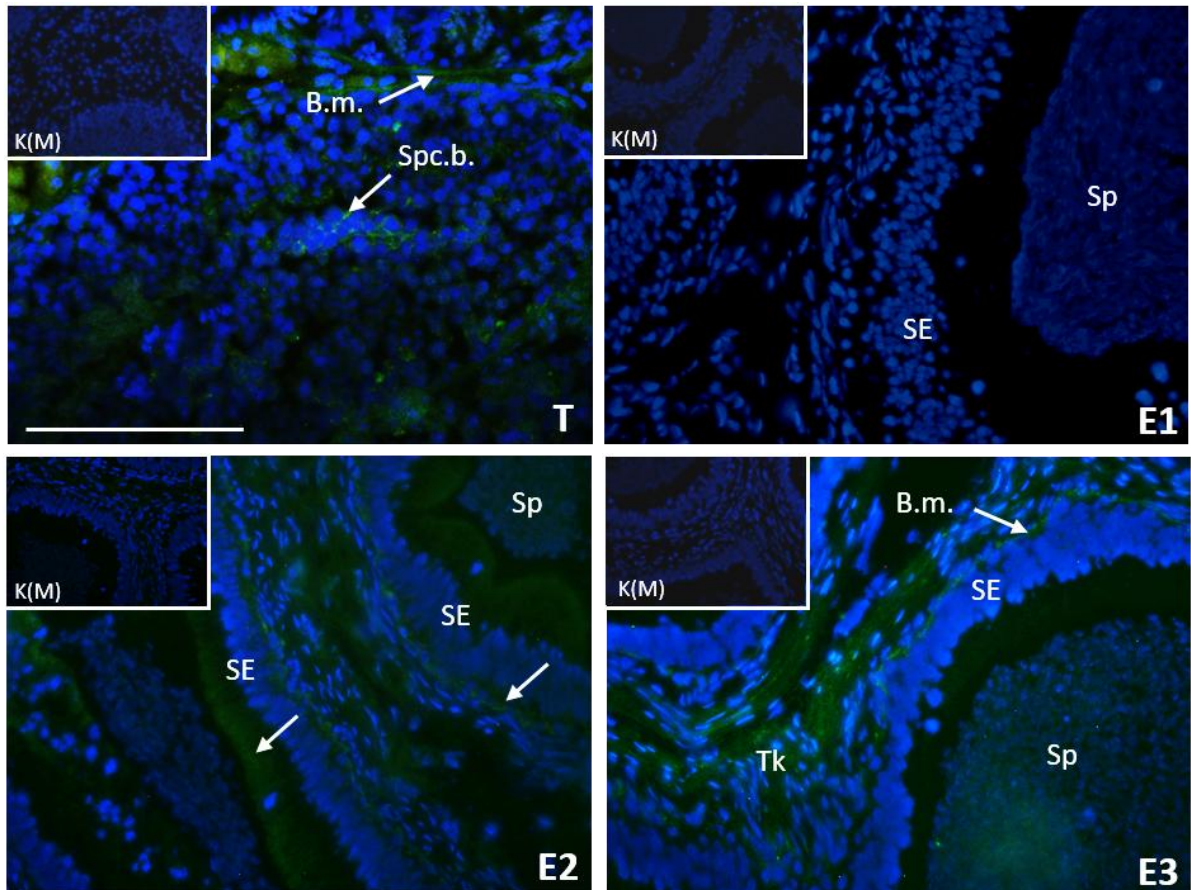
Obrázek 9: Lokalizace receptoru ER α v epididymálních spermích z jednotlivých úseků nadvarlete – hlavy (Ep1), těla (Ep2) a ocasu (Ep3); byla použita primární protilátka ER α (HC-20) ředěná 1 : 100 a sekundární protilátka proti králičím IgG konjugovaná s FITC, ředěná 1 : 500; šipky značí detekci receptoru ER α v regionech spermatické buňky: PA – postakrozomální region, EqS – ekvatoriální segment; pozitivní signál byl nalezen ve střední části bičíku u spermii ze všech tří částí nadvarlete; negativní kontrola (inkubace pouze se sekundární protilátkou proti králičím IgG) je připojena v rohu snímku Ep3; měřítko 10 μ m.



Obrázek 10: Spermie z ocasu nadvarlete. Na levém obrázku je zřetelný signál (FITC) ER α ve střední části bičíku spermie. Obrázek vznikl překrytím spermatické buňky s obarveným jádrem (DAPI), fluorescenčním zbarvením (FITC) v místě reakce protilátky ER α (HC-20) s ER α a červeným zbarvením (PNA) v oblasti akrozomu. Na pravém obrázku je červeně zbarvený (PNA) akrozomu, je důkazem jeho neporušenosti; měřítko 10 μ m.

5.2.3 Lokalizace ER β ve tkáni varlat a nadvarlat ve tkáni varlat, nadvarlat a epidymálních spermích

Výrazné pozitivní značení myší monoklonální protilátkou anti-ER β (1531) (obrázek 11, strana 51) bylo ve tkáni varlat detekované v bazální membráně (B.m.) semenotvorného kanálku a ve spermatických buňkách (Spc.b.) v lumen stočených kanálků. V rámci spermatické buňky nebylo možné přesnější lokalizaci signálu určit. Estrogenový receptor ER β jsme v hlavě nadvarlete nedetkovali. V těle nadvarlete bylo pozitivní značení zřetelné v sekrečním epitelu, zejména v cytoplazmě hlavních buněk. Spermie v lumen kanálku byly negativní. V ocasu nadvarlete bylo slabší pozitivní imunofluorescenční značení detekováno v hlavních buňkách sekrečního epitelu, středně pozitivní signál byl v bazální membráně a u spermii v uvnitř kanálku epididymu.



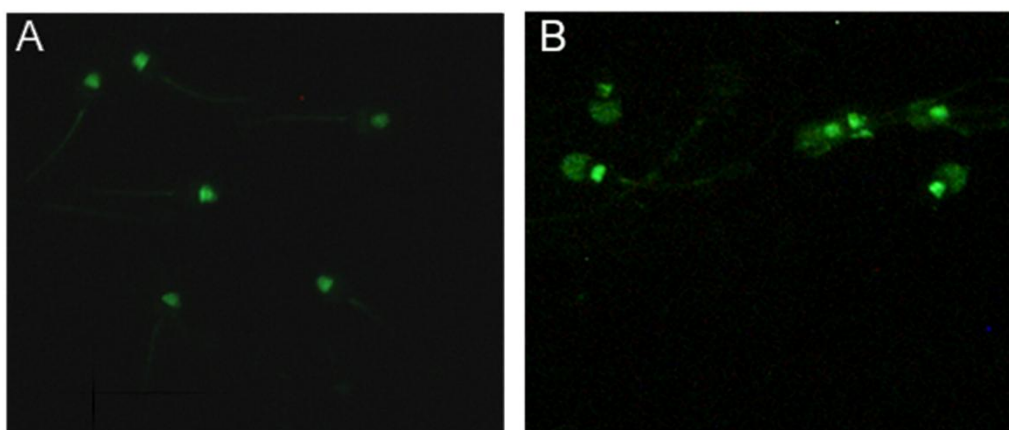
Obrázek 11: Lokalizace ER β : byla použita primární protilátka ER β (1531) ředěná 1 : 50 a sekundární protilátka proti myším IgG konjugovaná s FITC, ředěná 1 : 300; ve tkáni testes (T): šipky značí detekci receptoru ER β v místě spermatických buněk (Spc.b) a v bazální membráně (B.m.); ve tkáni hlavy nadvarlete – E1: signál pro ER β není; ve tkáni těla nadvarlete – E2: šipka značí detekci receptoru ER β v sekrečním epitelu (SE), spermie v lumen kanálku byly negativní; lokalizace v tkáni ocasu nadvarlete – E3: šipky značí detekci receptoru ER β v oblasti sekrečního epitelu (SE), v bazální membráně (B.m.) a u spermií v lumen kanálku (Sp); negativní kontroly jsou připojeny v rozích snímků; Zvětšení 400x, měřítko 100 μ m.

U spermií izolovaných z jednotlivých úseků nadvarlete se estrogenový receptor ER β detekovat nepodařilo. Byly opakovaně použity protilátky ER β (1531) a ER β (L-20) v různých variantách ředění, avšak viditelné pozitivní protilátkové značení nebylo získáno ani u jedné.

5.3 Imunolokalizace ERs v ejakulovaných a kapacitovaných spermích a spermích po akrozomální reakci

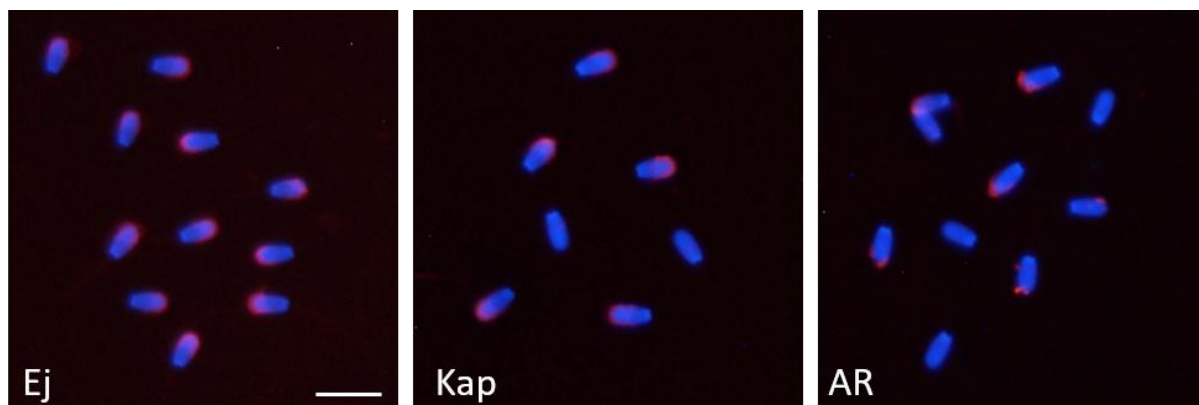
5.3.1 Hodnocení kapacitace a akrozomální reakce spermíí

Kapacitovaný stav spermíí byl sledován pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie s využitím primární protilátky proti fosfotyrozinu a sekundární protilátky s navázaným fluoroforem (kapitola 4.2.4.1, strana 30). Z celkového množství suspenze spermíí prošlo kapacitací přibližně 80 % spermatických buněk (obrázek 12). K významné fosforylaci tyrozinových zbytků proteinů došlo v oblasti akrozomu.



Obrázek 12 : (A) nekapacitované spermie, (B) kapacitované spermie; zvětšení 400x. Protilátka proti fosfotyrozinu značí u ejakulované spermie v postakrozomální oblasti trojúhelníkový tvar (Obrázek A). U kapacitované spermie je pomocí protilátky navíc značena oblast akrozomu (Obrázek B).

Akrozomální reakce *in vitro* kapacitovaných spermíí byla hodnocena na základě intaktního akrozomu pomocí vazby lektinu PNA na struktury akrozomální membrány (kapitola 4.2.4.3, strana 31). Velká většina ejakulovaných spermíí měla prokazatelně nepoškozený akrozom (obrázek 13; Ej, strana 53). Asi u 10 % spermatických buněk po *in vitro* kapacitaci byla zanedána absence akrozomu, kdy pravděpodobně proběhla spontánní akrozomální reakce (obrázek 13; Kap, strana 53). U některých spermíí po indukci akrozomální reakce je viditelná ztráta akrozomu (obrázek 13; AR, strana 53). Akrozomální reakce proběhla přibližně u 60 % buněk z původního celkového množství spermíí v suspenzi.



Obrázek 13: Hodnocení integrity akrozomu pomocí vazby s PNA lektinem; Ej – ejakulované spermie, u spermií je červeně zbarvený zachovaný akrozom; Kap – kapacitované spermie, akrozom u většiny spermií zůstal neporušený; AR – bez akrozomu jsou spermie po akrozomální reakci, u některých spermií je viditelný poškozený akrozom ve tvaru artefaktů; zvětšení 400x; měřítko 10 μ m;

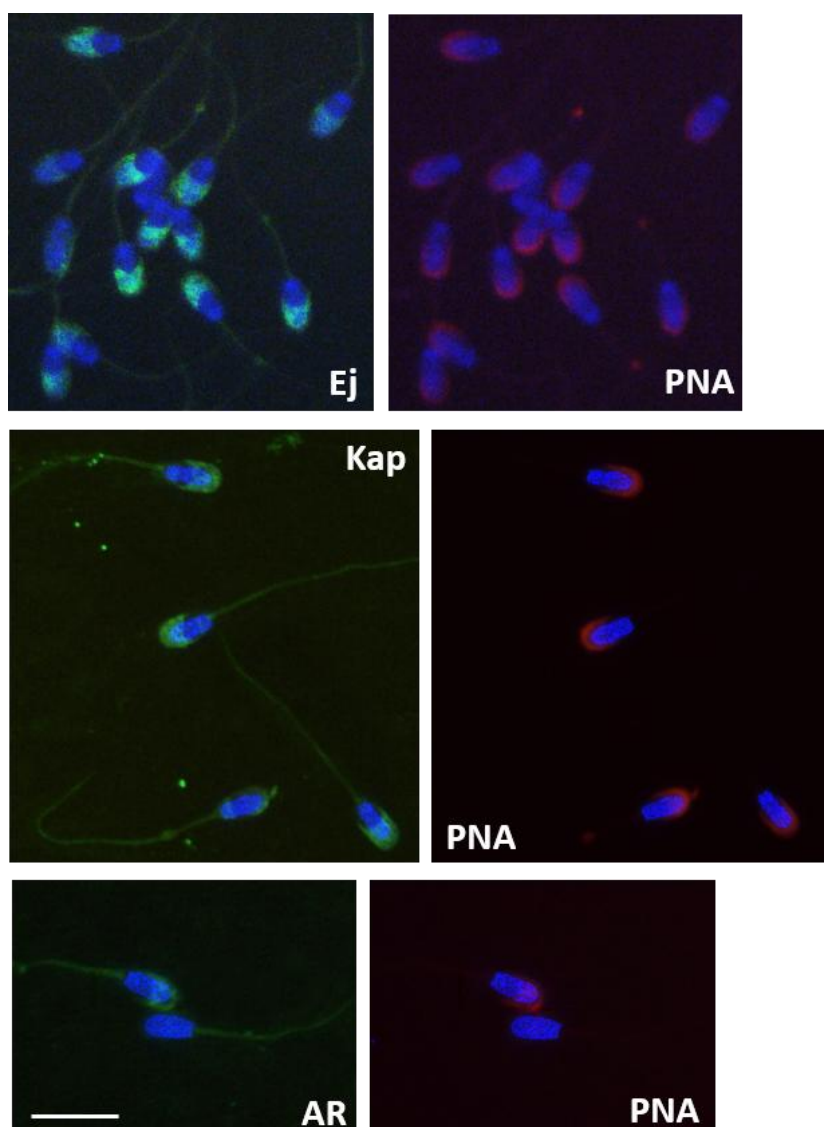
5.3.2 Imunolokalizace receptoru GPER v ejakulovaných a kapacitovaných spermích a spermích po akrozomální reakci

U ejakulovaných spermií (obrázek 14; Ej, strana 54) zpracovaných metodou vlhké fixace (kapitola 4.2.3.2, strana 29) a následně imunofluorescenční metodou (kapitola 4.2.4, strana 32) při použití primární polyklonální protilátky GPR30 (K-19-R) byl viditelný fluorescenční signál v oblasti akrozomu u většiny spermií. Kontrola stavu akrozomu byla provedena pomocí PNA lektinu značeného rhodaminem (obrázek 14 vpravo - červená barva).

Kapacitované spermie (obrázek 14; Kap, strana 54) zpracované stejně jako ejakulované spermie metodou vlhké fixace a nepřímé imunofluorescence při použití primární protilátky GPR30 (K-19-R) rozpoznávající estrogenový receptor GPER měly pozitivní značení v oblasti akrozomu, u některých spermií spíše v jeho apikální části. Velmi slabé difúzní značení bylo rovněž viditelné v bičíku spermie. Kontrola stavu akrozomu byla provedena pomocí PNA lektinu značeného rhodaminem (obrázek 14 vpravo - červená barva).

U spermií po akrozomální reakci (obrázek 14; AR, strana 54) zpracované stejně jako ejakulované spermie metodou vlhké fixace a nepřímé imunofluorescence byl slabší pozitivní signál patrný v bičíku spermie. Kontrola stavu akrozomu byla provedena pomocí vazby PNA lektinu na membránu akrozomu, značení akrozomu bylo negativní u spermií, u kterých

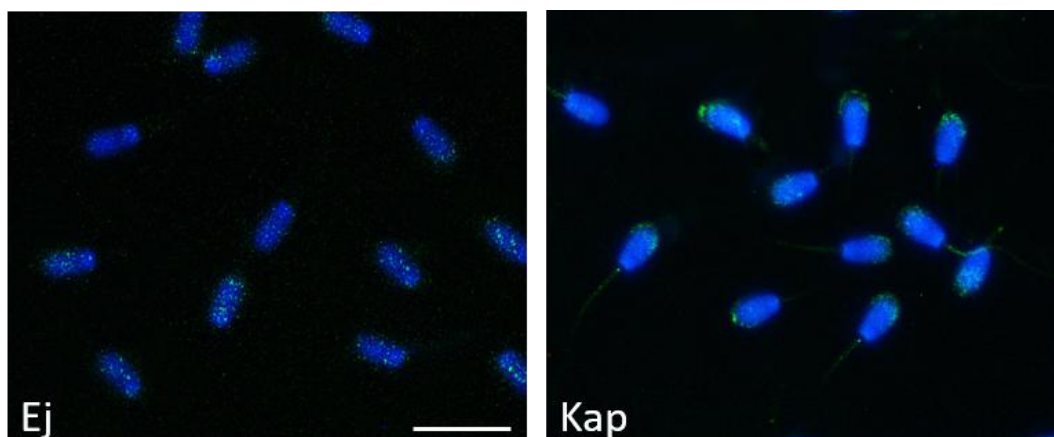
proběhla akrozomální reakce. Na pravém obrázku je spermie s chybějícím akrozomem po proběhlé akrozomální reakci, u druhé spermie jsou viditelné označené akrozomální artefakty.



Obrázek 14: Detekce receptoru GPER u spermií zpracovaných vlhkou fixací na skle; byla použita primární protilátka GPR30 (K-19-R) ředěná 1 : 50 a sekundární protilátka proti králičím IgG konjugovaná s FITC, ředěná 1 : 300; Ej – ejakulované spermie; Kap – kapacitované spermie; AR – spermie po akrozomální reakci; integrita akrozomu byla sledována pomocí vazby PNA lektinu (červeně) na akrozomální membránu; zvětšení 400x; měřítko 10 μ m.

Detekce receptoru GPER byla provedena i u spermií v suspenzi (kapitola 4.2.4.2, strana 33) (obrázek 15, strana 55). U ejakulovaných spermií je patrné difúzní protilátkové značení v oblasti hlavičky (obrázek 15; Ej, strana 55). Kapacitované spermie v suspenzi mají

pozitivní protilátkové značení receptoru GPER v oblasti akrozomu ve formě drobných okrsků. (obrázek 15; Kap). Kontrola bez inkubace s primární protilátkou byla negativní.

