

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Změny v podílu sialových kyselin v glykoproteinech
spermií v průběhu *in vitro* kapacitace**

Diplomová práce

**Bc. Natálie Kalčicová
Reprodukční biotechnologie**

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

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Změny v podílu sialových kyselin v glykoproteinech spermii v průběhu *in vitro* kapacitace" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za její vstřícnost, ochotu a cenné rady při vedení této diplomové práce. Velké poděkování také patří mé rodině a blízkým za podporu při studiu.

Změny v podílu sialových kyselin v glykoproteinech spermii v průběhu *in vitro* kapacitace

Souhrn

Glykokalyx savčí spermie obsahuje sialové kyseliny. Sialová kyselina je sacharid, který má v reprodukci mnoho důležitých funkcí. Míra sializace je pro zralou spermii zásadní. Sializace buněčného povrchu chrání spermii před jejím rozpoznáním a odstraněním imunitním systémem uvnitř těla samice. Zároveň spermii udává negativní náboj, který výrazně ovlivňuje její strukturální vlastnosti. Sialové kyseliny mají vliv na motilitu spermii, mohou napomáhat spermii procházet skrz cervikální mukos nebo se vázat na epitel oviduktu a tvořit oviduktální rezervoár spermii. Míra sializace u některých druhů hraje roli při rozpoznání a vazbě na *zona pellucida* oocyty. Množství sialových kyselin na povrchu spermie se v průběhu života spermie mění. Desializace povrchu spermie po kapacitaci byla potvrzena u několika savčích druhů.

Cílem této diplomové práce bylo lokalizovat a detekovat sialoglykoproteiny na kančích spermii před a po *in vitro* kapacitaci pomocí lektinů MAA, SNA, WGA a protilátek proti sialové kyselině. Pomocí nepřímé fluorescenční mikroskopie jsme pozorovali změny na apikální a hlavní části akrozomu, postakrozomální oblasti hlavičky a na bičíku spermii. Nejvýraznější změny jsme detekovali na bičíku, kde byl po kapacitaci signifikantní pokles signálu vazby lektinu MAA a pokles vazby lektinu SNA v suspenzi. Na akrozomu byl u vazby lektinů MAA a SNA detekován mírný nárůst počtu spermii se signálem pouze v apikální části akrozomu. U lektinu WGA byl naopak pozorován velmi malý pokles počtu spermii se signálem pouze v apikální části akrozomu. Změny byly detekovány i v postakrozomální oblasti na spermii v suspenzi, kde byl u lektinu SNA pozorován 23% nárůst ve vazbě na spermie po kapacitaci, kdežto u vazby lektinu WGA byl pozorován naopak 68% pokles. Pomocí metody Western blot se nám podařilo detekovat sialoglykoproteiny v celkových a povrchových proteinových extraktech spermii. Signifikantní pokles v množství sialoglykoproteinů po kapacitaci na třetinu své původní hodnoty byl objeven u vazby lektinů MAA a SNA. Pomocí protilátky proti sialové kyselině jsme detekovali dva sialoglykoproteiny o podobné velikosti, u kterých jsme pozorovali pokles v množství po kapacitaci. Pomocí lektinů MAA, SNA a WGA jsme detekovali různé sialoglykoproteiny, u kterých jsme, až na jeden protein vázaný lektinem WGA, pozorovali pokles v množství po kapacitaci značící odstranění sialových kyselin nebo samotných proteinů ze spermii.

Naše výsledky potvrzují, že po *in vitro* kapacitaci dochází k desializaci povrchu kančí spermie. Detekce sialové kyseliny zejména na bičíku spermie by tak mohla sloužit jako vhodný marker pro hodnocení kapacitace u kance. Výsledky našich experimentů dále poukazují na možnou redistribuci sialoglykoproteinů na akrozomu kančích spermii po kapacitaci pro následnou vazbu na *zona pellucida* oocyty.

Klíčová slova: glykoproteiny, lektiny, kapacitace, sialová kyselina

Changes in the portion of sialic acids in glycoproteins of spermatozoa during *in vitro* capacitation

Summary

Mammalian sperm glycocalyx contains sialic acids. Sialic acid is a carbohydrate that has many important functions in reproduction. The level of sialylation is crucial for mature spermatozoa. Cell surface sialylation protects spermatozoa from its recognition and removal by the immune system within the female body. At the same time, sialic acid gives sperm a negative charge, which significantly affects its structural properties. Sialic acids affect sperm motility, can help sperm to pass through the cervical mucus, or to bind to the oviduct epithelium and form sperm oviductal reservoir. The level of sialylation in some species plays a role in the recognition and binding to the oocyte's *zona pellucida*. The number of sialic acids on the sperm surface changes over the life of the sperm. Desialylation of the sperm surface after capacitation has been confirmed in several mammalian species.

The aim of this diploma thesis was to localize and detect sialoglycoproteins on boar spermatozoa before and after *in vitro* capacitation using MAA, SNA, WGA lectins and sialic acid antibodies. Using indirect fluorescence microscopy, we observed changes in the apical region and anterior part of the acrosome, the post-acrosomal region of the head, and the tail of the sperm. We detected the most significant changes in the sperm tail. After capacitation, there was a significant decrease in the MAA lectin binding signal and a decrease in the SNA lectin binding signal in suspension. On the acrosome, a slight increase in sperm count with a signal was detected only in the apical part of the acrosome during the binding of MAA and SNA lectins. In contrast, WGA lectin showed a very small decrease in sperm count with a signal only in the apical part of the acrosome. Changes were also detected in the post-acrosomal region of sperm in suspension, where a 23% increase in the binding signal was observed for SNA on sperm after capacitation, while a 68% decrease was observed for WGA lectin binding. Using Western blotting, we were able to detect sialoglycoproteins in total and surface protein sperm extracts. A significant decrease in the number of sialoglycoproteins after capacitation to one-third of its original value was found in MAA and SNA lectin binding. Using a sialic acid antibody, we detected two sialoglycoproteins of similar size, in which we observed a decrease in the amount after capacitation. Using the MAA, SNA, and WGA lectins, we detected various sialoglycoproteins. Except for one WGA lectin-bound protein, we always detected a decrease in the amount after capacitation, indicating the removal of sialic acids or the proteins themselves from spermatozoa.

Our results confirm desialylation of the boar sperm surface after *in vitro* capacitation. The detection of sialic acid, especially on the tail of sperm, could thus serve as a marker for the evaluation of capacitation in boars. The results of our experiments further indicate a possible redistribution of sialoglycoproteins on the boar sperm acrosome after capacitation for subsequent binding to the oocyte's *zona pellucida*.

Keywords: glycoproteins, lectins, capacitation, sialic acid

Obsah

1	Úvod	1
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3	Literární rešerše.....	3
3.1	Vývoj a morfologie spermie	3
3.2	Glykoproteinový obal spermie.....	5
3.3	Epididymální maturace	7
3.4	Kapacitace.....	7
3.5	Sialová kyselina	9
3.5.1	Biologická role sialové kyseliny.....	9
3.5.1.1	Role v reprodukci	10
3.6	Detekce sialové kyseliny v glykoproteinech spermii pomocí lektinů.....	12
3.6.1	Změny sialoglykoproteinů během epididymální maturace.....	13
3.6.2	Změny sialoglykoproteinů během ejakulace	15
3.6.3	Změny sialoglykoproteinů během <i>in vitro</i> kapacitace	17
4	Metodika	18
4.1	Příprava vzorků spermii	18
4.1.1	Příprava ejakulovaných spermii z nativního ejakulátu.....	18
4.1.2	Příprava <i>in vitro</i> kapacitovaných spermii z nativního ejakulátu	19
4.1.3	Příprava ejakulovaných a kapacitovaných spermii z inseminační dávky.	19
4.1.4	Izolace povrchových proteinů spermii.....	19
4.2	SDS-PAGE (SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu).....	21
4.3	Elektropřenos proteinů (Western blot).....	22
4.4	Imunodetekce proteinů na membráně	23
4.5	Nepřímá fluorescenční mikroskopie.....	24
4.5.1	Příprava mikroskopických preparátů	24
4.5.1.1	Fixace spermii.....	24
4.5.1.2	Příprava vzorku v suspenzi spermii	25
4.5.2	Detekce sacharidových struktur.....	25
4.5.3	Detekce fosforylace pro kontrolu kapacitace	26
5	Výsledky.....	28
5.1	Lokalizace sialové kyseliny na spermii před a po kapacitaci.....	28
5.1.1	Hodnocení <i>in vitro</i> kapacitace	29
5.1.2	Vazba lektinů na spermie v suspenzi.....	29
5.1.2.1	Lokalizace sialové kyseliny pomocí MAA lektinu před a po kapacitaci.....	30
5.1.2.2	Lokalizace sialové kyseliny pomocí SNA lektinu před a po kapacitaci	35
5.1.2.3	Lokalizace sialové kyseliny pomocí WGA lektinu před a po kapacitaci	40

5.1.3	Vazba lektinů na spermie po fixaci aceton-metanolem	44
5.1.3.1	Lokalizace sialové kyseliny pomocí MAA lektinu před a po kapacitaci	44
5.1.3.2	Lokalizace sialové kyseliny pomocí SNA lektinu před a po kapacitaci	45
5.1.3.3	Lokalizace sialové kyseliny pomocí WGA lektinu před a po kapacitaci	49
5.1.4	Procentuální zastoupení signálu vazby lektinů na spermiích	54
5.2	Detekce sialové kyseliny v extraktech spermií před a po kapacitaci.....	54
5.2.1	Denzitometrická a statistická analýza	55
5.2.2	Detekce v celkových proteinových extraktech spermií	55
5.2.2.1	Detekce sialové kyseliny pomocí MAA lektinu.....	55
5.2.2.2	Detekce sialové kyseliny pomocí SNA lektinu	57
5.2.2.3	Detekce sialové kyseliny pomocí protilátky	58
5.2.3	Detekce v povrchových proteinových extraktech spermií.....	60
5.2.3.1	Detekce sialové kyseliny pomocí MAA lektinu.....	61
5.2.3.2	Detekce sialové kyseliny pomocí SNA lektinu	62
5.2.3.3	Detekce sialové kyseliny pomocí WGA lektinu	63
6	Diskuze	65
7	Závěr.....	77
8	Literatura.....	79
9	Seznam použitých zkratk.....	89

1 Úvod

Povrch savčí spermie je pokryt silnou vrstvou sacharidových struktur zvanou glykokalyx, která dává spermii mnoho důležitých vlastností (Schröter et al. 1999). Glykokalyx si lze představit jako „molekulární prales“, ve kterém se peptidové kostry rozrůstají a větví pomocí navázaných sacharidových řetězců (Teclé & Gagneux 2015). Je známo, že povrchové glykoproteiny spermie jsou syntetizovány ve varleti. Po opuštění varlete a umlčení translační aktivity spermie jsou povrchové složky nadále upravovány, nahrazovány a odstraňovány (Schröter et al. 1999). K významným modifikacím této vrstvy dochází při zrání spermie uvnitř samčího reprodukčního traktu a následně během ejakulace a kapacitace uvnitř těla samice. Tyto úpravy výrazně ovlivňují vlastnosti spermie. Glykokalyx se obecně uplatňuje hlavně při ochraně spermie před samičím imunitním systémem a při molekulárním rozpoznávání gamet (Teclé & Gagneux 2015). Úroveň glykosylace povrchu spermie významným způsobem souvisí se schopností spermie oplodnit vajíčko (Schröter et al. 1999).

Je známo, že glykokalyx savčí spermie je bohatý na sialové kyseliny – sacharidy kyselé povahy, které mají v životě spermie mnoho důležitých funkcí. Tou hlavní funkcí je ochrana spermie před imunitní odpovědí samice, které spermie musí čelit, jakmile se dostane do samčího reprodukčního traktu (Toshimori et al. 1991). Dále je uváděno, že různými způsoby ovlivňují motilitu (van Vuuren et al. 1992; Lassalle & Testart 1994; Fernandez-Fuertes et al. 2018) a pomáhají spermii migrovat skrz cervikální mukos a vázat se na řasnatou výstelku epitelu oviduktu (Tollner et al. 2008a; Tollner et al. 2008b). Po kapacitaci dochází u mnoha savčích druhů k desializaci povrchu spermie (Ma et al. 2012; Wang et al. 2018). Tato úprava patrně hraje u některých druhů klíčovou roli při následném rozpoznání a vazbě spermie na *zona pellucida* vajíčka (Lassalle & Testart 1994; Velásquez et al. 2007; Fernandez-Fuertes et al. 2018). Přesné molekulární mechanismy zapojení sialových kyselin do reprodukčních procesů nicméně nejsou dosud popsány.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Tato práce vychází z hypotézy, že míra sializace kančí spermií klesá v průběhu *in vitro* kapacity.

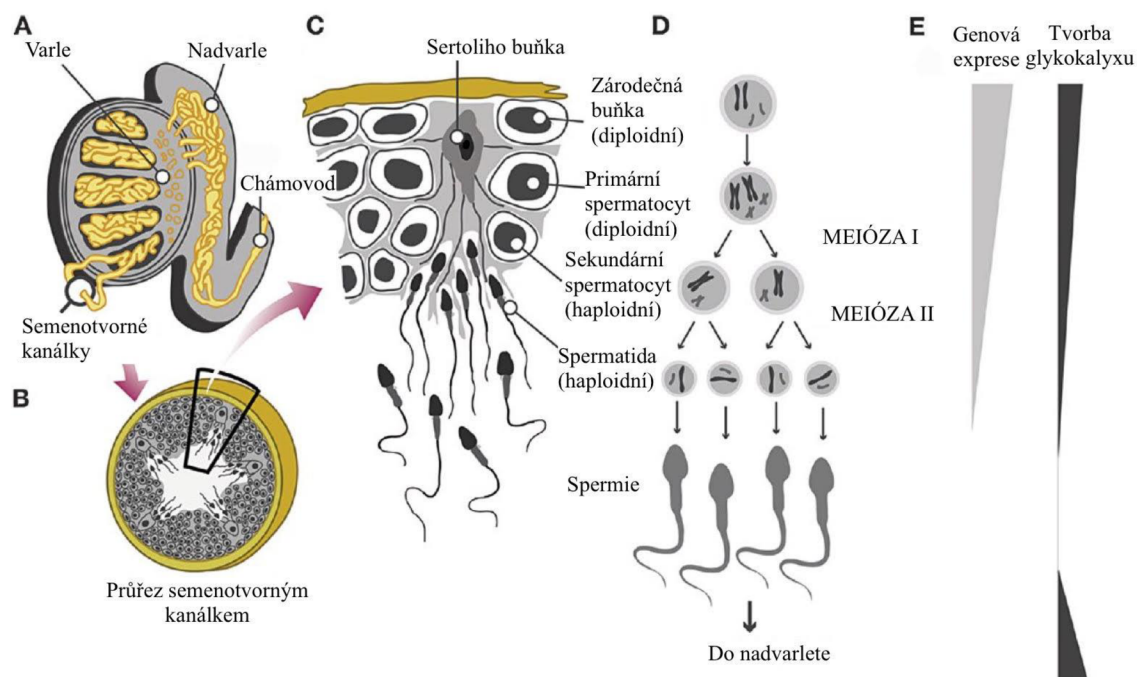
Cílem práce je:

- 1) lokalizace sialových kyselin v glykoproteinech spermií kance před a po *in vitro* kapacitaci pomocí nepřímé fluorescenční mikroskopie pomocí vybraných lektinů a protilátek;
- 2) detekce sialoglykoproteinů spermií kance před a po *in vitro* kapacitaci v celkových a povrchových extraktech spermií pomocí vybraných lektinů a protilátek.

3 Literární rešerše

3.1 Vývoj a morfologie spermie

Spermie se vyvíjejí v semenotvorných kanálcích varlat a jsou výsledkem procesu zvaného spermatogeneze, který se skládá ze tří hlavních fází: mitózy, meiózy a spermiohistogeneze. Během mitotické fáze se zárodečné buňky několikrát dělí a vytváří tak populaci spermatogonií. Následně vznikají diploidní primární spermatocyty (Toshimori & Eddy 2015). Při meiotické fázi dochází k redukci chromozomů na haploidní počet. Při prvním meiotickém dělení se mění primární spermatocyty na sekundární, které po druhém meiotickém dělení dávají vznik spermatidám (de Kretser et al. 1998). Spermiohistogeneze je proces, při kterém se kulatá spermatida přemění na vysoce specializovanou spermii, která je po epididymální maturaci schopná pohybu a po kapacitaci i oplození. Dochází při ní k formování akrozomu, kondenzaci jádra, tvorbě bičíku a vyloučení přebytečné cytoplazmy (Toshimori & Eddy 2015). Při spermatogenezi současně dochází k syntéze glykoproteinového obalu spermie (Teclé & Gagneux 2015). Schématické shrnutí procesu spermatogeneze je uvedeno na Obr. 1.

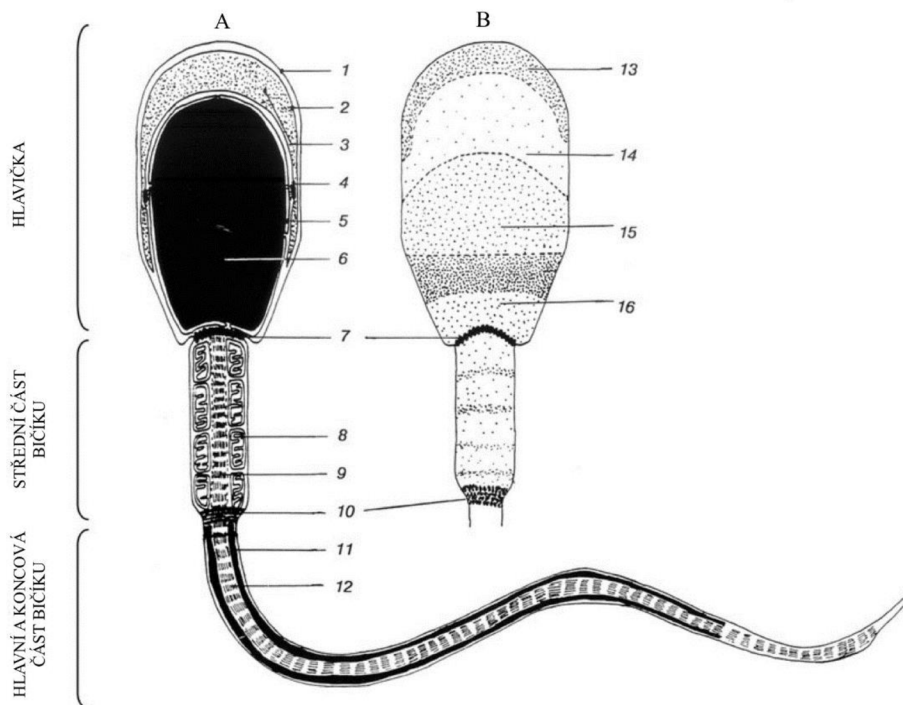


Obr. 1. Spermatogeneze u savců. A – spermatogeneze probíhá v semenotvorných kanálcích varlat, B – průřez semenotvorným kanálkem, C – zárodečné buňky (spermatogonie) se diferencují na primární a poté na sekundární spermatocyty, spermatidy a spermie, Sertoliho buňky přitom poskytují vhodné prostředí pro spermatogenezi, D – schéma meiózy I a II, E – porovnání míry genové exprese a tvorby glykokalyxu během vývoje a zrání spermie dle časové osy obrázků C a D. Převzato a upraveno podle Teclé & Gagneux (2015).

Spermie je pokrytá plazmatickou membránou. Mezi hlavní části spermie patří hlavička a bičík, které jsou spojené krčkem. Hlavička obsahuje jádro, akrozom a malé množství cytoplazmy s cytoskeletálními strukturami. Jádro obsahuje vysoce kondenzovaný chromatin (Toshimori & Eddy 2015). Jaderné proteiny spermie, histony, jsou při spermatogenezi nahrazovány protaminy. Jádro je pokryto zmenšeným jaderným obalem, ze kterého byly během vývoje odstraněny póry. Tvar jádra udržuje perinukleární théka, pevný obal někdy popisovaný

jako perinukleární matrix (Sutovsky & Manandhar 2006). Jádro je vpředu překryté akrozomem – cytoplazmatickým váčkem obaleným membránou s hydrolytickými enzymy a dalšími molekulami nezbytnými pro oplození. Akrozomální obsah uzavírá vnitřní a vnější akrozomální membrána. Hlavičku savčí spermie je možné dělit na akrozomální oblast a postakrozomální oblast. Plazmatická membrána akrozomu je dále rozdělena na apikální část, hlavní část a ekvatoriální segment. Velikost těchto oblastí se liší podle tvaru spermie. Plazmatická membrána postakrozomální oblasti pokrývá pásmo mezi spodním okrajem akrozomu a krčkem (Toshimori & Eddy 2015).

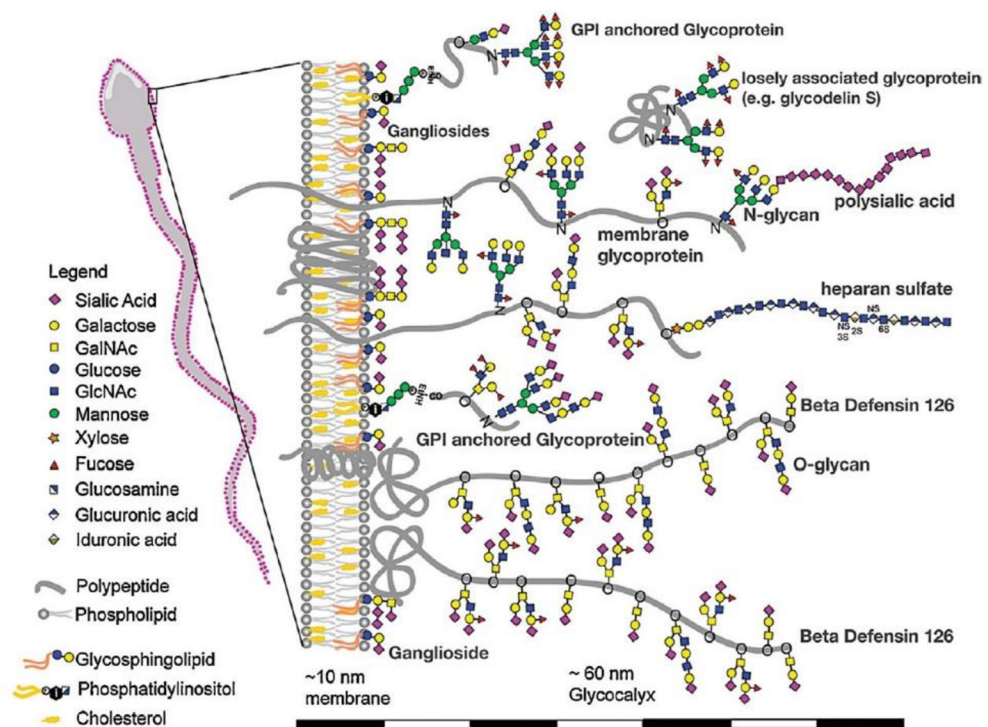
Bičik spermie je tvořen střední, hlavní a koncovou částí. Bičik obsahuje komplex mikrotubulů tvořící axonemu (Toshimori & Eddy 2015). Axonema se táhne celým bičikem, obsahuje 2 centrální tubuly obklopené 9 mikrotubulárními dublety, které jsou spojené dyneinovými ramínky. Krček savců (kromě hlodavců) obsahuje proximální centriolu. Axonema je ve střední části bičíku pokryta hustou šroubovicí mitochondrií, které generují energii pro pohyb spermie (Sutovsky & Manandhar 2006). Axonemu obklopují cytoskeletální struktury zvané vnější hustá vlákna vedoucí od krčku po hlavní část bičíku. Většinu bičíku tvoří hlavní část s jemnými vlákny obalující vnější hustá vlákna a axonemu. Střední část od hlavní části odděluje cytoskeletální prstenec – *annulus* (Toshimori & Eddy 2015). Schématický náčrt kančí spermie s popisky k vybraným strukturám je zobrazen na Obr. 2.



Obr. 2. Schématický náčrt kančí spermie. A – průřez spermie: 1 – plazmatická membrána, 2 – vnější akrozomální membrána, 3 – akrozomální matrix, 4 – vnitřní akrozomální membrána, 5 – jaderný obal, 6 – jádro, 7 – krček, 8 – mitochondrie, 9 – střední část bičíku, 10 – *annulus*, 11 – jemná vlákna tvořící pochvu, 12 – axonema a vnější hustá vlákna; B – povrch hlavičky a střední části bičíku spermie: 13 – apikální část akrozomu, 14 – hlavní část akrozomu, 15 – ekvatoriální segment akrozomu, 16 – postakrozomální oblast. Převzato a upraveno podle Gadella et al. (2008).

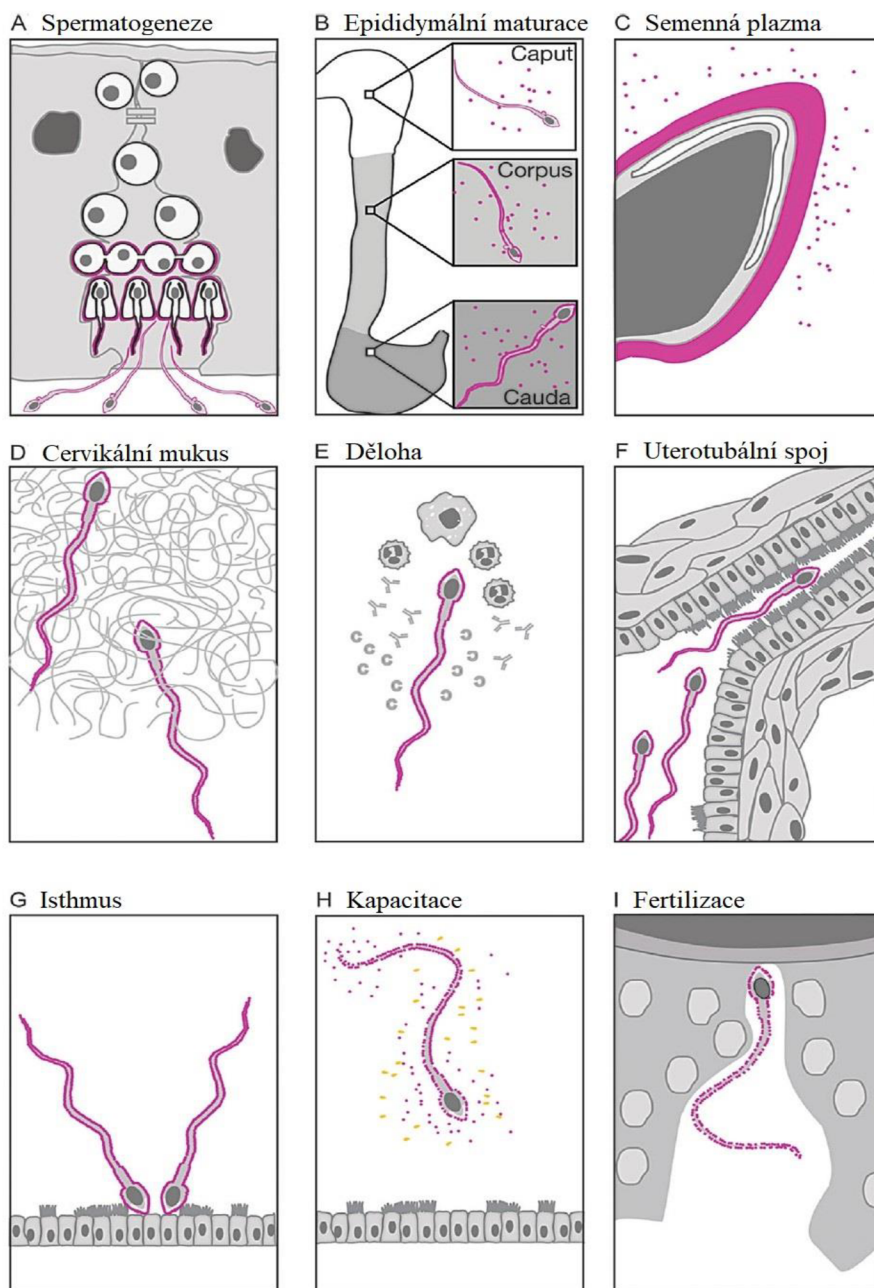
3.2 Glykoproteinový obal spermie

Všechny buňky jsou pokryté obalem zvaným glykokalyx, hustou vrstvou glykanů, oligosacharidů a polysacharidů připojených k proteinům a lipidům plazmatické membrány. Glykokalyx spermie je 20-60 nm silný (Bonet et al. 2013) a bohatý na sialové kyseliny (Schröter et al. 1999). Cukerné zbytky mohou být buď zakotvené do lipidové dvojvrstvy anebo kovalentně připojeny na povrch membrány přes polární skupiny molekul (proteinů a lipidů) či přes hydrofobní interakce (Obr. 3) (Schröter et al. 1999). Glykosylace spermie tvoří sacharidovou signaturu a zvyšuje specifitu interakce gamet. Mezi druhy se velmi různí (Dell et al. 1999). Zralý glykokalyx tvoří ochrannou bariéru proti prostředí v samičím reprodukčním traktu, mezibuněčný komunikační kanál pro spermie a má důležitou roli při rozpoznávání gamet (Schröter et al. 1999; Diekman 2003).



Obr. 3. Hlavní skupiny glykanů a glykokonjugátů na spermii. Převzato od Teclé & Gagneux (2015).

Některé glykoproteiny či glykolipidy, které jsou součástí plazmatické membrány spermie, mohou být syntetizované ve varlatech, jiné jsou produkovány vývodními kanálky, epitelem nadvarlat nebo přídatnými pohlavními žlázami. Na povrch buňky jsou inkorporovány během post-testikulární maturace. Další reorganizace nastává v reprodukčním traktu samice, kde dochází k odstranění glykoproteinů, kterým říkáme dekapacitační faktory. Také děložní a ovidukální sekrety upravují povrch spermie, což vede k *in vivo* kapacitaci. Povrchové glykoproteiny na spermii se mohou vázat na řasnatou výstelku epitelových buněk oviduktu a vytvářet tak ovidukální rezervoár spermií nebo se zapojují do rozpoznání a vazby spermie na glykoproteinovou vrstvu oocyta – *zona pellucida* (ZP). Dále se také podílí na tvorbě vazby s plazmatickou membránou oocyta při samotném oplodnění (Brewis & Gadella 2009). Schématický souhrn funkcí glykokalyxu spermie je zobrazen na Obr. 4.



Obr. 4. Funkce glykokalyxu spermie. A – Sbalování glykosylovaných proteinů během spermatogeneze, B – Modifikace glykanů v epididymu, C – Přidávání součástí semenné plazmy na glykokalyx a udržení spermie v nekapacitovaném stavu s neporušeným akrozomem, D – Potřeba určitých glykoproteinů pro průchod spermie skrz cervikální mukus, E – Sacharidové struktury chránící spermii před imunitním systémem samice a pomáhající spermii přežít v děloze, F – Průchod uterotubálním spojem umožněný glykosylací proteinů spermie, G – Tvorba ovidukálního rezervoáru vazbou na epitel pomocí sacharidových struktur, H – Ztráta glykanů, glykoproteinů a cholesterolu během kapacitace, I – Odhalení maskovaných funkčních molekul na povrchu spermie díky ztrátě glykanů a glykokonjugátů umožňuje interakci gamet. Převzato od Teclé & Gagneux (2015).

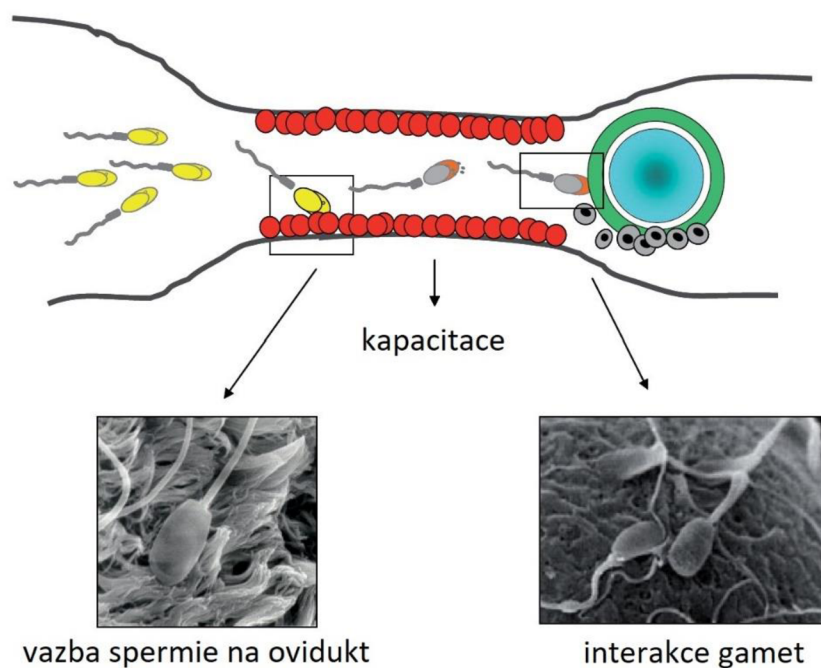
3.3 Epididymální maturace

Jakmile spermie opustí varle, není ještě schopná progresivního pohybu ani oplození. Aby tyto schopnosti získala, musí projít procesem epididymální maturace v nadvarleti samce a procesem kapacitace v reprodukčním traktu samice (Gervasi & Visconti 2017). S tím, jak spermie postupně prochází nadvarletem, stoupá její fertilizační schopnost (Robaire & Hinton 2015). Součástí tohoto procesu jsou četné biochemické a fyziologické změny, které zahrnují inkorporaci nových molekul produkovaných epitelem nadvarlete a post-translační modifikace proteinů syntetizovaných během spermatogeneze uvnitř buňky, neboť spermie již nejsou schopny si vyrobit vlastní proteiny (Gervasi & Visconti 2017). Do post-translačních modifikací patří i přidávání nebo odebrání fosfátových skupin u proteinů. Reverzibilní proteinová fosforylace hraje klíčovou roli v mnoha molekulárních procesech (Baker et al. 2012). *Epididymis* prasete je segmentovaný orgán a dělí se na tři části – *caput*, *corpus* a *cauda*. Každá z těchto částí vykazuje rozdílnou genovou expresi (Gervasi & Visconti 2017). Jak už bylo uvedeno, úroveň motility spermie se při epididymální maturaci výrazně mění. Testikulární spermie jsou buď nepohyblivé, nebo pouze slabě cukají bičičkem. Spermie z *caput epididymis* se pohybují v kruhu a spermie z *cauda* už se pohybují progresivně vpřed (Robaire & Hinton 2015). Během maturace také dochází k migraci cytoplazmatické kapky z krčku na *annulus*. Jestli při ejakulaci dojde ke ztrátě této kapky, záleží na druhu. Také stále není jasné, jestli má zadržení cytoplazmatické kapky na zralé spermii nějaký funkční význam (Cooper 2011).

Během průchodu epididymem se také mění obsah proteinového, sacharidového a lipidového obsahu spermie. Přenos proteinů a dalších molekul na spermii zajišťují hlavně epididymozomy – extracelulární vezikuly produkované tkání epididymu. Na spermii je přenášeno mnoho proteinů, které ovlivňují motilitu, akrozomální reakci nebo oplození (Sullivan & Saez 2013). Zároveň změnou prochází i sacharidy a lipidy v plazmatické membráně. Dochází k jejich přidání, odebrání nebo modifikaci (Saez et al. 2011).

3.4 Kapacitace

Biologická cesta spermií k oocyту začíná ejakulací. Spermie jsou nuceny se před imunitním systémem samice maskovat, aby nedošlo k jejich zničení. V momentu ejakulace spermie vykazují vysokou úroveň progresivní motility, ale jinak nejsou schopné rozpoznání a oplození oocyту. Jakmile dosáhnou isthmusu oviduktu, dojde ke kontaktu spermií s epitelem oviduktu, naváží se na něj a vytvoří tzv. oviduktální rezervoár (Aitken & Nixon 2013). Vazba spermie na epitel prodlužuje jejich dobu přežití (Gwathmey 2006). Následně dochází ke sledu postupných a koordinovaných maturačních změn spermie v pohlavním traktu samice, který označujeme jako kapacitaci. Zajímavé je, že děloha a vejcovody při tom působí synergicky, neboť spermie, které nejdříve projdou dělohou a následně dosáhnou vejcovodů kapacitují kratší dobu, než spermie přímo vložené do vejcovodů (Hunter & Rodriguez-Martinez 2004). Při kapacitaci dochází k sérii molekulárních modifikací na povrchu i uvnitř spermií, dokud nejsou připravené k oplození a dostanou signál k uvolnění z rezervoáru. Následně pokračují na své cestě k oocyту (Aitken & Nixon 2013). Proces kapacitace je shrnut na Obr. 5.

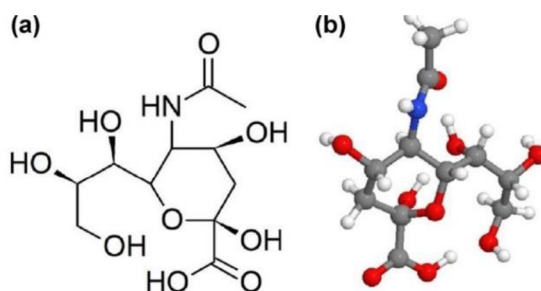


Obr. 5. Shrnutí procesu kapacitace. Spermie je zachycena v isthmickém regionu oviduktu a navázána na epitel pomocí sacharidových struktur. Když se blíží ovulace, je započata kapacitace. Spermie se uvolňuje a plave směrem k oocytu a dokončuje proces kapacitace. Kapacitovaná spermie následně rozpoznává oocyt. Převzato od Töpfer-Petersen et al. (2004).

Kapacitace zaujímá relativně dlouhé časové období. Liší se v závislosti na savčím druhu *in vivo*, od 1 hodiny u myši až po 6 hodin u některých primátů. Ve všech případech ale musí spermie zůstat po delší dobu uvnitř samičího reprodukčního traktu (Florman & Fissore 2015). Pojmeme kapacitace se obvykle rozumí přeměna charakteru a vlastností spermie až během jejího pobytu v samičím reprodukčním traktu, nicméně je možné, že kapacitace ve skutečnosti začíná během ejakulace, jakmile je spermie vystavená seminální tekutině. Celkový význam navození kapacitace seminální plazmou není zcela jasný a různí se podle druhu savce (Caballero et al. 2012). Při kapacitaci dochází ke změnám na plazmatické membráně a povrchu buňky, například desorpci – uvolňování nekovalentně uchycených proteinů, redistribuci – přerozdělení proteinů plazmatické membrány, difúzi lipidů, reorganizaci membránových domén, změnám v rozmístění fosfolipidů plazmatické membrány, výrazné hyperpolarizaci (posun do záporných hodnot membránového napětí) membránového potenciálu a ztrátě membránového cholesterolu. Dále dochází ke zvýšení fosforylace proteinů, změnám hodnot pH, koncentraci intracelulárního vápníku a jiných iontů. K tomuto rozsáhlému přeprogramování dochází jak v hlavičce, tak v bičíku spermie (Florman & Fissore 2015). Během kapacitace dochází k hyperaktivaci motility spermie (Yanagimachi 1970). Aktivovaná spermie se po ejakulaci pohybuje pomocí téměř symetrických ohybů bičíku (Ho et al. 2002). Hyperaktivovaná spermie má zvýšenou amplitudu ohybu bičíku, i když většinou pouze jen na jedné straně, což způsobuje asymetrický ohyb (Suarez 2008). Hyperaktivace bičíku se spouští zvýšením Ca^{2+} iontů v bičíku (Xia et al. 2007). Hyperaktivní pohyb je nezbytný pro oplození, neboť zajišťuje průchod ZP oocytu (Quill et al. 2003). S velkou pravděpodobností také pomáhá spermii přerušit vazbu s epitelem oviduktu a opustit oviduktní rezervoár. Také nejspíše zjednodušuje průchod skrz mukus v oviduktu nebo vrstvu folikulárních buněk *cumulus oophorus* (Jansen 1980; Suarez & Ho 2003).

3.5 Sialová kyselina

Tato kapitola je věnována cukrům kyselé povahy zvaným sialové kyseliny a jejich biologické roli v organismu se zaměřením na reprodukci. Sialová kyselina je skupinové označení pro deriváty neuraminové kyseliny (Schauer 1982). Tvoří rozmanitou rodinu monosacharidů, typicky navázaných na konce sacharidových řetězců glykoproteinů a glykolipidů (Ledeen & Yu 1976). Sialové kyseliny se hojně vyskytují na savčích buněčných površích a v sekretech. Je známo, že sialoglykany regulují strukturu, stabilitu, transport a funkci glykoproteinů a glykolipidů (Büll et al. 2014). Vzhledem k jejich umístění a velkému počtu mohou sialové kyseliny zprostředkovávat a/nebo modulovat širokou škálu fyziologických i patologických procesů (Varki et al. 2017). Jsou důležitými regulátory buněčných a molekulárních interakcí, v nichž mají dvojí funkci. Mohou buď maskovat rozpoznávací místo a fungovat jako molekulární mimikry usnadňující uniknutí před imunitním systémem (Varki 2008) nebo sloužit jako epitop (Kelm & Schauer 1997). Jejich negativní náboj a hydrofilní povaha jim udává mnoho rolí. Přestože v přírodě existuje přes padesát různých forem sialových kyselin, N-acetylneuraminová kyselina (Neu5Ac), která je zobrazena na Obr. 6 a její derivát N-glykolyneuraminová kyselina (Neu5Gc) jsou dvě nejčastější savčí sialové kyseliny (Varki et al. 2017).



N-acetylneuraminová kyselina (Neu5Ac) neboli sialová kyselina

Obr. 6. Struktura sialové kyseliny, Neu5Ac. (a) – schématický chemický model, (b) – barevný stereografický model, šedá – uhlík, červená – kyslík, modrá – dusík, bílá – vodík. Převzato a upraveno podle Hernández-Arteaga et al. (2017).

