

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Porovnání proteinového profilu spermií psů dvou  
příbuzných plemen**

**Diplomová práce**

**Bc. Andrea Svejková**

**Reprodukční biotechnologie**

**RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.**

**© 2024 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Porovnání proteinového profilu spermií psů dvou příbuzných plemen " 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 21. 4. 2024

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou vyjádřila své poděkování RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D., za její odborné vedení, neocenitelné rady a vstřícnost, které mi byly poskytnuty během celého procesu přípravy této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Janě Prokešové, která mi umožnila využít její chovné psi pro praktickou část mé studie. Speciální poděkování patří mé rodině a přátelům, kteří byli mou oporou během celého studia.

# Porovnání proteinového profilu spermií psů dvou příbuzných plemen

## Souhrn

Proteomika spermií poskytuje cenné informace o proteinových profilech a modifikacích, které jsou klíčové pro pochopení jejich fertilizačních funkcí a schopností. Hlavním cílem bylo detekovat a lokalizovat protein AKAP4, kvantifikovat úroveň fosforylace a sialylace proteinů a posoudit statistické rozdíly mezi dvěma geneticky příbuznými plemeny psů, australským ovčákem a miniaturním americkým ovčákem. Výsledky ukázaly úspěšnou detekci a lokalizaci AKAP4 u obou plemen, s variabilitou intenzity signálů, ale bez významných statistických rozdílů mezi plemeny. Protein byl primárně lokalizován v bičíku spermií. Dále byly identifikovány fosforylované proteiny ve třech různých molekulových hmotnostech, s významnými rozdíly ve fosforylaci u plemene australský ovčák. Fosforylované proteiny byly lokalizovány v ekvatoriálním segmentu hlavičky spermie. Sialylace proteinů, detekovaná pomocí lektinů MAL II a SNA, odhalila signifikantní rozdíly mezi plemeny v sialylaci spojené s vazbou  $\alpha$ -2,3 včetně rozdílných vzorů u obou plemen. Zaznamenána byla také variabilita sialylačních profilů spojených s vazbou  $\alpha$ -2,6, což může naznačovat plemenné variace v modifikacích proteinů spojených s možnými funkčními parametry spermií. Ty však nebyly potvrzeny jako statisticky významné. Tato studie také prokázala, že komplexní glykosylační profily, zjištěné pomocí lektinu WGA, nevykazují signifikantní rozdíly mezi plemeny, avšak byly výrazně zastoupeny v akrozomové oblasti hlavičky spermií. Studie byla zároveň doplněna o detekci proteinu  $\alpha$ -tubulin jako hlavního cytoskeletálního proteinu bičíku spermií a lokalizaci glykosylovaných molekul pomocí lektinu ConA s nejsilnějším signálem v akrozomové oblasti hlavičky. Předkládaná práce poskytuje důležitý základ pro další výzkum v oblasti reprodukční biologie psů a přispívá k lepšímu pochopení molekulárních mechanismů ovlivňujících reprodukční schopnosti, které by mohly být rozdílné mezi plemeny.

**Klíčová slova:** AKAP, fosforylace, sialoproteiny, imunofluorescence

# Comparison of the protein profile of spermatozoa from dogs of two related breeds

## Summary

Sperm proteomics provides valuable information on protein profiles and modifications that are key to understanding sperm fertilization functions and capabilities. The main objectives were to detect and localize the AKAP4 protein, quantify protein phosphorylation and sialylation levels, and assess statistical differences between two genetically related canine breeds, the Australian Shepherd and the Miniature American Shepherd. Results showed successful detection and localization of AKAP4 in both breeds, with variability in signal intensity but no significant statistical differences between breeds. The protein was primarily localized in the sperm flagellum. Furthermore, phosphorylated proteins were identified at three different molecular weights, with significant differences in phosphorylation in the Australian Shepherd breed. The phosphorylated proteins were localized in the equatorial segment of the sperm head. Protein sialylation, detected by MAL II and SNA lectins, revealed significant differences between breeds in sialylation associated with  $\alpha$ -2,3 binding, including different patterns in the two breeds. Variability in sialylation profiles associated with  $\alpha$ -2,6 binding was also observed, which may indicate breed variation in protein modifications associated with possible functional parameters of sperm. However, these were not confirmed to be statistically significant. This study also showed that the complex glycosylation profiles, as determined by the WGA lectin, did not show significant differences between breeds, but were strongly represented in the acrosomal region of the sperm head. The study was also complemented by the detection of  $\alpha$ -tubulin protein as the major cytoskeletal protein of the sperm flagellum and the localization of glycosylated molecules using ConA lectin with the strongest signal in the acrosomal region of the sperm head. The present work provides an important basis for further research in canine reproductive biology and contributes to a better understanding of the molecular mechanisms affecting reproductive performance, which might differ between breeds.

**Keywords:** AKAP, phosphorylation, sialoproteins, immunofluorescence

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Spermie</b>	<b>10</b>
3.1.1	Hlavička spermie	10
3.1.2	Krček spermie (spojovací část)	11
3.1.3	Bičík spermie	11
<b>3.2</b>	<b>Plazmatická membrána (PM)</b>	<b>12</b>
<b>3.3</b>	<b>Motilita spermíí</b>	<b>13</b>
<b>3.4</b>	<b>Metabolismus spermíí</b>	<b>14</b>
<b>3.5</b>	<b>Funkce vybraných proteinů ve spermii</b>	<b>15</b>
3.5.1	Proteinkináza A (PKA)	15
3.5.2	AKAP proteiny	17
3.5.3	Glykoproteiny a jejich detekce	19
<b>3.6</b>	<b>Proteomika a její využití ve výzkumu proteinů spermíí</b>	<b>20</b>
3.6.1	Proteomické cíle	21
3.6.2	Nejčastější techniky používané v proteomice	21
3.6.3	Detekce proteinů	22
3.6.4	Proteomika spermíí	24
<b>4</b>	<b>Metodika</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Odběr biologického materiálu</b>	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>Příprava vzorků</b>	<b>25</b>
<b>4.3</b>	<b>Western blot (WB)</b>	<b>26</b>
4.3.1	SDS – Elektroforéza	26
4.3.2	Přenos proteinů (Western blotting)	27
4.3.3	Imunodetekce proteinů	27
<b>4.4</b>	<b>Nepřímá fluorescence</b>	<b>28</b>
<b>4.5</b>	<b>Statistická analýza</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>Lokalizace AKAP4 proteinu a fosforylovaných a glykosylovaných molekul na psích spermíích</b>	<b>30</b>
<b>5.2</b>	<b>Proteinový profil psích spermíí</b>	<b>34</b>
5.2.1	Detekce AKAP4 v psích spermíích	34
5.2.2	Detekce $\alpha$ -tubulinu	36
<b>5.3</b>	<b>Detekce fosforylovaných proteinů v psích spermíích</b>	<b>37</b>
<b>5.4</b>	<b>Detekce sialovaných proteinů v psích spermíích</b>	<b>39</b>
5.4.1	Detekce sialových kyselin v glykoproteinech spermíí vázaných $\alpha$ -2,3	39

5.4.2	Detekce sialových kyselin v glykoproteinech spermií vázaných $\alpha$ -2,6....	42
5.4.3	Detekce sialových kyselin a N-acetylglukosaminu v glykoproteinech spermií	44
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>52</b>

# 1 Úvod

Studium spermií je zásadní pro pochopení reprodukčních mechanismů u živočichů. Spermie psů, stejně jako u jiných savců, jsou komplexní buňky, jejichž funkčnost je regulována mnoha proteiny a jejich modifikacemi. Zvláště důležitou roli v regulaci a zvýšení pohyblivosti spermií hraje hyperaktivace, která je nezbytná pro úspěšné proniknutí spermie do vajíčka.

V této práci se zaměříme na protein AKAP4, který hraje klíčovou roli v regulaci motility spermií a je nepostradatelným účastníkem kapacitace, jak zdůrazňuje studie Baldi et al. (1991). Dále se věnujeme fosforylaci a sialylaci proteinů a jiných molekul jako klíčových posttranslačních modifikací v savčích spermiích. Přestože výzkumy psích spermií nejsou tak časté jako studie zaměřené na jiné druhy, pomocí srovnání proteinových profilů spermií dvou příbuzných plemen psů můžeme lépe porozumět variabilitě mezi jedinci či plemeny a roli specifických proteinů v reprodukční biologii psů.



## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Byla stanovena vědecká hypotéza, která předpokládá, že existuje statisticky významný rozdíl v množství proteinu kotvícího proteinkinázu A (AKAP4), míře fosforylace a sialylace proteinů mezi jedinci dvou vybraných příbuzných plemen psů.

Cílem předkládané práce bylo:

- 1) Detekovat a lokalizovat protein AKAP4 jako možného fertilizačního markeru spermií
- 2) Detekovat a kvantifikovat fosforylované a sialované molekuly ve spermiích psů
- 3) Statisticky vyhodnotit rozdíly v množství AKAP4 proteinu, míře fosforylace a sialylace proteinů mezi jedinci dvou vybraných příbuzných plemen psů

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Spermie

Spermie patří mezi vysoce specializované buňky, které vznikají spermatogenezí v epididymu. Jejich specializací je nést genetickou informaci. Jsou haploidní, obsahují tedy pouze poloviční počet chromozomů (Varner & Johnson 2007). Během průchodu kanálky epididymu probíhá dozrávání a uložení spermií (Bertolla 2020; Trávník 2022). Jeden ze znaků dozrávání je ztráta cytoplazmatické kapky u většiny spermií. Dochází také k úpravě chromatinu, spojeným se zmenšováním hlavičky. Během transportu v epididymu dochází k dokončení kondenzace chromatinu vytvoření v rámci protaminů vazeb mezi komplexy DNA a protaminy (Trávník 2022).

Spermie savců se sice mohou morfologicky lišit, ale jejich struktura a stavba plazmatické membrány je velice podobná. Mezidruhové rozdíly jsou na první pohled patrné zejména v rozdílné ve velikosti (Teves & Roldan 2021).

England & Heimendahl (2011) uvádí, že psí spermie mají kulatý tvar hlavičky, která je dvojrozměrně zploštělá. Celková délka spermií u psa je kolem 70  $\mu\text{m}$ , přičemž hlava tvoří přibližně 10 % délky, střední část 20 % délky a ocas zbývajících 70 %.

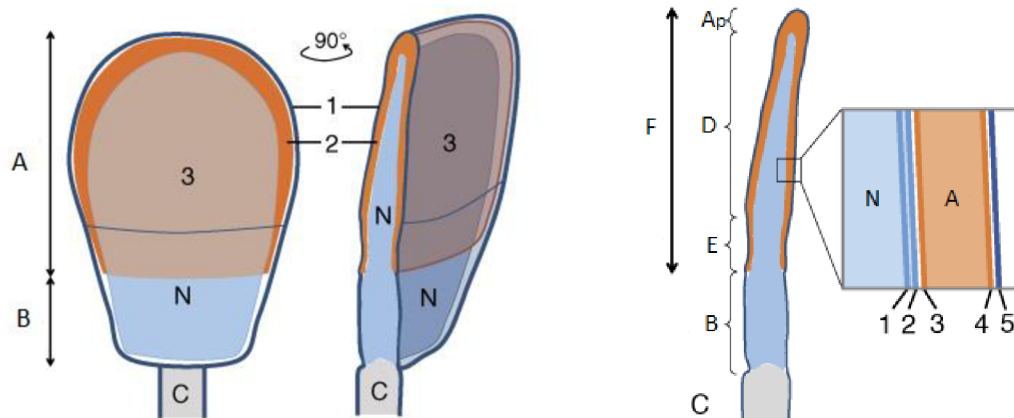
Přesná morfologie psích spermií je však předmětem široké diskuse a morfologické parametry se mohou lišit v závislosti na plemeni psa (Maree et al. 2010; Soler et al. 2017; Wysokińska et al. 2020).

#### 3.1.1 Hlavička spermie

Hlavička spermie obsahuje jádro s genetickým materiálem. Těsně nad jádrem, na předním konci, je jádro pokryto akrozomem, který zabírá asi 30–60 % spermie a obsahuje enzymy nezbytné pro vniknutí do *zony pellucidy* oocytu. Akrozom vzniká z Golgiho aparátu, který během spermiogeneze tvoří nepatrné proakrozomální vezikuly, které jsou nezbytné pro jeho formování. Mezi nejvýznamnější enzymy akrozomu řadíme například akrosin, glykosidázy, hyaluronidázu, neuraminidázu a mnoho dalších hydroláz, fosfatáz nebo esteráz. Funkčně je přední akrozom zapojený do akrozomové reakce, zatímco ekvatoriální segment je zapojen do fúze s oocytem (Tulsiani 2003).

Perinukleární théka je cytoskeletální proteinová vrstva, která obklopuje jádro spermií savců, s výjimkou připojení bičíku. Mezi akrozomem a jádrem spermie je tenký prostor, známý jako subakrozomový prostor. Tento prostor hraje podstatnou roli v regulaci formování akrozomu, akrozomové reakci a při přípravě chromatinu na dekondenzaci po vstupu do cytoplazmy vajíčka. Za akrozomem se nachází postakrozomální oblast (Schatten & Constantinescu 2017).

V přechodové části mezi hlavičkou a bičíkem spermie se nachází bazální tělísko. To sice není přímo součástí hlavičky spermie, nicméně je umístěno v její těsné blízkosti a je tak zodpovědné za vývoj a zakotvení bičíku spermie (Shukla 2011).



**Obrázek 1** Hlavička spermie psa převzato a upraveno (Schatten & Constantinescu 2017)

*A – akrozomová oblast, Ap – apikální segment, B – postakrozomální segment, C – spojovací část bičíku, D – hlavní segment, E – ekvatoriální segment, F – periakrozomální doména, N – jádro, 1 – vnitřní jaderná membrána, 2 – vnější jaderná membrána, 3 – vnitřní akrozomová membrána, 4 – vnější akrozomová membrána, 5 – plazmatická membrána*

### 3.1.2 Krček spermie (spojovací část)

Krček spermie je morfoloicky komplikovaná struktura, která spojuje spermii s bičíkem v místě zvaném spojovací region. Zpravidla je spojovací region umístěn centrálně na bázi hlavičky (Shukla 2011; Schatten & Constantinescu 2017).

Spermatické buňky obsahují centrioly, které se podílejí na dělení buněk tvorbou mitotických vřetének. Během přeměny ze spermatidy na spermii se centrioly dostávají do kontaktu s jádrem spermatidy a vedou k vytvoření implantační jamky v jádře. Tvorba bičíku je iniciována z distální centrioly, zatímco proximální centriola je prostřednictvím bazální destičky upevněna v implantační jamce a je obklopena segmentální implantační destičkou (Shukla 2011).

### 3.1.3 Bičík spermie

Bičík je nepostradatelnou součástí spermie. Zajišťuje pohyb a transport spermie v pohlavním traktu samice. Je rozdělen na střední, hlavní a koncovou část. Střední část je přiléhající k hlavičce a vyznačuje se přítomností mitochondriální pochvy. Hlavní část zabírá přibližně tři čtvrtiny délky bičíku, zatímco koncová část je krátký segment na špičce bičíku (Miki et al. 2002).

Hlavní část bičíku spermie, známá jako axonema, je charakteristická svou strukturou „9+2“. Skládá se ze dvou centrálních tubulů, které mají tubulární, neboli dutý, trubicový tvar a z prstence devíti periferních fibrilárních dubletů, které mohou mít nejen tubulární charakter, ale i kompaktní charakter ve smyslu pevnějšího uspořádání (Shukla 2011).

Střední část bičíku je ve srovnání s hlavní částí silnější v důsledku přítomnosti mitochondriální šroubovice složené z řetězce prodloužených mitochondrií. Pod střední částí je hlavní část obklopena vláknitým pláštěm. (Shukla 2011; Schatten & Constantinescu 2017).

### 3.2 Plazmatická membrána (PM)

PM spermii je komplexní, heterogenní, dynamická dvouvrstvá struktura, jež pokrývá celý povrch spermie a je zásadní pro úspěšné oplození (Flesch & Gadella 2000). Tvoří jí zejména fosfolipidy, které vytvářejí dvojvrstvu – s hydrofobními konci orientovanými dovnitř a hydrofilními konci orientovanými ven, dále pak cholesterol a proteiny. Obvykle jsou tyto lipidy rozmístěné ve dvojvrstvě asymetricky (Friend 1982).

Unikátním rysem spermii je rozdělení jejich PM do definovaných segmentů, lišících se složením i funkcí, což souvisí s napojením konkrétní oblasti na cytoskeletální struktury spermie. To může zahrnovat specifické receptorové oblasti na membráně, které se zapojují do buněčné signalizace, připojení k mikrotubulům pro regulaci pohybu bičíku, nebo interakci s aktinovými filamenty pro změny ve struktuře během fertilizace. Tím tyto specializované segmenty PM a jejich připojení k cytoskeletu umožňují spermii plnit efektivně její hlavní funkci. (Johnson & Everitt 2007).

PM spermie se skládá celkově ze čtyř segmentů – apikální čepička, preekvatoriální, ekvatoriální a postakrozomální segment. Každý segment tak hraje klíčovou roli při fertilizaci. Apikální čepička se navazuje na zona pellucida a společně s preekvatoriálním segmentem hraje důležitou roli při akrozomální reakci (Gadella et al. 2008). Ekvatoriální segment je významný pro vazbu s oolemou (plazmatická membrána oocyty) a následným splynutím obou gamet (Ellis et al. 2002; Gadella et al. 2008).

Během průchodu nadvarletem se PM spermii formuje, což je spojováno s nabýváním pohyblivosti a schopnosti fertilizace. Tento proces zahrnuje příjem glykoproteinů, odstranění nebo využití fosfolipidů, úpravou již existujících glykoproteinů a přesun proteinových i lipidových komponent do různých membránových domén. Úpravy PM jsou pečlivě koordinovány v různých zónách nadvarlete a tím nepřímo ovlivňují i vnitrobuněčné membrány a orgány, včetně nukleoproteinů. V hlavě nadvarlete dochází k příjmu a počátečním modifikacím glykoproteinů. V těle nadvarlete probíhají rozšířené modifikaci glykoproteinů a reorganizace lipidových a proteinových komponent, což zvyšuje funkční schopnosti spermie pro interakci s oocytem. V ocasu nadvarlete se spermie skladují a dochází k finálním úpravám PM, které jsou důležité pro udržení viability a pohyblivosti spermii až do momentu ejakulace (Jones 1998).

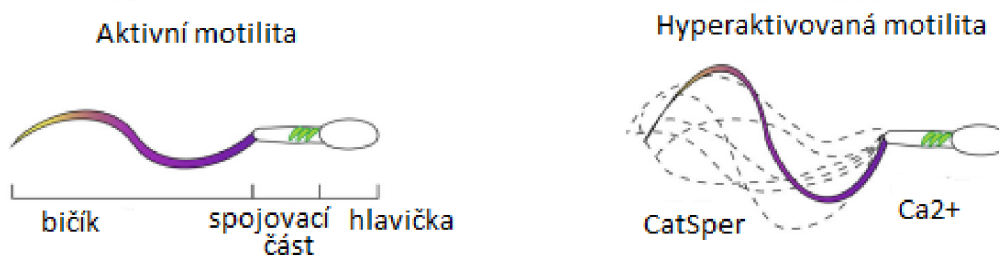
Lucio et al. (2017), při svém výzkumu odhalil, že motilní spermie mají ve své PM vysokou frekvenci několika fosfolipidů, jako jsou fosfatidylcholin a fosfatidylethanolamin s různými délkami a stupni nenasycenosti mastných kyselin. Naopak v astenospermii (nedostatečně pohyblivé spermie) nebyly identifikovány žádné konkrétní lipidové markery. Tato zjištění tedy naznačují, že rozdíly v lipidovém uspořádání membrány mezi vzorky motilními a vzorky spermii se sníženou motilitou jsou klíčové pro určení motility spermii, jejich funkčnosti a odolnosti vůči oxidačnímu stresu.

### 3.3 Motilita spermií

Aktivita spermií se projevuje koordinovanými mechanickými pohyby. Schopnost tohoto pohybu získává spermie při průchodu nadvarletem a musí k tomu mít k dispozici plně funkční bičík se schopností produkovat energii pro jeho pohyb (Freitas et al. 2016). Pohyby bičíku spermií jsou poháněny metabolickými procesy produkujícími energii a regulovány komplexní sítí signalizačních drah. Hlavní roli přitom hrají modifikace molekuly izoformy fosfoprotein proteázy 1 (PP1) (Freitas et al. 2016; Trávník 2022).

PP1 je důležitým enzymem serin/threoninové fosfatázy, který se podílí na široké škále buněčných procesů a vyskytuje se v buňce jako oligomerní komplex. Katalytická podjednotka PP1 se váže na řadu interagujících proteinů, tzv PP1 interagující proteiny, které mění její intracelulární lokalizaci a specifickou substrátu. PP1 je zásadní pro regulaci pohyblivosti spermií, a to především prostřednictvím jejich interakcí s inhibitorovými proteiny a A-kináza kotvícími proteiny (Fardilha et al. 2011).

Rozlišujeme dva typy pohybu spermií, aktivní a hyperaktivní (**Obrázek 2**). Aktivní pohyb je charakteristický pro čerstvě ejakulované spermie. Má malý rozkmit, podél bičíku se šíří symetrické krouživé vlny, výsledkem je lineární pohyb spermie. Hyperaktivní pohyb nastává po kapacitaci spermií. Charakterizuje se asymetrickým pohybem bičíku s velkým rozkmitem, jenž způsobí pohyb po zakřivených trajektoriích. Hyperaktivní pohyb slouží k uvolnění spermií z epitelu oviduktu, usnadnění pohybu proti proudu oviduktní tekutiny a k usnadnění průniku přes *zona pellucida* (Trebichalská & Holubcová 2020; Trávník 2022). Pohyb bičíku je regulován hladinou vápenatých iontů  $Ca^{2+}$  ty působí přímo v cytoskeletálních komponentách bičíku a regulují pohyb spermií (Bannai et al. 2000; Ho et al. 2002). Pohyb bičíku se dále reguluje cestou proteinkinázy A závislé na cAMP (Trebichalská & Holubcová 2020; Trávník 2022). Podstatnou roli v signalizaci  $Ca^{2+}$  hraje také kanál CatSper (Trebichalská & Holubcová 2020).

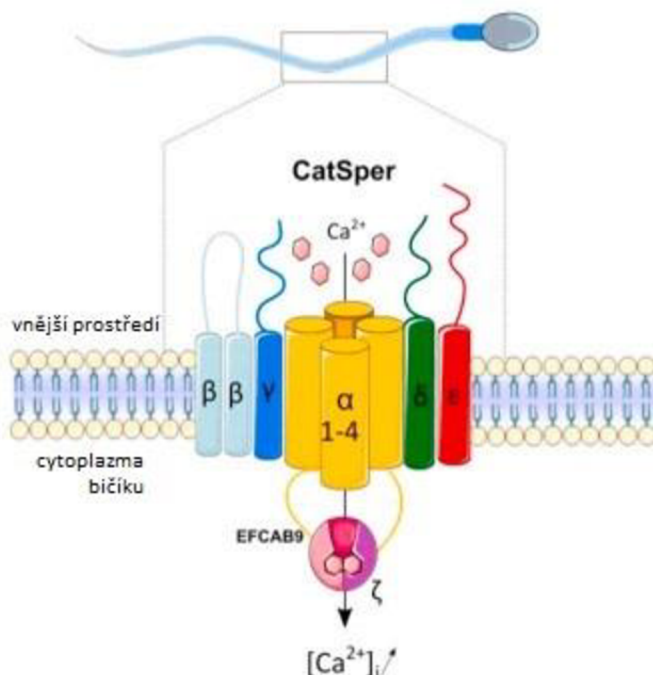


**Obrázek 2** Motilita spermií převzato a upraveno (Trebichalská & Holubcová 2020)

*Progesteronem indukovaná aktivace CatSper kanálu v alkalickém prostředí umožňuje rychlý příliv  $Ca^{2+}$ , který spolu s mobilizací  $Ca^{2+}$  ze zásobních organel zvyšuje intracelulární  $Ca^{2+}$ , a tím vytváří hyperaktivovanou motilitu spermií.*

CatSper je iontový kanál (**Obrázek 3**) v PM, který reaguje na změny napětí, pH a má vysokou afinitu k bivalentním kationtům (Kirichok et al. 2006). Tento komplexní multiprotein se skládá ze čtyř hlavních proteinů tvořící póry CatSper1 – 4 a pěti pomocných podjednotek, které jsou u savců kódovány minimálně devíti různými geny (Chung et al. 2017; Trávník 2022).