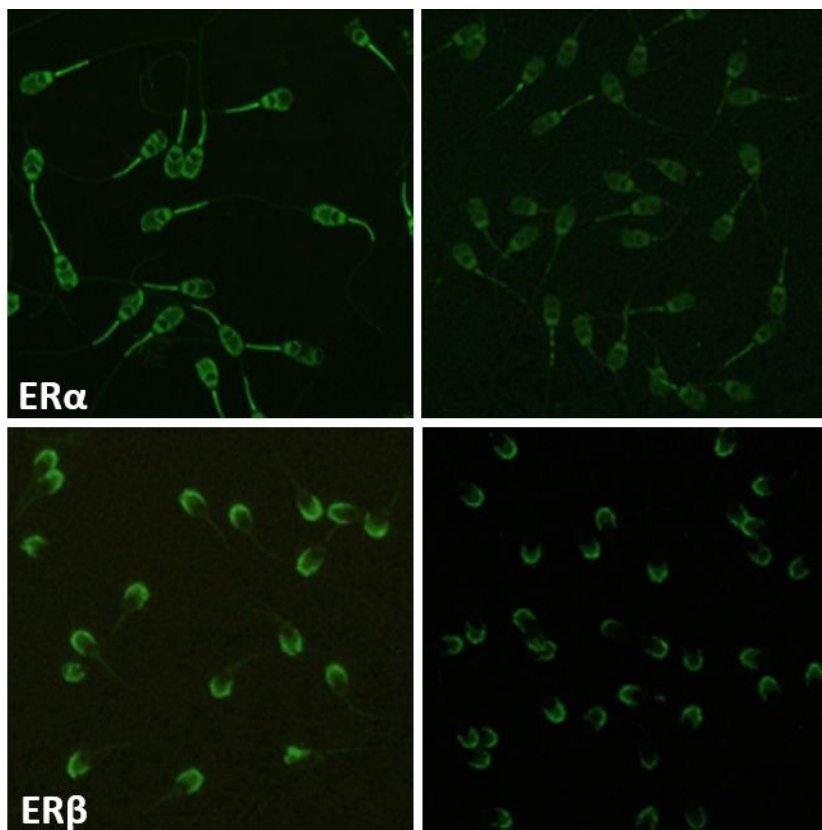


Obrázek 15: Detekce receptoru GPER u spermií v suspenzi; byla použita primární protilátka GPR30 (K-19-R) ředěná 1 : 100 a sekundární protilátka proti králičím IgG konjugovaná s FITC, ředěná 1 : 400; Ej – ejakulované spermie; Kap – kapacitované spermie; ejakulované spermie – difúzní značení v celé hlavičce, po kapacitaci je vidět konkrétnější protilátkové značení GPER v akrozomu; zvětšení 400x; měřítko 10 μ m.

5.4 Imunolokalizace receptoru ER α a ER β u ejakulovaných spermií

Viditelné imunofluorescenční protilátkové značení (kapitola 4.2.4.2, strana 32) u kančích ejakulovaných spermií zasušených na podložním skle (kapitola 4.2.3.2, strana 29) pro receptor ER α bylo pomocí polyklonální protilátky ER α (HC-20) (Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24) detekováno v oblasti akrozomové čepičky, postakrozomové oblasti a také ve střední části bičíku (obrázek 16; ER α vlevo, strana 56). Imunofluorescenční značení na spermiích ošetřených metanolem (kapitola 4.2.3.2, strana 30) na podložním skle pro receptor ER α bylo (použita stejná polyklonální protilátka) viditelně slabší (obrázek 16; ER α vpravo, strana 56). Pro receptor ER β bylo dosaženo pomocí monoklonální protilátky ER β (1531) (Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24) výrazné imunofluorescenční značení v ejakulovaných spermiích zasušených na podložním skle (kapitola 4.2.3.2, strana 29) v akrozomální čepičce hlavičky spermií (obrázek 16; ER β vlevo, strana 56). Také u spermií zasušených na skle a následně ošetřených metanolem (kapitola 4.2.3.2, strana 30) při použití stejné primární protilátky ER β (1531) bylo značení detekováno v akrozomální oblasti hlavičky spermie, ale signál byl o poznání slabší (obrázek 16; ER β vpravo, strana 56).

U negativních kontrol, kdy byl roztěr spermií inkubován pouze s příslušnou sekundární protilátkou, nebyla pozorována žádná imunofluorescence (data nejsou ukázána).

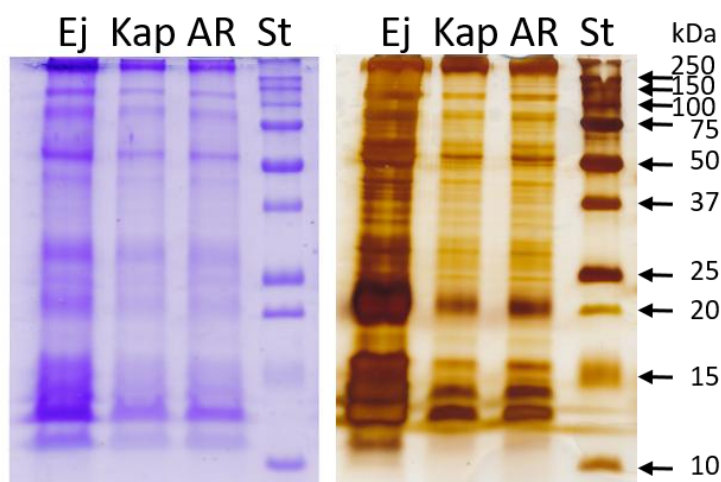


Obrázek 16: Imunofluorescenční značení $ER\alpha$ (horní řada obrázků); použita byla primární protilátka $ER\alpha$ (HC-20) v ředění 1:100 a sekundární protilátka proti králičím IgG konjugovaná s FITC v ředění 1:200; na levém obrázku jsou spermie zasušené na skle, na pravém obrázku fixované metanolem; zvětšení 400x.

Imunofluorescenční značení $ER\beta$ (dolní řada obrázků); byla použita primární protilátka $ER\beta$ (1531) v ředění 1:100 a sekundární protilátka proti myším IgG konjugovaná s FITC v ředění 1:200; na levém obrázku jsou spermie zasušené na skle, na pravém obrázku fixované metanolem; zvětšení 400x.

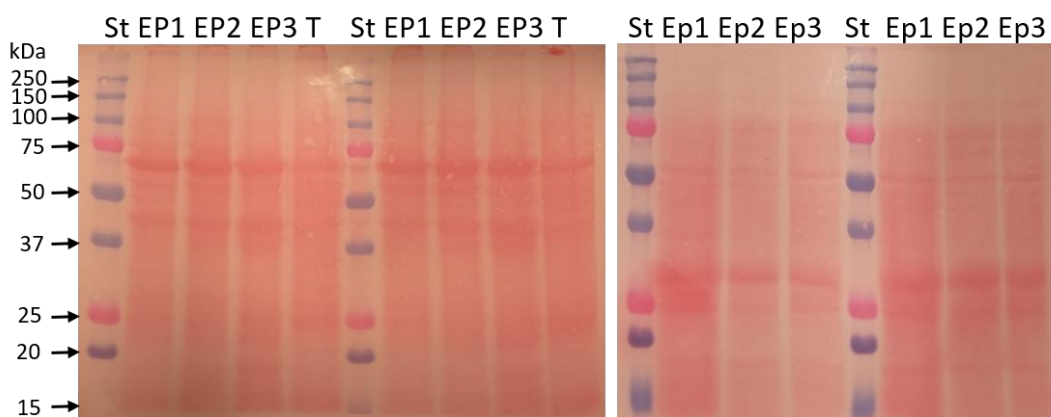
5.5 Izolace a separace proteinů z tkání a spermií

Pro kontrolu dostatečného množství proteinů obsažených ve vzorcích spermií byla provedena jejich vizualizace v gelu barvením CBB (kapitola 4.2.6.1, strana 36) a stříbrem (kapitola 4.2.6.2, strana 37) (obrázek 17, strana 57). Ve všech vzorcích bylo pro jejich přípravu použito stejné množství spermatických buněk. U vzorků kapacitovaných spermií a spermií po akrozomální reakci je viditelný úbytek proteinů.



Obrázek 17: Vizualizace separace proteinů podle jejich molekulové hmotnosti v 15% polyakrylovém gelu po SDS elektroforéze pomocí barvení CBB (levý obrázek) a stříbra (pravý obrázek). Šipky ukazují hodnoty molekulární hmotnosti proteinových standardů; Ej – ejakulované spermie, Kap – kapacitované spermie, AR – spermie po akrozomální reakci, St – proteinové molekulové standardy.

Pro detekci ERs ve tkáni varlete (T) a jednotlivých částech nadvarlete (EP1-3) a ve spermích izolovaných ze tří hlavních částí nadvarlete (Ep1-3) byla provedena extrakce proteinů (kapitola 4.2.5.1, strana 33 a kapitola 4.2.5.2, strana 34). Proteiny byly separovány pomocí SDS elektroforézy (kapitola 4.2.6, strana 35) a přeneseny na NC-membránu (kapitola 4.2.7, strana 37). Poté byla provedena vizualizace proteinů barvením Ponceau (kapitola 4.2.7.1, strana 38) (obrázek 18).



Obrázek 18: Vizualizace proteinů po SDS elektroforéze ve 12% polyakrylamidovém gelu a elektropřenosu na NC-membránu pomocí barvení Ponceau S. Na levém obrázku jsou nanášky extraktů z tkáni hlavy (EP1), těla (EP2), ocasu (EP3) nadvarlete a z varlete (T). Na pravém obrázku jsou extrakty z epididymálních spermii izolovaných z hlavy (Ep1), těla (Ep2) a ocasu (Ep3) nadvarlete; St – proteinové molekulové standardy.

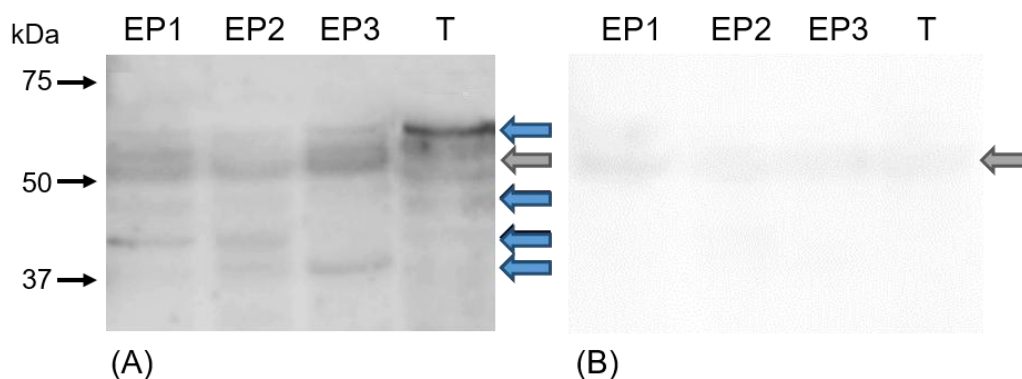
5.6 Detekce estrogenových receptorů v tkáni varlete a nadvarlete a spermiích

Sledované proteiny byly na NC-membráně detekovány pomocí specifických protilátek. Pro detekci proteinů estrogenových receptorů byly použity primární protilátky GPR30 (K-19-R), GPR30 (H-300), ER α (HC-20), ER α (C-311), ER β (1531), ER β (L-20) (Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24) v různém ředění; jako funkční se ukázaly být protilátky ER α (HC-20), ER β (1531) a GPR30 (K-19-R). Po inkubaci NC-membrány s primárními a poté sekundárními protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou (Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 25) byly příslušné ERs vizualizovány po aplikaci substrátu TMB (kapitola 4.2.8, strana 38) nebo metodou chemiluminiscence se substrátem ECL (kapitola 4.2.8, strana 38).

5.6.1 Detekce estrogenového receptoru GPER

V extraktech ze tkáně varlat se po vizualizaci proteinů podařilo pomocí specifické protilátky GPR30 (K-19-R) prokázat estrogenový receptor GPER. Protilátka označila dva proteinové pruhy. První byl výraznější, s molekulovou hmotností 38 kDa, druhý pruh byl výrazný méně a jeho molekulová hmotnost byla určena jako 48 kDa. Navíc se v extraktu ze tkáně varlat objevilo i další silné značení ve formě pruhu o molekulové hmotnosti 60 kDa (obrázek 19A; T, strana 59). Viditelný byl však i další difúzní pruh o molekulové hmotnosti přibližně 54 kDa. Tento pruh je patrný i v negativní kontrole a jedná se pravděpodobně o nespecifickou reakci s polyklonálním králičím antisérem (obrázek 19A a B; šedá šipka, strana 59).

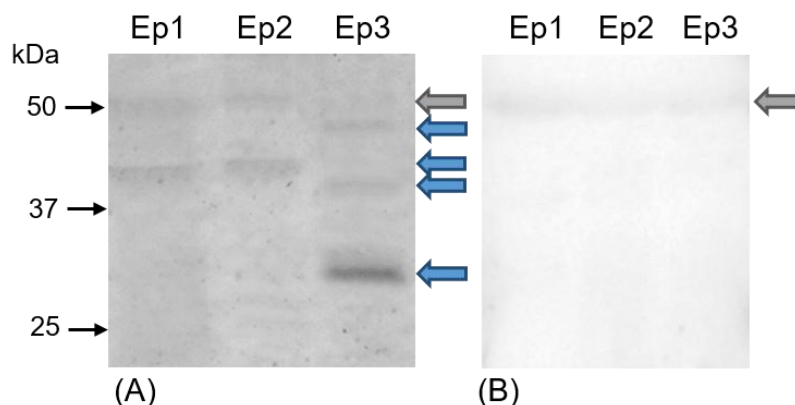
Protein GPER byl v extraktu z tkání nadvarlat detekován pomocí specifické protilátky GPR30 (K-19-R), která zřetelně značila proteinový proužek o molekulové hmotnosti 42 kDa v extraktu z tkáně hlavy (E1) a těla (E2) nadvarlete (obrázek 19A, strana 59). V extraktu z ocasu (E3) nadvarlete byl získán proužek o molekulové hmotnosti 38 kDa. Stejně jako v případě proteinového extraktu z tkání varlete byl přítomen ve všech třech oblastech nadvarlete proužek slabší intenzity o molekulové hmotnosti 60 kDa. U všech částí nadvarlete se také na nitrocelulóзовé membráně objevil proužek o molekulové hmotnosti 54 kDa. Jedná se patrně rovněž jako u varlat o nespecifickou reakci polyklonálního králičího antiséra použitého jako primární protilátka (obrázek 19A a B; šedá šipka).



Obrázek 19: Detekce GPER na NC-membráně v proteinových extraktech z kančích reprodukčních tkání: EP1 – hlava nadvarlete, EP2 – tělo nadvarlete, EP3 – ocas nadvarlete, T - varle; byla použita primární protilátka GPR30 (K-19-R) v ředění 1 : 500 a sekundární protilátka anti- R_G konjugovaná s křenovou peroxidázou, ředěná 1 : 3 000, vizualizace byla provedena pomocí ECL substrátu.

Obrázek A: reakce s polyklonální králičí protilátkou GPR30 (K-19-R), modré šipky ukazují specifické protilátkové značení receptoru GPER; Obrázek B: negativní kontrola s králičími imunoglobuliny. Šedá šipka ukazuje nespecifickou reakci.

Použitím specifické polyklonální protilátky GPR30 (K-19-R), rozpoznávající membránový estrogenový receptor GPER, se v extraktu spermií z hlavy (Ep1) a těla (Ep2) nadvarlete podařilo detekovat proužek o molekulové hmotnosti 42 kDa. V extraktu spermií z ocasu nadvarlete (Ep3) byly získány 2 pruhy o molekulární hmotnosti 38 a 48 kDa srovnatelné intenzity, navíc se ukázal jeden poměrně zřetelný proteinový proužek s hmotností 30 kDa (obrázek 20A, strana 60). Proteinový proužek o molekulové hmotnosti přibližně 52 kDa byl viditelný na membráně ošetřené primární protilátkou GPR30 (K-19-R) i na kontrolní membráně (obrázek 20 B, strana 60); pravděpodobně jedná o nespecifickou reakci s polyklonálním králičím antisérem.

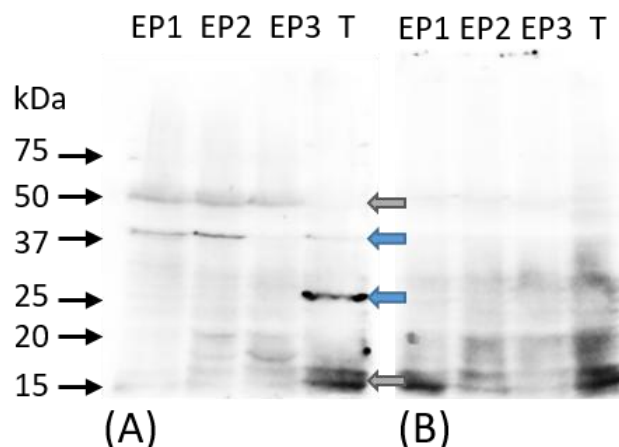


Obrázek 20: Detekce GPER na NC-membráně v proteinových extraktech z kančích epididymálních spermii izolovaných z jednotlivých úseků nadvarlete: Ep1 – hlava nadvarlete, Ep2 – tělo nadvarlete, Ep3 – ocas nadvarlete; byla použita primární protilátka GPR30 (K-19-R) v ředění 1 : 500 a sekundární protilátka anti- R_G konjugovaná s křenuvou peroxidázou, ředěná 1 : 3 000, vizualizace byla provedena pomocí ECL substrátu.

Obrázek A: reakce s polyklonální králičí protilátkou GPR30 (K-19-R), modré šipky ukazují specifické protilátkové značení receptoru GPER; Obrázek B: negativní kontrola s králičími imunoglobuliny. Šedá šipka ukazuje nespecifickou reakci.

5.6.2 Detekce estrogenových receptorů $ER\alpha$ a $ER\beta$

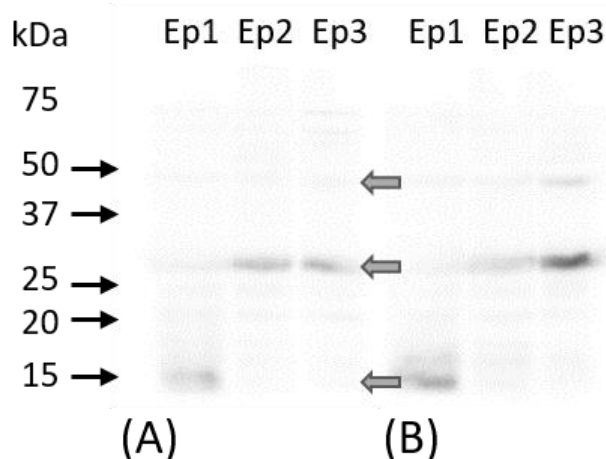
Pro detekci proteinu $ER\alpha$ v extraktech tkání varlat a nadvarlat byla použita protilátka $ER\alpha$ (HC-20) (Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24). Ve tkáni varlat (obrázek 21; T, strana 61) protilátka označila dva proteinové pruhy. Jeden přibližně o molekulové hmotnosti 27 kDa, druhý o molekulové hmotnosti 42 kDa. Detekovány byly také dva výrazné pruhy o nízké molekulové hmotnosti 15 a 16 kDa, které se objevily rovněž na kontrolní membráně (obrázek 21B, strana 61). Jedná se pravděpodobně o nespecifické vazby s králičími imunoglobuliny. V extraktech z tkáně nadvarlat se objevil viditelný proteinový pruh o molekulové hmotnosti 42 kDa v hlavě (EP1) a zejména v těle (EP2) nadvarlete, v extraktu z ocasu nadvarlete byl tento pruh velmi slabý (obrázek 21A, strana 61). V extraktu z tkáně nadvarlete a slabě i varlete se objevily pruhy o přibližné molekulární hmotnosti 50 kDa, stejné, ale slaběji viditelné pruhy jsou i na kontrolní membráně (obrázek 21B, strana 61). Jedná se pravděpodobně o nespecifické vazby.



Obrázek 21: Detekce receptoru ER α na NC-membrána v proteinových extraktech z kančích reprodukčních tkání: EP1 – hlava nadvarlete, EP2 – tělo nadvarlete, EP3 – ocas nadvarlete, T - varle; byla použita primární protilátka ER α (HC-20) v ředění 1 : 500 a sekundární protilátka anti-R $_G$ konjugovaná s křenovou peroxidázou ředěná 1 : 3 000, vizualizace byla provedena pomocí ECL substrátu.

Obrázek A: reakce s polyklonální králičí protilátkou ER α (HC-20), modré šipky ukazují specifické protilátkové značení receptoru ER α ; Obrázek B: negativní kontrola s králičími imunoglobuliny. Šedá šipka ukazuje nescifickou reakci.

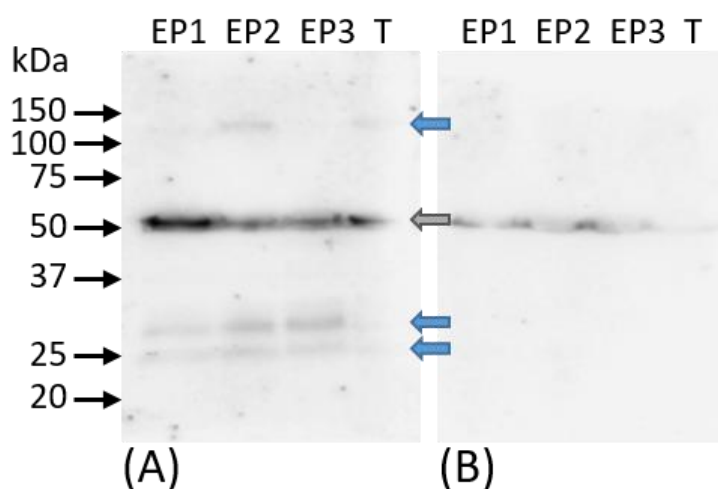
V extraktu spermií z hlavy, těla a ocasu nadvarlete se podařilo detekovat pouze proteinové proužky zároveň viditelné ve stejných vzorcích i na kontrolní membráně (obrázek 22). Pravděpodobně jedná o nescifickou reakci s polyklonálním králičím antisérem.