3.5.1 Biologická role sialové kyseliny

Sialoglykany vázané na membránu poskytují povrchu buňky aniontový neboli negativní náboj (Jeanloz & Codington 1976), který funguje jako bariéra a reguluje funkce povrchu buňky (Varki et al. 2017). Odpudivé elektrostatické síly ovlivňují konformaci makromolekul a buněčných membrán, zvyšují viskozitu glykoproteinů (Ahmad & McPhie 1980) a u některých typů buněk zabraňují agregaci (Schauer 1982). Dále se podílejí na pevnosti buněčného povrchu (Crook 1993). Sialové kyseliny tak způsobují vysoký stupeň viskozity mnohých mukózních sekretů například v dýchacím, trávicím nebo urogenitálním traktu (Devine & McKenzie 1992). Muciny obsahující sialové kyseliny fungující jako hydratační a ochranná bariéra na povrchu tkání, které jsou v kontaktu s okolním prostředím (Bansil et al. 1995). Zároveň jsou ale také základní jednotkou rozpoznávacích molekul a jejich role se mění podle typu buňky, tkáně a druhu (Varki et al. 2017). Sialová kyselina u obratlovců může sloužit jako biologická kamufláž, zamezuje totiž rozpoznání glykanů skrytých pod nimi. Skupinu siglektů (sialovou

kyselinu vázajících lektinů imunoglobulinové povahy), které lze najít na většině bílých krvinek imunitního systému, hrají kritickou roli v buněčné signalizaci imunitní odpovědi. Pomáhají imunitnímu systému rozpoznávat rozdíl mezi vlastními a nevlastními molekulami (Duan & Paulson 2020). Důležitou funkci mají sialové kyseliny i v nervovém systému. V mozku se nacházejí dvě skupiny sialoglykanů – gangliosidy a polysialové kyseliny. Gangliosidy jsou sialované glykosfingolipidy a jsou hlavními komponentami nervových buněk. Polysialová kyselina je nutná pro správný vývoj mozku (Schnaar et al. 2014).

Na druhou stranu, jelikož je sialová kyselina na povrchu buňky čteně zastoupená, není překvapením, že si početné zvířecí patogeny vyvinuly mechanismy, jak na ně zacílit. Vysoce specifické proteiny vázající sialovou kyselinu byly nejprve objeveny právě u patogenů a jejich toxinů a jsou u nich široce rozšířené (Varki et al. 2017). Nejznámější je virus chřipky (Weis et al. 1988), dále pak například bakterie *Helicobacter pylori* (Simon et al. 1997), parazitický prvok způsobující malárii *Plasmodium falciparum* (Reed et al. 2000) nebo i SARS-CoV-2 virus způsobující onemocnění Covid-19 (Baker et al. 2020). Některé bakteriální toxiny také cílí na sialoglykany, jako příklad lze uvést toxiny cholery (*Vibrio cholerae*) (Moustafa et al. 2004). Pozoruhodná je role sialové kyseliny u rakovinových buněk. Nádorové buňky mají zvýšenou expresi sialové kyseliny na membránových glykoproteinech a glykolipidech a také sekreci sialových kyselin uvnitř tumoru (Büll et al. 2014). Hypersializace podporuje růst nádorových buněk a koreluje se špatnou prognózou onemocnění pacientů s rakovinou (Schneider et al. 2001; Varki et al. 2009).

3.5.1.1 Role v reprodukci

Sialové kyseliny mají v reprodukci savců mnoho podstatných funkcí. Jak už bylo uvedeno, spermii savců obklopuje glykokalyx bohatý na sialové kyseliny, který jí dává důležité vlastnosti (Teclé & Gagneux 2015). Sialom (soubor sialových kyselin uvnitř i na povrchu) každé zralé spermie se skládá z desítek milionů sialových kyselin. Koncové sialové kyseliny jsou na spermie přidávány během průchodu *rete testis* nebo *ductuli efferentes*. Glykoproteiny bohaté na sialové kyseliny jsou sekretovány a přidávány na spermie i v epididymu (Calvo et al. 2000). U býka a berana je potvrzeno, že sializace spermie roste s průchodem skrz nadvarle (Holt 1980).

Hlavní funkcí sialové kyseliny je ochrana spermie proti působení samičího imunitního systému. Spermie jsou v samičím reprodukčním traktu cizí buňky, a proto musí čelit různým výzvám během jejich cesty k oplození. Látková a buněčná imunitní odpověď samice vede k výraznému snížení počtu spermií hned po inseminaci, kdy je do dělohy vpuštěno mnoho leukocytů (Thompson et al. 1992). Celková míra sialové kyseliny na savčí spermii pozitivně koreluje s ochranou před fagocytózou leukocyty (Toshimori et al. 1991). Savčí leukocyty produkují lektiny vázající sialovou kyselinu, které regulují imunitu – siglektly (viz kap 3.5.1). Většina siglektů má inhibiční efekt po navázání sialové kyseliny, jinými slovy vede k signalizaci zabráňující aktivaci imunitní odpovědi. Správné zapojení siglektů je pravděpodobně velice důležité pro přežití spermie. Nedostatečný počet sialových kyselin na povrchu znamená pro spermii zvýšené riziko odstranění samičím imunitním systémem (Crocker et al. 2007; Ma et al. 2016). Přítomnost sialových kyselin na povrchu spermií totiž slouží jako maskování antigenních skupin (Toshimori et al. 1988; Yudin et al. 2005).

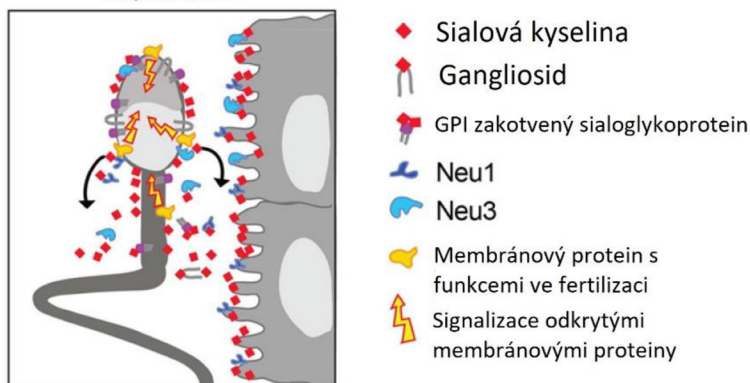
Dále je uváděno, že sialové kyseliny pomáhají spermii procházet skrz cervikální mukus (Tollner et al. 2008b) a vázat se na ovidukální epitel a vytvářet ovidukální rezervoár (Tollner et al. 2008a). Její nedostatek na spermii koreluje se subfertilitou a neschopností migrace v reprodukčním traktu (Tollner et al. 2011; Fernandez-Fuertes et al. 2018). Tvzení, že se sialové kyseliny zapojují do tvorby ovidukálního rezervoáru bylo potvrzeno u více savčích druhů včetně prasete, ale v těchto případech byly naopak nalezeny na epitelu oviduktu (Cortés et al. 2004; Kadirvel et al. 2012; Miller 2015). Naopak u některých savců negativně korelují se schopností spermie vázat se na ZP oocyty. U lidských spermií, které byly inkubovány s neuraminidázou (sialidázou) došlo k trojnásobnému zvýšení počtu spermií, které dokázaly rozeznat ZP (Lassalle & Testart 1994). Podobné výsledky byly uvedeny i u býka (Fernandez-Fuertes et al. 2018). Tento výsledek je nicméně v rozporu s poznatkami u myších kapacitovaných spermií (*Mus musculus*), u kterých vysoké dávky neuraminidázy znemožnily schopnost spermií vázat a oplodnit vajíčko. Zajímavé je, že stejný pokus u *Mus caroli* na spermie neměl žádný efekt (Lambert & Van Le 1984). Toto zjištění potvrzuje, že existují velké vnitrodruhové a mezidruhové rozdíly v molekulárních mechanismech rozpoznání ZP spermií. Ozgur et al. (1998) zjistili, že po ošetření lidských vajíček neuraminidázou došlo také ke zvýšení počtu spermií, které se navázaly na ZP. Současně uvádějí, že na ZP vedle sebe pravděpodobně koexistují vazebná místa pro sialovou kyselinu a vazebná místa, která jsou sialovou kyselinou skrytá a po odštěpení neuraminidázou se odhalí. Toto naznačuje, že na oocyty musí na některých místech dojít k redukci sialových kyselin pro úspěšnou vazbu na ZP, ale zároveň na jiných místech musí být stále přítomná. U prasete je potvrzené, že ZP oocyty obsahuje různě připojené sialové kyseliny (Rath et al. 2005). Na hlavičce lidských, býčích a beraních spermií navíc byly nalezeny siglekty se schopností vázat sialovou kyselinu (Alkhodair et al. 2018).

Je prokázáno, že při kapacitaci u savců dochází ke ztrátě sialových kyselin na spermii (Focarelli et al. 1995; Vázquez et al. 1996; Jiménez et al. 2003; Ma et al. 2012; Fernandez-Fuertes et al. 2018). Ma et al. (2012) detekovali dvě sialidázy (Neu1 a Neu3) zapojující se do desializace spermie během kapacitace (Obr. 7).

Model desializace spermie

Sialové kyseliny maskují funkci proteinů důležitých pro reprodukci

Samičí reprodukční trakt
kapacitace



Obr. 7. Model desializace spermie během kapacitace. Neu1 a Neu3 jsou zodpovědné za odstranění terminálních sialových kyselin a následně jsou samy uvolněny. Gangliosidy a sialoglykoproteiny jsou také uvolněny. Odkryté glykoproteiny se zapojují do signalizace během kapacitace. Převzato a upraveno podle Ma et al. (2012).

Poukazují na to, že nedostatečná míra sialidáz má spojitost s některými formami idiopatické neplodnosti u mužů. Částečná ztráta sialových kyselin by mohla odkrýt funkční skupiny a receptory pod nimi nutné pro navázání na ZP oocyty a podílet se na signalizaci a reorganizaci membrány spermie (Ma et al. 2012). Například je možné, že odkrývá receptory na lidské spermii, které umožňují se navázat na sializovaný ligand na ZP oocyty, jak popisují Pang et al. (2011). S tímto tvrzením souhlasí i Ma et al. (2016), kteří uvádějí, že pro úspěšné oplození se musí udržet správná rovnováha mezi sializací a desializací spermie. Velásquez et al. (2007) potvrzují klíčovou roli sialové kyseliny při vazbě spermie na ZP u skotu. Dále navíc uvádějí, že po oplození je neuraminidáza pravděpodobně uvolňována kortikálními granuly a brání tak polyspermii. U skotu je nicméně po přidání neuraminidázy k oocytům s *cumulus oophorus* současně popisováno snížení šance úspěšného oplození a následný zhoršený vývoj embrya (Fernandez-Fuertes et al. 2018).

Množství sialové kyseliny je uváděno v pozitivní (Lassalle & Testart 1994; Fernandez-Fuertes et al. 2018) i negativní (van Vuuren et al. 1992; Ortiz et al. 2011) souvislosti s motilitou a v pozitivní korelaci s morfologickými vlastnostmi spermie u člověka (Gabriel et al. 1994). Sialová kyselina nachází své využití i v asistované reprodukci jako marker pro selekci spermií na základě tzv. zeta potenciálu. Zeta potenciál je náboj o velikosti -16 až -20 mV, který nese zralá spermie a je lokalizován na rozhraní membrány spermie a okolí (Chan et al. 2006; Zahedi et al. 2013). Jak už bylo zmíněno v předchozí kapitole, negativní náboj na spermii je způsoben hlavně sialovými kyselinami navázanými na povrchu spermie (Holt 1980). Zeta metoda je neinvazivní metoda využívající tento jev pro selekci spermií s normální morfologií a hyperaktivním pohybem (Chan et al. 2006). Zeta potenciál je možné využít i pro selekci spermií na základě jejich pohlavního chromozomu. Důvodem je fakt, že spermie s X chromozomem mají o 33 % větší negativní náboj než spermie s chromozomem Y (Ishijima et al. 1991).

3.6 Detekce sialové kyseliny v glykoproteinech spermií pomocí lektinů

Glykoproteiny jsou strukturně komplexní molekuly sestavené z peptidové kostry s jedním nebo více kovalentně navázaných sacharidových řetězců. V závislosti na vazbě mezi aminokyselinovým zbytkem a cukernou složkou je lze rozdělit na dva hlavní typy, N-vázané glykany a O-vázané glykany. Změny glykoproteinů na povrchu spermií byly popsány u různých druhů savců během jejich vývoje, maturace, kapacitace a akrozomální reakce (Calvo et al. 2000). Přesnější popis těchto modifikací by nám umožnil lépe pochopit klíčové procesy fertilizace. Ke sledování takových změn se často používají lektiny. Lektinová histochemie dovoluje hodnotit expresi, distribuci a obměnu glykokonjugátů na membráně spermie (Vázquez et al. 1996). Lektiny můžeme najít v mnoha organismech jako zprostředkovatele biologických procesů. Tvoří skupinu neimunitních proteinů nejen rostlinného původu schopných rozpoznávat a specificky vázat různé sacharidové struktury (Vijayan & Chandra 1999). Jsou to zpravidla multimerní molekuly obsahující dvě a více vazebných míst pro jejich cukerný ligand (Koehler 1981). Liší se od imunoglobulinů, které mají sacharidy jako substrát (Brooks 2017). Lektiny se díky jejich schopnosti rozlišovat izomery cukrů, jejich větvení, vazby a terminální řetězce komplexních glykanů, používají pro analýzu glykosylace buněčných povrchů (včetně spermií) a tkání po řadu let (Accogli et al. 2017). Pro sledování změn povrchových sacharidů

lze využít lektiny spojené s fluorochromy nebo biotinovými systémy (Lis & Sharon 1998). Specifita lektinu je obvykle vyjádřena pomocí jednoduchého sacharidu, disacharidu nebo trisacharidu, který nejefektivněji inhibuje jeho vazbu, například lektin *Maackia amurensis* (MAA) s vazbou/specifitou k α -2,3 vázané sialové kyselině (Brooks 2017).

Specifita vybraných lektinů rozpoznávajících sialovou kyselinu je popsána v Tab. 1.

Tab. 1. Původ a vazebná specifita vybraných lektinů. Upraveno podle Calvo et al. (2000).

Lektin	Zkratka	Vazebná specifita
<i>Maackia amurensis agglutinin</i>	MAA	Sialová kyselina (vázaná α -2,3)
<i>Sambucus nigra agglutinin</i>	SNA	Sialová kyselina (vázaná α -2,6)
<i>Triticum vulgare (Wheat germ) agglutinin</i>	WGA	Sialová kyselina (multivalentní vazba) N-acetylglukosamin
<i>Limax flavus agglutinin</i>	LFA	Sialová kyselina (multivalentní vazba)

3.6.1 Změny sialoglykoproteinů během epididymální maturace

Jak již bylo uvedeno, savčí *epididymis* poskytuje patřičné molekulární prostředí pro zrání spermií. Takový proces zahrnuje intracelulární a extracelulární změny ve spermiích, včetně přetváření plazmatické membrány a úpravy cukerných složek povrchových glykoproteinů (Tulsiani 2003, 2006). Povrchové proteiny během průchodu epididymem mizí, jsou upravovány nebo jsou naopak nově přidávány. Tyto nové komponenty pocházejí z epididymálních sekretů. Přítomnost nebo naopak absence některých z těchto antigenů se často dává do souvislosti s vlastnostmi spermie jako je rozpoznání nebo vazba na ZP a plazmatickou membránu oocytu. Nicméně přesné molekulární mechanismy, které způsobují maturaci u spermií, nebyly dodnes s přesností definovány (Dacheux et al. 2003).

Glykohydrolázy a glykosyltransferázy jsou enzymy obsažené ve vysokých koncentracích v epididymální tekutině, která obklopuje spermie, a jsou schopné upravovat jejich povrchové glykoproteiny. Glykohydrolázy odštěpují cukerné zbytky z glykokonjugátů. Glykosyltransferázy přidávají cukerné zbytky na akceptorovou molekulu – glykoprotein nebo glykolipid. Například v lumenální tekutině potkana byla v *caput epididymis* detekována vysoká aktivita sialyltransferáz, které způsobují navázání sialových kyselin na povrch epididymálních spermií (Tulsiani et al. 1993).

Fakt, že některé lumenální glykoproteiny sekretované epitelem epididymu se vážou na spermie během průchodu epididymem, byly ověřeny v mnoha studiích pomocí lektinů. Tato skutečnost je důsledkem přidávání nových glykoproteinů na povrch spermií a nových sacharidů právě pomocí lumenálních glykosyltransferáz (Calvo et al. 2000). Naopak ztráta afinity pro některý z lektinů během průchodu epididymem na povrchu spermií může být buď maskováním terminálních cukerných zbytků přidáním jiných cukrů glykosyltransferázami nebo oddělením terminálního cukerného zbytku glykohydrolázami (Tulsiani 2006).

Lektinů používaných při studiích změn na povrchu spermií je nespočet, dále budou zmíněny jen lektiny s vazbou na sialovou kyselinu. Lektin MAA (*Maackia amurensis agglutinin*) rozpoznává sialovou kyselinu vázanou α 2,3 na galaktózu N- a O-vázaných glykanů. V kančím epitelu byly nalezeny MAA pozitivní buňky ve všech třech částech epididymu. Tento

lektin neznačil testikulární spermie, ale vázal se také na spermie jak v *caput*, *corpus*, tak i *cauda*. Vzhledem k těmto informacím lze předpokládat, že nejen u kančího epididymu dochází k rozsáhlé sialyzaci spermií působením luminálních sialotransferáz nebo začleněním nových sialoglykoproteinů sekretovaných z buněk epitelu (Calvo et al. 2000). MAA značí v lidském epididymu buňky, které se podílejí na sekreci, dále se váže i v luminální tekutině epididymu (Arenas et al. 1998).

SNA lektin (*Sambucus nigra agglutinin*) také rozpoznává sialovou kyselinu, ale vázanou α -2,6 na galaktózu N- a O-vázaných glykanů. Tento lektin značil u člověka buňky epididymu, které se podílejí na sekreci, ale v lumen nalezen nebyl. U kance značil buňky ve všech třech částech epididymu a velmi slabě značil spermie pouze v *cauda epididymis* (Calvo et al. 2000).

Tabulka (Obr. 8) souhrnně popisuje změny vybraných lektinů během epididymální maturace u různých druhů savců. Pokud se zaměříme na lektin WGA (*Triticum vulgare agglutinin*), který rozpoznává N-acetylglukosamin (GlcNAc) a také sialovou kyselinu, zjistíme, že u býka a opice byl pozorován pokles v množství tohoto lektinu na spermiích, kdežto u kozla, myši, berana, potkana a hřebce byl detekován nárůst vazby v průběhu epididymální maturace. U králíka byl detekován nárůst i pokles vazby WGA na králíčí epididymální spermie díky odlišným výsledkům studií, které se touto problematikou zabývaly.

Species		Bull	Goat	Monkey	Mouse	Rabbit	Ram	Rat	Stallion
Lectin	Sugar residue	Comparison of caput vs. cauda spermatozoa							
Con A	D-mannose D-glucose	↓	=	↑	↓ a	= a	=	↓ b	ND
SBA	D-N-acetyl-galactosamine	=	=	ND	ND	ND	↓	ND	ND
RCA	D-galactose and L-arabinose	=	ND	ND	ND	↓ a	↓	ND	↓
PNA	D-galactose	↑ (acrosome)	=	ND	ND	ND	↓	↓ (58 kDa) a	↓
WGA	Sialic acid and N-acetyl- D-glucosamine	↓	↑ (acrosome)	↓	↑ b	↓ a ↑ (acrosome) b	↑	↑ (86, 47 and 37 kDa) a ↑ (acrosome) c	↑
DBA	D-N-acetyl-galactosamine	↓	↑	ND	ND	ND	ND	=	ND
UEA	α -L-fucose	=	↑	ND	ND	ND	ND	=	↑
PSA	D-mannose	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↓ (118 kDa) a ↓ (58 kDa) a	ND
References		Arya & Vanha-Perttula (1985)	Bains <i>et al.</i> (1993)	Fain-Maurel <i>et al.</i> (1984)	a: Schlegel <i>et al.</i> (1986) b: Kumar <i>et al.</i> (1990)	a: Nicolson <i>et al.</i> (1977) b: Kumar <i>et al.</i> (1990)	Magargee <i>et al.</i> (1988)	a: Srivastava & Olson (1991) b: Olson & Danzo (1981) c: Kumar <i>et al.</i> (1990)	Retamal <i>et al.</i> (2000)

Obr. 8. Změny v kompozici glykokalyxu spermií během epididymální maturace u různých zvířat. Šipky značí nárůst nebo pokles sacharidových struktur během maturace spermií. Zkratka ND značí nedostupná data. Lektin WGA vázající sialovou kyselinu a N-acetylglukosamin je zeleně zvýrazněn. Převzato z Gervasi & Visconti (2017).

Arenas et al. (1996) popsali WGA pozitivitu u lidských vývodných kanálků, celého epididymis a epididymální tekutiny. Vazba WGA lektinu také na tekutinu v lumen epididymu ukazuje na sekreci glykoproteinu se sacharidovými strukturami rozpoznávanými WGA. V kančím epididymu byla vazba WGA také zaznamenána ve všech částech epitelu i na spermiích (Calvo et al. 2000) a také zde byl nalezen sialoglykoprotein, který váže WGA lektin v *corpus* a *cauda* (Dacheux & Dacheux 1988). Lektin WGA značil silně kančí spermie z *caput* a *cauda*, spermie z *cauda* ale značil s menší intenzitou, což značí úbytek sialových kyselin a GlcNAc na povrchu spermií (Calvo et al. 2000). U psa byly epididymální spermie v *caput* a *corpus* značeny lektinem WGA na akrozomu, ale jen částečně, zatímco v *cauda* a *vas deferens* byl značen celý akrozom (Bains et al. 1993). Jak už bylo uvedeno, vazba spermií pro WGA roste při průchodu epididymem i u berana, kdy byla na začátku epididymálního kanálku

nalezena pouze slabá vazba WGA na celém povrchu spermie. Nicméně během průchodu nastává velký nárůst značení WGA, který zůstává i po ejakulaci, což ukazuje na přidání N-acetylglukosaminylových nebo sialylových zbytků na povrch spermie (Magargee et al. 1988). Hammerstedt et al. (1982) uvádějí, že u berana se WGA nevázálo na spermie v *caput* a *corpus*, ale v proximální i distální části *cauda* už ano. Po přidání neuramidázy k spermii z *cauda epididymis*, se úroveň glykosylace spermie vrátila zpět úroveň glykosylace spermie pozorované v *caput*, což potvrzuje skutečnost, že jde o sialové zbytky, které jsou přidávány na povrch spermie a jsou pro zrání spermie podstatné (Magargee et al. 1988). Epididymální sialoglykoproteiny byly popsány u různých druhů savců a souvisí s epididymální maturací (Harayama et al. 1994).

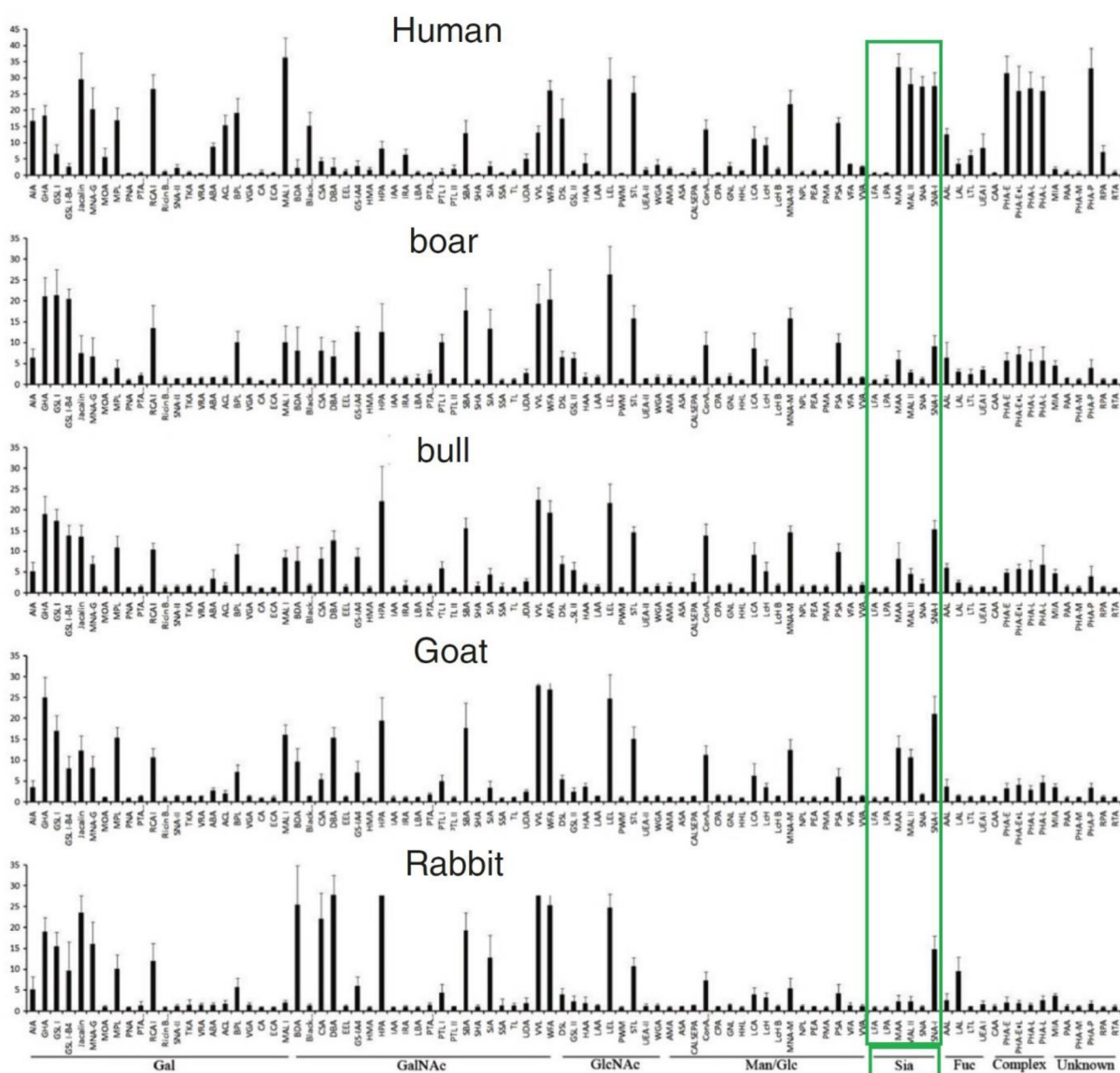
3.6.2 Změny sialoglykoproteinů během ejakulace

Glykokalyx ejakulovaných spermií obsahuje glykoproteiny sekretované epitelem vývodných kanálků, nadvarletem, semenných váčků, prostaty a Cowperových žláz, které se váží na povrch spermií během průchodu samčím pohlavním traktem (Accogli et al. 2017). Proteom epididymálních a ejakulovaných spermií se kvantitativně liší. Bylo identifikováno 1723 proteinů v rámci kančího proteomu spermie a 22 z nich se vyskytovalo ve větší míře na ejakulovaných spermii v porovnání s epididymálními. Glykokalyx ejakulovaných spermií je obohacen adsorpcí nových glykanů sekretovaných ze samčích přídatných pohlavních žláz, obalující celou buňku vrstvou antigenů a glykokonjugátů ovlivňujících imunitní odpověď. Některé tyto glykokonjugáty mají svou roli v přežití nebo transportu spermií samčím i samičím reprodukčním traktem jako např.: sialová kyselina, beta-defensin, glykodelin-S, CD glykoproteiny, N-acetylglukosamin, monosacharidy jako je manóza, glukóza, fukóza, galaktóza, glykosaminglykany a jiné. U berana seminální plazma zapříčiňuje zvýšení N-acetylglukosaminu, ale snížení sialové kyseliny. Tyto důležité změny glykokalyxu spermie mají klíčovou roli v tom, jakým směrem se bude spermie pohybovat, jak bude interagovat s cervikálním hlenem, uterinním a oviduktním epitelem, s buňkami imunitního systému a oocytom v průběhu oplození (Rickard & de Graaf 2020).

I značení lektiny se po ejakulaci mění a značí tak změny glykokonjugátů na povrchu spermie. Xin et al. (2014) pomocí mikročipů zanalyzovali vazbu 50 různých lektinů na lidské, prasečí, býčí, kozlí a králíčí ejakulované spermie (Obr. 9). Uvádí, že největší míru sializace lze najít na ejakulovaných spermii člověka, u kterého byla nalezena silná detekce α -2,3 (MAA) a α -2,6 (SNA) vázaných sialových kyselin. U kance, býka, kozla nebo králíka lze najít sialovou kyselinu v menší míře. Dále udává, že výrazně nižší míra sializace spermie je speciálně u prasete. Jako důvod nicméně uvádí kryoprezervaci spermií, která by mohla způsobovat částečnou ztrátu sialové kyseliny z kančích spermií.

Holt (1980) také potvrzuje, že ejakulované býčí a beraní spermie obsahují na svém povrchu sialovou kyselinu. Pomocí neuraminidázy zjistili, že více sialové kyseliny je na bičíku spermie než na hlavičce (Holt 1980). Magargee et al. (1988) tuto informaci potvrzuje a uvádí, že nárůst vazby WGA z *cauda epididymis* na povrch beraní spermie zůstal i po ejakulaci. Jiménez et al. (2003) sledovali vazbu lektinu WGA u kance a u ejakulovaných spermií se vázalo na celou spermii. Robles-Gómez et al. (2021) pomocí vazby WGA objevili vazbu na akrozomu nebo celé hlavičce. Wang et al. (2018) pomocí boronové kyseliny lokalizovali sialovou kyselinu

na celé kančí ejakulované spermii. Další studie zabývající se vazbou WGA na kančí ejakulované spermie lokalizovala sialovou kyselinu na celé spermii bez postakrozomální oblasti (Vázquez et al. 1996). WGA na býčích spermii po ejakulaci vykazovalo vazbu hlavně na přední část hlavičky (Medeiros & Parrish 1996). Vazbu lektinu WGA na lidské spermie studovali i Gómez-Torres (2012) a popisují vazbu na akrozomu. Hřebčí ejakulované spermie vykazovaly vazbu s MAA, SNA i WGA (Desantis et al. 2010). Zajímavostí jsou buvolí ejakulované spermie, u kterých je signál lektinu MAA viditelný pouze na bičíku (Batra et al. 2020). Lasalle & Testart (1994) uvádí, že u 80 % ejakulovaných lidských spermii byla nalezena vazba lektinu WGA. Focarelli et al. (1995) pomocí lektinů MAA a SNA lokalizovali sialovou kyselinu na lidských ejakulovaných spermii.



Obr. 9. Kvantitativní výsledky vazby lektinů na spermie člověka, kance, býka, kozla a králíka pomocí mikročipu. Gal – galaktóza, GalNAc – N-acetylgalaktosamin, GlcNAc – N-acetylglukosamin, Man/Glc – manóza/glukóza, Sia – sialová kyselina, Fuc – fukóza. Skupina lektinů vázající sialovou kyselinu je zvýrazněna zeleně. Převzato od Xin et al. (2014).

3.6.3 Změny sialoglykoproteinů během *in vitro* kapacity

Je známo, že glykokalyx spermie prochází při kapacitaci změnami, které jsou nutné pro navázání spermie na oocyt a akrozomální reakci. Tyto změny nejsou dosud přesně pochopeny, ale jsou velmi důležité pro rozpoznávání gamet a oplození savců. Během kapacity dochází k biochemickým modifikacím povrchu membrány. Periferní glykoproteiny se z povrchu odstraňují, integrální proteiny se přemísťují. Membránu kančí spermie hojně obklopuje N-acetylglukosamin, sialová kyselina a zbytky manózy a fukózy. Lze je najít na celé plazmatické membráně, včetně bičíku a akrozomu (Jiménez et al. 2003). Je prokázáno, že při kapacitaci u savců dochází ke ztrátě sialových kyselin na spermii (Focarelli et al. 1995; Vázquez et al. 1996; Jiménez et al. 2003; Ma et al. 2012). Ma et al. (2012) nastínili, proč k takové ztrátě během kapacity dochází. Detekovali u člověka volné Neu5Ac a u myši i volné Neu5Gc monosacharidy v *in vitro* kapacitačním médiu po inkubaci se spermii. Takové zjištění naznačuje, že ke snížení počtu sialových kyselin dochází pomocí sialidáz. Sialidázy na spermii našli dvě, Neu1 a Neu3. Právě tyto sialidázy by se měly podílet na odstraňování sialových kyselin během kapacity. Navíc u myši během kapacity detekovali úbytek sializovaného glykoproteinu CD52 (Ma et al. 2012).

Snížení sialové kyseliny po kapacitaci bylo také pozorováno u motilních lidských spermií (Lassalle & Testart 1994). Úbytek WGA po kapacitaci u člověka potvrzují Gómez-Torres et al. (2012). U buvolích spermií po kapacitaci klesl fluorescenční signál lektinu MAA o 77 % (Batra et al. 2020). Wang et al. (2018) pomocí lektinu WGA lokalizovali sialovou kyselinu na ejakulovaných a kapacitovaných kančích spermii. Průtoková cytometrie potvrdila, že po kapacitaci došlo ke snížení míry sializace spermie. Wang et al. (2018) dále detekovali dva sializované dekapacitační faktory AWN (Dostálová et al. 1995a; Dostálová et al. 1995b) a PSP-I (Nimtz et al. 1999) pocházející z kančí semenné plazmy, u kterých po kapacitaci zaregistrovali úbytek. Pokles vazby WGA lektinu po kapacitaci u kance potvrzuje i Vázquez et al. (1996), kdy byl detekován celkový úbytek WGA na akrozomu spermie. Jiménez et al. (2003) sledovali stejný lektin u kance a po kapacitaci potvrdil výrazné snížení vazby, a to hlavně na bičíku, většina zbývajících signálů byla koncentrována na akrozomu. Robles-Gómez et al. (2021) nezaznamenali po kapacitaci výrazné změny v lokalizaci vazby WGA lektinu, ale uvádějí, že došlo k odstranění sialových kyselin z oblasti akrozomu. Pomocí průtokové cytometrie bylo potvrzeno, že vazba WGA na spermie skotu po kapacitaci klesá o 78 % a ztráta byla viditelná hlavně na hlavičce (Medeiros & Parrish 1996). Taitzoglou et al. (2007) uvádí dokonce 91 % ztrátu. Pokles vazby WGA po kapacitaci byl také popsán u křečka (Ahuja 1984), kozla (Bawa et al. 1993), morčete a myši (Koehler 1981). Focarelli et al. (1995) sledovali změny sializace během kapacity na lidských spermii pomocí lektinů MAA a SNA, kdy byl signál vazby po kapacitaci redukován. Focarelli et al. (1990a) v dřívější studii identifikovali pomocí gelové elektroforézy u ejakulovaných lidských spermií několik povrchových sialoglykoproteinů. Později však pak po kapacitaci detekovali pouze jeden sialovaný povrchový glykoprotein a potvrdili tak jejich silný úbytek (Focarelli et al. 1995).

4 Metodika

4.1 Příprava vzorků spermií

Nativní ejakulát a inseminační dávky pocházely z ISK Skršín nebo od dodavatele PROAGRO Nymburk a.s. Vzorky spermií byly odebrány od dospělých kanců plemene Duroc nebo Landrase a následně transportovány ve zkumavkách a ochranném boxu na KVD ČZU. Se zpracováním nativního ejakulátu se začalo nejpozději do 5 hodin od doby odběru kvůli možnosti znehodnocení po delší časové prodlevě. Inseminační dávky byly skladovány při 17 °C a zpracovány nejpozději do 2 dní od odběru.

4.1.1 Příprava ejakulovaných spermií z nativního ejakulátu

U nativního ejakulátu byla spočítána koncentrace spermií na 1 ml. K 10 µl nativního ejakulátu bylo přidáno 990 µl destilované vody. Spermie se počítaly na světelném mikroskopu Nikon (YS100; Nikon, Japonsko) pomocí Bürkerovy komůrky (hloubka: 0,1 mm, plocha malého čtverce: 0,0025 mm², plocha velkého čtverce 0,04 mm²). Mezi komůrku a krycí sklo bylo nanášeno 10 µl suspenze spermií a v počítací mřížce byl sečten celkový počet spermií v 40 čtvercích na levé a horní obvodové straně. Toto číslo bylo následně dosazeno do vzorce pro výpočet počtu buněk v 1 mm³ suspenze (**b**):

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

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

Podle výsledku byl nativní ejakulát naředěn v Basic TL-Hepes (v 1 litru destilované vody bylo rozpuštěno 6,6634 g NaCl, 0,2386 g KCl, 0,0408 g NaH₂PO₄, 1,4 ml laktátu sodného, 0,1018 g MgCl₂ x 6H₂O, 2,383 g HEPES, 0,0220 g pyruvátu sodného, 2,186 g sorbitolu, 0,025 g gentamicinu, 0,065 g penicilinu a 0,1 g polyvinylalkoholu) zahřátým ve vodní lázni na 38 °C na požadovanou koncentraci 5x10⁷ buněk/ml. Naředěný ejakulát o objemu 10 ml byl za účelem odmytí semenné plazmy stočen na centrifuze (LC-8 5000, Benchmark Scientific Inc., USA) po dobu 10 minut při 300 x g a při laboratorní teplotě. Následně byl odstraněn supernatant a k peletě spermií bylo napipetováno 10 ml Basic TL-Hepes zahřátým na 38 °C a suspenze byla jemně a opatrně promíchána, tak aby nedošlo k poškození spermií. Celý krok byl třikrát zopakován. Ejakulované spermie byly následně ještě třikrát promyty stejným způsobem v promývacím roztoku PBS (Phosphate-buffered saline; 0,01 M fosfátový pufr, 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,5; Sigma-Aldrich USA) a naředěny na 10 ml. Obsah byl rozdělen po 1 ml do mikrozkupek a opět odstředěn na centrifuze (Mikro 22R Hettich Zentrifugen, DJB Labcare, UK) po dobu 10 minut, 300 x g při 17 °C. Po stočení byl odstraněn supernatant a vzorky byly rovnou použity pro SDS gelovou elektroforézu, nepřímou fluorescenční mikroskopii nebo zamrazeny při - 20 °C.

4.1.2 Příprava *in vitro* kapacitovaných spermií z nativního ejakulátu

K *in vitro* kapacitaci byly použity spermie v peletách po třetím promytí Basic TL-Hepes. K peletě spermií bylo napipetováno 10 ml kapacitačního média a spermie byly opatrně resuspendovány. Kapacitační médium bylo připraveno smícháním 50 ml Basic TL-Hepes s 0,099 g 11 mM glukózy, 0,0275 g 5 mM pyruvátu, 1 g 2% BSA (bovinní sérový albumin), 0,0084 g NaHCO₃ a 0,0147 g 2 mM CaCl₂ x 2H₂O. Zkumavky byly následně vloženy do termostatu s pootevřenými víčky na 4 hodiny při teplotě 38 °C a 5 % CO₂. Po dvou hodinách byla suspenze jemně promíchána a opět vložena na zbývajících 2 hodiny do termostatu. Po uplynuté době byly spermie stočeny po dobu 10 minut při 300 x g při laboratorní teplotě. Supernatant byl odstraněn a kapacitované spermie byly následně ještě třikrát promyty v PBS a naředěny v tomto roztoku na objem 10 ml. Obsah byl rozdělen po 1 ml do mikrozkušavek a odstředěn na centrifuze (10 minut, 300 x g při 17 °C). Po stočení byl odstraněn supernatant a vzorky byly použity pro SDS gelové elektroforézu, nepřímou fluorescenční mikroskopii nebo zamrazeny při - 20 °C.

4.1.3 Příprava ejakulovaných a kapacitovaných spermií z inseminační dávky

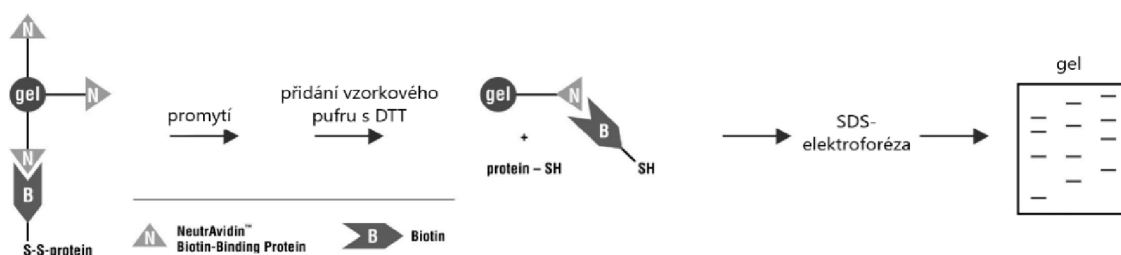
Z inseminační dávky bylo odebráno 5 ml a zbytek byl uložen do chladicího boxu s nastavenou teplotou na 17 °C. Obsah byl stočen na centrifuze při 300 x g po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Pomocí pipety byl odstraněn supernatant a k usazené peletě spermií bylo přidáno 5 ml roztoku PBS. Obsah byl resuspendován a stejným způsobem stočen na centrifuze za účelem odmytí ředidla. Tento krok byl třikrát zopakován. K získání vzorků ejakulovaných spermií byly promyté spermie naředěny pomocí roztoku PBS na 5 ml (koncentrace spermií: 5x10⁷/ml), resuspendovány, po 1 ml rozpipetovány do mikrozkušavek a odstředěny v centrifuze (10 minut, 300 x g při 17 °C). K *in vitro* kapacitaci byly použity promyté spermie v peletách, postup byl totožný jako u spermií z nativního ejakulátu (předchozí kapitola). Doba kapacitace v termostatu byla zkrácena na 2 hodiny. Poté byly spermie stočeny po dobu 10 minut při 300 x g při laboratorní teplotě. Supernatant byl odstraněn a kapacitované spermie byly následně ještě třikrát promyty v PBS a naředěny v tomto roztoku na 5 ml. Obsah byl rozpipetován do mikrozkušavek a odstředěn v centrifuze (10 minut, 300 x g při 17 °C). Po stočení byl odstraněn supernatant a vzorky byly rovnou použity pro SDS gelovou elektroforézu, nepřímou fluorescenční mikroskopii nebo zamrazeny při - 20 °C.

