# UNIVERZITA KARLOVA

## PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

STUDIJNÍ PROGRAM: BIOLOGIE

STUDIJNÍ OBOR: REPRODUKČNÍ A VÝVOJOVÁ BIOLOGIE

**BC. LUCIE SADÍLKOVÁ**

# PROTEIN RAB-2A: JEHO LOKALIZACE A FUNKCE V LIDSKÝCH SPERMIÍCH A FERTILIZACI

DIPLOMOVÁ PRÁCE

VEDOUCÍ PRÁCE: RNDR. PAVLA POSTLEROVÁ, PH.D.

KONZULTANT: MGR. VERONIKA PÁLENÍKOVÁ

2022

## PROHLÁŠENÍ

1. Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu.
2. Prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného titulu.
3. Souhlasím s tím, aby práce byla zpřístupněna pro studijní a výzkumné účely.

V Praze dne 22. 12. 2021

Lucie Sadílková

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své školitelce RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za ochotu, trpělivost a čas, který věnovala vedení této diplomové práce, a také své konzultantce Mgr. Veronice Páleníkové za cenné rady a velkou pomoc při práci v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Michaele Frolíkové, Ph.D. za tvorbu snímků ze SIM mikroskopie a celé Laboratoři reprodukční biologie za příjemné prostřední a ochotu vždy pomoci. Děkuji také Ing. Pavlu Koubkovi, Ph.D. za poskytnutí materiálu v rámci spolupráce s klinikou ProCrea Swiss, Praha. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu, kterou mi poskytovala po celou dobu mého studia.

## ABSTRAKT

Protein Rab-2A patří do Rab rodiny monomerních G-proteinů podílejících se na regulaci intracelulárního vezikulárního transportu. Přestože bylo publikováno několik studií popisující roli proteinu Rab-2A v savčích spermiích, přesná lokalizace ani funkce tohoto proteinu v samčích gametách nebyly dosud plně pochopeny. V předkládané diplomové práci jsme za využití protilátky 5C5, vytvořené Laboratoří reprodukční biologie, jako první popsali přítomnost Rab-2A v lidských spermiích. Protilátkou 5C5 se nám v lyzátu lidských spermií podařilo identifikovat několik izoforem Rab-2A o molekulových hmotnostech 26, 24, 22 a 18 kDa, jejichž identita byla potvrzena analýzou hmotnostní spektrometrie. Rab-2A jsme pomocí metody nepřímé imunofluorescence lokalizovali v oblasti akrozomu ejakulovaných i kapacitovaných spermií, odkud protein v průběhu akrozomální reakce odchází. Dále jsme zjistili sníženou hladinu proteinu Rab-2A u spermií od pacientů s různými patologiemi ejakulátu. Na základě studií popisující roli Rab-2A v biogenezi akrozomu a přítomnost Rab-2A v perinukleární théce býčích spermií, jsme se pokusili o detekci Rab-2A v této proteinové vrstvě také u lidských spermií. Zvolená metoda však zřejmě není využitelná pro lidské spermie a izolace se nezdařila. Dále jsme prokázali přítomnost Rab-2A v sekrečních veziklech pocházejících z lidské semenné plazmy, kde jsme detekovali pouze 24 a 22kDa izoformu. Přestože jsme nebyli úspěšní v potvrzení přítomnosti Rab-2A na povrchu lidských spermií, detekovali jsme u několika proteinů spermií vazebnou aktivitu pro glykoproteiny *zona pellucida*, mezi nimiž byly nalezeny také nízkomolekulární proteiny (18 a 30 kDa), které by mohly odpovídat izoformám proteinu Rab-2A rozpoznávaných protilátkou 5C5 v extraktech lidských spermií.



## KLÍČOVÁ SLOVA

Rab proteiny, GTPáza, akrozom, perinukleární théka, exozomy, *zona pellucida*

## ABSTRACT

The Rab-2A protein belongs to the Rab family of monomeric G-proteins involved in the regulation of intracellular vesicular transport. Although several studies describing the role of Rab-2A protein in mammalian sperm have been published, the exact localization and function of this protein in male gametes have not been fully understood yet. In the diploma thesis, we were the first to describe the presence of Rab-2A in human sperm using 5C5, produced by the Laboratory of Reproductive Biology. Using the 5C5 antibody, we were able to identify several Rab-2A isoforms with molecular weights of 26, 24, 22, and 18 kDa in the human sperm lysate, confirmed by mass spectrometry analysis. Using the indirect immunofluorescence method, we localized Rab-2A in the acrosome area of both ejaculated and capacitated sperm. We noticed that Rab-2A leaves the sperm during the acrosomal exocytosis. We also found a reduced Rab-2A protein level in sperm of patients with various pathologies of ejaculate. Based on studies describing the role of Rab-2A in acrosome biogenesis and the presence of Rab-2A in bovine sperm perinuclear theca, we tried to detect Rab-2A in this protein layer in human sperm. However, the chosen method is apparently not applicable to human sperm and isolation has failed. Additionally, we demonstrated the presence of Rab-2A in secretory vesicles derived from human seminal plasma, where we detected only 24 and 22 kDa isoforms. Although we were not successful in confirmation of the presence of Rab-2A on the surface of human sperm, we found binding activity to zona pellucida glycoproteins in several sperm proteins, including low-molecular-mass proteins (18 and 30 kDa), that could correspond to Rab-2A isoforms recognized by the 5C5 in human sperm extracts.

## KEYWORDS

Rab proteins, GTPase, acrosome, perinuclear theca, exosomes, *zona pellucida*

# OBSAH

1. Úvod ..... 1

2. Literární přehled ..... 2

2.1 Samčí pohlavní buňky ..... 2

2.1.1 Spermatogeneze ..... 3

2.1.2 Spermiogeneze ..... 4

2.1.3 Akrozom ..... 5

2.1.3.1 Biogeneze akrozomu ..... 6

2.1.4 Perinukleární théka ..... 7

2.2 Vezikulární transport ..... 8

2.3 Rab proteiny ..... 9

2.3.1 Molekulární mechanismus funkce Rab proteinů ..... 10

2.3.2 Struktura Rab proteinů ..... 11

2.4 Protein Rab-2A ..... 13

2.4.1 Protein Rab-2A a jeho lokalizace a funkce v savčích spermiích ..... 14

2.4.1.1 Funkce Rab-2A v biogenezi akrozomu ..... 14

2.4.1.2 Funkce Rab-2A v kapacitaci a akrozomální reakci spermií ..... 16

2.5 Exozomy ..... 17

2.5.1 Prostazomy ..... 18

3. Hypotézy a Cíle práce ..... 19

3.1 Hypotézy ..... 19

3.2 Cíle práce ..... 20

4. Materiály a metody ..... 21

4.1 Biologické materiály ..... 21

4.1.1 Lidské spermie ..... 21
4.1.2 Lidské *zona pellucida* ..... 21
4.2 Chemikálie ..... 21
4.3 Pufry ..... 23
4.4 Komerční kity ..... 24
4.5 Protilátky ..... 24
4.6 Laboratorní vybavení ..... 26
4.7 Metody ..... 27
4.7.1 Příprava vzorků lidských spermií ..... 27
4.7.2 *In vitro* kapacitace lidských spermií ..... 27
4.7.3 Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) ..... 27
4.7.4 *In vitro* indukce akrozomální reakce u lidských spermií ..... 28
4.7.5 Selekce spermií po akrozomální reakci od spermií s intaktním akrozomem (patent 308864) ..... 28
4.7.6 Izolace proteinů z lidských spermií pomocí SDS ..... 29
4.7.7 Měření koncentrace proteinů ve vzorku ..... 29
4.7.8 Izolace povrchových proteinů z lidských spermií ..... 29
4.7.9 Imunoprecipitace – příprava vzorků na hmotnostní spekrometrii ..... 30
4.7.10 Izolace proteinů z perinukleární théky ..... 31
4.7.11 Izolace exozomů z lidské semenné plazmy ..... 32
4.7.12 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) ..... 33
4.7.13 Vizualizace proteinů v gelu ..... 33
4.7.13.1 Barvení Coomassie Brilliant Blue ..... 33
4.7.13.2 Barvení stříbrem ..... 34
4.7.14 Western blot a imunodetekce proteinů ..... 34

4.7.15 Imunofluorescenční detekce proteinů spermií ..... 34
4.7.16 Izolace a biotinylace glykoproteinů *zona pellucida* ..... 35
4.7.17 Far-western blot analýza s biotinylovánými glykoproteiny ZP ..... 36
4.7.18 Statistika ..... 36
5. Výsledky ..... 37
5.1 Hodnocení kapacitovaného stavu lidských spermií ..... 37
5.2 Hodnocení indukce akrozomální reakce lidských spermiích ..... 39
5.3 Testování monoklonálních protilátek na lidských spermiích ..... 40
5.4 Identifikace proteinu rozpoznávaného protilátkou 5C5 v lidských spermiích 43
5.5 Detekce proteinu Rab-2A v proteinovém extraktu lidských spermiích ..... 46
5.6 Selekce spermií s intaktním akrozomem ..... 49
5.7 Detekce proteinu Rab-2A v proteinovém extraktu z povrchu lidských spermiích ..... 51
5.8 Detekce proteinu Rab-2A v extraktu spermií od pacientů s patologickým spermiogramem ..... 53
5.9 Lokalizace Rab-2A v lidských spermiích ..... 54
5.10 Detekce proteinu Rab-2A v perinukleární théce lidských spermií ..... 60
5.11 Detekce Rab-2A v semenné plazmě a sekrečních exozomech ..... 62
5.12 Studie vazby proteinů spermií s glykoproteiny *zona pellucida* ..... 63
6. Diskuze ..... 64
7. Závěr ..... 75
8. Seznam použité literatury ..... 76
9. Přílohy ..... 87