Hyperaktivovaná motilita spermie je zahájena, když ionty vápníku vstoupí do spermie pomocí tohoto specifického proteinu (Chung et al. 2017).



**Obrázek 3** Struktura iontového kanálu CatSper převzato a upraveno (Rahban & Nef 2020)

Kanál CatSper se nachází v hlavní části bičičku a skládá se ze čtyř pórů ( $\alpha$  1–4) a také pěti podjednotek ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\epsilon$ ). Poměrně nedávno objeveným členem komplexu CatSper byl identifikován protein EFCAB9, který váže  $\text{Ca}^{2+}$  a funguje jako duální senzor vápníku a pH pro CatSper.

### 3.4 Metabolismus spermíí

Stejně jako u jiných buněk potřebuje i spermie energii dodávanou adenosintrifosfátem (ATP). Tato energie ve formě ATP je důležitá pro funkci aktivního transportu látek, pohybu spermie, pro proces kapacitace, akrozomální reakce (AR) a další. Spermie tak může získávat ATP dvěma metabolickými cestami, a to glykolýzou anebo oxidativní fosforylací. Zatímco oxidativní fosforylace probíhá v mitochondriích středního dílu spermie, glykolýza probíhá v hlavičce a bičičku spermie. Metabolismus v mitochondriích je efektivnějším zdrojem ATP v porovnání s glykolýzou, avšak difuze ATP z mitochondrií do bičičku nestačí pro zajištění energie pro pohyb spermie (Trávník 2022). Zralé savčí spermie obsahují přibližně 72–80 mitochondrií (Rajender et al. 2010) a tak mohou teoreticky produkovat více než 30 molekul ATP na molekulu glukózy (Hereng et al. 2011).

Glykolýza je proces, při kterém se glukóza přeměňuje na pyruvát. Během tohoto procesu se uvolňuje energie ve formě ATP a NADH s bilancí dvě molekuly ATP na glukózu. Když jsou spermie zbaveny glukózy (počáteční jednotka glykolýzy) nebo když je glykolýza zablokována, obsah ATP a fosforylace proteinů (konkrétně cSrc a Fyn) na tyrosinu klesá. Následně spermie vykazují sníženou motilitu (Hereng et al. 2011).

Oxidativní fosforylace je složitější proces. Skládá se ze dvou dějů odehrávajících se na úrovni vnitřní mitochondriální membrány spojené s respiračními řetězci a ATP syntézy. Během ní vznikne 30 molekul ATP z jedné molekuly glukózy, oxidativní fosforylace je tedy patnáctkrát účinnější než glykolýza. Jejím limitujícím faktorem je ovšem dostupnost adenosindifosfátu (Trávník 2022).

## 3.5 Funkce vybraných proteinů ve spermii

### 3.5.1 Proteinkináza A (PKA)

Proteinkináza A (PKA) je enzym patřící do rodiny serin/treoninkináz. Tato rodina enzymů reguluje různé buněčné procesy tím, že fosforyluje (tj. přidávají fosfátovou skupinu) cílové proteiny. Inaktivní PKA je tetramerní enzym složený ze dvou katalytických (C) podjednotek a dvou regulačních (R) podjednotek. V neaktivním stavu se C podjednotky vážou na R podjednotky, což zabraňuje jejich aktivaci. K aktivaci PKA dochází, pokud se na R podjednotky navážou molekuly cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Tím dojde k uvolnění podjednotek a aktivaci enzymu (Clegg et al. 1992).

PKA existuje ve dvou hlavních izoformách s různými R podjednotkami, RI a RII, každá s alfa a beta podjednotkami a tyto funkčně neredundantní izoformy jsou primárním mechanismem pro dosažení specifity v signalizaci PKA (Clegg et al. 1992; Viste et al. 2005). Bylo zjištěno, že podjednotka RI převládá v mnoha buňkách s rychlou proliferací, rychlým růstem velikosti buněk nebo maligně transformovanými buňkami. Důležitým rozdílem mezi RI a RII je jejich relativní afinita pro kotvící proteiny, které omezují PKA typu II a v některých případech PKA typu I na subcelulární kompartmenty. Dalším nápadným rozdílem je schopnost PKA typu II, ale ne typu I, autofosforylovat se (Viste et al. 2005).

Specifičností rodiny PKA je dosaženo expresí specifických izoform a sestřihových variant podjednotek C a R v různých tělesných tkáních. Navíc velká a různorodá rodina proteinů kotvících kinázu A (AKAP z angl. A-Kinase Anchoring Proteins), které cílí na R podjednotky do určitých subcelulárních lokalit, pomáhá umístit holoenzym (aktivní molekula enzymu složená z bílkovinné složky – apoenzym a nebílkovinné složky – kofaktor) PKA do těsné blízkosti jeho substrátů (Pawson & Scott 1997).

Podjednotka C je hlavní funkční složka PKA, která se uvolňuje, když se cAMP naváže na podjednotku R PKA a poté fosforyluje zásadní substráty, aby spustil kaskádu signálních událostí uvnitř buňky, což indukuje velké konformační změny v R podjednotce (Taylor et al. 2005; Kim et al. 2007). To zase usnadňuje disociaci a aktivaci C podjednotek, které jsou volné pro fosforylaci proteinových substrátů (Shabb 2001). U savců aktivace PKA zvyšuje frekvenci pohybu bičíku, čímž dochází také k hyperaktivaci spermie a fosforylaci tyrosinu především proteinů bičíku. Tato modifikace proteinů se pojí se změnami na plazmatické membráně a přípravou spermií na akrozomovou reakci (Burton & Mcknight 2007).

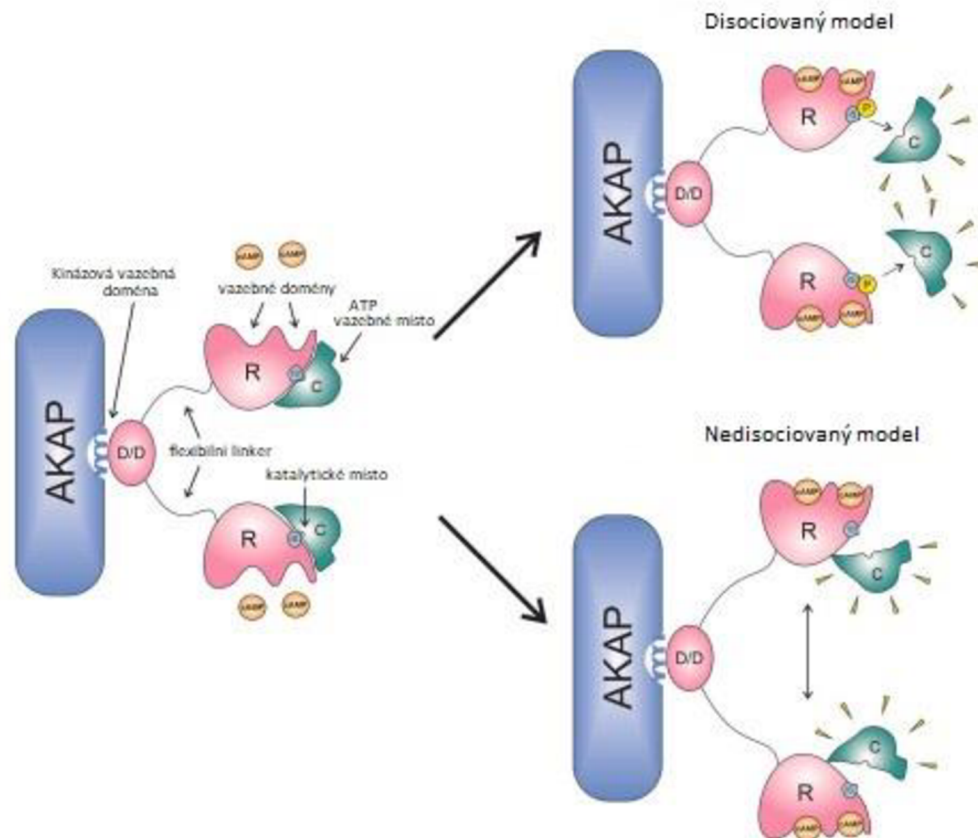
Při studii Skálhegg et al. (2002) vedla nulová mutace katalytické podjednotky PKA u myši k samčí sterilitě, přičemž spermie postrádaly pohyblivost a nebyly schopné oplodnění. Ve spermatu skotu PKA fosforyluje mitochondriální proteiny, tím reguluje produkci ATP, což souvisí s pohyblivostí spermií (Mizrahi & Breitbart 2014). Tash (1989) zjistil, že fosforylace

axonemálního dyneinu v bičíku spermie byla závislá na PKA, což se zdálo být kritickým bodem v regulaci motility bičíku.

Je známo, že pohyb bičíků spermií je regulován intracelulárními mediátory cAMP, vápníkem a pH (Cooper 1986). cAMP, neboli cyklický adenosinmonofosfát, je druhým poslem v mnoha typech buněk, včetně spermií. Funguje jako signální molekula, která přenáší signály z buněčného povrchu dovnitř buňky. Ve spermiích se cAMP podílí na řadě procesů, ale nejvíce ovlivňuje pohyblivost spermií a proces kapacitace (Morgan et al. 2008). Signální molekuly se vážou na receptory na povrchu spermií. Toto navázání aktivuje enzym zvaný adenylátcykláza, který přeměňuje ATP na cAMP. cAMP poté funguje jako klíč, který odemká nebo aktivuje PKA. PKA je ve své neaktivní formě komplex složený ze dvou regulačních a dvou katalytických podjednotek (Lodish et al. 2016). V neaktivním stavu R PAK (Corbin et al. 1975) blokuje C PKA (Zimmermann et al. 1999). Když se cAMP váže na R PKA, dochází k disociaci komplexu a uvolnění C PKA, které jsou nyní aktivní. Aktivní katalytické jednotky PKA mohou v této chvíli fosforylovat (přidat fosfátovou skupinu) na specifické cílové proteiny ve spermiích (Berg et al. 2015). Proces může aktivovat nebo deaktivovat tyto proteiny, což vede k řadě reakcí, jako je zvýšení pohyblivosti spermií, změny ve struktuře spermií připravujících se na oplodnění a další (Lodish et al. 2016).

PKA hraje nepostradatelnou roli v regulaci pohyblivosti spermií tím, že ovlivňuje složení a funkci bičíku, což umožňuje správnou motilitu spermie. Během kapacitace PKA také fosforyluje proteiny ve spermiích, což vede k biochemickým změnám potřebným pro akrozomální reakci – proces, při kterém je uvolněn obsah akrozomu, což umožňuje spermiím proniknout vnějšími obaly vajíčka a oplodnit ho (Graf et al. 2020). cAMP a PKA spolupracují ve spermiích, aby umožnily pohyblivost a připravily spermii na oplodnění. Ve skutečnosti jsou tyto procesy mnohem souhrnnější a obsahují mnoho dalších molekul a regulačních mechanismů (Berg et al. 2015).





**Obrázek 4** Schematické znázornění aktivace holoenzymu PKA. Převzato a upraveno (Graf et al. 2020)

Schéma ukazuje tradiční a nové mechanické modely aktivace PKA. Disociační model označuje uvolnění C PKA po navázání cAMP na R PKA. Fosforylační místo v sekvenci inhibitoru (IS) uvolňuje C PKA a získává svůj aktivní stav. V nedisociačním modelu vazba cAMP na R PKA podporuje konformační změnu, při které holoenzym PKA zůstává intaktní, ale aktivní a zároveň proximální k místům ukotvení a substrátům.

### 3.5.2 AKAP proteiny

AKAP proteiny neboli A-kinázy vázající proteiny jsou skupinou proteinů, které jsou schopné vázat PKA na specifických místech v buňce. Jednotlivé druhy těchto proteinů jsou často specializované na určité buněčné procesy a mohou být exprimovány v různých tkáních i buňkách. Funkcí AKAP je schopnost vytvářet víceproteinové signalizační komplexy. Do těchto komplexů je zapojena fosfodiesteráza, která reguluje koncentrace cAMP, a tím ovlivňuje signální dráhy cAMP/PKA (Jarnæss & Taskén 2007). Součástí komplexů s AKAP mohou být také fosfatázy nebo malé G-proteiny (Skroblin et al. 2010).

AKAP4, zpočátku syntetizovaný jako prekurzor proAKAP4, je protein, který má schopnost vytvářet komplex s PKA a umožňuje lokalizaci PKA. Tato interakce umožňuje PKA provádět fosforylaci cílových proteinů ve správných částech spermie, což je velice důležité pro regulaci buněčných procesů spojených s motilitou spermii a dalšími kroky procesu oplodnění (Johnson et al. 1997). Tento protein je hlavní součástí fibrózního pouzdra bičíku spermie, což

je místo s velkou koncentrací mitochondrií, kde se vytváří důležitá energie pro motilitu spermií. AKAP4 je pro tento segment velice specifický, pohyblivosti spermií a také kapacitací a plodností (Miki et al. 2002; Couazer & Bencharif 2021)

Proteiny cytoskeletu, kinázy, fosfatázy a fosfodiesterázy tvoří signální mechanismus, který reguluje motilitu prostřednictvím jejich interakce a koordinace. Tato aktivace se pojí s AKAP4, který má na starosti lokalizovanou produkci cAMP (Ficarro et al. 2003; Huang et al. 2005). Protein AKAP4 se podílí na expresi a regulaci motility spermií. Je zásadním účastníkem transdukčního signálu PKA a přitom podporuje klouzání doletů mikrotubulů. Je důležitým účastníkem kapacitace, tato událost závisí na mechanismu intracelulární signalizace včetně přítoku vápníku a fosforylace tyrosinových zbytků na bičkových proteinech (Baldi et al. 1991). Sekundární messengery, včetně cAMP, hrají důležitou roli v přenosu signálu pro hormony a neurotransmitery. cAMP, který je syntetizován z ATP prostřednictvím AC, se podílí na řadě buněčných procesů, jako je růst, diferenciaci a přežití buněk. Tyto enzymy jsou regulovány heterotrimerními G-proteiny nebo komplexem  $Ca^{2+}$ /kalmodulin v odpovědi na aktivaci buněčných povrchových receptorů. Zprostředkování aktivace cAMP je realizováno dvěma mechanismy: PAK a proteinem Epac (Liu et al. 2020). AKAP4 jsou aktivně fosforylovány na svých tyrosinových a serinových zbytcích během kapacitace. A pravděpodobně jsou ukazatelem stavu kapacitace (Turner et al. 1999; Ficarro et al. 2003). AKAP4 je jedinečný mezi AKAP proteiny, protože má specifickou vazebnou doménu pro RI-regulační podjednotku PKA, což je odlišné od prototypové RII vazebné domény. AKAP4 má také další doménu, která může vázat buď RI nebo RII podjednotky. Tato dualita ve vazebné schopnosti umožňuje AKAP4 flexibilitu v lokalizaci a funkci PKA v buňce, což je důležité pro správnou regulaci buněčných signalizačních drah (Vijayaraghavan et al. 1997). Schopnost AKAP4 vázat RI podjednotky má zásadní význam, protože RI orientované AKAP jsou méně běžné a mohou zprostředkovat specifické cílení a funkce PKA, které nejsou dosažitelné pro AKAP vázající pouze RII. To znamená, že AKAP4 může zprostředkovávat specifické signální události, které jsou závislé na typu I PKA, což může být kritické pro určité fáze spermatogeneze a kapacitace spermií, kde je regulace PKA rozhodující (Jarnaess et al. 2008). Tato specifická interakce a lokalizační flexibilita činí AKAP4 významným hráčem v regulaci spermiální funkce a potenciálně i dalších buněčných procesů, kde je PKA zapojena. Toto zjištění podtrhuje význam správného porozumění jednotlivým funkcím AKAP proteinů a jejich interakcí s PKA podjednotkami pro pochopení buněčné signalizace a regulace (Huang et al. 1997).

Výzkum provedený Miki et al. (2002) u kanců odhalil, že protein AKAP4 je nezbytný pro udržení struktury a funkce fibrózního pouzdra spermií. Jeho absence vede k narušení efektivní motility spermií, což je způsobeno nedostatečnou signalizací mezi enzymy, které zajišťují energii pro pohyb spermií. Tento nálezný je podpořen dalším výzkumem, který identifikoval specifické formy AKAP4. Couazer & Bencharif (2021) detekovali u psích spermií pomocí protilátky anti-AKAP4 (klon 7E10) molekulovou hmotnost 100 kDa pro nezralý AKAP4 a 82 kDa pro zralý AKAP4. Tyto proteiny byly identifikovány ve spermatické frakci psů a v ejakulátu kance, což naznačuje, že AKAP4 má konzistentní a kritickou roli ve vývoji a funkci spermií napříč druhy. Tyto poznatky zdůrazňují význam AKAP4 v regulaci reprodukční schopnosti a poskytují důležitý základ pro další výzkum vlivu tohoto proteinu.

### 3.5.3 Glykoproteiny a jejich detekce

Všechny buněčné povrchy v přírodě jsou pokryty glykokalyxem, což je hustá vrstva složená z oligosacharidů a polysacharidů připojených ke glykoproteinům a glykolipidům (Varki et al. 2009). Spermie jsou obaleny glykokalyxem, který je bohatý na sialové kyseliny (Sia), což jsou deriváty devítiuhlíkaté kyseliny neuramidové, běžně se vyskytující na površích a v sekretech savčích buněk (Schauer 1982). Tyto kyseliny mají klíčovou roli v mnoha biologických funkcích, od strukturálních a funkčních aspektů založených na jejich negativním náboji po účast v molekulárním rozpoznávání během vývoje, imunitní regulaci a karcinogenezi (Carlin et al. 2009). Existuje přes padesát různých forem Sia, ale dvě nejběžnější formy u savců jsou N-acetylneuraminová kyselina (Neu5Ac) a N-glykolylnneuraminová kyselina (Neu5Gc) (Varki 2009). Běžné typy vazeb Sia na základní glykanové řetězce zahrnují Sia  $\alpha$ 2-3 a Sia  $\alpha$ 2-6 (Chen & Varki 2010). Sia byly identifikovány na zralých spermiích, každá spermie obsahuje desítky milionů molekul Sia (Ghaderi et al., 2011). Hrají důležitou roli v buněčném rozpoznávání během infekcí, vývoje a regulace imunitních reakcí (Varki et al. 2009). Bylo zjištěno, že vyšší množství Sia na savčích spermiích má pozitivní vliv na ochranu proti fagocytóze, ale zároveň negativně ovlivňuje schopnost vazby spermií na zona pellucida oocyty (Bernal et al. 1980; Ritter et al. 1987; Toshimori et al. 1991). Tollner et al. (2008) zmiňují, že Sia usnadňují spermiím průchod cervikálním hlenem, umožňují jejich adhezi k epitelu vejcovodu a tím se podílejí na tvorbě ovidukálního rezervoáru.

Sia se často nachází na koncích glykanových řetězců a mají negativní náboj. Díky tomu získávají určité biochemické vlastnosti, které ovlivňují interakci s dalšími molekulami, včetně lektinů. Lektiny lze definovat jako proteiny neimunního původu, schopných reverzibilně se vázat na specifické monosacharidy nebo oligosacharidy prostřednictvím nekatalytické domény (Peumans & Van Damme 1995; Song 1999). Díky svým vlastnostem se lektiny využívají k detekci glykokonjugátů. Tato schopnost umožňuje lektinům hrát zásadní roli v buněčné signalizaci, adhezi buněk, imunitní odpovědi, ale také v procesech rozpoznávání patogenů hostitelem (Song 1999). Lektiny na spermiích tak mohou sloužit jako molekulární "klíče", které umožňují spermiím navázat na "zámky" ve formě glykanů na povrchu vajíčka. Bylo zjištěno, že lektiny hrají také podstatnou roli v kapacitaci spermií, a to především regulací interakcí mezi spermiemi a jejich mikroprostředím (Peumans & Van Damme 1995).

Poznatky o tom, že lektiny se vyskytují nejen v rostlinné, ale i v živočišné, bakteriální a virové říši, vedly k jejich kategorizaci do několika skupin (Čtvrtníčková 2009). Lektiny jsou rozděleny do pěti hlavních skupin podle monosacharidů, které rozpoznávají v sacharidových strukturách: lektiny vázající manózu, fukózu, N-acetylglukosamin, galaktózu/N-acetylgalaktosamin a N-acetylneuraminovou Sia kyselinu (Brůnová 2008). Vazbu  $\alpha$ -D-glukózy a  $\alpha$ -D-mannózy v glykanech lze charakterizovat pomocí lektinu Concanavalin A (ConA), získaného z fazoly *Canavalia ensiformis* (Cavada et al. 2018). Pro detekci vazby N-acetylglukosaminu (GlcNAc) a neuraminových kyselin, základních složek buněčných glykoproteinů a glykolipidů, je specificky využíván lektin Wheat Germ Agglutinin (WGA), pocházejícího z pšeničného klíčku (*Triticum vulgare*) (Balcan 2016). Vazbu  $\alpha$ -2,6-vázaných sialových kyselin na glykoproteiny rozpoznává Sambucus Nigra Agglutinin (SNA), který je extrahován z bezu černého (*Sambucus nigra*) (Linman et al. 2008). Jiný typ vazby sialových

kyselin  $\alpha$ -2,3-vázaných v glykoproteinech a glykolipidech lze identifikovat pomocí Maackia Amurensis Lectin II (MAL II), získaný z rostliny *Maackia amurensis* (Linman et al. 2008). Zmíněné lektiny (*Tabulka 1*) byly využity pro detekci glykosylací molekul v psích spermích v naší práci.

Lektin	Celý název	Původ	Specifita
ConA	Concanavalin A	Canavalia ensiformis	$\alpha$ -D-mannopyranosyl, $\alpha$ -D-glukopyranosyl
WGA	Wheat Germ agglutinin	Triticum vulgare	N-acetylglukosamin
SNA	Elderberry lectin	Sambucus nigra	$\alpha$ -2,6-vázané Sia
MAL II	Maackia amurensis lectin II	Maackia amurensis	$\alpha$ -2,3-vázané Sia

*Tabulka 1 Původ a specifita lektinu dostupné z („Lectins“).*

### 3.6 Proteomika a její využití ve výzkumu proteinů spermíí

Proteomika je vědecký obor propojený s biologií, který se zabývá studiem všech proteinů v biologických systémech jako je buňka, tkáň či celý organismus a jejich vlastními funkcemi (Chmelík 2005). Slouží spolu s dalšími doplňujícími analytickými metodami k nezbytným součástem rozvíjejícího přístupu tzv systémové biologie, který usiluje o komplexní popis biologických systémů prostřednictvím interakce různých typů dat a umožňuje počítačové simulace složitých biologických systémů (Patterson & Aebersold 2003).