4.1.4 Izolace povrchových proteinů spermií

K izolaci povrchových glykoproteinů byla použita sada Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). K právě promytým ejakulovaným nebo kapacitovaným spermiím bylo do zkumavky přidáno 10 ml biotinylačního činidla za účelem navázání biotinu a označení proteinů na povrchu spermií. Biotinylační činidlo bylo vyrobeno rozpuštěním 12 mg Sulfo-NHS-SS-Biotinu v 48 ml PBS. Suspenze spermií a biotinylačního činidla byla v ruce opatrně promíchána. Suspenze byly poté uloženy na 30 minut do lednice při teplotě 4 °C a obsah byl průběžně lehce promícháván. Tento krok zajistil rovnoměrné navázání biotinu. Po inkubaci byl obsah rozdělen do dvou zkumavek a stočen na centrifuze (10 minut, 300 x g při 20 °C). Po odsátí supernatantu bylo k vytvořené peletě spermií přidáno 10 ml 1x

koncentrovaného TBS pufru (Tris buffered saline; 25 mM Tris, 160 mM NaCl, pH 7,8) a obsah byl resuspendován a znovu odstředěn na centrifuze (10 minut, 300 x g při 20 °C). Tento krok byl dvakrát zopakován. Po promytí a odsátí supernatantu bylo k peletce přidáno 500 µl 1x koncentrovaného TBS, suspenze byla opatrně resuspendována a přepipetována do nových mikrozkušavek a naposledy stejným způsobem stočena na centrifuze. Po odsátí supernatantu bylo do mikrozkušavek napipetováno 250 µl lyzačního pufru ze sady (Lysis Buffer). Obsah byl krátce vortexován a vložen do nádoby s ledem. Dalších 30 minut byly vzorky každých 5 minut po dobu 5 sekund vortexovány a opět uloženy na led. Lyzáty byly následně odstředěny (2 min, 10 000 x g při 4 °C) a supernatanty byly přepipetovány do nových mikrozkušavek. Ze sady byly vybrány 2 kolonky (Columns), které byly vloženy do sběrných mikrozkušavek (Collection Tubes), dále lahvička s avidinem navázaným na agarózové mikrokuličky (NeutrAvidin Agarose), který má schopnost navázat se na biotinylované proteiny. Obsah v lahvičce byl jemně promíchán, aby se vytvořila jednotná suspenze. Na kolonku bylo napipetováno 500 µl suspenze agarózových kuliček. Kolonka byla centrifugována 1 min, 1000 x g a supernatant byl odstraněn. Kolonka byla promyta 500 µl promývacího pufru ze sady (Wash Buffer) anebo 500 µl PBS-T (Phosphate-buffered saline with Tween; 1x konc. PBS, 0,1% Tween) a byla centrifugována 1 min při 1000 x g. Tento krok byl dvakrát zopakován. Kolonka byla uzavřena zátkou, aby bylo zamezeno vytečení obsahu při centrifugování. Na kolonku byly poté přidány připravené lyzáty spermií. Po uzavření byla kolonka vložena na rotační třepačku (MX-T6-Pro, DLAB Scientific, USA), kde byly biotinylované proteiny inkubovány 1 hodinu s avidinem.

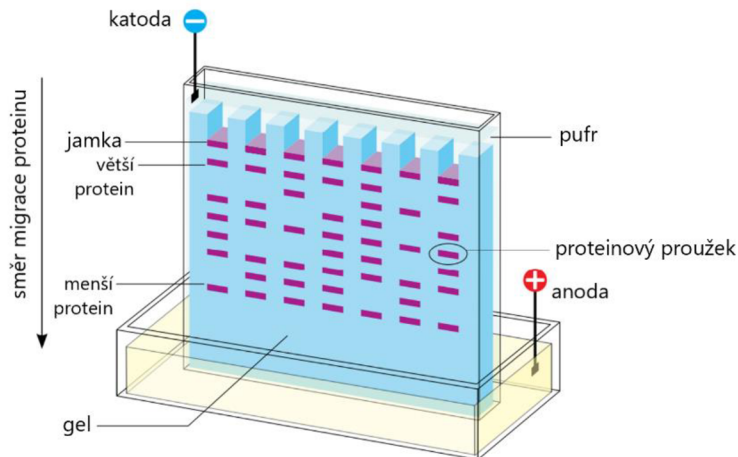
Po uplynutí doby byla kolonka otevřena a zátky byly odstraněny. Obsah byl stočen (1 min, 1000 x g) a supernatant byl vylit. Na kolonku bylo přidáno 500 µl promývacího pufru (Wash Buffer), do kterého byly přidány inhibitory proteáz (Complete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Švýcarsko). Mikrozkušavka s kolonkou byla poté zcentrifugována (1 min, 1000 x g) a supernatant byl odstraněn. Tento krok byl třikrát zopakován. Sběrná mikrozkušavka byla vyměněna za novou pro eluci zachycených proteinů. Byl připraven vzorkový pufr s dithiotreitem (DTT) pro uvolnění disulfidové vazby spojující proteiny s biotinem. DTT bylo rozpuštěno v destilované vodě o výsledné koncentraci 50 mM. Roztok DTT byl poté přidán do 1 ml vzorkového pufru pro SDS elektroforézu (Sample Buffer; 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 – Bio-Rad, USA; glycerol, 2% SDS, 0,05% bromfenolová modř – Sigma-Aldrich, USA). 200 µl vzorkového pufru s DTT bylo napipetováno na zazátkované kolonky v nových sběrných mikrozkušavkách a proběhla jejich inkubace na rotační třepačce po dobu 1 hodiny. Posledním krokem bylo stočení obsahu po dobu 2 min při 1000 x g. Výsledný eluát byl rovnou použit pro SDS-elektroforézu a Western blot analýzu anebo zmrazen při -20 °C pro pozdější použití. Shrnutí celé metodiky je znázorněno na Obr. 10.



Obr. 10. Shrnutí metodiky biotinylace a izolace povrchových proteinů. Převzato a upraveno podle www.thermofisher.com, User Guide: Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit.

4.2 SDS-PAGE (SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu)

K separaci proteinů ejakulovaných a kapacitovaných spermii byla provedena elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS). SDS je detergent, který udává proteinům negativní náboj, díky kterému putují ke kladně nabitě anodě. Proteiny byly v gelu separovány podle molekulové hmotnosti na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli, jak je znázorněno na Obr. 11.



Obr. 11. Schéma elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Převzato a upraveno podle www.bio-rad.com, *A guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection*.

Z připravených vzorků spermii bylo nejprve zapotřebí extrahovat proteiny. 50 μ l vzorku spermii bylo smícháno s 150 μ l vzorkového pufru, směs byla důkladně promíchána a vložena na led. Suspenze byla po dobu 30 minut průběžně vortexována a následně byla povařena v termobloku po dobu 5 min (100 °C), což mělo za následek lyzaci buněk. Vzorky byly poté odstředěny na centrifuze (2 minuty, 10 000 x g při 4 °C). Výsledný supernatant obsahující proteiny byl použit pro SDS-elektroforézu.

Pro analýzu proteinů byla použita aparatura pro vertikální elektroforézu (Mini-PROTEAN Tetra, Bio-Rad, USA). Nejdříve byl připraven spodní separační (resolving) gel, u kterého byla zvolena koncentrace 12 %. Pro přípravu dvou gelů bylo zapotřebí 3,5 ml destilované H₂O, 2,5 ml pufru pro separační gel (Resolving gel buffer, 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; Bio-Rad, USA), 4 ml 30% akryl-bisakrylamidového roztoku (Acrylamide/bis-acrylamide 30% solution; Bio-Rad, USA), 100 μ l 10% roztoku SDS (dodecylsírany sodný; Bio-Rad, USA). Před aplikací roztoku gelu bylo přidáno ještě 70 μ l 10% roztoku APS (persíran amonný, Amersham Biosciences, Švédsko), který aktivuje volné radikály a 4,5 μ l TEMED (tetramethylethylendiamin, Pharmacia Biotech, Švédsko), který volné radikály stabilizuje. Gely byly napipetovány mezi zespuštěná skla, která byla upevněna do stojánků. Navrch gelů byla potom napipetována vrstva destilované vody zabraňující přístupu vzduchu. Gely byly ponechány tuhnout po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Horní, zaostřovací (stacking) 4% gel byl připraven smícháním 1,52 ml destilované H₂O, 0,625 ml pufru pro zaostřovací gel (Stacking gel buffer, 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; Bio-Rad, USA), 0,325 ml akryl-bisakrylamidového roztoku (Acrylamide/bis-acrylamide 30% solution) a 25 μ l 10% roztoku SDS. Těsně před aplikací bylo do směsi přidáno 50 μ l 10% roztoku APS a 3,8 μ l TEMED. Ze ztuhnutého separačního gelu byla odlita vrstva destilované vody a následně na něj byl napipetován připravený roztok zaostřovacího gelu a vložen

15jamkový hřebínek. Gely byly ponechány tuhnout 15 minut. Následně byla skla, ve kterých byly ztuhlé gely, vložena do elektroforetické jednotky a umístěna do vaničky. Vanička s gely byla zalita elektrodovým pufrem (15 g Tris, 72 g glycin, 5 g SDS, 1 l destilované H₂O, ředěno 1:4 s dest. H₂O; pH 8,3). Hřebínky byly opatrně vytaženy a do vytvořených jamek byly nanесeny 3 μl standardu molekulových hmotností 10-250 kDa (Precision plus ProteinTM WesternCTM Blotting Standards; Bio-Rad, USA) a 10 μl vzorku spermií. Nakonec byla vanička přikryta víkem s elektrodami. Elektrody byly zapojeny ke zdroji stejnosměrného proudu, který byl nastaven na konstantní napětí 80 V a elektroforéza byla spuštěna. Po 30 minutách bylo napětí navýšeno na 150 V a ponecháno takto další hodinu.

4.3 Elektropřenos proteinů (Western blot)

Pro přenos separovaných proteinů v polyakrylamidovém gelu po SDS-elektroforéze na nitrocelulóзовou membránu byla použita metoda využívající elektrický proud, tzv. Western blot neboli elektropřenos. Při této metodě migrují proteiny od negativního náboje k membráně, kde je náboj pozitivní, jak je znázorněno na Obr. 12. Pro elektropřenos byla použita stejná aparatura (Mini-PROTEAN Tetra) jako pro SDS-elektroforézu, pouze s jinými součástkami, do kterých byly gely s membránami vloženy. Do nízké nádoby s transferovým pufrem ve složení 3,03 Tris, 14,4 g glycinu, 200 ml metanolu (VWR, BDH Chemicals, Francie) doplněný do objemu 1 l destilovanou H₂O byly namočeny 4 houbičky, 4 výstřižky chromatografického papíru Whatman (GE Healthcare, USA) a jedna nitrocelulóзовá membrána (Hybond C, Amersham, Švédsko). Po 15 minutách, kdy byly komponenty dostatečně nasáklé pufrem, byla do blotovacího rámu postupně naskládána – houbička, 2 chromatografické papíry, gel, membrána, a nakonec další vrstva papírů a houbička. Stejný postup byl opakován pro druhý gel. Vrstvy byly důkladně stlačeny, aby mezi nimi nezůstaly žádné bublinky vzduchu. Blotovací rám byl poté vložen správnou stranou (gel směrem k zápornému náboji, membrána směrem ke kladnému) do kazety, která byla umístěna do vaničky plné transferového pufru. Vanička byla přikryta víkem s elektrodami. Vanička byla vložena do nádoby se studenou vodou a ledem, který aparaturu chladil. Zdroj byl nastaven na konstantní elektrický proud 0,5 A. Elektropřenos proteinů byl spuštěn a ponechán běžet po dobu 1 hodiny a 10 minut. Po skončení byla kazeta vytažena, obsah byl rozebrán a membrána byla použita pro imunodetekci proteinů. Pro zviditelnění přenesených proteinů bylo na membránu napipetováno 5 ml Ponceau S barviva (Ponceau S, Sigma-Aldrich, USA). Barvivo bylo ponecháno působit 1 minutu. Membrána s vizualizovanými proteiny byla vyfocena pro srovnání celkové nanášky proteinů. Barva byla z membrány následně odstraněna promytím v destilované vodě a PBS.



Obr.12. Schéma elektropřenosu. Vytvořeno v programu Goodnotes.

4.4 Imunodetekce proteinů na membráně

Pro blokování nespecifických vazeb na volná místa na membráně byla namíchána 2% želatina (Gelatin from cold water fish skin, Sigma, Kanada) nebo 5% mléko (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad, USA) zředěné v roztoku PBS. Želatina nebo mléko byly promíchávány 1 hodinu při 50 °C, aby bylo zajištěno jejich dokonalé rozpuštění. Potom, co byla membrána promyta, bylo na její povrch nalito 10 ml 2% želatiny nebo 5% mléka. Místa na membráně se blokovala na lineární třepačce (SK-L180-E, DLAB Scientific, USA) 1 hodinu při laboratorní teplotě. Membrána byla opakovaně na třepačce promyta v PBS-T. Membrána byla opatrně rozstříhána na jednotlivé části. Každá část obsahovala standard molekulových hmotností a vzorky s proteiny ejakulovaných a kapacitovaných spermii. Jednotlivé části byly vloženy do parafilmových kapsiček. Do každé kapsičky byl přidán buď biotinem značený lektin (Vector laboratories, USA) ředěný v Hepes pufru (10 mM HEPES, 0,1 mM CaCl₂, pH 7,5) nebo králičí polyklonální protilátka proti sialové kyselině (Rabbit Polyclonal Antibody to Sialic Acid, vyrobena firmou Abbexa, kat. č. abx100414, UK nebo CloudClone, kat. č. PAS099Ge01, Čína) ředěná v PBS v poměru 1:500. Ředění lektinů se lišilo podle druhu a výchozí koncentrace:

- MAL II (Biotinylated Maackia Amurensis Lectin, 1 mg/ml), 5 µl/ml
- SNA (Biotinylated Sambucus Nigra Lectin, 1 mg/ml), 2 µl/ml
- WGA (Biotinylated Wheat Germ Agglutinin, 5 mg/ml), 1 µl/ml

Jako pozitivní kontrola pro ověření koncentrace přenesených proteinů byla pro celkové proteinové extrakty použita část membrány inkubovaná s α -tubulinem. Povrchové proteinové extrakty byly vztahovány ke koncentracím spermii jednotlivých kanců. Informace o koncentracích pocházely z inseminální stanice kanců, ze které byly nativní ejakuláty dovezeny. Do kapsičky proto byla přidána i myší monoklonální protilátka proti α -tubulinu (DM1A; Sigma-Aldrich, USA) naředěna v PBS na koncentraci 1:1000. Pro negativní kontrolu byl použit pouze roztok PBS. Kapsičky byly vloženy do lednice a inkubace probíhala přes noc. Následující den byla z kapsiček vylita všechna tekutina a jednotlivé kousky membrán byly pinzetou opatrně přesunuty do 50 ml zkumavek. Každá zkumavka byla zalita PBS-T a vložena na rotační třepačku na 10 minut za účelem promytí. Tento krok byl dvakrát zopakován. Následovala inkubace (1 hodina, laboratorní teplota) na rotační třepačce:

- se sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s křenovou peroxidázou (Goat Anti-Rabbit IgG (L+H), Horseradish Peroxidase-Linked, Bio-Rad, USA) v koncentraci 1:3000 pro část membrány s protilátkou proti sialové kyselině
- s avidinem konjugovaným s křenovou peroxidázou (1 µg/ml, ředěno v PBS) v koncentraci 1:1000 pro část membrány s biotinylovanými lektiny
- se sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům konjugovanou s křenovou peroxidázou (Goat Anti-Mouse IgG (L+H), Horseradish Peroxidase-Linked, Bio-Rad, USA) v koncentraci 1:3000 pro část membrány pro detekci α -tubulinu

Následně byly membrány promyty 4x po 5 minutách v PBS-T a 2x po 5 minutách v PBS. Pro vizualizaci detekce sacharidových struktur a α -tubulinu na membráně byl použit chemiluminiscenční substrát (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific, USA) fungující jako substrát pro křenovou peroxidázu. Detekce

chemiluminiscence byla provedena pomocí přístroje Azure c300 (Azure c300 Gel Imaging System, Azure Biosystems, USA).

Pro vyhodnocení zastoupení sializovaných glykoproteinů před a po kapacitaci byla provedena denzitometrická analýza v programu ImageJ (LOCI, University of Wisconsin, USA). Pro statistické vyhodnocení denzitometrické analýzy byl použit párový t-test v programu GraphPad Prism 9.3.2 (GraphPad Software Inc., USA). Výsledky byly normalizovány k ejakulovaným spermii. Jako statisticky významný byl hodnocen rozdíl na hladině významnosti $p=0,05$. Molekulové hmotnosti glykoproteinů byly vypočítány v programu Microsoft Excel pomocí kalibračních křivek z molekulových hmotností standardů v závislosti na jejich vzdálenosti od horní části membrány.

4.5 Nepřímá fluorescenční mikroskopie

Nepřímá fluorescenční mikroskopie je laboratorní technika využívající mikroskop nejčastěji pro vizualizaci reakce antigen – protilátka za pomoci jevu zvaného fluorescence, kdy látka po absorpci excitačního záření uvolňuje emisní záření s delší vlnovou délkou. Může se ale využívat nejen v kombinaci s protilátkou, ale například u lektinů lze sledovat reakci biotin – streptavidin. Na protilátku/streptavidin je navázán tzv. konjugát – fluorescenční barvivo. Nepřímá fluorescence se skládá ze dvou kroků. Nejprve se protilátka/biotinylovaný lektin naváže na substrát, následně se na protilátku/biotinylovaný lektin naváže konjugát.

4.5.1 Příprava mikroskopických preparátů

Pro zjištění lokalizace glykoproteinových struktur ejakulovaných a kapacitovaných spermii, na které se lektiny nebo protilátka proti sialové kyselině váží, bylo nejprve nutné připravit mikroskopické preparáty. Na podložní sklíčka byla pomocí hydrofobní fixy PAN liquid rocker (Sigma-Aldrich, USA) nakreslena 3 kolečka o přibližně stejné velikosti, do kterých byla následně napipetována již připravená suspenze spermii.

4.5.1.1 Fixace spermii

Fixace spermii slouží k jejich ochraně před degradací a zastavení metabolických dějů v buňce. Různé fixační tekutiny mění některé charakteristiky buněk rozličnými způsoby, proto bylo použito více druhů.

Chemická fixace spermii byla provedena některým z následujících způsobů:

a) Vlhká fixace roztokem acetonu-metanolu na skle

Z mikroskopavky bylo odebráno 100 μ l suspenze spermii do nové, ke které bylo přidáno 500 μ l PBS a obsah byl promíchán pipetou. Do koleček bylo napipetováno 20 μ l suspenze spermii. Preparáty spermii byly převrstveny 50 μ l vymraženého acetonu (Lach-Ner, ČR) s metanolem (VWR, BDH Chemicals, Francie) v poměru 1:1. Po 5 minutách byly preparáty důkladně opláchnuty PBS a osušeny.

b) Vlhká fixace formaldehydem s BSA na skle

Z mikroskopavky bylo odebráno 100 μ l suspenze spermii do nové, ke které bylo přidáno 500 μ l PBS a obsah byl promíchán pipetou. Do koleček bylo napipetováno 20 μ l suspenze spermii. Preparáty spermii byly převrstveny 50 μ l 2% formaldehydu s 2% BSA (Sigma-

Aldrich, USA). Poté byly preparáty uloženy do zatemněné vlhké komůrky, po 30 minutách byly vytáhnuty a důkladně opláchnuty PBS a osušena. Tento typ fixace sloužil pro vzorky určené pro kontrolu kapacity pomocí protilátky proti fosfotyrosinu.

c) Zasušení spermií s následnou fixací acetonem na skle

Z mikroskopické zkumavky bylo odebráno 100 μ l suspenze spermií do nové, ke které bylo přidáno 500 μ l PBS a obsah byl promíchán pipetou. Do koleček bylo napipetováno 20 μ l suspenze spermií a byl proveden roztěr. Preparáty spermií byly ponechány zaschnout na vzduchu při laboratorní teplotě a následně byly vloženy na 5 minut do skleněné květy naplněné vymraženým acetonem (Lach-Ner, ČR). Preparáty byly poté ponechány zaschnout na vzduchu.

d) Fixace paraformaldehydem v suspenzi

Mikroskopická zkumavka se suspenzí promytých spermií (1 ml) byla stočena na centrifuze (5 min, 300 x g při 20 °C). Supernatant byl odstraněn a k peletě spermií bylo přidáno 500 μ l 4% paraformaldehydu v PBS, který byl připraven následovně: 0,4 g paraformaldehydu za stálého míchání bylo rozpuštěno v 10 ml PBS při 70 °C v digestoři, poté přidáno pár kapek 5 M NaOH, po vyčerpání bylo pH upraveno na 7,4. Inkubace probíhala 30 min při laboratorní teplotě. Po skončení inkubační doby byl obsah odstředěn, supernatant byl odstraněn a spermie byly dvakrát promyty v PBS. Po promytí byla peleta spermií resuspendována v 1 ml PBS a po 20 μ l napipetována do koleček na podložním sklíčku a byl proveden roztěr. Preparáty byly poté ponechány zaschnout na vzduchu.

4.5.1.2 Příprava vzorku v suspenzi spermií

Z mikroskopické zkumavky bylo odebráno 200 μ l suspenze spermií do nové, ke které bylo přidáno 300 μ l PBS (pro vzorky určené pro inkubaci s protilátkou proti sialové kyselině) nebo HEPES pufru (10 mM HEPES, 0,1 mM CaCl₂, pH 7,5) (pro vzorky určené k inkubaci s lektiny). Obsah byl promíchán a rozpipetován po 100 μ l do 5 nových mikroskopických zkumavek, do kterých byly poté přidány biotinylované lektiny (MAL II lektin, SNA lektin v poměru 1:50 a WGA lektin v poměru 1:250) a polyklonální králičí protilátka proti sialové kyselině (abx100414 nebo PAS099Ge01) v poměru 1:50.

Poslední mikroskopická zkumavka se spermii byla ponechána jako negativní kontrola. Vzorky byly vloženy na 2 hodiny do třepacího termobloku (Thermo Shaker TS-100, Biosan, Litva) při 37 °C. Po inkubaci byly vzorky 2x na 3 minuty stáčený při 300 x g a laboratorní teplotě, po prvním stočení byly zkumavky pootočený o 90°, aby se vytvořila ucelená peleta spermií. Supernatant byl odsán pipetou. K peletě bylo přidáno 100 μ l PBS/HEPES pufru za účelem promytí spermií, obsah byl resuspendován, opět stejným způsobem stočen (2x na 3 minuty při 300 x g) a supernatant byl odstraněn. Spermie byly dvakrát promyty. Promytá peleta byla naředěna v 50 μ l PBS/HEPES pufru. Obsah byl po 20 μ l napipetován na preparáty, do levého a prostředního kolečka suspenze s lektiny nebo protilátkou, do pravého kolečka negativní kontrola. Spermie byly poté zafixovány roztokem acetonu a metanolu (viz kap 4.5.1.1).

4.5.2 Detekce sacharidových struktur

Preparáty byly rovnou použity nebo uloženy do lednice. Pokud byly pro detekci používány preparáty skladované v lednici, byly nejdříve opláchnuty roztokem PBS a osušeny.

Následně bylo do všech tří koleček napipetováno 150 μ l blokovacího média Superblock (Blocking Buffer in PBS; Thermo Fisher Scientific, USA) a vzorky byly 30 minut inkubovány ve vlhké zatemněné komůrce při laboratorní teplotě. Poté byla skla omyta roztokem PBS. Při práci s fluochromy byla laboratoř zatemněna.

Do všech koleček bylo poté napipetováno 100 μ l:

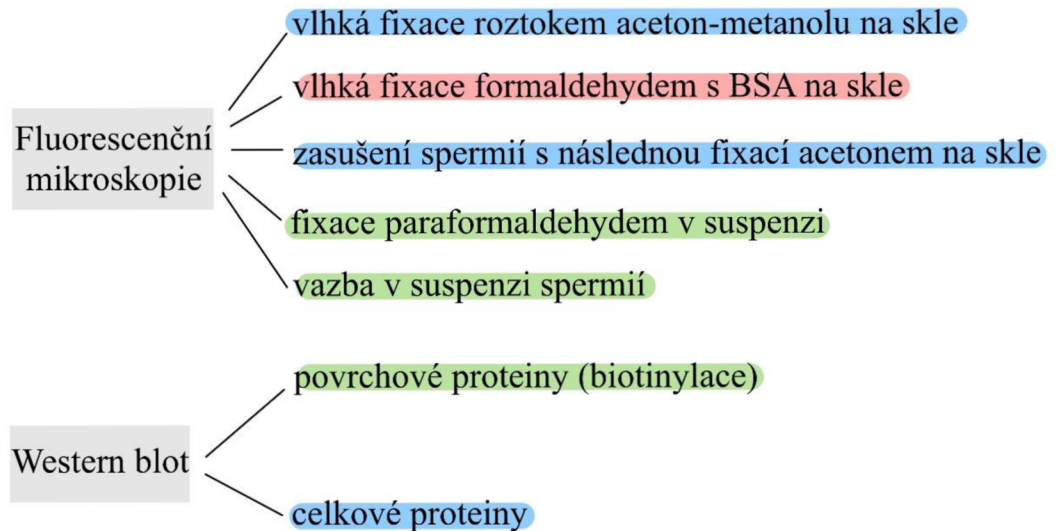
- Streptavidinu konjugovaného s FITC (ThermoFisher Scientific, USA) ředěného 1:300 v PBS na vzorky s lektiny, které byly následně ponechány inkubovat 45 minut v zatemněné vlhké komůrce v lednici.
- sekundární protilátky proti králičím IgG konjugované s Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, USA) ředěné 1:300 v PBS na vzorky s protilátkou proti sialové kyselině, které byly následně ponechány inkubovat 45 minut v zatemněné vlhké komůrce v lednici.

Preparáty byly poté znovu omyty PBS, osušeny a do levého kolečka bylo napipetováno 100 μ l PNA konjugovaného s rhodaminem (Rhodamin Peanut Agglutinin, Vector Laboratories, USA) ředěného v PBS v poměru 1:700 pro detekci integrity akrozomu. Preparáty byly vloženy do vlhké zatemněné komůrky na 30 minut při laboratorní teplotě. Po skončení inkubační doby byly preparáty opláchnuty PBS a destilovanou H₂O a osušeny. Nakonec bylo do všech koleček přidáno 5 μ l montovacího média s DAPI (VectaShield Antifade Mounting Medium, Vector Laboratories, USA) značící DNA a zachovávající fluorescenční vlastnosti vzorků. Preparáty byly přikryty krycími sklíčky a vloženy na 10 minut do zatemněné komůrky. Takto přichystané vzorky byly připraveny pro snímání pod fluorescenčním mikroskopem (Nikon Eclipse E600, Japonsko). Snímky byly pořizovány kamerou (Nikon Digital Sight DS-Fi 1, Japonsko) v programu NIS Elements. Pro statistické vyhodnocení byl použit párový t-test v programu GraphPad Prism 9.3.2 (GraphPad Software Inc., USA). Jako statisticky významný byl hodnocen rozdíl na hladině významnosti $p=0,05$.

4.5.3 Detekce fosforylace pro kontrolu kapacity

Připravené preparáty spermií fixované formaldehydem určené pro detekci fosfotyrosinu a kontrolu kapacity byly nejdříve opláchnuty roztokem PBS a osušeny. Následně bylo do všech tří koleček napipetováno 150 μ l blokovacího média Superblock a vzorky byly 30 minut inkubovány ve vlhké zatemněné komůrce při laboratorní teplotě. Poté byla skla omyta roztokem PBS. Následně bylo do levého a prostředního kolečka napipetováno 100 μ l monoklonální myší protilátky proti fosfotyrosinu (klon 4G10; EMD Milipore, USA) ředěné 1:300 a do pravého představujícího negativní kontrolu 100 μ l PBS. Preparáty byly ponechány inkubovat přes noc v zatemněné vlhké komůrce v lednici. Druhý den byly preparáty omyty PBS a do všech koleček bylo napipetováno 100 μ l sekundární protilátky proti myším IgG konjugované s Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, USA) ředěné 1:300 v PBS. Vzorky byly následně ponechány inkubovat 1 hodinu v zatemněné vlhké komůrce v lednici. Preparáty byly poté znovu omyty v PBS, osušeny a do levého bylo aplikováno PNA s rhodaminem a montovací médium s DAPI, postup byl totožný jako v předchozí kapitole (4.5.2). Preparáty byly přikryty krycími sklíčky a vloženy na 10 minut do zatemněné komůrky. Takto připravené vzorky byly připraveny pro snímání pod fluorescenčním mikroskopem (Nikon Eclipse E600, Japonsko). Snímky byly pořizovány v programu NIS Elements.

Na následujícím obrázku (Obr. 13) je schéma shrnující použité metody pro studium sializace spermie v průběhu *in vitro* kapacitace. Modře jsou označeny metody, které se zaměřují na studium podílu sialových kyselin v celé spermii. Metody, které se zabývají sialovými kyselinami pouze na povrchu spermie jsou označeny zeleně. Červeně je označena metoda určená pro kontrolu *in vitro* kapacitace.



Obr. 13. Souhrnné schéma použitých metod pro studium sializace spermie v průběhu *in vitro* kapacitace. Vytvořeno v programu Goodnotes.

5 Výsledky

5.1 Lokalizace sialové kyseliny na spermích před a po kapacitaci

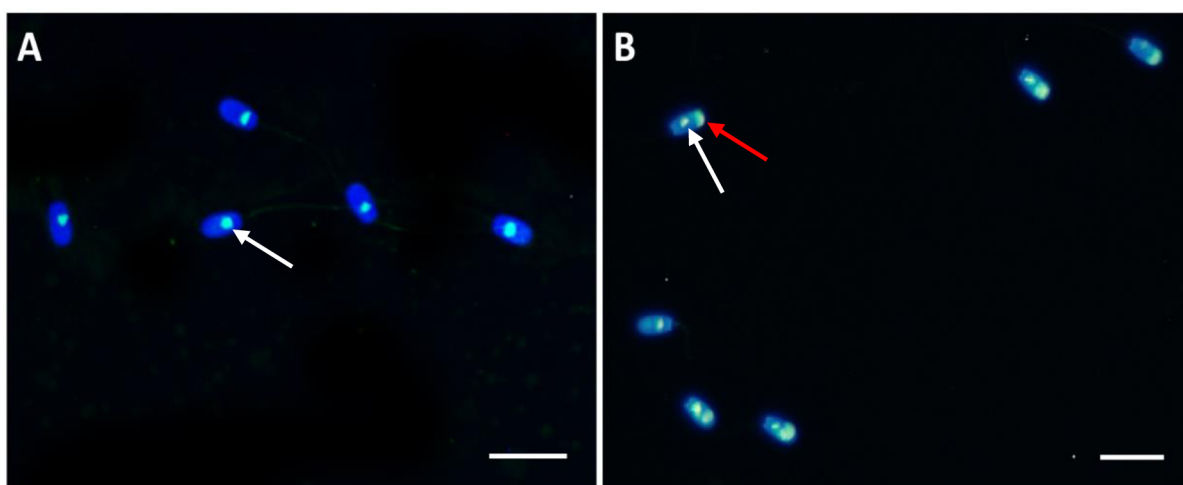
Pro lokalizaci míst na kančí spermii, na kterých je navázána sialová kyselina, byla využita metoda nepřímé fluorescenční mikroskopie (viz kap 4.5). U všech pokusů byly použity pouze vzorky spermii z nativního ejakulátu. Detekce sializovaných struktur na spermii byla provedena za použití lektinů, které mají schopnost vázat se na specifické sacharidové struktury. Byly vybrány tři druhy biotinylovaných lektinů: MAA (MAL II), SNA a WGA, které se váží na sialovou kyselinu v různém spojení. Lektin MAL II preferuje sialovou kyselinu s vazbou α -2,3, zatímco lektin SNA upřednostňuje vazbu α -2,6. Lektin WGA neváže pouze sialovou kyselinu ale i N-acetylglukosamin. Vizualizace byla provedena na principu vazby biotin-streptavidin pomocí streptavidinu konjugovaného s fluorochromem pro zviditelnění oblastí s navázanou sialovou kyselinou na spermii ve fluorescenčním mikroskopu. Dále byla vyzkoušena detekce pomocí primární polyklonální králičí protilátky proti sialové kyselině s následnou vizualizací sekundární protilátkou proti králičím IgG konjugovanou s Alexa Fluor 488. Reakce s protilátkou byla však negativní, proto výsledky nejsou uvedeny.

Mikroskopické preparáty se spermii byly připravovány různými technikami (kap 4.5.1). Ejakulované a kapacitované spermie byly buď fixované roztokem aceton-metanolu přímo na skle, nebo 4% paraformaldehydem v suspenzi a až poté inkubovány s lektiny. Při dalším způsobu přípravy vazba s lektinem proběhla rovnou v suspenzi spermii a až následně byly spermie zafixovány pomocí aceton-metanolu. U lektinu MAA byla vyzkoušena i fixace pouze acetonem. Fixace 4% paraformaldehydem byla ve všech případech negativní, proto zde výsledky nejsou uvedeny. Preparáty určené pro kontrolu kapacitace, na kterých byl detekován fosfotyrosin, byly fixované 2% formaldehydem s 2% BSA.

Pro každý lektin a způsob přípravy byly provedeny minimálně 3 opakování. U dvou opakování bylo napočítáno 100 buněk u ejakulovaných a kapacitovaných spermii, které byly rozděleny do kategorií podle viditelného vzoru. Spermie zcela bez signálu nebyly započítávány. Následně byly vytvořeny grafy porovnávající zastoupení jednotlivých kategorií značení u ejakulovaných a kapacitovaných spermii v rámci 100 buněk napočítaných u tří zkoumaných kanců dohromady. Současně byly vytvořeny i grafy porovnávající změny na akrozomu a bičíku před a po kapacitaci počítané u dvou kanců odděleně s průměrem a střední chybou průměru (SEM) a výsledky byly statisticky vyhodnoceny. Nakonec byly vytvořeny tabulky porovnávající detekci signálu na spermích pro každý lektin a způsob přípravy.

5.1.1 Hodnocení *in vitro* kapacitace

Pro kontrolu *in vitro* kapacitace byla porovnáována míra fosforylace proteinů u ejakulovaných a kapacitovaných spermií pomocí primární monoklonální protilátky proti fosfotyrosinu (4G10). Spermie byly fixovány 2% formaldehydem s 2% BSA a inkubovány přes noc s protilátkou. Spermie byly následně inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s Alexa 488 (zelený signál). Jádra spermií byla značena pomocí DAPI (modrý signál). Tyrosinová fosforylace proteinů je důležitá součást kapacitace. Na kančích spermích se míra fosforylovaných proteinů před a po kapacitaci výrazně liší na hlavičce spermie. Na Obr. 14 lze vidět rozdíl mezi signálem u ejakulovaných spermií, kde byl výrazný signál v subekvatoriální části spermie, kdežto u kapacitovaných spermií lze navíc vidět i silný signál na akrozomu.



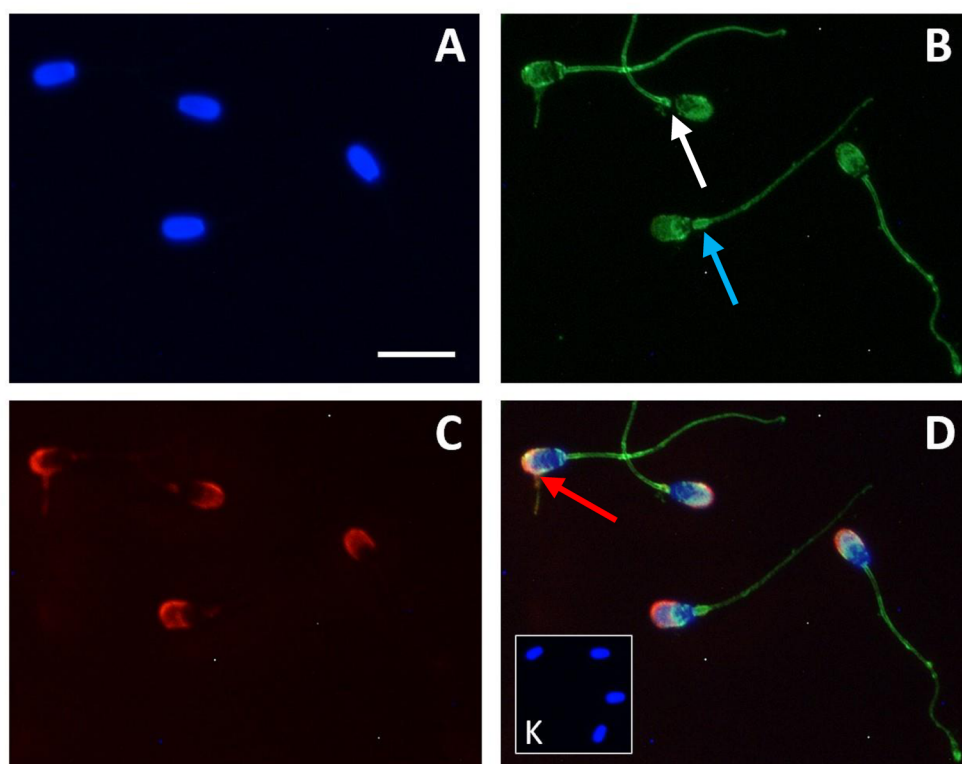
Obr. 14. Detekce fosfotyrosinu u ejakulovaných (A) a kapacitovaných (B) spermií: A – signál viditelný pouze v subekvatoriální části spermie, B – signál viditelný v subekvatoriální části a v akrozomu; DAPI (modře), pozitivní reakce s protilátkou proti fosfotyrosinu (zeleně). Bílá šipka značí signál v subekvatoriální části, červená šipka značí signál v akrozomu. Zvětšení 400x, měřítko 10 μm .

5.1.2 Vazba lektinů na spermie v suspenzi

Vazba lektinů v suspenzi byla vybrána za účelem detekce sialové kyseliny na povrchu spermie. Tato metoda představovala nejšetrnější postup zajišťující co nejpřirozenější podmínky, při kterých nedocházelo k poškození epitopů, precipitaci některých proteinů nebo narušení plazmatické membrány spermie fixací. Byly použity spermie z nativního ejakulátu, u kterých dochází k odmytí povrchových glykoproteinů pouze v minimální míře. Pro vizualizaci detekce sacharidových struktur byl použit streptavidin konjugovaný s FITC, pro označení akrozomů byl použit lektin PNA konjugovaný s rhodaminem a pro jádra bylo použito DAPI v montovacím médiu. U každého experimentu byla provedena negativní kontrola bez inkubace s lektinem.

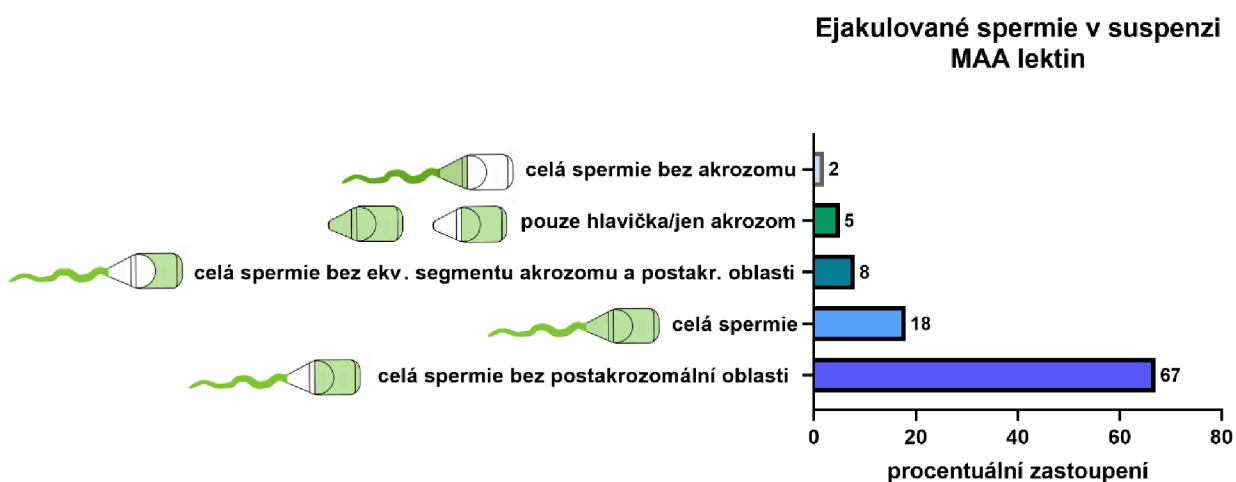
5.1.2.1 Lokalizace sialové kyseliny pomocí MAA lektinu před a po kapacitaci

Na Obr. 15 je vidět lokalizace α -2,3 vázané sialové kyseliny pomocí lektinu MAA v suspenzi u ejakulovaných spermíí. Na vybraných spermíích lze pozorovat silný signál na celé spermii nebo chybějící pouze v postakrozomální oblasti (bílá šipka). U některých spermíí byl viditelný i výrazný signál na krčku spermie (modrá šipka), značící reziduální cytoplazmatickou kapku.



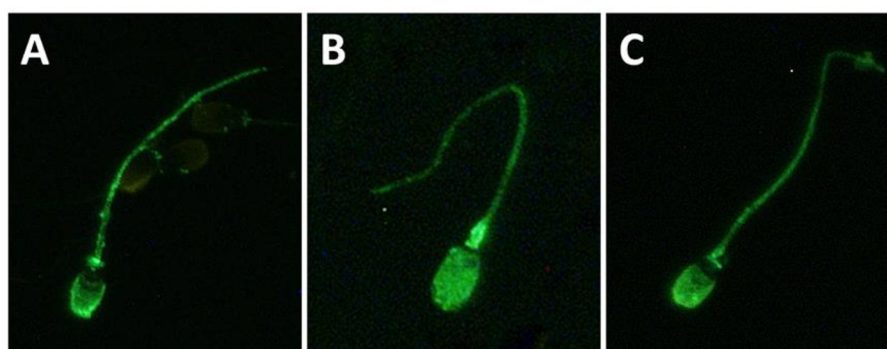
Obr. 15. Detekce α -2,3 vázané sialové kyseliny na ejakulovaných spermíích v suspenzi: A – jádra značené DAPI (modře), B – pozitivní reakce s MAA lektinem (zeleně), C – akrozomy značené PNA lektinem (červeně), D – složený obrázek (DAPI, lektin, PNA), K – negativní kontrola. Bílá šipka značí chybějící signál v postakrozomální oblasti, modrá šipka značí reziduální cytoplazmatickou kapku, červená šipka značí poškozený akrozom. Zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.

Na Obr. 16 je zhodnoceno procentuální zastoupení jednotlivých vzorů vazby MAA lektinu u 100 ejakulovaných spermií napočítaných u tří různých kanců dohromady. Nejvíce převládá signál na celé spermii kromě postakrozomální oblasti, tento vzor byl zastoupený v 67 %. 18 % tvořil signál na celé spermii včetně postakrozomální oblasti spermie. Pouze v 5 % případů nebyl značen bičík spermie a v 2 % nebyl nalezen signál na akrozomu. 8 % spermií viditelně chyběl signál na ekvatoriálním segmentu akrozomu a v postakrozomální oblasti.