# SEZNAM ZKRATEK

| | |
|---|---|
| ALH | Laterální pohyb hlavičky spermie (z angl. „Head Lateral moving“) |
| AR | Akrozomální reakce |
| AZS | Astenozoospermie |
| BCF | Frekvence úderu bičíku (z angl. „Beat Frequency Cross“) |
| CASA | z angl. „Computer-assisted sperm analysis“ |
| CBB | Coomassie Brilliant Blue |
| CDR | Oblasti určující komplementaritu (z angl „Complementary Determining Regions“) |
| $dH_2O$ | Destilovaná voda |
| ER | Endoplazmatické retikulum |
| GA | Golgiho aparát |
| GAP | Protein aktivující GTPázu (z angl. „GTPase-activating protein“) |
| GDI | Inhibitor disociace GDP (z angl. „GDP-dissociation inhibitor“) |
| GDP | Guanosindifosfát (z angl. „Guanosine diphosphate“) |
| GEF | Faktor pro výměnu guaninových nukleotidů (z angl. „Guanine Nucleotide Exchange Factor“) |
| GTP | Guanosintrifosfát (z angl. „Guanosine triphosphate“) |
| HRP | Křenová peroxidáza (z angl. „Horseradish peroxidase“) |
| IAM | Vnitřní akrozomální membrána (z angl. „Inner Acrosomal Membrane“) |
| IgG | Imunoglobulin G |
| IVF | *In vitro* fertilizace |
| LIN | Index linearity (z angl. „Linearity index“) |
| MS | Hmotnostní spektrometrie (z angl. „Mass Spectrometry“) |
| NIF | Nepřímá imunofluorescence |
| NOR | Normozoospermie |
| OAM | Vnější akrozomální membrána (z angl. „Outer Acrosomal Membrane“) |

| | |
|---|---|
| OAT | Oligoastenoteratozoospermie |
| OZS | Oligozoospermie |
| PAS | Postakrozomální pochva (z angl. „Post-acrosomal sheath“) |
| PBS | Fosfátový pufr (z angl. „Phosphate-buffered saline“) |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PI | Fosfoinositidy |
| PT | Perinukleární théka |
| PVDF | z angl. „Polyvinylidene difluoride membrane“ |
| Rab | z angl. „Ras-related in brain“ |
| RabGGTase | Geranylgeranyltransferáza pro Rab protein (z angl. „Rab geranylgeranyl transferase“) |
| REP | Rab „escort“ protein |
| RPM | otáčky za minutu (z angl. „Revolutions Per Minute“) |
| SAL | Subakrozomální vrstva (z angl. „Subacrosomal layer“) |
| SDS | Sodium dodecyl sulfát |
| SDS-PAGE | SDS-Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. „SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis“) |
| SIM | Strukturní iluminační mikroskopie (z angl. „Structured Illumination Microscopy“) |
| SNARE | z angl. „Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment-protein Receptor“ |
| t-SNARE | z angl. „target-Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment-protein Receptor“ |
| v-SNARE | z angl. „vesicle-Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment-protein Receptor“ |
| SP | Semenná plazma |
| STR | Index přímosti (z angl. „Straightness index“) |
| TBS | Trisový pufr (z angl. „Tris-buffered saline“) |

| | |
|---|---|
| VAP | Průměrná rychlost dráhy pohybu (z angl. „Average Path Velocity“) |
| VCL | Rychlost křivočarého pohybu (z angl.“Curvilinear Velocity“) |
| VSL | Rychlost přímočarého pohybu (z angl. „Straight Line Velocity“) |
| WB | Western blot |
| WOB | Oscilační index (z angl. „Oscillation index“) |
| ZP | *zona pellucida* |

# 1. ÚVOD

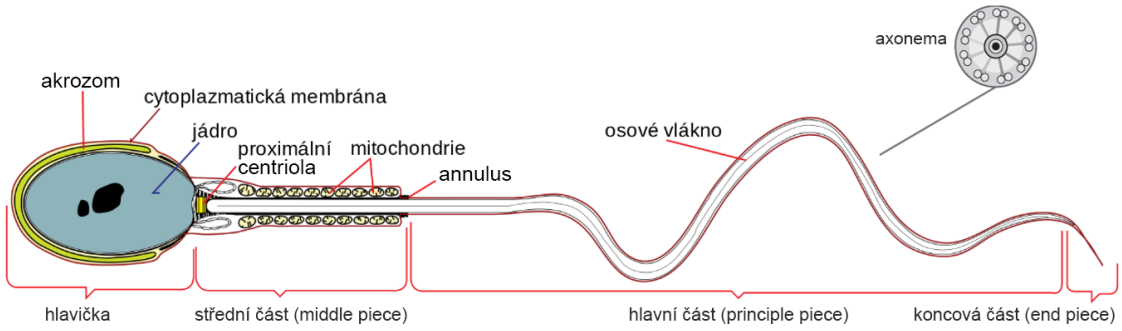
Vzájemné rozpoznání a interakce mezi spermií a vajíčkem je klíčovou událostí v procesu fertilizace. K druhově specifickému rozpoznání gamet, označovanému též jako primární vazba, dochází prostřednictvím proteinů přítomných na povrchu kapacitované spermie, které interagují s oligosacharidovými řetězci glykoproteinů *zona pellucida* vajíčka (Clark, 2014). Jedním z kandidátních proteinů pro primární vazbu, nalezených na povrchu spermie, je protein Rab-2A, který byl identifikován v rámci studie na prasečích spermiích pomocí specifické protilátky 5C5 (Zigo et al., 2015). Na základě vysoké homologie mezi prasečím a lidským proteinem Rab-2A je velká pravděpodobnost, že protilátka vytvořená proti povrchovým proteinům prasečí spermie bude reagovat také s proteinem na lidských spermiích.

Protein Rab-2A je GTPáza zajišťující regulaci intracelulárního vezikulárního transportu a fúze membrán (Stenmark a Olkkonen, 2001). Přestože byla popsána přítomnost proteinu Rab-2A ve spermiích různých druhů savců, v lidských spermiích tento protein dosud nebyl identifikován. V savčích spermií bylo také navrženo několik rolí proteinu Rab-2A. U býků byla zjištěna úloha Rab-2A v biogenezi akrozomu, kde tento protein reguluje transport malých váčků putujících od trans-Golgi ke vznikajícímu akrozomu (Mountjoy et al., 2008). Po dokončení biogeneze akrozomu byl Rab-2A popsán jako součást subakrozomální proteinové vrstvy, zvané perinukleární théka, která se podílí na ukotvení akrozomu k jádru spermie, čímž zabraňuje předčasné akrozomální reakci (Oko a Sutovsky, 2009). U kance byl také určen původ Rab-2A v epididymální tekutině, na základě čehož byl navržen transport Rab-2A do membrány spermie pomocí extracelulárních vezikulů epididymální tekutiny (Simpson et al., 2008; Zigo et al., 2015). Další studie pak navrhují Rab-2A jako klíčový protein související s kapacitací spermií a dokonce navrhují Rab-2A jako biomarker samčí fertility (Bae et al., 2019; Kwon et al., 2015b, 2015a, 2014).

# 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 2.1 SAMČÍ POHLAVNÍ BUŇKY

Samčí pohlavní buňkou je spermie. Savčí spermie je charakterizována dvěma morfologickými a funkčními jednotkami, a to hlavičkou a bičíkem. Obě části jsou tvarovány a sestavovány během cytomorfogenetické fáze spermatogeneze, známé jako spermiogeneze (Roosen-Runge, 1977). Zatímco bičík představuje hlavní motorickou sílu zajišťující pohyb spermie k oocytu, hlavička nese polovinu genetické informace nezbytné pro vznik a vývoj nového jedince. Průměr hlavičky lidské spermie se pohybuje mezi 4–6 μm a průměr bičíku je 1–2 μm. Celková délka lidské spermie je pak okolo 60 μm. Morfologie lidské spermie je znázorněna na obrázku *(Obr. 1)*. Hlavička spermie je vyplněna především jádrem obsahujícím kondenzovaný chromatin, dále jsou zde přítomny různé cytoskeletální struktury a malé množství cytoplazmy. Od přední části do dvou třetin je hlavička kryta váčkem, obsahující enzymy, který se nazývá akrozom. V krčku spermie se nachází centriola, ze které vychází svazek mikrotubulů označovaný jako axonema, který prochází celým bičíkem spermie. Axonema se ve většině délky bičíku skládá z jednoho centrálního páru mikrotubulů, který je obklopen devíti dalšími páry uspořádanými do kruhu. Bičík dělíme na tři části: střední část („middle piece“), hlavní část („principle piece“) a koncová část („end piece“). Axonema ve střední část bičíku je obklopena spirálovitě uspořádanou mitochondriální pochvou. Na distálním konci střední části bičíku se pak nachází prstenec (annulus), který je vytvořen z druhé centrioly. Axonema hlavní části bičíku je pokryta sedmi vnějšími denzními vlákny, zatímco koncová část je tvořena pouze svazky mikrotubulů (Knobil a Neill, 1996; Singh, 2014).