Obrázek 22: Detekce receptoru ER α na NC-membráně v proteinových extraktech z kančích epididymálních spermií izolovaných z jednotlivých úseků nadvarlete: Ep1 – hlava nadvarlete, Ep2 – tělo nadvarlete, Ep3 – ocas nadvarlete; byla použita primární protilátka ER α (HC-20) v ředění 1 : 500 a sekundární protilátka anti-R $_G$ konjugovaná s křenovou peroxidázou ředěná 1 : 3 000, vizualizace byla provedena pomocí ECL substrátu.

Obrázek A: reakce s polyklonální králičí protilátkou ER α (HC-20), šedé šipky ukazují nescifickou reakci; Obrázek B: negativní kontrola s králičími imunoglobuliny.

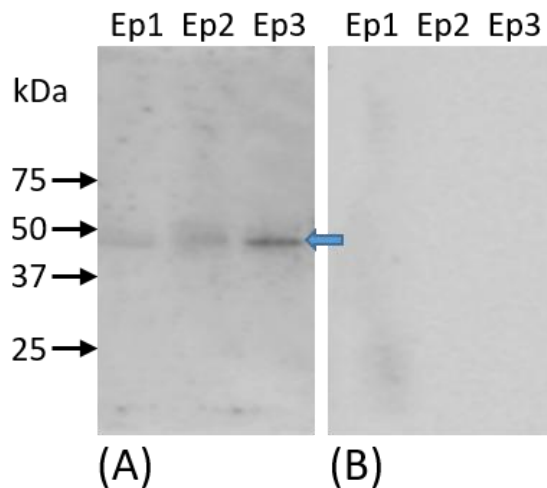
V extraktech z tkáně varlat a nadvarlat se podařilo pomocí specifické protilátky ER β (1531) (Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24) prokázat protein estrogenového receptoru ER β . Ve tkáni varlat (obrázek 23A) protilátka označila dva slabší proteinové pruhy o molekulové hmotnosti 25 a 28 kDa. Tato detekce byla viditelná také ve všech úsecích nadvarlete. Slabší reakce s protilátkou byla viditelná v extraktech z těla nadvarlete (EP2) a varlete (T) o přibližné molekulové hmotnosti 120 kDa. Výrazná reakce s protilátkou byla pozorována v extraktech ze všech tkáních o přibližné molekulové hmotnosti 52 kDa, které byly detekovány také v negativní kontrole (obrázek 23B; šedá šipka).



Obrázek 23: Detekce receptoru ER β na NC-membráně v proteinových extraktech z kančích reprodukčních tkání: EP1 – hlava nadvarlete, EP2 – tělo nadvarlete, EP3 – ocas nadvarlete, T – varle; byla použita primární protilátka ER β (1531) v ředění 1 : 500 a sekundární protilátka anti-M_G konjugovaná s křenuvou peroxidázou ředěná 1 : 3 000, vizualizace byla provedena pomocí ECL substrátu.

Obrázek A: reakce s monoklonální myší protilátkou ER β (1531), modré šipky ukazují specifické protilátkové značení receptoru ER β , šedá šipka ukazuje nespecifickou reakci; Obrázek B: negativní kontrola s myšími imunoglobuliny.

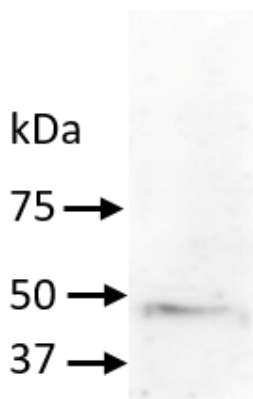
V extraktu spermií z hlavy, těla a ocasu nadvarlete se podařilo detekovat pouze jeden proteinový proužek o hmotnosti 48 kDa (obrázek 24, strana 63) odpovídající receptoru ER β , viditelný zejména v extraktu spermií z ocasu nadvarlete.



Obrázek 24: Detekce receptoru $ER\beta$ na NC-membráně v proteinových extraktech z kančích epididymálních spermií izolovaných z jednotlivých úseků nadvarlete: Ep1 – hlava nadvarlete, Ep2 – tělo nadvarlete, Ep3 – ocas nadvarlete; byla použita primární protilátka $ER\beta$ (1531) v ředění 1 : 500 a sekundární protilátka anti- M_G konjugovaná s křenovou peroxidázou ředěná 1 : 3 000, vizualizace byla provedena pomocí ECL substrátu.

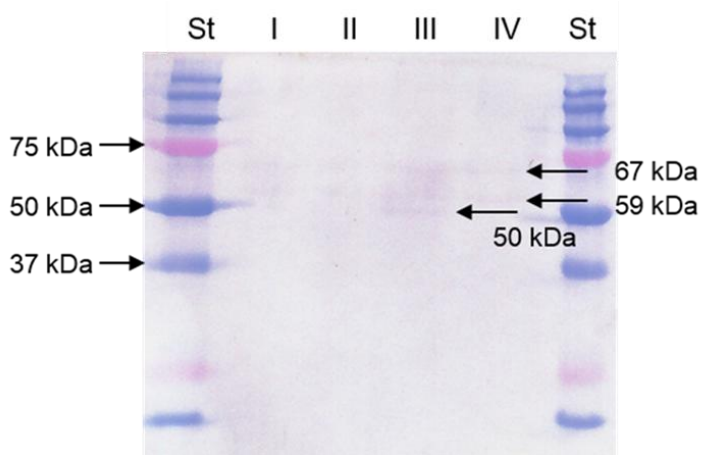
Obrázek A: reakce s monoklonální králičí protilátkou ($ER\beta$ (1531), modrá šipka ukazuje specifickou reakci; Obrázek B: negativní kontrola s myšími imunoglobuliny.

Na ejakulovaných spermiích bylo pozitivní fluorescenční značení receptorů $ER\alpha$ a $ER\beta$ zřetelné (obrázek 16, strana 56). V extraktu z ejakulovaných spermií se však protein receptoru $ER\alpha$ ani jednou z testovaných specifických protilátek [$ER\alpha$ (HC-20) a $ER\alpha$ (C-311)] identifikovat nepodařilo. Pomocí myší monoklonální protilátky $ER\beta$ (1531) byl na nitrocelulózkové membráně detekován zřetelně viditelný jediný proteinový proužek o molekulové hmotnosti 48 kDa je (obrázek 25).



Obrázek 25: Detekce receptoru $ER\beta$ na NC-membráně v proteinovém extraktu z kančích ejakulovaných spermií; byla použita primární protilátka $ER\beta$ (1531) v ředění 1 : 500 a sekundární protilátka anti- M_G konjugovaná s křenovou peroxidázou ředěná 1 : 3 000, vizualizace byla provedena pomocí ECL substrátu.

Pro detekci ER α v subcelulárních frakcích proteinů izolovaných z ejakulovaných kančích spermii (kapitola 4.2.5.3, strana 34) na nitrocelulózové membráně byla použita polyklonální králičí protilátka ER α (HC-20) (Seznam protilátek, kapitola 4.1.2, strana 24). Protein pro estrogenový receptor ER α o molekulové hmotnosti 67 kDa byl detekován ve všech frakcích (obrázek 26), nejvýraznější reakce byla viditelná ve frakci proteinů izolovaných z jádra buňky (III). Navíc však byl ve všech frakcích detekován i proužek o hmotnosti 59 kDa a v jaderné frakci ještě navíc protein o molekulové hmotnosti 50 kDa.



Obrázek 26: Detekce ER α v subproteomu ejakulovaných spermii prasete pomocí protilátky ER α (HC-20) v ředění 1 : 250) a sekundární protilátky anti-R O konjugované s křenovou peroxidázou (1 : 10 000, Amersham, UK). Vizualizace byla provedena pomocí substrátu TMB. Proteinové frakce z různých částí buňky: cytosolární (I), membránová (II), jaderná (III) a cytoskeletální (IV); St – předbarvené molekulové standardy.

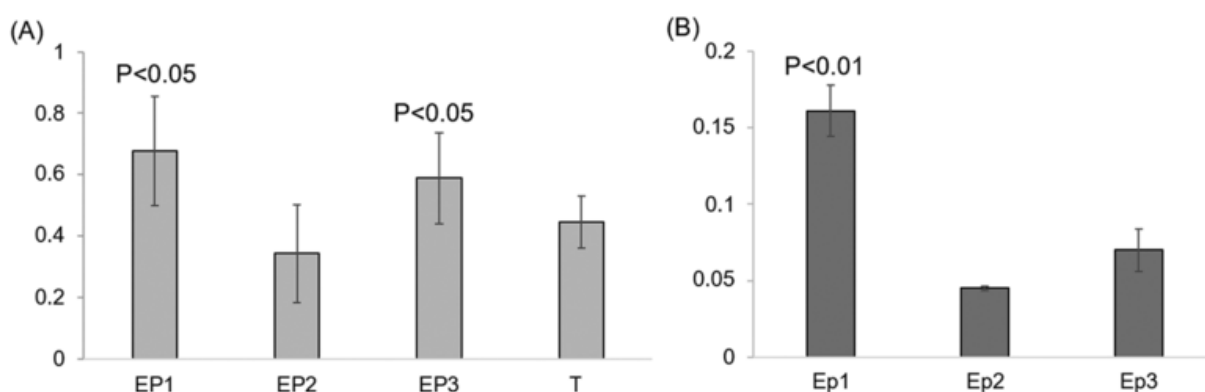
5.6.3 Imunoprecipitace proteinů ERs pomocí specifických protilátek

Byl připraven extrakt kančích ejakulovaných spermii, ve kterém byla provedena imunoprecipitace ERs pomocí specifických protilátek (kapitola 4.2.5.4, strana 34). Imunoprecipitované proteiny byly separovány pomocí SDS elektroforézy (kapitola 4.2.6, strana 35) a po elektropřenosu na NC-membránu (kapitola 4.2.7, strana 37) byla provedena imunodetekce specifickými protilátkami proti příslušným ERs. Metodou imunoprecipitace se nám nepodařilo ERs v extraktech ejakulovaných spermii detekovat.

5.7 Exprese mRNA pro receptor GPER ve tkáni varlete a nadvarlete a v epididymálních spermích prasete

Ve spolupráci s Katedrou ochrany rostlin FA PPZ ČZU byla jako součást projektu CIGA 20162027 v rámci spolupráce mezi pracovišti FAPPZ Ing. Marií Maňasovou, Ph.D., zjišťována exprese mRNA ve tkáních varlat a nadvarlat a v epididymálních spermích kanců.

Byla izolována mRNA pro GPER z tkání kančích varlat a všech tří částí nadvarlete (hlava, tělo, ocas) a ze spermií ze stejných oblastí nadvarlete pomocí metody qRT-PCR s primery pro prasečí gen GPER1. Referenční gen (GAPDH) byl použit jako kontrola (kapitola 4.2.9, strana 39). Vyšší exprese mRNA ($P < 0.05$) byla nalezena ve tkáni hlavy a ocasu nadvarlete ve srovnání s tkáněmi varlat (T) a těla (EP2) nadvarlete (obrázek 27A). Vyšší obsah ($P < 0.01$) mRNA byl nalezen v epididymálních spermích izolovaných z hlavy nadvarlete (Ep1) ve srovnání se spermii z těla (Ep2) a ocasu (Ep3) (obrázek 27 B).



Obrázek 27: Relativní exprese mRNA pro GPER ve tkáních (A) nadvarlete dospělých kanců (EP1 – hlava, EP2 – tělo, EP3 – ocas) a varlete (T), (B) ve spermích izolovaných z úseků nadvarlete (Ep1 – hlava, Ep2 – tělo, Ep3 – ocas).

6 Diskuze

Podmínkou účinku přirozených estrogenů i látek s estrogením účinkem pocházejících z životního prostředí, tzv. environmentálních estrogenů, je přítomnost estrogenových receptorů v cílových tkáních. ERs byly detekovány v buňkách nejen samičího, ale i samčího reprodukčního traktu; což ukazuje na vliv estrogenních látek na samčí reprodukční tkáň i na spermie během jejich vývoje a zrání v reprodukčním traktu samčího i samičího pohlaví.

Pro pochopení podstaty účinku estrogenních látek produkovaných v organismu i pocházejících z vnějšího prostředí na reprodukční proces u samců je nezbytné získat co nejpřesnější představu o expresi a lokalizaci ERs ve tkáních pohlavních orgánů i ve spermiích v jejich vývojových etapách.

Detekcí a lokalizací ERs v reprodukčních tkáních a ve spermiích se zabývalo několik autorů u různých druhů zvířat i u člověka s poměrně variabilními výsledky. Důvodem je pravděpodobně použití odlišných metod nebo jejich variant pro průkaz estrogenových receptorů, volba specifických protilátek a jejich ředění s přihlédnutím k rozsahu jejich specifity proti ERs nebo také způsob detekce estrogenových receptorů.

Estrogenový transmembránový receptor spřažený s G-proteinem (GPER) je pravděpodobně prostředníkem v negenomických reakcích iniciovaných působením estrogenních látek. Z dříve publikovaných informací v odborných článcích vyplývá, že exprese membránového receptoru GPER v těle a ocasu nadvarlete poukazuje na pravděpodobnou roli negenomické estrogenové signalizace při zrání spermií v těle a při jejich ochraně a depozici v ocasu nadvarlete (Martínez-Traverso et Pearl; 2015).

V současné době existuje o přítomnosti receptoru GPER v reprodukčních tkáních samců v odborných zdrojích jen málo informací. Dosud byly publikovány důkazy o detekci GPER ve tkáni varlat pouze u člověka (Rago et al., 2011; Chevalier et al., 2012; Fietz et al., 2014; Oliveira et al., 2014), myši (Siriani et al., 2008) a potkana (Lucas et al., 2010; 2011). Ve tkáni všech tří úseků nadvarlat u nedospělých i dospělých potkanů byl GPER prokázán pouze skupinou Martínez-Traverso et al. (2015). Jediná další zmínka o detekci GPER v nadvarleti je v článku Katleby et al. (2015), kdy byl receptor GPER detekován v epitelálních buňkách ocasu nadvarlete u nedospělých kanečků (stáří 6,5 týdne) na parafinových řezech metodou peroxidázového barvení. O detekci transmembránového

receptoru GPER v reprodukčních tkáních dospělých kanců dosud žádné informace publikovány nebyly.

My jsme na kryořezech varlat dospělých kanců s použitím králičí polyklonální protilátky GPR30 (K-19-R), (Santa Cruz Biotechnology, USA) proti vnitřní části sekvence AMK lidského proteinu prokázali přítomnost receptoru GPER v cytoplazmě Leydigových buněk a ve spermatických buňkách uvnitř semenotvorných kanálků. Jednotlivá vývojová stádia spermií však nebylo možné zřetelně odlišit. Rovněž nebylo možné spolehlivě určit, zda byl receptor GPER lokalizován také v Sertoliho buňkách. Na kryořezech z tkáně nadvarlat jsme estrogenový receptor GPER (pomocí stejné protilátky GPR30 (K-19-R) detekovali ve všech třech úsecích. Prokázali jsme přítomnost GPER v bazální membráně sekrečního epitelu a poněkud slabší signál také v hladkosvalových buňkách vně vývodného kanálku nadvarlete. Pozitivní značení jsme detekovali i ve spermiích přítomných uvnitř kanálku hlavy, těla i ocasu nadvarlete, ale signál pro GPER ve spermiích měl variabilní intenzitu. Na rozdíl od střední intenzity signálu u spermií v hlavě nadvarlete se u spermií v těle značení jevílo jako velmi slabé až negativní. U spermií v kanálku v části ocasu nadvarlete byl signál pro GPER poměrně silný, v rámci spermatické buňky bylo možné ho lokalizovat v oblasti akrozomu. Informace publikované jinými autory o lokalizaci receptoru GPER v reprodukčních tkáních dospělých kanců dosud publikovány nebyly, tudíž zůstávají naše zjištění prozatím ojedinělá.

Informace týkající se lokalizace membránového receptoru GPER v epididymálních spermiích nejen u kanců, ale i u ostatních savčích druhů, nebyly dosud v dostupné literatuře rovněž publikovány. V našich experimentech jsme pro imunofluorescenční mikroskopii na epididymálních spermiích získaných z jednotlivých úseků nadvarlete při detekci receptoru GPER zvolili králičí polyklonální protilátku GPR30 (K-19-R) (Santa Cruz Biotechnology, USA) proti vnitřní části sekvence AMK lidského proteinu, která se plně osvědčila při detekci GPER v reprodukčních tkáních. Ve spermiích izolovaných z jednotlivých částí kanálku nadvarlete byla prokázána exprese GPER v různých formách a intenzitě. Protilátkové značení receptoru GPER u epididymálních spermií z hlavy nadvarlete bylo spíše slabé a difúzní v oblasti akrozomu spermie, výraznější signál byl v bičíku zároveň s označením v cytoplazmatických kapkách. Signál pro GPER u epididymálních spermií z těla nadvarlete byl zřetelný v apikální části hlavičky spermie a v cytoplazmatických kapkách střední části bičíku. U spermií izolovaných z ocasu nadvarlete byl receptor GPER detekován zcela jednoznačně v celém akrozomu a slabě v bičíku spermatických buněk s výrazným signálem v cytoplazmatické kapce ve střední části.

O přítomnosti membránového receptoru GPER v ejakulovaných spermiiích v odborné literatuře informace existují, avšak velmi omezené z hlediska počtu sledovaných druhů zvířat i vědeckých týmů zabývajících se touto problematikou. Ojedinelými výsledky jsou údaje publikované Arkounem et al. (2014) a Gautierem et al. (2016) u ejakulovaných zralých spermiiích hřebců. Pozitivní protilátkové značení bylo prokázáno ve spojovací části (krčku) spermie (Arkoun et al., 2014) a při použití elektronové mikroskopie byl GPER nalezen při subcelulární lokalizaci ve střední části, v krčku, bičíku a hlavičce (Gautier et al., 2016) spermie. V lidské zralé ejakulované spermii se průkazu receptoru GPER věnovala pouze Rago et al. (2014); GPER byl lokalizován jen ve střední části bičíku spermie. Stejný autorský kolektiv se jako jediný zabýval detekcí GPER pomocí protilátek také v kančí ejakulované spermii (Rago et al., 2014). U spermiiích fixovaných vymraženým metanolem na mikroskopickém skle Rago et al. (2014) použili dvě primární protilátky: králičí polyklonální LS-A4271 (MBL International Corporation, USA) mapující vnitřní část třetí extracelulární domény lidského GPER a králičí polyklonální K-19-R (Santa Cruz Biotechnology, USA) mapující vnitřní region lidského GPR30. Výsledky získané použitím obou primárních protilátek Rago et al. (2014) uvádí jako shodné. Detekován byl signál pro GPER v ekvatoriálním segmentu a v akrozomální oblasti hlavičky i v mitochondriální části bičíku. My jsme použili primární králičí polyklonální protilátku GPR30 (K-19-R) shodnou s Rago et al. (2014). Pracovali jsme se spermiiími fixovanými metodou vlhké fixace ve formě nátěrů na mikroskopických sklech. Pozitivní značení jsme detekovali u většiny ejakulovaných spermiiích pouze v oblasti akrozomu. Rago et al. (2014) na rozdíl od nás popsali fluorescenční signál i v ekvatoriální oblasti a ve střední části bičíku.

Výsledky Rago et al. (2014) na ejakulovaných spermiiích se v určité míře shodují s našimi výsledky u spermiiích izolovaných z ocasu epididymu, kdy fluorescenční signál byl detekován v obou případech v akrozomu spermie a slaběji i v proximální oblasti bičíku. Nabízí se proto teorie, že během zrání spermiiích v nadvarleti je receptor GPER patrně stabilně bez signifikantních změn manifestován v bičíku až do stádia maturace spermiiích, zatímco k výrazným změnám dochází v akrozomu. V průběhu epididymální maturace spermiiích prochází spermie řadou změn s cílem získat oplozovací schopnost. Tyto změny zahrnují vazbu proteinů produkovaných nadvarletem na povrch spermiiích nebo posttranslační modifikace proteinů spermie (Cornwall, 2014). Expres proteinů se však v jednotlivých částech epididymu liší. Vysoká je koncentrace proteinů při transportu spermiiích z hlavy do těla nadvarlete (Dacheux et al., 2012). Tyto proteiny se s velkou pravděpodobností váží na

plazmatickou membránu spermatických buněk a mohou být příčinou překrytí epitopu receptoru GPER rozpoznávaného použitou specifickou protilátkou. Následkem nepřístupnosti receptoru GPER může být značení protilátkami slabé a difúzní, jako v případě slabé detekce GPER v akrozomu spermií z hlavy nadvarlete. Změna intenzity protilátkového značení může souviset s odhalením epitopů pro specifickou protilátku proti GPER v akrozomální části spermie během jejího transportu nadvarletem. V ocasu nadvarlete dochází k uvolnění některých z těchto proteinů z povrchu spermií (Belleannee et al., 2011), a tím pravděpodobného odkrytí epitopů GPER umožňujících navázání použitých specifických protilátek.