Stejně tak, jako geny tvoří genom, tak i proteiny tvoří proteom. Termín proteom (protein complement of the genome) poprvé použil Mark Wilkins v roce 1994 na konferenci v Sieně (Wilkins et al. 1996). Novodobému rozvoji proteomiky napomáhá především nepřetržitý vývoj Orbi trapu (což je hybridní hmotnostní spektrometr), který je neustále zdokonalován a tím přináší nové možnosti analýzy (Eliuk & Makarov 2015).

Proteomika zkoumá kompletní soubor proteinů v daném biologickém systému. Identifikuje všechny přítomné proteiny. Analyzuje strukturu proteinů a jejich změny, včetně různých forem modifikací, které mohou ovlivňovat jejich funkci. Pomáhá porozumět funkci jednotlivých proteinů a jejich interakcím s dalšími molekulami proteinů, DNA, RNA a zjistit, jak se tyto interakce podílí na biologických procesech (Pandey & Mann 2000). Studuje také regulaci proteinové exprese a jejich změny v čase a různých podmínkách, což pomáhá pochopit dynamiku buněčných procesů. Identifikuje změny v proteomech spojené s onemocněním, a to může poskytovat důležité informace pro diagnostiku, prognózu a vývoj léčiv (Lim & Elenitoba-Johnson 2004).

### 3.6.1 Proteomické cíle

Hlavním cílem proteomiky je porozumět a popsat strukturu, funkce a interakce proteinů v buňkách (Chmelík 2005). Existuje hned několik důvodů, proč je proteomika tak důležitým vědním oborem. Jedním z nich může být identifikace proteinů v daném biologickém vzorku, která umožňuje vytvoření proteomických map a ty poskytují obecný přehled o exprimovaných proteinech (Aebersold & Mann 2003). Post-translační modifikace (PTM), mezi které zahrnujeme fosforylace, glykosylace, acetylace, ubiquitinace a další. Jsou to modifikaci, jež zásadně ovlivňují funkci proteinů a tím mohou měnit i jejich stabilitu, aktivitu, lokalizaci a interakci. Jsou tedy nezbytné k pochopení regulace a funkčních změn proteinů (Jensen 2006). Ve většině případů fungují interakce mezi proteiny ve složitých sítích dalších interakcí a tím koordinují buněčné procesy, mapování umožňuje odhalit mechanismy signálních drah a identifikovat nové biologické cesty (Gavin et al. 2002). Dynamika proteinové exprese studuje změny v expresi proteinů v rozdílných podmínkách a zjišťuje, jak se buňky přizpůsobují změnám v prostředí (Gygi et al. 1999). Subcelulární lokalizace určuje, na jakém místě se daný protein nachází, což je nezbytné pro pochopení jeho funkce. Tyto proteiny mohou být umístěny v různých buněčných organelách a kompartmentech, kde plní svou roli (Foster et al. 2006). Funkční analýzy objasňují funkce, kterou hrají v biologických procesech. Jsou nezbytné pro biomedicínský výzkum (Tyers & Mann 2003). Biomarkery pro diagnostiku a prognózu identifikují proteiny a PTM. Jsou specifické pro určité stavy nebo onemocnění a to může vést k vývoji nových biomarkerů pro diagnostiku, prognózu a sledování účinnosti léčby (Dias et al. 2016). Identifikace proteinů hraje také klíčovou roli v patogenezi onemocnění a tím umožňuje k vytváření nových terapeutických strategií, podporuje tak vývoj nových léčiv a terapeutických postupů (Schirle & Jenkins 2016). Studie odolnosti a citlivosti k léčbě mohou odhalit různé mechanismy, které stojí za citlivostí nebo rezistencí vůči léčbě a tím umožňují personalizovaný přístup k léčbě a vývoji účinnějších terapeutik (Paul & Kumar 2018). Srovnávání proteomů mezi různými organismy v různých evolučních stádiích přináší pochopení evoluční konzervace proteinových funkcí a drah. Toto srovnání odhaluje základní biologické mechanismy a poskytuje nové pochopení vývoje života (Koonin & Galperin 2003).

### 3.6.2 Nejčastější techniky používané v proteomice

V proteomice se využívá rozdílných technik, které se často kombinují pro komplexní analýzu proteinů a poskytují tak důležité informace o proteomech všech buněčných a tkáňových systémů. Mezi často používané techniky patří elektroforéza. Patří mezi soubor separačních metod, které využívají stejnosměrného elektrického pole. Elektroforéza tak umožňuje separaci látek na základě jejich odlišné elektroforetické mobility. To znamená, že rozdělí nabitě molekuly (ionty) pomocí jejich rozdílné pohyblivosti. Dvourozměrná elektroforéza (2-DE) rozděluje proteiny dle izoelektrického bodu a poté dle molekulové hmotnosti. Rozlišuje tak tisíc proteinů v jednom vzorku a využívá se především pro srovnávací studie (Görg et al. 2004). Modernizovanější verze 2-DE je Diferenciální elektroforéza (DIGE). Proteiny se značují různými fluorescenčními barvivy před separací na jednom gelu, což umožňuje přesnější kvantifikaci a srovnávání proteinových profilů (Unlu et al. 1997). Imunoprecipitace je metoda, která se využívá pro izolaci a koncentraci specifických proteinů či

proteinových komplexů z komplexních směsí a s využitím specifických protilátek. Patří mezi často používané metody pro přípravu vzorků a další analýzu, jako je Western blott nebo hmotnostní spektrometrie. Je také zásadní pro studium protein-proteinových interakcí (Dziembowski & Seraphin 2004). Hmotnostní spektrometrie (MS – Mass Spectrometry) patří mezi centrální technologie pro identifikaci, kvantifikaci a charakterizaci proteinů a jejich PTM. Využívá se k měření hmotnosti a nábojů molekul, což umožňuje detailní analýzu peptidů a proteinů (Aebersold & Mann 2003). Chromatografie zahrnuje několik metod jako je iontová výměna, reverzně fázová a afinitní chromatografie pro separaci a purifikaci proteinů nebo peptidů před analýzou pomocí MS. Umožňuje také před separací složitých směsí (Ishihama 2005). Při izotopově značených technikách (např. SILAC, iTRAQ, TMT) jsou proteiny nebo peptidy chemicky modifikovány izotopicky značenými reagensy, což umožňuje jejich kvantifikaci v MS analýze. Využívají se pro kvantitativní porovnání proteinů mezi různými stavy nebo podmínkami (Ong & Mann 2006). V neposlední řadě, se využívá bioinformatiky a vyhledávání v databázích. Slouží pro uživatele jako sada nástrojů a metod pro analýzu a interpretaci dat z proteomických experimentů. Zahrnuje algoritmy pro identifikaci proteinů z MS dat, analýzu proteinových sítí a predikci funkce neznámých proteinů (Bairoch 2000; Jensen et al. 2009).

### 3.6.3 Detekce proteinů

V oblasti proteomiky spermií je k detekci a analýze proteinů využíváno mnoho metod. Mezi ně patří hmotnostní spektrometrie, která slouží k identifikaci a kvantifikaci proteinů (Aebersold & Mann 2003). K oddělení a rozpoznání specifických proteinů slouží techniky dvoudimenzionální gelové elektroforézy (Unlu et al. 1997; Görg et al. 2004) a Western blottingu (Dziembowski & Seraphin 2004), kde hrají podstatnou roli protilátky (Unlu et al. 1997; Dziembowski & Seraphin 2004). Pro vizualizaci lokalizace proteinů slouží imunodetekce (Johnson & Nogueira Araujo 1981).

Tyto metody, každá s určitými klady a zápory, se často kombinují pro komplexní analýzu proteomu spermií s cílem identifikovat nové biomarkery plodnosti, studovat mechanismy funkce spermií nebo pochopit dopady vnějších i genetických faktorů.

Pro separaci proteinů se často využívá jejich elektroforetické dělení. Elektroforéza je metoda, kdy se nabitě částice v kapalném médiu posouvají pod vlivem elektrického pole. Pohyblivost částic závisí na jejich náboji, velikosti a tvaru, a také je ovlivněna vlastnostmi pufru, jako je jeho typ, koncentrace a pH, stejně jako teplota a síla elektrického pole. Tato metoda se často využívá k analýze a purifikaci velkých molekul, včetně proteinů a nukleových kyselin, ale také pro menší nabitě molekuly, jako jsou cukry, aminokyseliny, peptidy, nukleotidy a jednoduché ionty (Westermeier 2001).

Provedení elektroforézy zahrnuje aplikaci vzorku na porézní materiál, skrze který se pak pod aplikovaným napětím molekuly posouvají různými rychlostmi (Westermeier 2001). Elektroforéza nachází uplatnění v mnoha oblastech, včetně biologického a biochemického výzkumu, proteinové chemie, farmakologie, forenzní vědy, klinických studií, veterinární medicíny, potravinářské kontroly a molekulární biologie (Westermeier et al. 2008).

Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) s přidavkem dodecylsírany sodného (SDS) je metoda, která využívá pufrovací systém pro oddělení molekul. V tomto procesu se iontové molekuly pohybují v gelu, kde přechází od vedoucího iontu, který má vysokou rychlost migrace, ke koncovému iontu s pomalou migrací. Oddělení molekul dochází na základě rozdílů v jejich elektroforézní pohyblivosti (Garfin 2009; Westermeier 2001).

Oddělení proteinů a dalších molekul může probíhat buď ve vertikálním, nebo horizontálním elektroforézním uspořádání. Vertikální systémy jsou oblíbené pro jejich flexibilitu a kompatibilitu s různými typy příslušenství. Na druhou stranu, horizontální systémy, které používají velmi tenké gely, přinášejí specifické přednosti (Westermeier 2001).

Odpovídající příprava vzorku je základem pro úspěšnou elektroforézu, přičemž každý proteinový vzorek vyžaduje individuálně upravený postup, zahrnující úplné rozpuštění, oddělení, denaturaci a redukci proteinů. Důležité je, aby byly proteiny v elektroforetických podmínkách plně rozpuštěny (Grabski 2009).

Pro úplnou analýzu všech intracelulárních proteinů je nutné buňky efektivně narušit. Narušení buněk by mělo probíhat při nízké teplotě, protože během lyzace mohou být uvolněny proteázy, a proto by měl být proteinový vzorek chráněn před proteolýzou. Narušení buněk se často provádí v solubilizačním roztoku vhodném pro vybrané proteiny (Gottlieb & Adachi 2000; Rabilloud 1996).

Pro úspěšnou elektroforézu je klíčová přesná kvantifikace proteinů ve vzorku, což umožňuje správné naložení množství a usnadňuje porovnání mezi vzorky. Výběr metody kvantifikace závisí na různých faktorech, včetně dostupnosti proteinu a přítomnosti rušivých látek. Přesnost měření se liší v závislosti na složitosti směsi proteinů a jejich aminokyselinovém složení. Pro nejspolehlivější výsledky je doporučeno použití směsi proteinů podobných analyzovanému vzorku jako standard (Noble & Bailey 2009).

Po dokončení elektroforézy je gel s rozdělenými proteiny obvykle barven barvivy jako je modř nebo stříbro pro vizualizaci proteinů. V dalších případech je možné přenést vzorky z gelu na membránu pomocí „blottingu“ neboli elektropřenosu (Bayer et al. 1987).

Pro analýzu založenou na reaktivitě s protilátkami je nutné, aby separované molekuly byly uvolněny z elektroforetického gelu. Nejméně efektivní metodou pro tento účel je právě technika přenosu na membránu. Při „blottingu“, jsou molekuly separované na pevném gelu eluovány přes širokou plochu gelu na speciální membránu, která molekuly váže. Proteiny zůstávají převážně na povrchu membrány, kde jsou dostupné pro detekci. Nejčastěji používanými materiály membrán pro elektropřenos proteinů jsou nitrocelulóza (NC) a polyvinylidenfluorid (PVDF). NC membrána je nejvšeobecněji použitelná. Gel obsahující separované proteiny je umístěn vedle membrány v kazetě, která je poté ponořena do nádoby s pufrů mezi dvěma elektrodami. Aplikací napětí na elektrody se molekuly přesunou z gelu na membránu (Kurien & Scofield 2006).

Po tomto procesu lze na membráně navázané proteiny detekovat buď specificky pomocí protilátek, nebo různými barvicími technikami. Proteiny přenesené na membránu je možné vizualizovat přímo barvením membrány pomocí Ponceau S, koloidního zlata, amidové černě a Coomassie Blue (Bayer et al. 1987; LaRochelle & Froehner 1990).

Imunodetekce a imunofluorescence jsou dvě základní techniky využívané v biochemickém a buněčném výzkumu pro studium proteinů. Při imunodetekci jsou proteiny po přenesení na membránu inkubovány s primární protilátkou specifickou pro cílový protein,

následované aplikací sekundární protilátky označené enzymem pro vizualizaci. Tato metoda je neocenitelná pro analyzování proteinové exprese a posttranslačních modifikací (Ni et al. 2016). Na druhou stranu, imunofluorescence využívá fluoroforem značené protilátky k vizualizaci proteinů přímo v buňkách nebo tkáních, což umožňuje detailní pozorování jejich lokalizace, distribuce a vzájemných interakcí na subcelulární úrovni. Společně tyto metody poskytují komplexní nástroje pro zkoumání dynamiky proteinů v různých biologických kontextech (Jalali et al. 2017).

### 3.6.4 Proteomika spermií

Výzkum proteinů u spermií savců se stal významným prvkem k pochopení molekulárních mechanismů regulujících funkci spermií, jejich zrání a interakce s oocytem. Proteomika tak pomáhá odhalovat nové biomarkery plodnosti či neplodnosti u zvířat i lidí a identifikovat specifické proteiny, které se podílí na procesu fertilizace. Pomáhá také objevovat potenciální receptory, jež se zapojují do interakce spermie s oocytem (Sutovsky 2020).

Studie Amaral et al. (2014) poskytuje komplexní přehled o proteomu lidských spermií. Identifikuje přes 6000 různých proteinů a analyzuje jejich zapojení do buněčných drah. Tato studie také upozorňuje na přítomnost proteinů v RNA metabolismu a jejich translaci, což může naznačovat proces složitější regulace funkce spermií, než se původně myslelo. Výzkum Bayram et al. (2016) se naopak zabývala studií u různých savčích druhů, kde byl identifikován soubor 623 proteinů přítomných ve spermiích napříč 19 druhy, což naznačuje určitou stálost proteinů spermií u savců. Tím tato studie potvrzuje univerzálnost některých funkcí u spermií (Bayram et al. 2016).

Výzkum proteinů psích spermií identifikoval několik klíčových proteinů, které hrají roli v kvalitě a plodnosti spermií. Patří mezi ně proteiny vázající heparin, proteiny vázající zinek, laktoferin, matrix metaloproteináza, superoxid dismutáza, kataláza a glutathion peroxidáza (Aquino-Cortez 2016). Byl také zkoumán vliv psiho plemene na proteomiku spermií a seminální plazmy, přičemž byly zjištěny rozdíly v profilech proteinů spermatu (Araujo 2022).

Výzkum ukazuje rozdíly v proteomu spermií mezi jednotlivými plemeny, která mohou souviset s rozdíly v plodnosti. Studie u plemen skotu identifikovaly rozdílnou expresi proteinů ve spermiích a semenné plazmě (Park et al. 2012). Podobně byly pozorovány proteomické rozdíly mezi holštýnskými býky s vysokou a nízkou plodností (Kasimanickam et al. 2019). Tyto rozdíly byly spojeny s rozdíly ve funkcích spermií, jako je energetický metabolismus, buněčná komunikace, spermatogeneze a motilita. Kromě toho byly u spermií beranů identifikovány specifické proteiny jako potenciální markery plodnosti (Hitit et al. 2021). Nedávné studie zdůraznily význam proteomické analýzy pro pochopení rozdílů v proteomu spermií různých plemen kanců, jako je Yorkshire a Duroc (Xu et al. 2021). Tyto rozdíly mohou mít významné důsledky pro strukturu, funkci a plodnost spermií. Kromě toho může využití proteomických přístupů pomoci při identifikaci potenciálních biomarkerů neplodnosti u samců (Rickard & Graaf 2020).



## 4 Metodika

### 4.1 Odběr biologického materiálu

Pro experimenty této diplomové práce byl používán nativní ejakulát chovných psů (*Tabulka 2*) plemene australský ovčák (AUO) a miniaturní americký ovčák (MAO) z chovatelské stanice Cofi Capito, která se nachází v Horní Libchavě.

Odběr byl prováděn masturbační technikou bez přítomnosti háravé feny ve stejný den a za podobných podmínek. Ejakulát byl odebrán do plastového sáčku, z kterého byl následně přepipetován do plastové zkumavky. Před dalším zpracováním se nechal ejakulát odstát 30 minut při pokojové teplotě.

<i>Canis</i>	<i>odběr A</i>	<i>odběr B</i>	<i>celé jméno psa</i>	<i>plemeno</i>
<i>Ca 1</i>	1,75 ml	2 ml	Nebesniy Aljans Around The Corner	AUO
<i>Ca 2</i>	3,75 ml	4,25 ml	Moonbaby's Zippo Cofi Capito	AUO
<i>Ca 3</i>	4 ml	7,5 ml	Moonbaby's Pray For Peace Prepare For War	AUO
<i>Ca 4</i>	7,75 ml	6,5 ml	Dizzy Marble Dream Glow	AUO
<i>Ca 5</i>	5 ml	4,25 ml	First Mini Cofi Capito	MAO
<i>Ca 6</i>	10,25 ml	10 ml	Moonbaby's Percy Cofi Capito	MAO
<i>Ca 7</i>	6,5 ml	8,25 ml	Moonbaby's Red Ranger	MAO
<i>Ca 8</i>	12,25 ml	7,5 ml	Gordonview Mega Opportunity	MAO

*Tabulka 2 Přehled odběru psů*

- Odběr A proběhl 15. 11. 2023
- Odběr B proběhl 22. 11. 2023

### 4.2 Příprava vzorků

Pro přípravu vzorků byl použit nativní odstátý ejakulát, který byl jemně zamíchán a rozpipetován po 1 ml do 1,5 ml mikrozkuvek typu Eppendorf. Mikrozkuvky byly centrifugovány po dobu 5 minut při 700 x g při pokojové teplotě. Po odsátí supernatantu byla mikrozkuvka doplněna 1 ml PBS roztoku a následně byl vzorek rozsuspendován a znovu centrifugován. Tyto kroky promývání spermií byly provedeny celkem 5x. Po poslední centrifugaci bylo odsáto co nejvíce supernatantu a zbylá peletka spermií byla pečlivě popsána a zamrazena. Tyto zamrazené vzorky byly na ledu převezeny do univerzitní laboratoře pro další analýzu.

Pro detekci nepřímé imunofluorescence byl odebrán alikvot o objemu 100  $\mu$ l do vlastní mikrozkuvky před poslední centrifugací. K alikvotu bylo přidáno 100–600  $\mu$ l PBS (phosphate buffered saline; Sigma-Aldrich, USA), nebyla možnost využití mikroskopu, bylo zapotřebí makroskopického odhadu hustoty alikvotu). Na sklíčka byla nakreslena dvě kolečka pomocí PAP Pen liquid blocker (Sigma-Aldrich, USA) a okraj sklíček byl popsán základními údaji – datum, identifikace psa a čím byl preparát fixován. Do každého kolečka bylo přeneseno

20 µl suspenze spermií a 50 µl vymraženého aceton-metanolu (v poměru 1:1). Po 5 minutách následoval oplach PBS roztokem a osušení preparátu. Takto připravené preparáty se vzorky byly skladovány v lednici při teplotě 4°C.

Pro zpracování vzorků na Western blot analýzu bylo potřeba lyzovat peletu spermií s přidáním 150–600 µl (dle individuální velikosti každé peletky) vzorkového pufru s inhibitory. Vzorky byly inkubovány v ledové tříšti 30 minut a při tom každých 5 minut vortexovány. Po lyzaci vzorků následovalo rozpůlení vzorků na dva dílčí vzorky a to vzorky neredukujících (N) podmínek a vzorky redukujících (R) podmínek. Vzorky připravené za N podmínek byly inkubovány v termobloku 5 minut při 38 °C a následně centrifugovány ve 4 °C 2 minuty při 10 000 x g. Odebraný supernatant ze vzorku byl zamrazen. Vzorky připravené za R podmínek byly inkubovány v termobloku 5 minut při 95 °C. Poté byly vzorky centrifugovány ve 4 °C 2 minuty při 10 000 x g. Do nové mikrozkuhavky byl odebrán supernatant a k němu přidán merkaptoethanol do finální 5% koncentrace. Vzorky byly vortexovány a znovu inkubovány v termoshakeru 5 minut při 95 °C.

### 4.3 Western blot (WB)

#### 4.3.1 SDS – Elektroforéza

Pro přípravu gelů byla sestavena aparatura Mini-PROTEAN Tetra Cell. Připravený roztok 12% separačního akrylamidového gelu (*Tabulka 3*) byl napipetován mezi skla a následně převrstven destilovanou vodou. Polymerace separačního gelu trvala 20–30 minut. Po uplynutí této doby byla destilovaná voda vylita a následovalo navrstvení roztoku 4% zaostřovacího akrylamidového gelu (*Tabulka 4*). Po napipetování tohoto roztoku byl mezi skla vsazen hřebínek pro tvorbu 15 jamek. Polymerace zaostřovacího gelu trvala 10–15 minut.

*Tabulka 3 Složení 12% separačního gelu*

<b>12% separační gel</b>	
<b>roztok</b>	<b>množství</b>
Tris HCl pH 8,8 (Resolving gel buffer, 1,5; MBio-Rad, USA)	2,5 ml
30 % Akrylamid (Acrylamide/bis-acrylamide 30% solution; Bio-Rad, USA)	4 ml
H <sub>2</sub> O	3,5 ml
SDS 10 % (dodecylsírán sodný; Bio-Rad, USA)	100 µl
TEMED (tetramethylethylendiamin; Pharmacia Biotech, Švédsko)	4,5 µl
APS 10 % (persíran amonný; Amersham Biosciences, Švédsko)	70 µl

*Tabulka 4 Složení 4% zaostřovací gelu*

<b>4% zaostřovací gel</b>	
<b>roztok</b>	<b>množství</b>
Tris HCl pH 6,8 (Stacking gel buffer, 0,5 M; Bio-Rad, USA)	625 µl
30 % Akrylamid (Acrylamide/bis-acrylamide 30% solution; Bio-Rad, USA)	325 µl
H <sub>2</sub> O	1,5 ml
SDS 10 % (dodecylsírán sodný; Bio-Rad, USA)	25 µl
TEMED (tetramethylethylendiamin; Pharmacia Biotech, Švédsko)	3,8 µl
APS 10 % (persíran amonný; Amersham Biosciences, Švédsko)	50 µl

Po této době byla souprava přemístěna do nádoby určené k elektroforéze. Nádoba byla zalita elektrodoým pufrem (15 g Tris, 72 glycin, 5 g SDS rozpuštěno v 1 l destilované H<sub>2</sub>O, roztok byl následně zředěn 1:4 v destilované H<sub>2</sub>O) a hřebínek byl vyjmut. Do první jamky byly pomocí Hamiltonovy pipety napipetovány 2 µl hmotnostního standardu (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad, USA), do zbylých jamek pak 8 vzorků s proteinovými extrakty spermii po 10 µl. Pro elektroforézu byl využit přístroj PowerPac HC High-Current Power Supply (Bio-Rad, USA). Počáteční úsek elektroforézy probíhal při napětí 80 V po dobu 30 minut, poté bylo napětí zvýšeno na 150 V po dobu zhruba 60 minut, dokud nedošlo k dostatečnému rozdělení proteinů.