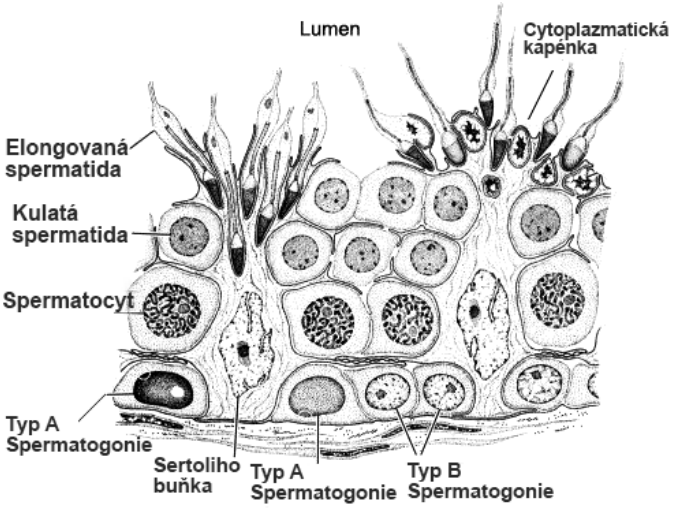



**Obr. 1: Ilustrace lidské spermie.** *Převzato a upraveno z* Villarreal (2006).

### 2.1.1 SPERMATOGENEZE

Spermatogeneze je složitý biologický proces buněčné transformace odehrávající se uvnitř semenotvorných kanálků varlete, při kterém dochází k přeměně diploidní spermatogonie na haploidní spermii. Zárodečný epitel semenotvorných kanálků *(Obr. 2)* je tvořen buňkami vytvářející četné koncentrické vrstvy, které zahrnují různá vývojová stádia zárodečných buněk - spermatogonie, primární a sekundární spermatocyty a spermatidy (Roosen-Runge, 1977). Mezi nimi prostupují výběžky somatických Sertoliho buněk mající podpůrnou a výživovou funkci (Skinner a Griswold, 2004).

Proces gametogeneze u mužů na rozdíl od žen začíná až v pubertě, kdy primordiální zárodečné buňky podstupují řadu mitotických děleních, při kterých dceřiné buňky (spermatogonie) zůstávají vzájemně propojeny cytoplazmatickými můstky. Syncytiální spojení jsou udržována i v průběhu spermatocytických stádií a jsou rozpuštěna až ve stádiu spermatid. Předpokládá se, že toto propojení je důležité zejména pro synchronní vývoj zárodečných buněk (Holstein et al., 2003). V zárodečném epitelu rozlišujeme několik typů spermatogonií. Tmavý typ A představuje populaci kmenových buněk, který prochází buněčným dělení za vzniku jedné tmavé spermatogonie typu A, která se dále nedělí a vytváří zásobárnu kmenových buněk a druhé světlé spermatogonie typu A, jež se dále dělí a dává vznik dvou spermatogoniím typu B. Spermatogonie typu B je buňka předurčená k diferenciaci a při jejím dělení vznikají dva primární spermatocyty (Clermont, 1966). Jedná se o největší mužské zárodečné buňky, které vstupují do prvního meiotického dělení. Z jednoho primárního spermatocytu se po prvním redukčním dělení stávají dva sekundární spermatocyty, mající haploidní počet chromozomů, jež vstupují do druhého meiotického dělení za vzniku čtyř haploidních spermatid. Spermatidy jsou přeměněny v procesu zvaném spermiogeneze na bičíkaté spermie, které jsou poté uvolněny do lumen semenotvorného kanálku (Holstein et al., 2003).

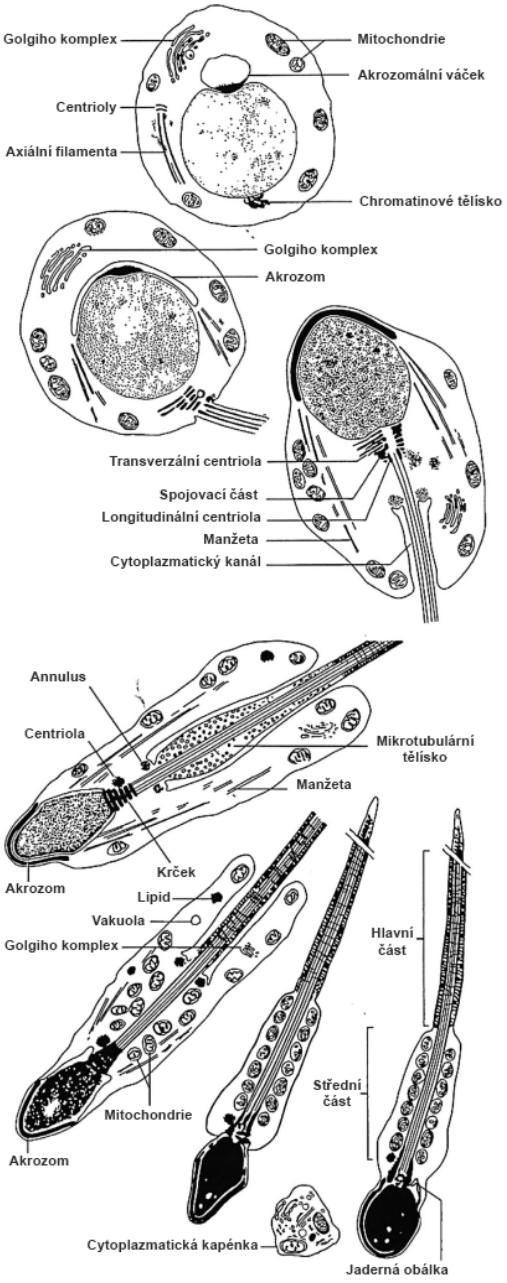



***Obr. 2: Průřez semenného kanálku muže.***

*Převzato a upraveno z* Gilbert (1997).

### 2.1.2 SPERMIOGENEZE

Spermiogeneze, též označována jako spermatolióza, je závěrečnou fází spermatogeneze, při které jsou haploidní spermatidy transformovány na zralé spermie *(Obr. 3)*. Spermatida je kulatá buňka obsahující velké centrálně umístěné jádro, Golgiho aparát (GA), centrozom a mitochondrie. Pro její přeměnu na kompaktní bičíkatou spermii tak musí dojít k řadě morfologických změn. V časných fází spermiogeneze je na základě sekreční činnosti GA tvořen akrozomální váček *(Kap. 2.1.3.1)* (Tang et al., 1982; Thorne-Tjomsland et al., 1988). Jaderný chromatin je prostřednictvím výměny jaderných histonů za protaminy, zajišťujících kompaktnější sbalení DNA, kondenzován na přibližně jednu desetinu objemu spermatidy. Jádro spermatidy se poté pohybuje k jednomu pólu buňky a vytváří hlavičku spermie. V průběhu spermiogeneze dochází také k vývoji bičíku. Centrozom se dělí na dvě centrioly, přičemž jedna centriola se stává sférickou a pohybuje se směrem k posteriornímu konci jádra, kde zaujímá svou pozici v krčku spermie umožňující vznik axonemy. Druhá centriola vytváří prstence okolo distálního konce střední části bičíku. Axonema mezi krčkem a prstencem je poté obalena mitochondriemi tvořící střední část bičíku. Mikrotubulární vlákna se dále prodlužují a vytvářejí hlavní a koncovou část bičíku (Singh, 2014). Nakonec je většina cytoplazmy spermatidy včetně přebytečných organel jako jsou GA, mitochondrie a ribozomy odstraněna v podobě cytoplazmatické kapénky, která je posléze fagocytována Sertoliho buňkami (Breucker et al., 1985).