Také informace o detekci receptoru GPER v kapacitovaných spermiích a ve spermiích po akrozomální reakci v odborné literatuře doposud neexistují. Pracovali jsme s kapacitovanými spermiemi i spermiemi po akrozomální reakci ošetřenými pomocí metody vlhké fixace. Pro detekci GPER jsme použili stejnou primární protilátku GPR30 (K-19-R) jako u ejakulovaných spermií. Signál jsme u spermií po *in vitro* kapacitaci vyhodnotili oproti ejakulovaným spermiím jako méně výrazný. U kapacitovaných spermií se jednalo spíše o apikální část akrozomu. Slabý signál byl detekován i v proximálním úseku bičíku některých kapacitovaných spermií. Po akrozomální reakci byla u spermií v oblasti akrozomu patrná ztráta signálu fluorescence. V případě, že akrozomální reakce neproběhla nebo proběhla nedokonale, byl znatelný slabý zbytkový imunofluorescenční signál. Slabé protilátkové značení pro GPER bylo viditelné u některých spermií také v proximální oblasti bičíku.

Výše uvedené ovšem platí pro spermie, u kterých byla prostřednictvím vlhké fixace permeabilizována plazmatická membrána, takže protilátka značí GPER na povrchu i uvnitř spermatické buňky. Je pravděpodobné, že uvnitř buňky se protilátka váže na receptor GPER lokalizovaný na buněčných membránách, jako je endoplazmatické retikulum, jak ve své práci uvádí Filardo et al. (2007).

U spermií inkubovaných s primární protilátkou v suspenzi, kdy plazmatickou membrána zůstává neporušena a k protilátkovému značení dochází pouze na povrchu buňky, byl nález odlišný. U ejakulovaných spermií jsme detekovali difúzní fluorescenční signál v oblasti celé hlavičky. U kapacitovaných spermií bylo výraznější pozitivní protilátkové značení ve formě drobných okrsků detekováno v oblasti akrozomu. Vyšší intenzita fluorescenčního signálu u kapacitovaných spermií v suspenzi by zřejmě mohla být způsobena odkrytím epitopů na povrchu spermie po její kapacitaci, popřípadě přeskupením

membránových domén, ke kterému během kapacitačního procesu dochází (Gadella et al., 2008).

Na úrovni proteinu byl membránový receptor GPER některými autory prokázán v extraktech reprodukčních tkání a spermii. V extraktu ze zárodečných buněk varlat některých savčích druhů (potkan, člověk, ovce) byl detekován protein GPER o molekulové hmotnosti 42 kDa (Chimento et al., 2010; 2011; Rago et al., 2011; Sandner et al., 2014; Cao et al., 2016). V práci Vauchera et al. (2014) bylo uvedeno, že v extraktu z testikulární tkáně u potkanů a u lidí byl pomocí Western blot analýzy prokázán proteinový pruh odpovídající molekulové hmotnosti v intervalu 50 až 60 kDa a slabší protilátkové značení odpovídající proteinovému pruhu o hmotnosti 40 kDa. Při použití Western blot analýzy bylo nejvyšší množství proteinu GPER nalezeno ve tkáni varlat, jednalo se o protein molekulové hmotnosti 60 kDa. My jsme v extraktu z tkáně varlat našli méně zřetelný proteinový pruh o hmotnosti 42 kDa, navíc jsme detekovali další GPER pozitivní proteinové pruhy o molekulové hmotnosti 38 a 48 kDa. Protein s podobnou molekulovou hmotností detekovali Oliveira et al. (2014) v zárodečných a Sertoliho buňkách lidských varlat.

Protein GPER byl detekován rovněž v extraktu z tkáně epididymu. Ve tkáni nadvarlete potkanů byly prokázány 2 proteiny odpovídající GPER, a to především výraznější detekce u proteinu o molekulové hmotnosti 43 kDa a slabší o hmotnosti 55 kDa (Martínez-Traverso et Pearl, 2015). My jsme našli zřetelnou reakci s protilátkou proti GPER u proteinu o molekulové hmotnosti 42 kDa v extraktu z hlavy a těla nadvarlete. Tento pruh koresponduje s GPER pozitivním proteinovým pruhem o hmotnosti 41 kDa v těle nadvarlete u prepubertálních kanečků popsaným Katlebou et al. (2015). Navíc jsme v proteinovém extraktu z tkáně nadvarlat detekovali, stejně jako v případě tkáně varlat dospělých kanců, pozitivní značení protilátkou proteinů o molekulové hmotnosti 38 a 48 kDa. Odlišná molekulární hmotnost detekovaných proteinů korespondující s GPER patrně poukazuje na různé glykosylované a neglykosylované izoformy vyskytující se ve spermii a v samčích reprodukčních tkáních, podobně jako to bylo popsáno u MCF-7 buněk nádoru prsu a myometria (Maiti et al., 2011).

Informace o proteinu GPER přítomném v epididymálních spermii v odborné literatuře chybí. Pro průkaz proteinu GPER jsme použili králičí polyklonální protilátku K-19-R (Santa Cruz Biotechnology, USA) jako Rago et al. (2014) a detekovali jsme nejen protein s molekulovou hmotností 42 kDa v extraktu spermii z hlavy a těla nadvarlete, ale také

proteiny o 30, 38 a 48 kDa ve spermiích z ocasu nadvarlete. Protein korespondující s GPER s molekulární hmotností 38 kDa byl detekován v extraktu ejakulovaných spermií hřebce (Arkoun et al., 2014). V extraktu z ejakulovaných spermií u člověka i prasete byl prokázán protein GPER o molekulové hmotnosti 42 kDa (Rago et al., 2014).

Signifikantní expresi receptoru GPER na úrovni mRNA prokázal v Leydigových buňkách lidských varlat Fietz et al. (2014). Hess et al. (2011) publikoval informaci o pozitivním nálezu mRNA pro GPER v nadvarleti dospělých potkanů a také o jeho výrazné expresi v těle nadvarlete u lidí. Rovněž (Lucas et al., 2011) popsal přítomnost mRNA pro GPER v nadvarleti dospělých potkanů s převažující expresí v jeho těle. Rago et al. (2014) popisují přítomnost mRNA pro GPER v lidských i kančích spermiích. Nám se v rámci spolupráce s Katedrou ochrany rostlin podařila izolace mRNA pro GPER protein z tkání varlete a nadvarlete a také epididymálních spermií. Byl prokázán nesignifikantní rozdíl v obsahu mRNA ve tkáni všech částí kančího nadvarlete a také ve tkáni varlat, s vyšší expresí v hlavě a ocase nadvarlete než ve varlatech a v těle nadvarlete. Detekována byla také mRNA pro GPER ve spermiích z nadvarlete s různou vzájemnou expresí. Nejvyšší množství mRNA bylo nalezeno ve spermiích z hlavy nadvarlete ve srovnání se spermiemi ze dvou následujících částí nadvarlete. Nižší množství detekované mRNA může naznačovat její aktivní translaci do proteinů během epididymální maturace spermií nebo její možnou degradaci. Translace mRNA do proteinu ve spermiích je diskutabilní; byla však popsána během finálních maturačních kroků před fertilizací Gurem a Breitbartem (2008).

Dříve popsané klasické ERs byly detekovány u mnoha druhů zvířat (Hess et al., 2004). V samčím reprodukčním traktu se v porovnání s jinými tělesnými tkáněmi vyskytují ve vyšší koncentraci, z čehož lze usuzovat na zásadní význam estrogenních látek pro vývoj pohlavních orgánů i jejich funkci v reprodukci. Ani v těchto cílových tkáních však distribuce ERs není rovnoměrná (Lombardi et al., 2001). Na rozdíl od téměř všudypřítomného ER β je výskyt estrogenového receptoru ER α v celém samčím reprodukčním traktu více specifický (Eddy et al., 1996; Franca et al., 2005; Hess et al., 2011). Také s ohledem na věk se distribuce ERs mění (Carreau et al., 2010). Rozdíly v lokalizaci ERs zřejmě souvisejí jednak s vývojem orgánu samotného, ale i s jeho fyziologickými funkcemi. Parlevliet et al. (2006) v této souvislosti poukazují na rozdílný výskyt ERs v hlavě, těle a ocase nadvarlete v závislosti jak na anatomické lokalizaci, tak na věku (pohlavní zralosti) jedinců. Schleicher et al. (1984) a Hess a Carnes (2004) upozorňují na význam receptoru ER α týkající se resorpce

tekutiny ve vývodných kanálcích varlete u kanců, včetně transportu sodíkových iontů před přesunem spermií do hlavy nadvarlete (Hess, 2000; 2003). Bylo zjištěno, že absence ER α zpětnou resorpci tekutiny znemožňuje. Důsledkem toho dochází k poškození spermií a snížení jejich oplozovací schopnosti (Hess a Carnes, 2004). Funkce ER β prozatím uspokojivě vysvětlena nebyla. Například u myši bylo zjištěno, že mezi geny, které řídí apoptózu zárodečných buněk, patří i gen související s expresí ER β (Delbes et al., 2004). Couse et al. (1997) však uvádějí, že u ER β KO myši žádná změna ve spermatogenezi zjištěna nebyla. Vzhledem k odlišnosti dosažených výsledků je úloha receptoru ER β v pohlavním traktu samců i nadále nejasná.

V testikulární tkáni byl estrogenový receptor ER α detekován s různými výsledky v zárodečných buňkách, Sertoliho buňkách a Leydigových buňkách u lidí (Pentikäinen et al., 2000; Mäkinen et al., 2001; Saunders et al. 2001; Solakidi et al., 2005; Guido et al., 2011; Fietz et al., 2014), myši (Mäkinen et al., 2001; Zhou et al., 2002), potkanů (Pelletier et al., 2000; Lucas et al., 2008) i hřebců (Pearl et al., 2011). U kanců si však publikované údaje značně protirečí (Rago et al., 2004; Mutembei et al., 2005; Ramesh et al., 2007; Gunawan et al., 2011). První informace o lokalizaci ERs ve tkáni varlat kanců popisuje Rago et al. (2004), kteří zjistili odlišné zastoupení ERs ve tkáni varlat v závislosti na věku zkoumaných zvířat. U nedospělých kanečků byla detekce ER α negativní. U dospělých kanců byla metoda imunoperoxidového barvení potvrzena lokalizace ER α hlavně ve spermatogoniích a spermatocytech a také v Sertoliho a Leydigových buňkách (Rago et al., 2004). Gunawan et al. (2011) detekovali ER α pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie na kryořezech varlete v cytoplazmě Sertoliho buněk, slabě v zárodečných buňkách a velmi slabě v Leydigových buňkách. Značení v Sertoliho buňkách uvedli jako ne zcela jednoznačné (Gunawan a kol., 2011). My jsme pomocí imunofluorescenčního značení stejnou polyklonální protilátkou ER α (HC-20), kterou využili Gunawan et al. (2011), potvrdili místa lokalizace ER α v intersticiální tkáni varlat s pravděpodobným značením cytoplazmy v Leydigových buňkách. Signál protilátkového značení ER α jsme také detekovali ve spermatických buňkách uvnitř lumen semenotvorného kanálku, ale nepodařilo se nám určit, o jaký typ vývojového stádia spermií se jedná.

Estrogenový receptor ER α byl rovněž prokázán v epiteliálních buňkách kanálku všech tří úseků nadvarlete u člověka (Saunders et al., 2001), myši (Zhou et al., 2002; Gautier et al., 2016), potkana (Zaya et al., 2012) a hřebce (Parlevliet et al., 2006). U kanců byl receptor ER α s různou intenzitou detekován ve všech částech nadvarlete (Pearl et al., 2007b; Gunawan et

al., 2011). Výjimku představuje práce Pearl et al. (2007a), kde na rozdíl od ostatních autorů nedetekovali ER α v ocasu nadvarlete. My jsme lokalizovali receptor ER α na kryořezech tkáně ze všech tří hlavních částí kančího nadvarlete. V řezech z hlavy nadvarlete to bylo v bazální membráně epitelální výstelky a ve spermiích v lumen epididymálního kanálu. V těle nadvarlete se nám ER α podařilo detekovat v sekrečním epitelu a ve spermiích v lumen kanálku a v ocasu nadvarlete jsme ER α našli ve spermiích v lumen kanálku, v sekrečním epitelu a v hladkosvalových buňkách, což odpovídá i výsledkům Gunawana et al. (2011). Poněkud odlišných výsledků detekce ER α bylo dosaženo skupinou Pearl et al. (2007a), kdy použili odlišnou polyklonální protilátku, a to proti myššímu proteinu ER α , která tento receptor značila pouze v sekrečním epitelu kanálků hlavy, těla a ocasu, v bazálních buňkách těla a v hladkosvalových buňkách hlavy kančího nadvarlete. Nerozpoznávala však ER α v epididymálních spermiích, a to v celém průběhu kanálku nadvarlete (Pearl et al., 2007a).

Pokud jde o detekci receptoru ER α v epididymálních spermiích, jsou k dispozici pouze výsledky získané v rámci detekce ER α na tkáňových řezech. Z výše uvedených publikací, studujících nadvarle kanců, uvádí pozitivní nález pouze studie Gunawan et al. (2011), kde autoři popisují značení ER α (protilátka HC-20) v postakrozomální oblasti a bičíku spermie zejména v těle a ocasu nadvarlete. V naší studii jsme v tkáňových řezech zaznamenali pozitivní značení spermií v kanálku nadvarlete také, proto jsme pro ověření analyzovali i epididymálních spermií získaných promytím jednotlivých úseků nadvarletní tkáně. Shodně s Gunawanem et al. (2011) jsme pomocí stejné protilátky ER α (HC-20) lokalizovali receptor ER α ve střední části bičíku, slaběji pak v postakrozomální oblasti hlavičky spermií z hlavy nadvarlete a v ekvatoriálním segmentu hlavičky u spermií z těla nadvarlete.

Receptor ER β byl detekován ve tkáni varlat člověka (Saunders et al., 2001, myši a potkana (Pelletier et al., 2000; Mäkinen et al., 2001; Lucas et al., 2008), hřebců (Pearl et al., 2011), avšak s odlišnými výsledky lokalizace. Detekce ER β ve tkáni varlat u kanců i kanečků byla popsána několika autory (Rago et al., 2004; Mutembei et al., 2005; Ramesh et al., 2007; Gunawan et al., 2012). V zárodečných buňkách dospělých kanců, a to ve spermatogoniích, primárních spermatocytech a spermatidách na řezech testes metodou nepřímé imunofluorescenční mikroskopie popsali detekci ER β Gunawan et al. (2012). Nicméně na snímcích uvedených ve zmíněné publikované práci Gunawana et al. (2012) však tato jednotlivá vývojová stadia spermatických buněk v semenotvorném kanálku nelze odlišit. Detekce ER β v bazální membráně semenotvorného kanálku byla prokazatelně negativní. Mutembei et al. (2005) a Gunawan et al. (2012) popsali u dospělých kanců jako pozitivní pro

ER β Sertolihových buněk. Byl popsán také pozitivní výskyt ER β v Leydigových buňkách dospělých kanců (Mutembei et al., 2005; Ramesh et al., 2007; Gunawan et al., 2012). My jsme ve tkáni varlete detekovali výrazné protilátkové značení pro ER β v bazální membráně semenotvorných kanálků a buňky uvnitř semenotvorného kanálku. Pro detekci receptoru ER β se nám osvědčila myší monoklonální protilátka ER β (1531) specifická proti C-konci (AMK 256-505) lidského proteinu. Gunawan et al. (2012) zvolili pro detekci stejného receptoru polyklonální kozí protilátku proti C-terminální doméně lidského proteinu (L-20) (Santa Cruz Biotechnology). My jsme tuto protilátku také otestovali, ale bohužel se zcela negativním výsledkem. Rago a kol. (2004) použili pro detekci ER β metodou imunoperoxidázového barvení tkáni varlat dospělých kanců monoklonální protilátku proti lidskému proteinu (MCA1974, Serotec, UK) a našli receptor ve spermatogoniích, spermatocytech a také v peritubulárních myoidních buňkách. V Sertolihových a Leydigových buňkách a ve spermatidách ER β detekován nebyl (Rago et al., 2004). Výsledky detekce ER β v testikulární tkáni Gunawana a kol. (2012) a Rago (2004) se shodují v případě spermatogonií a primárních spermatocytů. Naše zjištění korespondují s výsledky obou autorů v případě detekce ER β ve spermatických buňkách, avšak nebylo možné spolehlivě určit jejich konkrétní vývojové stádium.

Ve tkáni nadvarlete byl estrogenový receptor ER β detekován ve všech třech částech tohoto orgánu u člověka (Saunders et al., 2001), myši (Zhou et al., 2002), potkana (Zaya et al., 2012; Gautier et al., 2016) i hřebců (Parlevliet et al., 2006). U kanců je situace obdobná, ovšem přesná lokalizace ER β je různými autory uváděna nejednotně. Na pozitivním nálezu u epiteliálních buněk v hlavě nadvarlete dospělých kanců se autoři shodují (Carpino et al., 2004; Pearl et al., 2007a; Pearl et al., 2007b; Gunawan et al., 2012). My jsme receptor však ER β ve tkáni hlavy nadvarlete nedetekovali. V těle nadvarlete jsme při tom ale prokázali pozitivní protilátkové značení pro ER β v sekrečním epitelu a bazální membráně kanálku, detekce u spermii v lumen byla spíše negativní. Ve stejné části nadvarlete Gunawan et al. (2012) detekovali ER β metodou nepřímé imunofluorescence v epiteliálních buňkách a ve spermii v lumen kanálku. Carpino et al. (2004) pomocí imunoperoxidázového značení receptor ER β prokázali v těle nadvarlete dospělých prasat v intersticiu, slaběji v epitelu kanálku a v hladkosvalových buňkách. V ocase nadvarlete jsme ER β prokázali v sekrečním epitelu, v bazální membráně kanálku i ve spermii v lumen kanálku. Carpino et al. (2004) pomocí monoklonální protilátky prokázali ER β u dospělých prasat v intersticiální tkáni,

slaběji v hladkosvalových buňkách a sekrečním epitelu, Gunawan et al. (2012) popsali lokalizaci ER β v sekrečním epitelu ocasu nadvarlete a ve spermiích v lumen kanálku.

Příčinou rozdílů ve výsledcích jednotlivých týmů může být celá řada, ovšem nabízejí se zejména rozdíly v použité metodice detekce ER β , zejména ve výběru odlišných protilátek. V naší studii jsme použili myši monoklonální protilátku ER β (1531). Gunawan et al. (2012) pro detekci ER β zvolili kozí polyklonální protilátku (L-20) a Carpino et al. (2004) zvolili k detekci receptoru ER β myši monoklonální protilátku proti celému lidskému proteinu (MCA1974, Serotec, UK). V případě týmu Gunawan et al. (2012) nelze vyloučit, že polyklonální protilátka ER β mohla označit i místa s lokalizací ER α , protože shoda mezi receptory ER α a ER β je v DNA-vázající a ligand-vázající doméně až 80 % (databáze Blast). Na druhou stranu, Carpino et al. (2004) uvádějí nález ER β v hlavě nadvarlete dospělých kanců také. Každopádně je zřejmé, že protilátky použité jednotlivými týmy měly rozdílnou specifitu rozpoznávaného epitopu, a to mohlo hrát klíčovou roli mimo jiné i na popsáný výskyt zkrácených forem tohoto estrogenového receptoru (Inoue et al., 2000; Aschim et al., 2004; Rago et al., 2006; 2007).