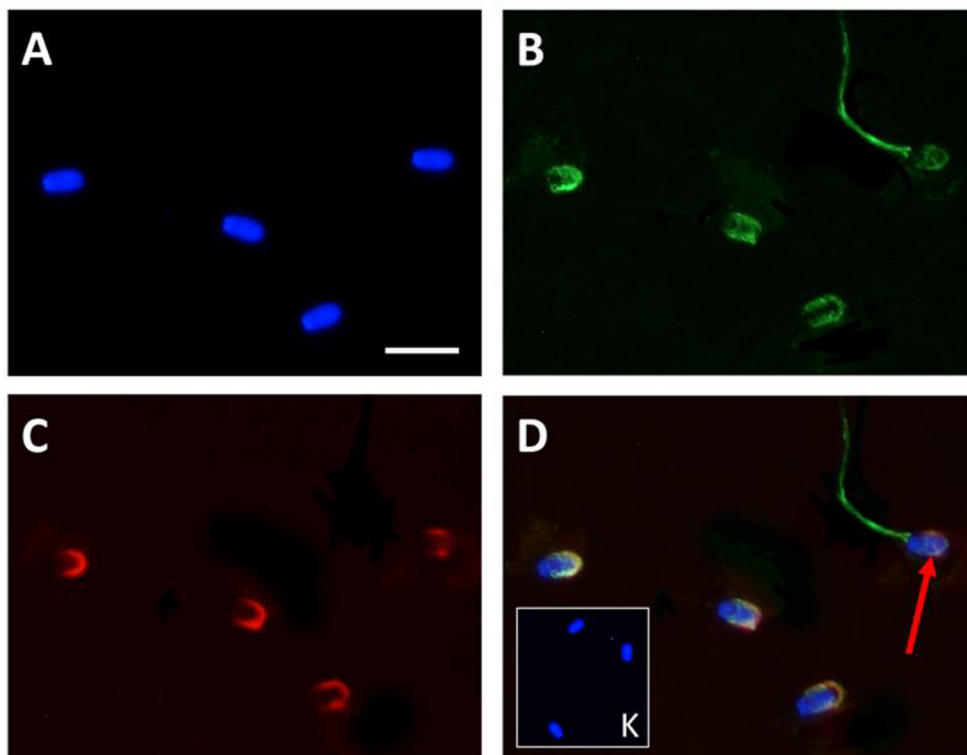
Obr. 16. Grafické porovnání procentuálního zastoupení jednotlivých vzorů vazby MAA lektinu na ejakulované spermie v suspenzi.

Na Obr. 17 jsou zobrazeny detaily nejčastěji nalezených vzorů na ejakulovaných spermiích s navázaným MAA lektinem značící α -2,3 vázanou sialovou kyselinu. Vlevo (4A) je vložena spermie se značením celého povrchu kromě ekvatoriálního segmentu akrozomu a postakrozomální oblasti. Uprostřed (4B) je vložen obrázek spermie se signálem na celé spermii a vpravo (4C) je obrázek spermie se signálem chybějícím pouze v postakrozomální oblasti.



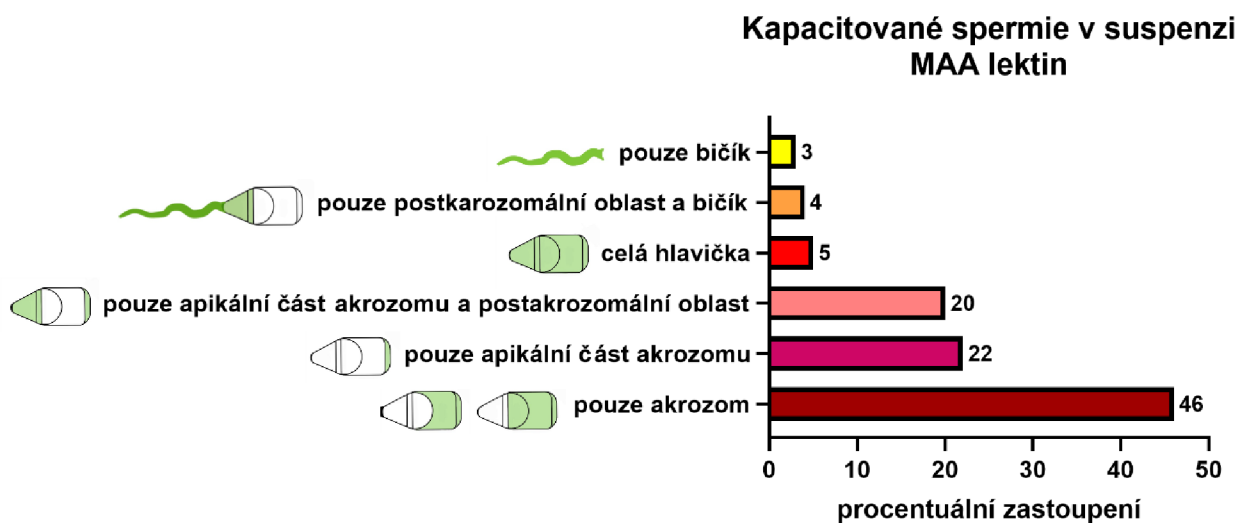
Obr. 17. Ejakulované spermie v suspenzi s MAA lektinem – detaily nejčastěji zastoupených kategorií značení: A – signál na celé spermii kromě ekvatoriálního segmentu a postakrozomální oblasti spermie, B – signál na celé spermii se značením proximální cytoplazmatické kapky, C – signál na celé spermii kromě postakrozomální oblasti.

Na Obr. 18 je vidět lokalizace α -2,3 vázané sialové kyseliny pomocí lektinu MAA na povrchu kapacitovaných spermíí. U vybraných spermíí jsme zaznamenali sníženou intenzitu signálu vazby MAA po kapacitaci. Nejvýraznější rozdíl lze pozorovat hlavně na bičíku spermíí, kde po kapacitaci na většině spermíí signál zcela vymizel. Vzory se tak lišily hlavně v oblasti akrozomu spermíí. Oproti ejakulovaným spermíím byl signál MAA detekován na akrozomu často pouze v jeho apikální části.



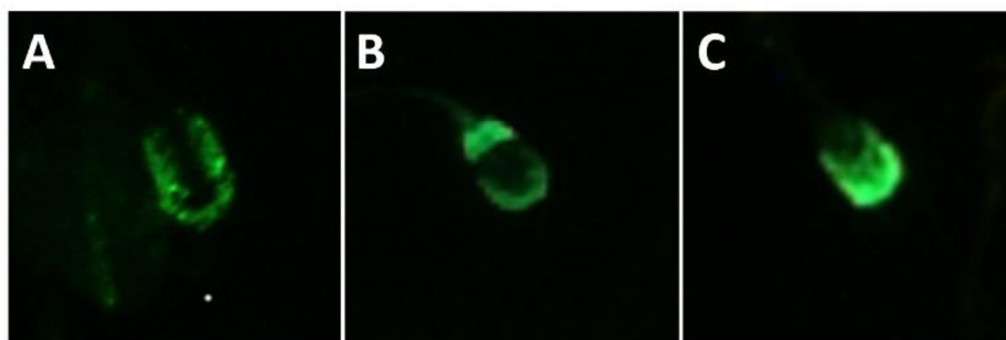
Obr. 18. Detekce α -2,3 vázané sialové kyseliny na kapacitovaných spermíích: A – jádra značené DAPI (modře), B – pozitivní reakce s MAA lektinem (zeleně), C – akrozomy značené PNA lektinem (červeně), D – složení obrázků (DAPI, lektin, PNA), K – negativní kontrola. Červená šipka značí poškozený akrozom. Zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.

Na Obr. 19 je znázorněno procentuální zastoupení jednotlivých vzorů vazby MAA lektinu u 100 kapacitovaných spermíí napočítaných u tří různých kanců dohromady. Nejvíce převládal signál pouze na akrozomu spermie, tento vzor byl zastoupený v 46 % případů. Signál pouze v apikální části akrozomu tvořil 22 % z celkového zastoupení. U 20 % spermíí byla detekce nalezena spolu s apikální částí akrozomu i v postakrozomální oblasti. Pouze v 5 % případů byla sialová kyselina detekována na celé hlavičce spermie. Jak už bylo uvedeno, největší rozdíl po kapacitaci lze pozorovat u signálu na bičíku spermie, kde byl nalezen signál pouze u 7 % spermíí.



Obr. 19. Grafické porovnání procentuálního zastoupení jednotlivých vzorů vazby MAA lektinu na kapacitované spermie v suspenzi.

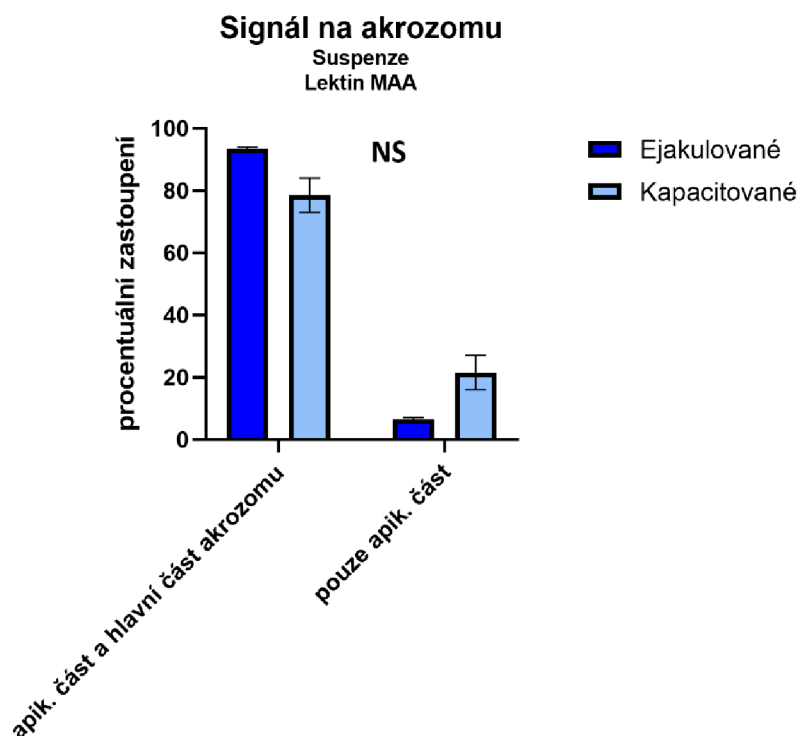
Na Obr. 20 lze vidět detaily nejčastěji nalezených vzorů na kapacitovaných spermích s navázaným MAA lektinem značící α -2,3 vázanou sialovou kyselinu lišící se pouze rozdílným signálem na hlavičce.



Obr. 20. Kapacitované spermie v suspenzi s MAA lektinem – detaily nejčastěji zastoupených kategorií
značení: A – signál v apikální části akrozomu, B – signál v apikální části akrozomu a postakrozomální oblasti, C – signál v apikální části, hlavní části akrozomu a slabě v ekvatoriálním segmentu akrozomu.

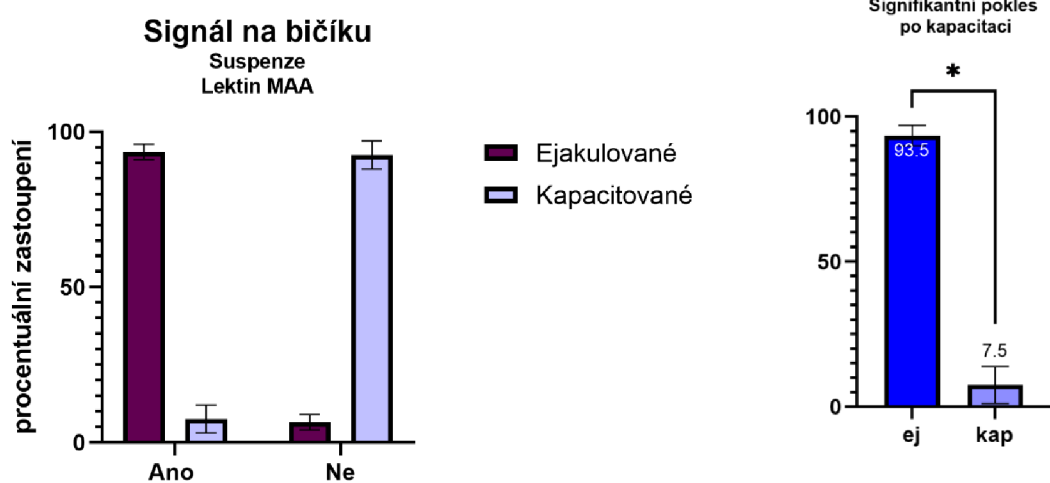
Na Obr. 21 je uvedený graf představující rozdíl v lokalizaci signálu na apikální části akrozomu a hlavní části akrozomu u spermíí s vazbou MAA před a po kapacitaci. Bylo napočítáno 100 ejakulovaných a 100 kapacitovaných spermíí dvou kanců odděleně, u kterých byl sledován pouze signál na akrozomu. Z hodnot bylo následně vypočítáno procentuální zastoupení, průměr a stanovena standardní chyba průměru. Z grafu lze vyčíst, že došlo ke změně v sacharidových strukturách na hlavičce spermíí a lokalizace vazby MAA se po kapacitaci liší. Po kapacitaci bylo detekováno více spermíí se sialovou kyselinou vázanou pouze v apikální části akrozomu než před kapacitací. Průměrný nárůst této populace spermíí byl 15%.

Naprostá většina jak ejakulovaných (93,5 %), tak kapacitovaných (78,5 %) spermií však vykazovala signál jak na apikální části, tak i na hlavní části akrozomu.



Obr. 21. Grafické porovnání průměrného procentuálního zastoupení signálu vazby MAA lektinu na akrozom spermií v suspenzi před a po kapacitaci. Odchylka z průměru je vyjádřena \pm SEM; NS – rozdíl není signifikantní.

Na Obr. 22a je graf představující rozdíl v lokalizaci vazby MAA na bičíku u spermií před a po kapacitaci. Postup výpočtu byl totožný jako u předešlého grafu. V grafu lze pozorovat velmi výrazný, statisticky významný pokles (86 %) v množství kapacitovaných spermií, které byly značeny MAA na bičíku. Statisticky významný rozdíl $p < 0,05$ je vyjádřen v grafu na Obr. 22b hvězdičkou.

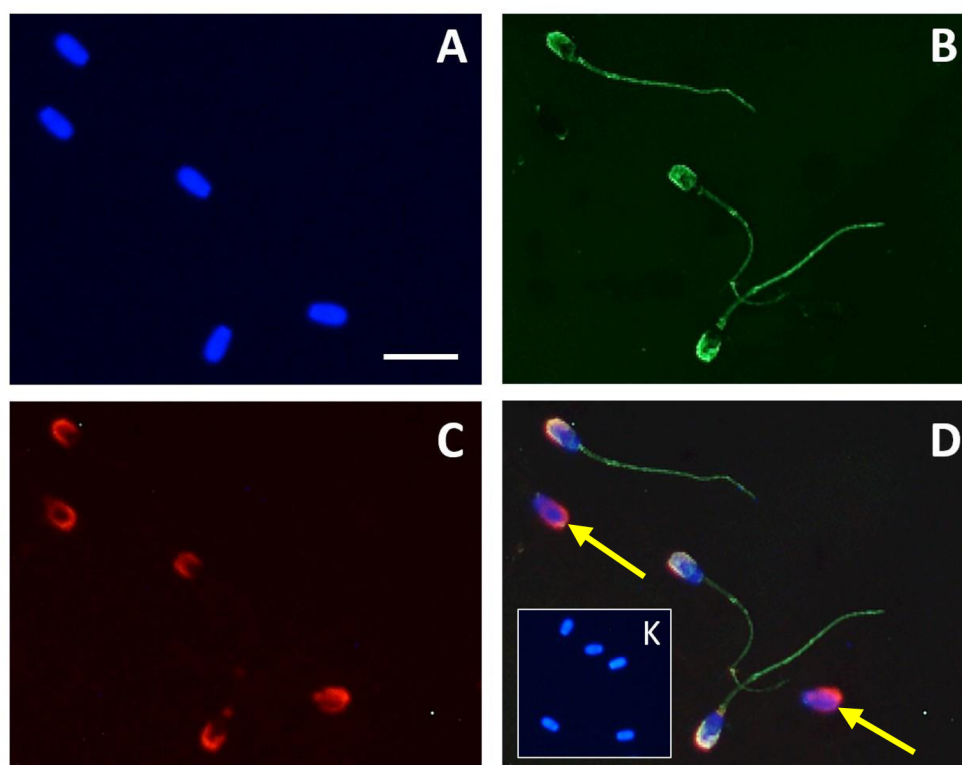


Obr. 22a. Grafické porovnání průměrného procentuálního zastoupení signálu vazby MAA lektinu na bičík spermií v suspenzi před a po kapacitaci. Odchylka z průměru je vyjádřena \pm SEM.

Obr. 22b. Signifikantní pokles ($p < 0,05$) v průměrném procentuálním zastoupení signálu vazby MAA lektinu na bičík spermií v suspenzi po kapacitaci. Odchylka z průměru je vyjádřena \pm SEM.

5.1.2.2 Lokalizace sialové kyseliny pomocí SNA lektinu před a po kapacitaci

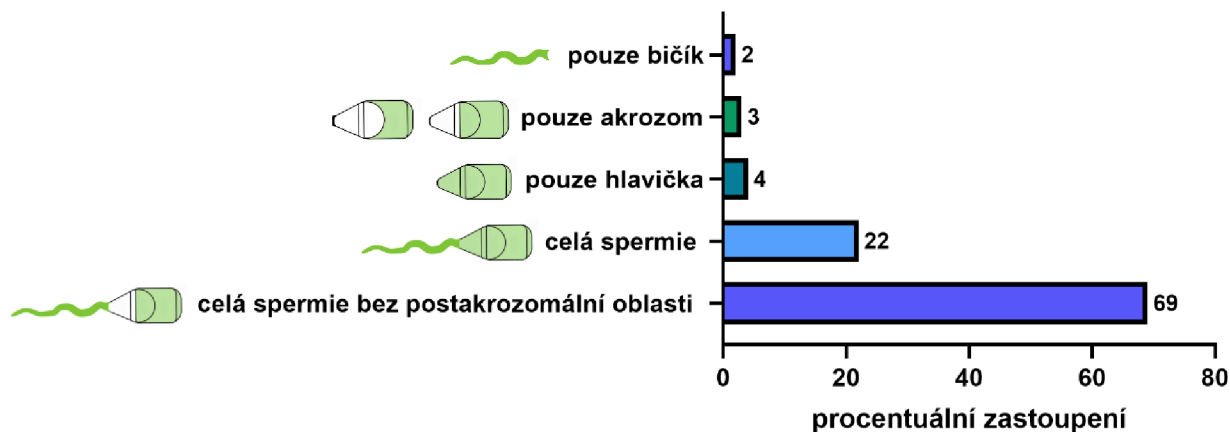
Na Obr. 23 je ukázána lokalizace α -2,6 vázané sialové kyseliny pomocí lektinu SNA v suspenzi u ejakulovaných spermií. Na spermiích v obrázku je zřejmé, že signál viditelně chyběl hlavně v postakrozomální oblasti a dále v menší míře i v ekvatoriálním segmentu spermie, nicméně celkový signál byl velice výrazný na celé spermii včetně bičíku. Je také patrné, že intenzita signálu v apikální části akrozomu byla výraznější než na ostatních částech spermie.



Obr. 23. Detekce α -2,6 vázané sialové kyseliny na ejakulovaných spermiích v suspenzi: A – jádra značené DAPI (modře), B – pozitivní reakce s SNA lektinem (zeleně), C – akrozomy značené PNA lektinem (červeně), D – složený obrázek (DAPI, lektin, PNA), K – negativní kontrola. Žlutá šipka značí spermie zcela bez signálu. Zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.

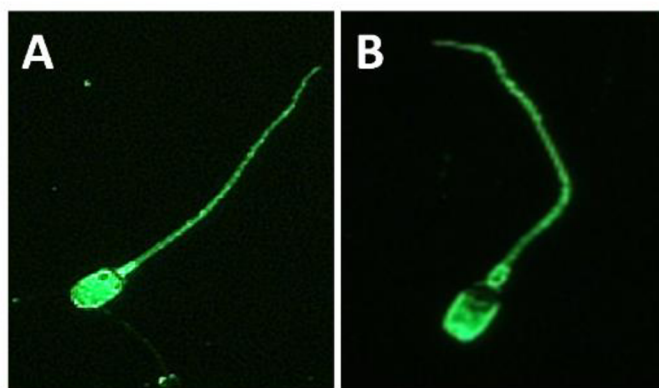
Na Obr. 24 je uveden graf s procentuálním zastoupením jednotlivých vzorů vazby SNA lektinu u 100 ejakulovaných spermií napočítaných u tří různých kanců. Z 22 % byla sialová kyselina lokalizována na celé spermii. Nejvíce zastoupenou skupinou byly spermie s detekcí sialové kyseliny na celé spermii kromě postakrozomální oblasti, tato skupina tvořila 69 %. Na bičíku byl signál detekován v 93 % případů. Obdobně jako v případě ejakulovaných spermií inkubovaných v suspenzi s MAA lektinem byla i v této skupině poměrně často viditelná cytoplazmatická kapka.

Ejakulované spermie v suspenzi SNA lektinu



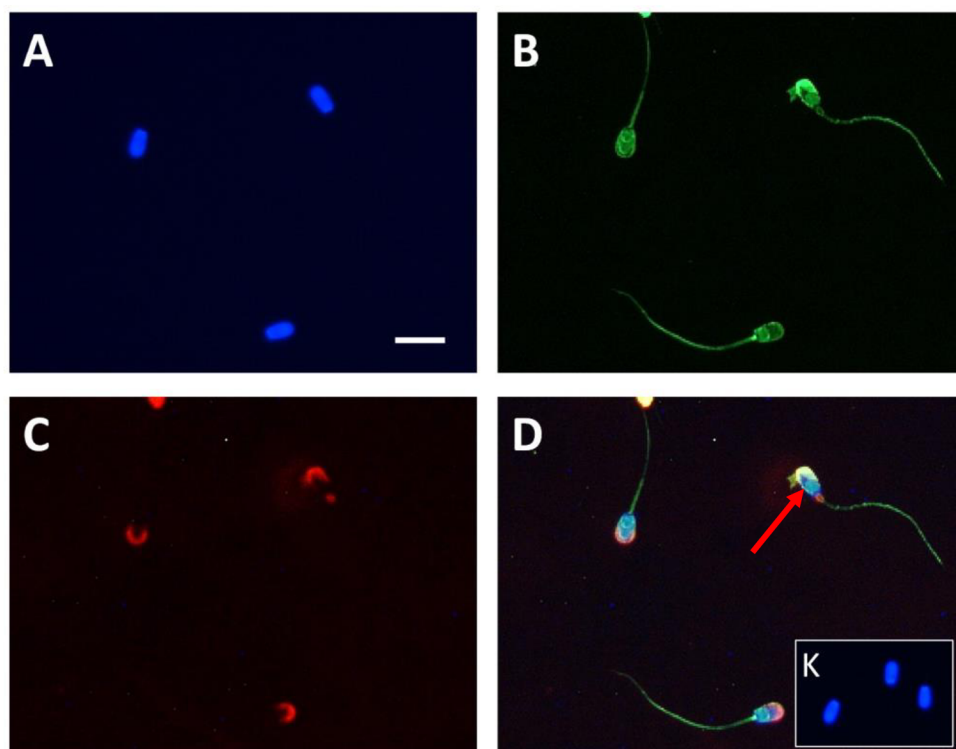
Obr. 24. Grafické porovnání procentuálního zastoupení jednotlivých vzorů vazby SNA lektinu na ejakulované spermie v suspenzi.

Na Obr. 25 lze vidět detaily nejčastěji nalezených vzorů na ejakulovaných spermích s navázaným SNA lektinem značící α -2,6 vázanou sialovou kyselinu lišící se rozdílným signálem na hlavičce. V obou případech je viditelná výrazná intenzita signálu.

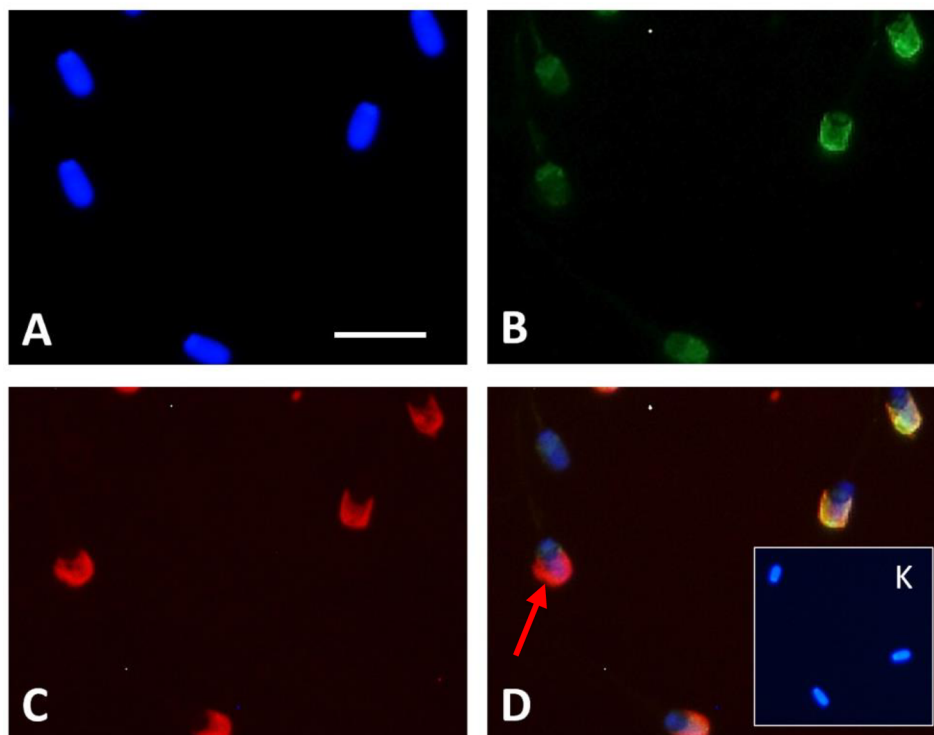


Obr. 25. Ejakulované spermie v suspenzi s SNA lektinem – detaily nejčastěji zastoupených kategorií značení: A – signál na celé spermii, B – signál na celé spermii kromě postakrozomální oblasti.

Na Obr. 26 a 27 lze vidět lokalizaci α -2,6 vázané sialové kyseliny pomocí lektinu SNA v suspenzi u kapacitovaných spermí. Dva obrázky jsou uvedené z důvodu dvou populací spermí, které byly v tomto případě pozorovány v podobné míře. Na Obr. 27 je populace se signálem pouze na hlavičce, zatímco na Obr. 26 je vybrána populace spermí s detekcí sialové kyseliny i na bičíku spermie.

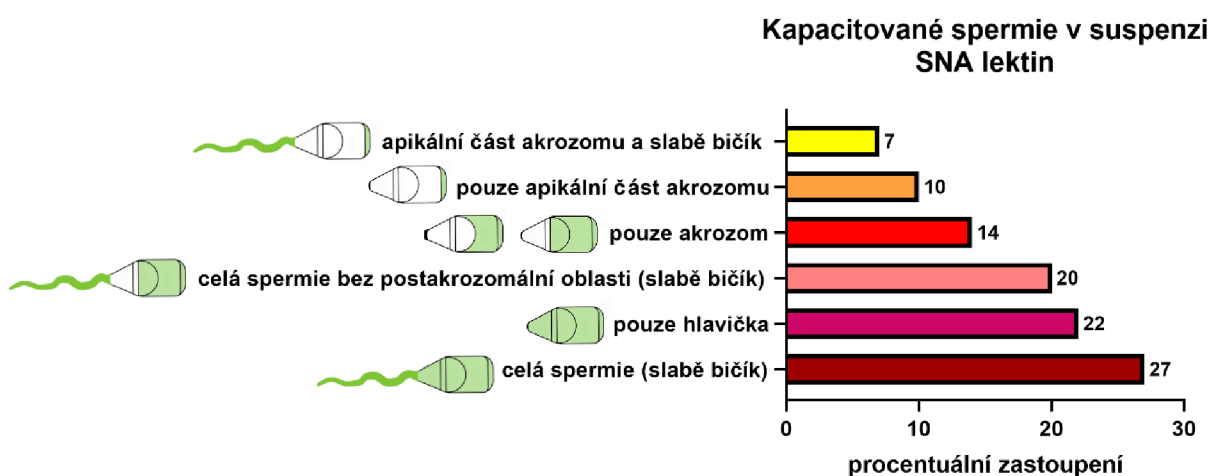


Obr. 26. Detekce α -2,6 vázané sialové kyseliny na kapacitovaných spermích v suspenzi: A – jádra značené DAPI (modře), B – pozitivní reakce s SNA lektinem (zeleně), C – akrozomy značené PNA lektinem (červeně), D – složený obrázek (DAPI, lektin, PNA), K – negativní kontrola. Červená šipka značí poškozený akrozom. Zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.



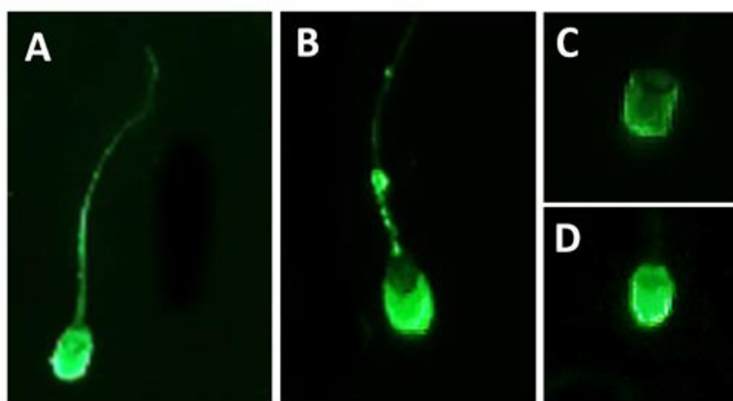
Obr. 27. Detekce α -2,6 vázané sialové kyseliny na kapacitovaných spermích v suspenzi: A – jádra značené DAPI (modře), B – pozitivní reakce s SNA lektinem (zeleně), C – akrozomy značené PNA lektinem (červeně), D – složený obrázek (DAPI, lektin, PNA), K – negativní kontrola. Červená šipka značí poškozený akrozom. Zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.

Na Obr. 28 je uveden graf s procentuálním zastoupením jednotlivých vzorů vazby SNA lektinu na 100 kapacitovaných spermií napočítaných u tří různých kanců dohromady. Poměr mezi spermii se signálem a bez signálu na bičíku byl oproti ejakulovaným spermii poměrně vyrovnaný. Signál na bičíku byl viditelný u 54 % buněk. Naproti tomu u 46 % buněk byl zaznamenán signál pouze na hlavičce. Nejvíce zastoupenou populaci s 27 % tvořily spermie s detekcí sialové kyseliny na celé spermii. Druhou největší populaci tvořily spermie se signálem pouze na celé hlavičce (22 %). 20 % spermií chyběl signál jen v postakrozomální oblasti a u 14 % spermií byla sialová kyselina lokalizována pouze na akrozomu. V 10 % případů vykazovala pozitivní reakci s lektinem pouze apikální část akrozomu a ve zbylých 7 % vykazoval pozitivní reakci i bičík. Po kapacitaci vzrostl počet spermií se signálem v postakrozomální oblasti o 23 %.



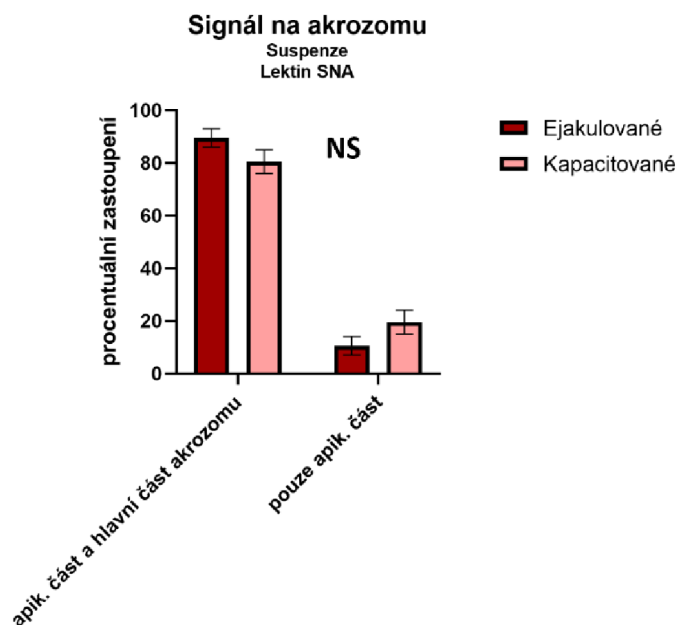
Obr. 28. Grafické porovnání procentuálního zastoupení jednotlivých vzorů vazby SNA lektinu na kapacitované spermie v suspenzi.

Na Obr. 29 lze vidět detaily nejčastěji nalezených populací u kapacitovaných spermií s navázaným SNA lektinem značící α -2,6 vázanou sialovou kyselinu. Jak už bylo zmíněno, v této skupině lze pozorovat rozdíly jak v signálu na bičíku, tak i na hlavičce spermie.



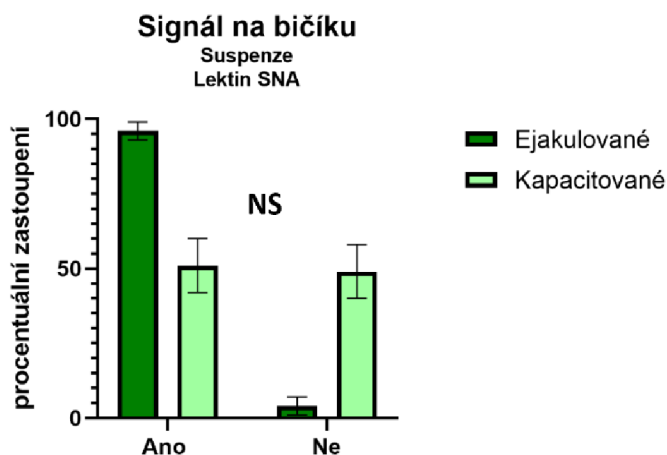
Obr. 29. Kapacitované spermie v suspenzi s SNA lektinem – detaily nejčastěji zastoupených kategorií
značení: A – signál na celé spermii, B – signál na celé spermii kromě ekvatoriální segmentu akrozomu a postakrozomální oblasti, C – signál pouze v akrozomu, D – signál na celé hlavičce.

Na Obr. 30 je uvedený graf představující rozdíl v lokalizaci signálu vazby SNA v apikální části akrozomu a hlavní části akrozomu u spermii před a po kapacitaci. Jak je z grafu patrné, velmi podobně jako v případě lektinu MAA po kapacitaci došlo k nárůstu zastoupení spermii s vazbou SNA lektinu na sacharidové struktury pouze v apikální části akrozomu, nicméně průměrný procentuální rozdíl byl pouze 9 %. Naprostá většina spermii (v průměru 89,5 % ejakulovaných a 80,5 % kapacitovaných spermii) vykazovala signál s lokalizací sialové kyseliny jak v hlavní části akrozomu, tak současně i v hlavní části akrozomu.



Obr. 30. Grafické porovnání průměrného procentuálního zastoupení signálu vazby SNA lektinu na akrozom spermii v suspenzi před a po kapacitaci. Odchylka z průměru je vyjádřena \pm SEM; NS – rozdíl není signifikantní.

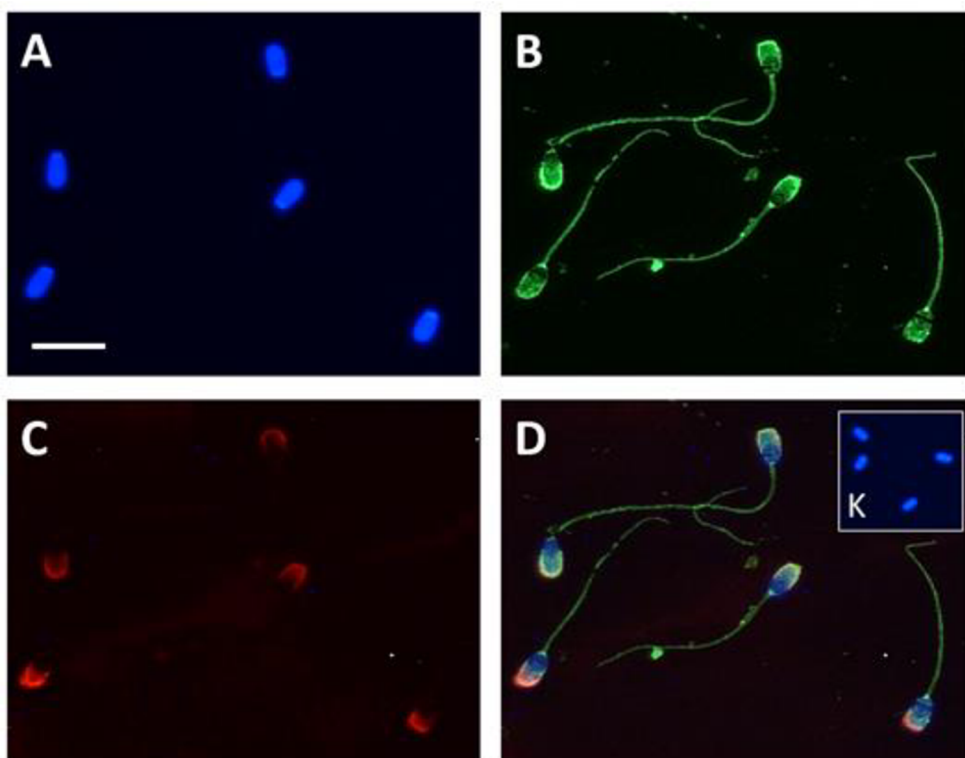
Na Obr. 31 je graf představující rozdíl v lokalizaci signálu na bičíku u spermii s vazbou SNA před a po kapacitaci. U ejakulovaných spermii je vidět jasná převaha spermii se signálem na bičíku (96 %). Po kapacitaci nastal pokles v procentu značených spermii v průměru o 45 %. Podobně jako v případě lektinu MAA lze tedy hovořit o výrazném rozdílu v lokalizaci sialové kyseliny na bičíku před a po kapacitaci.



Obr. 31. Grafické porovnání průměrného procentuálního zastoupení signálu vazby SNA lektinu na bičík spermii v suspenzi a po kapacitaci. Odchylka z průměru je vyjádřena \pm SEM; NS – rozdíl není signifikantní.

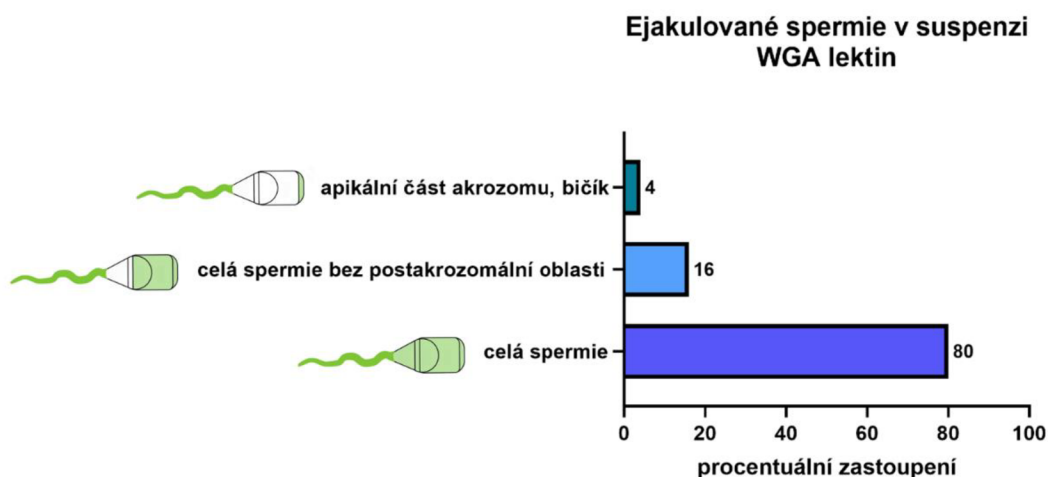
5.1.2.3 Lokalizace sialové kyseliny pomocí WGA lektinu před a po kapacitaci

Na Obr. 32 lze pozorovat lokalizaci nejen sialové kyseliny ale i N-acetylglukosaminu pomocí lektinu WGA v suspenzi u ejakulovaných spermií. Na většině spermií v obrázku je patrný výrazný signál na celé spermii kromě postakrozomální oblasti. Celková intenzita signálu byla v případě tohoto lektinu nejvyšší, nejvíce zřetelná byla detekce sialové kyseliny v apikální části akrozomu.



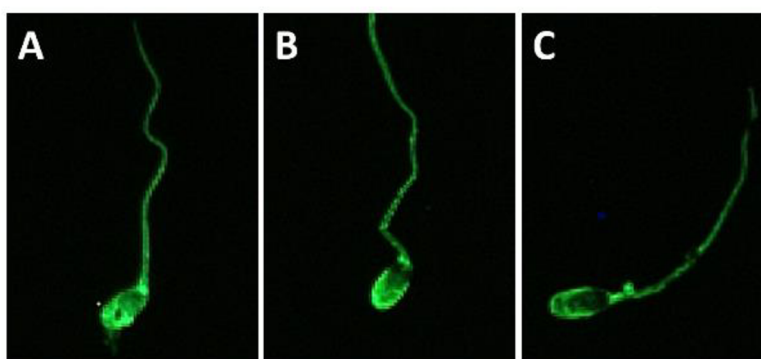
Obr. 32. Detekce sialové kyseliny a N-acetylglukosaminu na ejakulovaných spermiích v suspenzi: A – jádra značené DAPI (modře), B – pozitivní reakce s WGA lektinem (zeleně), C – akrozomy značené PNA lektinem (červeně), D – složený obrázek (DAPI, lektin, PNA), K – negativní kontrola. Zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.

Na Obr. 33 je zobrazeno grafické porovnání a procentuální zastoupení jednotlivých populací nalezených u ejakulovaných spermií v suspenzi s vazbou WGA lektinu. Jasnou převahu s 80 % tvořila populace spermií se signálem na celé spermii. Do této skupiny byly počítány i spermie se slabou fluorescencí v postakrozomální oblasti. Populace spermií, které zcela chyběl signál pouze v postakrozomální oblasti tvořila 16 %. Zbytek (4 %) tvořily spermie s detekcí signálu pouze v apikální části akrozomu a na bičíku.