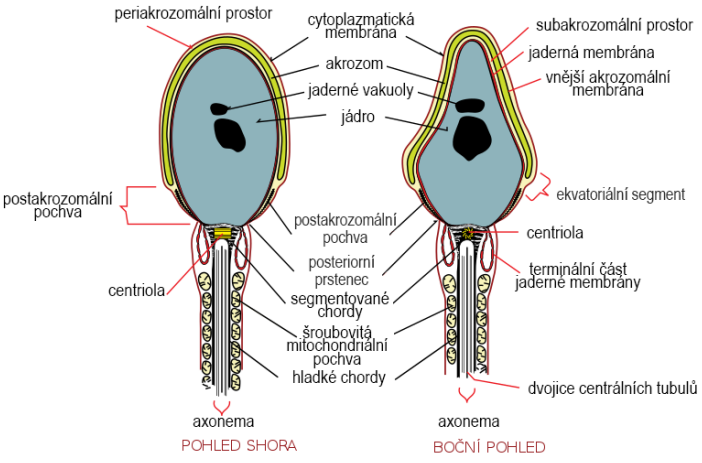



***Obr. 3: Ilustrace jednotlivých kroků lidské spermiogeneze.*** *Převzato a upraveno z* de Kretser et al. (2018).

### 2.1.3 AKROZOM

Akrozom je jedinečná membránová organela překrývající anteriorní část jádra spermie, která má zásadní roli v průběhu oplození. Tato kyselá vakuola obsahuje řadu hydrolytických enzymů, jež po uvolnění napomáhají penetraci spermie skrze *zona pellucida* (ZP) vajíčka (Yanagimachi, 2011). Do nedávné doby byl přijímán obecný koncept, že pouze savčí spermie s intaktním akrozomem je schopna oplodnit oocyt, přičemž k exocytóze akrozomu dochází až po vazbě spermie na ZP, to umožnuje následnou penetraci spermie skrze ZP a fúzi s plazmatickou membránou oocytu (Wassarman et al., 2004). V pozdějších studiích na myších však bylo prokázáno, že většina spermií, která je schopna oplodnit myší oocyt, podstupuje akrozomální exocytózu ještě před vazbou na ZP, při průchodu kumulárními buňkami (Jin et al., 2011). Nicméně u lidí tento jev prokázán nebyl a pro úspěšné přirozené oplození u člověka jsou nezbytné spermie s funkčním akrozomem (Dam et al., 2007).

Funkce akrozomu závisí na jeho struktuře *(Obr. 4)*. Přestože různé druhy savců mají odlišnou morfologii akrozomu, u všech savců je akrozom dělen na dvě základní části: velká anteriorní část různých tvarů a velikostí a posteriorní část označovanou jako ekvatoriální segment, jedná se o menší a tenčí část akrozomu nacházející se v poledníkové oblasti hlavičky spermie. Fosfolipidovou dvojvrstvu obklopující lumen akrozomu dělíme na vnější akrozomální membránu (OAM z angl. „Outer Acrosomal Membrane“) a vnitřní akrozomální membránu (IAM z angl. „Inner Acrosomal Membrane“). OAM leží těsně pod plazmatickou membránou spermie, přičemž v průběhu akrozomální reakce dochází k jejich vzájemné fúzi a vylití akrozomálního obsahu (Yanagimachi, 2011). IAM se nachází nad jadernou membránou a po akrozomální reakci zůstává zachována. Uvnitř akrozomu se pak nachází hydrolytické enzymy, které se účastní akrozomální reakce a napomáhají rozrušení extracelulárních obalů oocytu.




***Obr. 4: Ilustrace znázorňující popis hlavičky lidské spermie.*** *Převzato a upraveno z* Villarreal (2006).

Dále je zde přítomna takzvaná akrozomální matrix poskytující proteinovou kostru, jež usnadňuje interakci spermie a vajíčka (Buffone et al., 2004).

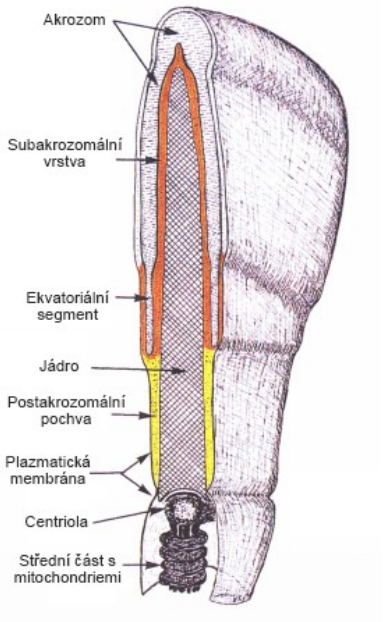
#### 2.1.3.1 BIOGENEZE AKROZOMU

Biogeneze akrozomu je klíčovou událostí v procesu spermiogeneze *(Kap. 2.1.2)*, která byla před více než půl stoletím na základě mikroskopické analýzy řezů varlat savců rozdělena do čtyř hlavních fází: Golgiho fáze, fáze čepičky, akrozomální fáze a fáze zrání (Clermont a Leblond, 1955). První dvě fáze jsou označeny na základě rozdílné sekreční činnosti Golgiho aparátu (Tang et al., 1982; Thorne-Tjomsland et al., 1988). V první fázi GA sekretuje několik malých denzních sekrečních granulí bohatých na hydrolytické enzymy, jako je například proakrozin (Bozzola et al., 1991; Olson et al., 1998). Tyto proakrozomální granule se dále spojují za vzniku větší akrozomální granule, která na periferii asociuje s jaderným obalem skrze proteinovou vrstvu zvanou perinukleární théka. Ve fázi čepičky pak dochází ke zvětšování akrozomální granule prostřednictvím fúze s četnými malými vezikuly pocházející z trans strany Golgiho aparátu. Poté, co akrozomální granule dosáhne jaderné membrány se začne zplošťovat a expandovat přes jádro, kde zaujímá tvar čepičky. V akrozomální fázi pak akrozom expanduje přes povrch prodlužujícího se jádra spermatidy. Dále dochází ke kondenzaci jádra i akrozomu. V závěrečné fázi zrání je akrozom diferencován na anteriorní a posteriorní oblast (Khawar et al., 2019; Oko a Sutovsky, 2009).

Delece proteinů zapojených do třídění, transportu a fúze vezikul způsobuje defekty v biogenezi akrozomu a vede ke vniku globozoospermie, která je charakterizována ztrátou akrozomu v jejímž důsledku mají hlavičky spermií menší a kulatější tvar. Takto deformovaná spermie pak není schopna oplodnit oocyt (Alvarez Sedó et al., 2012; Kang-Decker et al., 2001; Paiardi et al., 2011; Yao et al., 2002). Přestože je akrozom obecně považován za organelu odvozenou od Golgiho aparátu, molekulární mechanismy regulující jeho tvorbu jsou stále do značné míry neznámé. V posledních letech byl na základě zjištění, že biogeneze akrozomu zahrnuje jak biosyntetické, tak endocytické dráhy akrozom navržen také jako organela související s lysozomy (Berruti et al., 2010; Berruti a Paiardi, 2011).

### 2.1.4 PERINUKLEÁRNÍ THÉKA

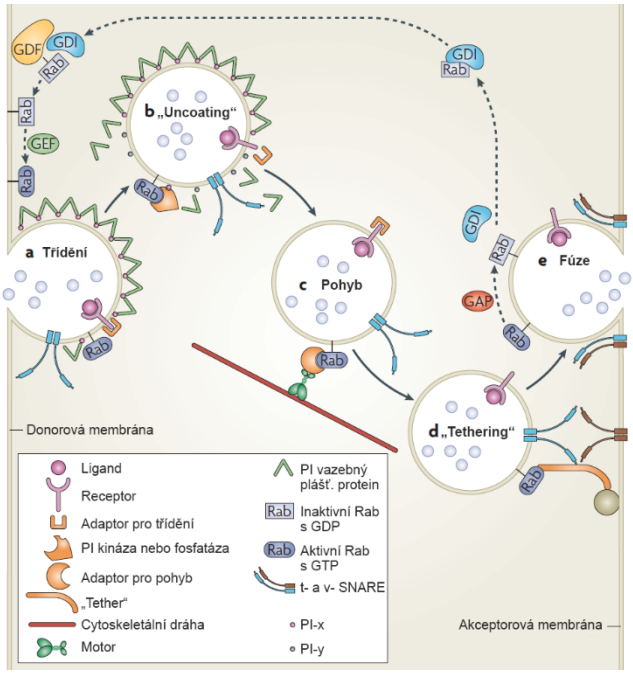
Perinukleární théka (PT) je kondenzovaná vrstva proteinů obklopující jádro spermie s výjimkou oblasti implantace bičíku. Jedná se o pouzdro okolo jádra odolné vůči neiontogenním detergentům vyplňující většinu cytosolu hlavičky spermie (Oko a Sutovsky, 2009). Na základě kompozičních a strukturních rozdílů byla PT rozdělena do dvou oblastí: subakrozomální vrstvy (SAL z angl. „Subacrosomal layer“) a postakrozomální pochvy (PAS z angl. „Post-acrosomal sheath“) *(Obr. 5)* (Oko a Maravei, 1994; Oko, 1995). Subakrozomální část PT se v průběhu spermiogeneze podílí na biogenezi akrozomu. V maturovaných spermiích se pak nachází apikálně, mezi vnitřní akrozomální membránou a jaderným obalem, kde upevňuje akrozom pevně k jádru (Oko a Maravei, 1995). Druhá část PT, postakrozomální pochva, je umístěna kaudálně, mezi plazmatickou membránou spermie a jaderným obalem a podílí se na interakci vajíčka se spermií, a také na aktivaci vajíčka v průběhu oplození (Oko a Sutovsky, 2009; Sutovsky et al., 2003). PT je cytoskeletální struktura, která však není složena z klasických proteinů cytoskeletu, jak se dříve předpokládalo, ale z mnoha cytosolických a jaderných proteinů. V průběhu spermiogeneze dochází nejprve k sestavení subakrozomální vrstvy z cytosolických proteinů, které jsou do místa určení dopravovány pomocí proakrozomálních a akrozolmálních váčků. V SAL PT bylo identifikováno několik proteinů podílejících se na biogenezi akrozomu, včetně varianty histonu H2B a proteinu Rab-2A (Aul a Oko, 2001; Mountjoy et al., 2008). PAS je pak sestavena později, během elongace spermatidy, z cytosolických proteinů, které jsou do oblasti PAS transportovány po mikrotubulární manžetě (Oko a Sutovsky, 2009).