Také v případě ER β jsme chtěli zpřesnit jeho lokalizaci v epididymálních spermiích pozitivně detekovaných v tkáňových řezech. Využili jsme imunocytochemickou analýzu spermií izolovaných z jednotlivých úseků nadvarlete, neboť obrazový materiál získaný z vyšetření tkáňových řezů neumožňoval seriózní lokalizaci v rámci jednotlivých buněk. Údaje o detekci estrogenového receptoru ER β v kančích epididymálních spermiích byly doposud publikovány pouze skupinou Gunawana et al. (2012), a to stejně jako u ER α (Gunawan et al., 2011) pouze v rámci detekce na kryorezech. Autoři sice popisují protilátkové značení (L-20, Santa Cruz Biotechnology) v oblasti akrozomu hlavičky spermatické buňky v těle nadvarlete, avšak signál v publikovaném snímku také není podle našeho názoru zcela zřetelný. Ačkoli jsme kromě protilátky použité s pozitivním výsledkem na kryorezech (1531) otestovali i protilátku L-20 použitou Gunawanem et al. (2012), receptor ER β u izolovaných epididymálních spermií dospělých kanců se nám, na rozdíl od nálezů na tkáňových kryorezech, detekovat nepodařilo. Příčinou negativního výsledku by patrně mohla být použita rozpouštědla pro fixaci spermií (aceton a metanol), která mohla způsobit ztrátu epitopů pro navázání specifické protilátky, případně také nízké množství daného receptoru v epididymálních spermiích.

Přítomnost estrogenového receptoru ER α v ejakulovaných spermích je popsána v několika odborných zdrojích, i když s poměrně odlišnými výsledky. Receptor ER α byl detekován v různých částech spermatické buňky u lidí (Aquila et al., 2004; Solakidi et al., 2005; Rago et al., 2006; Guido et al., 2011), myši (Gautier et al., 2016), potkana (Zaya et al., 2012) a hřebce (Arkoun et al., 2014). U kance se průkazem přítomnosti ER α v kančí ejakulované spermii zabývala pouze skupina Rago et al. (2007), která detekovala ER α pomocí monoklonální myši protilátky (F-10, proti C-konci lidského proteinu) pouze v bičíku spermie. My jsme při použití králičí polyklonální protilátky ER α (HC-20) rozpoznávající také C-konec AMK sekvence lidského proteinu získali odlišné výsledky – spermie byly označeny v oblasti akrozomové čepičky, postakrozomové oblasti a také ve střední části bičíku.

Receptor ER β byl v různých částech ejakulovaných spermíí prokázán u lidí (Saunders et al., 2001; Aquila et al., 2004; Rago et al., 2006; Guido et al., 2011; Rago et al., 2006) a hřebců (Arkoun et al., 2014), u kanců se detekci ER β v ejakulovaných spermích věnovali pouze Rago et al. (2007), kde pomocí králičí polyklonální protilátky H-150 (Santa Cruz Biotechnology) proti N-konci lidského určili lokalizaci ER β pouze v oblasti akrozomu. My jsme pro detekci ER β v ejakulovaných spermích použili myši monoklonální protilátku ER β (1531) rozpoznávající C-konec (AMK 256-505) lidského proteinu (Santa Cruz Biotechnology) a zaznamenali jsme výrazný signál pro ER β v akrozomální oblasti hlavičky spermie shodně s výsledky Rago et al. (2007).

Z hlediska diskuze příčin rozdílných výsledků publikovaných při studiu ERs různými autory je zajímavý i námi pozorovaný efekt zvolené metody fixace ejakulovaných spermíí. U spermíí zasušených i fixovaných metanolem bylo výsledné imunofluorescenční značení z hlediska lokalizace ER α , resp. ER β shodné, avšak intenzita signálu byla mnohem výraznější u zasušených spermíí. Důvodem může být ovlivnění stavu epitopu ERs způsobené fixací, jehož důsledkem je slabší vazba specifických protilátek.

Součástí naší studie byla dále detekce klasických receptorů ER α a ER β v jednotlivých analyzovaných vzorcích na úrovni proteinu.

Protein ER α byl ve tkáni varlat i v nadvarletí kanců detekován jako protein o molekulové hmotnosti 66 kDa (Rago et al., 2004; Gunawan et al., 2011). U kančích ejakulovaných spermíí pak byl popsán protein ER α o molekulové hmotnosti 67 kDa (Rago et al., 2007) odpovídající jeho plné délce. My jsme v extraktu z tkáně varlat pomocí protilátky

ER α (HC-20) prokázali dva proteinové pruhy ER α molekulové hmotnosti 27 a 42 kDa, ve všech úsecích nadvarlete pak pouze protein o molekulové hmotnosti 42 kDa, přičemž nejvýraznější exprese byla v těle nadvarlete. Jednalo se zřejmě o zkrácené formy receptoru ER α . Podobná zkrácená forma ER α o molekulové hmotnosti 46 kDa byla popsána v reprodukčních tkáních člověka (Flouriot et al., 2000). Pokud jde o spermie samotné, ve všech subcelulárních frakcích izolovaných z ejakulovaných kančích spermií (cytosolární, membránové, jaderné a cytoskeletální proteiny) byl detekován protein o molekulové hmotnosti 67 kDa, nejvýraznější značení bylo viditelné ve frakci proteinů izolovaných z jádra buňky. Tento nález zcela koresponduje s výsledky Rago et al. (2007) pro ER α u ejakulovaných spermií. Navíc byl ale ve všech frakcích viditelný i proužek o molekulové hmotnosti 59 kDa a v jaderné frakci i proužek o hmotnosti 50 kDa. Vzhledem k tomu, že zkrácené verze proteinu ER α byly popsány i v lidských spermiích 45 kDa (Solakidi et al., 2005) nebo 45 a 60 kDa (Naz et Sellamuthu, 2006), může jít o tento případ také. Molekulová hmotnost 59 a 50 kDa však také odpovídá popsanému proteinu ER β podle Rago et al. (2007). Důvodem možného značení proteinů obou estrogenových receptorů ER α i ER β protilátkou proti ER α může být použita polyklonální protilátka ER α (HC-20) rozpoznávající C-terminální sekvenci proteinu, která je vysoce homologní mezi oběma receptory. Přestože se nám nepodařilo estrogenový receptor ER α detekovat v celkovém proteinovém extraktu z ejakulovaných spermií a ani ze spermií epididymálních, ačkoli u obou typů buněk jsme detekovali signál při imunocytochemické lokalizaci tohoto receptoru, lze pozitivní detekci ER α v subcelulárních frakcích vysvětlit nabohacením proteinů z jednotlivých částí spermatické buňky.

V případě ER β byl ve tkáni pohlavních orgánů kanců popsán protein o molekulové hmotnosti 56 kDa (Gunawan et al., 2012), resp. 59 kDa (Rago et al., 2004). U prasečích spermií byly skupinou Rago et al. (2007) detekovány proteiny pro ER β o molekulové hmotnosti 50 a 59 kDa. My jsme detekovali ER β ve tkáni varlat a nadvarlat ve formě dvou proteinů o molekulové hmotnosti 25 a 28 kDa. Jedná se zřejmě o varianty zkrácených forem estrogenového receptoru ER β , z nichž některé byly již dříve popsány (Inoue et al., 2000; Aschim et al., 2004). Navíc byl detekován protein o molekulové hmotnosti okolo 120 kDa, což by mohlo svědčit o přítomnosti dimeru ERs (Razandi et al., 2004). V extraktu z epididymálních i ejakulovaných spermií jsme detekovali jeden protein o molekulové hmotnosti 48 kDa. Také v tomto případě se domníváme, že se jedná o zkrácenou izoformu ER β . Určitou analogií může být situace v detekci ER β u lidských spermií, kde bylo popsáno

několik proteinů o různých molekulových hmotnostech 55 kDa (Aquila et De Amicis, 2014), 59 kDa, resp. 50 kDa (Rago et al., 2006), ale také 64 kDa (Solakidi et al., 2005; Naz et Sellamuthu, 2006).

Poněkud variabilní výsledky imunolokalizace klasických ERs i stanovení jejich molekulové hmotnosti, patrné z dostupné literatury i z našich vlastních výsledků svědčí ovelkém vlivu zvolených metodických přístupů. Zdá se, že volba protilátky rozpoznávající určitou oblast AMK sekvence ERs je klíčová pro detekci určitých izoform obou ERs. Pro detekci ER α jsme použili protilátku (HC-20) shodně s týmem Gunawan et al. (2011) a naše výsledky lokalizace tohoto receptoru ve tkáních varlat a nadvarlat, jakož i v epididymálních spermích jsou de facto ve shodě s uvedenou publikací také, ačkoli při zachování stejných postupů se s tímto týmem částečně rozcházíme, pokud jde o detekci ER β , pro jehož detekci jsme použili protilátky rozdílné. Naopak u ejakulovaných spermíí jsme se sice rozcházel s týmem Rago et al. v lokalizaci ER α , ale ER β jsme lokalizovali shodně. Přitom proti ER α naše týmy použily protilátky, u nichž v obou případech výrobci uváděli specifitu vůči epitopům na C-konci lidského proteinu, ale ER β jsme detekovali pomocí protilátek proti lokacím zcela rozdílným (N-konec vs. C-konec lidského proteinu).

Jedním z faktorů variability publikovaných výsledků může také být zpracování biologického materiálu a s tím související dostupnost vazebných míst pro použité protilátky, příp. vhodnost protilátky pro danou analytickou metodu (zde např. imunolokalizace ve tkáních a spermích vs. detekce proteinů přenesených na NC-membránu). Ačkoli jsme testovali i některé další protilátky použité jinými autory, v našich experimentálních podmínkách se neosvědčily vůbec. Podobně protilátka s označením HC-20 úspěšně lokalizovala ER α ve tkáních i spermích a na NC-membráně mezi proteiny získanými ze subcelulárních frakcí izolovaných z ejakulovaných spermíí také označila protein o odpovídající molekulové hmotnosti 67 kDa. Avšak detekovat stejný protein z extraktu získaného přímo z ejakulovaných či epididymálních spermíí se nám s touto protilátkou nepodařilo. Podobně protilátka použitá proti ER β velmi výrazně značila proteiny izolované z tkání všech tří částí nadvarlete, ale na kryorezech odpovídajících tkání byl signál této protilátky velmi slabý. V neposlední řadě pak můžeme uvažovat o vlivu změny epitopu po fixaci metanolem či acetonem, což se mohlo projevit v intenzitě značení ERs, jak tomu bylo v případech kančích ejakulovaných spermíí.

7 Závěr

Z dostupné literatury je zřejmé, že publikované výsledky týkající se detekce a lokalizace estrogenových receptorů v kančích reprodukčních orgánech a spermiích dosud nebyly uspokojivě popsány a ověřeny. Distribuce ERs nebyla sledována v různých stádiích vývoje spermií jednotnými metodami a zejména v případě GPER jsou dosud získané výsledky velmi omezené.

Při detekci a lokalizaci membránového receptoru GPER ve tkáních i spermiích jsme dosáhli ojedinělých a dosud neuvedených výsledků. Jako první jsme publikovali informaci o přítomnosti GPER ve tkáni varlat a nadvarlat dospělých kanců. Dosavadní jediná informace o detekci GPER v samčích pohlavních orgánech prasat se týká pouze nedospělých kanečků (Katlaba et al., 2015). Rovněž u spermií izolovaných z nadvarlete dospělých kanců dosud žádné publikované údaje o detekci receptoru GPER neexistují. V případě detekce receptoru GPER u ejakulovaných spermií jsme ověřili informace dosud jediného zdroje Rago et al. (2014). U ejakulovaných spermií byla navíc potvrzena exprese genu pro estrogenový receptor GPER na úrovni mRNA. Tyto poznatky jsme publikovali v práci Krejčířová et al. (2018; viz. Příloha). Jedinečné jsou i další, dosud nepublikované poznatky o detekci receptoru GPER u kapacitovaných spermií a spermií po akrozomální reakci, a to nejen u kanců, ale i v rámci ostatních savčích druhů.

Estrogenové receptory ER α a ER β jsme detekovali v reprodukčních tkáních i v epididymálních a ejakulovaných spermiích. Naše výsledky se ve svých jednotlivých částech shodují s výsledky již publikovanými, v některých bodech dosavadní poznatky doplňují. Nelze však říci, že by naše výsledky byly ve shodě vysloveně s jedním konkrétním týmem nebo jejich publikací. Poněkud variabilní výsledky imunolokalizace klasických ERs i stanovení jejich molekulové hmotnosti, patrné z dostupné literatury i z našich vlastních výsledků, a dílčí shody s jednotlivými publikovanými studii ukazují na zásadní význam zvolené metodiky a zejména použitých specifických protilátek proti ERs.

Do budoucna by bylo vhodné dořešit například přesnou lokalizaci jednotlivých typů estrogenových receptorů ve spermatické buňce na subcelulární úrovni nebo objasnit lokalizaci a funkci jednotlivých izoform estrogenových receptorů. Napomoci by mohla cílená extrakce proteinů z různých částí spermatické buňky a detekce jednotlivých typů ERs. Mechanismy negenomického působení estrogenních látek přes ERs u spermíí tak zůstávají stále nedořešeny.

8 Seznam literatury

- Acconcia, F., Bocedi, A., Ascenzi, P., Marino, M. 2003. Does palmitoylation target estrogen receptors to plasma membrane caveolae? *Life*. 55: 33-35.
- Acconcia, F., Ascenzi, P., Fabozzi, G., Visca, P., Marino, M. 2004. S-Palmitoylation modulates human estrogen receptor- α functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 316(3): 878-883.
- Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalancia, A., Visca, P., Marino, M. 2005. Palmitoylation dependent estrogen receptor α membrane localization: regulation by 17 β -estradiol. *Molecular Biology of the Cell*. 16: 231 – 237.
- Acconcia, F., Kumar, R. 2006. Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer Letters*. 238(1): 1-14.
- Aquila, S., Sisci, D., Gentile, M., Middea, E., Catalano, S., Carpino, A., Rago, V., Andó, S. 2004. Estrogen receptor (ER) α and ER β are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 89(3): 1443-1451.
- Aquila, S., De Amicis, F. 2014. Steroid receptors and their ligands: Effect on male gamete functions. A review. *Experimental Cell Research*. 328: 303-313.
- Arkoun, B., Gautier, G., Delalande, Ch., Barrier-Battut, I., Guénon, I., Goux, D., Bouraïma-Lelong, H. 2014. Stallion spermatozoa: Putative target of estrogens; presence of the estrogen receptors ESR1, ESR2 and identification of the estrogen-membrane receptor GPER. *General and Comparative Endocrinology*. 200: 35-43.
- Aschim, E. L., Saether, T., Wiger, R., Grotmol, T., Haugen, T. B., 2004. Differential distribution of splice variants of estrogen receptor beta in human testicular cells suggest specific functions in spermatogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 92: 97-106.
- Barraille, P., Chinestra, P., Bayard, F., Faye, J. - Ch. 1999. Alternative initiation of translation accounts for a 67/45 kDa dimorphism of the human estrogen receptor ER α . *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 257(1): 84-88.

- Beato, M., Chávez, S., Truss, M. 1996. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids*. 61(4): 240 – 251.
- Belleannee, C., Belghazi, M., Labas, V., Teixeira-Gomes, A. P., Gatti, J. I., Dacheux, J. I., Dacheux, F. 2011. Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. *Proteomics*. 11(10): 1952-1964.
- Cao, X., Huang, J., Zhang, G., Zuo, W., Lan, C., Sun, Q., Yang, D., Gao, D., Cheng, Ch., Zhou, W. L. 2016. Functional expression of G protein-coupled receptor 30 in immature rat epididymal epithelium. *Cell Biology International*. 41(2): 134-146.
- Carpino, A., Bilinska, B., Siciliano, L., Maggiolini, M., Rago, V. 2004a. *Folia histochemica et cytobiologica*. 42:13-17.
- Carpino, A., Romeo, F., Rago, V. 2004b. Aromatase immunolocalization in human ductuli efferentes and proximal ductus epididymis. *Journal of Anatomy*. 204(3): 217-220.
- Carreau, S. 2003. Estrogens – male hormones? *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 41(3): 107-111.
- Carreau, S., Delalande, Ch., Silandre, D., Bourguiba, S., Lambard, S. 2006. Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 246: 65-68.
- Carreau, S., Hess, R. A. 2010. Oestrogens and spermatogenesis. A review. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 365: 1517-1535.
- Carreau, S., Bouraima-Lelong, H., Delalande, Ch. 2011. Estrogens – new players in spermatogenesis. A review. *Reproductive Biology*. 11(3):174-193.
- Carreau, S., Bouraima-Lelong, H., Delalande, C. 2012. Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. *Advances in Medical Sciences*. 57(1): 31-36.
- Cederroth, Ch. R., Nef, S. 2009. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 304: 30-42.
- Chevalier, N., Vega, A., Bouskine, A., Siddeek, B., Michiels, J.-F., Chevallier, D., Fénelin, P. 2012. GPR30, the non-classical membrane G protein related estrogen receptor, is

overexpressed in human seminoma and promotes seminoma cell proliferation. *Plos One*. 7(4): e34672.

Chimento, A., Sirianni, R., Delalande, C., Silandre, D., Bois, C., Andó, S., Maggiolini, M., Carreau, S., Pezzi, V. 2010a. 17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER α . *Molecular and Cellular Endocrinology*. 320(1-2): 136-144.

Chimento, A., Sirianni, R., Zolea, F., Bois, C., Delalande, Ch., Andó, S., Maggiolini, M., Aquila, S., Carreau, S., Pezzi, V. 2010b. GPER and ESRs are expressed in rat round spermatids and mediate oestrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax. *International Journal of Andrology*. 34: 420-429.

Cooke, P. S., Manjunatha, K. N., CheMyong, K., Gail, S. P., Hess, R. A. 2017. Estrogens in male physiology. *Physiological Reviews*. 97: 995-1043.

Cornwall, G. A. 2014. Role of posttranslational protein modifications in epididymal sperm maturation and extracellular quality control. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 759: 159-180.

Couse, J. F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J. A., Korach, K. S. 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*. 138(11): 4613-4621.

Couse, J., Korach, K. 1999. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?. *Endocrine Reviews*. 20: 358-417.

Dacheux, J. I., Belleannée, C., Guyonnet, B., Labas, V., Teixeira-Gomes, A. P., Ecroyd, H., Dacheux, F. 2012. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 58(4): 197-210.

Delbes, G., Levacher, C., Pairault, C., Racine, C., Duquenne, C., Krust, A., Habert, R. 2004. Estrogen receptor beta-mediated inhibition of male germ cell line development in mice by endogenous estrogens during perinatal life. *Endocrinology*. 145 (7): 3395-3403.

- Dostálová, P., Žatecká, E., Dvořáková – Hortová, K. 2017. Of oestrogens and sperm: a review of the roles of oestrogens and oestrogen receptors in male reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(5): 904.
- Eddy, E., Washburn, T., Bunch, D., Goulding, E., Gladen, B., Lubahn, D., Korach, K. 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology*. 137: 4796-4805.
- Fietz, D., Ratzenböck, C., Hartmann, K., Raabe, O., Kliesch, S., Weidner, W., Klug, J., Bergmann, M. 2014. Expression pattern of estrogen receptors α and β and G-protein-coupled estrogen receptor 1 in the human testis. *Histochemistry and Cell Biology*. 142: 421-432.
- Filardo, E. J., Quinn, J., Pang, Y., Graeber, C., Shaw, S., Dong, J., Thomas, P. 2007. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology*. 148: 3236-3245.
- Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V., Gannon, F. 2000. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER- α) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER- α activation function 1. *The EMBO Journal*. 19(17): 4688-4700.
- França, L. R., Avelar, G. F., Almeida, F. F. L. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*. 63(2): 300-318.
- Franco, R., Boscia, F., Gigantino, V., Marra, L., Esposito, F., Ferrara, D., Pariante, P., Botti, G., Caraglia, M., Minucci, S., Chieffi, P. 2011. GPR30 is overexpressed in post-pubertal testicular germ cell tumors. *Cancer Biology & Therapy*. 11(6): 609-613.
- Gadella, B. M., Tsai, P. S., Boerke, A., Brewis, I. A. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *The International Journal of Developmental Biology*. 52(5-6):473-80.
- Gautier, C., Barrier-Battut, I., Guénon, I., Goux, D., Delalande, C., Bouraïma-Lelong, H. 2016. Implication of the estrogen receptors GPER, ESR1, ESR2 in post-testicular maturation of equine spermatozoa. *General and Comparative Endocrinology*. 233(1): 100-108.