#### 4.3.2 Přenos proteinů (Western blotting)

Gel byl vyjmut ze soupravy a promyt v destilované vodě. Souprava na samotný Western blotting byla sestavena z kazety, dvou houbiček, čtyř filtračních papírů a nitrocelulókové (NC) membrány v následujícím pořadí: houbička, 2x filtrační papír, NC membrána, gel, 2x filtrační papír, houbička. Kazeta byla vložena do soupravy Mini Trans-Blot Central Core a následně do nádoby, která byla zalita transferovým pufrem (3,03 g Tris, 14,4 glycin rozpuštěn ve 200 ml destilované H<sub>2</sub>O, 200 ml methanolu a doplněno na 1 l destilovanou H<sub>2</sub>O). Celou soupravu z vnějšku ochlazovala ledová tříšť, aby nedocházelo k jejímu přehřátí při elektropřenosu. Elektropřenos probíhal pomocí přístroje PowerPac HC High-Current Power Supply pod stálým proudem 500 mA po dobu 45 minut. Po uplynutí této doby byla membrána vyjmuta ze soupravy a omyta pomocí destilované vody. Po omytí byl zkontrolován přenos proteinů na membránu za použití barvicího roztoku Ponceau S (Sigma–Aldrich, USA). Toto barvivo efektivně obarví proteiny na membráně červeně, neovlivňuje jejich biologickou aktivitu a umožňuje rychlou vizualizaci přenesených proteinů. Po kontrole přenosu byla membrána omývána na třepačce roztokem PBS s 0,1% Tweenem 20 (PBS-T).

#### 4.3.3 Imunodetekce proteinů

Pro zablokování nespecifických vazebných míst na NC membráně byly připraveny média 5% sušeného mléka (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk; Bio-Rad, USA) (připraveno pro protilátky) a 2% želatiny (Sigma-Aldrich, USA) (připraveno pro lektiny). 0,25 g sušeného mléka bylo smícháno s 5 ml destilované vody a 0,1 g sušené želatiny bylo smícháno s 5 ml destilované vody a důkladně promícháno na rotační třepačce do úplného rozpuštění. Membrána byla vložena do krabiček a zablokována mlékem po dobu 45 minut na třepačce. Blokace želatinou probíhala přes noc v lednici při 4 °C.

Po zablokování mlékem bylo provedeno promytí membrány 3x 5 minut pomocí PBS-T. Následně byla přidána primární protilátka ředěná v PBS: anti-AKAP4 klon 7E10 (4BioDx, Francie) v poměru 1:5000, anti-phosphotyrosine klon 4G10 (Millipore Corporation, USA) v poměru 1:500 a Alfa-tubulin klon DM1A (Monoclonal anti- $\alpha$ -Tubulin Antibody produced in mouse, Sigma-Aldrich, USA) v poměru 1:1000. Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc v lednici při 4 °C. Po inkubaci následovalo promytí 3x 5 minut s PBS s 0,1% Tweenem 20. Poté byla přidána sekundární protilátka anti-mouse konjugovaná s křenovou peroxidázou (Bio-

Rad, USA) proti myším imunoglobulinům v poměru 1:3000 v PBS. Sekundární protilátka byla s membránou inkubována po dobu 60 minut na třepačce. Posléze byla NC membrána promývána PBS-T 5x 5 minut.

Po zablokování membrány želatinou bylo provedeno promytí 3x 5 minut pomocí PBS-T. Následně byl přidán biotinem značený lektin v poměru 1:2500 (MAL II., WGA, SNA – Vector Laboratories, USA) ředěný v HEPES pufru (10 mM HEPES, pH 7,5; 0,15 M NaCl; 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,01 mM MnCl<sub>2</sub>) Inkubace s lektinem byla prováděna na třepačce po dobu 90 minut. Po inkubaci následovalo promytí 3x 5 minut s PBS-T. Poté byla přidána Avidin peroxidáza (Sigma-Aldrich, USA) v poměru 1:1000 v PBS, ta byla na třepačce inkubována 60 minut. Posléze byla membrána promyta s PBS-T 5x 5 minut. Na membráně po promytí byla provedena vizualizace detekce proteinů a lektinů za použití chemiluminiscenčního substrátu (SuperSignal West Chemiluminescent Substrate; Thermo Scientific, USA) při poměru 1:1. Chemiluminiscence byla provedena a vyhodnocena v digitálním přístroji Azure c300 Gel Imaging System (Azure Biosystems, Dublin, USA).

#### 4.4 Nepřímá fluorescence

Na nepřímou fluorescenci byla použita připravená sklička se zafixovanými spermii. Sklička byla omyta PBS a poté bylo do obou koleček s preparáty spermii napipetováno 150 µl Super Blocking Bufferu (ThermoFischer Scientific, USA). Sklička byla uložena do vlhké komůrky na dobu 20–30 minut. Po uplynutí doby byla sklička opět opláchnuta PBS. Na kolečka pro samotnou detekci bylo napipetováno 100 µl primární protilátky (AKAP4 1:50, 4G10 1:500) nebo biotinem značeného lektinu v poměru 1:300 (MAL II, WGA, SNA, ConA – Vector Laboratories, USA). Na negativní kontrolu bylo napipetováno 100 µl PBS (jako kontroly pro detekci protilátkami) nebo 100 µl roztok HEPES (pro lektiny). První inkubace probíhala přes noc při 4 °C. Po inkubaci následoval oplach preparátů PBS a přidání 100 µl sekundární protilátky goat anti-mouse 488 v poměru 1:300 v PBS (k protilátkám) nebo přidání 100 µl Streptavidinu FITC (ThermoFisher Scientific, USA) v poměru 1:300 v PBS (k lektinům) do obou koleček. Druhá inkubace probíhala 45–60 minut. Následoval oplach PBS a přidání 100 µl PNA s Rhodaminem (Vector Laboratories, USA) do každého kolečka v poměru 1:500 v PBS pro obarvení akrozomů. Inkubace probíhala ve vlhké komůrce po dobu 30 minut. Následoval oplach PBS a oplach destilovanou vodou. Posledním krokem před samotným vyhodnocením bylo napipetování 7 µl Vectashieldu s DAPI (Vector Laboratories, USA) a přikrytí krycím sklíčkem. Analýza probíhala po 10–15 minutách pod fluorescenčním mikroskopem Nikon Imaging software (NIS-Elements).

#### 4.5 Statistická analýza

Síla signálu byla detekována pomocí software Image Studio Digits verze 4.0. C-Digit Scanner. K následnému zpracování naměřených dat byl využit Microsoft Excel. Změřené signály byly následně vztaženy na plochu signálu daného proteinu/glykoproteinu. Stejný postup proběhl také u hodnocení celkové nanášky proteinů ve vzorku. Takto získané hodnoty byly

vztaženy k signálu barvení proteinů. Výsledky byly porovnány a rozdíly mezi jednotlivými vzorky byly statisticky vyhodnoceny.

Experimenty byly 1–5 krát zopakovány, pro vyhodnocení byl však vybrán jeden reprezentativní výsledek. Pro denzitometrickou analýzu exprese proteinů byl použit program Image Studio Digits (Lite Verze 5.2.; LI-COR Biosciences, USA). Pro vypracování statistických analýz dat u detekce proteinu a míry fosforylace/glykosylace v lyzátu spermií mezi jednotlivými plemeny byla zvolena analýza T-test a ANOVA v GraphPad Prism 5.0 Software (LLC) d.b.a Dotmatics. Hodnota **P** menší než hladina významnosti ( $\alpha = 0,05$ ) byla považována za statisticky významnou.

## 5 Výsledky

Pro vyhodnocení byla vybrána data získaná z prvního odběru označeného jako A, a to z důvodu odlišného proteinového profilu po lyzaci spermií z odběru B. Nanáška u jedinců z odběru B byla výrazně odlišná a toto měření nebylo do výsledků zahrnuto. V případě vzorků z odběru A bylo u některých experimentů provedeno několik opakování, aby mohla být data řádně vyhodnocena.

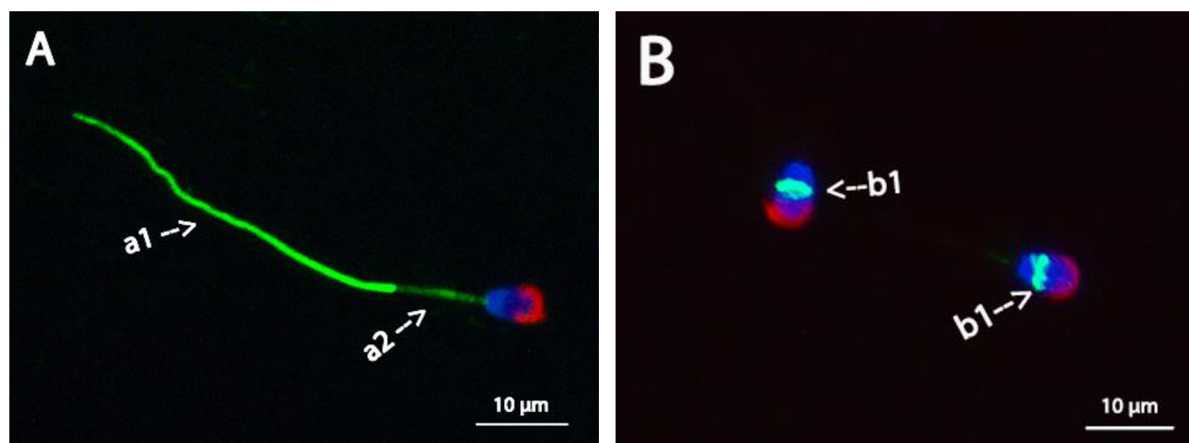
### 5.1 Lokalizace AKAP4 proteinu a fosforylovaných a glykosylovaných molekul na psích spermiích

Použitím fluorescenční mikroskopie byly zaznamenány signály pro detekci AKAP4 proteinu, fosorylovaných a glykosylovaných molekul. Modrou barvou je za pomoci DAPI obsaženém v montovacím médiu značeno jádro spermie. Červenou barvou je díky PNA lektinu konjugovaným s rhodaminem onačen akrozom spermie. Zelená barva pak detekuje, pro nás nejdůležitější, signál protilátky proti AKAP4 a fosfotyrosinu nebo signál biotinem značeného lektinu pomocí streptavidinu konjugovaného s FITC. U každého experimentu byla provedena negativní kontrola bez inkubace s protilátkou nebo lektinem. Kontrolní experimenty bez použití protilátky nebo lektinu byly konzistentně negativní, což potvrzuje specifickou vazbu.

Pro prezentaci výsledků byla vybrána vždy jedna reprezentativní fotografie, která byla následně detailněji popsána.

Pro lokalizaci proteinu AKAP4, který se typicky nachází v bičíku spermií, byla použita specifická protilátka Anti-AKAP4. Jak je zobrazeno na **Obrázek 5 (A)**, lokalizace signálu AKAP4 byla nejintenzivnější v oblasti koncové části bičíku spermie (a1). Zatímco ve střední části bičíku spermie (a2) byla zaznamenána slabší detekce.

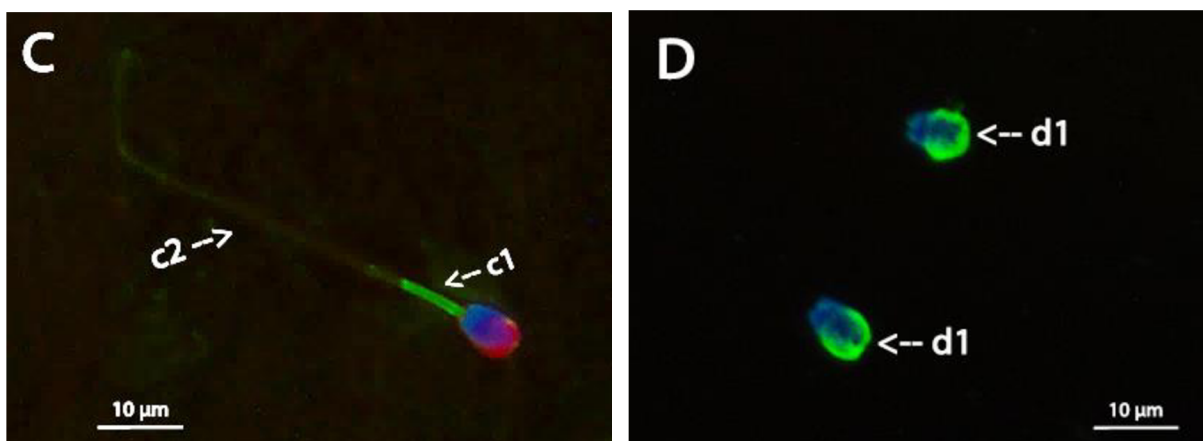
Posttranslačních modifikace PTyr byly detekovány použitím monoklonální protilátky proti fosfotyrosinu 4G10, jak ukazuje **Obrázek 5 (B)**. Signál byl zaznamenán v ekvatoriálním segmentu hlavičky (b1) na spermiích s neporušeným akrozomem.



**Obrázek 5** Imunolokalizace AKAP4 (A) a PTyr (B) v psích spermiích. Jádra značené DAPI (modře), pozitivní reakce s protilátkou (zeleně), akrozomy značené PNA lektinem (červeně). D – složený obrázek (DAPI, lektin, PNA). a1 – silný signál pro AKAP4 na bičíku spermie, a2 – slabý signál pro AKAP4 ve střední části bičíku, b1 – lokalizace fosforylovaných proteinů v ekvatoriálním segmentu hlavičky spermie. Zvětšení 400x.

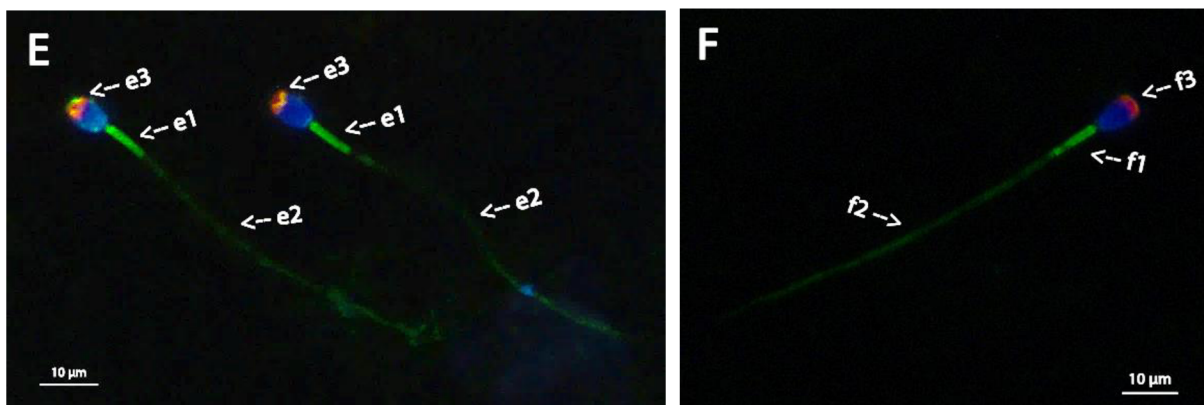
Pro detekci sialových kyselin na povrchu spermií byla zvolena metoda vazby lektinu, která představuje nejméně invazivní přístup umožňující zachování co nejpřirozenějších podmínek bez poškození buněčných struktur. **Obrázek 6 (C)** ukazuje lokalizaci  $\alpha$ -2,6 vázané sialové kyseliny pomocí lektinu SNA. Tento lektin vázal sialované molekuly nejvýrazněji ve střední části bičíku spermie (c1). Méně výrazný signál byl také pozorován v hlavní části bičíku (c2).

Naopak to bylo u lektinu WGA, který se specificky váže na N-acetylglukosaminové zbytky a sialové kyseliny glykanů. **Obrázek 6 (D)** ukazuje detekci silného signálu v akrozomové části hlavičky spermie (d1). Na obrázku si můžeme povšimnout, že tento signál naprosto překrývá signál akrozomu značeným PNA lektinem.



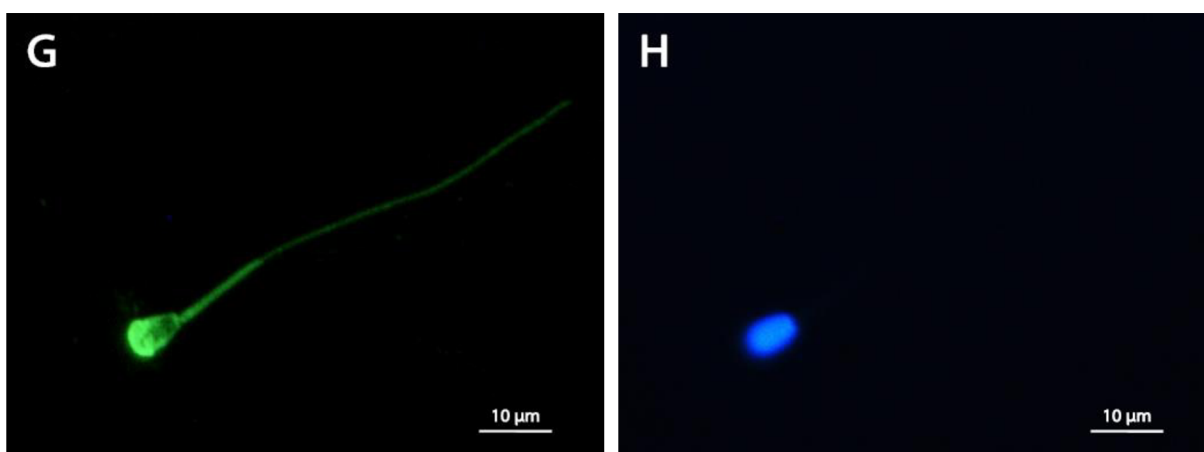
**Obrázek 6** Lokalizace vazby lektinů SNA (C) a WGA (D). Jádra značené DAPI (modře), pozitivní reakce s lektinem (zeleně), akrozomy značené PNA lektinem (červeně). c1 – lokalizace sialylace ve střední části bičíku spermie, c2 – slabší signál pro sialylaci na bičíku spermie, d1 – lokalizace sialylace v akrozomové oblasti. Zvětšení 400x.

Pro další detekci sialovaných molekul byl použit lektin MAL II se specifitou pro  $\alpha$ -2,6 vázané sialové kyseliny (**Obrázek 7**). Pomocí MAL II lektinu byl ve střední části bičíku spermie detekován výrazný signál (e1, f1). Méně výrazný signál byl nalezen v hlavní části bičíku spermie (e2, f2). Rozdíl je však viditelný mezi plemeny AUO a MAO v apikální části hlavičky spermie, kde byl zachycen signál u plemene AUO (e3), zatím co u plemene MAO se signál v apikální části hlavičky spermie nevyskytoval (f3).

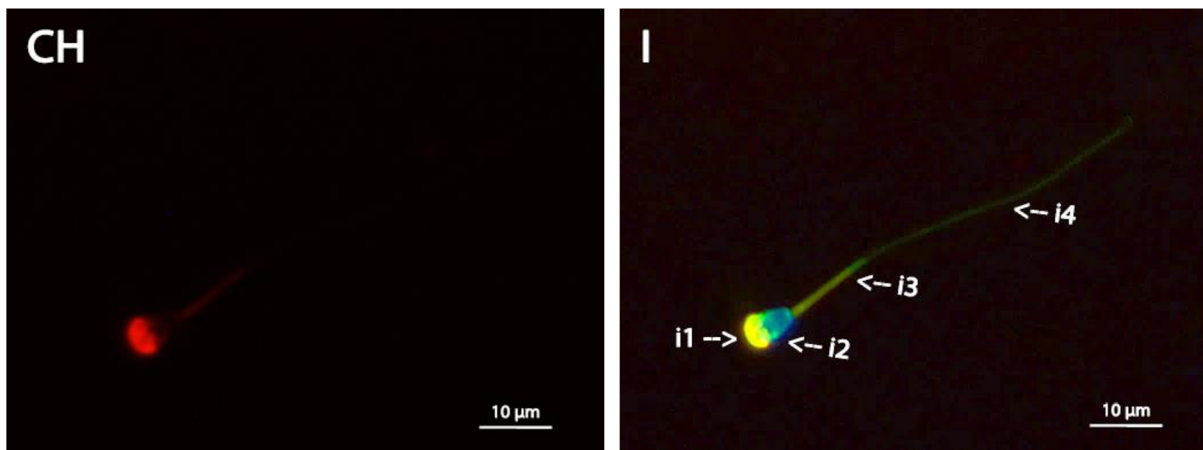


**Obrázek 7** Lokalizace lektinu *MAL II* u AUO (E) a MAO (F). Jádra značené DAPI (modře), pozitivní reakce s lektinem (zeleně), akrozomy značené PNA lektinem (červeně). e1, f1 – lokalizace sialylace ve střední části bičíku spermie, e2, f2 – slabší signál pro sialylaci na bičíku spermie, e3 – lokalizace sialylace v apikální části hlavičky spermie u plemene AUO, f3 – absence sialylace v apikální části hlavičky spermie u plemene MAO. Zvětšení 400x.

Lokalizace vazby lektinu ConA (**Obrázek 8**) (G) ukazuje signál těchto sacharidových struktur díky použití streptavidinu konjugovaného s FITC. Obrázek (H) ukazuje jádro spermie značené pomocí DAPI. Obrázek (CH) zobrazuje označení akrozomu pomocí lektinu PNA konjugovaného s rhodaminem. Obrázek (I) je pak složený ze všech 3 fotografií pro výslednou vizualizaci. ConA je lektin, který se váže na  $\alpha$ -D-glukózu a  $\alpha$ -D-manózu. Na obrázku (G) byla vazba lektinu ConA detekována na celém povrchu spermie s nejsilnějším signálem v akrozomové oblasti hlavičky (i1). Tento signál postupně zeslábl a pokračoval směrem k posteriorní části hlavičky spermie (i2) a byl rovnoměrně rozložen také ve střední části bičíku spermie (i3). Méně výrazný signál pak pokračoval až do hlavní a koncové části bičíku spermie (i4).





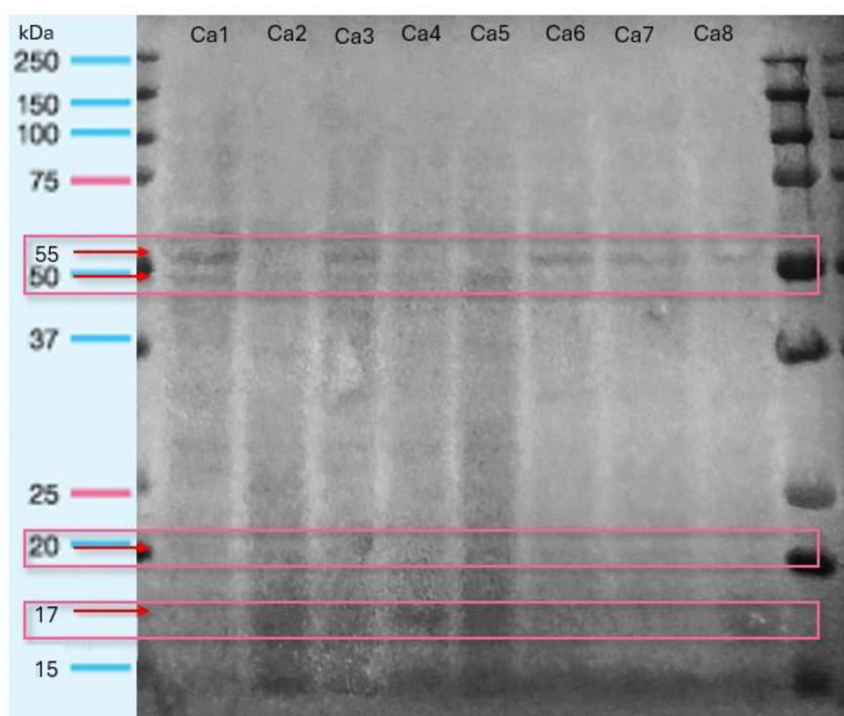


**Obrázek 8** Lokalizace lektinu *ConA* (G). Značení jádra DAPI (H). Značení akrozomu PNA lektinem (CH). Propojení všech 3 kanálů (I). i1 – lokalizace glukozylových a manozylových struktur v akrozomové oblasti hlavičky spermie, i2, slabší signál pro glukózu a manózu na hlavičce spermie, i3 – slabší signál pro glukózu a manózu ve střední části bičíku spermie, i4 – slabý signál *ConA* na bičíku spermie. Zvětšení 400x.