***Obr. 5: Ilustrace znázorňující midsagitální řez hlavičky býčí spermie.*** *Perinukleární théka je strukturně kontinuální cytoskeletární struktura, která obklopuje celé jádro spermie kromě oblasti implantace bičíku. Subakrozo-mální vrstva je znázorněna oranžově, zatímco oblast post-akrozomální pochvy je značena žlutě. Převzato a upraveno z Oko (1995).*

## 2.2 VEZIKULÁRNÍ TRANSPORT

Mechanismus vezikulárního transportu se zdá být ve všech eukaryotních organismech konzervovaný a zahrnuje několik po sobě jdoucích kroků, přičemž každý tento krok je regulován prostřednictvím aktivity Rab proteinů *(Obr. 6)* (Stenmark, 2009). Prvním krokem je pučení, kdy na donorové membráně pod působením plášťových proteinů (coatomer, clathrin) a následné deformaci membrány vzniká váček, který kromě rozpustných a integrálních membránových proteinů určených k exportu obsahuje také proteiny důležité pro fúzi membrán jako jsou SNARE proteiny („Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment-protein Receptor“) a proteiny regulující transport Rab („Ras-related in brain“) *(Kap. 2.3)* (Touchot et al., 1987). SNARE jsou proteiny asociované s membránou lokalizované buď na váčcích (v-SNARE) nebo na cílových membránách (t-SNARE), které obsahují velké, hydrofobní „coiled-coil“ domény (Palfreyman a Jorgensen, 2008). Rab proteiny regulují několik klíčových událostí v pučení vezikulu na donorové membráně, od sestavení plášťových proteinů, přes selekci proteinů určených pro transport, až po fyzické pučení váčku (Stenmark, 2009). Po oddělení nascentního váčku od donorové membrány, za působení Rab proteinů, disociuje proteinový obal vezikulu (proces označovaný jako „uncoating“) a váček putuje k cílovému kompartmentu. Při transportu cytoplazmou buňky se váček pohybuje buď prostou difuzí nebo přímým transportem pomocí cytoskeletu, kdy efektory některých Rab proteinů mohou přímo interagovat s cytoskeletálními komponentami. Po dopravení do blízkosti cílové membrány se váček nejprve volně váže na cílovou membránu prostřednictvím velkých proteinových komplexů, jde o proces označovaný jako „tethering“, na němž se podílí řada proteinů, s nimiž Rab proteiny přímo interagují. Poté je váček pevně ukotven do cílové membrány (proces označovaný jako „docking“) vzájemným provázáním molekul v-SNARE na membráně váčku a t-SNARE na cílové membráně. Po vzniku SNARE komplexu dochází k fúzi membrán (Stenmark, 2009; Tuvim et al., 2001).




***Obr. 6: Jednotlivé kroky vezikulárního transportu regulované Rab GTPázou a jejími efektory*** *(zobrazeny oranžově). (a) Rab protein s navázaným GTP je schopen aktivovat adaptorový protein zajišťující třídění proteinů určených pro transport. b) Náborem fosfoinositidových (PI) kináz nebo fosfatáz je Rab protein schopen měnit složení PI transportního váčku, a tím způsobovat disociaci PI-vázaných plášťových proteinů. c) Dále se Rab proteiny podílí na pohybu váčku podél aktinových vláken nebo mikrotubulů interakcí přímo s molekulárními motory nebo s jejich adaptory. d) Rab GTPázy se také se mohou účastnit uvazování váčku na cílovou membránu, které je nezbytné pro přiblížení membrán a následnou aktivaci tvorby SNARE komplexu vedoucí k fúzi membrán. Převzato z* Stenmark (2009).

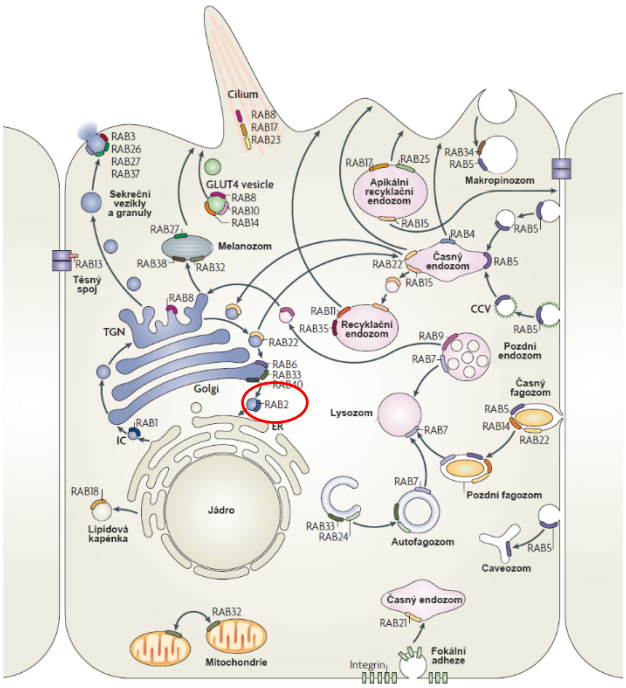
## 2.3 RAB PROTEINY

Rab proteiny patří do Ras nadrodiny malých GTPáz (Stenmark a Olkkonen, 2001). Jedná se o malé monomerních G-proteiny o velikosti 20-30 kDa, které jsou na základě sekvenční podobnosti, struktury a funkce děleny do pěti hlavních rodin: Ras, Rho/Rac, Rab, Ran, Rad a Arf (Goitre et al., 2014). Jednotlivé rodiny mají rozdílné biologické funkce, všechny však sdílí podobnou strukturu obsahující sadu pěti konzervovaných sekvenčních elementů, jenž jsou nezbytné pro jejich GTPázovou aktivitu. Pro Rab proteiny je typické, že na svém C-konci mají motiv obsahující cystein, přes který jsou navazovány perenylové skupiny umožňující ukotvení Rab proteinů do membrány (Geyer a Wittinghofer, 1997).

Rab proteiny jsou GTPázy regulující intracelulární vezikulární transport a fúzi membrán (Stenmark a Olkkonen, 2001; Tuvim et al., 2001). Regulační mechanismus Rab proteinů spočívá, stejně jako u jiných GTPáz, v jejich schopnosti fungovat jako molekulární přepínače mezi aktivním stavem (s navázaným GTP) a neaktivním stavem (s navázaným

GDP) (Bourne et al., 1991, 1990). Aktivní forma Rab proteinu může interagovat s různými efektory, jako jsou molekulární motory, komplexy provazující membrány, proteinové lešení, adaptororvé proteiny, či lipidové kinázy a regulovat tak různé kroky vezikulárního transportu, od tvorby vezikul na donorové membráně, přes transport vezikul, až po vazbu vezikulu na cílovou membránu a fúzi (Goody et al., 2017). Cyklování mezi aktivní a neaktivní formou Rab proteinu tak umožňuje časovou a prostorovou regulaci membránového transportu (Zerial a McBride, 2001).

U lidí bylo identifikováno přes 70 různých Rab proteinů (Stenmark a Olkkonen, 2001). Jejich diverzita odpovídá množství intracelulárních transportních drah v různých typech buněk. Jednotlivé Rab proteiny se nachází v různých intracelulárních kompartmentech *(Obr. 7)*, kde regulují odlišné fáze vezikulárního transportu. Proto jsou také Rab proteiny považovány za markery organel (Stenmark, 2009; Zerial a McBride, 2001). Dosud není známo mnoho konkrétních Rab proteinů regulující některé kroky vezikulárního přenosu, zejména u vysoce specializovaných typů eukaryotických buněk, jakým jsou například spermie, a naopak mnoho identifikovaných Rab proteinů zatím nebylo přiřazeno k jednotlivým transportním krokům (Tuvim et al., 2001).