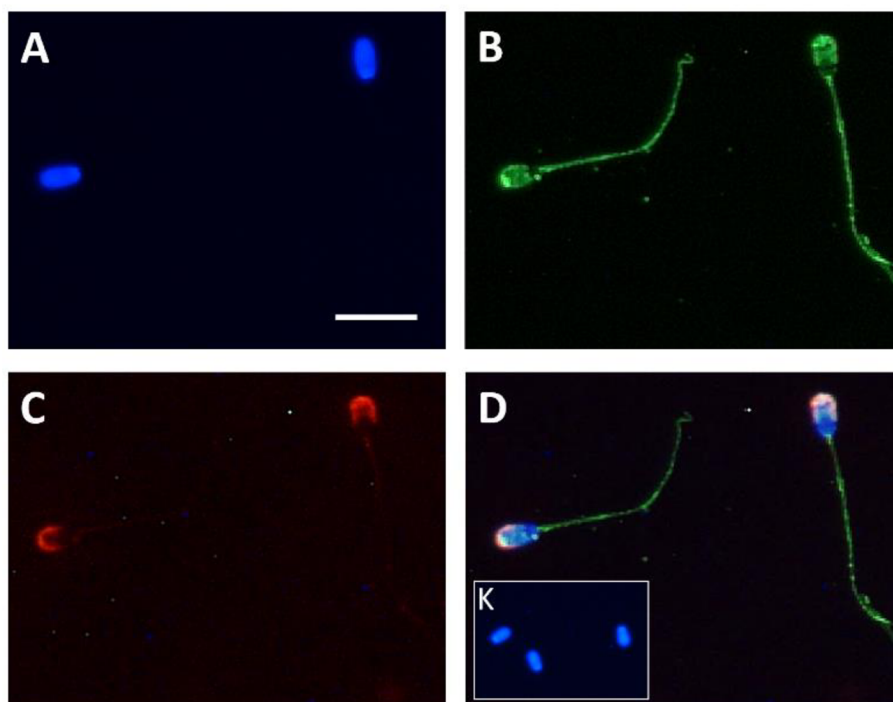
Obr. 33. Grafické porovnání procentuálního zastoupení jednotlivých vzorů vazby WGA lektinu na ejakulované spermie v suspenzi.

Obr. 34 představuje detaily spermií se všemi nalezenými vzory na ejakulovaných spermích s navázaným WGA lektinem značící sialovou kyselinu a N-acetylglukosamin lišící se rozdílným signálem na hlavičce.



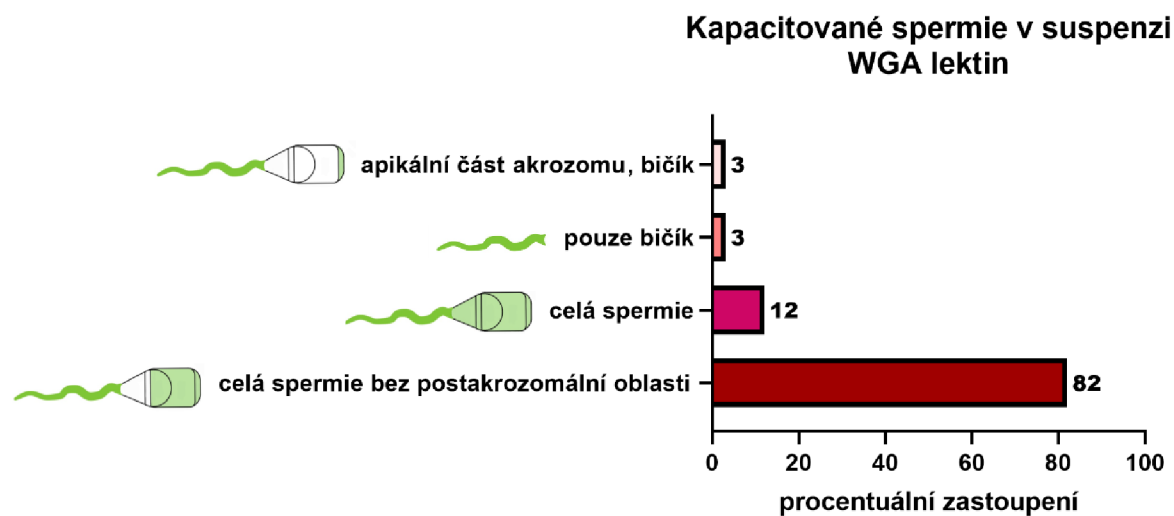
Obr. 34. Ejakulované spermie v suspenzi s WGA lektinem – detaily nejčastěji zastoupených kategorií značení: A – signál na celé spermii, B – signál na celé spermii kromě ekvatoriální segmentu akrozomu a postakrozomální oblasti, C – signál pouze v apikální části akrozomu a na bičíku.

Na Obr. 35 je zobrazena lokalizace sialové kyseliny a N-acetylglukosaminu u kapacitovaných spermií v suspenzi. Na obrázku jsou jako v předchozím případě vybrané spermie se signálem na celé spermii kromě postakrozomální oblasti, popř. s velmi slabou nebo částečnou fluorescencí v této oblasti.



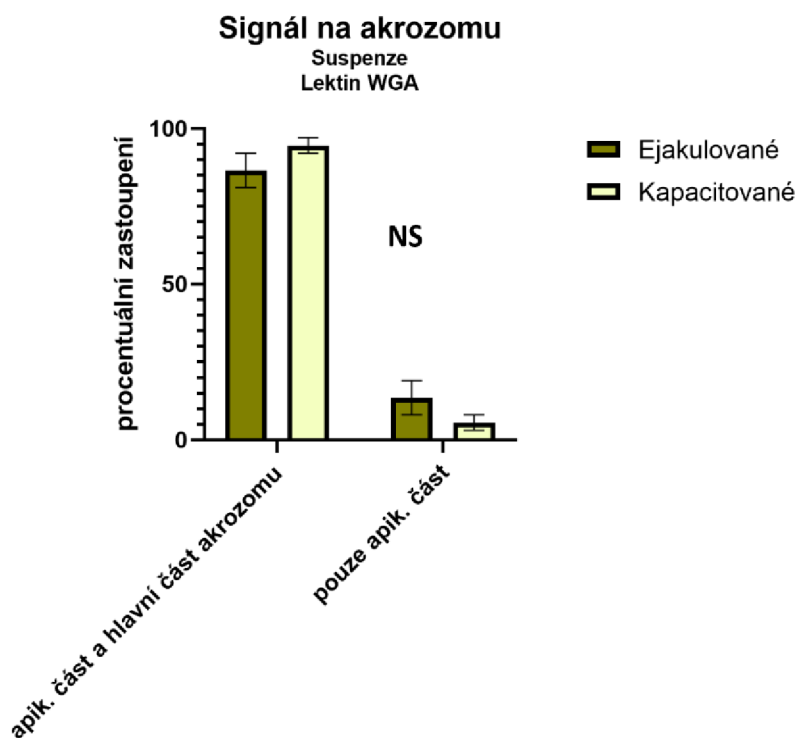
Obr. 35. Detekce sialové kyseliny a N-acetylglukosaminu na kapacitovaných spermích v suspenzi: A – jádra značené DAPI (modře), B – pozitivní reakce s WGA lektinem (zeleně), C – akrozomy značené PNA lektinem (červeně), D – složený obrázek (DAPI, lektin, PNA), K – negativní kontrola. Zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.

Následující graf (Obr. 36) ukazuje, že podíl spermíí bez signálu v postakrozomální oblasti po kapacitaci jasně vzrostl, a to z 20 % na 88 %. Po kapacitaci je tedy možné pozorovat pokles počtu spermíí s vazbou WGA na postakrozomální oblast hlavičky o 68 %. Bičík vykazoval jasnou fluorescenci u všech spermíí. Z grafů lze tedy vyčíst, že sialová kyselina nebo N-acetylglukosamin po kapacitaci patrně z postakrozomální oblasti odchází.



Obr. 36. Grafické porovnání procentuálního zastoupení jednotlivých vzorů vazby WGA lektinu na ejakulované spermie v suspenzi.

Na Obr. 37 je uvedený graf představující rozdíl v lokalizaci signálu na apikální části akrozomu a hlavní části akrozomu u spermii s vazbou WGA před a po kapacitaci. Bylo napočítáno 100 ejakulovaných a 100 kapacitovaných spermii dvou kanců odděleně, u kterých byl sledován pouze signál na akrozomu. Z hodnot byl následně vypočítán průměr a stanovena standardní chyba průměru. Z grafu lze vyčíst, že počet spermii se signálem v hlavní části akrozomu po kapacitaci narozdíl od předchozích případů průměrně vzrostl, přesněji o 8 %. U naprosté většiny spermii, ať už ejakulovaných (86,5 %) nebo kapacitovaných (94,5 %) byl signál lokalizován jak v apikální, tak i v hlavní části akrozomu.



Obr. 37. Grafické porovnání průměrného procentuálního zastoupení signálu vazby WGA lektinu na akrozom spermii v suspenzi před a po kapacitaci. Odchylka z průměru je vyjádřena \pm SEM; NS – rozdíl není signifikantní.

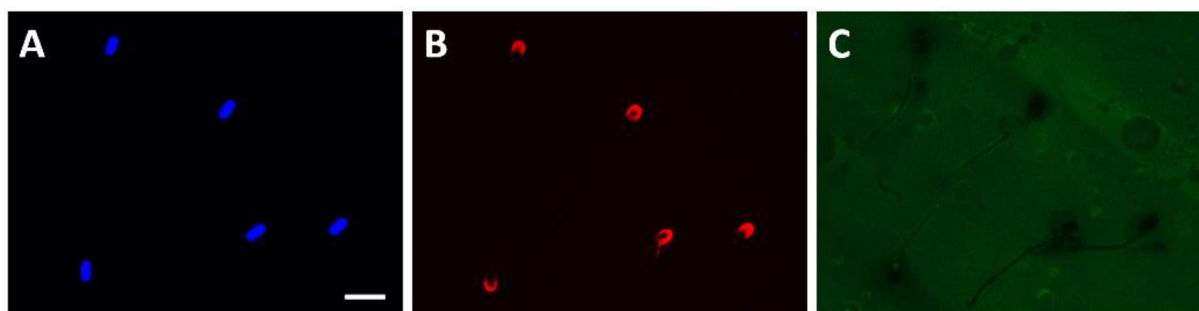
Signál na bičíku byl nalezen jak u ejakulovaných, tak u kapacitovaných spermii ve 100 % případů, a proto v tomto případě graf není uveden.

5.1.3 Vazba lektinů na spermie po fixaci aceton-metanolem

Vazba lektinu na sacharidové struktury glykoproteinů spermií byla sledována také na preparátech fixovaných vymraženým roztokem aceton-metanolu na mikroskopickém sklíčku. Aceton spolu s metanolem má nejen schopnost buňky fixovat, ale také permeabilizovat jejich plazmatickou membránu. Vazba lektinu na sialovou kyselinu tak může probíhat i uvnitř spermie. Pro vizualizaci detekce sacharidových struktur byl použit streptavidin konjugovaný s FITC, pro označení akrozomů byl použit lektin PNA konjugovaný rhodaminem a pro jádra DAPI v montovacím médiu. U každého experimentu byla provedena negativní kontrola bez lektinu.

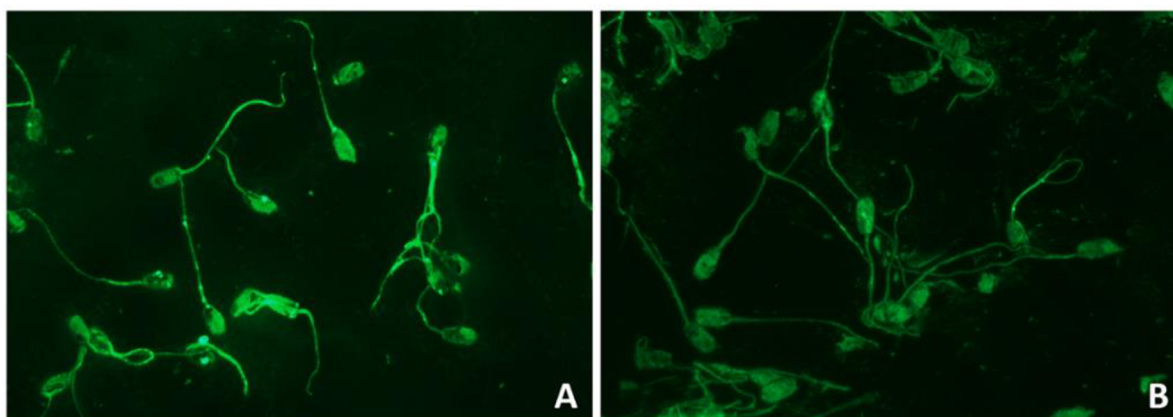
5.1.3.1 Lokalizace sialové kyseliny pomocí MAA lektinu před a po kapacitaci

Na Obr. 38 lze vidět, že na spermích po vlhké fixaci a následné inkubaci s lektinem MAA nebyl detekován žádný signál. Negativní reakce byla pozorována na ejakulovaných i kapacitovaných spermích.



Obr. 38. Negativní reakce s lektinem MAA u ejakulovaných spermíí fixovaných aceton-metanolem: A – jádra značené DAPI (modře), B – akrozomy značené PNA lektinem (červeně), C – reakce s MAA lektinem. Zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.

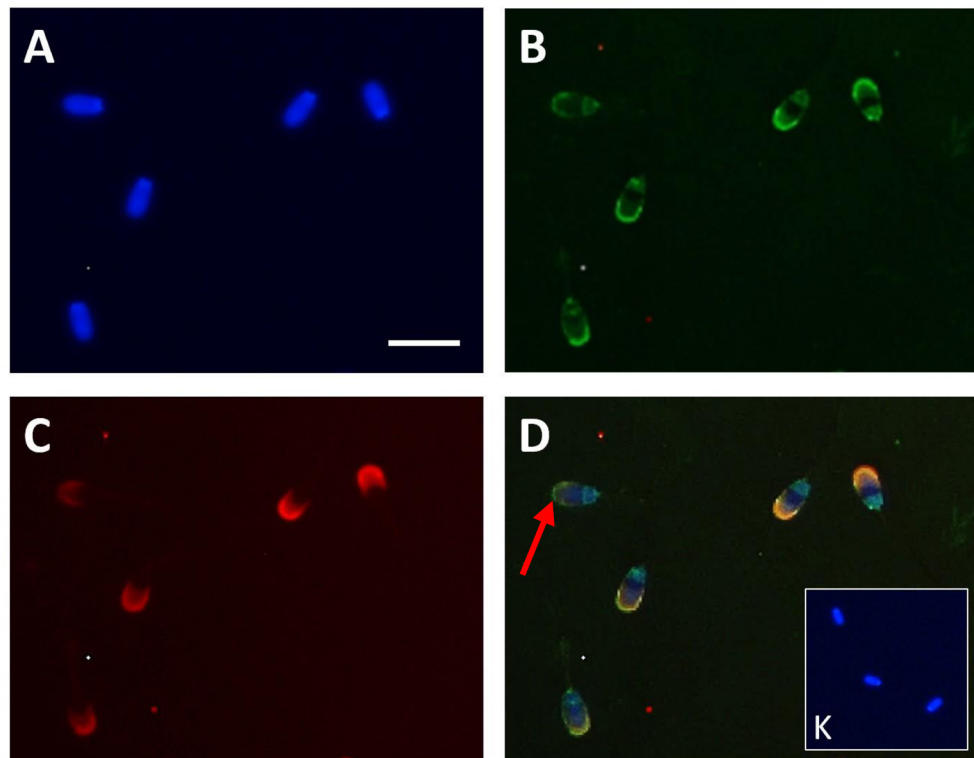
Byla také vyzkoušena šetrnější fixace pouze pomocí acetonu. Na Obr. 39 lze pozorovat velmi výrazný signál na ejakulovaných spermích a slabší signál na kapacitovaných spermích. Zároveň je viditelné silné pozadí. Zelený signál značící navázání MAA lektinu na spermích, který vykazuje vazbu s α -2,3 sialovou kyselinou, byl patrný vždy na celé spermii.



Obr. 39. Pozitivní reakce s lektinem MAA u ejakulovaných a kapacitovaných spermíí fixovaných pouze acetonem: A – ejakulované spermie, B – kapacitované spermie. Zelená barva značí pozitivní reakci s lektinem MAA. Zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.

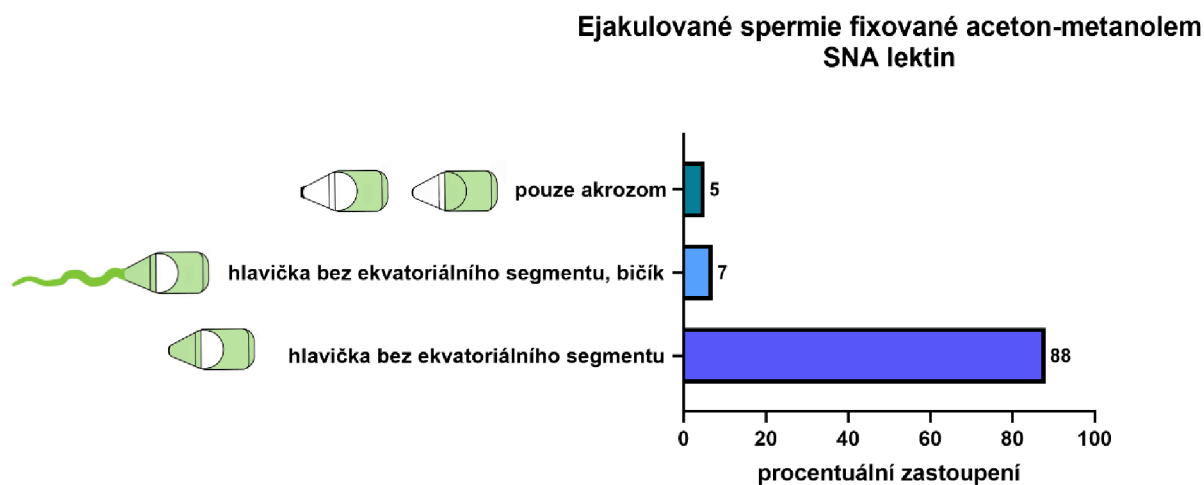
5.1.3.2 Lokalizace sialové kyseliny pomocí SNA lektinu před a po kapacitaci

U ejakulovaných spermií fixovaných aceton-metanolem vykazovala vazba s SNA lektinem typický vzor, který je možno vidět na Obr. 40. Detekce signálu nebyla oproti spermiiám v suspenzi vůbec nalezena na bičíku, pouze na hlavičce. Na obrázku je vidět silná fluorescence v apikální části akrozomu a dále slabší fluorescence v hlavní části akrozomu a postakrozomální oblasti. Signál viditelně chybí v ekvatoriálním segmentu akrozomu.



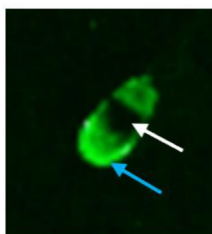
Obr. 40. Detekce α -2,6 vázané sialové kyseliny na ejakulovaných spermiiách fixovaných aceton-metanolem: A – jádra značené DAPI (modře), B – pozitivní reakce s SNA lektinem (zeleně), C – akrozomy značené PNA lektinem (červeně), D – složený obrázek (DAPI, lektin, PNA), K – negativní kontrola. Červená šipka značí poškozený akrozom. Zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.

Na následujícím grafu (Obr. 41) lze vidět, že populace spermií se signálem na celé hlavičce spermie kromě ekvatoriálního segmentu byla nejvíce zastoupena, a to v 88 %. Ostatní vzory byly pozorované pouze v jednotkách procent případů. Pouze v 7 % případů byl signál lokalizován na bičíku.



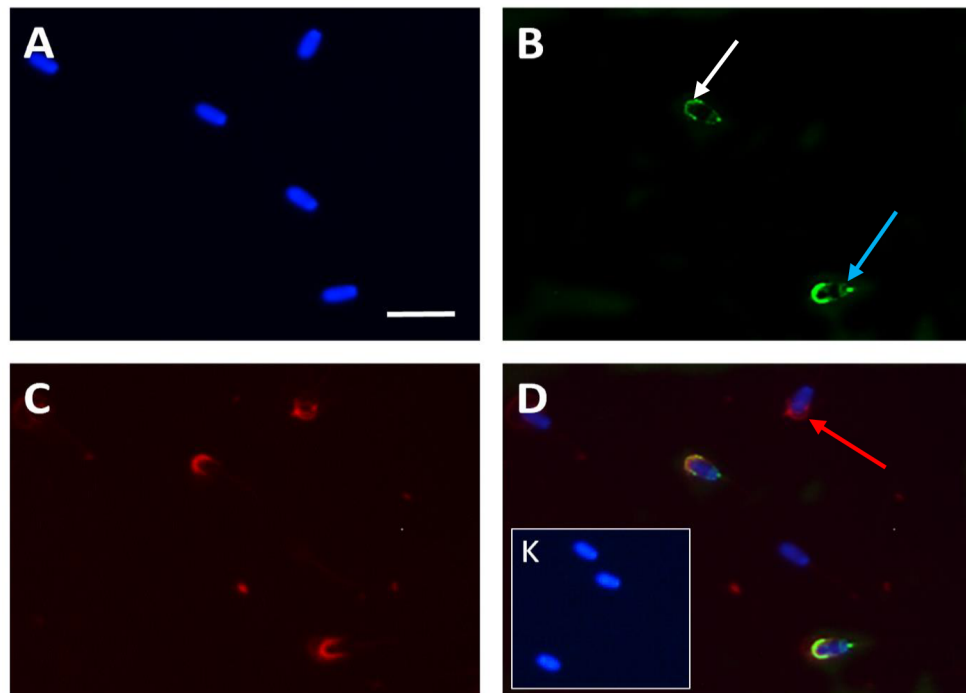
Obr. 41. Grafické porovnání procentuálního zastoupení jednotlivých vzorů vazby SNA lektinu na ejakulované spermie fixované aceton-metanolem.

Na Obr. 42 je zvětšený výřez nejčastěji zastoupeného vzoru v této skupině. Lze pozorovat zvýšenou intenzitu v apikální části akrozomu (modrá šipka) a chybějící signál v ekvatoriálním segmentu (bílá šipka).



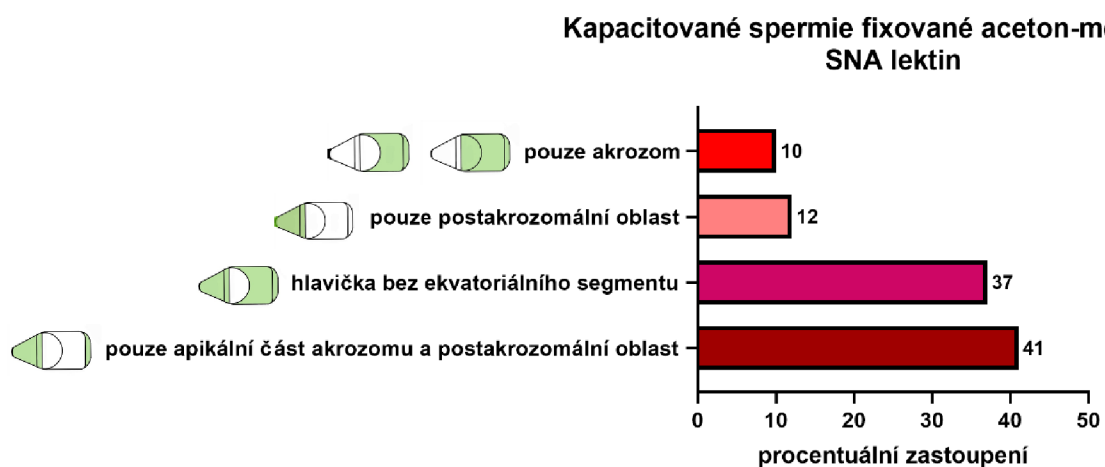
Obr. 42. Ejakulované spermie fixované aceton-metanolem s SNA lektinem – detail nejčastěji zastoupeného vzoru: signál na apikální části akrozomu, hlavní části akrozomu a postakrozomální oblasti; modrá šipka ukazuje silný signál v apikální části akrozomu, bílá šipka chybějící signál v ekvatoriálním segmentu.

Lokalizace α -2,6 vázané sialové kyseliny na kapacitovaných spermích lze vidět na Obr. 43. Signál na vybraných spermích byl detekován pouze v apikální části akrozomu (bílá šipka) a slabě v postakrozomální oblasti (modrá šipka). U spermie s poškozeným akrozomem (červená šipka) není vazba s SNA.



Obr. 43. Detekce α -2,6 vázané sialové kyseliny na kapacitovaných spermích fixovaných aceton-metanolem: A – jádra značené DAPI (modře), B – pozitivní reakce s SNA lektinem (zeleně), C – akrozomy značené PNA lektinem (červeně), D – složený obrázek (DAPI, lektin, PNA), K – negativní kontrola. Červená šipka značí poškozený akrozom, modrá šipka značí slabý signál v postakrozomální oblasti, bílá šipka značí signál v apikální části akrozomu. Zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.

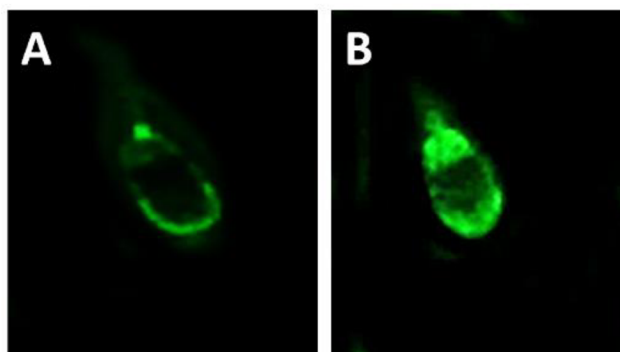
Na Obr. 44 je graficky znázorněné zastoupení jednotlivých vzorů po vazbě s SNA lektinem. Vzor vyskytující se u ejakulovaných spermí se signálem na celé hlavičce kromě ekvatoriálního segmentu klesl po kapacitaci z 88 % (viz Obr. 41) na 37 %. Z grafu je patrné, že detekce sialové kyseliny v oblasti hlavní části akrozomu po kapacitaci do určité míry vymizela a zůstala pouze v apikální části akrozomu a v postakrozomální oblasti (41 %).



Obr. 44. Grafické porovnání procentuálního zastoupení jednotlivých vzorů vazby SNA lektinu na kapacitované spermie fixované aceton-metanolem.

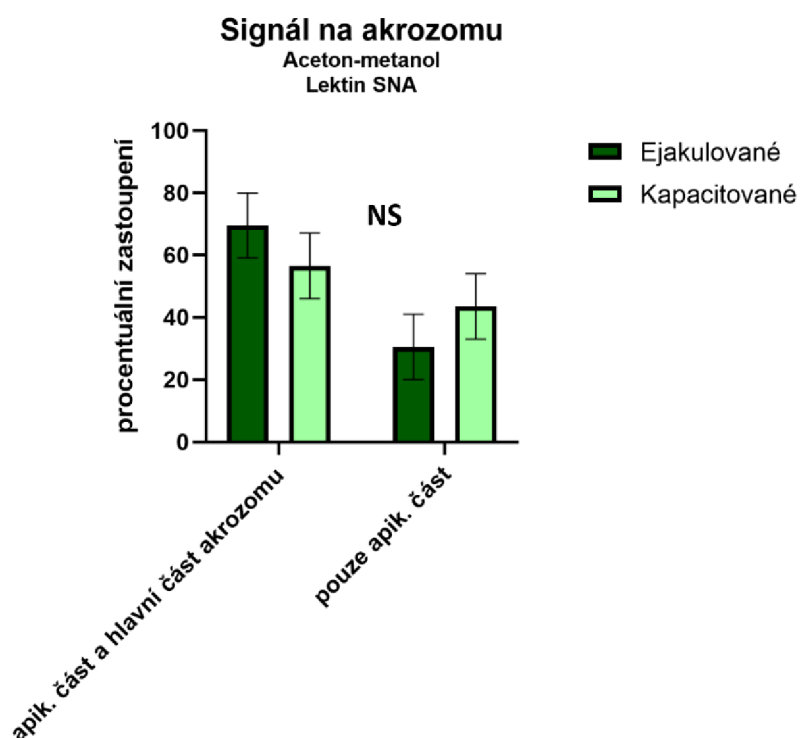
Ve 12 % případů zůstal signál pouze v postakrozomální oblasti spermie a 10 % spermií naopak vykazovalo vazbu s lektinem pouze na akrozomu. Signál na bičíku spermie nebyl viditelný u žádné spermie.

Na Obr. 45 jsou detaily dvou nejčastějších vzorů, které vazba SNA lektinu na kapacitovaných spermích vykazovala.



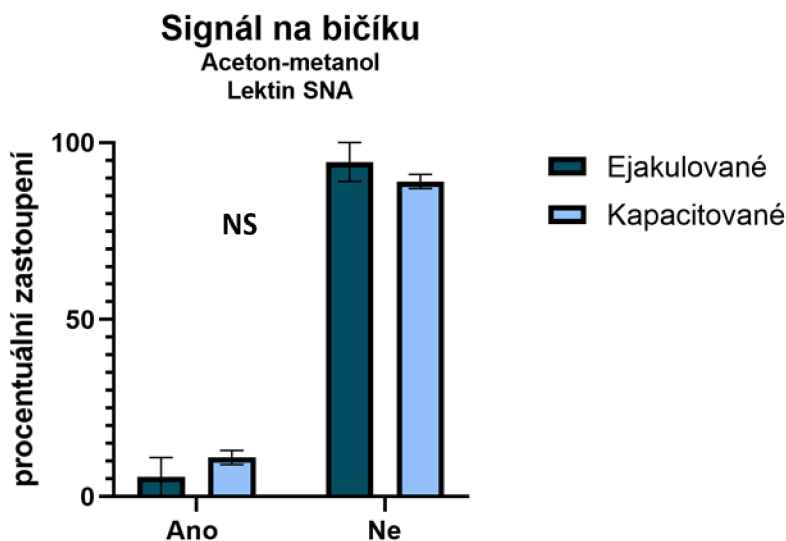
Obr. 45. Kapacitované spermie s SNA lektinem – detaily nejčastěji zastoupených kategorií značení: A – signál v apikální části akrozomu a slabě v postakrozomální oblasti, B – signál na celé hlavičce kromě ekvatoriálního segmentu akrozomu.

Na Obr. 46 je uvedený graf představující rozdíl v lokalizaci signálu v apikální části akrozomu a hlavní části akrozomu u spermií s vazbou lektinu SNA před a po kapacitaci. Jak si lze všimnout, počet spermií se signálem v hlavní části akrozomu po kapacitaci klesl průměrně o 16 % a detekce byla lokalizovaná ve větší míře pouze v apikální části akrozomu.



Obr. 46. Grafické porovnání průměrného procentuálního zastoupení signálu vazby SNA lektinu na akrozom spermií fixovaných aceton-metanolem před a po kapacitaci. Odchylka z průměru je vyjádřena \pm SEM; NS – rozdíl není signifikantní.

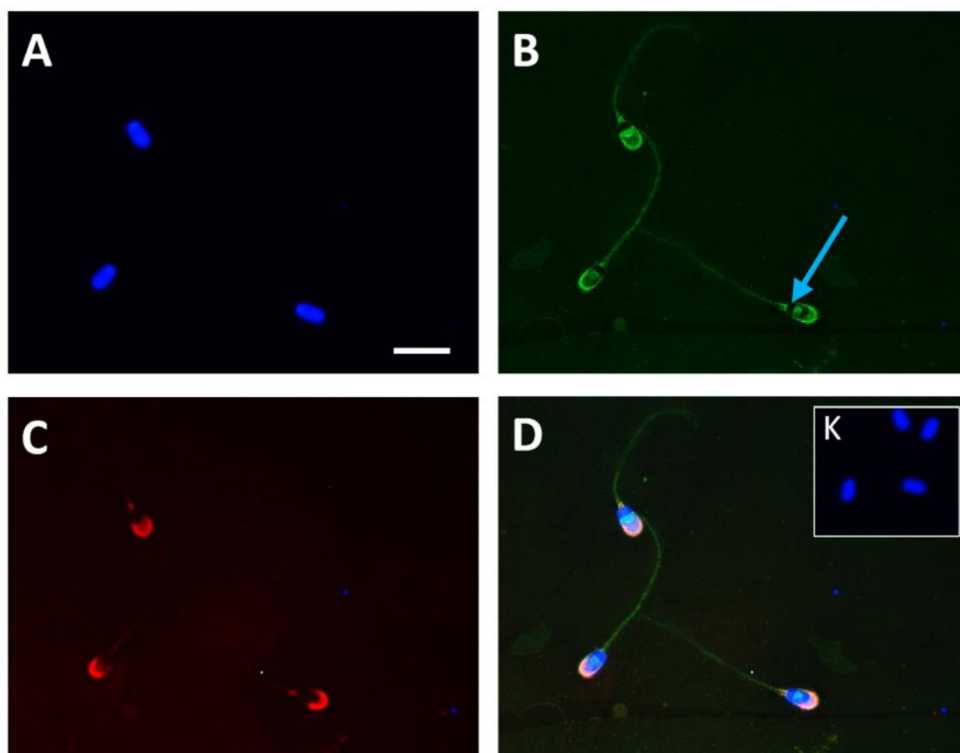
Na Obr. 47 je obdobný graf popisující změny v lokalizaci sialové kyseliny před a po kapacitaci na bičíku spermie. Jak je z grafu patrné, v této skupině byly rozdíly minimální. V průměru 94,5 % u ejakulovaných a 89 % kapacitovaných spermií nebyla viditelná žádná fluorescence na bičíku. Po kapacitaci přibýlo pouze v průměru o 5,5 % spermií, u kterých bičík vykazoval pozitivní reakci s lektinem SNA.



Obr. 47. Grafické porovnání průměrného procentuálního zastoupení signálu vazby SNA lektinu na bičík spermií fixovaných aceton-metanolem před a po kapacitaci. Odchylka z průměru je vyjádřena \pm SEM; NS – rozdíl není signifikantní.

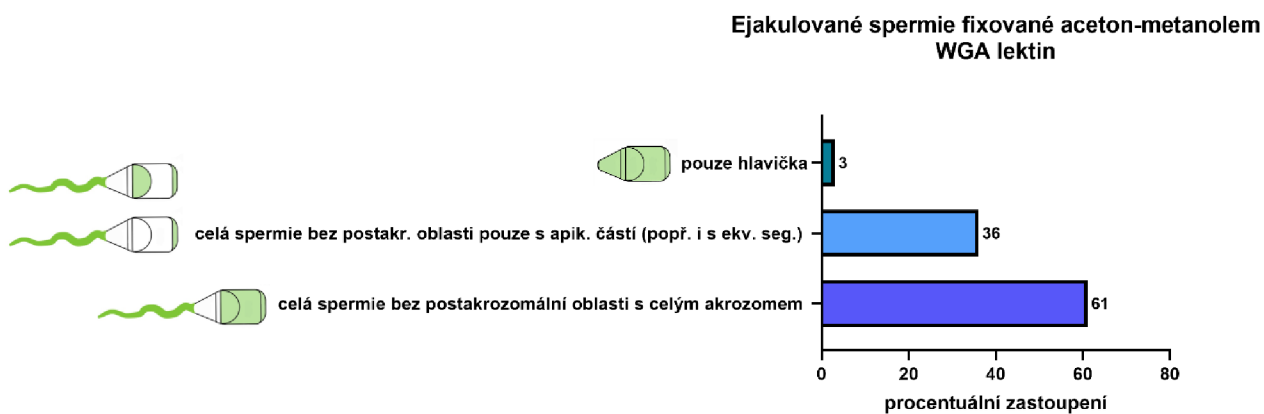
5.1.3.3 Lokalizace sialové kyseliny pomocí WGA lektinu před a po kapacitaci

Lokalizace sialové kyseliny a N-acetylglukosaminu na ejakulovaných spermiích fixovaných aceton-metanolem je zobrazena na Obr. 48. Na obrázku lze vidět spermie s pozitivní detekcí na celé spermii pouze s chybějícím signálem v postakrozomální oblasti (modrá šipka). Je vidět zřetelný rozdíl mezi intenzitou signálu v různých částech akrozomu. Intenzita v apikální části a ekvatoriálním segmentu akrozomu byla výrazně silnější, zatímco v hlavní části akrozomu byla znatelně slabší.

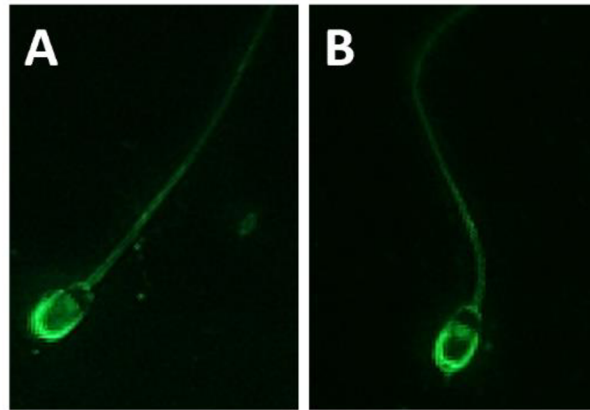


Obr. 48. Detekce sialové kyseliny a N-acetylglukosaminu na ejakulovaných spermích fixovaných aceton-metanolem: A – jádra značené DAPI (modře), B – pozitivní reakce s WGA lektinem (zeleně), C – akrozomy značené PNA lektinem (červeně), D – složený obrázek (DAPI, lektin, PNA), K – negativní kontrola. Modrá šipka značí chybějící signál v postakrozomální oblasti. Zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.

Na Obr. 49 je uvedeno grafické znázornění procentuálního zastoupení jednotlivých populací. V grafu je vidět, že největší skupinu tvořil vzor spermí se signálem po celé buňce kromě postakrozomální oblasti. Tento vzor vazby WGA lektinu byl nalezen u 61 % spermí. Druhou největší skupinou byly spermie se signálem pouze na bičíku a apikální části akrozomu a/nebo i v ekvatoriálním segmentu, tato skupina tvořila 36 %. U 97 % spermí byl detekován signál na bičíku a pouze u 3 % svítila jen hlavička spermie. Zvětšené výřezy s dvěma skupinami nejčastěji zastoupených vzorů lze vidět na Obr. 50.

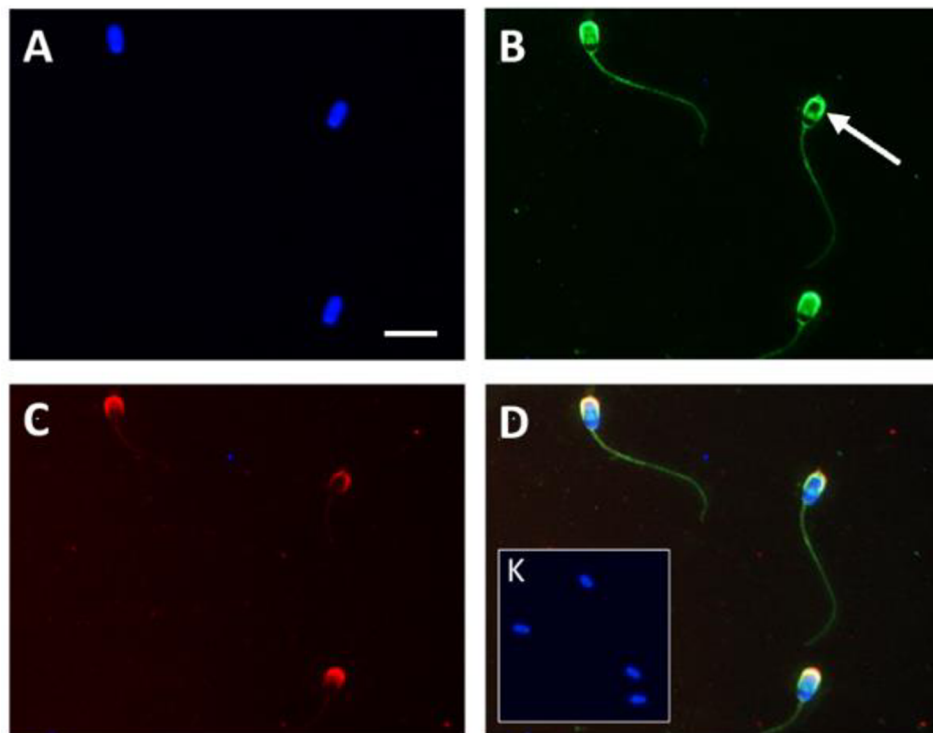


Obr. 49. Grafické porovnání procentuálního zastoupení jednotlivých vzorů vazby WGA lektinu na ejakulované spermie fixované aceton-metanolem.



Obr. 50. Ejakulované spermie WGA lektinem – detaily nejčastěji zastoupených kategorií značení: *A – signál na celé spermii kromě postakrozomální oblasti, B – signál na celé spermii kromě postakrozomální oblasti a hlavní části akrozomu*

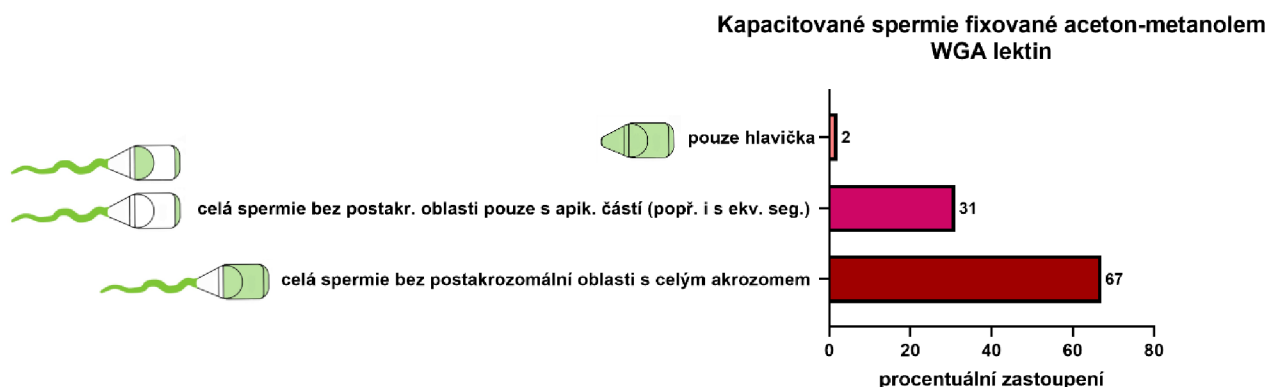
Na následujícím obrázku (Obr. 51) je vidět pozitivní reakce s WGA lektinem u kapacitovaných spermii fixovaných aceton-metanolem. Na vybraných spermích byl zřetelný signál na celé spermii kromě postakrozomální oblasti a u jedné buňky navíc chyběla detekce i v oblasti hlavní části akrozomu (označeno bílou šipkou).