## 5.2 Proteinový profil psích spermií

Vzorky proteinů po lyzaci spermií označené jako Ca1 až Ca8 byly separovány, přeneseny na nitrocelulóзовou membránu a následně obarveny na proteiny. Tyto vzorky byly rozděleny do dvou skupin dle plemene. Vzorky Ca1 až Ca4 reprezentují jedince plemene AUO, zatímco vzorky Ca5 až Ca8 jsou jedinci plemene MAO.

Proteinová analýza lyzátu (**Obrázek 9**) od psů odhalila pruhy odpovídající molekulovým hmotnostem 50 kDa a 55 kDa. V oblasti 55 kDa byla zřetelná exprese proteinů ve vzorcích Ca1, Ca3, Ca6, Ca7 a Ca8, zatímco u Ca2, Ca4 a Ca5 byla detekce těchto proteinů méně výrazná. Pro molekulární hmotnost 50 kDa byla zaznamenána přítomnost proteinů podobném množství pro vzorky Ca1 až Ca5, naopak u vzorků Ca6 až Ca8 byla intenzita barvení nižší. Dále byly nalezeny proteiny s molekulovými hmotnostmi 20 kDa a 17 kDa napříč všemi analyzovanými vzorky, ačkoliv s nižší intenzitou ve srovnání s vyššími molekulovými hmotnostmi. Relativně konzistentní intenzita barvení napříč vzorky svědčí o přítomnosti těchto proteinů v podobné míře v rámci obou plemen. Kromě těchto proteinů se ve vzorcích psích spermií objevují proteiny v oblasti 25-37 kDa především u plemene AUO (Ca1-Ca4). Ve všech vzorcích je viditelný výrazný pruh proteinu o 15 kDa.



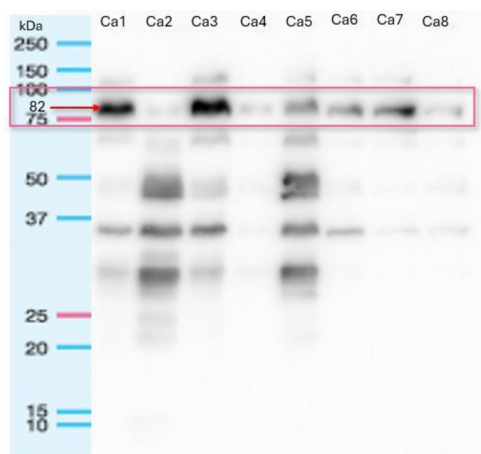
**Obrázek 9** NC membrána se separovanými proteiny spermií získaných od 4 jedinců u dvou různých plemen (AUO: Ca1-4 a MAO: Ca5-8) po obarvení proteinů Ponceau S.

### 5.2.1 Detekce AKAP4 v psích spermiích

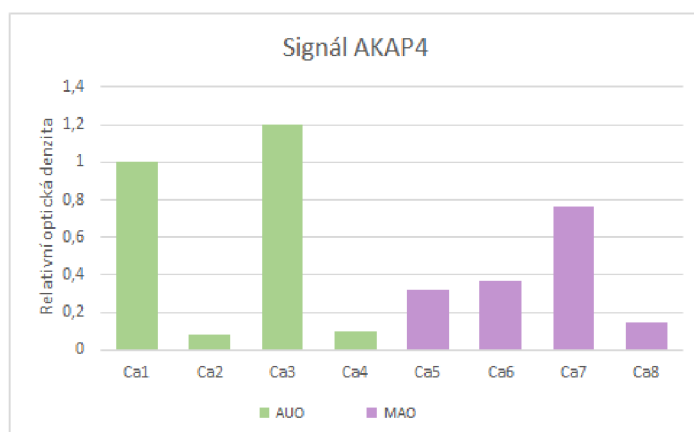
Membrána po inkubaci s protilátkou proti proteinu AKAP4 (**Obrázek 10**), zobrazuje osm vzorků lyzátu psích spermií označených Ca1 až Ca8. V oblasti odpovídající molekulové hmotnosti 82 kDa, což je predikovaná velikost proteinu AKAP4, jsou zřetelné signály v různých

intenzitě. Přítomnost nescifických signálů detekovaných anti-AKAP4 (klon 7E10) naznačuje nutnost další verifikace specifity protilátky.

Bylo pozorováno (**Graf 1**), že naměřený signál proteinu AKAP4 vykazoval výraznou variabilitu mezi jednotlivými jedinci. Vzorky Ca1 a Ca3 ukazují zřetelné signály, přičemž Ca3 je nejzřetelnější z celého souboru. Vzorky Ca5, Ca6 a Ca7 vykazují středně zřetelné signály, zatímco Ca2, Ca4 a Ca8 vykazují nejméně zřetelné signály. Rozložení signálů napříč vzorky svědčí o výrazné variabilitě ve vyjádření proteinu AKAP4 mezi jednotlivými vzorky spermií. Pro ověření specifčnosti detekce byla současně provedena negativní kontrola bez přidání protilátky, přičemž tato kontrola byla bez detekovaného signálu.

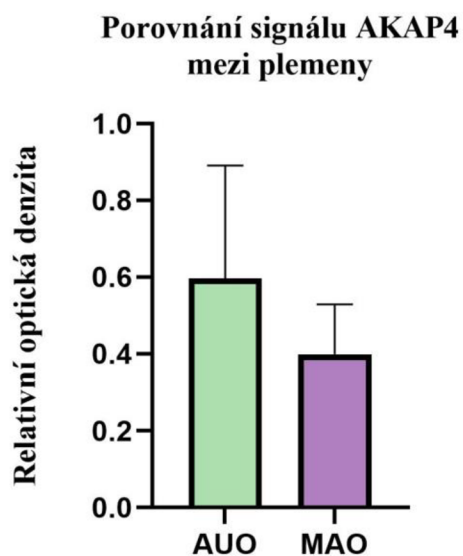


**Obrázek 10** Imunodetekce AKAP4 proteinu na NC membráně s proteinovými extrakty spermií získaných od 4 jedinců u dvou různých plemen (AUO: Ca1-4 a MAO: Ca5-8).



**Graf 1** Vyhodnocení optické hustoty signálu protilátky proti AKAP4.

**Graf 2** demonstruje porovnání intenzity signálu proteinu AKAP4 mezi dvěma plemeny. Plemeno AUO prokazuje vyšší průměrnou intenzitu signálu ve srovnání s plemenem MAO. Přitom variabilita intenzity signálu v plemeni AUO je značnější, což je vyjádřeno větším rozptylem hodnot. Naopak, plemeno MAO, i přes nižší průměrnou intenzitu signálu, vykazuje menší rozptyl, indikující stabilnější úroveň signálu mezi jednotlivými jedinci tohoto plemene. Rozdíl v množství AKAP4 proteinu mezi plemeny nebyl vyhodnocen jako signifikantní ( $p > 0,05$ ).

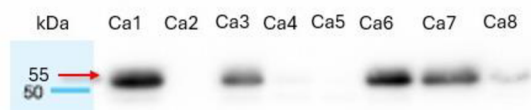


*Graf 2* Porovnání signálu AKAP4 mezi plemeny AUO a MAO. Odchylky jsou prezentovány jako střední chyba průměru (SEM). Vyhodnoceno *t*-testem  $p > 0,05$ .

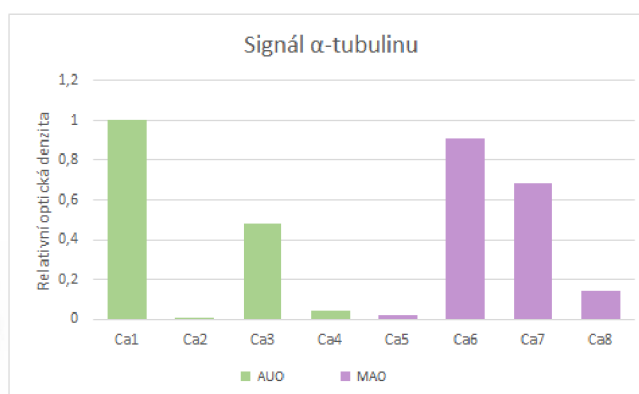
### 5.2.2 Detekce $\alpha$ -tubulinu

V molekulové hmotnosti 55 kDa (*Obrázek 11*) byla pozorována variabilita v intenzitě proteinových signálů. Vzorky Ca1, Ca3, Ca6, Ca7 a Ca8 vykazovaly zřetelné signály, zatímco u vzorků Ca2, Ca4 a Ca5 byla detekce minimální a při vizuálním hodnocení nedetekovatelná.

*Graf 3* ukazuje srovnání intenzity signálu  $\alpha$ -tubulinu vztažené k celkovému množství proteinů ve vzorku mezi dvěma plemeny. Vzorek Ca1 vykazoval nejvyšší intenzitu signálu ze všech vzorků, zatímco vzorek Ca6 následuje s téměř stejně vysokou hodnotou. Střední úroveň signálu byla patrná u vzorků Ca3 a Ca7, což naznačuje mírně nižší expresi  $\alpha$ -tubulinu v těchto vzorcích. Oproti tomu vzorky Ca2, Ca4, Ca5 a Ca8 představovaly nejnižší intenzity signálu, s Ca2 majícím zcela minimální úroveň. Došlo k výrazným rozdílům v signálech u  $\alpha$ -tubulinu mezi jedinci. Pro ověření specifčnosti detekce byla současně provedena negativní kontrola bez přidané protilátky, přičemž tato kontrola byla bez detekovaného signálu.

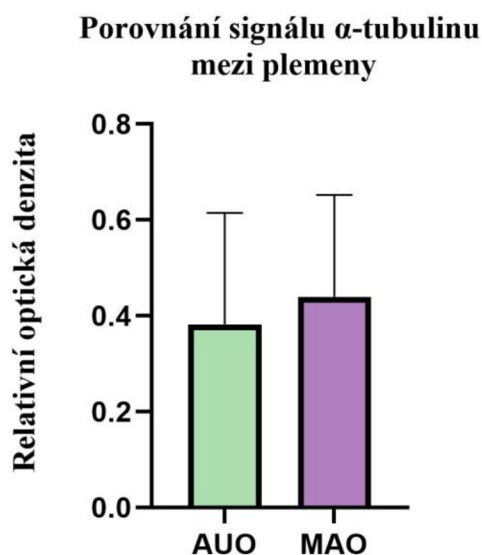


*Obrázek 11* Imunodetekce  $\alpha$ -tubulinu na NC membráně s proteinovými extrakty spermií získaných od 4 jedinců u dvou různých plemen (AUO: Ca1-4 a MAO: Ca5-8).



*Graf 3* Vyhodnocení optické denzity signálu protilátky proti  $\alpha$ -tubulinu.

**Graf 4** ukazuje srovnání intenzity signálu  $\alpha$ -tubulinu mezi dvěma plemeny. Plemeno AUO, vykazuje nižší průměrnou intenzitu signálu ve srovnání s plemenem MAO. Rozptyl hodnot u skupiny MAO je větší, což naznačuje větší variabilitu intenzity signálu tedy množství izolovaného  $\alpha$ -tubulinu v lyzátech spermií u tohoto plemena. Rozdíl v množství  $\alpha$ -tubulinu mezi plemeny nebyl vyhodnocen jako signifikantní ( $p > 0,05$ ).

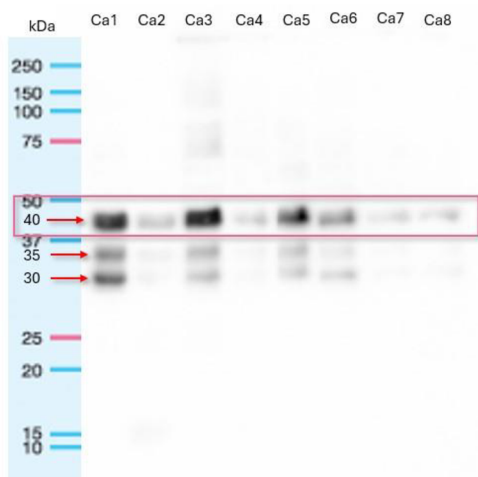


*Graf 4 Porovnání signálu  $\alpha$ -tubulinu mezi plemeny AUO a MAO. Odchylky jsou prezentovány jako střední chyba průměru (SEM). Vyhodnoceno t-testem  $p > 0,05$ .*

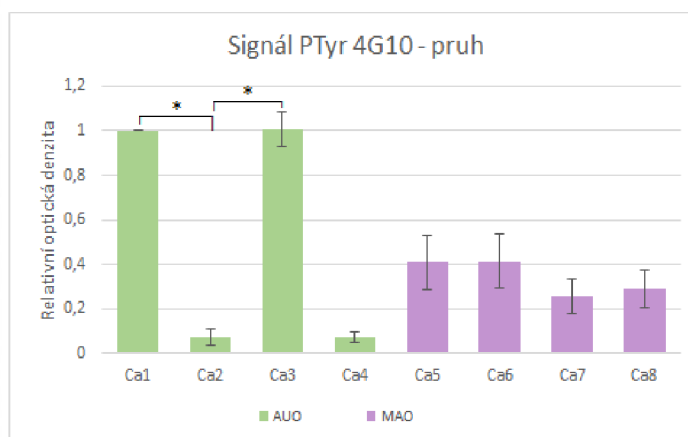
### 5.3 Detekce fosforylovaných proteinů v psích spermiích

Membrána (**Obrázek 12**) byla inkubována s monoklonální protilátkou 4G10, zaměřenou proti fosforylovanému tyrosinu. Signály fosforylace byly pozorovány u všech vzorků v hmotnostním pásmu 40 kDa, s variabilními úrovněmi intenzity. Dále byly u všech zkoumaných vzorků zaznamenány PTyr signály v pásech 35 kDa a 30 kDa. U vzorku Ca3 byla zjištěna specifická fosforylace v molekulových hmotnostech v rozmezí mezi 70–85 kDa a 100–150 kDa. Pro ověření specifičnosti detekce byla současně provedena negativní kontrola pro každou membránu bez přidané protilátky, přičemž všechny negativní kontroly byly bez detekovaného signálu.

**Graf 5** prezentuje srovnání intenzity průměrného signálu protilátky PTyr 4G10 u nejvýraznějšího pruhu o velikosti 40 kDa vztážené k celkovému množství proteinů ve vzorku mezi dvěma plemeny. Pozorování bylo provedeno pětkrát a ukázalo, že naměřené úrovně signálu protilátky PTyr 4G10 se významně lišily mezi jednotlivými vzorky. Nejvyšší intenzitu signálu vykázaly vzorky Ca1 a Ca3, přičemž Ca3 dosahoval nejintenzivnějšího signálu ve zkoumané skupině. Vzorky Ca5, Ca6 a Ca7 prezentovaly střední úroveň signálů, zatímco vzorky Ca2, Ca4 a Ca8 měly nejslabší signál. Statistické vyhodnocení ukázalo signifikantní rozdíl ve fosforylaci 40kDa proteinu spermií v rámci jednoho plemene AUO mezi vzorky Ca1 a Ca2 a také mezi Ca2 a Ca3 ( $p < 0,05$ ).



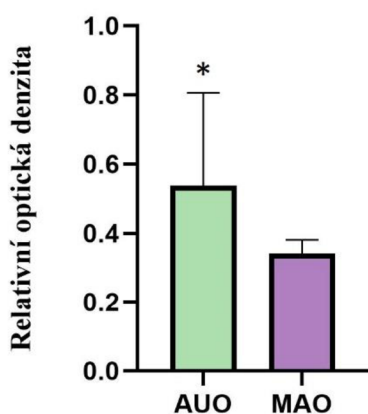
**Obrázek 12** Vazba protilátky PTyr 4G10 na fosforylovaných spermích získaných od 4 jedinců u dvou různých plemen (AUO Ca1-4 a MAO Ca5-8) na NC membráně.



**Graf 5** Vyhodnocení optické denzity signálu protilátky PTyr 4G10 u nejvýraznějšího pruhu. Statisticky vyhodnoceno jednofaktorovým ANOVA testem

**Graf 6** Porovnání průměrných signálu PTyr 4G10 (u nejvýraznějšího pruhu) mezi plemeny AUO a MAO. Odchytky jsou prezentovány jako střední chyba průměru (SEM). Vyhodnoceno t-testem  $p < 0,05$ . prezentuje porovnání intenzity signálu protilátky PTyr 4G10 (u nejvýraznějšího pruhu o 40 kDa) mezi plemeny AUO a MAO. Plemeno AUO zřetelně vykazuje vyšší průměrnou intenzitu signálu pro PTyr ve srovnání s plemenem MAO. Rozptyl hodnot v plemeni AUO je větší, což odráží značnou variabilitu ve fosforylaci proteinů v tomto plemeni. Naproti tomu plemeno MAO, přestože má nižší průměrnou intenzitu signálu, projevuje menší rozptyl, což ukazuje uniformnější úroveň fosforylace mezi jedinci tohoto plemene. Analýza ukázala, že plemeno AUO má statisticky signifikantně vyšší průměrnou intenzitu signálu protilátky PTyr 4G10 než plemeno MAO, s  $p$ -hodnotou  $< 0,05$ .

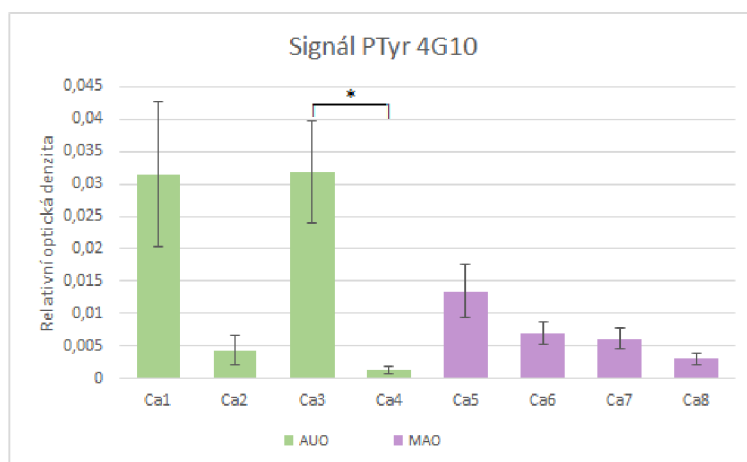
**Porovnání průměrných signálu PTyr 4G10 mezi plemeny**



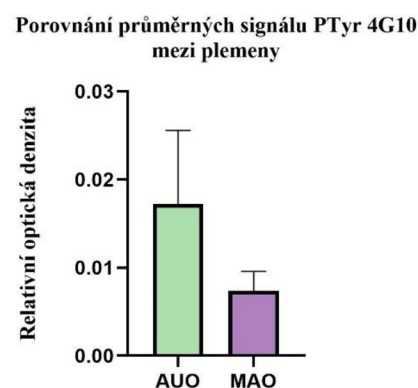
**Graf 6** Porovnání průměrných signálu PTyr 4G10 (u nejvýraznějšího pruhu) mezi plemeny AUO a MAO. Odchytky jsou prezentovány jako střední chyba průměru (SEM). Vyhodnoceno t-testem  $p < 0,05$ .

**Graf 7** ukazuje porovnání intenzity průměrného signálu protilátky PTyr 4G10 v celém vzorku vztažený k celkovému množství proteinů ve vzorku mezi dvěma plemeny. Pozorování bylo provedeno pětkrát a ukázalo, že variabilitu signálu protilátky PTyr 4G10. Nejvyšší intenzitu signálu vykázaly vzorky Ca1 a Ca3, přičemž Ca3 dosahoval mírně vyšší intenzity. Vzorky Ca5, Ca6 a Ca7 prezentovaly střední úroveň signálů, zatímco vzorky Ca2, Ca4 a Ca8 měly tento nejslabší signál. Statistické vyhodnocení ukázalo signifikantní rozdíl ve fosforylaci proteinů spermií v rámci jednoho plemene AUO mezi vzorky Ca3 a Ca4 ( $p < 0,05$ ).

**Graf 8** prezentuje porovnání intenzity signálu protilátky PTyr 4G10 v celém vzorku mezi plemeny AUO a MAO. Plemeno AUO zřetelně vykazuje vyšší průměrnou intenzitu signálu pro PTyr ve srovnání s plemenem MAO. Rozptyl hodnot v plemeni AUO je větší, což odráží značnou variabilitu ve fosforylaci proteinů v tomto plemeni. Naproti tomu plemeno MAO, přestože má nižší průměrnou intenzitu signálu, projevuje menší rozptyl, což ukazuje uniformnější úroveň fosforylace mezi jedinci tohoto plemene. Rozdíl v množství protilátky PTyr 4G10 (v celém vzorku) mezi plemeny nebyl vyhodnocen jako signifikantní ( $p > 0,05$ ).



**Graf 7** Vyhodnocení optické denzity signálu PTyr 4G10 u celého sloupce. Statisticky vyhodnoceno jednofaktorovým ANOVA testem.



**Graf 8** Porovnání průměrných signálů u celého sloupce PTyr 4G10 mezi plemeny AUO a MAO. Odchylky jsou prezentovány jako střední chyba průměru (SEM) Vyhodnoceno t-testem  $p > 0,05$ .

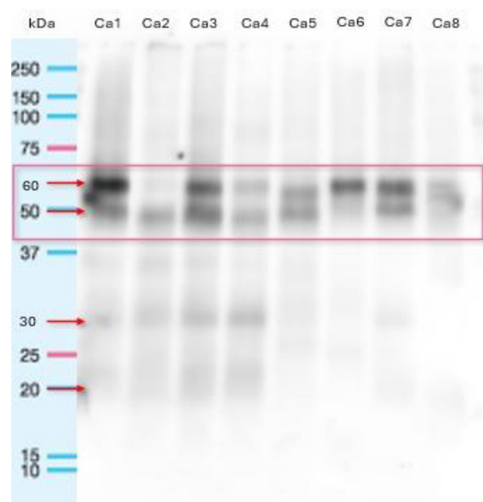
## 5.4 Detekce sialovaných proteinů v psích spermích

### 5.4.1 Detekce sialových kyselin v glykoproteinech spermií vázaných $\alpha$ -2,3

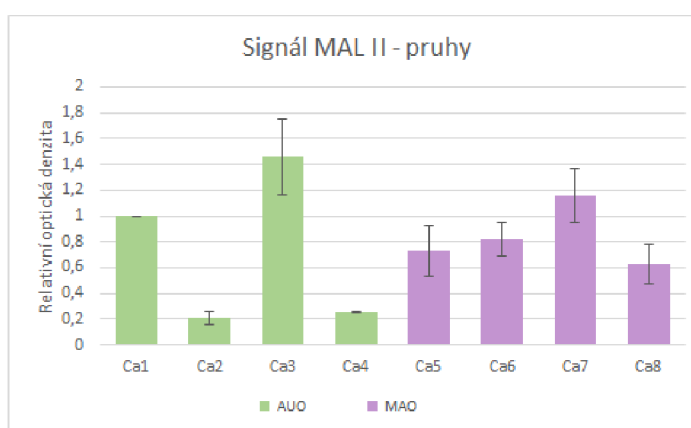
**Obrázek 13** prezentuje membránu, která byla podrobena inkubaci s lektinem MAL II. Signály s přítomností glykoproteinů s vázanými sialovými kyselinami byly zaznamenány v molekulových hmotnostních pásmech 60 kDa byly pozorovány v rámci vzorků Ca1, Ca3-8. Vzorek Ca2 však neprokázal vizuálně detekovaný signál. V molekulové hmotnosti 50 kDa byla identifikována interakce s lektinem u vzorků Ca1-5 a Ca7, zatímco Ca6 a Ca8 byly negativní. Dále u zástupců plemene AUO, tedy Ca1-4, byla detekována specifická vazba lektinu v hmotnostních oblastech 30 kDa a 20 kDa. Pro ověření specifičnosti detekce byla současně provedena negativní kontrola pro každou membránu inkubovaná pouze s avidinem

konjugovaným s HRP bez přítomnosti lektinu. Negativní kontroly byly bez detekovaného signálu.