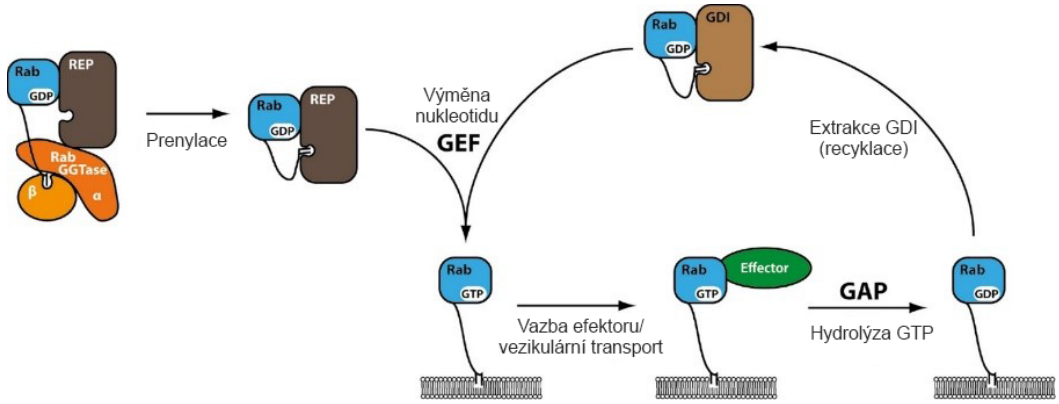



***Obr. 7: Lokalizace jednotlivých Rab proteinů v buněčných kompartmentech.*** *Převzato z Stenmark (2009).*

### 2.3.1 MOLEKULÁRNÍ MECHANISMUS FUNKCE RAB PROTEINŮ

Nově syntetizovaný Rab protein je ve své neaktivní formě rozpoznán Rab „escort“ proteinem (REP), díky kterému se dostává do kontaktu s geranylgeranyltransferázou (RabGGTase) zprostředkovávající vazbu geranylgeranylových skupin na C-konec Rab proteinu, prostřednictvím kterých je protein později ukotven do membrány. Takto modifikovaný Rab protein může být rozpoznán inhibitorem disociace GDP (GDI z angl.

„GDP-dissociation inhibitor“) a transportován na donorovou membránu, kde za účasti faktoru pro výměnu guaninových nukleotidů (GEF z angl. „Guanine Nucleotide Exchange Factor“) dochází k výměně navázaného GDP za GTP. Aktivovaný Rab protein je poté schopen interagovat s rozpustnými faktory, které působí jako efektory pro přenos signálu Rab GTPáz v transportním mechanismu a umožňují tak regulaci různých fází vezikulárního transportu. Po fúzi vezikulu s cílovou membránou dochází k hydrolýze GTP katalyzovanou proteinem aktivujícím GTPázu (GAP z angl. „GTPase-activating protein“) a inaktivaci GTPázy. Nakonec jsou Rab proteiny s navázaným GDP extrahovány z membrány prostřednictvím GDI, jsou uvolněny do cytosolu a může dojít k obnovení cyklu jejich navázáním na další cílovou membránu *(Obr. 8)* (Goody et al., 2017; Hutagalung a Novick, 2011).



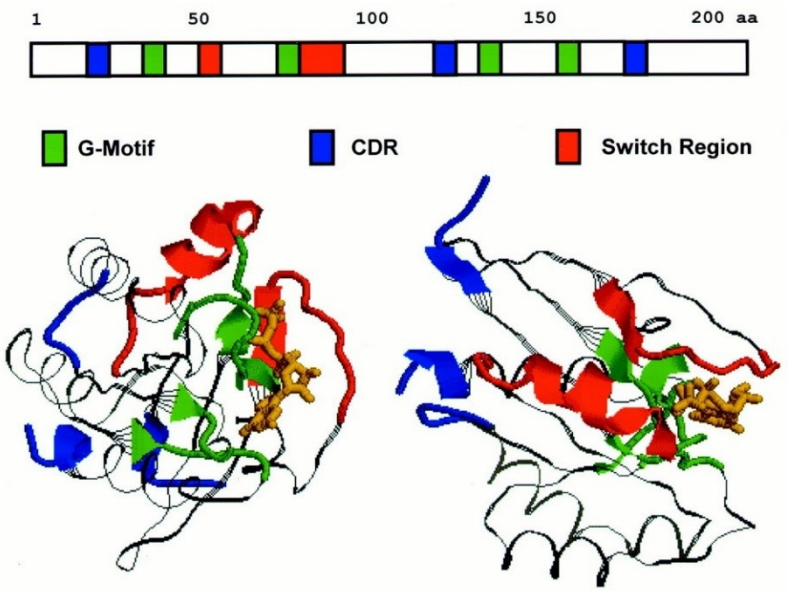

***Obr. 8: Molekulární mechanismus funkce Rab proteinů.*** *Nově syntetizovaný Rab protein je ve své neaktivní formě navázán na Rab „escort“ protein (REP), díky kterému se dostává do kontaktu s geranylgeranyltransferázou (RabGGTase). RabGGTase se skládá z α-podjednotky a katalytické β-podjednotky zajišťující prenylaci Rab proteinu. Po prenylaci je Rab protein aktivován faktorem pro výměnu guaninových nukleotidů (GEF) katalyzujícím výměnu GDP za GTP. Aktivovaný Rab interaguje s efektorovými molekulami a reguluje tak různé kroky vezikulárního transportu. Nakonec je Rab deaktivován proteinem aktivujícím GTPázu (GAP), jenž katalyzuje hydrolýzu GTP na GDP. Poté je Rab v neaktivní formě navázán na inhibitor disociace GDP (GDI), čímž se stává rozpustný a může být opět navázán na membránu. Převzato a upraveno z Goody et al. (2017).*

### 2.3.2 STRUKTURA RAB PROTEINŮ

Rab proteiny jsou vysoce evolučně konzervovanou skupinou proteinů napříč všemi eukaryoty. Jejich diverzita a počet roste společně se složitostí daného organismu, která je spojená s větší kompartmentací vyžadující vyšší specializaci vezikulárního transportu

(Bock et al., 2001). Přestože se jednotlivé druhy liší počtem členů Rab rodiny, sekvenční identita Rab proteinů mezi jednotlivými druhy zůstala vysoká. Například mezi ortology pocházející z kvasinek a savců se sekvenční identita pohybuje okolo 55-75 %. Široká distribuce Rab proteinů a jejich vysoká homologie napříč druhy tak naznačuje jejich velký význam v biologických procesech odehrávajících se uvnitř eukaryotické buňky (Tuvim et al., 2001).

Terciální struktura Rab proteinů byla popsána na myším modelu proteinu Rab-3a. *(Obr. 9)* (Dumas et al., 1999; Ostermeier a Brunger, 1999). Rab proteiny obecně sdílejí motiv běžný pro všechny malé GTPázy Ras rodiny, který se skládá z 6 β-listů obsahující pět paralelních vláken a jedno vlákno antiparalelní obklopené pěti α-helixy. V pěti smyčkách spojující α-helixy a β-listy se pak nachází elementy zodpovědné za vazbu guaninových nukleotidů a $Mg^{2+}$, a také za hydrolýzu GTP (Stenmark a Olkkonen, 2001). Na povrchu 3D molekuly byly definovány dvě oblasti označené jako „Switch region I" a „Switch region II", které při výměně guaninových nukleotidů prochází konformační změnou (Schlichting et al., 1990). Tyto oblasti jsou také nezbytné pro interakci Rab proteinů se svými regulátory GEF a GAP. Dále byly identifikovány 4 oblasti označené jako „Complementary Determining Regions" (CDR), které se liší mezi jednotlivými skupinami Rab proteinů a pravděpodobně umožňují specifickou vazbu efektorových molekul na příslušný Rab protein (Chavrier et al., 1991; Moore et al., 1995).

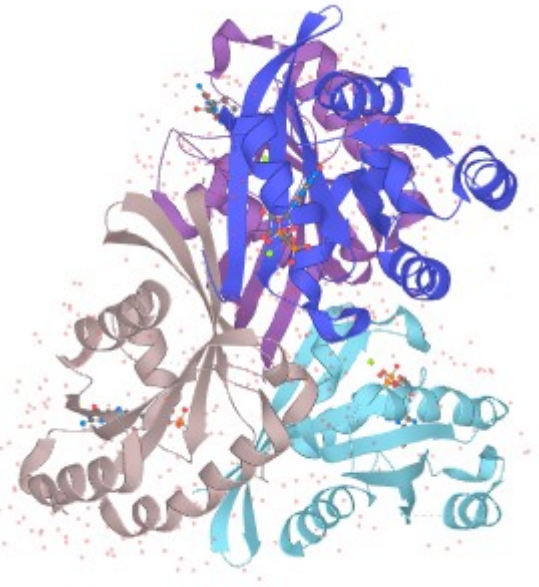



***Obr. 9: Primární a terciální struktura proteinu Rab-3A v komplexu s navázaným GTP.*** *Zeleně jsou vyobrazeny G-motivy vážící GTP. Červeně je pak znázorněn Switch region, ve kterém dochází ke změně konformace při výměně nukleotidů. Modře jsou znázorněny „Complementary Determining Regions" (CDR) o kterých se předpokládá, že se účastní specifických interakcí mezi jednotlivými Rab podrodinami a jejich efektorovými molekulami. Molekula GTP je označena žlutě. Obrázek byl převzat z Tuvim et al. (2001).*