Obr. 51. Detekce sialové kyseliny a N-acetylglukosaminu na kapacitovaných spermích fixovaných aceton-metanolem: *A – jádra značené DAPI (modře), B – pozitivní reakce s WGA lektinem (zeleně), C – akrozomy značené PNA lektinem (červeně), D – složený obrázek (DAPI, lektin, PNA), K – negativní kontrola. Bílá šipka značí spermii bez signálu v hlavní části akrozomu. Zvětšení 400x, měřítko 10 μ m*

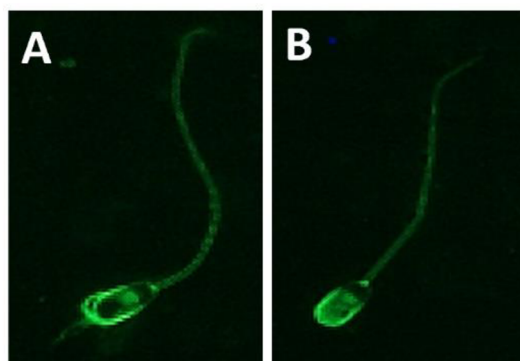
Na Obr. 52 je graf s procentuálním zastoupením nalezených vzorů u kapacitovaných spermii s pozitivní reakcí s lektinem WGA. U 98 % spermii byl nalezen signál na bičíku. V zastoupení jednotlivých vzorů došlo po kapacitaci pouze k malým změnám. Nejčastěji

nalezeným vzorem byla s 67 % spermie s lokalizací signálu na celé spermii kromě postakrozomální oblasti. Druhá nejvíce zastoupená skupina zůstala také stejná, spermie se signálem v apikální části akrozomu a bičíku nyní tvořily 31 %.



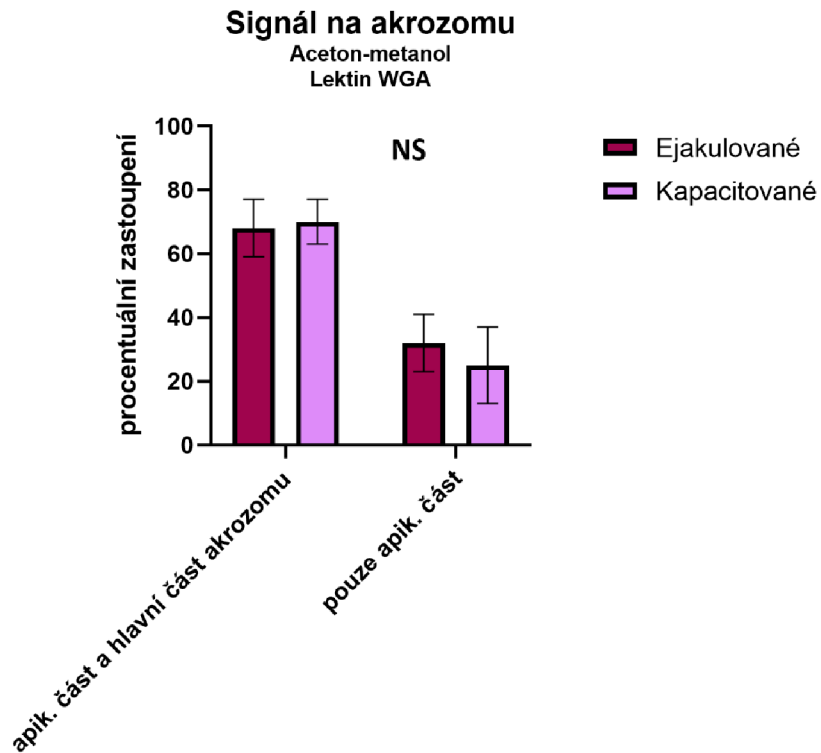
Obr. 52. Grafické porovnání procentuálního zastoupení jednotlivých vzorů WGA lektinu na kapacitované spermie fixované aceton-metanolem.

Na Obr. 53 jsou vloženy detaily spermií, které reprezentují vzory, které dohromady tvořily 98 % zastoupení u kapacitovaných spermií s navázaným WGA lektinem.



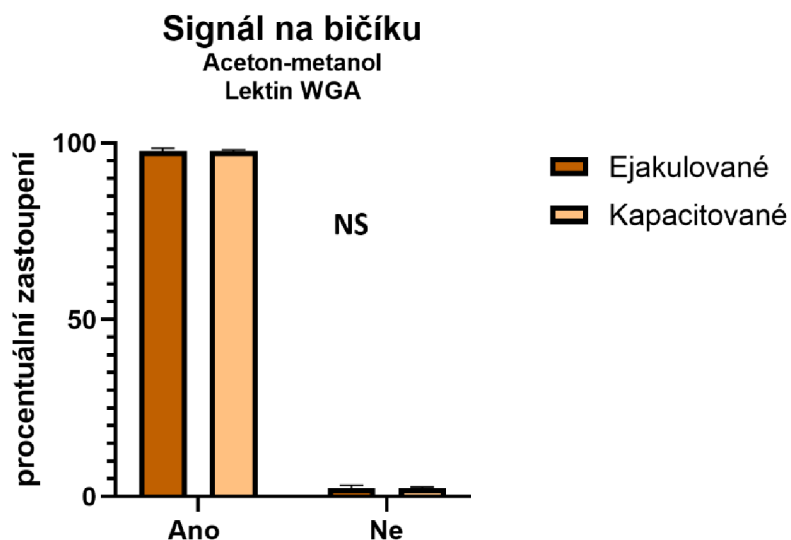
Obr. 53. Kapacitované spermie WGA lektinem – detaily dvou nejčastěji zastoupených kategorií značení: A – signál v apikální části akrozomu a slabě v ekvatoriálním segmentu, B – signál na celé hlavičce kromě postakrozomální oblasti.

Změny v signálu na akrozomu spermie s vazbou WGA lektinu před a po kapacitaci lze vidět na následujícím grafu (Obr. 54). Jak lze z grafu vyčíst, lokalizace signálu se po kapacitaci změnila jen mírně. Počet spermií se signálem pouze v apikální části akrozomu po kapacitaci lehce klesl, a to v průměru o 8 %. Téměř tři čtvrtiny ejakulovaných i kapacitovaných spermií ovšem vykazovaly signál jak v apikální části akrozomu, tak i v hlavní části akrozomu.



Obr. 54. Grafické porovnání průměrného procentuálního zastoupení signálu vazby WGA lektinu na akrozom spermii fixovaných aceton-metanolem před a po kapacitaci. Odchylka z průměru je vyjádřena \pm SEM; NS – rozdíl není signifikantní.

Obr. 55 pak představuje graf, kde je porovnáván signál na bičíku u ejakulovaných a kapacitovaných spermii. Jak lze vidět, téměř 100 % spermii mělo pozitivní reakci s WGA lektinem na bičíku jak před kapacitací, tak i po kapacitaci.



Obr. 55. Grafické porovnání průměrného procentuálního zastoupení signálu vazby WGA lektinu na bičík spermii fixovaných aceton-metanolem před a po kapacitaci. Odchylka z průměru je vyjádřena \pm SEM; NS – rozdíl není signifikantní.

5.1.4 Procentuální zastoupení signálu vazby lektinů na spermích

Na závěr této kapitoly jsou přiloženy tabulky (Tab. 2 a Tab. 3) s procentuálním zastoupením spermíí, na kterých byl detekován signál s vybranými lektiny. Tabulky jsou rozdělené dle lektinů a způsobu přípravy mikroskopických preparátů. Jak je možné vidět, lektin MAA značil ejakulované spermie v suspenzi ve 44 % a po kapacitaci ve 33 % případů. Při vazbě po fixaci aceton-metanolem nebyla detekována žádná spermie se signálem. Lektin SNA značil 52 % ejakulovaných a 58 % kapacitovaných spermíí v suspenzi, při fixaci aceton-metanolem se značení zvýšilo na 94 % u ejakulovaných a 65 % u kapacitovaných spermíí. Z hodnot v tabulkách lze vyvodit, že ze všech lektinů nejvíce spermie značil lektin WGA s 75 a 76 % u vazby v suspenzi a 89 a 94 % s vazbou po fixaci aceton-metanolem.

Tab. 2. Porovnání procentuálního zastoupení signálu na spermích s vazbou lektinu v suspenzi u jednotlivých skupin.

Suspenze			
Spermie se signálem v %	MAA	SNA	WGA
Ejakulované	44	52	75
Kapacitované	33	58	76

Tab. 3. Porovnání procentuálního zastoupení signálu na spermích s vazbou lektinu po fixaci aceton-metanolem u jednotlivých skupin.

Aceton-metanol			
Spermie se signálem v %	MAA	SNA	WGA
Ejakulované	0	94	89
Kapacitované	0	65	94

5.2 Detekce sialové kyseliny v extraktech spermíí před a po kapacitaci

Za účelem detekce sializovaných proteinů ve spermích před a po kapacitaci byla provedena extrakce proteinů a následná SDS-elektroforéza. Gelová elektroforéza zajistila rozdělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Rozdělené proteiny byly následně přeneseny na membránu, na které byly detekovány proteiny s navázanou kyselinou sialovou. Pro detekci pouze sacharidových struktur na povrchu buňky vázaných na glykoproteiny na plazmatické membráně byly izolovány povrchové glykoproteiny spermíí. Byla tak zkoumána míra sializace glykoproteinů na povrchu a v celé spermii. Pro extrakci povrchových proteinů byly použity nativní ejakuláty. Pro extrakci celkových proteinů byly použity inseminální dávky. Všechny vzorky byly připraveny v neredukujících podmínkách. U detekce pomocí lektinu nebo protilátky proti sialové kyselině je vždy uveden pouze jeden reprezentativní obrázek z vybraného opakování.

5.2.1 Denzitometrická a statistická analýza

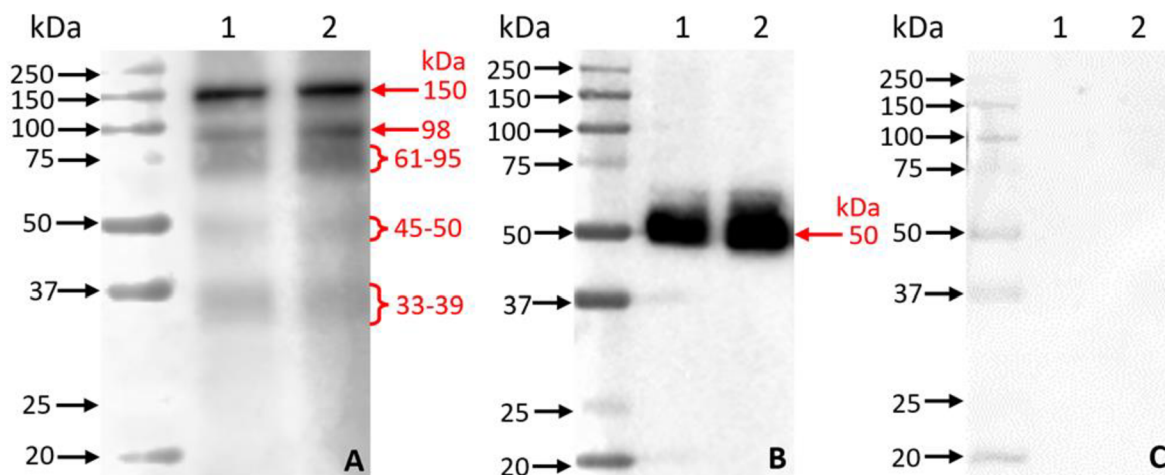
Pro vyhodnocení zastoupení sializovaných glykoproteinů před a po kapacitaci byla provedena denzitometrická analýza a výsledky byly normalizovány k ejakulovaným spermii. Vytvořené grafy zobrazují hodnoty relativní optické denzity detekované sialové kyseliny pomocí lektinu nebo protilátky v glykoproteinech spermii. Hodnoty jsou vztaženy k signálu tubulinu za účelem zahrnutí rozdílného množství proteinů v celkové nanášce ejakulovaných a kapacitovaných spermii. K vyhodnocení výsledků u celkových proteinů byly analyzovány 3 měření z inseminačních dávek od různých kanců a byly porovnávány celkové signály sializovaných proteinů před a po kapacitaci. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí párového t-testu a jako statisticky významný byl hodnocen rozdíl na hladině významnosti $p=0,05$. Z výsledků byl vytvořen graf s uvedenými směrodatnými odchylkami u hodnoty průměru. U povrchových glykoproteinů z nativního ejakulátu nebylo možné změny statisticky vyhodnotit kvůli experimentům s pozitivním signálem v negativní kontrole nebo neúspěšné detekci sializovaných glykoproteinů. V tomto případě byla provedena denzitometrická analýza u vybraných glykoproteinů a vytvořeny grafy porovnávající optickou denzitu před a po kapacitaci pro jedno opakování.

5.2.2 Detekce v celkových proteinových extraktech spermii

Proteiny ejakulovaných a kapacitovaných spermii byly inkubovány s biotinem značenými lektiny MAA a SNA a dále byla vyzkoušena detekce pomocí polyklonální králičí protilátky proti sialové kyselině. Tato metoda korespondovala s metodou lokalizace sialové kyseliny na spermii při vazbě lektinů na spermie fixované aceton-metanolem pomocí fluorescenčního mikroskopu. U každé detekce je přiložen výřez membrány s negativní kontrolou inkubovanou pouze s avidinem konjugovaným s křenovou peroxidázou a pozitivní kontrolou po inkubaci s α -tubulinem u ejakulovaných a kapacitovaných spermii. U pozitivní kontroly lze vidět detekci α -tubulinem o velikosti 50 kDa. Tubulin sloužil jako referenční protein pro určení celkové nanášky proteinů.

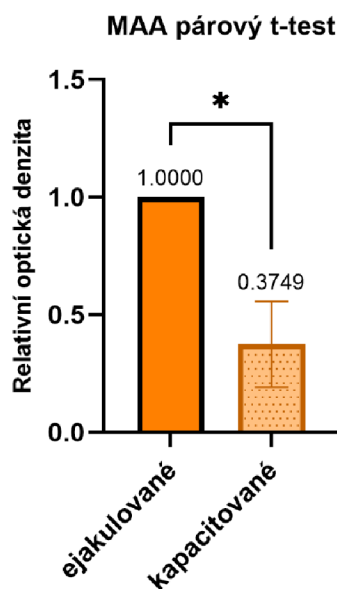
5.2.2.1 Detekce sialové kyseliny pomocí MAA lektinu

Pro detekci α -2,3 vázané sialové kyseliny v celkových glykoproteinech spermii byl použit lektin MAA, pro vizualizaci proteinů byl použit avidin konjugovaný s křenovou peroxidázou. Na Obr. 56A je nitrocelulósová membrána, na které jsou viditelné proteiny z ejakulovaných a kapacitovaných spermii s pozitivní reakcí s lektinem. Na Obr. 56B je ukázána kontrolní detekce α -tubulinu a obrázek 56C zobrazuje negativní kontrolu. Byly detekovány glykoproteiny o velikosti 150 a 98 kDa a dále glykoproteiny s velikostí 61-95 kDa, 45-50 kDa a 33-39 kDa. Signál vazby MAA lektinu byl vztažen k celkové nanášce extrahovaných proteinů ejakulovaných a kapacitovaných spermii vyjádřené detekcí α -tubulinu.



Obr. 56. Detekce α -2,3 vázáné sialové kyseliny v extraktu spermii před a po kapacitaci pomocí lektinu MAA (A), pozitivní kontrola detekcí α -tubulinu (B), negativní kontrola po inkubaci pouze s avidinem konjugovaným s křenovou peroxidázou (C): 1 – ejakulované spermie, 2 – kapacitované spermie.

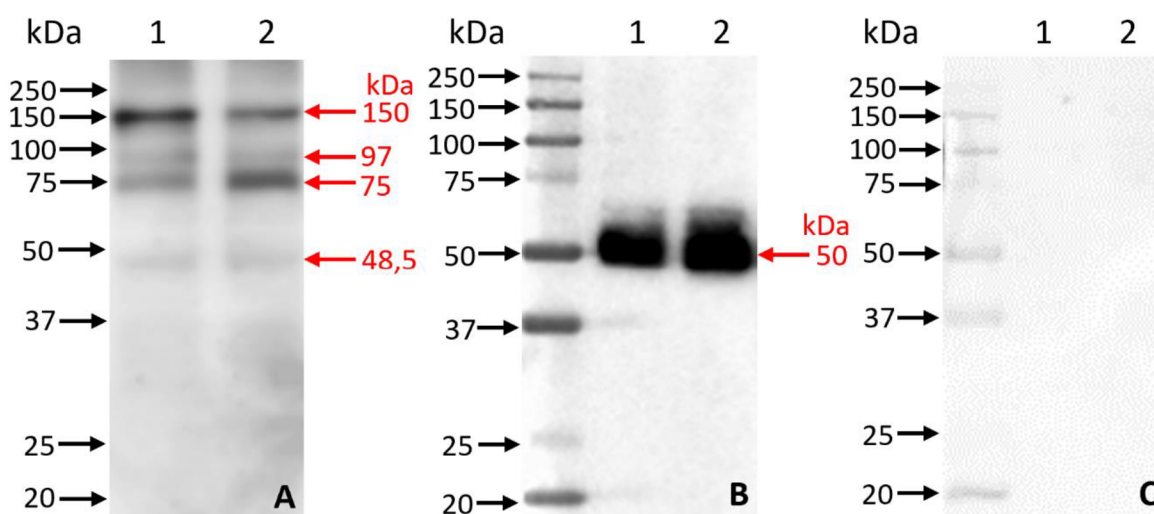
Na Obr. 57 lze vidět statistické vyhodnocení výsledků denzitometrické analýzy v průměrné intenzitě signálu MAA lektinu reagujícího s α -2,3 vázanou sialovou kyselinou v extraktu celkových glykoproteinů spermii před a po kapacitaci. Hodnoty jsou vztaženy k signálu protilátky proti α -tubulinu. Pokles v množství sialové kyseliny u kapacitovaných glykoproteinů byl výrazný, a to zhruba na třetinu své původní hodnoty stanovené u ejakulovaných spermii. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl s hodnotou $p < 0,05$ ($p = 0,0272$).



Obr. 57. Průměr intenzity signálu lektinu MAA s vazbou na α -2,3 vázanou sialovou kyselinou v celkovém extraktu spermii před a po kapacitaci; statisticky významný rozdíl $p < 0,05$.

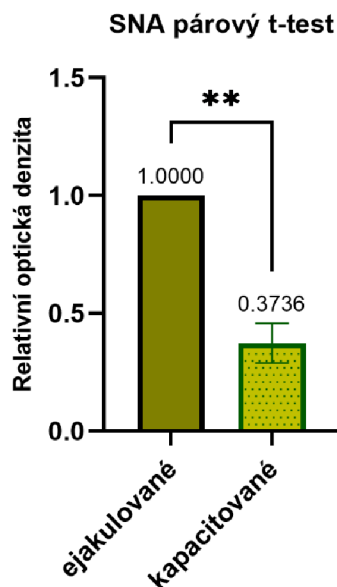
5.2.2.2 Detekce sialové kyseliny pomocí SNA lektinu

Byla provedena detekce α -2,6 vázané sialové kyseliny v celkových glykoproteinech spermií pomocí lektinu SNA, pro vizualizaci proteinů byl použit avidin konjugovaný s křenovou peroxidázou. Na Obr. 58A je nitrocelulózová membrána, na které jsou viditelné proteiny spermií před a po kapacitaci s pozitivní reakcí s lektinem. Na Obr. 58B je ukázána kontrolní detekce α -tubulinu a obrázek 58C zobrazuje negativní kontrolu. Byly detekovány glykoproteiny o velikosti 150 a 97 kDa, což naznačuje, že by se mohlo jednat o stejné proteiny jako u detekce lektinem MAA. Dále byly detekovány glykoproteiny s velikostí 75 kDa a 48,5 kDa.



Obr. 58. Detekce α -2,6 vázané sialové kyseliny v extraktu spermií před a po kapacitaci pomocí lektinu SNA (A), pozitivní kontrola detekcí α -tubulinu (B), negativní kontrola po inkubaci pouze s avidinem konjugovaným s křenovou peroxidázou (C): 1 – ejakulované spermie, 2 – kapacitované spermie.

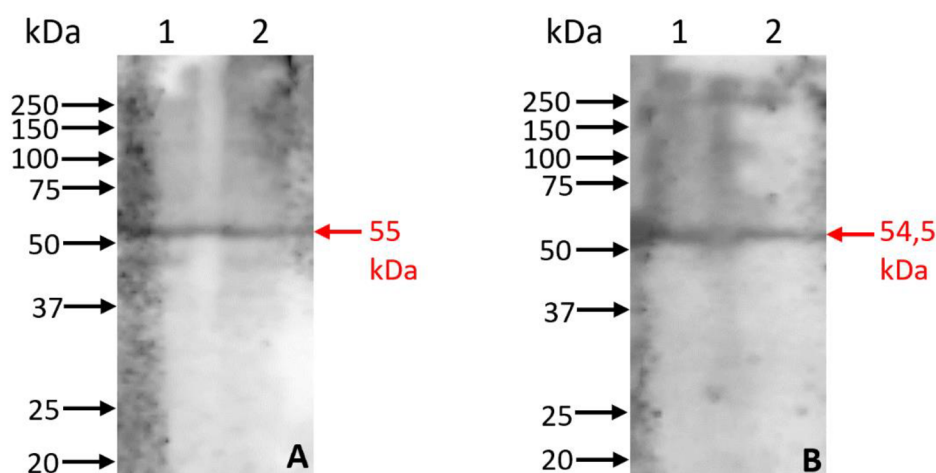
Na Obr. 59 lze vidět statistické vyhodnocení výsledků denzitometrické analýzy v průměrné intenzitě signálu SNA lektinu reagujícího s α -2,6 vázanou sialovou kyselinou v extraktu spermií před a po kapacitaci. Hodnoty jsou vztaženy k signálu protilátky proti α -tubulinu. Pokles v množství sialové kyseliny u kapacitovaných glykoproteinů byl opět výrazný, a to také zhruba na třetinu své původní hodnoty stanovené u ejakulovaných spermií podobně jako u lektinu MAA. Dvě hvězdičky značí statisticky významný rozdíl s hodnotou $p < 0,01$ ($p = 0,0060$).



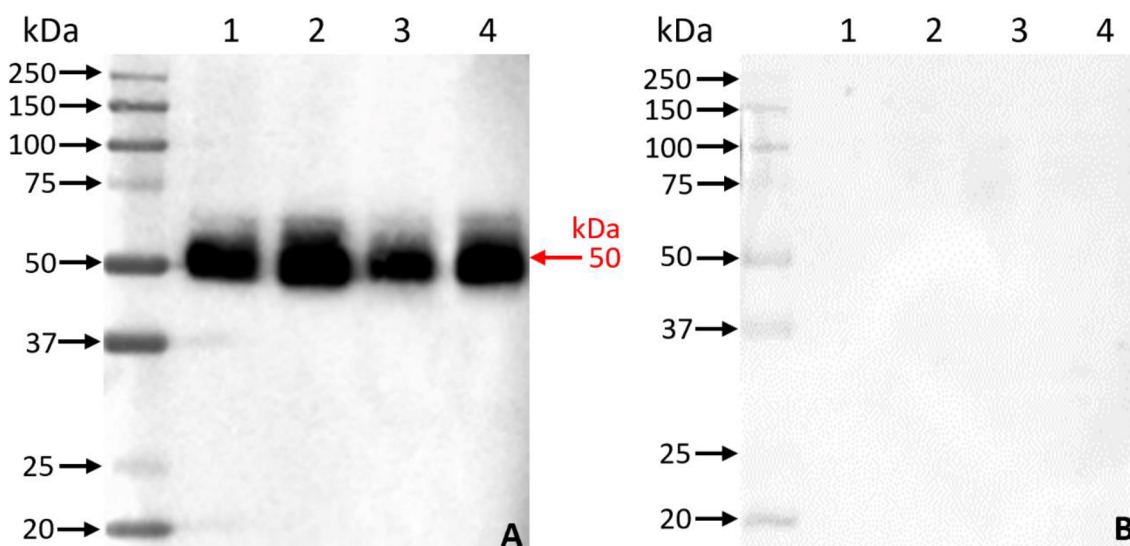
Obr. 59. Průměr intenzity signálu lektinu SNA s vazbou na α -2,6 vázanou sialovou kyselinu v celkovém extraktu spermií před a po kapacitaci; statisticky významný rozdíl $p < 0,01$.

5.2.2.3 Detekce sialové kyseliny pomocí protilátky

Pro detekci sialové kyseliny v glykoproteinech na PVDF membráně byla vyzkoušena polyklonální protilátka proti sialové kyselině (abx100414) a jako sekundární protilátka byla použita protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou. Na Obr. 60 lze vidět dvě membrány s přenesenými proteiny od dvou různých kanců, na obou membránách je viditelný proteinový proužek o molekulární hmotnosti 54,5 a 55 kDa, což naznačuje, že by se mohlo jednat o stejný glykoprotein. Na Obr. 61 je ukázána kontrolní detekce α -tubulinu a negativní kontrola.

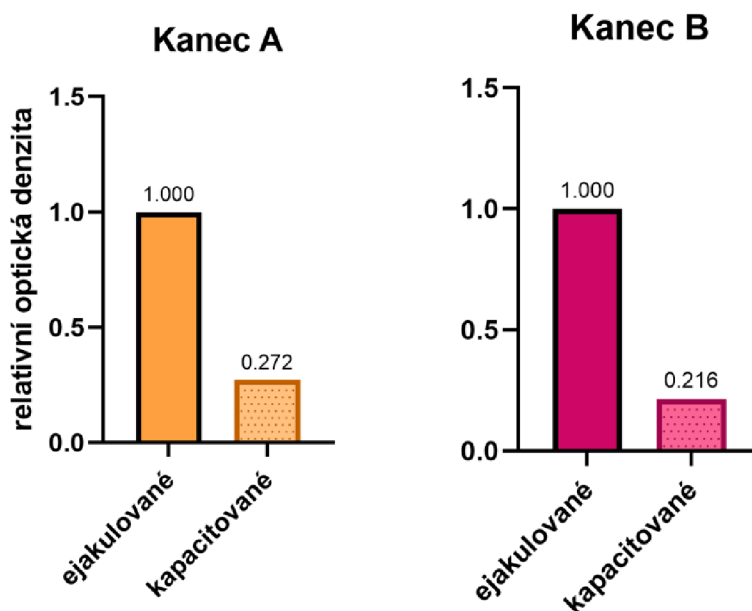


Obr. 60. Imunodetekce celkových proteinů z inseminační dávky pomocí protilátky proti sialové kyselině (abx100414), kanec A (A) a kanec B (B): 1 – ejakulované spermie, 2 – kapacitované spermie



Obr. 61. Pozitivní kontrola detekcí α -tubulinu (A), negativní kontrola po inkubaci pouze s avidinem konjugovaným s křenovou peroxidázou (B): 1 – ejakulované spermie (kanec A), 2 – kapacitované spermie (kanec A), 3 – ejakulované spermie (kanec B), 4 – kapacitované spermie (kanec B).

Viditelná detekce byla pozorována pouze u dvou opakování, proto nebylo možné rozdíl v detekci signálu před a po kapacitaci statisticky ověřit. Na Obr. 62 lze vidět výsledky denzitometrické analýzy v intenzitě signálu protilátky proti sialové kyselině v celkovém extraktu spermií před a po kapacitaci počítané z membrán na Obr. 60. Hodnoty jsou vztaženy k signálu protilátky proti α -tubulinu. Z grafů je patrný pokles v množství sializovaného 54,5 a 55 kDa proteinu po kapacitaci. Signál výrazně klesl z hodnoty 1 relativní optické denzity u ejakulovaných spermií na hodnotu 0,272 u kance A a 0,216 u kance B.



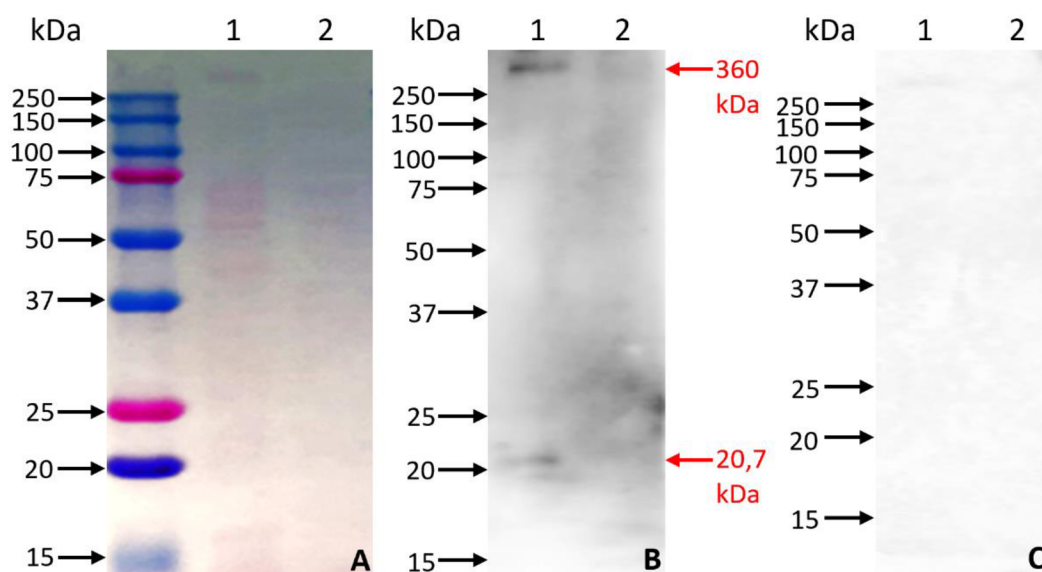
Obr. 62. Intenzity signálu protilátky proti sialové kyselině v celkovém extraktu spermií před a po kapacitaci.

5.2.3 Detekce v povrchových proteinových extraktech spermií

Vzorky spermií pocházely z nativních ejakulátů plemene Duroc. Pro detekci sializovaných glykoproteinů na povrchu spermií před a po kapacitaci byly izolovány povrchové proteiny ejakulovaných a kapacitovaných spermií. Tato metoda korespondovala s metodou lokalizace sialové kyseliny na spermiích při vazbě lektinů v suspenzi pomocí fluorescenčního značení. Během procesu zvaného biotinylace se na NH₂ skupiny proteinů na povrchu buněk kovalentně navázal biotin, který sloužil jako značka. Po lyzaci spermií byly biotinylované proteiny z lyzátu vyvázány avidinem konjugovaným na gelových kuličkách. Protože v tomto případě nebylo možné využít α -tubulin jako referenčního proteinu určujícího rozdíl v nanáše proteinů, byla jako referenční hodnota brána koncentrace spermií jednotlivých kanců. Informace o koncentraci spermií jednotlivých kanců pocházela z inseminační stanice kanců, ze které nativní ejakuláty pocházely. Po kapacitaci se počítalo s univerzální ztrátou 20 % v koncentraci spermií. Byly použity lektiny MAA, SNA a WGA. Pro vizualizaci proteinů byl použit avidin konjugovaný s křenovou peroxidázou. Byla vyzkoušena i protilátka proti sialové kyselině, nicméně u žádného experimentu nebyly proteiny detekovány, proto není dále uváděna. Celkem byly provedeny pokusy u 7 různých kanců, nicméně ve velké části negativních kontrol bylo detekováno vysoké množství proteinů a výsledky tak nemohly být vyhodnoceny. Z těchto důvodů nemohla být provedena statistická analýza. Byl vybrán jeden reprezentativní kanec, u kterého byla izolace i detekce úspěšná a mohla tak být provedena denzitometrická analýza a výsledky této analýzy mohly být vloženy do grafu.

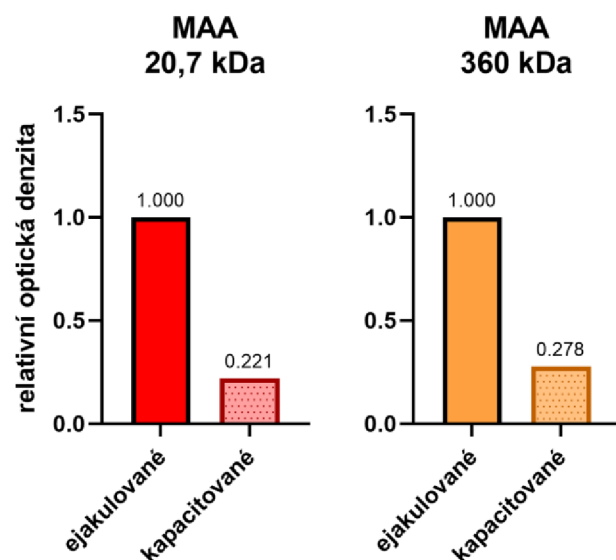
5.2.3.1 Detekce sialové kyseliny pomocí MAA lektinu

Pro detekci α -2,3 vázané sialové kyseliny v povrchových glykoproteinech spermii byl použit lektin MAA. Na Obr. 63 je nitrocelulózová membrána, na které jsou viditelné glykoproteiny spermii před a po kapacitaci s pozitivní reakcí s lektinem. Vlevo je přiložen snímek membrány obarvené Ponceau pro ukázkou celkové nanášky proteinů, kde lze pozorovat pokles v množství před a po kapacitaci (Obr. 63A). Na Obr. 63B je vložen výřez membrány detekovaných sializovaných glykoproteinů pomocí lektinu MAA, na kterém lze vidět dva viditelné proteinové proužky s povrchovými glykoproteiny s navázanou sialovou kyselinou o molekulové hmotnosti 360 a 20,7 kDa. Signál vazby MAA u obou glykoproteinů po kapacitaci výrazně klesl.



Obr. 63. Celková nanáška proteinů na membráně (barvení Ponceau) (A), detekce povrchových proteinů z nativního ejakulátu pomocí MAA lektinu (B), negativní kontrola (C): 1 – ejakulované spermie, 2 – kapacitované spermie.

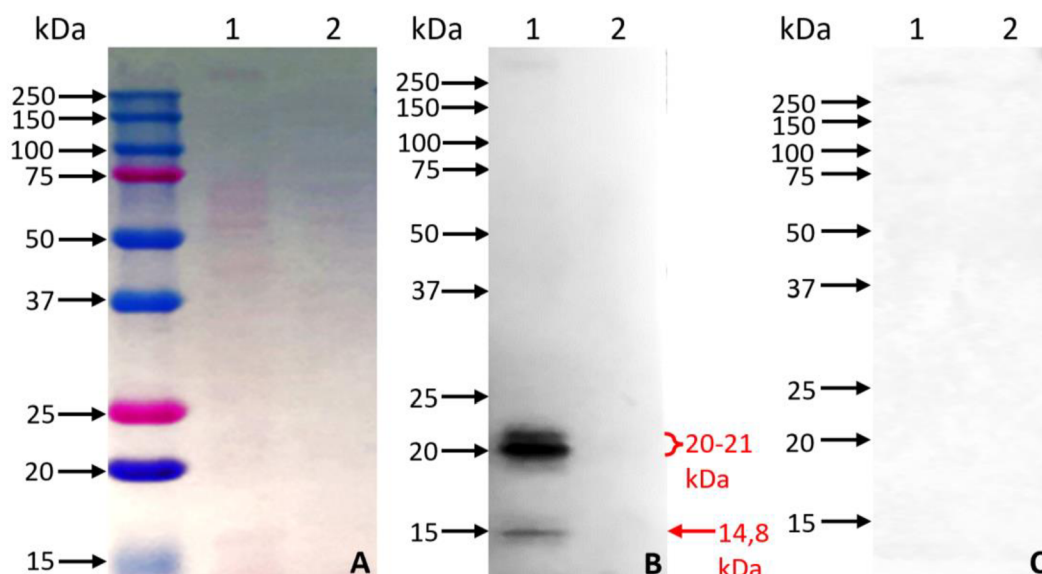
Na Obr. 64 lze vidět výsledky denzitometrické analýzy v intenzitě signálu u vybraných glykoproteinů v extraktu povrchových glykoproteinů spermii před a po kapacitaci. Hodnoty jsou vztaženy ke koncentraci spermii. Pokles v množství sialové kyseliny u kapacitovaných glykoproteinů byl velmi výrazný, u obou glykoproteinů klesl signál po kapacitaci zhruba na čtvrtinu své původní hodnoty oproti ejakulovaným spermii.



Obr. 64. Intenzity signálu MAA lektinu s vazbou na α -2,3 vázanou sialovou kyselinu u vybraných povrchových glykoproteinů před a po kapacitaci.

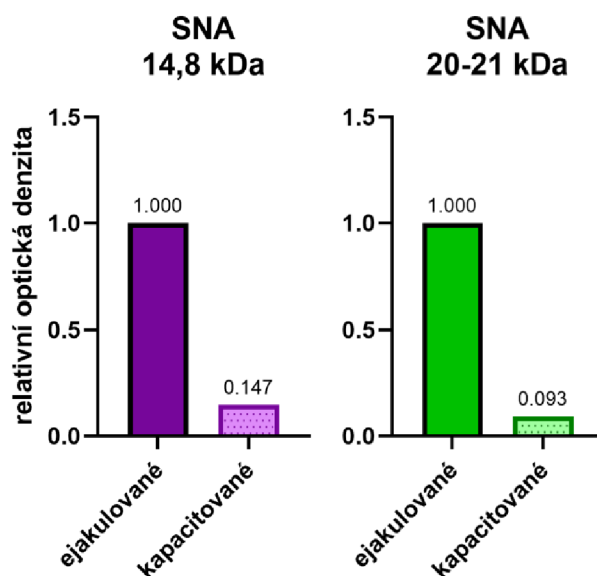
5.2.3.2 Detekce sialové kyseliny pomocí SNA lektinu

Pro detekci α -2,6 vázané sialové kyseliny v povrchových glykoproteinech spermií byl použit lektin SNA. Na Obr. 65 je nitrocelulózová membrána, na které jsou viditelné proteiny spermií před a po kapacitaci s pozitivní reakcí s lektinem. Vlevo je přiložen snímek membrány obarvené Ponceau pro ukázkou celkové nanášky proteinů, kde lze pozorovat pokles v množství před a po kapacitaci (Obr. 65A). Na Obr. 65B je výřez membrány s detekcí sializovaných glykoproteinů pomocí lektinu SNA. U ejakulovaných spermií byly detekovány glykoproteiny o velikosti 20-21 kDa a 14,8 kDa. Je pravděpodobné, že detekovaný 20-21 kDa glykoprotein je shodný s proteinem detekovaným pomocí lektinu MAA. Jak lze vidět, u kapacitovaných spermií míra signálu těchto glykoproteinů klesla, v extraktu není viditelný žádný detekovaný proužek.



Obr. 65. Celková nanáška proteinů na membráně (barvení Ponceau) (A), detekce povrchových proteinů z nativního ejakulátu pomocí SNA lektinu (B), negativní kontrola (C): 1 – ejakulované spermie, 2 – kapacitované spermie.

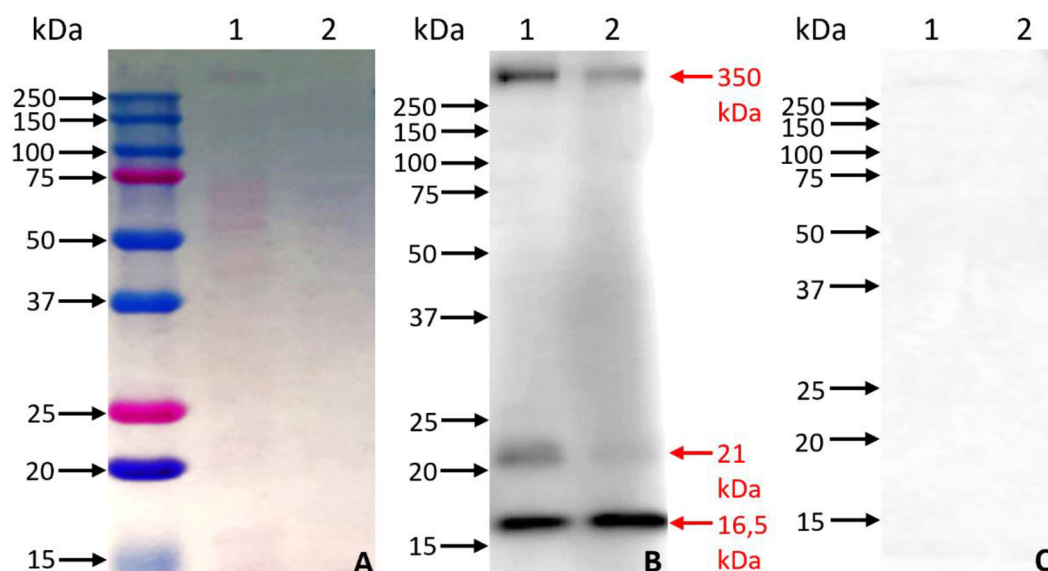
Na Obr. 66 lze vidět výsledky denzitometrické analýzy v intenzitě signálu u vybraných glykoproteinů v extraktu povrchových glykoproteinů spermií před a po kapacitaci. Hodnoty jsou vztaženy ke koncentraci spermií. Pokles v množství sialové kyseliny u kapacitovaných glykoproteinů byl znovu velmi výrazný. U obou glykoproteinů klesl signál po kapacitaci zhruba na desetinu své původní hodnoty oproti ejakulovaným spermiím.



Obr. 66. Intenzity signálu SNA lektinu s vazbou na α -2,6 vázanou sialovou kyselinu u vybraných povrchových glykoproteinů před a po kapacitaci.