- Gibson, D. A., Saunders, P. T. K. 2012. Estrogen dependent signaling in reproductive tissues – a role for estrogen receptors and estrogen related receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 348(2): 361-372.
- Grober, O. M., Mutarelli, M., Giurato, G., Ravo, M., Cicatiello, L., De Filippo, M. R., Ferrato, L., Nassa, G., Papa, M., F., Paris, O., Tarallo, R., Luo, S., Schroth, G. P., Benes, V., Weisz, A. 2011. Global analysis of estrogen receptor beta binding to breast cancer cell genome reveals an extensive interplay with estrogen receptor alpha for target gene regulation. *BMC Genomics*. 12: 36.
- Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., Huber, J. C. 2002. Production and actions of estrogens. *The New England Journal of Medicine*. 346(5): 340-352.
- Guido, C., Perrotta, I., Panza, S., Middea, E., Avena, P., Santoro, M., Marsico, S., Imbrogno, P., Andó, S., Aquila, S. 2011. Human sperm physiology: Estrogen receptor alpha (ER α) and estrogen receptor beta (ER β) influence sperm metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele – associated male infertility. *Journal of Cellular Physiology*. 226: 3403-3412.
- Gunawan, A., Kaewmala, K., Uddin, M. J., Cinar, M. U., Tesfaye, D., Phatsara, C., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K. 2011. Association study and expression analysis of porcine ERS1 as a candidate gene for boar fertility and sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 128: 11-21.
- Gunawan, A., Cinar, M. U., Uddin, M. J., Kaewmala, K., Tesfaye, D., Phatsara, C., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K. 2012. Investigation on association and expression of ESR2 as a candidate gene for boar sperm quality and fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 47: 782-790.
- Gur, Y., Breitbart, H. 2008. Protein synthesis in sperm: dialog between mitochondria and cytoplasm. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 282(1-2): 45-55.
- Gur, Y., Breitbart, H. 2015. Mammalian sperm translate nuclear – encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Development*. 20: 411-416.

- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., Gustafsson, J.-A. 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological Reviews*. 87: 905-931.
- Hess, R. A. 2000. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Review of Reproduction*. 5(2): 84-92.
- Hess, R. A., Bunick, D., Bahr, J. 2001. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract – a review. *Molecular and Endocrinology*. 178:29-38.
- Hess, R. A. 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1(1): 52.
- Hess, R. A., Fernandes, S. A. F., Gomes, G. R. O., Oliveria, C. A., Lazari, M. F. M., Porto, C. S. 2011. Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. *Journal of Andrology*. 32(6): 600-612.
- Hess, R. A., Cooke, P. S. 2018. Estrogen in the male: a historical perspective. *Biology of Reproduction*. 99(1): 27-44.
- Ho, K. J., Liao, J. K. 2002. Nonnuclear actions of estrogen. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 22: 1952-1961.
- Inoue, S., Ogawa, S., Horie, K., Hoshino, S., Goto, W., Hosoi, T., Tsutsumi, O., Muramatsu, M., Ouchi, Y. 2000. An estrogen receptor β isoform that lacks exon 5 has dominant negative activity on both ER α and ER β . *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 279: 814-819.
- Jacenic, D., Cygankiewicz, A. I., Krajewska, W. M. 2016. The G protein-coupled estrogen receptor as a modulator of neoplastic transformation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 429:10-18.
- Jia, M., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J.-A. 2015. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 29: 557-568.
- Joseph, A., Shur, B. D., Hess, R. A. 2011. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. *Biology of Reproduction*. 84: 207-217.

- Katleba, K. D., Legacki, E. L., Conley, A. J., Berger, T. 2015. Steroid regulation of early postnatal development in the corpus epididymidis of pigs. *Journal of Endocrinology*. 225(3): 125-134.
- Kang, L., Zhang, X., Xie, Y., Tu, Y., Wang, D., Liu, Z., Wang, Z. Y. 2010. Involvement of estrogen receptor variant ER-alpha36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling. *Molecular Endocrinology*. 24(4): 709-721.
- Kotula-Balak, M., Hejmej, A., Lydka, M., Cierpich, A., Bilinska, B. 2012. Detection of aromatase, androgen, and estrogen receptors in bank vole spermatozoa. *Theriogenology*. 78: 385-392.
- Krejčířová, R., Maňasová, M., Sommerová, V., Langhamerová, E., Rajmon, R., Maňásková-Postlerová, P. 2018. G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in adult boar testes, epididymis and spermatozoa during epididymal maturation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 116: 113-119.
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.-A. 1996. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93(12): 5925-5930.
- Kulkoyluoglu, E., Madak-Erdogan, Z. 2016. Nuclear and extranuclear-initiated estrogen receptor signaling crosstalk and endocrine resistance in breast cancer. *Steroids*. 114: 41-47.
- Kumar, P., Wu, Q., Chambliss, K. L., Yuhanna, I. S., Mumby, S. M., Mineo, C., Tall, G. G., Shaul, P. W. 2007. Direct interactions with G α i and G β γ mediate nongenomic signaling by estrogen receptor α . *Molecular Endocrinology*. 21(6): 1370-1380.
- Kumar, R., Zakharov, M. N., Khan, S. H., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., Singh, R., Bhasin, S., Jasuja, R. 2011. The dynamic structure of the estrogen receptor. *Journal of Amino Acids*. 2011: 1-7.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

- Lambard, S., Galeraud-Denis, I., Saunders, P. T. K., Carreau, S. 2004. Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors. *Journal of Molecular Endocrinology*. 32: 279-289.
- Lekhkota, O., Brehm, R., Claus, R., Wagner, A., Bohle, R. M., Bergmann, A. 2006. Cellular localization of estrogen receptor-alpha (ER α) and -beta (ER β) mRNA in the boar testis. *Histochemistry and Cell Biology*. 125:259-264.
- Levin, E. R. 2009. Plasma membrane estrogen receptors. A review. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 20 (10): 477-482.
- Lombardi, G., Zarrilli, S., Colao, A., Paesano, L., Di Somma, C., Rossi, F., De Rosa, M. 2001. Estrogens and health in males. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 178: 51-55.
- Lu, P., Wang, F., Song, X., Liu, Y., Zhang, K., Cao, N. 2016. Relative abundance of G protein-coupled receptor 30 and localization in testis and epididymis of sheep at different developmental stages. *Animal Reproduction Science*. 175: 10-17.
- Lucas, T. F., Siu, E. R., Esteves, C. A., Monteiro, H. P., Oliveira, C. A., Porto, C. S., Lazari, M. F. 2008. 17 β -estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction*. 78(1): 101-114.
- Lucas, T. F., Royer, C., Siu, E. R., Lazari, M. F., Porto, C. S. 2010. Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction*. 83:307-317.
- Lucas, T. F., Pimenta, M. T., Pisolato, R., Lazari, M. F., Porto, C. S. 2011. 17 β -estradiol signaling and regulation of Sertoli cell function. *Spermatogenesis*. 1(4): 318-324.
- Luconi, M., Forti, G., Baldi, E. 2002. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 80(4-5): 369-381.
- Maiti, K., Paul, J. W., Read, M., Chan, E. C., Riley, S. C., Nahar, P., Smith, R. G. 2011. G-1-activated membrane estrogen receptors mediate increased contractility of the human myometrium. *Endocrinology*. 152: 2448-2455.

- Marino, M., Ascenzi, P., Acconcia, F. 2006. S-palmitoylation modulates estrogen receptor α localization and functions. *Steroids*. 71: 298-303.
- Martínez-Traverso, G. B., Pearl, Ch. A. 2015. Immunolocalization of G protein-coupled estrogen receptor in the rat epididymis. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 13:48.
- Mäkinen, S., Mäkelä, S., Weihua, Z., Warner, M., Rosenlund, B., Salmi, S., Hovatta, O., Gustafsson, J.-A. 2001. Localization of oestrogen receptors alpha and beta in human testis. *Molecular Human Reproduction*. 7(6): 497-503.
- Morito, K., Hirose, T., Kinjo, J., Hirakawa, T., Okawa, M., Nohara, T., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatsu, M., Masamune, Y. 2001. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors α and β . *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 24(4): 351-356.
- Mosselman, S., Polman, J., Dijkema, R. 1996. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters*. 392: 49-53.
- Mutembei, H. M., Pesch, S., Schuler, G., Hoffmann, B. 2005. Expression of oestrogen receptors α and β and of aromatase in the testis of immature and mature boars. *Reproduction in Domestic Animals*. 40:228-236.
- Naz, R. K., Sellamuthu, R. 2006. Receptors in Spermatozoa: Are They Real? *Journal of Andrology*. 27(5): 627-636.
- Nanjappa, M. K., Hess, R. A., Medrano, T. I., Locker, S. H., Levin, E. R., Cooke, P. S. 2016. Membrane-localized estrogen receptor 1 is required for normal male reproductive development and function in mice. *Endocrinology*. 157(7): 2909-2919.
- Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., Muramatsu, M. 1998. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 243: 122-126.
- Olde, B., Leeb-Lundberg, L. M. F. 2009. GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 20(8): 409-416.
- Oliveira, P. F., Alves, M. G., Martins, A. D., Correia, S., Bernardino, R. L., Silva, J., Barros, A., Sousa, M., Cavaco, J. E., Socorro, S. 2014. Expression pattern of G protein-coupled

receptor 30 in human seminiferous tubular cells. *General and Comparative Endocrinology*. 201: 16- 20.

Otto, C., Fuchs, I., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., Andreasen, P., Schwarz, G., Altmann, H., Klewer, M., Schoor, M., Vonk, R., Fritzscheier, K. H. 2009. GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biology of Reproduction*. 80: 34-41.

Parlevliet, J. M., Pearl, Ch. A., Hess, M. F., Famula, T. R., Roser, J. F. 2006. Immunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid concentrations in the stallion epididymis. *Theriogenology*. 66:755-765.

Pearl, Ch. A., Berger, T., Roser, J. F. 2007a. Estrogen and androgen receptor expression in relation to steroid concentrations in the adult boar epididymis. *Domestic Animal Endocrinology*. 33: 451-459.

Pearl, Ch. A., At-Taras, E., Berger, T., Roser, J. F. 2007b. Reduced endogenous estrogen delays epididymal development but has no effect on efferent duct morphology in boars. *Reproduction*. 134: 593-604.

Pearl, Ch. A., Mason, H., Roser, J. F. 2011. Immunolocalization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and androgen receptor in the pre-, peri- and post-pubertal stallion testis. *Animal Reproduction Science*. 125:103-111.

Pedram, A., Razandi, M., Levin, E. R. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. 2006. *Molecular Endocrinology*. 20(9): 1996-2009.

Pedram, A., Razandi, M., Sainson, R. C., Kim, J. K., Hughes, C. C., Levin, E. R. 2007. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 282(31): 22278-22288.

Pedram, A., Razandi, M., Deschenes, R. J., Levin, E. R. 2012. DHHC-7 and -21 are palmitoyltransferases for sex steroid receptors. *Molecular Biology of the Cell*. 23(1): 188-199.

- Pelletier, G., El-Alfy, M. 2000a. Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 85(12): 4835-4840.
- Pelletier, G., Labrie, C., Labrie, F. 2000b. Localization of oestrogen receptor α , oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs. *Journal of Endocrinology*. 165: 359-370.
- Pentikäinen, V., Erkkilä, K., Suomalainen, L., Parvinen, M., Dunkel, L. 2000. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 85:2057-2067.
- Petersen, D. N., Tkalcevic, G. T., Koza-Taylor, P. H., Turi, T. G., Brown, T. A. 1998. Identification of estrogen receptor β 2, a functional variant of estrogen receptor β expressed in normal rat tissues. *Endocrinology*. 139(3): 1082-1092.
- Prelusky, D. B. 1994. Residues in food products of animal origin. In: Miller, J. D., Trenholm, H. L. 524 (ed): *Mycotoxins in Grain: Compounds other than aflatoxins*, Eagen press, St. Paul, 405-419.
- Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., Sklar, L. A. 2007. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 265-266: 138-142.
- Prossnitz, E. R., Oprea, T. I., Sklar, L. A., Arterburn, J. B. 2008. The ins and outs of GPR30: A transmembrane estrogen receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 109: 350-353.
- Publicover, S., Harper, C. V., Barratt, C. 2007. $[Ca^{2+}]_i$ signalling in sperm - making the most of what you've got. *Nature Cell Biology*. 9: 235-242.
- Qian, H., Xuan, J., Liu, Y., Shi, G. 2016. Function of G-coupled estrogen receptor-1 in reproductive system tumors. *Journal of Immunology Research*. 016:ID 7128702, 1-6.
- Rago, V., Maggiolini, M., Vivacqua, A., Palma, A., Carpino, A. 2004. Differential expression of estrogen receptors (ER α /ER β) in testis of mature and immature pigs. *The Anatomical Record Part A*. 281A: 1234-1239.

- Rago, V., Siciliano, L., Aquila, S., Carpino, A. 2006. Detection of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta in human ejaculated immature spermatozoa with excess residual cytoplasm. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4:36.
- Rago, V., Aquila, S., Panza, R., Carpino, A. 2007. Cytochrome P450arom, androgen and estrogen receptors in pig sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 5: 23-29.
- Rago, V., Romeo, F., Giordano, F., Maggiolini, M., Carpino, A. 2011. Identification of the estrogen receptor GPER in neoplastic and non-neoplastic human testes. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 9:135.
- Rago, V., Giordano, F., Brunelli, E., Zito, D., Aquila, S., Carpino, A. 2014. Identification of G protein-coupled estrogen receptor in human and pig spermatozoa. *Journal of Anatomy*. 224: 732-736.
- Ramesh, R., Pearl, C. A., At-Taras, E., Roser, J. F., Berger, T. 2007. Ontogeny of androgen and estrogen receptor expression in porcine testis: Effect of reducing testicular estrogen synthesis. *Animal Reproduction Science*. 102(3-4): 286-299.
- Razandi, M., Oh, P., Pedram, A., Schnitzer, J., Levin, E. R. 2002. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Molecular Endocrinology*. 16 (1): 100-115.
- Razandi, M., Pedram, A., Merchenthaler, I., Greene, G. L., Levin, E. R. 2004. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Molecular Endocrinology*. 18 (12): 2854-2865.
- Rochira, V., Granata, A. R., Madeo, B., Zirilli, L., Rossi, G., Carani, C. 2005. Estrogens in males: what have we learned in the last 10 years? *Asian Journal of Andrology*. 7(1): 3-20.
- Rosselli, M., Reinhart, K., Imthurn, B., Keller, P. J., Dubey, R. K. 2000. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. *Human Reproduction Update*. 6(4): 332-350.
- Saunders, P. T. K., Sharpe, R. M., Williams, K., Macpherson, S., Urquart, H., Irvine, D. S., Millar, R. 2001. Differential expression of oestrogen receptor α and β proteins in the testes

and male reproductive system of human and non-human primates. *Molecular Human Reproduction*. 7(3): 227-236.

Schleicher, G., Drews, U., Stumpf, W. E., Sar, M. 1984. Differential distribution of dihydrotestosterone and estradiol binding sites in the epididymis of the mouse. An autoradiographic study. *Histochemistry*. 81(2): 139-147.

Selva, D. M., Tirado, O. M., Toran, N., Suarez-Quian, C. A., Reventos, J., Munell, F. 2004. Estrogen receptor beta expression and apoptosis of spermatocytes of mice overexpressing a rat androgen-binding protein transgene. *Biology of Reproduction*. 71: 1461-1468.

Schwartz, N., Verma, A., Bivens, C. B., Schwartz, Z., Boyan, B. D. 2016. Rapid steroid hormone actions via membrane receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1863: 2289-2298.

Shemes, M., Shore, L. S. 2012. Effects of environmental estrogens on reproductive parameters in domestic animals. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. 67(1): 6-10.

Siriani, R., Chimento, A., Ruggiero, C., De Luca, A., Lappano, R., Andó, S., Maggiolini, M., Pezzi, V. 2008. The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. *Endocrinology*. 149(10): 5043-5051.

Smith, L. C., Ralston-Hooper, K. J., Ferguson, P. L., Sabo-Attwood, T. 2016. The G Protein-coupled estrogen receptor agonist G-1 inhibits nuclear estrogen receptor activity and stimulates novel phosphoproteomic signatures. *Toxicological Sciences*. 151(2): 434-446.

Solakidi, S., Psarra, A.M.G., Nikolaropoulos, S., Sekeris, C.E. 2005. Estrogen receptors α and β (ER α and ER β) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER β and AR in mitochondria of the midpiece. *Human Reproduction*. 20(12): 3481-3487.

Tapiero, H., Nguyen Ba, G., Tew, K. D. 2002. Estrogens and environmental estrogens. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 56: 36-44.

Vaucher, L., Funaro, M. G., Mehta, A., Mielnik, A., Bolyakov, A., Prossnitz, E. R., Schlegel, P. N., Paduch, D. A. 2014. Activation of GPER-1 estradiol receptor downregulates production of testosterone in isolated rat Leydig cells and adult human testis. *PloS One*. 9(4): e92425.

Wang, Ch., Liu, Y., Cao, J. M. 2014. G Protein-Coupled Receptors: Extranuclear Mediators for the Non-Genomic Actions of Steroids. *International Journal of Molecular Sciences*. 15:15412-15425.

Wang, Z. Y., Zhang, X. T., Shen, P., Loggie, B. W., Chang, Y. Ch., Deuel, T. F. 2005. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- α 36, a novel variant of human estrogen receptor- α 66. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 336: 1023-1027.

Whiting, K. P., Restall, C. J., Brain, P. F. 2000. Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. *Life Sciences*. 67: 743-757.

Zaya, R., Hennick, C., Pearl, C. A. 2012. In vitro expression of androgen and estrogen receptors in prepubertal and adult rat epididymis. *General and Comparative Endocrinology*. 178(3): 573-586.

Zhao, C., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J. A. 2008. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nuclear Receptor Signaling* 6: e003.

Zhou, Q., Nie, R., Prins, G. S., Saunders, P. T. K., Katzenellenbogen, B. S., Hess, R. A. 2002. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *Journal of Andrology*. 23(6): 870-881.

Elektronické zdroje:

https://www.pentachemicals.eu/soubory/bezpecnostni-listy/bezplist_179.pdf

PŘÍLOHA



G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in adult boar testes, epididymis and spermatozoa during epididymal maturation

Romana Krejčířová^a, Marie Maňasová^b, Veronika Sommerová^a, Eva Langhamerová^a, Radko Rajmon^a, Pavla Maňásková-Postlerová^{a,c,*}

^a Department of Veterinary Sciences, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Czech Republic

^b Department of Plant Protection, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Czech Republic

^c Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Biotechnology, Czech Academy of Sciences, v.v.i., Biocev, Vestec, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 February 2018

Received in revised form 27 April 2018

Accepted 3 May 2018

Available online 04 May 2018

Keywords:

GPER

Adult boar testes

Epididymal spermatozoa

ABSTRACT

The G protein-coupled estrogen receptor (GPER) is a transmembrane receptor considered as a mediator of rapid non-genomic responses. GPER has been found in the male reproductive tract of many mammalian species. However, in adult boars, GPER has been reported only in ejaculated spermatozoa. Therefore, we focused on GPER detection in testicular and epididymal tissues and sperm cells in adult boars. We found GPER in Leydig cells and seminiferous tubules of boar testes and in the secretory epithelium of epididymis. A weaker signal was visible in smooth muscle cells and spermatozoa in the epididymal tubule. In spermatozoa isolated from epididymal parts, GPER was found to localize mainly in the sperm acrosome and flagellum. We immunodetected several protein bands in the extracts of the tissues and epididymal spermatozoa. A significantly higher amount of GPER mRNA was detected in the spermatozoa from caput epididymis, whereas the mRNA expression was lower in tissues of testes and caput epididymal. Our results showed the first evidence of GPER in boar epididymal spermatozoa. Moreover, the GPER localization in adult boar testes, epididymis, and mature spermatozoa suggests the involvement of estrogens via transmembrane receptor and rapid non-genomic signaling in both the sperm development and post-testicular maturation.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Estrogens play an important role in spermatogenesis, sperm maturation, capacitation, acrosome reaction, and fertilization [1]. The effect of estrogens is determined by the presence of estrogen receptors (ERs) in the cells of targeted tissues to which they are able to bind, thus initiating the cellular responses [2–4]. Besides classical nuclear/cytoplasmic ERs, ESR1 (ER α) and ESR2 (ER β) [2–4], the G protein-coupled estrogen receptor GPER (GPR30) has been described [5–7]. This transmembrane receptor is considered to be a mediator of rapid non-genomic estrogen responses in various types of cells [8,9]. It is structurally unrelated to classical estrogen receptors ESR1 and ESR2 [10]. Some investigators have claimed that it is strictly a cytosolic or endoplasmic reticulum-associated receptor, while others have maintained that it is a plasma membrane-associated one [8,11]. The biological function of GPER could be related to the cell type and localization [5,7]. It has been confirmed that the GPER signaling cascade also includes the release of intracellular calcium ions [12], which is closely related to the sperm

capacitation and acrosomal reaction [13] and indicates the GPER presence in spermatozoa. The proof of this is the detection of GPER in spermatozoa of humans and pigs [14]. GPER has been studied in the testes and epididymides of several mammals, such as the mouse [15,16], rat [17,18], sheep [19] and human [20,21]. In the pig, the GPER expression has been reported only in the epididymal tissue of postnatal boars [22]. In adult boar reproductive tissues, GPER detection has not been described yet. The available literature suggests that the detection and localization of GPER in the male reproductive tissue and spermatozoa has not yet been verified and fully documented. Additionally, the distribution of ERs has not been monitored across a single stage of sperm development by a uniform methodology, and particularly in the case of GPER, the findings can be described as very incomplete. In our present study, we focused on the detection of membrane estrogen receptor GPER in the testicular and epididymal tissues in adult boars as well as their localization in sperm cells during their development and maturation.