**Graf 9** prezentuje srovnání průměrné intenzity signálu dvou nejvýraznějších pruhů u lektinu MAL II, které byly vztaženy k celkovému množství proteinů ve vzorku mezi dvěma plemeny. Při analýze signálu lektinu MAL II, která byla provedena ve dvou opakováních, byla zjištěna rozdílná intenzita signálu mezi jednotlivými vzorky. Nejsilnější signály byly naměřeny u vzorků Ca1, Ca3 a Ca7, při čemž Ca3 vykazoval nejvyšší intenzitu signálu. Vzorky Ca5, Ca6 a Ca 8 vykazovaly střední intenzitu signálu, zatím co vzorky Ca2 a Ca4 vykazovaly nejnižší intenzitu signálu. Rozdíl v sialylaci proteinů spermií v molekulových hmotnostech 50 a 60 kDa detekovaných MAL II lektinem nebyl vyhodnocen jako statisticky signifikantní ( $p < 0,05$ ).



**Obrázek 13** Vazba lektinu MAL II na sialované proteiny spermií získaných od 4 jedinců u dvou různých plemen (AUO Ca1-4 a MAO Ca5-8) na NC membráně

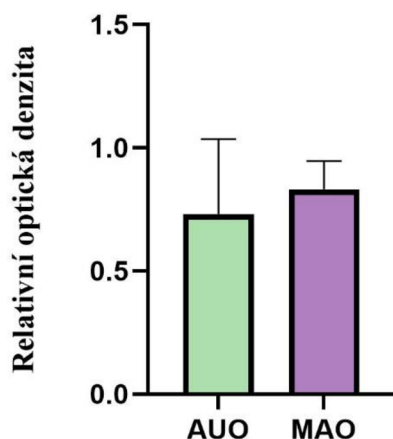


**Graf 9** Vyhodnocení optické denzity signálu lektinu MAL II u dvou pruhů.

**Graf 10** ukazuje porovnání intenzity signálu lektinu MAL II mezi plemeny AUO a MAO. Plemeno MAO projevuje vyšší průměrnou intenzitu signálu, což odpovídá sialovaným glykoproteinům, v porovnání s plemenem AUO. Variabilita v intenzitě signálu je u plemene AUO značnější, což svědčí o vyšší variabilitě v expresi těchto glykoproteinů. Naproti tomu plemeno MAO vykazuje nižší variabilitu intenzity signálu mezi jednotlivými jedinci, jak naznačuje menší rozptyl hodnot. Rozdíl v množství lektinu MAL II mezi plemeny nebyl vyhodnocen jako signifikantní ( $p > 0,05$ ).



### Porovnání signálu lektinu MAL II mezi plemeny

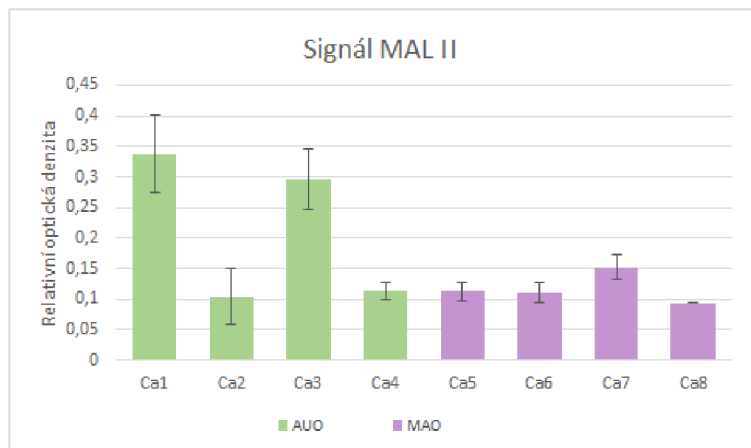


*Graf 10* Porovnání signálu lektinu MAL II u dvou pruhů mezi plemeny AUO a MAO. Odchytky jsou prezentovány jako střední chyba průměru (SEM). Vyhodnoceno t-testem  $p > 0,05$ .

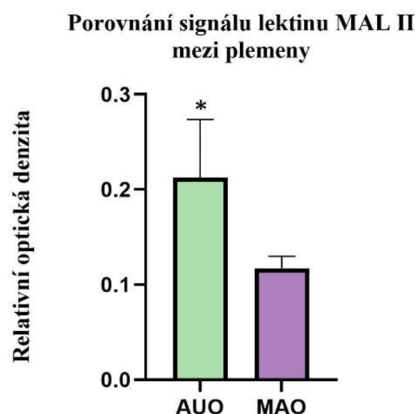
*Graf 11* ukazuje srovnání průměrné intenzity signálu lektinu MAL II v celém vzorku, které byly vztažené k celkovému množství proteinů ve vzorku mezi dvěma plemeny. Při analýze signálu lektinu MAL II, která byla provedena ve dvou opakováních, byla zjištěna rozdílná intenzita signálu mezi jednotlivými vzorky. Nejsilnější signály byly zaznamenány u vzorků Ca1 a Ca3, s tím, že Ca1 vykazoval největší intenzitu signálu v celé skupině. Vzorky Ca2, Ca4, Ca5, Ca6, Ca7 a Ca8 prezentovaly střední úroveň intenzity, přičemž vzorek Ca8 měl nejnižší a Ca7 nejvyšší intenzitu v této skupině. Rozdíly mezi jedinci v sialylaci proteinů spermií v celém vzorku detekovaných MAL II lektinem nebyl vyhodnocen jako statisticky signifikantní ( $p < 0,05$ ).

*Graf 12* prezentuje porovnání intenzity signálu lektinu MAL II v celém vzorku mezi plemeny AUO a MAO. Plemeno AUO projevuje vyšší průměrnou intenzitu signálu, což odpovídá sialovaným glykoproteinům, v porovnání s plemenem MAO. Variabilita v intenzitě signálu je u plemene AUO značnější, což svědčí o vyšší variabilitě v expresi těchto glykoproteinů. Naproti tomu plemeno MAO vykazuje nízkou variabilitu intenzity signálu mezi jednotlivými jedinci, jak naznačuje menší rozptýlení hodnot.

Statistická analýza odhalila, že rozdíly v intenzitě signálu lektinu MAL II mezi plemeny AUO a MAO jsou signifikantní s  $p$ -hodnotou  $< 0,05$ . To značí, že je velmi pravděpodobné, že pozorovaný rozdíl není výsledkem náhodné variability, ale odráží skutečný rozdíl mezi plemeny. Plemeno AUO vykazuje výrazně vyšší průměrné množství sialovaných glykoproteinů ve srovnání s plemenem MAO.



**Graf 11** Vyhodnocení optické denzity signálu lektinu MAL II u celého sloupce.

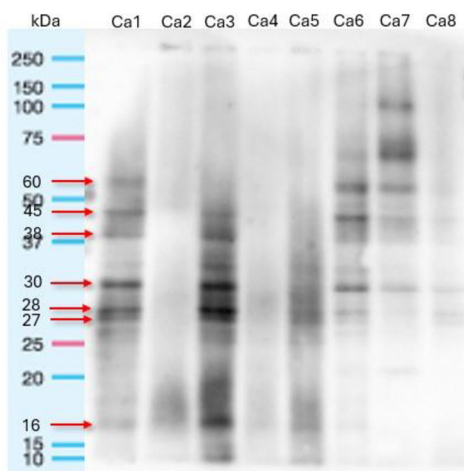


**Graf 12** Porovnání signálu lektinu MAL II u celého sloupce mezi plemeny AUO a MAO. Odchyly jsou prezentovány jako střední chyba průměru (SEM). Vyhodnoceno t-testem  $p < 0,05$ .

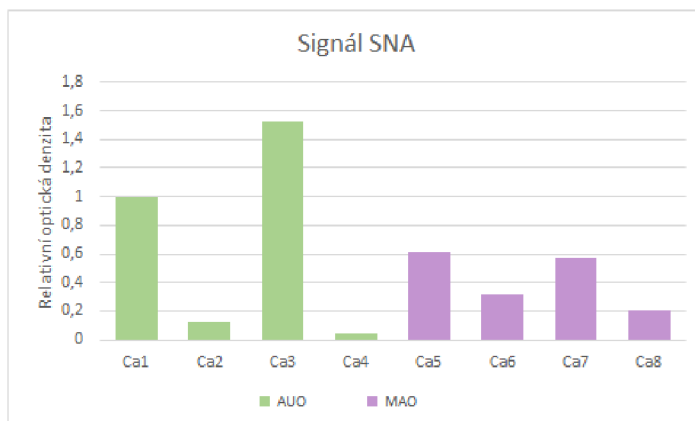
#### 5.4.2 Detekce sialových kyselin v glykoproteinech spermii vázaných $\alpha$ -2,6

Vazba lektinu SNA ukázala velkou diverzitu tohoto typu sialylace proteinů ve spermii, což se projevilo rozsáhlým spektrem detekovaných proteinů s různou molekulovou hmotností (**Obrázek 14**). Specifická hmotnost 60 kDa byla zjištěna v případě vzorků Ca1, Ca6 a Ca7. Vzorky Ca1, Ca3, Ca6 a Ca8 vykazaly přítomnost proteinů s hmotností 45 kDa. Dále byly ve vzorcích Ca1 a Ca3 identifikovány proteiny o hmotnosti 38 kDa. Proteiny s molekulární hmotností 28 kDa a 27 kDa byly pozorovány u jedinců Ca1, Ca3, Ca5, Ca6 a Ca8, což naznačuje distribuci sialovaných proteinů v těchto molekulových hmotnostech. V širším rozsahu vzorků Ca1 až Ca6 byla zaznamenána přítomnost sialylací o hmotnosti 16 kDa. Pro ověření specifičnosti detekce byla současně provedena negativní kontrola pro každou membránu inkubovaná pouze s avidinem konjugovaným s HRP bez přítomnosti lektinu. Negativní kontroly byly bez detekovaného signálu.

**Graf 13** ukazuje srovnání intenzity signálu lektinu SNA vztažené k celkovému množství proteinů ve vzorku mezi dvěma plemeny. Při analýze signálu lektinu SNA v celém vzorku byla zaznamenána variabilita intenzity signálu mezi jednotlivými vzorky. Nejsilnější signály byly identifikovány u vzorků Ca1 a Ca3, při čemž Ca3 má nejvyšší hodnotu z celého souboru. Vzorky Ca5, Ca6, Ca7 a Ca8 prezentovaly střední intenzitu signálu. Naopak, nejnižší úroveň signálu byla zjištěna u vzorků Ca2 a Ca4.



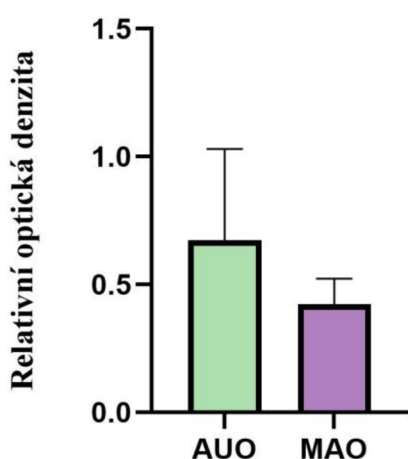
**Obrázek 14** Vazba lektinu SNA na sialované proteiny spermií získaných od 4 jedinců u dvou různých plemen (AUO Ca1-4 a MAO Ca5-8) na NC membráně.



**Graf 13** Vyhodnocení optické denzity signálu lektinu SNA.

**Graf 14** porovnává intenzity signálu lektinu SNA mezi dvěma plemeny. Plemeno AUO prokázalo vyšší průměrnou intenzitu signálu, vykazující vyšší úroveň sialovaných proteinů, ve srovnání s plemenem MAO. Variabilita v intenzitách signálu je u plemene AUO výraznější, což poukazuje na rozsáhlejší variabilitu v expresi sialovaných proteinů v tomto plemeni. Na druhou stranu, plemeno MAO, přestože má nižší průměrnou intenzitu signálu, vykazuje menší rozptyl hodnot, což svědčí o konzistentnější expresi mezi jedinci tohoto plemene. Rozdíl v množství lektinu SNA mezi plemeny nebyl vyhodnocen jako signifikantní ( $p > 0,05$ ).

**Porovnání signálu lektinu SNA mezi plemeny**

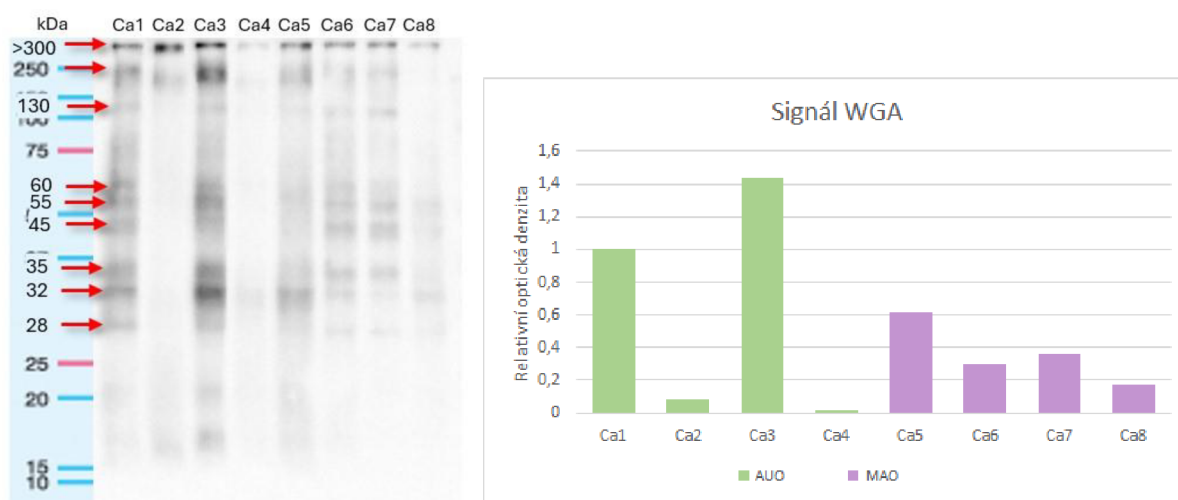


**Graf 14** Porovnání signálu lektinu SNA mezi plemeny AUO a MAO. Odchytky jsou prezentovány jako střední chyba průměru (SEM). Vyhodnoceno t-testem  $p > 0,05$ .

### 5.4.3 Detekce sialových kyselin a N-acetylglukosaminu v glykoproteinech spermií

Analýza pomocí lektinu WGA (**Obrázek 15**) odhalila široký rozsah glykosylačních profilů proteinů, zahrnující molekulové hmotnosti nad 300 kDa až k 28 kDa. Signál přesahující 300 kDa byl nalezen ve všech vzorcích. Glykosylované proteiny s molekulovou hmotností 250 kDa byly detekovány u vzorků Ca1 až Ca3, a také u Ca5 až Ca7. V kategorii 130 kDa byla přítomnost glykoproteinů potvrzena u vzorků Ca1, Ca3, Ca5, Ca6 a Ca7. Další sledované hmotnostní skupiny 60 kDa a 55 kDa byly prezentovány ve vzorcích Ca1, Ca3, Ca6 a Ca7. Podobně specifická hmotnost 45 kDa a 35 kDa byla zjištěna u stejných vzorků. Proteiny o velikosti 32 kDa a 28 kDa byly identifikovány v širším spektru vzorků, konkrétně Ca1, Ca3, Ca5 až Ca8, což může naznačovat konzistentní vzory glykosylace v těchto molekulových velikostech. Pro ověření specifčnosti detekce byla současně provedena negativní kontrola inkubovaná pouze s avidinem konjugovaným s HRP bez přítomnosti lektinu. Negativní kontrola byla bez detekovaného signálu.

**Graf 15** ukazuje srovnání intenzity signálu lektinu WGA vztažené k celkovému množství proteinů ve vzorku mezi dvěma plemeny. Při analýze signálu lektinu WGA v celém vzorku byla zjištěna výrazná rozdílnost v intenzitě mezi jedinci plemene AUO, na rozdíl od konzistentnějších signálů u plemene MAO. V rámci plemene AUO byly vzorky Ca1 a Ca3 charakterizovány jako nejsilnější signály, přičemž Ca3 měl nejvyšší hodnotu z celého souboru. Vzorky Ca5, Ca6, Ca7 a Ca8 měly signály střední intenzity. Nízkou úroveň signálu vykazoval vzorek Ca2 a nejnižší intenzitu vzorek Ca4.

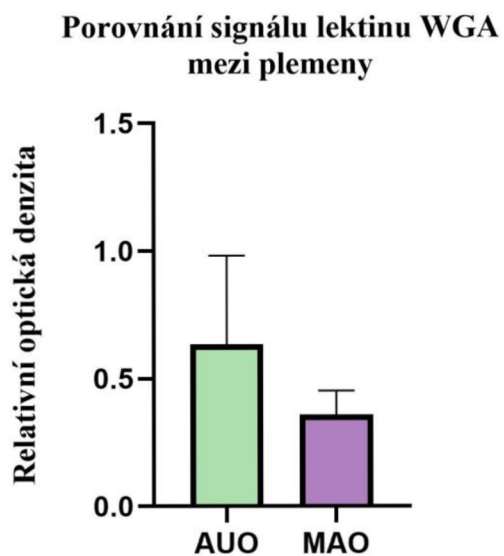


**Obrázek 15** Vazba lektinu WGA na sialované proteiny spermií získaných od 4 jedinců u dvou různých plemen (AUO Ca1-4 a MAO Ca5-8) na NC membráně.

**Graf 15** Vyhodnocení optické denzity signálu lektinu WGA.

**Graf 16** prezentuje porovnání relativní optické denzity signálu lektinu WGA mezi plemeny AUO a MAO. Plemeno AUO zaznamenalo vyšší průměrnou intenzitu signálu v porovnání s plemenem MAO. U plemene AUO byl zjištěn větší rozptyl hodnot, což poukazuje na vyšší variabilitu v intenzitě signálu sialovaných proteinů v tomto plemeni. Oproti tomu, plemeno MAO, i když má nižší průměrnou intenzitu signálu, vykazuje menší rozptyl,

což odráží nižší variabilitu v intenzitě signálu mezi jedinci tohoto plemene. Rozdíl v množství lektinu WGA mezi plemeny nebyl vyhodnocen jako signifikantní ( $p > 0,05$ ).



*Graf 16 Porovnání signálu lektinu WGA mezi plemeny AUO a MAO. Odchytky jsou prezentovány jako střední chyba průměru (SEM). Vyhodnoceno t-testem  $p > 0,05$ .*

## 6 Diskuze

Výsledky naší studie poskytují nový pohled na proteomiku spermií psů, což je důležité pro pochopení reprodukčních strategií a kvality spermií mezi různými plemeny. Přestože byly v naší práci identifikovány významné biomarkery spojené s fertilizační schopností, je třeba vzít v úvahu metodologické omezení výzkumu, které mohlo ovlivnit naše závěry.

AUO a MAO jsou úzce příbuzná plemena. MAO byl vyšlechtěn v 60. letech 20. století v Kalifornii selektivním šlechtěním malých AUO, tak aby byl zachován jejich celkový exteriér a kvality původního plemene, jen v menším provedení. Toto selektivní šlechtění vedlo k vytvoření MAO jako samostatného plemene, které sdílí mnoho společných vlastností s AUO (Smrčková 2005). Mohli bychom tedy předpokládat, že rozdíly mezi plemeny by měly být minimální.

Protein AKAP4 je vysoce konzervovaný napříč různými savčími druhy, jak ukazuje studie Hu et al. (2009). Jeho úloha je klíčová pro strukturu bičíku, chemotaxi, kapacitaci a pohyblivost spermií, což naznačuje jeho potenciální vliv na kvalitu a plodnost spermií (Blommaert et al. 2019). Naše výsledky potvrzují, že protein AKAP4 se vyskytuje ve spermiích psů s molekulovou hmotností 82 kDa, což odpovídá zjištěním studie Couazer & Bencharif (2021). V rámci plemene AUO a MAO byl AKAP4 detekován konzistentně napříč všemi jedinci bez statisticky významných rozdílů, což naznačuje jeho uniformní expresi mezi zkoumanými skupinami. Dále byla potvrzena lokalizace tohoto proteinu v bičíku spermií, což koresponduje s dřívějšími zjištěními u myši (Miki et al., 2002). Pomocí imunofluorescence byl zaznamenán silný signál převážně v hlavní části bičíku, zatímco střední část bičíku vykazovala méně intenzivní signál. Vzhledem k tomu, že tento výzkum nezahrnoval analýzu motilních a nemotilních frakcí spermií, dalším krokem by mohla být selekce spermií a následná studie, zda motilní spermie vykazují odlišnou intenzitu signálu AKAP4 ve srovnání s nemotilními. Takový přístup by nám mohl poskytnout lepší pochopení vztahu mezi lokalizací a množstvím AKAP4 a fertilizační schopností spermií, což by mohlo sloužit jako indikátor pro výběr spermií s vyšší pravděpodobností úspěšného oplodnění.

Výzkumy ukazují, že posttranslační modifikace, jako je fosforylace, jsou klíčové pro vývoj a maturaci spermií, a to nejen v nadvarlatech, ale i během samotné kapacitace (Baker, 2016). Studie Jones et al. (2008) ukazuje, že fosforylované proteiny jsou koncentrovány zejména v ekvatoriálním segmentu hlavičky spermie u různých savců, což koreluje s našimi pozorováními fosforylovaných proteinů ve spermiích psů. Tato oblast hlavičky spermie je podle Jones et al. (2008) považována za organizační centrum pro multimolekulární komplexy, které jsou zásadní pro zprostředkování akrozomové reakce. Ve své studii identifikovali proteiny o molekulových hmotnostech 34 a 39 kDa u kance a 35 a 40 kDa u berana, což se podobá naší detekci proteinů o hmotnostech 40, 35 a 30 kDa u psů (Jones et al. 2008). Tento fakt podporuje tvrzení, že protilátka PTyr 4G10 je efektivním nástrojem pro identifikaci fosforylovaných proteinů napříč různými druhy savců. V našem výzkumu byl statisticky signifikantní rozdíl ve fosforylaci proteinu o molekulové hmotnosti 40 kDa zjištěn mezi vzorky u jednoho plemene (AUO), což naznačuje, že fosforylace může být indikátorem dobré motility. Tyto zjištěné rozdíly mezi jednotlivými vzorky AUO mohou odrážet variabilitu v reprodukční schopnosti tohoto plemene, což zdůrazňuje potenciál hodnocení míry fosforylace jako biomarkeru pro kvalitu spermií. Nicméně, absence signifikantních rozdílů v celkové míře PTyr mezi plemeny

AUO a MAO naznačuje, že přestože fosforylace je důležitým faktorem maturace, její úroveň sama o sobě nemusí přímo odrážet plemenné rozdíly v reprodukčním potenciálu. Tento nálezn poskytuje cenný vlned do komplexnosti fosforylačních procesů a jejich role ve funkci spermií, a ukazuje na potřebu dalšího výzkumu pro hlubší porozumění těchto mechanismů.