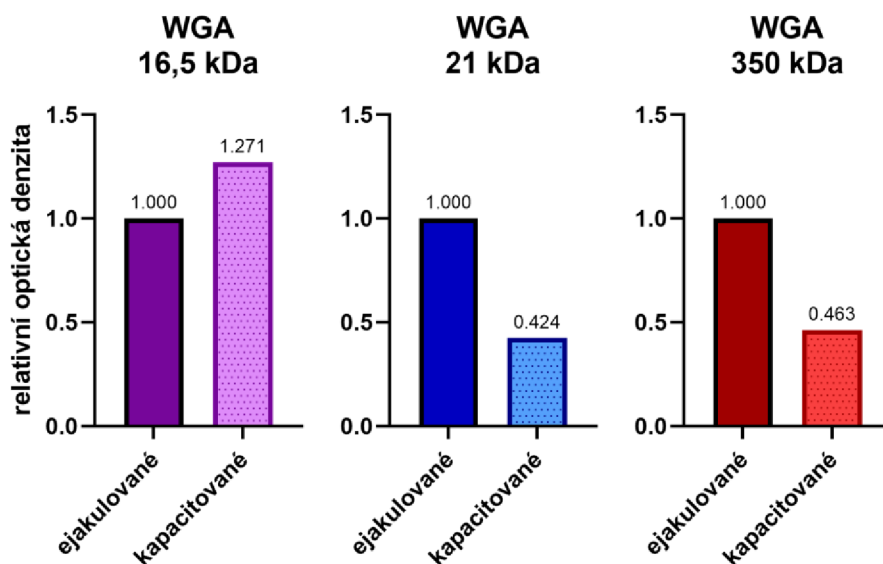
5.2.3.3 Detekce sialové kyseliny pomocí WGA lektinu

Schopnost vázat sialovou kyselinu má i lektin WGA, který ale zároveň umí vytvořit vazbu i s N-acetylglukosaminem. Lektin WGA byl využit pro detekci těchto sacharidových struktur v povrchových glykoproteinech. Na Obr. 67 lze vidět nitrocelulóзовou membránu s povrchovými glykoproteiny z ejakulovaných a kapacitovaných spermií. Vlevo je přiložen snímek membrány obarvené Ponceau pro ukázkou celkové nanášky proteinů, kde lze pozorovat pokles v množství před a po kapacitaci (Obr. 67A). Na Obr. 67B je výřez membrány s detekcí sializovaných glykoproteinů pomocí lektinu WGA. V tomto případě byly detekovány výrazné signály u glykoproteinů o třech různých molekulových hmotnostech. Jako v případě lektinu MAA a SNA byl detekován glykoprotein o velikosti 21. Dále byl detekován signál u glykoproteinů o velikosti 350 a 16,5 kDa. Z obrázku je patrné, že signál u 21 a 350 kDa proteinů po kapacitaci klesá. Naopak míra signálu 16,5 kDa proteinu po kapacitaci viditelně roste.



Obr. 67. Celková nanáška proteinů na membráně (barvení Ponceau) (A), detekce povrchových proteinů z nativního ejakulátu pomocí WGA lektinu (B), negativní kontrola (C): 1 – ejakulované spermie, 2 – kapacitované spermie.

Po provedení denzitometrické analýzy byl vytvořen graf (Obr. 68) popisující změny v detekci signálu vybraných glykoproteinů před a po kapacitaci. Hodnoty jsou vztaženy ke koncentraci spermií. Jak lze vidět, signál glykoproteinu o molekulové hmotnosti 16,5 kDa po kapacitaci vzrostl z hodnoty 1 relativní optické denzity na hodnotu 1,271. U 21kDa proteinu celková míra signálu klesla na hodnotu 0,424. Velmi podobná změna byla pozorována i u 350kDa proteinu, kde hodnota klesla na 0,463.



Obr. 68. Intenzity signálu WGA lektinu s vazbou na sialovou kyselinu a N-acetylglukosamin u vybraných povrchových glykoproteinů před a po kapacitaci.

6 Diskuze

Sialové kyseliny jsou sacharidy kyselé povahy, které lze často najít na buněčných površích (Varki & Varki 2007). Tyto cukry jsou důležitou součástí glykoproteinového obalu spermie, kterému dávají mnoho důležitých vlastností (Teclé & Gagneux 2015). Bylo potvrzeno, že tyto kyseliny chrání spermii před imunitním systémem reprodukčního traktu samice (Toshimori et al. 1991; Crocker et al. 2007; Ma et al. 2016) a udávají celé buňce negativní náboj (Holt 1980), který způsobuje odpuzování částic (Ahmad & McPhie 1980), zabraňuje agregaci buněk (Schauer 1982) a zvyšuje rigiditu spermie (Crook 1993). Dostatek sialových kyselin navázaných na spermii zvyšuje její šanci na přežití a oplození. Dostatečné množství negativně nabitých sialových kyselin na povrchu spermie slouží jako marker při selekci spermií (Chan et al. 2006; Ainsworth et al. 2011). Podle dosavadních studií lze předpokládat, že tyto cukry pomáhají spermiím procházet skrz mukus v samičím reprodukčním traktu (Tollner et al. 2008b; Tollner et al. 2011) a ovlivňují motilitu spermií (van Vuuren et al. 1992; Lassalle & Testart 1994; Fernandez-Fuertes et al. 2018). Sialové kyseliny jak na spermii, tak na oviduktu se také zapojují do vazby spermií na oviduktální epitel, a tudíž do tvorby oviduktálního rezervoáru u různých savců včetně prasete (Cortés et al. 2004; Tollner et al. 2008a; Kadirvel et al. 2012; Miller 2015). V neposlední řadě je jim věnována pozornost, kvůli jejich roli ve vazbě spermie na *zona pellucida* oocyty (Lambert & Van Le 1984; Lassalle & Testart 1994; Ozgur et al. 1998; Velásquez et al. 2007; Pang et al. 2011). Míra sializace na spermii roste s tím, jak spermie prochází epididymem (Holt 1980; Toshimori et al. 1988). Při ejakulaci dochází k začleňování sializovaných složek semenné plazmy na plazmatickou membránu spermie (Ma et al. 2016). Po kapacitaci by mělo u savců docházet k poklesu obsahu sialových kyselin na spermii (Focarelli et al. 1990b; Lassalle & Testart 1994; Focarelli et al. 1995; Ma et al. 2012; Ma et al. 2016; Fernandez-Fuertes et al. 2018). U kance byla tato změna také potvrzena (Vázquez et al. 1996; Jiménez et al. 2003; Wang et al. 2018). Podrobné molekulární mechanismy zapojení sialových kyselin do reprodukčních procesů savců ale nejsou přesně popsány.

V rámci této diplomové práce jsme se zaměřili na detekci a lokalizaci sialové kyseliny na kančích spermiích před a po *in vitro* kapacitaci za použití vybraných lektinů a protilátek proti sialové kyselině. Použili jsme lektiny, které mají schopnost se specificky vázat na sialovou kyselinu s různým typem vazby na koncový sacharid glykoproteinů na povrchu spermií. Lektin s vazbou typu α -2,3 – *Maackia amurensis agglutinin* (MAA), α -2,6 – *Sambucus nigra agglutinin* (SNA) a *Triticum vulgare (Wheat germ) agglutinin* (WGA), který váže sialovou kyselinu připojenou na koncový sacharid všemi typy vazeb a současně N-acetylglukosamin (GlcNAc). Byla také vyzkoušena detekce vybranými polyklonálními protilátkami proti sialové kyselině.

Lokalizace sialové kyseliny na kančích spermiích před a po *in vitro* kapacitaci jsme provedli pomocí nepřímé fluorescenční mikroskopie. Spermie byly získány z nativního ejakulátu kanců plemene Duroc. Do inseminačních dávek je běžně přidáváno ředidlo, které může způsobit odstranění některých proteinů. Protože sialové kyseliny bývají terminálními sacharidy na glykoproteinovém řetězci na povrchu spermie, jsou v přímém kontaktu s ředidlem a šance odmytí různých periferně vázaných molekul je pravděpodobně vysoká. Oproti tomu nativní ejakulát obsahuje molekuly, které tvoří přirozené prostředí pro spermie. Při zpracování vzorků spermií přirozeně dochází k odmytí některých proteinů, ale ředidlo přidávané do inseminačních dávek celkovou míru možného odstranění proteinových složek ještě zvyšuje.

Pro sledování změn v lokalizaci sialové kyseliny na spermii byla použita vazba lektinu v suspenzi představující nejšetrnější metodu pro studium sacharidových struktur na povrchu spermie. Při této vazbě by nemělo docházet k permeabilizaci membrány a lze tak předpokládat, že pokud nebyly spermie poškozené, došlo k navázání pouze ve vrstvě nad a v úrovni plazmatické membrány (PM). Druhým způsobem přípravy spermií byla vlhká fixace roztokem acetonu s metanolem v poměru 1:1 na skle. Aceton naopak způsobuje permeabilizaci membrány (Jamur & Oliver 2010). V tomto případě byla vazba s lektiny provedena až po fixaci. Lze tedy předpokládat, že se lektiny při vlhké fixaci vázaly i na sacharidové struktury uvnitř buňky. Jako třetí způsob fixace byla vyzkoušena fixace 4% paraformaldehydem v suspenzi. Paraformaldehyd chrání spermie před permeabilizací membrány, ale současně způsobuje, že proteiny vytvoří síťovitou strukturu a sníží tak přístupnost pro lektiny nebo protilátky (Kim et al. 2017), čímž si vysvětlujeme negativní výsledek našich experimentů vazby lektinů na takto fixované spermie.

Pro vazbu α -2,3 vázaných sialových kyselin jsme vybrali lektin MAL II, dále uváděný jako MAA (Knibbs et al. 1991). U ejakulovaných spermií byl MAA lektin vázaný v suspenzi detekovaný nejčastěji na celé spermii kromě postakrozomální oblasti. Tento vzor tvořil populaci zastoupenou v 67 % případů, nicméně 18 % spermií mělo viditelný signál i v postakrozomální oblasti. Signál byl silnější v oblasti akrozomu. U 95 % spermií byl pozorován intenzivní signál na bičíku. Spermie se signálem na akrozomu měly v této skupině 98% zastoupení. U určité části ejakulovaných spermií byla pozorována proximální cytoplazmatická kapka značící neúplnou zralost spermie. Na rozdíl od lektinů SNA a WGA, nebyla opakovaně u lektinu MAA nalezená žádná detekce při vlhké fixaci aceton-metanolem na skle. Je známo, že metanol částečně precipituje proteiny spermie (Wessel & Flügge 1984). Precipitace proteinů má za následek zhroucení struktury proteinu a poškození nebo zneprístupnění epitopů na spermii a současně obnažení struktur, které byly skryté. Je možné, že epitopy s α -2,3 vázanou sialovou kyselinou byly tímto způsobem fixace poškozené nebo pozměněné a výsledná reakce s lektinem následně byla negativní. Proto byla vyzkoušena u všech lektinů vazba po fixaci spermií pouze acetonem na skle po jejich předchozím zasoušení na vzduchu. Detekce signálu po vazbě s MAA byla u ejakulovaných spermií fixovaných acetonem velmi silná a viditelná po celé spermii. Experiment byl proveden pouze jednou, ale lze z něj vyvodit, že metanol skutečně způsoboval narušení struktur spermie pro vazbu tohoto lektinu. Na rozdíl od vazby v suspenzi byl signál detekovaný v postakrozomální oblasti hlavičky spermie. Můžeme tedy předpokládat, že v této oblasti došlo k vazbě na sialovou kyselinu nikoliv na povrchu, ale pod úrovní PM spermie. Z těchto výsledků lze vyvodit, že kromě postakrozomální oblasti je celý povrch kančí ejakulované spermie bohatý na α -2,3 sialové kyseliny. Dosud nebyla publikována studie, která by popisovala vazbu tohoto lektinu na ejakulovaných spermiích kance. U lidských spermií byla detekována slabá vazba MAA na akrozomu a velmi silný signál právě v postakrozomální oblasti. Bičík navíc nevykazoval žádnou detekci α -2,3 sialové kyseliny. Signál vazby MAA lektinu na cytoplazmatické kapce byl ale stejně jako v našem případě viditelný (Focarelli et al. 1995). U hřebce vykazovaly spermie slabší signál na akrozomu a středně silný signál vazby MAA lektinu na zbytku spermie (Desantis et al. 2010). U buvolích ejakulovaných spermií byl signál vazby lektinu MAL II viditelný pouze na střední části bičíku (Batra et al. 2020). Lze tedy předpokládat, že existuje velká mezidruhová různorodost v lokalizaci α -2,3 vázané sialové kyseliny na savčí spermii.

Po *in vitro* kapacitaci jsme na spermích s vazbou MAA lektinu v suspenzi pozorovali celkově slabší intenzitu fluorescence. Co se týče lokalizace vazby s lektinem, největší populaci zaujímaly spermie se signálem pouze na akrozomu, tato populace tvořila 46 % a 42 % spermii vykazovalo signál pouze na apikální části akrozomu. Nejvýznamnější rozdíl ve vazbě MAA bylo možné sledovat na bičíku, kde byl detekován signál pouze u malého procenta spermii. Pokud se zaměříme na změnu v oblasti akrozomu, přesněji na rozdíl signálu v apikální části a hlavní části akrozomu před a po kapacitaci u vazby lektinu MAA, zjistíme, že se signál po kapacitaci mírně přesunul do apikální části akrozomu. Nelze říci, jestli došlo k navázání nových sialových kyselin na apikální část anebo pouze k odkrytí skupin, které mohly být před kapacitací maskovány jinými molekulami. U naprosté většiny spermii, a to jak ejakulovaných (93,5 %), tak kapacitovaných (78,5 %), byla sialová kyselina lokalizována na apikální i hlavní části akrozomu. Částečný úbytek na hlavní části akrozomu by mohl být významný pro následnou vazbu na ZP oocyty, kde bylo u člověka a skotu dokázáno, že úbytek sialových kyselin na povrchu zvyšuje počet spermii navázaných na ZP (Lassalle & Testart 1994; Fernandez-Fuertes et al. 2018). Tento předpoklad, by souhlasil s teorií, že negativní náboj, který spermii dávají sialové kyseliny (Holt 1980) je nutné při kapacitaci odstranit, aby mohlo dojít k rozpoznání vajíčka (Ainsworth et al. 2011). Pokles ve vazbě MAA po kapacitaci je zdokumentován i u lidských (Focarelli et al. 1995) a buvolích spermii (Batra et al. 2020). U lidských spermii byl slabší signál po kapacitaci viditelný pouze v úzkém pásu postakrozomální oblasti (Focarelli et al. 1995). Velmi výrazná změna ve vazbě α -2,3 vázané sialové kyseliny v suspenzi byla sledována na bičíku, kde byl po kapacitaci nalezen statisticky významný úbytek signálu. Z toho lze usuzovat, že desializace povrchu bičíku je důležitou součástí kapacitace. Jsou k dispozici studie popisující pozitivní korelaci mezi množstvím sialové kyseliny na spermii a motilitou spermie u člověka a býka (Lassalle & Testart 1994; Fernandez-Fuertes et al. 2018). Fernandez-Fuertes et al. (2018) pomocí CASA analýzy (Computer Assisted Sperm Analysis) zjistili, že odstranění sialových kyselin z povrchu býčích spermii pomocí neuraminidázy způsobilo snížení celkové a progresivní motility, ale neovlivnilo parametry motility, které jsou spojované s hyperaktivním pohybem spermie, kterého spermie nabývá po kapacitaci (Suarez 2008). Lze tedy předpokládat, že sializace povrchu spermie je potřebná pro ejakulované spermie pro průchod skrz cervikální mukos (Tollner et al. 2008b) a po kapacitaci již není nutná. Současně ale není potvrzeno, že by desializace indukovala hyperaktivní motilitu spermii (Fernandez-Fuertes et al. 2018). U lidských spermii je současně popisován i negativní vliv sialové kyseliny na motilitu spermii. Tento efekt je vysvětlován schopností sialové kyseliny maskovat receptory pro hormon melatonin na spermích (van Vuuren et al. 1992), u kterého byl potvrzen jeho pozitivní vliv na jejich motilitu (Ortiz et al. 2011).

Bohužel jsme nemohli výsledky vazby v suspenzi porovnávat s vazbou lektinu na spermích fixovaných aceton-metanolem. U spermii fixovaných pouze acetonem, lze vidět viditelný úbytek intenzity fluorescence. Lokalizace sialové kyseliny ale zůstává stejná, a to na celé spermii, což by mohlo znamenat, že pod PM bičíku v postakrozomální oblasti lze detekovat α -2,3 vázané sialové kyseliny a může docházet ke ztrátě těchto molekul během kapacitace ve větší míře spíše z povrchu spermii.

Pro sledování změn α -2,6 vázaných sialových kyselin jsme vybrali lektin SNA. Lokalizace takto vázané sialové kyseliny v suspenzi vykazovala vzory, které byly velmi

podobné vazbě lektinu MAA. Procentuální zastoupení nalezených populací bylo obdobné. Intenzita signálu vazby SNA se lišila na apikální části akrozomu, kde byla výraznější než na zbytku hlavičky. U ejakulovaných spermií fixovaných aceton-metanolem byl ale viditelný velký rozdíl v lokalizaci vazby. Téměř všechny spermie vykazovaly stejný vzor, a to vazbu SNA lektinu po celé hlavičce spermie kromě ekvatoriálního segmentu. Velmi výrazný signál bylo možné pozorovat na apikální části akrozomu. Na rozdíl od vazby lektinu v suspenzi nebyl u 95 % spermií signál lokalizován na bičíku. Lze předpokládat, že odlišná metoda fixace způsobila navázání lektinu SNA v postakrozomální oblasti, jako tomu bylo v případě fixace acetonem u vazby MAA. Z výsledku lze usuzovat, že metanol způsobil nepřístupnost sialové kyseliny na ekvatoriálním segmentu a bičíku kvůli precipitaci sialoglykoproteinů v těchto oblastech. Naopak v postakrozomální oblasti na hlavičce způsobil odkrytí dalších sializovaných skupin. Téměř identický vzor na hlavičce byl nalezen u kančích spermií, které byly inkubovány s protilátkou proti kančímu spermadhezinu AWN (Wang et al. 2018). Při inkubaci byl nicméně nalezen signál i na bičíku, který v našem případě nalezen nebyl. AWN je protein z kančí semenné plazmy. U spermadhezinu AWN bylo popsáno, že má podobně jako lektiny schopnost vázat koncové α -2,3 a α -2,6 vázané sialové kyseliny (Dostálová et al. 1995a). Je tedy možné, že AWN má podobnou vazebnou specifitu jako SNA lektin. Wang et al. (2018) pomocí boronové kyseliny izolovali AWN a uvádějí tak, že samotný AWN je sializovaný. Toto tvrzení je ale v rozporu s Calvete et al. (1994), kteří uvádějí, že na glykosylované formě AWN není navázána sialová kyselina. Není tedy jisté, jestli se v našem experimentu váže SNA lektin spermadhezinu AWN anebo má AWN pouze stejné vazebné vlastnosti jako SNA a vykazují tak stejné značení. Ve studii Wang et al. (2018) byly spermie fixované 4% paraformaldehydem a na rozdíl od našeho experimentu by nemělo docházet k permeabilizaci membrány. Vazbu lektinu SNA na ejakulovaných kančích spermiích lze porovnávat se studii zabývajícími se hřebčímí a lidskými spermii. U hřebčímí spermií byl po vazbě s SNA nalezen slabý signál na akrozomu a středně silný signál na zbytku spermie, stejně jako u lektinu MAA (Desantis et al. 2010). U lidských spermií byla viditelná silná fluorescence v postakrozomální oblasti a navíc i ve střední části bičíku (Focarelli et al. 1995).

Po *in vitro* kapacitaci jsme po vazbě SNA v suspenzi našli šest populací s rozdílným vzorem. Nejvíce zastoupenou skupinou byly spermie se signálem na celé spermii a dále populace spermií, kde byl signál pouze na celé hlavičce. Zbylou populaci tvořily spermie, které měly signál pouze na apikální části akrozomu a popřípadě ještě na bičíku. Signál na bičíku byl ale viditelně slabší než v případě ejakulovaných spermií. Z výsledků je patrné, že se v postakrozomální oblasti po kapacitaci odhalily sializované struktury, na které se mohl SNA lektin následně navázat. Pokud porovnáme vazbu SNA v suspenzi na akrozomu, zjistíme, že podobně jako u lektinu MAA se signál částečně přemístil do apikální části akrozomu. O 9 % více spermií mělo signál viditelný pouze na apikální části akrozomu. Nicméně naprostá většina spermií (až téměř 90 %) měla detekovatelný signál v obou částech akrozomu. Rozdíl byl ale viditelný v případě bičíku. Stejně jako u MAA došlo po kapacitaci ke ztrátě signálu SNA na bičíku až u poloviny spermií, ale není tak dramatický jako v případě MAA. Z toho můžeme usuzovat, že po kapacitaci dochází k odstranění α -2,6 sialové kyseliny na bičíku, ale ne v takové míře jako u typu s vazbou α -2,3 na koncový sacharid. Změna po kapacitaci u spermií fixovaných aceton-metanolem byla odlišná. Četnost typického vzoru se signálem na apikální a hlavní části akrozomu a současně v postakrozomální oblasti, který se vyskytoval

u ejakulovaných spermií, klesla více jak o polovinu. Nejvíce zastoupenou skupinou byly spermie se signálem pouze v postakrozomální oblasti a apikální části akrozomu (téměř polovina spermií). Signál na bičíku nebyl nalezen u žádné spermie. V 90 % případů byl signál viditelný na postakrozomální oblasti, signál na této oblasti klesl pouze o 5 % a zdá se tak, že po kapacitaci α -2,6 vázaná sialová kyselina z tohoto místa na spermii neodchází. I v tomto případě se po *in vitro* kapacitaci signál na akrozomu částečně přesunul z hlavní do apikální části. Po kapacitaci došlo pouze k minimální změně na bičíku spermií. Při vlhké fixaci 94,5 % ejakulovaných a 89 % kapacitovaných spermií nemělo viditelný žádný signál na bičíku. Změnu ve vazbě SNA lektinu po *in vitro* kapacitaci můžeme porovnávat pouze se studii na lidských spermiích (Focarelli et al. 1995), kdy byla vazba SNA lektinu o 30 % redukována a signál byl viditelný pouze v úzkém pásu postakrozomální oblasti, stejně jako u MAA. SNA ale tuto oblast značilo v porovnání s MAA mnohem jasněji. Podobně jako v našem případě, došlo na bičíku lidských spermií po *in vitro* kapacitaci ke ztrátě signálu (Focarelli et al. 1995).

Je známo, že na povrchu spermií lze nalézt sialové kyseliny s vazbou α -2,3 a α -2,6 na koncový sacharid glykoproteinů (Focarelli et al. 1995; Calvo et al. 2000; Desantis et al. 2010; Xin et al. 2014). U savců však existuje ještě třetí typ vazby a to α -2,8 (Tiralongo 2010). Lze ho najít kromě centrálního nervového systému podle nejnovějších studií i na savčí spermii (Simon et al. 2013). Jedná se o lineární homopolymer α -2,8 vázaných sialových kyselin – polySia (Mühlenhoff et al. 1998). U potkana, býka a člověka byla tato polySia detekována v postakrozomální oblasti ejakulované spermie (Simon et al. 2013). Předpokládá se, že α -2,8 vázaná sialová kyselina také chrání spermii před imunitní odpovědí samice (Wang et al. 2011). Bylo objeveno, že polySia jsou syntetizovány epitelem epididymu v *caput*. Přesný význam polySia na spermii ale není známý (Simon et al. 2013). Lektin WGA váže sialovou kyselinu vázanou všemi třemi typy vazeb, včetně α -2,8. Zároveň se jedná o obecně nejpoužívanější lektin pro studium sialových zbytků. Použití tohoto lektinu umožnilo porovnávat výsledky měření s výsledky z jiných studií. Nevýhodou je jeho preference k vazbě N-acetylglukosaminu (GlcNAc) (Gallagher et al. 1985). Nicméně Lasalle a Testart (1994) uvedli, že u ejakulovaných lidských spermií váže sialovou kyselinu a GlcNAc v poměru 3:1. Pro budoucí studium sializovaných struktur na povrchu spermie by bylo vhodné experimenty doplnit o vazbu lektinem LFA (*Limax flavus agglutinin*), který váže pouze sialovou kyselinu s vazbou α -2,3, α -2,6 i α -2,8 (Kurachi et al. 1998), nicméně jeho použití ve studiích zabývajících se savčími spermiemi je vzácné a tudíž těžko porovnatelné.

Vazba lektinu WGA v suspenzi ejakulovaných spermií v našich experimentech vykazovala ze všech tří lektinů nejvíce intenzivní fluorescenci, což bylo pravděpodobně způsobené jeho specifitou k různým cukerným zbytkům. Na všech spermiích byla detekována vazba lektinu na celém bičíku. Charakteristickým vzorem byl signál na celé buňce (80 %) se zřetelně silnějším signálem na apikální části akrozomu a slabším v postakrozomální oblasti. Je nutné podotknout, že do této skupiny byly započítávány spermie se slabou nebo velmi slabou fluorescencí v postakrozomální oblasti. Spermie, které na jakékoliv části postakrozomální oblasti zcela postrádaly signál, tvořily skupiny s poměrně nízkým zastoupením (16 %). Postakrozomální oblast byla u předešlých lektinů vázána pouze sporadicky, lze tedy předpokládat, že v tomto případě došlo k navázání GlcNAc nebo α -2,8 vázané sialové kyseliny v této oblasti. Druhá možnost by byla v souladu s výsledky u člověka nebo býka (Simon et al. 2013). Ze studie na lidských ejakulovaných spermiích je ale potvrzeno, že se v této oblasti

GlcNAc nachází (Lassalle & Testart 1994). V postakrozomální oblasti, bičíku a občasně i akrozomu u lidské ejakulované spermie byl detekovaný sialoglykoprotein CD52 (Yeung et al. 1997) a tento protein byl nalezen i na spermích skotu (Michalková et al. 2010). Je možné, že lektiny, které se vázaly v postakrozomální oblast, značily sialové kyseliny, které jsou součástí právě CD52. U ejakulovaných spermií fixovaných roztokem aceton-metanolu byl výsledek ve vazbě WGA lektinu na hlavičce odlišný. Signál v postakrozomální oblasti zcela chyběl téměř u všech spermií. Nejvíce zastoupeným vzorem byla populace spermií se signálem na celé buňce kromě postakrozomální oblasti. Bylo možné si všimnout odlišné intenzity fluorescence na různých částech akrozomu. Apikální část a ekvatoriální segment svítily jasněji než hlavní část akrozomu. Podobně jako při vazbě v suspenzi byl téměř u všech takto fixovaných spermií nalezen signál na celém bičíku. Naše výsledky jsou v souladu s pozorováním ze studie Vázquez et al. (1996), kde byla vazba tohoto lektinu na kančích spermích viditelná ve stejných oblastech jako při našem hodnocení vazby WGA lektinu v suspenzi spermií. Současně se ztotožňuje se studií zabývající se lidskými ejakulovanými spermii, ve které se tento lektin vázal na celou spermii s výrazným signálem na apikální části akrozomu (Lassalle & Testart 1994). U spermií s odstraněnou plazmatickou membránou vázal WGA pouze ekvatoriální segment a postakrozomální oblast, pravděpodobně se ale jednalo o struktury s GlcNAc, protože tuto vazbu vykazoval pouze sukcinylovaný WGA, který váže právě pouze GlcNAc (Lassalle & Testart 1994). Wang et al. (2018) sledovali vazbu WGA lektinu na kančích ejakulovaných spermích a lokalizovali různé populace lišící se vazbou na hlavičce. Většina spermií měla viditelný jasný signál v postakrozomální oblasti a slabší na akrozomu (Wang et al. 2018). Signál na bičíku zmiňován není. Hřebčí ejakulované spermie vykazovaly také středně silný signál vazby WGA na akrozomu (Desantis et al. 2010). WGA na býčích spermích po ejakulaci vykazovalo vazbu hlavně na přední část hlavičky (Medeiros & Parrish 1996). Jiménez et al. (2003) také sledovali změny ve vazbě lektinu WGA v suspenzi během kapacity u kance a u ejakulovaných spermií se WGA vázalo na celou spermii se slabší fluorescencí v postakrozomální oblasti, což je shodné s našimi výsledky ve vazbě v suspenzi. Podle nejnovější studie od skupiny Robles-Goméz et al. (2021) sledující vazbu lektinu WGA na ejakulovaných kančích spermích byla lokalizace vazby lektinu nejčastěji na přední a hlavní části akrozomu. Celkově 90 % spermií vykazovalo signál na akrozomu, druhým nejčastějším vzorem s 30 % byly spermie se slabým signálem po celé hlavičce (Robles-Goméz et al. 2021). Bičík opět není zmiňován.

Po kapacitaci jsme na spermích s vazbou v suspenzi pozorovali snížení množství sacharidových skupin vázající WGA v postakrozomální oblasti. Počet spermií se signálem na celé spermii klesl o 68 %. Největší skupinou u kapacitovaných spermií byly buňky s chybějícím signálem v postakrozomální oblasti. Z tohoto výsledku můžeme vyvodit, že po kapacitaci dochází k odstranění sialových kyselin nebo GlcNAc z této oblasti. Když se zaměříme na změnu ve vazbě WGA na akrozomu před a po kapacitaci, zjistíme, že nedošlo k velkým změnám. U naprosté většiny spermií byl signál lokalizovaný jak v hlavní, tak apikální části akrozomu. Na rozdíl od předchozích dvou lektinů se signál u malého počtu spermií přesunul do hlavní části akrozomu, což je pravděpodobně zapříčiněno specifitou lektinu i ke GlcNAc. Signál na bičíku se před a po kapacitaci nezměnil. U všech ejakulovaných i kapacitovaných spermií byla vazba WGA na bičíku detekována. Jelikož u lektinů MAA i SNA k poklesu došlo, lze předpokládat, že se po kapacitaci WGA navázalo na GlcNAc struktury na bičíku nebo

na α -2,8 vázané sialové kyseliny. Druhou variantu bychom museli potvrdit pomocí lektinu LFA (Kurachi et al. 1998), který rozpoznává sialovou kyselinu vázanou všemi třemi typy vazeb nebo protilátkou proti polySia (Simon et al. 2013). U kapacitovaných spermii fixovaných aceton-metanolem byl výsledek velmi podobný jako před kapacitací, kdy byla nejvíce zastoupenou skupinou spermie se signálem WGA na celé buňce kromě postakrozomální oblast. Signifikantní změny během kapacitace nebyly nalezeny ani na akrozomu ani na bičíku. Na rozdíl od předchozích dvou lektinů bylo nicméně nalezeno průměrně o 8 % více spermii se signálem jak v apikální, tak i hlavní části akrozomu. Tento výsledek je shodný s vazbou v suspenzi. Všechny spermie měly před i po kapacitaci viditelný signál na bičíku. Pokles ve vazbě tohoto lektinu po kapacitaci byl potvrzený u nespočtu savců, a to nejen u kance (Vázquez et al. 1996; Jiménez et al. 2003; Wang et al. 2018), ale i býka (Medeiros & Parrish 1996), člověka (Lassalle & Testart 1994; Gómez-Torres et al. 2012), kozla (Bawa et al. 1993), křečka (Ahuja 1984), morčete a myši (Koehler 1981). Některé studie potvrzují úbytek ve vazbě tohoto lektinu po kapacitaci pomocí průtokové cytometrie, jako například u býčích spermii o 91 % (Taitzoglou et al. 2007) nebo u kančích spermii (Wang et al. 2018), kteří pomocí WGA lokalizovali 3 vzory na ejakulovaných a kapacitovaných kančích spermii. Více jak polovina spermii měla jasný signál v postakrozomální oblasti a slabší signál na zbytku hlavičky, kde po kapacitaci nebyl viditelný rozdíl. U dalšího vzoru, kde byl viditelný signál na celé hlavičce spermie kromě apikální části akrozomu, byl mnohem vyšší u nekapacitovaných spermii. Třetí vzor, který vykazoval slabý signál na celé hlavičce po kapacitaci silně vzrostl (Wang et al. 2018). Naše výsledky byly odlišené, protože jsme pozorovali primárně nárůst populace se signálem na celé spermii kromě postakrozomální oblasti. Vázquez et al. (1996) detekovali během kapacitace úbytek v detekci sialoglykoproteinů pomocí WGA hlavně na akrozomu kančích spermii, oproti tomu Jiménez et al. (2003) detekovali během kapacitace největší pokles vazby WGA lektinu na bičíku kančí spermie. U býčích spermii klesla vazba WGA o 78 %, a to hlavně na hlavičce spermie (Medeiros & Parrish 1996). U lidských spermii po kapacitaci klesl signál vazby WGA na celé spermii a zcela vymizel signál na apikální části akrozomu, což v případě kančích spermii u našich pokusů potvrdit nemůžeme. Stejná změna byla pozorována u spermii bez plazmatické membrány nebo imotilních spermii (Lassalle & Testart 1994). Nejnovější studie (Robles-Gómez et al. 2021) sledovala změny vazby lektinu WGA u kance před a po kapacitaci. Stejně jako v našem případě při vazbě lektinu po fixaci aceton-metanolem nenalezli po kapacitaci výrazné změny v lokalizaci vazby WGA. Nicméně intenzita signálu u vzoru spermii se slabou fluorescencí po celé hlavičce po kapacitaci výrazně klesla, což značí odstranění sialových kyselin z oblasti akrozomu (Robles-Gómez et al. 2021). V našich experimentech jsme nicméně pozorovali úbytek pouze na postakrozomální oblasti, nikoliv na akrozomu. Gómez-Torres (2012) také potvrzují úbytek vazby WGA po kapacitaci na lidských spermii, současně ale popisují nárůst vazby na akrozomu spermie, což je v souladu s našimi výsledky u kance.

Jak už bylo uvedeno, vyzkoušeli jsme lokalizaci sialových struktur na spermii i pomocí dvou různých polyklonálních protilátek proti sialové kyselině, a to jak v suspenzi, tak po fixaci aceton-metanolem. Ani jednou však nebyla viditelná pozitivní reakce se spermii. V budoucnu bychom doporučili otestovat vazbu protilátky po fixaci pouze acetonem nebo 4% paraformaldehydem v suspenzi. Wang et al. (2018) lokalizovali sialovou kyselinu pomocí boronové kyseliny konjugované na latexových a magnetických kuličkách s fluorescenčním značením, která váže specificky pouze sialovou kyselinu a nevykazuje nespecifickou vazbu na

jiné sacharidové struktury jako lektiny (Gómez-Torres et al. 2012; Villaverde et al. 2016). Tato metoda by byla vhodným doplňkem naší studie pro studium sialových kyselin na kančích spermích. Na ejakulovaných spermích značila boronová kyselina celou spermii. Po kapacitaci lokalizovali sialovou kyselinu buď na ekvatoriálním segmentu a postakrozomální oblasti anebo na apikální části akrozomu a ekvatoriálním segmentu akrozomu. Také byl po kapacitaci zaznamenán signál na hlavní a koncové části bičíku (Wang et al. 2018), což je v rozporu s naším tvrzením o poklesu vazby sialové kyseliny na bičíku spermie po kapacitaci. Toto zjištění nicméně podporuje již dříve zmíněnou teorii o možnosti existence α -2,8 vázané sialové kyseliny na bičíku kančí spermie. Dále Wang et al. (2018) pomocí protilátek detekovali na spermích dva sializované dekapacitační faktory AWN (Dostálová et al. 1995a) a PSP-I (Nimtz et al. 1999). AWN byl výše zmiňován v souvislosti se stejnou lokalizací na hlavičce jako u vazby lektinu SNA v naší studii. Po kapacitaci signál z apikální části akrozomu částečně vymizel. Dostálová et al. (1995) také popsali částečný úbytek AWN na spermích po kapacitaci a navíc uvedli, že se zbytkové AWN pravděpodobně účastní vazby na ZP oocytu (Dostálová et al. 1995a). U proteinu PSP-I byl viditelný signál na celém akrozomu a u některých spermích na bičíku, ale chyběl v postakrozomální oblasti u nekapacitovaných spermích. Po kapacitaci signál na akrozomu výrazně klesl a na bičíku nebyl už vůbec viditelný (Wang et al. 2018), což koresponduje s našimi výsledky vazby MAA v suspenzi.

Pokud shrneme výsledky lokalizace sialové kyseliny na povrchu kančích spermích před a po kapacitaci pomocí nepřímé fluorescenční mikroskopie, dojdeme k závěru, že způsob fixace spermích hraje při vazbě lektinu zásadní roli. Naše výsledky potvrzují, že po kapacitaci došlo k výraznému snížení počtu spermích se signálem na bičíku, a tím i vazby α -2,3 (86% úbytek) a α -2,6 (45% úbytek) vázané sialové kyseliny na povrchu spermie. Desializace povrchu bičíku je pravděpodobně důležitou součástí procesu kapacitace. Je možné, že odstranění sializovaných struktur je podstatné pro hyperaktivovaný pohyb spermie, ačkoliv při samotné desializaci býčích spermích pomocí neuraminidázy nebyla pozorována indukce hyperaktivace motility (Fernandez-Fuertes et al. 2018). Jak už bylo výše zmíněno, po kapacitaci z bičíku odchází spermadheziny PSP-I, což s našimi výsledky souhlasí, protože jsme prokázali úbytek MAA a SNA lektinu na bičíku po kapacitaci. Lze předpokládat, že spermadheziny AWN a PSP-I jsou sialoglykoproteiny, které při našich experimentech z povrchu kančí spermie odešly, stejně jako v případě Wang et al. (2018). Bylo by vhodné naši studii doplnit o měření celkového poklesu nebo nárůstu vazby pomocí průtokové cytometrie, abychom snížení sialových kyselin na povrchu spermie potvrdily kvantitativní metodou v porovnání s denzitometrickou analýzou detekce signálu glykoproteinů na membráně po SDS-elektroforéze, která je diskutována níže. Zobrazovací průtoková cytometrie by nám navíc umožnila lokalizovat sialovou kyselinu na spermích. Na některých místech na spermii došlo po kapacitaci naopak ke zvýšení signálu vazby lektinů rozpoznávajících sialovou kyselinu. Toto zjištění by bylo v souladu s výsledky Ma et al. (2016), kteří uvádějí, že pro úspěšné plození je nutná rovnováha mezi sializací a desializací na úrovni spermie a vytvoření „yin yang” mechanismu. Během kapacitace jsme zaznamenali, že došlo současně k menšímu úbytku signálu (9-15 %) vazby lektinů MAA a SNA a možné relokaci signálu z hlavní oblasti akrozomu do oblastí apikální nebo odstranění sializovaných struktur. Můžeme předpokládat, že tato migrace sialovaných molekul je nutná pro správné navázání spermie na ZP oocytu. Co se týče postakrozomální oblasti, zvýšená vazba lektinu SNA na tuto oblast značí navýšení množství α -2,6 vázané sialové kyseliny po kapacitaci

na tomto místě. Zajímavé je, že v případě lektinu WGA naopak došlo k výraznému poklesu vazby v této oblasti, což ale může být způsobeno úbytkem množství GlcNAc po kapacitaci nikoliv sialové kyseliny samotné. Na závěr je také vhodné zhodnotit výsledky popisující procentuální zastoupení signálu vazby lektinů na spermích v našich experimentech. Není překvapením, že nejvíce se na spermie dokázal vázat lektin WGA. Toto zjištění dáváme do souvislosti s jeho již zmiňovaným širším spektrem vazebné specifity oproti zbylým lektinům. U lektinů MAA a SNA bylo v suspenzi nalezeno poměrně nízké procento spermií se signálem. Můžeme se tedy domnívat, že pouze část ejakulovaných spermií obsahuje na svém povrchu sialové kyseliny, které zvyhodňují jejich šanci na oplození. Při cestě spermií za oocytom by tak mohlo docházet k přirozené selekci spermií a jen určitá populace ejakulovaných spermií by měla předpoklady pro oplození vajíčka. Pokud se zaměříme na vazbu lektinů v suspenzi, zjistíme, že po kapacitaci se počet spermií se signálem mírně zvýšil u SNA, a naopak snížil u MAA. Po fixaci aceton-metanolem se nicméně počet spermií s vazbou lektinu SNA o třetinu snížil. Toto zjištění naznačuje, že celkové množství α -2,6 sialové kyseliny na spermii se snižuje, ale na povrchu dochází zřejmě pouze k redistribuci molekul. Další možností je možnost narušení epitopů pro vazbu SNA ve spermích způsobené fixací metanolem.

Zajímalo nás, jak se mění podíl sialoglykoproteinů v celé spermii v průběhu kapacitace, a proto byla provedena detekce v celkových proteinových extraktech ejakulovaných a kapacitovaných spermií pomocí vazby vybraných lektinů a protilátek. Signál vazby lektinu nebo protilátky byl vždy vztažen k celkové nanáše extrahovaných proteinů spermií vyjádřené detekcí α -tubulinu. Pro vyhodnocení zvýšení či snížení podílu sialových kyselin v celkových proteinech byla provedena denzitometrická analýza. Relativní optická denzita byla v tomto případě počítána z celého vzorku a hodnotila tak změnu v rámci všech detekovaných proteinů. Při vazbě biotinem značeného lektinu MAA byly detekovány sialoglykoproteiny o velikosti 150 a 98 kDa a dále další s velikostí 61-95, 45-50, 33-39 kDa, u kterých se pravděpodobně velikost lišila podle počtu navázaných sialových kyselin měnící celkovou molekulovou hmotnost, a nebylo tedy možné určit přesnou velikost proteinů. Sialová kyselina, která není navázána na žádný protein má samostatně v podobě monosacharidu hmotnost 309 Da. Všechny glykoproteiny byly detekovány před i po kapacitaci, a proto předpokládáme, že nedošlo k úplnému odstranění žádného sialoglykoproteinu ze spermií během jejich kapacitace. Pomocí denzitometrické analýzy byl vyhodnocen výrazný pokles v množství sialové kyseliny po kapacitaci zhruba na třetinu své původní hodnoty u ejakulovaných spermií. Pokles v množství po kapacitaci byl statisticky významný s hodnotou $p < 0,05$. U lektinu SNA byly detekovány glykoproteiny o velikosti 150 a 97 kDa, což naznačuje, že by se mohlo jednat o stejné proteiny jako u detekce MAA, které na sobě mají navázané sialové kyseliny oběma typy vazby α -2,3 i α -2,6. Dále byly detekovány proteiny s velikostí 75 a 48,5 kDa. Všechny proteiny byly detekované před i po kapacitaci. Stejně jako u předešlého lektinu byl vyhodnocen statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) před a po kapacitaci. Jednalo se o opět výrazný pokles na třetinu své původní hodnoty. Téměř identická hodnota vazby lektinů MAA a SNA značí, že α -2,3 a α -2,6 vázané sialové kyseliny ze sialoglykoproteinů po kapacitaci mizí ve stejném poměru. Pomocí polyklonální protilátky proti sialové kyselině byly u dvou různých kanců detekovány před i po kapacitaci odlišné sialoglykoproteiny o velikosti 54,5 a 55 kDa. V tomto případě můžeme předpokládat, že se jedná o stejný protein. Množství detekovaných sialových kyselin kleslo po kapacitaci téměř pětkrát. Výrazný pokles bohužel nebylo možné statisticky ověřit. Detekce

sialoglykoproteinu pomocí protilátky o odlišné molekulové hmotnosti, než bylo v případě vazby s lektiny, může být způsobená rozdílnou specifitou vazby na sialovou kyselinu. Glykoprotein o podobné velikosti nebyl v žádném jiném našem experimentu detekován. Mohlo by se jednat o odlišnou specifitu protilátky, která by měla vázat sialovou kyselinu obecně, bez ohledu na typ vazby na koncový sacharid. U myši byl detekován sialoglykoprotein o velikosti 54 kDa na bičíku, který nebyl přesně identifikován. Nicméně tento sialoglykoprotein chrání spermii před fagocytózou makrofágy a je na spermii začleňován během epididymální maturace (Toshimori et al. 1991).