2. Materials and methods

The study was carried out according to Directive 2010/63/EU and guidelines of the Czech legislation (Directive 208/2004 Sb.).

* Corresponding author at: Institute of Biotechnology, Czech Academy of Sciences, v.v.i., Průmyslová 595, 252 50 Vestec, Czech Republic.
E-mail address: pavlam@ibt.cas.cz (P. Maňásková-Postlerová).

2.1. Collection of spermatozoa and tissues from boar reproductive organs

Epididymides and testes of adult boars (4 animals of Large white boars, slaughter weight of 110–115 kg, 9–12 months of age; 2 miniature pigs, slaughter weight of 70–100 kg, 7–12 months of age) were collected immediately post-mortem from the breeding station at the Institute of Animal Physiology and Genetics (Liběchov, Czech Republic) and at slaughterhouse of the Institute of Animal Science (Praha-Uhřetěves, Czech Republic) and transported on ice to the laboratory. Spermatozoa from the main parts of the epididymis (caput, corpus and cauda) were obtained by swimming up from the epididymal organ into phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 10 mM phosphate buffer, 2.7 mM potassium chloride and 137 mM sodium chloride, pH 7.4) after incubation for 30 min at 37 °C. Tissue pieces were removed by centrifugation for 5 min at 50g. Then spermatozoa were separated from the buffer by centrifugation (20 min at 300g) and used for protein extraction, mRNA isolation and immunofluorescence.

Tissues of the boar reproductive tract (testes, caput, corpus, and cauda epididymis) were cut to small pieces and kept at –70 °C for the isolation of mRNA and preparation of protein extracts. Pieces of the testes and main parts of epididymis were frozen in blocks with tissue-freezing medium (Jung, Nussloch, Germany) in liquid nitrogen and stored at –70 °C. Cryosections of 5-µm thickness were prepared.

2.2. Sperm and tissue extract preparation

Proteins from spermatozoa isolated from different parts of the epididymis (caput, corpus, and cauda) were extracted using sodium dodecyl sulphate (SDS) sample buffer (2% SDS in 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) for 30 min on ice and vortexed every 5 min. For sperm samples, 5×10^7 sperm cells counted in Makler counting chamber were dissolved in 150 µl of SDS sample buffer. Testicular and epididymal tissues from caput, corpus and cauda (100 mg) were homogenized in 500 µl of 1% Triton X-100 in 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) with 50 mM NaCl using homogenizer IKA T10 basic (IKA Werke, Staufen, Germany). Detergent was removed from the tissue extracts using 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's protocol. Extracts were dissolved in reducing sample buffer (2% SDS in 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) for sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis.

2.3. SDS-electrophoresis with immunoblotting

SDS-electrophoresis and the Western blot technique were used for GPER detection and were carried out using protocols based on standard methods [23,24]. Samples containing protein equivalent to 5×10^6 sperm cells and 25 µg per lane were run in 4% stacking and 12% running SDS polyacrylamide gel using Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad, Hercules, CA) as molecular weight markers. After transferring proteins onto a nitrocellulose membrane, nonspecific sites were blocked with 5% Blotting-Grade Blocker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) in PBS at 4 °C overnight. GPER was detected by primary polyclonal rabbit antibody against human GPR30 (K-19-R, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) diluted 1:500 in PBS, followed by peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Bio-Rad). The antibody reaction was visualized by chemiluminescent substrate SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Scientific) and the blot was screened with Azure c600 Gel Imaging System (Sierra Ct, Dublin, CA) to visualize the corresponding interaction bands. As a negative control, blots were incubated with immunoglobulins from rabbit serum (Sigma-Aldrich) in the same concentration as the primary antibody.

2.4. Indirect immunofluorescence technique – localization of GPER in the tissues and spermatozoa

Indirect immunofluorescence was used to detect the presence of GPER in the main parts of boar epididymis (caput, corpus and cauda) and testes, and in spermatozoa isolated from the boar adult epididymis by specific polyclonal antibody. Cryosections (5-µm thick) and spermatozoa of the epididymis were fixed in frozen (–20 °C) acetone and methanol (1:1) for 10 and 5 min, respectively. After blocking with Superblock (PBS) Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), samples were incubated with rabbit polyclonal antibody against human GPR30 (K-19-R, Santa Cruz) diluted 1:100 in PBS overnight at 4 °C followed by incubation with goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). For acrosome integrity evaluation, spermatozoa were incubated with PNA-Rhodamine (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Samples covered by VectaShield-DAPI (Vector Laboratories) were viewed and evaluated with a Nikon Eclipse E600 fluorescent microscope with Nikon Plan Fluor lenses and a Nikon Digital Sight DS-Fi 1 camera (Nikon, Japan) with the aid of NIS Elements imaging software (Laboratory imaging, a.s., Prague, Czech Republic). As controls, tissue sections and spermatozoa were incubated with the secondary antibody only.

2.5. RNA extraction and reverse transcription-PCR analysis

2.5.1. Optimization of PCR

Total RNA was isolated using Hybrid R™ (GeneAll Biotechnology, Co., Ltd., Seoul, Korea), from exactly the amount of spermatozoa and tissues (tissues and spermatozoa from caput, corpus and cauda epididymis, and testicular tissue), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified fluorometrically (Qubit 3.0, Invitrogen, ThermoFisher). First-strand cDNAs were synthesized from individual RNA using HyperScript™ (GeneAll Biotechnology). The cDNA amplification was performed by using specific forward and reverse primers (*GPER1* [*Sus scrofa*] forward: 5'CTGAGCTTCAAGCCGATGT3' and reverse: 5'CCCTAAGTAGCGCAGAGC3'; GenBank accession: NC_010445.4) derived from the porcine GPER sequence. Amplification was performed with initial heating at 95 °C for 5 min followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, annealing temperature at 70 °C for 45 s and 72 °C for 1 min, and terminal amplification at 72 °C for 5 min in the PCR Thermal Cycler (Bio-Rad). PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide.

2.5.2. Quantitative PCR (qRT-PCR)

Total RNA isolation and cDNA synthesis was described in the previous section. The same primer pair used in PCR was also used in qRT-PCR. Five-fold serial dilution of the PCR product was prepared and used as a template for generation of the standard curve. To ensure repeatability of the experiments, each sample was run in eight replicates. The qRT-PCR was set up using 2 µl first-strand cDNA template, 7.75 µl deionized H₂O, 0.25 M forward and reverse primer, and 10 µl $1 \times$ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). The thermal cycling conditions were 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C followed by 45 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 70 °C and 45 s at 72 °C, and at the end, melting curve from 65 °C to 95 °C by 0.5 °C increments for 5 s. The experiments were performed using the CFX Connect™, Real-Time System (Bio-Rad). An amplification-based threshold and adaptive baseline were selected as algorithms. The *GAPDH* housekeeping gene (forward: 5'ACCCAGAAGACTGTGGATGG 3' and reverse: 5'ACGCTGCTTCCACCCTTC 3') derived from the porcine sequence (GenBank accession No. AF017079; [25]) was used for data normalization. Final results were reported as the relative abundance level after normalizing with the mRNA expression level of the housekeeping gene.

2.6. Data analysis

Our data are from at least four independent experiments. Data obtained from RT-qPCR were analyzed by STATISTICA 12 software (StatSoft, Czech Republic) with one-way ANOVA with post-hoc Tukey test. Quantification of Western blot immunodetection was subjected to densitometric analysis in the program Image Studio Digits Ver 4.0 (LI-COR, Lincoln, NE). The antibody signal was related to the total protein concentration in the samples.

3. Results

3.1. Localization of GPER in the boar testes and epididymis

GPER localization was determined in cryosections of adult boar testes and epididymal parts with a specific polyclonal antibody. In the testicular tissue (Fig. 1), the GPER antibody stained the Leydig cells (L.c.) and spermatogenic cells (Spc.c.). GPER was localized in all parts of the epididymal tissue sections (caput, corpus and cauda). In caput epididymis, the antibody showed GPER in the membrane of secretory epithelium (SE) and in spermatozoa (Sp) within the tubule (Fig. 1B). A weaker signal was also observed in smooth muscle (SM). In the corpus part of boar epididymis, strong antibody staining was found in the membrane of secretory epithelium (SE) and a weak signal was visible in the smooth muscle (SM) tissue. Spermatozoa (Sp) inside the tubule were not clearly stained (Fig. 1C). The GPER signal was also observed in cryosections of cauda epididymis, namely in the secretory epithelial membrane (SE), smooth muscle (SM), and spermatozoa (Sp) within the epididymal tubule, likely in the acrosomal region (Fig. 1D).

3.2. Localization of GPER in boar epididymal spermatozoa

We found a weak antibody staining corresponding to the GPER protein in the flagellum of epididymal spermatozoa isolated from all investigated parts (caput, corpus and cauda) of the boar epididymis (Fig. 2A–D). Antibody staining with higher intensity was also observed in the neck and cytoplasmic droplets in the midpiece of some epididymal spermatozoa. In spermatozoa isolated from caput epididymis, the antibody also showed a weak diffuse staining in the sperm acrosome (Fig. 2A-Ep1 and 2B). Immunofluorescent labeling in spermatozoa from the corpus epididymal part was concentrated in the apical area of the sperm head (Fig. 2A-Ep2 and 2B). In contrast, spermatozoa isolated from cauda epididymis were clearly stained with the GPER antibody in the whole acrosome (Fig. 2A-Ep3 and 2D). In figures of epididymal spermatozoa, the acrosome integrity was proved by PNA-lectin staining of the outer acrosomal membrane (Fig. 2A–D, red).

3.3. Detection of GPER in protein extracts from boar epididymal sperm and reproductive tissues

We detected the GPER protein in the extracts from boar testicular and epididymal tissues with specific polyclonal antibody (Fig. 3A; black arrows). The antibody clearly recognized the protein band of 42 kDa in the caput and corpus epididymal extracts. In the cauda epididymal tissue extract, a band of 38 kDa was observed. In the testicular extract, the antibody detected two protein bands with molecular masses of 38 and 48 kDa. Additionally, a strong band was visible in molecular mass of approximately 60 kDa in the testicular tissue homogenate.

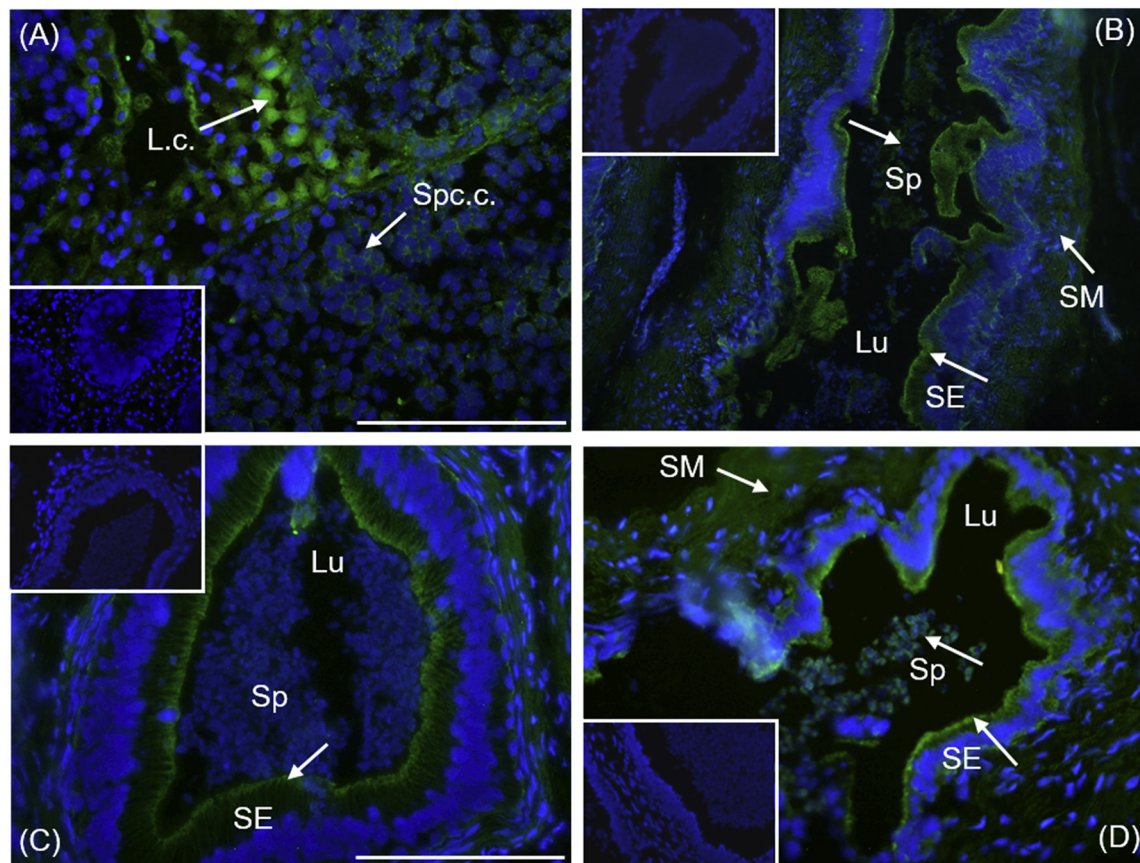


Fig. 1. Localization of GPER in adult boar testes (A), and parts of epididymis: caput (B), corpus (C) and cauda (D) with specific anti-GPER (K-19-R) polyclonal antibody using indirect immunofluorescent microscopy. L.c. – Leydig cells, Spc.c. – spermatogenic cells, SE – secretory epithelium, Lu – lumen; Sp – spermatozoa, SM – smooth muscle tissue; green color (FITC) – immunofluorescence presenting the reaction of antibody with antigen; blue color (DAPI) – staining of the cell nucleus; arrows show antibody staining; magnification 200 \times , scale bar = 100 μ m. Negative controls are inserted in corners. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

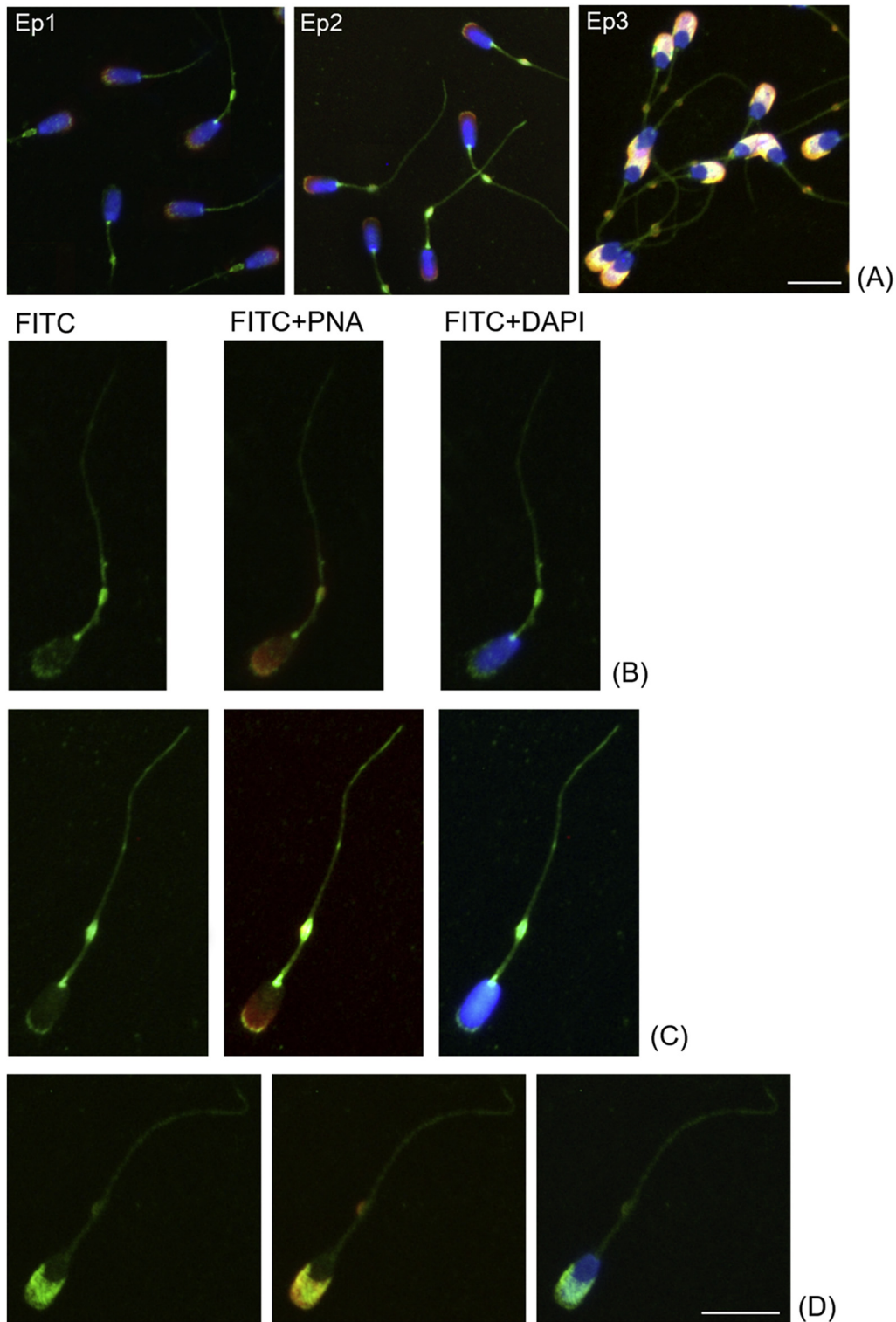


Fig. 2. Localization of GPER in boar spermatozoa isolated from epididymal tubule: caput (Ep1), corpus (Ep2) and cauda (Ep3). (A) Panel shows overlaid images with antibody staining of GPER, PNA-lectin staining of sperm acrosome and DAPI staining of sperm nucleus; (B) caput epididymal spermatozoon, (C) corpus epididymal spermatozoon, (D) cauda epididymal spermatozoon. Green color (FITC) – immunofluorescence presenting the reaction of polyclonal antibody (K-19-R) with antigen; blue color (DAPI) – staining of the cell nucleus; red color (Rhodamin) – PNA-lectin staining of sperm acrosome; magnification 400 \times and 600 \times , scale bar = 10 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The same band with less intensity was also registered in all epididymal extracts. In addition, we detected a weak band with molecular mass of 48 kDa in the testicular tissue. A diffuse band of approximately 54 kDa appeared in all tissue extracts, suggesting non-specific reaction with the polyclonal rabbit antiserum (Fig. 3A,B; grey arrow).

Specific polyclonal antibody to GPER recognized a protein band with molecular mass of 42 kDa in the extracts of spermatozoa isolated from the caput and corpus epididymal parts. In the cauda epididymal sperm extract, two bands with molecular masses of 38 and 48 kDa and similar density were determined, and one clear protein band approximately of

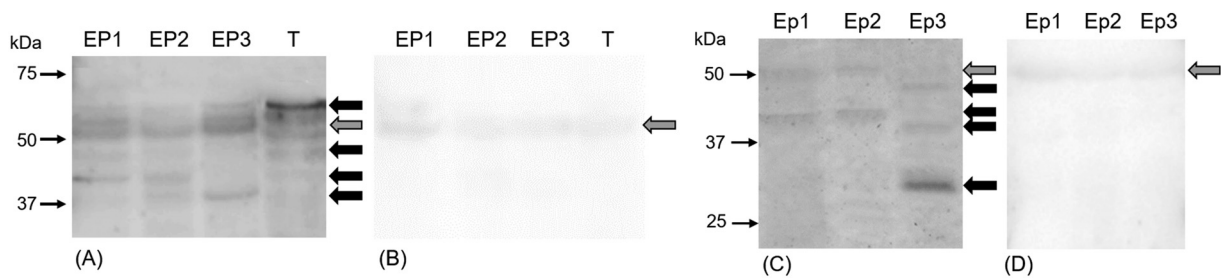


Fig. 3. Western blot analysis of the GPER detection in protein extracts from boar reproductive tissues: EP1 – caput epididymis, EP2 – corpus epididymis, EP3 – cauda epididymis, T – testes; (A) reaction with polyclonal rabbit antibody (K-19-R), (B) control with rabbit immunoglobulins. Western blot analysis of the GPER detection in protein extracts from spermatozoa isolated from boar epididymis: Ep1 – caput epididymis, Ep2 – corpus epididymis, Ep3 – cauda epididymis, T – testes; (C) reaction with polyclonal rabbit antibody (K-19-R), (D) control with rabbit immunoglobulins.