V naší studii poskytl zvlášt' zajímavé výsledky lektin MAL II, který specificky váže sialové kyseliny vázané na  $\alpha$ -2,3 v glykoproteinech spermií. Zatímco studie Xin et al. (2014) zaznamenala celkově nižší úrovně vazby lektinu MAL II u nehumánních vzorků ve srovnání s humánními. Naše zjištění ukazují, že výrazné signály byly přítomny hlavně u molekulových hmotností 60 a 50 kDa. I když rozdíly v sialylaci těchto dvou proteinů detekované pomocí lektinu MAL II nebyly statisticky signifikantní, specifická vazba lektinu byla zjištěna u několika molekulových hmotností (30 a 20 kDa) pouze u plemene AUO, což nebylo pozorováno u plemene MAO. Vzorky od plemene AUO vykazovaly vyšší a variabilnější signály sialylace napříč jedinci, což naznačuje, že pozorované rozdíly mezi plemeny nejsou pouze důsledkem náhodné variability, ale odrážejí skutečné biologické rozdíly. Spermie u plemene AUO zjevně obsahují vyšší průměrné množství sialovaných glykoproteinů ve srovnání s plemenem MAO, což by mohlo mít důsledek pro funkci spermií a reprodukční úspěšnost. Zajímavým pozorováním je, že v apikální části hlavičky spermií plemene AUO byla zjištěna sialylace, která chyběla u plemene MAO. Toto zjištění vyvolává otázky ohledně možných funkčních následků variability v sialylaci mezi plemeny a naznačují potřebu dalších studií, které by mohly odhalit, jak rozdíly v sialylaci ovlivňují interakci spermií s molekulami v pohlavním traktu samice včetně interakce s oocytem a jak tyto interakce mohou ovlivnit úspěšnost fertilizace. Další studie by mohly přinést lepší pochopení těchto procesů, což by pomohlo ve vývoji nových přístupů k řízení reprodukce a zlepšení fertilizačního potenciálu psích spermií.

Toto zjištění vyvolává otázky ohledně možných funkčních následků variability v sialylaci mezi plemeny a poukazuje na důležitost dalšího prozkoumání toho, jak tyto rozdíly mohou ovlivňovat nejen interakci spermií s molekulami v reprodukčním traktu samice, ale také úspěšnost spermie při průniku a fúzi s oocytem. Důkladnější pochopení těchto interakcí by mohlo přinést klíčové informace pro vývoj nových terapeutických strategií a zlepšení šlechtitelských programů, zaměřených na zvýšení reprodukční efektivity. Vzhledem k těmto potenciálním aplikacím je nezbytné provést další výzkumy, které by se zaměřily na detailní mapování a funkční analýzu sialylačních vzorů ve spermiích, aby bylo možné identifikovat specifické molekulární cesty zodpovědné za tyto kritické reprodukční procesy.

Dosud nebyla publikována žádná studie, která by se zabývala sialylací proteinů u psích spermií. U jiných druhů tyto studie existují a zabývají se především sialylací v souvislosti s motilitou spermií, ale i ochranou spermií před imunitním systémem samice (Teclé & Gagneux 2015). Detekce sialových kyselin vázaných na  $\alpha$ -2,6 pomocí lektinu SNA odhalila značnou diverzitu v sialylaci proteinů spermií, což bylo patrné z širokého spektra molekulových hmotností detekovaných u různých jedinců. Zaznamenána byla značná variabilita v intenzitě signálů, přičemž u plemene AUO byla tato variabilita výraznější, avšak nebyla statisticky signifikantní. Tento výsledek poukazuje na individuální rozdíly v glykosylačních profilech spermií, které mohou ovlivňovat jejich funkční vlastnosti. Významnější bylo zjištění, že ačkoli oligosacharidy identifikované lektiny MAL II a SNA nevykazovaly konzistentní vzorce detekce ve spektru molekulových hmotností, oba lektiny identifikovaly stejné vazebné místo

ve spermiích u obou plemen. Výjimku tvořil vzor v apikální části hlavičky spermií u plemene AUO. Tento nález koresponduje s výzkumem Desantis et al. (2010), který popisuje podobné lokalizační vzory u těchto dvou lektinů mezi sebou ve spermiích u koní. Přítomnost sialovaných glykoproteinů v této oblasti pak naznačuje jejich potenciální roli v interakci spermií s oocytem a jejich schopnost chránit spermii v reprodukčním traktu samice, jak uvádí Tecle & Gagneux (2015). Zjištění, že lektiny MAL II a SNA by mohly být použity jako podobné a užitečné markery pro studium sialylace spermií v rámci psích plemen, zdůrazňuje potřebu dalšího výzkumu toho, jak rozdíly v sialylačních profilech mohou ovlivňovat funkční vlastnosti spermií a jejich interakce v průběhu reprodukčního procesu.

Detekce sialových kyselin a N-acetylglukosaminu v glykoproteinech spermií pomocí lektinu WGA odhalila širokou škálu glykosylačních profilů proteinů spermií, přičemž byla zaznamenána výrazná variabilita mezi jednotlivými jedinci. Tato variabilita znemožnila jednoznačné určení konzistentních molekulových hmotností signálů pro všechny jedince v rámci obou plemen. Přestože byly mezi plemeny zaznamenány rozdíly v intenzitě a rozsahu glykosylačních profilů, nebyly tyto rozdíly statisticky signifikantní. Významným výsledkem byla konzistentní lokalizace těchto struktur v akrozomové oblasti hlavičky spermií. Tento náález koreluje se studii Sinowatz & Friess (1983), které identifikovaly podobnou lokalizaci glykoproteinů v býčích spermiích nadvarlete, a s výzkumem Verini-Supplizi et al. (2000), který zaznamenal vazbu lektinu WGA v akrozomové oblasti spermií z nadvarlat koní. Tato konzistentní lokalizace napříč druhy naznačuje, že akrozomová oblast, která hraje důležitou roli v počátečních fázích interakce spermií s oocytem (Florman & First 1988), obsahuje vysoké koncentrace specifických glykoproteinů. Zjištění v rámci naší studie poukazuje na potřebu dalšího výzkumu pro hlubší pochopení, jak specifické glykosylační vzory na psích spermiích mohou ovlivňovat jejich funkční vlastnosti, včetně jejich schopnosti úspěšně oplodnit oocyt.

Cytoskeletální protein  $\alpha$ -tubulin ve spermiích vykazuje vysokou míru polymorfismu prostřednictvím různých posttranslačních úprav, které zahrnují glutamylace a acetylace. Tyto úpravy jsou důležité pro funkční diferenciaci mikrotubulů v různých částech spermií, jako je axonema v bičíku (Redeker et al. 1998). Přítomnost glutamylovaného tubulinu byla identifikována jako zásadní pro stabilitu mikrotubulů ve spermiích, což naznačuje, že tato úprava může být nezbytná pro udržení strukturální integrity spermií během fertilizace a pohybových procesů (Fouquet et al. 1994). Detekovali jsme  $\alpha$ -tubulin (55 kDa) v rozdílné intenzitě mezi jedinci. Na rozdíl od předchozích studovaných molekul plemeno MAO, vykazuje vyšší průměrnou intenzitu signálu ve srovnání s plemenem AUO. To může značit, že plemeno MAO má více studovaného proteinu než plemeno AUO. Tyto rozdíly mezi plemeny však nebyly vyhodnoceny jako statisticky signifikantní.

Pomocí lektinu Concanavalin A (ConA), který specificky váže  $\alpha$ -D-glukózu a  $\alpha$ -D-manózu v glykanech, bylo zjištěno jasné lokalizační rozložení na spermiích psů. Nejintenzivnější signály byly lokalizovány v akrozomové oblasti hlavičky spermie, což koreluje s nálezy u hřebčích a býčích spermií popsány v studiích Verini-Supplizi et al. (2000) a Sinowatz & Friess (1983). Tyto studie zdůrazňují význam oblasti akrozomové čepičky jako klíčového místa pro interakci spermií se *zona pellucida* oocyty (Florman & First 1988). Navíc byly slabší signály ConA detekovány na zbytku hlavičky a střední části bičíku spermie, s nejslabšími signály pozorovanými až v hlavní a koncové části bičíku. Žádná z předchozích



studií nezmiňuje vazbu ConA mimo akrozomovou oblast, což otevírá potenciální nové možnosti pro další výzkum.

V této práci byly identifikovány specifické lokalizace a modifikace, které byly dříve málo prozkoumané, což poskytuje výchozí bod pro další studie, které by tyto aspekty mohly detailněji rozpracovat. I přes významné přínosy je třeba zmínit některé limitující faktory tohoto výzkumu, které mohou ovlivnit interpretaci výsledků. K těmto faktorům patří malý počet pozorovaných jedinců v rámci plemene, omezený čas pro experimenty a skutečnost, že výsledky pochází pouze z jednoho odběru ejakulátu. Tyto omezení mohou významně ovlivnit výklad získaných dat.

A však ve většině předchozích studií (González-Chábarri et al. 1994; Kawakami et al. 2002; Couazer & Bencharif 2021), které se zaměřovaly na analýzu psích spermií, byly vzorky získány z různých plemen psů nebo dokonce z kříženců, což může vést k značné heterogenitě v získaných datech. Naopak naše studie, zaměřující se specificky na dvě plemena psů, poskytuje homogennější vzorky, což zvyšuje reprezentativnost a průkaznost našich výsledků. Toto zacílení umožňuje přesnější charakterizaci proteinových profilů a jejich postranlačních modifikací specifických pro dané plemeno, což může přispět k lepšímu pochopení plemenných rozdílů ve fertilizační schopnosti a kvalitě spermií. Tato studie tak představuje komplexní průzkum detekce a lokalizace molekul, který v oblasti výzkumu psích spermií dosud nebyl kompletně prozkoumán. Vzhledem k tomu, že zkoumaní jedinci mají prokázaný původ a jsou ověřeni v chovu s více potomky, můžeme předpokládat, že kvalita jejich spermií adekvátní nejen pro tento, ale i budoucí výzkumy.

Tato pilotní studie by mohla sloužit jako impulz pro další výzkumné skupiny ke zkoumání a rozšíření získaných poznatků, což by mohlo obohatit reprodukční biologii psů o nové perspektivy. Konkrétně by bylo zajímavé důkladněji studovat charakter postranlačních modifikací, které prokázaly statisticky významné rozdíly, jelikož mohou klíčově přispět k hlubšímu pochopení biochemických procesů v rámci maturace spermií. Bylo by také užitečné zkoumat role sialových kyselin vázaných na  $\alpha$ -2,3 v glykoproteinech spermií, které byly identifikovány pomocí lektinu MAL II a ukázaly výraznou specifčnost pro plemeno AUO, což naznačuje potenciál pro rozvoj nových biomarkerů, které by mohly být použity k hodnocení fertilizačního potenciálu spermií.

Navíc by bylo vhodné rozšířit studii o další plemena psů, aby bylo možné srovnávat glykosylační a fosforylační vzory proteinů spermií napříč širším proteomickým spektrem. Toto by mohlo přinést lepší porozumění proteinů a jejich postranlačních modifikací na tyto důležité reprodukční charakteristiky. Výzkum by se rovněž měl zaměřit na sjednocení dat z molekulárních studií s reprodukčními výsledky, jako je míra úspěšnosti oplodnění, počet a kvalita potomků, či dlouhodobá plodnost, což by umožnilo vytvoření mohutnějších modelů predikujících reprodukční úspěch. Tento multidisciplinární přístup by nejenže poskytl cenné informace o molekulárních výbavě ovlivňujících fertilizaci, ale také by mohl přispět k rozvoji přesnějších diagnostických nástrojů pro veterinární medicínu a šlechtění psů.

## 7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo, detekovat a lokalizovat protein AKAP4, kvantifikovat fosforylované a sialované molekuly ve spermích psů a statisticky vyhodnotit rozdíly v množství AKAP4 proteinu, míře fosforylace a sialylace proteinů mezi jedinci dvou vybraných příbuzných plemen psů

- Podařilo se detekovat a lokalizovat protein AKAP4 u obou plemen psů. Detekce proteinu byla v molekulové velikosti 82 kDa. U plemene AUO byla potvrzena větší variabilita v intenzitě signálu. Výsledky však nevykazovaly významný statistický rozdíl. Tento protein byl také lokalizován v silné míře v bičíku spermie a v malé míře ve střední části bičíku spermie.
- Podařilo se detekovat a lokalizovat fosforylované proteiny pomocí PTyr 4G10 u obou plemen psů. Fosforylované proteiny byly detekovány v molekulové velikosti 40, 35 a 30 kDa. Výsledky u měření ukázaly signifikantní rozdíl ve fosforylaci 40kDa proteinu spermii v rámci jednoho plemene AUO mezi vzorky Ca1 a Ca2 a také mezi Ca2 a Ca3. Analýza také ukázala, že plemeno AUO má statisticky signifikantně vyšší průměrnou intenzitu signálu protilátky PTyr 4G10 než plemeno MAO odpovídající celkové fosforylaci proteinů. Fosforylované molekuly byly lokalizovány u obou plemen v ekvatoriálním segmentu hlavičky spermie.
- Podařilo se detekovat i lokalizovat sialové kyseliny v glykoproteinech spermii vázaných  $\alpha$ -2,3 pomocí lektinu MAL II. Nejvýraznější signál byl v hmotnostních pásmech 60 a 50 kDa. Pouze u plemene AUO byla detekována specifická vazba lektinu o hmotnostních velikostech 30 a 20 kDa. Analýza vazby lektinu u 60 a 50kDa glykoproteinů nebyla vyhodnocena jako signifikantní. Statistická analýza u celého vzorku však odhalila, že rozdíly v intenzitě signálu lektinu MAL II mezi plemeny AUO a MAO jsou signifikantní. U plemene AUO byly lokalizovány sialové kyseliny vázané  $\alpha$ -2,3 s výrazným signálem ve střední části bičíku, s méně výrazným signálem v hlavní části bičíku a signálem v apikální části hlavičky spermie, u plemene MAO se signál v apikální části hlavičky téměř nevyskytoval.
- Podařilo se detekovat i lokalizovat sialové kyseliny v glykoproteinech spermii vázaných  $\alpha$ -2,6 pomocí lektinu SNA. Při čemž tato vazba prokázala velkou diverzitu tohoto typu sialylace, která se projevila u různých jedinců i plemene, a to v hmotnostních velikostech 60, 45, 38, 28, 27 a 16 kDa. Při porovnání vazby mezi dvěma plemeny nebyl vyhodnocen signifikantní rozdíl. Vazba  $\alpha$ -2,6 byla lokalizována u obou plemen v nejvýraznější intenzitě ve střední části bičíku a v méně výrazné intenzitě v hlavní části bičíku.
- Podařilo se detekovat i lokalizovat sialové kyseliny a N-acetylglukosamin v glykoproteinech spermii. Detekce pomocí lektinu WGA objevila velký rozsah glykosylačních profilů proteinů, které se u různých jedinců a plemen o molekulové hmotnosti >300, 250, 130, 60, 55, 45, 35, 32 a 28 kDa. Míra tohoto typu glykosylace rozpoznávaná WGA lektinem mezi dvěma plemeny nebyla vyhodnocena jako signifikantní. Pomocí WGA lektinu byly lokalizovány sacharidové struktury v podobě silného signálu v akrozomová části hlavičky u obou plemen.

- Podařilo se detekovat  $\alpha$ -tubulin, který vykazoval hmotnostní velikost 55 kDa a variabilitu mezi jednotlivci. Při porovnání vazby mezi dvěma plemeny nebyl vyhodnocen signifikantní rozdíl.
- Podařilo se lokalizovat pomocí ConA  $\alpha$ -D-glukózu a  $\alpha$ -D-manózu v glykanech spermií v celé spermii s nejsilnějším signálem v akrozomové oblasti hlavičky. Tento signál postupně slábl a pokračoval směrem k posteriorní části hlavičky spermie a střední části bičíku spermie. Méně výrazný signál pak pokračoval až do hlavní a koncové části bičíku spermie.

Závěrem lze konstatovat, že naše výsledky potvrdily signifikantní rozdíly ve fosforylovaných proteinech mezi plemeny a zdůraznily variabilitu v množství proteinů a jejich posttranslačních modifikacích mezi jedinci. Je však nutné zdůraznit, že proteomické studie obecně čelí omezením spojeným s extrakcí proteinů, což může ovlivnit interpretaci výsledků. Pro získání jasnějších závěrů a lepšího porozumění reprodukčním mechanismům je nezbytné propojit data z molekulárních studií s reprodukčními výsledky, jako jsou míra úspěšnosti oplodnění, počet a kvalita potomků, či dlouhodobá plodnost. Takové sjednocení by umožnilo vytvoření mohutnějších modelů, které by přesněji predikovaly fertilizační úspěch.

## 8 Literatura

- Aebersold R, Mann M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**:198-207. Available at [10.1038/nature01511](https://doi.org/10.1038/nature01511) (accessed February 25, 2024).
- Amaral A, Castillo J, Ramalho-Santos J, Oliva R. 2014. The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and clinical science. *Human reproduction update* **20**:40-62. Available at [10.1093/humupd/dmt046](https://doi.org/10.1093/humupd/dmt046) (accessed April 21, 2024).
- Aquino-Cortez A, Silva LDM da, Araújo AA de, Menezes E da SB de, Moura A de AAN. 2016. Proteins of the canine seminal plasma. *ANIMAL REPRODUCTION* **46**:901-908. Available at [10.1590/0103-8478cr20150972](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150972) (accessed April 21, 2024).
- Araujo MS, Paulo OLOH, Scott C, Paranzini CS, Codognoto VM, Dell'Aqua CPF, Papa FO, Souza FF. 2022. Insights into the influence of canine breed on proteomics of the spermatozoa and seminal plasma. *Journal of Proteomics* **257**. Available at <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104508> Get rights and content (accessed August 30, 2023).
- Bairoch A. 2000. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Research* **28**:304-305. Available at [10.1093/nar/28.1.304](https://doi.org/10.1093/nar/28.1.304) (accessed February 27, 2024).
- Baker MA. 2016. Proteomics of post-translational modifications of mammalian spermatozoa. *Cell Tissue* **363**:279–287. Available at [10.1007/s00441-015-2249-x](https://doi.org/10.1007/s00441-015-2249-x) (accessed April 19, 2024).
- Balcan E. 2016. Quantitative approach to lectin-based glycoprofiling of thymic tissues in the control – and the dexamethasone-treated mice. *Tissue & cell* **48**:168-82. Available at [10.1016/j.tice.2016.03.010](https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.03.010) (accessed April 12, 2024).
- Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, Forti G. 1991. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl* **12**:323-30. Available at [10.1002/j.1939-4640.1991.tb01610.x](https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1991.tb01610.x) (accessed March 10, 2024).
- Bannai H, Yoshimura M, Takahashi K, Shingyoji C. 2000. Calcium regulation of microtubule sliding in reactivated sea urchin sperm flagella. *J Cell Sci* **113**:831–839. Available at [10.1242/jcs.113.5.831](https://doi.org/10.1242/jcs.113.5.831) (accessed March 9, 2024).
- Bayer EA, Ben-Hur H, Wilchek M. 1987. Enzyme-based detection of glycoproteins on blot transfers using avidin-biotin technology. *Anal Biochem* **161**:123-31. Available at [10.1016/0003-2697\(87\)90661-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90661-0) (accessed April 21, 2024).
- Bayram H, Claydon A, Brownridge P, Hurst J, Mileham A, Stockley P, Beynon R, Hammond D. 2016. Cross-species proteomics in analysis of mammalian sperm proteins... *Journal of proteomics* **135**:38-50. Available at [10.1016/j.jprot.2015.12.027](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.12.027). (accessed February 27, 2024).
- Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer JL. 2015. *Biochemistry* 8th edition. W. H. Freeman.

- Bernal A, Torres J, Reyes A, Rosado A. 1980. Presence and regional distribution of sialyl transferase in the epididymis of the rat. *Biol Reprod* **23**:290–293. Available at 10.1095/biolreprod23.2.290 (accessed April 12, 2024).
- Bertolla R. 2020. Sperm biology and male reproductive health. *Scientific Reports* **10**. Available at 10.1038/s41598-020-78861-7. (accessed February 28, 2024).
- Blommaert D, Sergeant N, Delehedde M, Jouy N, Mitchell V, Franck T, Donnay I, Lejeune JP, Serteyn D. 2019. Expression, localization, and concentration of A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) and its precursor (proAKAP4) in equine semen: Promising marker correlated to the total and progressive motility in thawed spermatozoa. *Theriogenology*:52-60. Available at 10.1016/j.theriogenology.2019.03.011 (accessed April 19, 2024).
- Brůnová L. 2008. Proteinové inženýrství lektinů – cílená metagenéze patogenních lektinů. Diplomová práce. Brno.
- Burton KA, McKnight GS. 2007. PKA, germ cells, and fertility. *Physiology (Bethesda)* **22**:40-6. Available at 10.1152/physiol.00034.2006 (accessed April 21, 2024).
- Carlin AF, Uchiyama S, Chang YC, Lewis AL, Nizet V, Varki A. 2009. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood* **113**:3333–3336. Available at 10.1182/blood-2008-11-187302 (accessed April 12, 2024).
- Cavada BS, Pinto-Junior VR, Osterne VJS, Nascimento KS. 2018. ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. *Molecular Sciences* **21**:30. Available at 10.3390/ijms20010030 (accessed April 12, 2024).
- Clegg CH, Abrahamsen MS, Degen JL, Morris DR, McKnight GS. 1992. Cyclic AMP-dependent protein kinase controls basal gene activity and steroidogenesis in Y1 adrenal tumor cells. *Biochemistry* **31**:3720-3726. Available at 10.1021/bi00129a023 (accessed March 9, 2024).
- Cooper TG. 1986. *The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization*. Springer-Verlag, Berlin.
- Corbin JD, Keely SL, Park CR. 1975. The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3':5' monophosphate dependent protein kinases in adipose, cardiac, and other tissues. *J. Biol. Chem.*
- Couazer D, Bencharif D. 2021. Are AKAP4 and proAKAP4 Found in Canine Semen? Preliminary Results. *Aspects of Nanotechnology* **3**:70-75. Available at <https://doi.org/10.36959/758/542> (accessed January 25, 2024).
- Čtvrtníčková L. 2009. *Lektiny*. Bakalářská. Brno.
- Desantis S, Ventriglia G, Zizza S, Nicassio M, Valentini L, Summa AD, Lacalandra GM. 2010. Lectin-binding sites on ejaculated stallion sperm during breeding and non-breeding periods. *Theriogenology* **73**:146-1153. Available at 10.1016/j.theriogenology.2009.12.001 (accessed April 19, 2024).