Abychom mohli porovnat změnu v podílu sialových kyselin navázaných pouze na povrchu spermií před a po kapacitaci, byla provedena detekce vazby MAA, SNA a WGA lektinů na proteinech cíleně izolovaných z povrchu ejakulovaných a kapacitovaných spermií. Relativní optická denzita byla v tomto případě počítána u jednotlivých detekovaných proteinových proužků a hodnotila tak změnu v rámci jednotlivých detekovaných proteinů odděleně. V tomto případě nemohl být jako referenční protein k nanášce použit α -tubulin, protože tento protein je součástí cytoskeletu buňky a neměl by tudíž být v extraktech povrchových proteinů detekovatelný. Povrchové proteiny byly extrahovány výhradně z nativních ejakulátů, u kterých nedošlo k mechanickému odmytí povrchových glykoproteinů ředidlem jako v případě inseminačních dávek. Při vyhodnocování této metody nemá vztahování signálu k celkové nanášce proteinů barvených pomocí Ponceau vypovídající hodnotu, jelikož při izolaci povrchových proteinů nikdy s jistotou nevíme, jaké množství proteinů se na biotin naváže. Je to z důvodu odlišné přístupnosti biotinylačního činidla proteinům a jejich aminových skupin před a po kapacitaci (Zigo et al. 2013). V průběhu kapacitace může dojít ke ztrátě povrchových proteinů, nicméně současně může docházet k odhalení většího či menšího množství proteinů, které jsou v těsné blízkosti plazmatické membrány. Přístup biotinylačního činidla k proteinům se proto může lišit. Je také nutné počítat s faktem, že celkový počet spermií po kapacitaci promýváním klesá. Z tohoto důvodu statistické vyhodnocení denzitometrické analýzy není zcela vypovídající. Signály byly proto vztaženy ke koncentraci spermií jednotlivých kanců. Informaci o koncentraci spermií v ejakulátu nám poskytla inseminační stanice, ze které ejakuláty pocházely. Po kapacitaci bylo počítáno s univerzální 20% ztrátou. Celkem bylo provedeno 7 experimentů s různými kanci. Výsledky bylo ale možné hodnotit pomocí denzitometrické analýzy pouze v jednom případě. Při ostatních měřeních bylo v negativní kontrole detekováno velké množství proteinů, což značí nespecifickou vazbu na proteiny, která byla pravděpodobně způsobena biotinem, který se neodštěpil během izolace povrchových proteinů, kdy je nutné uvolnit biotinem značené proteiny z gelových kuliček konjugovaných s avidinem pomocí redukce disulfidového můstku v biotinové značce. Při vizualizaci vazby lektinů, značených také biotinem, se na separované proteiny na membráně mohl avidin konjugovaný s peroxidázou následně navázat na tyto stále biotinem značené povrchové proteiny, a nikoli pouze na místa s navázaným lektinem. Při detekci sialové kyseliny pomocí lektinu MAA byly detekovány dva glykoproteiny o velikosti 360 a 20,7 kDa. U obou sialoglykoproteinů po kapacitaci klesla hodnota relativní optické denzity. V případě 20,7kDa proteinu klesla téměř pětkrát a v případě proteinu o velikosti 360 kDa zhruba o 70 %. Lze proto předpokládat podobnou míru desializace u obou proteinů. Při detekci pomocí lektinu SNA byly detekovány proteiny o velikosti 20-21 kDa a 14,8 kDa. Je možné se domnívat, že detekovaný 20-21kDa glykoprotein je shodný s 20,7 kDa proteinem detekovaným pomocí lektinu MAA

a značí tak protein, na kterém je sialová kyselina navázána oběma typy vazeb. U obou těchto glykoproteinů byl také detekován velmi výrazný pokles relativní optické denzity po kapacitaci o 85 % (14,8 kDa) a 90 % (20-21 kDa), míra desialzace byla znovu u obou proteinů velmi obdobná. Pokud se zaměříme na 14,8 kDa protein zjistíme, že by se mohlo jednat o již zmiňovaný spermadhezín AWN nebo PSP-I. AWN je 14kDa sialoglykoprotein, který je periferně vázáný na vnější povrch akrozomu epididymálních, ejakulovaných a kapacitovaných spermií (Dostálová et al. 1995a; Jonáková & Tichá 2004). Wang et al. (2018) potvrzují jeho výrazný úbytek po kapacitaci, jak již bylo diskutováno v rámci lokalizace sialové kyseliny pomocí fluorescenční mikroskopie.

Pouze u lektinu WGA, který kromě sialové kyseliny váže i N-acetylglukosamin jsme pozorovali zvýšené množství detekovaných sacharidových struktur jednoho z nalezených glykoproteinů po kapacitaci. Stejně jako v případě lektinu MAA a SNA byl detekován povrchový glykoprotein o velikosti 21 kDa. Dále byly detekovány ještě další dva glykoproteiny o velikosti 360 a 16,5 kDa. U glykoproteinů o velikosti 21 a 360 kDa celková míra signálu po kapacitaci klesla o více jak 50 %. Naopak u 16,5kDa glykoproteinu se hodnota relativní optické denzity zvýšila o čtvrtinu. Lze se domnívat, že toto navýšení bylo způsobené navázáním WGA na koncový N-acetylglukosamin, jehož míra vzrostla díky odhalení glykanů a glykoproteinů po kapacitaci, případně po desializaci povrchu spermie. Sialoglykoprotein o velikosti 21 kDa byl detekovaný při vazbě pomocí všech tří lektinů v povrchových glykoproteinech kančích spermií. V extraktu býčích spermií byl detekován sialoglykoprotein CD52 o molekulové hmotnosti 20-28 kDa (Michalková et al. 2010), lze tedy předpokládat, že by se mohlo jednat o stejný protein. U člověka má CD52 také hmotnost okolo 20 kDa a na povrch spermií se dostává z extracelulárních vezikul během epididymální maturace (Kirchhoff & Schröter 2001). U kanců byl popsán 250kDa sialoglykoprotein s anti-aglutinačním efektem na spermie (Dacheux & Dacheux 1988, 1989). Tento protein je produkován v *caput* a *cauda* epididymis. Focarelli et al. (1990a) pomocí gelové elektroforézy identifikovali u ejakulovaných lidských spermií povrchové sialoglykoproteiny různých molekulárních hmotností. Jednalo se o molekuly do velikosti 5 kDa a dva proteiny o velikosti 15-16 a 22-23 kDa, které odpovídají velikostmi námi detekovaným povrchovým sialoglykoproteinům. Po kapacitaci ovšem identifikovali pouze jeden sialoglykoprotein o velikosti 20 kDa (Focarelli et al. 1990a). Wongkome & Chulavatnatol (1984) identifikovali sialoglykoproteiny na povrchu lidské spermie o velikosti 30, 14, 12 a 18 kDa. Bylo také zjištěno, že se během průchodu epididymem na povrch lidských spermií váže sialovaný glykoprotein o velikosti 37 kDa (Dacheux & Dacheux 1987). Glykoprotein podobné velikosti jsme detekovali pomocí MAA u celkových proteinových extraktů. Dále například kančí 25kDa aglutinin syntetizovaný hlavně v *cauda epididymis* vykazuje afinitu pro WGA a zabraňuje „head-to-head“ aglutinaci spermií a udržuje progresivní motilitu spermií v *in vitro* podmínkách (Calvo et al. 2000). Glykoprotein o velikosti 25 kDa nicméně při našich experimentech detekován nebyl. U myši byl nalezen 54kDa protein SMA-4 s anti-aglutinačními schopnostmi s afinitou k WGA zabraňující „tail-to-tail“ aglutinaci (Feuchter et al. 1988). U potkanů byl také nalezen 37,6kDa protein tvořený v *caput* a *corpus* obsahující sialovou kyselinu (Faye et al. 1980). Další sialoglykoproteiny popsány u potkanů jsou CRISP (cysteine-rich secretory proteins) proteiny, které se vážou na spermie během maturace a jsou zapojeny do fúze gamet (Hinton et al. 1996; Cohen et al. 2004; Ellerman et al. 2006). Všechny zmiňované sialoglykoproteiny byly detekovány v rámci starších studií a většina z nich nebyla

přesně identifikována. Bylo by proto vhodné do budoucna u námi nalezených sialoglykoproteinů provést identifikaci pomocí hmotnostního spektrometru.

Výsledky našich experimentů potvrzují, že podíl sialové kyseliny v glykoproteinech kančích spermií je po kapacitaci na spermii redukován. Je tak možné, že tímto způsobem dochází k odkrytí vazebných míst nutných pro navázání spermie na ZP. Tuto možnost podporuje fakt, že na oocytu byly také objeveny sializované struktury, které by se mohly zapojovat do vazebných interakcí mezi spermii a oocytem (Ozgur et al. 1998; Pang et al. 2011). U prasete bylo potvrzeno, že na ZP se váží lektiny MAA a SNA, z čehož vyplývá, že obsahuje různě připojené sialové kyseliny (Rath et al. 2005). Je nicméně možné, že při interakci gamet záleží na typu vazby sialové kyseliny na koncový sacharid. Velásquez et al. (2007) totiž potvrzují klíčovou roli sialové kyseliny při vazbě spermie na ZP u skotu, a to α -2,3 vázané v glykoproteinech bovinní ZP. Zároveň udává, že ošetření ZP neuraminidázou mělo za výsledek výrazný inhibiční efekt vazby gamet (Velásquez et al. 2007). Naše zjištění tedy potvrzují výsledky některých předešlých studií, které uvádějí, že odstranění sialových kyselin z povrchu spermie je potřebné pro následné navázání spermie na ZP (Lassalle & Testart 1994; Fernandez-Fuertes et al. 2018). Na hlavičce lidských, býčích a beraních spermií navíc byly objeveny siglekty vázající právě sialovou kyselinu (Alkhodair et al. 2018). V našich experimentech nicméně nedošlo k úplnému odstranění sialových kyselin z povrchu spermií po kapacitaci. Nabízí se tedy možnost, že pro správné rozpoznání a interakci gamet musí být jak na spermii, tak na vajíčku přítomné sialové kyseliny, ale současně i vazebná místa pro sialovou kyselinu a vytvářet tak mezi sebou jakousi rovnováhu. Je ovšem nutné dodat, že u některých druhů měla desializace povrchu spermie naopak inhibiční nebo žádný efekt na interakci mezi spermii a oocytem (Lambert & Van Le 1984). Při zapojení sialové kyseliny v rozpoznání a vazbě na ZP oocytu tedy evidentně hraje důležitou roli mezidruhová i vnitrodruhová variabilita.

7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala studiem změn v podílu sialové kyseliny na kančích spermiiích po *in vitro* kapacitaci. Vycházeli jsme z hypotézy, že míra sializace kančí spermie v průběhu kapacitace klesá. Cílem práce bylo lokalizovat (1) a detekovat (2) sialoglykoproteiny na spermiiích před a po *in vitro* kapacitaci pomocí vybraných lektinů a protilátek.

Sialové kyseliny jsme lokalizovali na ejakulovaných a kapacitovaných spermiiích pomocí lektinů MAA, SNA a WGA v suspenzi a po fixaci roztokem aceton-metanolu. U vazby lektinu MAA v suspenzi byl potvrzen signifikantní, v průměru 86% úbytek signálu na bičíku spermie po kapacitaci. Dále uváděné změny v lokalizaci signálu po kapacitaci již nebyly signifikantní. V oblasti akrozomu byl pozorován v průměru 15% nárůst v zastoupení spermii se značením pouze v apikální části akrozomu. U vazby lektinu SNA v suspenzi byl také potvrzen výrazný průměrný úbytek signálu na bičíku, ale v tomto případě pouze 45%. Byl pozorován průměrně 9% nárůst počtu spermii se signálem pouze v apikální části akrozomu po kapacitaci. Co se týče postakrozomální oblasti, detekce signálu v tomto regionu se po kapacitaci zvýšila o 23 %. Po fixaci spermii roztokem acetonu a metanolu byl po kapacitaci pozorován průměrně 16% nárůst počtu spermii se signálem pouze v apikální části akrozomu. Při vazbě lektinu WGA v suspenzi bylo možné po kapacitaci pozorovat pokles vazby na postakrozomální oblasti hlavičky o 68 %. Na akrozomu byl pozorován pokles počtu spermii se signálem pouze v apikální části průměrně o 8 % u obou způsobů přípravy preparátů. Při vazbě WGA po vlhké fixaci nedošlo k výrazným změnám.

Pomocí lektinů a protilátky proti sialové kyselině jsme detekovali sialoglykoproteiny v povrchových a celkových proteinových extraktech spermii. V obsahu celkových proteinů jsme pomocí lektinu MAA potvrdili signifikantní pokles v množství sialoglykoproteinů po kapacitaci na téměř třetinu své původní hodnoty. Téměř totožný signifikantní pokles v množství glykoproteinů s navázanou sialovou kyselinou po kapacitaci byl potvrzen u lektinu SNA. Pomocí protilátky proti sialové kyselině byly v celkových proteinových extraktech detekovány dva sialoglykoproteiny podobné velikosti (54,5 a 55 kDa). Signál po kapacitaci výrazně klesl zhruba na čtvrtinu své původní hodnoty, nicméně kvůli malému množství opakování nemohlo být toto zjištění statisticky ověřeno. U povrchových proteinových extraktů byly měřeny změny v rámci jednotlivých nalezených sialoglykoproteinů. Statistická analýza nemohla být provedena, neboť u velkého množství pokusů byla nalezena nespecifická vazba lektinu. Pomocí lektinu MAA byly detekovány sialoglykoproteiny o velikosti 20,7 a 360 kDa, po kapacitaci jejich průměrná intenzita signálu klesla na zhruba čtvrtinovou hodnotu. Lektin SNA se navázal na dva glykoproteiny o molekulové hmotnosti 14,8 a 20-21 kDa a jejich signál po kapacitaci klesl na zhruba desetinu své původní hodnoty. Pomocí lektinu WGA jsme detekovali celkem tři sialoglykoproteiny. U proteinů o velikosti 21 a 350 kDa jsme po kapacitaci detekovali desializaci. Naopak u třetího detekovaného sialoglykoproteinu o velikosti 16,5 kDa byl detekován nárůst intenzity signálu. Předpokládáme, že námi detekované sialoglykoproteiny o nižší molekulové hmotnosti by mohly být kančí spermadheziny AWN a PSP I – dekapacitační faktory původem ze semenné plazmy nebo sializovaný glykoprotein CD52, který je začleňován do plazmatické membrány spermie během epididymální maturace.

Z výsledků diplomové práce tedy vyplývá, že stanovená hypotéza se potvrdila. Výrazný úbytek sialových kyselin jsme pozorovali zejména na bičíku spermii. Detekce sialové kyseliny

právě v této části spermie by tak mohla sloužit jako vhodný marker pro hodnocení kapacity kančích spermií. Změny v podílu sialové kyseliny na povrchu spermie po kapacitaci jsme detekovali i na apikální a hlavní části akrozomu hlavičky spermie. Předpokládáme, že po kapacitaci dochází k redistribuci sialoglykoproteinů do apikální části akrozomu, které se následně mohou účastnit vazby na *zona pellucida* oocyty. Některé studie popisují naopak nutnost desializace apikální části akrozomu, aby mohlo dojít k interakci gamet. Jsme si nicméně vědomi toho, že způsob zapojení sialových kyselin do vazby na tento glykoproteinový obal oocyty se pravděpodobně výrazně liší druh od druhu. Do budoucna je však nutné některé experimenty zopakovat, aby bylo možné všechny nalezené změny po kapacitaci statisticky potvrdit. Tato práce je považována za předběžnou studii změn v podílu sialových kyselin v glykoproteinech spermií v průběhu *in vitro* kapacity.

8 Literatura

- Accogli G, Lacalandra GM, Aiudi G, Cox SN, Desantis S. 2017. Differential surface glycoprofile of buffalo bull spermatozoa during mating and non-mating periods. *Animal: an international journal of animal bioscience* **11**:1807.
- Ahmad F, McPhie P. 1980. The intrinsic viscosity of glycoproteins. *International Journal of Biochemistry* **11**:91-96.
- Ahuja KK. 1984. Lectin-coated agarose beads in the investigation of sperm capacitation in the hamster. *Developmental biology* **104**:131-142.
- Ainsworth CJ, Nixon B, Aitken RJ. 2011. The electrophoretic separation of spermatozoa: an analysis of genotype, surface carbohydrate composition and potential for capacitation. *International Journal of Andrology* **34**:e422-e434.
- Aitken RJ, Nixon B. 2013. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Molecular human reproduction* **19**:785-793.
- Alkhodair K, Almhanna H, McGetrick J, Gedair S, Gallagher ME, Fernandez-Fuertes B, Tharmalingam T, Larsen PB, Fitzpatrick E, Lonergan P. 2018. Siglec expression on the surface of human, bull and ram sperm. *Reproduction* **155**:361-371.
- Arenas MI, De Miguel MP, Bethencourt FR, Fraile B, Royuela M, Paniagua R. 1996. Lectin histochemistry in the human epididymis. *Reproduction* **106**:313-320.
- Arenas MI, Madrid JF, Bethencourt FR, Fraile B, Paniagua R. 1998. Identification of N-and O-linked oligosaccharides in the human epididymis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **46**:1185-1188.
- Bains HK, Pabst MA, Bawa SR. 1993. Changes in the lectin binding sites on the testicular, epididymal, vas, and ejaculated spermatozoon surface of dog. *Andrologia* **25**:19-24.
- Baker AN, Richards S-J, Guy CS, Congdon TR, Hasan M, Zwetsloot AJ, Gallo A, Lewandowski JR, Stansfeld PJ, Straube A. 2020. The SARS-COV-2 spike protein binds sialic acids and enables rapid detection in a lateral flow point of care diagnostic device. *ACS central science* **6**:2046-2052.
- Baker MA, Hetherington L, Weinberg A, Naumovski N, Velkov T, Pelzing M, Dolman S, Condina MR, Aitken RJ. 2012. Analysis of phosphopeptide changes as spermatozoa acquire functional competence in the epididymis demonstrates changes in the post-translational modification of Izumo1. *Journal of proteome research* **11**:5252-5264.
- Bansil R, Stanley E, LaMont JT. 1995. Mucin biophysics. *Annual review of physiology* **57**:635-657.
- Batra V, Dagar K, Nayak S, Kumaresan A, Kumar R, Datta TK. 2020. A higher abundance of O-linked glycans confers a selective advantage to high fertile buffalo spermatozoa for immune-evasion from neutrophils. *Frontiers in immunology*:1928.

- Bawa SR, Pabst MA, Werner G, Bains HK. 1993. Capacitated and acrosome reacted spermatozoa of goat (*Capra indicus*): a fluorescence and electron microscopic study. *Andrologia* **25**:123-135.
- Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M 2013. Boar reproduction. Springer.
- Brewis IA, Gadella BM. 2009. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *MHR: Basic science of reproductive medicine* **16**:68-79.
- Brooks SA. 2017. Lectin histochemistry: historical perspectives, state of the art, and the future. Pages 93-107. *Histochemistry of Single Molecules*. Springer.
- Büll C, Stoel MA, den Brok MH, Adema GJ. 2014. Sialic acids sweeten a tumor's life. *Cancer research* **74**:3199-3204.
- Caballero I, Parrilla I, Almiñana C, Del Olmo D, Roca J, Martínez EA, Vázquez JM. 2012. Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. *Reproduction in Domestic Animals* **47**:12-21.
- Calvete JJ, Solís D, Sanz L, Díaz-Mauriño T, Töpfer-Petersen E. 1994. Glycosylated boar spermadhesin AWN-1 isoforms. Biological origin, structural characterization by lectin mapping, localization of O-glycosylation sites, and effect of glycosylation on ligand binding. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **375**:667-674.
- Calvo A, Pastor LM, Bonet S, Pinart E, Ventura M. 2000. Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis. *Journal of reproduction and fertility* **120**:325-336.
- Chan PJ, Jacobson JD, Corselli JU, Patton WC. 2006. A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. *Fertility and sterility* **85**:481-486.
- Cohen DJ, Busso D, Da Ros V, Ellerman DA, Maldera JA, Goldweic N, Cuasnicu PS. 2004. Participation of cysteine-rich secretory proteins (CRISP) in mammalian sperm-egg interaction. *International Journal of Developmental Biology* **52**:737-742.
- Cooper TG. 2011. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian journal of andrology* **13**:130.
- Cortés PP, Orihuela PA, Zúniga LM, Velásquez LA, Croxatto HB. 2004. Sperm binding to oviductal epithelial cells in the rat: role of sialic acid residues on the epithelial surface and sialic acid-binding sites on the sperm surface. *Biology of reproduction* **71**:1262-1269.
- Crocker PR, Paulson JC, Varki A. 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nature Reviews Immunology* **7**:255-266.
- Crook M. 1993. The determination of plasma or serum sialic acid. *Clinical biochemistry* **26**:31-38.
- Dacheux F, Dacheux J-L. 1987. The intracellular pathway of antagglutinin secretion in the boar caput epididymidis as revealed by immunogold labelling. *Cell and tissue research* **249**:89-99.

- Dacheux F, Dacheux J-L. 1988. Immunocytochemical localization of antagglutinin in the boar epididymis. *Cell and tissue research* **252**:329-337.
- Dacheux F, Dacheux J-L. 1989. Androgenic control of antagglutinin secretion in the boar epididymal epithelium. *Cell and tissue research* **255**:371-378.
- Dacheux JL, Gatti JL, Dacheux F. 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy research and technique* **61**:7-17.
- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Human reproduction* **13**:1-8.
- Dell A, Morris HR, Easton RL, Patankar M, Clark GF. 1999. The glycobiology of gametes and fertilization. *Biochimica et biophysica acta* **1473**:196-205.
- Desantis S, Ventriglia G, Zizza S, Nicassio M, Valentini L, Di Summa A, Lacalandra GM. 2010. Lectin-binding sites on ejaculated stallion sperm during breeding and non-breeding periods. *Theriogenology* **73**:1146-1153.
- Devine PL, McKenzie IFC. 1992. Mucins: structure, function, and associations with malignancy. *Bioessays* **14**:619-625.
- Diekman AB. 2003. Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg? *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **60**:298-308.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1995a. Boar spermadhesin AWN-1: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *European Journal of Biochemistry* **230**:329-336.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Töpfer-Petersen E. 1995b. Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **376**:237-242.
- Duan S, Paulson JC. 2020. Siglecs as immune cell checkpoints in disease. *Annual review of immunology* **38**:365-395.
- Ellerman DA, Cohen DJ, Da Ros VG, Morgenfeld MM, Busso D, Cuasnicú PS. 2006. Sperm protein “DE” mediates gamete fusion through an evolutionarily conserved site of the CRISP family. *Developmental biology* **297**:228-237.
- Faye JC, Duguet L, Mazzuca M, Bayard F. 1980. Purification, radioimmunoassay, and immunohistochemical localization of a glycoprotein produced by the rat epididymis. *Biology of reproduction* **23**:423-432.
- Fernandez-Fuertes B, Blanco-Fernandez A, Reid CJ, Meade KG, Fair S, Lonergan P. 2018. Removal of sialic acid from bull sperm decreases motility and mucus penetration ability but increases zona pellucida binding and polyspermic penetration in vitro. *Reproduction* **155**:481-492.

- Feuchter FA, Tabet AJ, Green MF. 1988. Maturation antigen of the mouse sperm flagellum. I. Analysis of its secretion, association with sperm, and function. *American journal of anatomy* **181**:67-76.
- Florman H, Fissore R. 2015. Fertilization in Mammals. Pages 149-196.
- Focarelli R, Giuffrida A, Rosati F. 1995. Changes in the sialylglycoconjugate distribution on the human sperm surface during in-vitro capacitation: partial purification of a 20 kDa sialylglycoprotein of capacitated spermatozoa. *MHR: Basic science of reproductive medicine* **1**:369-373.
- Focarelli R, Rosa D, Rosati F. 1990a. Differentiation of the vitelline coat and the polarized site of sperm entrance in the egg of *Unio elongatulus* (Mollusca, Bivalvia). *Journal of Experimental Zoology* **254**:88-96.
- Focarelli R, Rosati F, Terrana B. 1990b. Sialylglycoconjugates release during in vitro capacitation of human spermatozoa. *Journal of andrology* **11**:97-104.
- Gabriel LK, Franken DR, Van Der Horst G, Kruger TF, Oehninger SC. 1994. Wheat germ agglutinin receptors on human sperm membranes and sperm morphology. *Andrologia* **26**:5-8.
- Gadella B, Tsai P-S, Boerke A, Brewis I. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *The International journal of developmental biology* **52**:473-480.
- Gallagher JT, Morris A, Dexter TM. 1985. Identification of two binding sites for wheat-germ agglutinin on poly-lactosamine-type oligosaccharides. *Biochemical journal* **231**:115-122.
- Gervasi MG, Visconti PE. 2017. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology* **5**:204-218.
- Gwathmey TM 2006. Forming the oviductal sperm reservoir: Mechanism and function. Cornell University.
- Gómez-Torres MJ, Avilés M, Girela JL, Murcia V, Fernández-Colom PJ, Romeu A, Juan Jd. 2012. Characterization of the lectin binding pattern in human spermatozoa after swim-up selection.
- Hammerstedt RH, Hay SR, Amann RP. 1982. Modification of ram sperm membranes during epididymal transit. *Biology of reproduction* **27**:745-754.
- Harayama H, Miyano T, Miyake M, Kusunoki H, Kato S. 1994. Identification of anti-agglutinin for spermatozoa in epididymal boar plasma. *Molecular reproduction and development* **37**:436-445.
- Hernández-Arteaga A, de Jesús Zermeño Nava J, Kolosovas-Machuca ES, Velázquez-Salazar JJ, Vinogradova E, José-Yacamán M, Navarro-Contreras HR. 2017. Diagnosis of breast cancer by analysis of sialic acid concentrations in human saliva by surface-enhanced Raman spectroscopy of silver nanoparticles. *Nano Research* **10**:3662-3670.

- Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D, Lan ZJ, Labus JC. 1996. 2 The Role of the Epididymis in the Protection of Spermatozoa. *Current topics in developmental biology* **33**:61-102.
- Ho H-C, Granish KA, Suarez SS. 2002. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Developmental biology* **250**:208-217.
- Holt WV. 1980. Surface-bound sialic acid on ram and bull spermatozoa: deposition during epididymal transit and stability during washing. *Biology of reproduction* **23**:847-857.
- Hunter RHF, Rodriguez-Martinez H. 2004. Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* **67**:243-250.
- Ishijima SA, Okuno M, Mohri H. 1991. Zeta potential of human X-and Y-bearing sperm. *International Journal of andrology* **14**:340-347.
- Jamur MC, Oliver C. 2010. Permeabilization of cell membranes. Pages 63-66. *Immunocytochemical methods and protocols*. Springer.
- Jansen RPS. 1980. Cyclic changes in the human fallopian tube isthmus and their functional importance. *American journal of obstetrics and gynecology* **136**:292-308.
- Jeanloz RW, Codrington JF. 1976. The biological role of sialic acid at the surface of the cell. Pages 201-238. *Biological roles of sialic acid*. Springer.
- Jiménez I, González-Márquez H, Ortiz Ro, Herrera JA, García A, Betancourt M, Fierro R. 2003. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* **59**:1171-1180.
- Jonáková V, Tichá M. 2004. Boar seminal plasma proteins and their binding properties. A review. *Collection of Czechoslovak chemical communications* **69**:461-475.
- Kadirvel G, Machado SA, Korneli C, Collins E, Miller P, Bess KN, Aoki K, Tiemeyer M, Bovin N, Miller DJ. 2012. Porcine sperm bind to specific 6-sialylated biantennary glycans to form the oviduct reservoir. *Biology of reproduction* **87**:147-141.
- Kelm S, Schauer R. 1997. Sialic acids in molecular and cellular interactions. *International review of cytology* **175**:137-240.
- Kim S-O, Kim J, Okajima T, Cho N-J. 2017. Mechanical properties of paraformaldehyde-treated individual cells investigated by atomic force microscopy and scanning ion conductance microscopy. *Nano convergence* **4**:1-8.
- Kirchhoff C, Schröter S. 2001. New insights into the origin, structure and role of CD52: a major component of the mammalian sperm glycocalyx. *Cells Tissues Organs* **168**:93-104.
- Knibbs RN, Goldstein IJ, Ratcliffe RM, Shibuya N. 1991. Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leucoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*. Comparison with other sialic acid-specific lectins. *Journal of Biological Chemistry* **266**:83-88.

- Koehler JK. 1981. Lectins as probes of the spermatozoon surface. *Archives of andrology* **6**:197-217.
- Kurachi S, Song Z, Takagaki M, Yang Q, Winter HC, Kurachi K, Goldstein IJ. 1998. Sialic acid-binding lectin from the slug *Limax flavus*: Cloning, expression of the polypeptide, and tissue localization. *European journal of biochemistry* **254**:217-222.
- Lambert H, Van Le A. 1984. Possible involvement of a sialylated component of the sperm plasma membrane in sperm-zona interaction in the mouse. *Gamete research* **10**:153-163.
- Lassalle B, Testart J. 1994. Human zona pellucida recognition associated with removal of sialic acid from human sperm surface. *Reproduction* **101**:703-711.
- Ledeer RW, Yu RK. 1976. Chemistry and analysis of sialic acid. Pages 1-57. *Biological roles of sialic acid*. Springer.
- Lis H, Sharon N. 1998. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical reviews* **98**:637-674.
- Ma F, Wu D, Deng L, Secret P, Zhao J, Varki N, Lindheim S, Gagneux P. 2012. Sialidases on mammalian sperm mediate deciduous sialylation during capacitation. *Journal of Biological Chemistry* **287**:38073-38079.
- Ma X, Pan Q, Feng Y, Choudhury BP, Ma Q, Gagneux P, Ma F. 2016. Sialylation facilitates the maturation of mammalian sperm and affects its survival in female uterus. *Biology of reproduction* **94**:123-121.
- Magargee SF, Kunze E, Hammerstedt RH. 1988. Changes in lectin-binding features of ram sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation. *Biology of reproduction* **38**:667-685.
- Medeiros CMO, Parrish JJ. 1996. Changes in lectin binding to bovine sperm during heparin-induced capacitation. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* **44**:525-532.
- Michalková K, Simon M, Antalíková J, Klíma J, Jankovičová J, Hluchý S. 2010. Identification of bovine CD52-like molecule by monoclonal antibody IVA-543: distribution of CD52-like molecule in the bull genital tract. *Theriogenology* **74**:1066-1074.
- Miller DJ. 2015. Regulation of sperm function by oviduct fluid and the epithelium: insight into the role of glycans. *Reproduction in domestic animals* **50**:31-39.
- Moustafa I, Connaris H, Taylor M, Zaitsev V, Wilson JC, Kiefel MJ, Von Itzstein M, Taylor G. 2004. Sialic acid recognition by *Vibrio cholerae* neuraminidase. *Journal of Biological Chemistry* **279**:40819-40826.
- Mühlenhoff M, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R. 1998. Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function. *Current opinion in structural biology* **8**:558-564.

- Nimtz M, Grabenhorst E, Conradt HS, Sanz L, Calvete JJ. 1999. Structural characterization of the oligosaccharide chains of native and crystallized boar seminal plasma spermadhesin PSP-I and PSP-II glycoforms. *European journal of biochemistry* **265**:703-718.
- Ortiz A, Espino J, Bejarano I, Lozano GM, Monllor F, García JF, Pariante JA, Rodríguez AB. 2011. High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. *Journal of pineal research* **50**:132-139.
- Ozgun K, Patankar MS, Oehninger S, Clark GF. 1998. Direct evidence for the involvement of carbohydrate sequences in human sperm-zona pellucida binding. *Molecular human reproduction* **4**:318-324.
- Pang P-C, Chiu PCN, Lee C-L, Chang L-Y, Panico M, Morris HR, Haslam SM, Khoo K-H, Clark GF, Yeung WSB. 2011. Human sperm binding is mediated by the sialyl-Lewisx oligosaccharide on the zona pellucida. *Science* **333**:1761-1764.
- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL. 2003. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**:14869-14874.
- Rath D, Töpfer-Petersen E, Michelmann H-W, Schwartz P, Ebeling S. 2005. Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology* **63**:352-362.
- Reed MB, Caruana SR, Batchelor AH, Thompson JK, Crabb BS, Cowman AF. 2000. Targeted disruption of an erythrocyte binding antigen in *Plasmodium falciparum* is associated with a switch toward a sialic acid-independent pathway of invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**:7509-7514.
- Rickard JP, de Graaf SP. 2020. Sperm surface changes and their consequences for sperm transit through the female reproductive tract. *Theriogenology* **150**:96-105.
- Robaire B, Hinton BT. 2015. Chapter 17 - The Epididymis. Pages 691-771 in Plant TM, and Zeleznik AJ, editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego.
- Robles-Gómez L, González-Brusi L, Sáez-Espinosa P, Huerta-Retamal N, Cots-Rodríguez P, Avilés M, Gómez-Torres MJ. 2021. Specific lectin binding sites during in vitro capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Italian Journal of Animal Science* **20**:372-382.
- Saez F, Ouvrier A, Drevet JR. 2011. Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian journal of andrology* **13**:11.
- Schauer R. 1982. Sialic acids, chemistry, metabolism, and function.
- Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. 2014. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiological reviews*.

- Schneider F, Kemmner W, Haensch W, Franke G, Gretschel S, Karsten U, Schlag PM. 2001. Overexpression of Sialyltransferase CMP-Sialic Acid: Gal β 1, 3GalNAc-R α 6-Sialyltransferase Is Related to Poor Patient Survival in Human Colorectal Carcinomas. *Cancer research* **61**:4605-4611.
- Schröter S, Osterhoff C, McArdle W, Ivell R. 1999. The glycocalyx of the sperm surface. *Human reproduction update* **5**:302-313.
- Simon P, Bäumner S, Busch O, Röhrich R, Kaese M, Richterich P, Wehrend A, Karin M, Gerardy-Schahn R, Martina M. 2013. Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8SiaII. *Journal of Biological Chemistry* **288**:18825-18833.
- Simon PM, Goode PL, Mobasser A, Zopf D. 1997. Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infection and immunity* **65**:750-757.
- Suarez SS. 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Human reproduction update* **14**:647-657.
- Suarez SS, Ho HC. 2003. Hyperactivated motility in sperm. *Reproduction in domestic animals* **38**:119-124.
- Sullivan R, Saez F. 2013. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction* **146**:R21-R35.
- Sutovsky P, Manandhar G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. The sperm cell: Production, maturation, fertilization, regeneration:1-30.
- Taitzoglou IA, Kokoli AN, Killian GJ. 2007. Modifications of surface carbohydrates on bovine spermatozoa mediated by oviductal fluid: a flow cytometric study using lectins. *International journal of andrology* **30**:108-114.
- Tecele E, Gagneux P. 2015. Sugar-coated sperm: unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Molecular reproduction and development* **82**:635-650.
- Thompson LA, Barratt CLR, Bolton AE, Cooke ID. 1992. The leukocytic reaction of the human uterine cervix. *American journal of reproductive immunology* **28**:85-89.
- Tiralongo J. 2010. Sialic acid-specific microbial lectins. Pages 585-598. *Microbial Glycobiology*. Elsevier.
- Tollner TL, Venners SA, Hollox EJ, Yudin AI, Liu X, Tang G, Xing H, Kays RJ, Lau T, Overstreet JW. 2011. A common mutation in the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility. *Science translational medicine* **3**:65-92.
- Tollner TL, Yudin AI, Tarantal AF, Treece CA, Overstreet JW, Cherr GN. 2008a. Beta-defensin 126 on the surface of macaque sperm mediates attachment of sperm to oviductal epithelia. *Biology of reproduction* **78**:400-412.

- Tollner TL, Yudin AI, Treece CA, Overstreet JW, Cherr GN. 2008b. Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates sperm penetration of cervical mucus. *Human reproduction* **23**:2523-2534.
- Toshimori K, Araki S, Ōura C, Eddy EM. 1991. Loss of sperm surface sialic acid induces phagocytosis: an assay with a monoclonal antibody T21, which recognizes a 54K sialoglycoprotein. *Archives of andrology* **27**:79-86.
- Toshimori K, Araki S, Ōura C. 1988. Masking of sperm maturation antigen by sialic acid in the epididymis of the mouse. *Histochemistry* **90**:195-200.
- Toshimori K, Eddy EM. 2015. Chapter 3 - The Spermatozoon. Pages 99-148 in Plant TM, and Zeleznik AJ, editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego.
- Tulsiani DRP. 2003. Glycan modifying enzymes in luminal fluid of rat epididymis: are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation? *Microscopy research and technique* **61**:18-27.
- Tulsiani DRP. 2006. Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation. *Molecular and cellular endocrinology* **250**:58-65.
- Tulsiani DRP, Skudlarek MD, Holland MK, Orgebin-Crist M-C. 1993. Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biology of reproduction* **48**:417-428.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Tsoлова M. 2004. Glycobiology of fertilization in the pig. *International Journal of Developmental Biology* **52**:717-736.
- van Vuuren RJJ, Pitout MJ, van Aswegen CH, Theron JJ. 1992. Putative melatonin receptor in human spermatozoa. *Clinical biochemistry* **25**:125-127.
- Varki A, Kannagi R, Toole BP. 2009. Glycosylation changes in cancer. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition.
- Varki A, Schnaar RL, Schauer R. 2017. Sialic acids and other nonulosonic acids. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd edition.
- Varki NM, Varki A. 2007. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Laboratory investigation* **87**:851-857.
- Velásquez JG, Canovas S, Barajas P, Marcos J, Jiménez-Movilla M, Gallego RG, Ballesta J, Avilés M, Coy P. 2007. Role of sialic acid in bovine sperm–zona pellucida binding. *Molecular reproduction and development* **74**:617-628.
- Vijayan M, Chandra N. 1999. Lectins. *Current opinion in structural biology* **9**:707-714.
- Villaverde AISB, Hetherington L, Baker MA. 2016. Quantitative glycopeptide changes in rat sperm during epididymal transit. *Biology of reproduction* **94**:91-91.

- Vázquez JM, Martínez E, Pastor LM, Roca J, Matas C, Calvo A. 1996. Lectin histochemistry during in vitro capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa: new lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa. *Acta histochemica* **98**:93-100.
- Wang X, Chow R, Deng L, Anderson D, Weidner N, Godwin AK, Bewtra C, Zlotnik A, Bui J, Varki A. 2011. Expression of Siglec-11 by human and chimpanzee ovarian stromal cells, with uniquely human ligands: implications for human ovarian physiology and pathology. *Glycobiology* **21**:1038-1048.
- Wang Y, Gu Y, Gao H, Gao Y, Shao J, Pang W, Dong W. 2018. Exploring boar sperm sialylation during capacitation using boronic acid-functionalized beads. *Reproduction* **155**:25-36.
- Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC. 1988. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**:426-431.
- Wessel DM, Flüggé UI. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical biochemistry* **138**:141-143.
- Wongkome C, Chulavatnatol M. 1984. Sialoglycoproteins of ejaculated human spermatozoa and seminal plasma. *International journal of andrology* **7**:352-361.
- Xia J, Reigada D, Mitchell CH, Ren D. 2007. CATSPER channel-mediated Ca²⁺ entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation. *Biology of reproduction* **77**:551-559.
- Xin A-J, Cheng L, Diao H, Wang P, Gu Y-H, Wu B, Wu Y-C, Chen G-W, Zhou S-M, Guo S-J. 2014. Comprehensive profiling of accessible surface glycans of mammalian sperm using a lectin microarray. *Clinical proteomics* **11**:1-9.
- Yanagimachi R. 1970. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *Reproduction* **23**:193-196.
- Yeung CH, Schröter S, Wagenfeld A, Kirchhoff C, Kliesch S, Poser D, Weinbauer GF, Nieschlag E, Cooper TG. 1997. Interaction of the human epididymal protein CD52 (HE5) with epididymal spermatozoa from men and cynomolgus monkeys. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* **48**:267-275.
- Yudin AI, Generao SE, Tollner TL, Treece CA, Overstreet JW, Cherr GN. 2005. Beta-defensin 126 on the cell surface protects sperm from immunorecognition and binding of anti-sperm antibodies. *Biology of reproduction* **73**:1243-1252.
- Zahedi A, Tavalae M, Deemeh MR, Azadi L, Fazilati M, Nasr-Esfahani MH. 2013. Zeta potential vs apoptotic marker: which is more suitable for ICSI sperm selection? *Journal of assisted reproduction and genetics* **30**:1181-1186.
- Zigo M, Jonáková V, Šulc M, Maňásková-Postlerová P. 2013. Characterization of sperm surface protein patterns of ejaculated and capacitated boar sperm, with the detection of ZP binding candidates. *International journal of biological macromolecules* **61**:322-328.

9 Seznam použitých zkratek

AWN	kančí glykoprotein semenné plazmy
CASA	z ang. Computer Assisted Sperm Analysis
CD52	GPI-zakotvený glykoprotein
CRISP	z ang. cysteine-rich secretory protein
GlcNAc	N-acetylglukosamin
GPI kotva	glykosylfosfatidylinositolová kotva
LFA	<i>Limax flavus</i> lektin
MAA	<i>Maackia amurensis</i> lektin
NC	nitrocelulóza
PM	plazmatická membrána
PolySia	polysialová kyselina
PSP-I	kančí glykoprotein semenné plazmy
PVDF	polyvinylidenfluorid
SDS	dodecylsírán sodný (z ang. sodium dodecyl sulfate)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
SNA	<i>Sambucus nigra</i> lektin
TEMED	tetramethylethylendiamin
WGA	<i>Triticum vulgare</i> (Wheat germ) lektin
ZP	<i>zona pellucida</i>