30 kDa was detected (Fig. 3C; black arrows). A diffuse band of approximately 50 kDa was discovered in all tissue extracts, suggesting non-specific reaction with the polyclonal rabbit antiserum (Fig. 3C,D; grey arrow).

3.4. mRNA expression in boar epididymal spermatozoa and testicular and epididymal tissues

Using mRNA isolated from the tissues of boar testes and three epididymal parts (caput, corpus and cauda) and spermatozoa from the same epididymal regions, we carried out qRT-PCR with primers for the porcine *GPER1* gene and the housekeeping *GAPDH* gene as a control. Higher expression of mRNA ($P < 0.05$) was found in the caput (EP1) and cauda (EP3) epididymal tissues in comparison with testicular (T) and corpus (EP2) epididymal samples (Fig. 4A). Nevertheless, a higher amount ($P < 0.01$) of mRNA was found in the spermatozoa isolated from caput epididymis (Ep1) in comparison with the boar spermatozoa from subsequent epididymal parts, corpus (Ep2) and cauda (Ep3) (Fig. 4B).

4. Discussion

Both endogenous estrogens and estrogens from the environment affect the organism via estrogen receptors (ERs). ERs were found not only in the cells of the female but also of the male reproductive tract. The effect of estrogens on the male reproductive tissues and development of gametes is essential for the reproductive success. Localization of ERs in the male reproductive tract and spermatozoa is therefore a prerequisite for understanding the estrogen effects on fertilization.

G protein-coupled estrogen receptor (GPER) is a membrane receptor considered as a mediator of the non-genomic responses of estrogens. In our study, we focused on the detection and localization of GPER in the testes and epididymis and in spermatozoa during their epididymal maturation. In a previous study, it has already been postulated that the expression of GPER in the corpus and cauda epididymis suggests a role for

non-classical estrogen signaling in the sperm maturation in the corpus, and sperm protection/storage in the cauda [18].

Literature data show the presence of both GPER membrane estrogen receptor and mRNA expression in the germ cells and testicular and epididymal tissues of several mammals. GPER has mostly been described in germ cells and reproductive organs of rats, where it was studied in spermatocytes and round spermatids [26,27], in Sertoli cells associated with normal testes development and function [17,28], and in Leydig cells [29]. In the rat epididymis, the highest GPER expression was found in the corpus and cauda, and lower expression was observed in the apical membrane and cytoplasm of epithelial cells in the caput [18]. Contrary to rats, the findings on GPER expression in humans have been inconsistent. Rago et al. [30] did not find GPER in germ cells but only in Leydig and Sertoli cells. In contrast, Oliveira et al. [31] reported expression of this estrogen receptor not only in Sertoli cells, but in the human germ cells, whereas Sandner et al. [32] identified GPER in interstitial and peritubular cells only. However, there is very little information on GPER detection in the reproductive tissues of adult boars. Katleba et al. [22] are the only authors to have detected GPER in prepubertal pigs (age 6.5 weeks) in the corpus epididymis. They immunolocalized GPER in epithelial cells, smooth muscle and stromal cells labeled with varying intensity [22]. We investigated GPER localization in all parts of the boar adult epididymis. We proved the presence of this receptor in the membrane of secretory cells, and a weak signal was visible in smooth muscle cells and spermatozoa within the tubule. In boar adult testes, our results showed the presence of GPER in Leydig cells and in cells within the seminiferous tubule; however, it is not evident which developmental stage of sperm cells was stained or whether GPER localized into Sertoli cells.

In addition to immunofluorescence studies, GPER has also been detected at the protein level in the extracts from germ cells or testicular and epididymal tissues of different mammals (rats, humans and sheep), where the GPER protein was reported with molecular mass of 42 kDa [19,26,27,30,32,33]. In another study of rats and humans, Western blot analysis showed a strong protein band corresponding to GPER between 50 and 60 kDa, and weak antibody reaction was visible in a

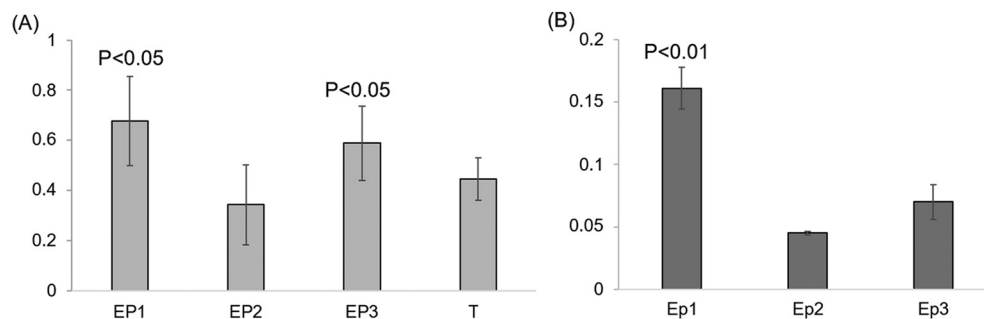


Fig. 4. Relative expression of GPER mRNA in tissues (A) of adult boar epididymis (EP1 – caput, EP2 – corpus, and EP3 – cauda) and testes (T), and in epididymal spermatozoa (B) isolated from epididymal parts (Ep1 – caput, Ep2 – corpus, and Ep3 – cauda).

protein band of 40 kDa in the extract from the testes [29]. Lu et al. [19] detected GPER in spermatocytes, spermatogonia, Sertoli and Leydig cells, and testicular spermatozoa of 6–12 month old rams, and in the main and interstitial cells of the corpus and cauda epididymis, where the amount of GPER protein and mRNA has been found the highest.

In Western blot analysis, the highest abundance of GPER was found in the testes represented by a strong antibody reaction with a protein band of ~60 kDa. The antibody showed a lower amount of GPER in the epididymal parts. We found a clear protein band of ~42 kDa in the extract from caput and corpus epididymis and the same band with weak intensity in the testes. This band corresponded to the GPER band of ~41 kDa in the corpus epididymis of prepubertal boars described by Katleba et al. [22]. Additionally, we detected other GPER-positive bands of 38 and 48 kDa in protein extracts of both tissue homogenates. Similarly, the protein band with molecular mass of 38 kDa has been found in germ cells and Sertoli cells in the cellular fractions of human testes [31]. In tissue extracts of the rat epididymis, two proteins have been shown to demonstrate the presence of GPER, namely 43 kDa and a weak band of 55 kDa [18]. Our protein bands detected with different molecular masses corresponding to GPER may suggest various glycosylated and non-glycosylated isoforms occurring in the spermatozoa and male reproductive tissues, similarly as described in MCF-7 breast cancer cells and myometrium [34].

Hess et al. [20] reported a positive finding of GPER mRNA in the epididymis of adult rats with high expression in human corpus epididymis. We found no significant differences in the amount of mRNA in all boar epididymal parts and testicular tissues. Nevertheless, we registered higher expression in the caput and cauda epididymis than in the testes and corpus epididymis. Fietz et al. [21] demonstrated significant expression of GPER mRNA in Leydig cells of the human testes.

In mature sperm cells, GPER has only been reported in ejaculated spermatozoa in the pig and human [14] and in stallion [35,36]. In stallion, this receptor was detected in the connecting piece (neck) of the sperm [35], and using electron microscopy, GPER was found at subcellular localization in the midpiece, neck, flagellum, and head [36]. In boar ejaculated sperm, the GPER receptor was localized in the acrosomal part and equatorial segment of the head and in the mitochondrial part of the flagellum [14]. In our study, we demonstrated the presence of GPER in spermatozoa isolated from distinct parts of the epididymal tubule with different patterns and intensity. Labeling of GPER in epididymal spermatozoa from the caput and corpus part was weaker and diffuse in the sperm acrosome and stronger in the flagellum with marked cytoplasmic droplets. In epididymal sperm from the cauda, the GPER localization was obvious predominantly in the acrosome. Previous GPER localization in ejaculated sperm [14] is similar to our findings on spermatozoa isolated from the cauda epididymis. This may suggest that during the epididymal maturation, GPER is present in the flagella without significant change up to their mature stage, whereas in the sperm acrosome its change is substantial. The intensity of antibody staining may suggest the exposure of epitopes for specific GPER antibody in the acrosomal part of spermatozoa during their passage throughout the epididymis. It is well-known that during sperm epididymal maturation, spermatozoa undergo a number of changes that lead to their fertilizing ability. These changes include the binding of proteins secreted by the epididymis to the sperm surface or post-translational processing of sperm proteins [37]. Proteins expressed mainly in the transition between the caput and corpus epididymis [38] are likely to bind to the sperm plasma membrane, and may thus cover the GPER epitopes recognized by the used antibody. This results in weak and diffuse GPER antibody staining of the acrosome in spermatozoa from the caput and corpus epididymis. Subsequently, in the cauda epididymis, some of these proteins leave the sperm surface [39], and thus GPER epitopes for the binding of antibodies can be revealed.

The GPER protein with a molecular weight of 42 kDa was detected in the extract from ejaculated sperm of the pig and human by Rago et al. [14]. We used the same polyclonal anti-GPER antibody as these authors

(Santa Cruz, K-19-R) and detected not only the protein band of 42 kDa in the caput and corpus epididymal sperm extracts, but also bands of 30, 38 and 48 kDa in the cauda epididymal spermatozoa. The protein band corresponding to GPER with a molecular mass of 38 kDa has also been reported in the extract from equine ejaculated spermatozoa [35].

The study by Rago et al. also described the presence of GPER mRNA in human and boar sperm. This is probably the first report on the positive finding of GPER in mature mammalian sperm [14]. We detected GPER mRNA in epididymal spermatozoa with differing relative expression. The highest amount of mRNA was found in spermatozoa from the caput epididymal part compared to spermatozoa from the two following parts. The lower amount of detected mRNA may indicate its active translation into the protein during epididymal maturation of spermatozoa or its possible degradation. The translation of mRNA into the protein in the sperm is questionable; however, it was described during the final maturation steps before fertilization by Gur and Brietbart [40].

The available literature suggests that the detection and localization of ERs in the male reproductive tissue and spermatozoa has not yet been verified and fully documented. The distribution of ERs has not been monitored across a single stage of sperm development by a uniform methodology, and particularly in the case of GPER, the findings can be described as very incomplete. Our results were the first to confirm the presence of GPER in epididymal spermatozoa not only of boars, but also of mammals. The protein was also found in adult boars in testicular and epididymal tissues at the protein and mRNA levels. Its localization in the epididymal epithelium and spermatozoa suggests potential involvement of estrogens not only in the sperm development, but also in post-testicular maturation in the epididymis.

Authors' contribution

R.K. was responsible for sample preparation, immunofluorescent methods, and manuscript preparation. M.M. carried out the RT-qPCR method. V.S. performed immunofluorescent microscopy and participated in the manuscript preparation. E.L. performed WB analysis. R.R. accomplished data analysis and participated in the manuscript preparation. P.P. designed the experiments, analyzed data and prepared the results for the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

Authors thank Dr. Hasmik Margaryan for preparation of the cryosections from boar reproductive organs and Dr. Šárka Takáčová for language revision. The work was supported by the Internal Grant Agency of the Czech University of Life Sciences CIGA Project No. 20162027, by CAS (RVO: 86652036), by the Grant Agency of the Czech Republic No. GA-18-11275S and by project BIOCEV (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) from the ERDF.

References

- [1] P. Dostálová, E. Žatecká, K. Dvořáková-Hortová, Of oestrogen and sperm: a review of the roles of oestrogens and oestrogen receptors in male reproduction, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 904.
- [2] M. Luconi, G. Forti, E. Baldi, Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80 (2002) 369–381.
- [3] F. Acconcia, R. Kumar, Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors, *Cancer Lett.* 238 (2006) 1–14.
- [4] S. Aquila, F. De Amicis, Steroid receptors and their ligands: effect on male gamete functions, *Exp. Cell Res.* 328 (2014) 303–313.
- [5] E.J. Filardo, J. Quinn, Y. Pang, C. Graeber, S. Shaw, J. Dong, P. Thomas, Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane, *Endocrinology* 148 (2007) 3236–3245.

- [6] C.M. Revankar, D.F. Cimino, L.A. Sklar, J.B. Arterburn, E.R. Prossnitz, A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling, *Science* 307 (2005) 1625–1630.
- [7] E.R. Prossnitz, J.B. Arterburn, L.A. Sklar, GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen, *Mol. Cell. Endocrinol.* 265–266 (2007) 138–142.
- [8] B. Olde, L.M.F. Leeb-Lundberg, GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology, *Trends Endocrinol. Metab.* 20 (2009) 409–416.
- [9] C. Wang, Y. Liu, J.M. Cao, G protein-coupled receptors: extranuclear mediators for the non-genomic actions of steroid, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 15412–15425.
- [10] H. Qian, J. Xuan, Y. Liu, G. Shi, Function of G-coupled estrogen receptor-1 in reproductive system tumors, *J. Immunol. Res.* 2016 (2016) 1–6 (ID 7128702).
- [11] N. Schwartz, A. Verma, C.B. Bivens, Z. Schwartz, B.D. Boyan, Rapid steroid hormone actions via membrane receptors, *Biochim. Biophys. Acta* 1863 (2016) 2289–2298.
- [12] E.R. Prossnitz, T.I. Oprea, L.A. Sklar, J.B. Arterburn, The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 109 (2008) 350–353.
- [13] S. Publicover, C.V. Harper, C. Barratt, $[Ca^{2+}]_i$ signaling in sperm – making the most of what you've got, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 235–242.
- [14] V. Rago, F. Giordano, E. Brunelli, D. Zito, S. Aquila, A. Carpino, Identification of G protein-coupled estrogen receptor in human and pig spermatozoa, *J. Anat.* 224 (2014) 732–736.
- [15] R. Siriani, A. Chimento, C. Ruggiero, A. De Luca, R. Lappano, S. Andó, M. Maggiolini, V. Pezzi, The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line, *Endocrinology* 149 (2008) 5043–5051.
- [16] C. Otto, I. Fuchs, G. Kauselmann, H. Kern, B. Zevnik, P. Andreasen, G. Schwarz, H. Altmann, M. Klewer, M. Schoor, R. Vonk, K.H. Fritzemeier, GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice, *Biol. Reprod.* 80 (2009) 34–41.
- [17] T.F. Lucas, C. Royer, E.R. Siu, M.F.M. Lazari, C.S. Porto, Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat Sertoli cells, *Biol. Reprod.* 83 (2010) 307–317.
- [18] G.B. Martínez-Traverso, C.A. Pearl, Immunolocalization of G protein-coupled estrogen receptor in the rat epididymis, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13 (2015) 48.
- [19] P. Lu, F. Wang, X. Song, Y. Liu, K. Zhang, N. Cao, Relative abundance of G protein-coupled receptor 30 and localization in testis and epididymis of sheep at different developmental stages, *Anim. Reprod. Sci.* 175 (2016) 10–17.
- [20] R.A. Hess, S.A.F. Fernandes, G.R.O. Gomes, C.A. Oliveria, M.F.M. Lazari, C.S. Porto, Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis, *J. Androl.* 32 (2011) 600–612.
- [21] D. Fietz, C. Ratzenböck, K. Hartmann, O. Raabe, S. Kliesch, W. Weidner, J. Klug, M. Bergmann, Expression pattern of estrogen receptors α and β and G-protein-coupled estrogen receptor 1 in the human testis, *Histochem. Cell Biol.* 142 (2014) 421–432.
- [22] K.D. Katleba, E.L. Legacki, A.J. Conley, T. Berger, Steroid regulation of early postnatal development in the corpus epididymidis of pigs, *J. Endocrinol.* 225 (2015) 125–134.
- [23] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [24] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 (1979) 4350–4354.
- [25] A. Gunawan, K. Kaewmala, M.J. Uddin, M.U. Cinar, D. Tesfaye, C. Phatsara, E. Tholen, C. Looft, K. Schellander, Association study and expression analysis of porcine ESR1 as a candidate gene for boar fertility and sperm quality, *Anim. Reprod. Sci.* 128 (2011) 11–21.
- [26] A. Chimento, R. Siriani, C. Delalande, D. Silandre, C. Bois, S. Andó, M. Maggiolini, S. Carreau, V. Pezzi, 17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha, *Mol. Cell. Endocrinol.* 320 (2010) 136–144.
- [27] A. Chimento, R. Siriani, F. Zolea, C. Bois, C. Delalande, S. Andó, M. Maggiolini, S. Aquila, S. Carreau, V. Pezzi, GPER and ESRs are expressed in rat round spermatids and mediate oestrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax, *Int. J. Androl.* 34 (2011) 420–429.
- [28] T.F. Lucas, M.T. Pimenta, R. Pisolato, M.F. Lazari, C.S. Porto, 17beta-estradiol signaling and regulation of Sertoli cell function, *Spermatogenesis* 1 (2011) 318–324.
- [29] L. Vaucher, M.G. Funaro, A. Mehta, A. Mielnik, A. Bolyakov, E.R. Prossnitz, P.N. Schlegel, D.A. Paduch, Activation of GPER-1 estradiol receptor downregulates production of testosterone in isolated rat Leydig cells and adult human testis, *PLoS One* 9 (2014), e92425.
- [30] V. Rago, F. Romeo, F. Giordano, M. Maggiolini, A. Carpino, Identification of the estrogen receptor GPER in neoplastic and non-neoplastic human testes, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9 (2011) 135.
- [31] P.F. Oliveira, M.G. Alves, A.D. Martins, S. Correia, R.L. Bernardino, J. Silva, A. Barros, M. Sousa, J.E. Cavaco, S. Socorro, Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in human seminiferous tubular cells, *Gen. Comp. Endocrinol.* 201 (2014) 16–20.
- [32] F. Sandner, H. Welter, J.U. Schwarzer, F.M. Köhn, H.F. Urbanski, A. Mayerhofer, Expression of the oestrogen receptor GPER by testicular peritubular cells is linked to sexual maturation and male fertility, *Andrology* 2 (2014) 695–701.
- [33] X. Cao, J. Huang, G. Zhang, W. Zuo, C. Lan, Q. Sun, D. Yang, D. Gao, C.H. Cheng, W.L. Zhou, Functional expression of G protein-coupled receptor 30 in immature rat epididymal epithelium, *Cell Biol. Int.* 41 (2016) 134–146.
- [34] K. Maiti, J.W. Paul, M. Read, E.C. Chan, S.C. Riley, P. Nahar, R.G. Smith, G-1-activated membrane estrogen receptors mediate increased contractility of the human myometrium, *Endocrinology* 152 (2011) 2448–2455.
- [35] B. Arkoun, G. Gautier, C. Delalande, I. Barrier-Battut, I. Guénon, D. Goux, H. Bouraïma-Lelong, Stallion spermatozoa: putative target of estrogens; presence of the estrogen receptors ESR1, ESR2 and identification of the estrogen-membrane receptor GPER, *Gen. Comp. Endocrinol.* 200 (2014) 35–43.
- [36] C. Gautier, I. Barrier-Battut, I. Guénon, D. Goux, C. Delalande, H. Bouraïma-Lelong, Implication of the estrogen receptors GPER, ESR1, ESR2 in post-testicular maturation of equine spermatozoa, *Gen. Comp. Endocrinol.* 233 (2016) 100–108.
- [37] G.A. Cornwall, Role of posttranslational protein modifications in epididymal sperm maturation and extracellular quality control, *Adv. Exp. Med. Biol.* 759 (2014) 159–180.
- [38] J.L. Dacheux, C. Belleannée, B. Guyonnet, V. Labas, A.P. Teixeira-Gomes, H. Ecroyd, F. Dacheux, The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa, *Syst Biol Reprod Med* 58 (2012) 197–210.
- [39] C. Belleannée, M. Belghazi, V. Labas, A.P. Teixeira-Gomes, J.L. Gatti, J.L. Dacheux, F. Dacheux, Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation, *Proteomics* 11 (2011) 1952–1964.
- [40] Y. Gur, H. Breitbart, Protein synthesis in sperm: dialog between mitochondria and cytoplasm, *Mol. Cell. Endocrinol.* 282 (2008) 45–55.