## 2.4 PROTEIN RAB-2A

Protein Rab-2A patří do Rab rodiny monomerních G-proteinů podílejících se na regulaci intracelulárního vezikulárního transportu (Stenmark a Olkkonen, 2001). Sekvenční identita se mezi jednotlivými členy Rab rodiny pohybuje okolo 35 až více než 80 %. Rab proteiny se sekvenční identitou vyšší než 75 % jsou obvykle označeny stejným číslem, za číslem je pak danému proteinu přiřazené písmeno (např. Rab-2A, Rab-2B). Takto blízce příbuzné Rab proteiny se dají považovat za izoformy a obvykle se nachází ve stejných buněčných kompartmentech, kde plní podobnou funkci (Tuvim et al., 2001). U savčích Rab proteinů byl také popsán alternativní sestřih, který by mohl zajišťovat vznik izoforem, jenž interagují s odlišnými efektory a liší se tak svou funkcí (Echard et al., 2000). Sekvenční identita mezi lidskými proteiny Rab-2A a Rab-2B je 83 %. Oba proteiny se nacházejí mezi cis-Golgiho cisternami a endoplazmatickým retikulem *(Obr. 7, str. 10)* a jsou nezbytné pro udržení struktury GA. Funkce proteinu Rab-2B je však nezávislá na proteinu Rab-2A, jehož hlavní úloha je regulace intracelulárního vezikulárního transportu směrem od endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu (Aizawa a Fukuda, 2015; Short et al., 2001; Tisdale et al., 1992; Tisdale a Balch, 1996).

Byly popsány dvě izoformy lidského proteinu Rab-2A o molekulových hmotnostech 23,5 a 20 kDa, které jsou produkovány alternativním sestřihem. Odlišnost mezi nimi spočívá v tom, že druhá izoforma na rozdíl od první izoformy postrádá aminokyseliny 16-39. Protein Rab-2A má velmi nízkou jak buněčnou tak i tkáňovou specifitu. U člověka je exprimován ve více než 250 tkání včetně testis, epididymis, prostaty a semenných váčků (Uniprot). Terciální struktura proteinu Rab-2A *(Obr. 10)* je velmi podobná struktuře proteinu Rab-3A popsané v *Kap. 2.3.2*.



***Obr. 10: Struktura lidského proteinu Rab-2A**, Uniprot.*

### 2.4.1 PROTEIN RAB-2A A JEHO LOKALIZACE A FUNKCE V SAVČÍCH SPERMIÍCH

Přestože bylo publikováno několik studií popisující roli proteinu Rab-2A v savčích spermiích, přesná lokalizace ani funkce tohoto proteinu v samčích pohlavních buňkách nebyly dosud plně pochopeny. Protein Rab-2A byl poprvé lokalizován na povrchu plazmatické membrány spermií pomocí monoklonální protilátky 5C5. Byl popsán v oblasti překrývající akrozom u epididymálních, ejakulovaných i kapacitovaných prasečích spermií (Zigo et al., 2015). Podobná lokalizace proteinu Rab-2A jako u kance byla později popsána také na myším modelu, kde byl detekován signál Rab-2A v akrozomální oblasti a střední části bičíku (Bae et al., 2019). U býků byl Rab-2A lokalizován v subakrozomální vrstvě proteinů PT podílejících se na ukotvení akrozomu k jádru maturované spermie *(Kap. 2.1.4)*, a také byla popsána pravděpodobná funkce tohoto proteinu v býčích spermatidách při biogenezi akrozomu (Mountjoy et al., 2008; Oko a Sutovsky, 2009). V dalším experimentu Zigo et al., (2015) pak bylo zjištěno, že protein Rab-2A, rozpoznávaný protilátkou 5C5, odpovídá vazbě biotinem značených glykoproteinů ZP na proteiny spermie a byl také navržený pravděpodobný původ Rab-2A v epididymální tekutině kance. Další studie předpokládají úlohu proteinu Rab-2A spolu s Rab-3A v akrozomální exocytóze *(Kap. 2.4.1.2)* (Kwon et al., 2014; Lopez et al., 2007; Mountjoy et al., 2008; Yunes et al., 2000). Jiné publikace pak popisují Rab-2A jako klíčový protein související s kapacitací spermií *(Kap. 2.4.1.2)* a dokonce navrhují protein Rab-2A jako biomaker samčí fertility (Bae et al., 2019; Kwon et al., 2015a, 2015b, 2014).

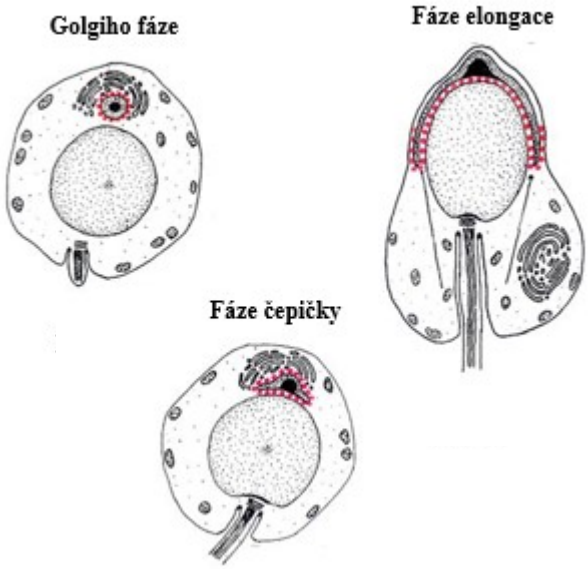
#### 2.4.1.1 FUNKCE RAB-2A V BIOGENEZI AKROZOMU

Bylo popsáno několik proteinů podílejících se na vzniku akrozomu během spermiogeneze (Peterson et al., 1992). Rab-2A byl v průběhu Golgiho fáze a fáze čepičky spermiogeneze u býků detekován na cytosolické straně membrány proakrozomálních a akrozomálních váčků *(Obr. 11)*. Vhledem k velkému množství Rab-2A detekovaného v membráně těchto váčků a popsané funkci Rab proteinů v regulaci vezikulárního transportu se předpokládá, že je Rab-2A hlavní protein regulující transport a fúzi malých sekrečních váčků směřujících od trans-Golgi do rostoucích proakrozomálních a akrozomálních váčků (Mountjoy et al., 2008). Přítomnost Rab-2A v malých sekrečních veziklech však zatím nebyla prokázána. Jak již bylo zmíněno, v somatických buňkách protein Rab-2A obvykle zprostředkovává regulaci vezikulárního transportu mezi endoplazmatickým

retikulem a cis-Golgi (Tisdale et al., 1992). Je proto velmi překvapivé, že ve spermatidách dochází ke změně polarity tohoto transportu a Rab-2A reguluje pohyb váčků od trans-Golgi směrem ke vznikajícímu akrozomu. Tato změna polarity by mohla být vysvětlena asociací Rab-2A s jinými efektory ve spermatidách než v somatických buňkách. Může to být ale také dáno rozdílnou orientací GA v buněčné polaritě zárodečné versus somatické buňky. V somatických buňkách je trans strana GA orientována směrem k cytoplazmatické membráně, tedy ve směru sekrece, zatímco v kulatých spermatidách je trans strana GA umístěna ve směru k jaderné obálce, a to z důvodu sekrece akrozomálních proteinů. Je tak možné že se Rab-2A pouze přizpůsobil změně této polarity (Mountjoy et al., 2008).

O významné roli Rab proteinů v biogenezi akrozomu svědčí také novější studie, ve které byla detekována exprese nového RabGAP specifického pro varlata (označeného jako MGCRABGAP) v periakrozomální oblasti elongujících a elongovaných myších spermatid, a také v oblasti krčku zralých spermií. Jeho exprese kolokalizovala s expresí Rab-3A výhradně v postmeiotických buňkách během spermiogeneze. Dále byly identifikovány transkripty RabGAP v myších i lidských varlatech, přičemž množství transkriptu RabGAP bylo sníženo v testikulární tkáni mužů s různými typy spermatogenních defektů (Lin et al., 2011).

Po dokončení biogeneze akrozomu, jak byla popsána u býčí spermie, v průběhu elongace spermatidy, Rab-2A postupně mizí z povrchu téměř celé vnější akrozomální membrány a zůstává zachován pouze v oblasti ekvatoriálního segmentu, a také na vnitřní akrozomální membráně. Zde se poté stává součástí subakrozomální vrstvy proteinů PT ukotvující akrozom maturovaných spermií pevně k jádru, čímž je akrozom stabilizován *(Obr. 11)*. K upevnění akrozomální membrány přes protein Rab-2A tak pravděpodobně slouží geranylgeranylové skupiny kovalentně vázané na jeho C-konci (Mountjoy et al., 2008; Oko a Sutovsky, 2009).