- Dias MH, Kitano ES, Iwai LK. 2016. Proteomics and drug discovery in cancer. *Drug Discovery Today* **22**:264–277. Available at <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.10.004>. (accessed January 5, 2024).
- Dziembowski A, Seraphin B. 2004. Recent developments in the analysis of protein-protein interactions. *EMBO reports* **5**:1361-1367. Available at [10.1038/sj.embor.7400324](https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400324) (accessed February 27, 2024).
- Eliuk S, Makarov A. 2015. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* **8**:61-80. Available at [10.1146/annurev-anchem-071114-040325](https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071114-040325) (accessed April 21, 2024).
- Ellis D, Shadan S, James P, Henderson R, Edwardson J, Hutchings A, Jones R. 2002. Post-testicular development of a novel membrane substructure within the equatorial segment of ram, bull, boar, and goat spermatozoa as viewed by atomic force microscopy... *Journal of structural biology* **138**:187-198. Available at [10.1016/S1047-8477\(02\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(02)00025-4) (accessed February 29, 2024).
- England G, Heimendahl A. 2011. *BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology* Second edition. British Small Animal Veterinary Association.
- Fardilha M, Esteves S, Korrodi-Gregório L, Pelech S, Silva O, Silva E. 2011. Protein phosphatase 1 complexes modulate sperm motility and present novel targets for male infertility. *Molecular human reproduction* **17**:466-77. Available at [10.1093/molehr/gar004](https://doi.org/10.1093/molehr/gar004) (accessed April 12, 2024).
- Ficarro S et al. 2003. Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. *J Biol Chem* **28**:11579-89. Available at [10.1074/jbc.M202325200](https://doi.org/10.1074/jbc.M202325200) (accessed March 10, 2024).
- Flesch FM, Gadella BM. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta* **1469**:197-235. Available at [10.1016/S0304-4157\(00\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00018-6) (accessed February 29, 2024).
- Florman H, First N. 1988. The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. *Developmental biology* **128**:453-63. Available at [10.1016/0012-1606\(88\)90307-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90307-7) (accessed April 20, 2024).
- Foster LJ et al. 2006. A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell* **125**:187-199. Available at [10.1016/j.cell.2006.03.022](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.022) (accessed February 25, 2024).
- Fouquet J, Eddé B, Kann M, Wolff A, Desbruyères E, Denoulet P. 1994. Differential distribution of glutamylated tubulin during spermatogenesis in mammalian testis. *Cell motility and the cytoskeleton* **27**:49-58. Available at [10.1002/CM.970270106](https://doi.org/10.1002/CM.970270106) (accessed April 19, 2024).
- Freitas M, Vijayaraghavan S, Fardilha M. 2016. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biology of Reproduction* **96**:2–12. Available at [10.1095/biolreprod.116.144337](https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.144337) (accessed March 9, 2024).

- Friend DS. 1982. Plasma-membrane diversity in a highly polarized cell. *J. Cell Biol.* **93**:243-249. Available at 10.1083/jcb.93.2.243 (accessed February 29, 2024).
- Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *International Journal of Developmental Biology* **52**:473–480. Available at 10.1387/ijdb.082583bg (accessed February 29, 2024).
- Garfin DE. 2009. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol* **463**:497-513. Available at 10.1016/S0076-6879(09)63029-9 (accessed April 21, 2024).
- Gavin AC et al. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**:141-147. Available at 10.1038/415141a (accessed February 25, 2024).
- Ghaderi D, Springer SA, Ma F, Cohen M, Secrest Taylor RE, Varki A, Gagneux P. 2011. Sexual selection by female immunity against paternal antigens can fix loss of function alleles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:17743–17748. Available at 10.1073/pnas.1102302108 (accessed April 12, 2024).
- González-Chábarri E, Aguado JA, Navarro M, López-Rodas V, Costas E. 1994. The use of lectins to characterize and separate living canine spermatozoa: A preliminary study. *Theriogenology*. **41**:365-9. Available at 10.1016/0093-691x(94)90071-p (accessed April 20, 2024).
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**:3665-3685. Available at 10.1002/pmic.200401031 (accessed February 27, 2024).
- Gottlieb RA, Adachi S. 2000. Nitrogen cavitation for cell disruption to obtain mitochondria from cultured cells. *Methods Enzymol* **322**:213-21. Available at 10.1016/s0076-6879(00)22022-3 (accessed April 21, 2024).
- Grabski AC. 2009. Advances in preparation of biological extracts for protein purification. *Methods Enzymol* **463**:285-303. Available at 10.1016/S0076-6879(09)63018-4 (accessed April 21, 2024).
- Graf CB, Ritagliati C, Stival C, Luque GM, Gentile I, Buffone MG, Krapf D. 2020. Everything you ever wanted to know about PKA regulation and its involvement in mammalian sperm capacitation. *Molecular and Cellular Endocrinology* **518**. Available at 10.1016/j.mce.2020.110992 (accessed April 13, 2024).
- Gygi SP et al. 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology* **17**:994-999. Available at 10.1038/13690 (accessed February 25, 2024).
- Hereng TH, Elgstoen KBP, Cederkvist FH, Eide L, Jahnsen T, Skalhegg BS, Rosendal KR. 2011. Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa. *Hum Reprod* **26**:3249–3263. Available at 10.1093/humrep/der317 (accessed March 9, 2024).

- Hitit M et al. 2021. Proteomic fertility markers in ram sperm. *Anim Reprod Sci* **235**:106882. Available at [10.1016/j.anireprosci.2021.106882](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106882) (accessed April 21, 2024).
- Ho HC, Granish KA, Suarez SS. 2002. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca<sup>2+</sup> and not cAMP. *Dev Biol* **250**. Available at 208–217 (accessed March 9, 2024).
- Hu Y, Yu H, Pask AJ, O'Brien DA, Shaw G, Renfree MB. 2009. A-kinase anchoring protein 4 has a conserved role in mammalian spermatogenesis. *REPRODUCTION* **137**:645–653. Available at [10.1530/REP-08-0337](https://doi.org/10.1530/REP-08-0337) (accessed April 19, 2024).
- Huang L, Durick K, Weiner J, Chun J, Taylor S. 1997. D-AKAP2, a novel protein kinase A anchoring protein with a putative RGS domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:11184–9. Available at [10.1073/PNAS.94.21.11184](https://doi.org/10.1073/PNAS.94.21.11184) (accessed April 15, 2024).
- Huang Z, Somanath PR, Chakrabarti R, Eddy EM, Vijayaraghavan S. 2005. Changes in Intracellular Distribution and Activity of Protein Phosphatase PP1 $\gamma$ 2 and Its Regulating Proteins in Spermatozoa Lacking AKAP4. *Biology of Reproduction* **72**:384–392. Available at [10.1095/biolreprod.104.034140](https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.034140) (accessed March 10, 2024).
- Chen X, Varki A. 2010. Advances in the biology and chemistry of sialic acids. *ACS Chem Biol* **5**:163–176. Available at [doi.org/10.1021/cb900266r](https://doi.org/10.1021/cb900266r) (accessed April 12, 2024).
- Chmelík J. 2005. Proteomický průvodce. *Chemické Listy* **99**:883–885.
- Chung JJ, Miki K, Kim D, Shim S-H, Shi HF, Hwang JY, Cai X, Iseri Y, Zhuang X, Clapham DE. 2017. CatSper $\zeta$  regulates the structural continuity of sperm Ca<sup>2+</sup> signaling domains and is required for normal fertility. *ELife* **6**: e23082. Available at [doi.org/10.7554/eLife.23082](https://doi.org/10.7554/eLife.23082) (accessed April 12, 2024).
- Ishihama Y. 2005. Protein chromatography on a microchip. *Journal of Chromatography A* **1079**:24–34. Available at [10.1016/j.chroma.2005.03.117](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.117) (accessed February 27, 2024).
- Jalali M, Saldanha FYL, Jalali M. 2017. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Academic Press.
- Jarnaess E, Ruppelt A, Stokka AJ, Lygren B, Scott JD, Taskén K. 2008. Dual specificity A-kinase anchoring proteins (AKAPs) contain an additional binding region that enhances targeting of protein kinase A type I. *J Biol Chem* **283**:33708–18. Available at [10.1074/jbc.M804807200](https://doi.org/10.1074/jbc.M804807200) (accessed April 15, 2024).
- Jarnæss E, Taskén K. 2007. Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes. *Biochemical Society Transactions* **35**:931–937. Available at [10.1042/BST0350931](https://doi.org/10.1042/BST0350931) (accessed March 10, 2024).
- Jensen LJ et al. 2009. STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Research* **37**: D412–6. Available at [10.1093/nar/gkn760](https://doi.org/10.1093/nar/gkn760) (accessed February 27, 2024).
- Jensen ON. 2006. Interpreting the protein language using proteomics **7**:391–403. Available at [10.1038/nrm1939](https://doi.org/10.1038/nrm1939) (accessed February 25, 2024).



- Johnson GD, Nogueira Araujo GM. 1981. A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *Journal of Immunological Methods* **43**:349-350. Available at 10.1016/0022-1759(81)90183-6 (accessed April 10, 2024).
- Johnson LR, Foster JA, Haig-Ladewig L, VanScoy H, Rubin CS, Moss SB, Gerton GL. 1997. Assembly of AKAP82, a protein kinase A anchor protein, into the fibrous sheath of mouse sperm. *Dev Biol* **192**:340-50. Available at 10.1006/dbio.1997.8767 (accessed March 10, 2024).
- Johnson MH, Everitt BJ. 2007. *Essential Reproduction*, 6th edition. Blackwell, Massachusetts.
- Jones R, James PS, Oxley D, Coadwell J, Suzuki-Toyota F, Howes EA. 2008. The equatorial subsegment in mammalian spermatozoa is enriched in tyrosine phosphorylated proteins. *Biol Reprod* **79**:421-31. Available at 10.1095/biolreprod.107.067314 (accessed April 19, 2024).
- Jones R. 1998. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis.... *Journal of reproduction and fertility* **53**:73-84. Available at 10.1387/ijdb.082583bg (accessed February 29, 2024).
- Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Arangasamy A, Kastelic JP. 2019. Sperm and seminal plasma proteomics of high – versus low-fertility Holstein bulls. *Theriogenology* **126**:41-48. Available at 10.1016/j.theriogenology.2018.11.032 (accessed April 21, 2024).
- Kawakami E, Morita Y, Hori T, Tsutsui T. 2002. Lectin-binding characteristics and capacitation of canine epididymal spermatozoa. *J Vet Med Sci* **64**:543-9. Available at 10.1292/jvms.64.543 (accessed April 20, 2024).
- Kim C, Cheng CY, Saldanha SA, Taylor SS. 2007. PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell* **130**:1032–1043. Available at 10.1016/j.cell.2007.07.018 (accessed March 9, 2024).
- Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. 2006. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature* **439**:737-40. Available at 10.1038/nature04417 (accessed April 12, 2024).
- Koonin EV, Galperin MY. 2003. *Sequence – Evolution – Function: Computational Approaches in Comparative Genomics*. Kluwer Academic Publishers.
- Kurien BT, Scofield RH. 2006. Western blotting. *Methods* **38**:283-93. Available at 10.1016/j.ymeth.2005.11.007 (accessed April 21, 2024).
- LaRochelle WJ, Froehner SC. 1990. Staining of proteins on nitrocellulose replicas. *Methods Enzymol* **184**:433-6. Available at 10.1016/0076-6879(90)84304-Y (accessed April 21, 2024).
- Lectins. Available at <https://www.interchim.fr/ft/M/MS902z.pdf#page=1&zoom=100,94,978> (accessed April 21, 2024).
- Lim MS, Elenitoba-Johnson KS. 2004. Proteomics in pathology research. *Lab Invest* **84**:1227-44. Available at 10.1038/labinvest.3700167 (accessed April 21, 2024).

- Linman M, Taylor J, Yu H, Chen X, Cheng Q. 2008. Surface plasmon resonance study of protein-carbohydrate interactions using biotinylated sialosides. *Analytical chemistry* **80**:4007-13. Available at doi.org/10.1021/ac702566e (accessed April 12, 2024).
- Liu Y, Merrill RA, Strack S. 2020. A-Kinase Anchoring Protein 1: Emerging Roles in Regulating Mitochondrial Form and Function in Health and Disease. *Cells* **26**; **9**:298. Available at 10.3390/cells9020298 (accessed April 15, 2024).
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A, Martin KC. 2016. *Molecular Cell Biology* 8th Edition. W. H. Freeman and Company.
- Lucio C et al. 2017. Lipid composition of the canine sperm plasma membrane as markers of sperm motility... *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **52**:208-213. Available at 10.1111/rda.12860 (accessed February 29, 2024).
- Maree L, Plessis SS du, Menkveld R, Horst G van der. 2010. Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. *Human Reproduction* **25**:1369-1382. Available at 10.1093/humrep/deq075 (accessed March 11, 2024).
- Miki K, BPR, Willis WD, Brown PR, Goulding EH, Eddy EM. 2002. Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Dev Biol* **248**:331-42. Available at 10.1006/dbio.2002.0728 (accessed March 10, 2024).
- Mizrahi R, Breitbart H. 2014. Mitochondrial PKA mediates sperm motility. *Biochimica et Biophysica Acta* **1840**:3404-3412. Available at 10.1016/j.bbagen.2014.09.005 (accessed March 9, 2024).
- Morgan DJ, Weisenhaus M, Shum S, Su T, Zheng R, Zhang C, Shokat KM, Hille B, Babcock DF, McKnight GS. 2008. Tissue-specific PKA inhibition using a chemical genetic approach and its application to studies on sperm capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**:20740-20745. Available at doi.org/10.1073/pnas.0810971105 (accessed April 12, 2024).
- Ni D, Xu P, Gallagher S. 2016. Immunoblotting and Immunodetection. *Curr Protoc Mol Biol* **114**:10.8.1-10.8.37. Available at 10.1002/0471142727.mb1008s114 (accessed April 21, 2024).
- Noble JE, Bailey MJ. 2009. Quantitation of protein. *Methods Enzymol* **463**:73-95. Available at 10.1016/S0076-6879(09)63008-1 (accessed April 21, 2024).
- Ong SE, Mann M. 2006. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature Chemical Biology* **1**:252-262. Available at 10.1038/nchembio736 (accessed February 27, 2024).
- Pandey A, Mann M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**:837-846. Available at https://doi.org/10.1038/35015709 (accessed February 19, 2024).
- Park YJ, Kwon WS, Oh SA, Pang MG. 2012. Fertility-related proteomic profiling bull spermatozoa separated by percoll. *J Proteome Res* **11**:4162-8. Available at 10.1021/pr300248s (accessed April 21, 2024).

- Patterson S, Aebersold R. 2003. Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Genetics* **33**:311-323. Available at <https://doi.org/10.1038/ng1106>. (accessed February 18, 2024).
- Paul D, Kumar A. 2018. Proteomics: A tool to develop novel diagnostic methods and unravel molecular mechanisms of drug resistance in tuberculosis. *Tuberculosis* **113**:237-254. Available at [10.1016/j.tube.2018.09.009](https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.09.009) (accessed February 25, 2024).
- Pawson T, Scott JD. 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* **278**:2075–2080.
- Peumans WJ, Van Damme EJ. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol* **109**:347–352. Available at [10.1104/pp.109.2.347](https://doi.org/10.1104/pp.109.2.347) (accessed April 12, 2024).
- Rabilloud T. 1996. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis* **17**:813-29. Available at [10.1002/elps.1150170503](https://doi.org/10.1002/elps.1150170503) (accessed April 21, 2024).
- Rahban R, Nef S. 2020. CatSper: The complex main gate of calcium entry in mammalian spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* **518**:110951. Available at [10.1016/j.mce.2020.110951](https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110951) (accessed April 12, 2024).
- Rajender S, Rahul P, Mahdi AA. 2010. Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion* **10**:419–428. Available at [10.1016/j.mito.2020.06.003](https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.06.003) (accessed March 9, 2024).
- Redeker V, Rossier J, Frankfurter A. 1998. Posttranslational modifications of the C-terminus of alpha-tubulin in adult rat brain: alpha 4 is glutamylated at two residues. *Biochemistry* **37**:14838-44. Available at [10.1021/BI981335K](https://doi.org/10.1021/BI981335K) (accessed April 19, 2024).
- Rickard JP, Graaf de SP. 2020. Sperm surface changes and their consequences for sperm transit through the female reproductive tract. *Theriogenology* **150**:96-105. Available at [10.1016/j.theriogenology.2020.02.018](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.018) (accessed April 21, 2024).
- Ritter G, Krause W, Geyer R, Stirm S, Wiegandt H. 1987. Glycosphingolipid composition of human semen. *Arch Biochem Biophys* **257**:370–378. Available at [10.1016/0003-9861\(87\)90579-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90579-0) (accessed April 12, 2024).
- Shabb JB. 2001. Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem. Rev* **101**:2381–2411. Available at [10.1021/cr000236l](https://doi.org/10.1021/cr000236l) (accessed March 9, 2024).
- Shukla MK. 2011. *Applied Veterinary Andrology and Frozen Semen Technology*. New India Pub Agency Nipa.
- Schatten H, Constantinescu GM. 2017. *Animal Models and Human Reproduction*. Wiley-Blackwell.
- Schauer R. 1982. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* **40**:131–234. Available at [10.1016/S0065-2318\(08\)60109-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60109-2) (accessed April 12, 2024).

- Schirle M, Jenkins JL. 2016. Identifying compound efficacy targets in phenotypic drug discovery. *Drug Discovery Today* **21**:82-89. Available at 10.1016/j.drudis.2015.07.013 (accessed February 25, 2024).
- Sinowatz F, Friess AE. 1983. Localization of lectin receptors on bovine epididymal spermatozoa using a colloidal gold technique. *Histochemistry* **79**:335-44. Available at 10.1007/BF00491769 (accessed April 19, 2024).
- Skålhegg BS, Huang Y, Su T, Idzerda RL, McKnight GS, Burton KA. 2002. Mutation of the C{alpha} sunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Molecular Endocrinology* **16**:630-639. Available at 10.1210/mend.16.3.0793 (accessed March 9, 2024).
- Skroblin P, Grossmann S, Schäfer G, Rosenthal W, Klusmann E. 2010. Mechanisms of Protein Kinase A Anchoring. *International review of cell and molecular biology* **283**:235-330. Available at 10.1016/S1937-6448(10)83005-9 (accessed March 10, 2024).
- Smrčková L. 2005. Svět psů. *Australský ovčák* **8**:36-40.
- Soler C, Contell J, Bori L, Sancho M, García-Molina A, Valverde A, Segarvall J. 2017. Sperm kinematic, head morphometric and kinetic-morphometric subpopulations in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Asian J Androl* **19**:154-159. Available at 10.4103/1008-682X.188445 (accessed March 11, 2024).
- Song X-X, Yang X-Z, Iga K, Niwa K. 1999. Binding of Lectins to the Zona Pellucida of In Vitro Matured Pig Oocytes and Sperm-Oocyte Interaction In Vitro. *Journal of Mammalian Ova Research* **16**:23-30. Available at 10.1274/jmor.16.23 (accessed April 12, 2024).
- Sutovsky P. 2020. Proteomic analysis of mammalian gametes and sperm-oocyte interactions... *Society of Reproduction and Fertility supplement* **66**:103-116. Available at 10.1530/bioscipros.18.0011 (accessed February 27, 2024).
- Tash JS. 1989. Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motil Cytoskeleton* **14**:332-339. Available at 10.1002/cm.970140303 (accessed March 9, 2024).
- Taylor SS, Kim C, Vigil D, Haste NM, Yang J, Wu J, Anand GS. 2005. Dynamics of signaling by PKA. *Biochim Biophys Acta* **1754**:25-37. Available at 10.1016/j.bbapap.2005.08.024 (accessed April 21, 2024).
- Tecele E, Gagneux P. 2015. Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Mol. Reprod.* **82**:635-650. Available at 10.1002/mrd.22500 (accessed April 19, 2024).
- Teves M, Roldan E. 2021. Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. *Physiological Reviews* **102**:7-60. Available at 10.1152/physrev.00009.2020. (accessed February 28, 2024).
- Tollner TL, Yudin AI, Tarantal AF, Treece CA, Overstreet JW, Cherr GN. 2008. Betadefensin 126 on the surface of macaque sperm mediates attachment of sperm to oviductal epithelia.

- Biology of reproduction **78**:400-412. Available at 10.1095/biolreprod.107.064071 (accessed April 12, 2024).
- Toshimori K, Araki S, Öra 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. Available at 10.3109/01485019108987656 (accessed April 12, 2024).
- Trávník P. 2022. Klinická fyziologie lidské reprodukce. Praha. Grada Publishing.
- Trebichalská Z, Holubcová Z. 2020. Perfect date—the review of current research into molecular bases of mammalian fertilization. Journal of Assisted Reproduction and Genetics **37**:243–256. Available at 10.1007/s10815-019-01679-4 (accessed March 9, 2024).
- Tulsiani D. 2003. Introduction to Mammalian Reproduction. Springer Science+Business Media, New York.
- Turner RMO, Eriksson RLM, Gerton GL, Moss SB. 1999. Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, pro-hAKAP82 and hAKAP82. Molecular Human Reproduction **5**:816–824. Available at 10.1093/molehr/5.9.816 (accessed March 10, 2024).
- Tyers M, Mann M. 2003. From genomics to proteomics. Nature **422**:193-197. Available at 10.1038/nature01510 (accessed February 25, 2024).
- Unlu M, Morgan ME, Minden JS. 1997. Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis **18**:2071-2077. Available at 10.1002/elps.1150181133 (accessed February 27, 2024).
- Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. 2009. Essentials of Glycobiology 4th edition. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Varki A. 2009. Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. Glycoconj J **26**:231–245. Available at 10.1007/s10719-008-9183-z (accessed April 12, 2024).
- Varner DD, Johnson L. 2007. From a Sperm's Eye View—Revisiting Our Perception of This Intriguing Cell **53**:104-177. Available at <https://aaep.org/sites/default/files/issues/proceedings-07proceedings-z9100107000104.pdf> (accessed February 28, 2024).
- Verini-Supplizi A, Stradaioli G, Fagioli O, Parillo F. 2000. Localization of the lectin reactive sites in adult and prepubertal horse testes. Res Vet Sci **69**:113-8. Available at 10.1053/rvsc.2000.0398 (accessed April 19, 2024).
- Vijayaraghavan S, Goueli SA, Davey MP, Carr DW. 1997. Protein kinase A-anchoring inhibitor peptides arrest mammalian sperm motility. J Biol Chem **272**:4747-52. Available at 10.1074/jbc.272.8.4747 (accessed March 10, 2024).
- Viste K, Kopperud RK, Christensen AE, Døskeland SO. 2005. Substrate enhances the sensitivity of type I protein kinase a to cAMP. J Biol Chem **280**:13279-13284. Available at 10.1074/jbc.M413065200 (accessed March 9, 2024).

- Westermeier R. 2001. Electrophoresis in practice Third edition. Wiley – VCH, Weinheim, Germany.
- Westermeier RM, Naven T, Hopker HR. 2008. Proteomics in practice 2nd edition. Wiley – VCH, Weinheim, Germany.
- Wilkins MR, Sanchez J-C, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. 1996. Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **13**:19-50. Taylor & Francis Group. Available at <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923> (accessed December 27, 2023).
- Wysokińska A, Chłopik A, Szablicka D. 2020. The Incidence of Spermatozoa with Morphological Changes in Semen Collected from Canine Epididymides. *Zootech* **354**:29–34. Available at 10.21005/AAPZ2020.53.1.03 (accessed March 11, 2024).
- Xin AJ, et al. 2014. Comprehensive profiling of accessible surface glycans of mammalian sperm using a lectin microarray. *Clin Proteom* **11**. Available at 10.1186/1559-0275-11-10 (accessed April 19, 2024).
- Xu Y, Han Q, Ma C, Wang Y, Zhang P, Li C, Cheng X, Xu H. 2021. Comparative Proteomics and Phosphoproteomics Analysis Reveal the Possible Breed Difference in Yorkshire and Duroc Boar Spermatozoa. *Front Cell Dev Biol* **16**:652809. Available at 10.3389/fcell.2021.652809 (accessed April 21, 2024).
- Zimmermann B, Chiorini JA, Ma Y, Kotin RM, Herberg FW. 1999. PrKX is a novel catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase regulated by the regulatory subunit type I. *J. Biol. Chem.* Available at 10.1074/jbc.274.9.5370 (accessed April 12, 2024).
- Zmudzinska A, Wisniewski J, Mlynarz P, Olejnik B, Mogielnicka-Brzozowska M. 2022. Age-Dependent Variations in Functional Quality and Proteomic Characteristics of Canine (*Canis lupus familiaris*) Epididymal Spermatozoa. *International Journal of Molecular Sciences* **23**:9143. Available at <https://doi.org/10.3390/ijms23169143> (accessed August 30, 2023).