***Obr. 11: Ilustrace znázorňující distribuci proteinu Rab-2A během tří fází býčí spermiogeneze****: Golgiho fáze, fáze čepičky a fáze elongace spermatidy. Červené tečky znázorňují protein Rab-2A, který je během Golgiho fáze a fáze čepičky spojen s cytosolickou stranou akrozomální membrány. V průběhu elongace spermatidy Rab-2A postupně mizí z povrchu OAM a je zachován pouze v oblasti ekvatoriálního segmentu OAM a pod IAM, kde zůstává jako součást PT zralých spermií. Převzato a upraveno z Mountjoy et al. (2008).*

#### 2.4.1.2 FUNKCE RAB-2A V KAPACITACI A AKROZOMÁLNÍ REAKCI SPERMIÍ

Pro to, aby spermie byla schopna překonat extracelulární obaly vajíčka a došlo k úspěšnému oplození, musí při průchodu oviduktem podstoupit maturační proces, zvaný kapacitace (Austin, 1951; Chang, 1951). Studie využívající proteomický přístup k nalezení proteinů souvisejících s kapacitací v kančích spermií, detekovala vysokou expresi Rab-2A v kančích spermiích před kapacitací. Po kapacitaci kančích spermií byla naopak zaznamenána snížená exprese Rab-2A (Kwon et al., 2014). Vhledem k roli Rab proteinů v regulaci vezikulárního transportu a membránové fúze, a také k detekci Rab-2A na akrozomální membráně během biogeneze akrozomu, se předpokládá, že by Rab-2A mohl být zapojen do strukturní modifikace akrozomu během kapacitace spermie, která je nezbytná pro následnou indukci akrozomální exocytózy (Kwon et al., 2014; Mountjoy et al., 2008; Stenmark a Olkkonen, 2001). Snížená exprese proteinu Rab-2A u spermií po kapacitaci byla popsána také na myším modelu. V hlavičce i bičíku myší spermie bylo detekováno několik Rab proteinů, u kterých byla měřena míra exprese před a po kapacitaci. Po kapacitaci byly exprese všech Rab proteinů i jejich regulátorů, jako je GDI a GEF, významně sníženy. Výjimku tvořil pouze GTPázu aktivující protein (GAP), jehož hladina exprese se po kapacitaci nezměnila. Z toho autoři usuzují, že na rozdíl od Rab proteinů v somatických buňkách je u spermatických Rab proteinů dráha ireverzibilní a po kapacitaci již nedochází k jejich návratu do deaktivované formy (Bae et al., 2019)

Stejní autoři, zabývající se identifikací proteinů souvisejících s kapacitací u kance, dále porovnávali proteiny exprimované ve spermiích kanců s různě velkými vrhy. Rab-2A byl nadměrně exprimován ve spermiích po kapacitaci od kanců s malými vrhy mláďat, přičemž jeho exprese negativně korelovala s velikostí vrhu. Rozdílná exprese Rab-2A tak podporuje potenciální zapojení tohoto proteinu do regulace samčí plodnosti prostřednictvím akrozomální reakce. Na základě těchto zjištění byl protein Rab-2A navržen jako biomarker související se samčí neplodností (Kwon et al., 2015b, 2015a).

Další událostí, následující po kapacitaci, která je nezbytná pro průchod spermie do vajíčka a úspěšné oplození je akrozomální reakce. Jedná se o vápníkem indukovanou mnohonásobnou fúzi vnější akrozomální membrány s plazmatickou membránou spermie, díky které dochází k uvolnění akrozomálního obsahu. Lytické enzymy uvolněné z akrozomálního váčku pak disociují glykoproteinový obal (ZP) oocytu, aby spermie mohla projít až k plazmatické membráně oocytu a fúzovat s ním (Yanagimachi, 2011). Bylo popsáno několik Rab proteinů podílejících se na exocytóze akrozomálního váčku (Bustos et al., 2012; Lopez et al., 2007; Ruete et al., 2014). Za hlavní Rab protein klíčový pro indukci akrozomální reakce je považován Rab-3A (Lopez et al., 2007). Nárůst intracelulární hladiny vápníku, ke které dojde po otevření $Ca^{2+}$ kanálů v plazmatické membráně spermie po indukci akrozomální reakce progesteronem a glykoproteiny ZP, způsobí aktivaci Rab-3A (Belmonte et al., 2005; Kirkman-Brown et al., 2003; Michaut et al., 2000). Efektory Rab-3A se pak podílejí na ireverzibilním připojení akrozomu k plazmatické membráně spermie prostřednictvím regulace SNARE proteinů přítomných na obou membránách, které je nezbytné pro poslední kroky fúze membrán (De Blas et al., 2005). Vhledem k podobné lokalizaci proteinů Rab-3A a Rab-2A se předpokládá, že by se Rab-2A mohl na akrozomální exocytóze podílet spolu s proteinem Rab-3A podobným mechanismem (Bae et al., 2019; Kwon et al., 2014; Lopez et al., 2007; Mountjoy et al., 2008; Yunes et al., 2000).

## 2.5 EXOZOMY

Exozomy jsou extracelulární membránové váčky o velikosti 40–500 nm sekretované většinou typů buněk do extracelulárního prostoru a tělesných tekutin jako je krev, moč, plodová voda, amnionová tekutina, mateřské mléko, ale také oviduktální tekutina a ejakulát. Exozomy hrají zásadní roli v intracelulární komunikaci. Obsahují řadu

cytosolických i membránových proteinů, lipidů, ale také mRNA i microRNA, které mohou být pomocí exozomů přeneseny do jiné buňky (Baskaran et al., 2020; Simpson et al., 2008; Valadi et al., 2007). Mezi exozomy pocházející z ejakulátu patří především epididymozomy a prostazomy. Epididymozomy jsou malé membránové vezikuly vylučované apokrinním způsobem do lumen epididymu, kde se podílejí na získávání nových proteinů důležitých pro zrání spermie (Sullivan et al., 2007) .

### 2.5.1 PROSTAZOMY

Prostazomy, též označované jako apozomy, či seminozomy jsou membránové váčky o průměru 40-500 nm, jenž jsou sekretovány epiteliálními buňkami prostaty do semenné plazmy (Delves et al., 2007; Luchter-Wasylewska a Wasylewski, 2007). Prostazomy mají podobné vlastnosti jako epididymozomy, oba typy vezikulů obsahují vysoký podíl cholesterolu ku fosfolipidům a hlavní fosfolipidem je sfingomyelin (Kravets et al., 2000; Rejraji et al., 2006; Simpson et al., 2008). Byly popsány dva mechanismy, kterými jsou prostazomy sekretovány do lumen prostaty. Prvním mechanismem je exocytóza, při které dochází k navázání vezikulu k plazmatické membráně a následné fúzi vedoucí k uvolnění prostazomu přímo do lumen. Druhým mechanismem je takzvaná „diacytóza“, jejíž princip spočívá v translokaci vezikulu z cytosolu buňky do lumen, při které dochází k proděravění plazmatické membrány (Brody et al., 1983; Ronquist a Brody, 1985). Po sekreci prostazomů do semenné plazmy dochází k pH závislé fúzi prostazomů s membránou spermií, při které jsou proteiny pocházející z prostazomu přeneseny do membrány spermie, kde plní řadu biologických funkcí (Carlini et al., 1997; Kravets et al., 2000). Fúzí prostazomů s membránou spermie dochází také k jejímu nabohacení o cholesterol a sfingomyelin, čímž se membrána stává méně fluidní a zabraňuje tak předčasné akrozomální reakci (Arienti et al., 1998; Carlini et al., 1997). Dále prostazomy stimulují motilitu spermií (Fabiani et al., 1994), chrání spermii před imunitní reakcí a kyselým prostředí uvnitř samičího reprodukčního traktu (Arienti et al., 1997), napomáhají zkapalnění semenné plazmy (Lilja a Laurell, 1984), mají antibakteriální účinky (Lena Carlsson et al., 2000) a byl popsán také inhibiční efekt prostazomů na růst rakovinných buněk prostaty (L. Carlsson et al., 2000). V prostazomech izolovaných z lidské semenné plazmy byla identifikována řada enzymů, transportních a strukturních proteinů, chaperonů, proteinů signální transdukce a také 11 Rab proteinů, včetně proteinu Rab-2A, jejich regulátor Rab-GDI1 a dvou GAP. Předpokládá se tedy, že by Rab proteiny mohly být zapojeny do třízení proteinů pro transport v prostazomu (Utleg et al., 2003).

# 3. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

## 3.1 HYPOTÉZY

V rámci studie povrchových proteinů spermie důležitých pro rozpoznání a vazbu spermie na *zona pellucida* (ZP) vajíčka byl vytvořen panel monoklonálních protilátek proti povrchovým proteinům prasečích spermií. Osm z těchto protilátek rozpoznávalo protein v oblasti akrozomu na hlavičce spermie. Podařilo se identifikovat pouze 3 proteiny rozpoznávané těmito protilátkami se ZP vázající aktivitou, a to proakrozin/akrozin rozpoznávaný klonem 4C7, laktadherin/p47 klonem 1H9 a protein Rab-2A rozpoznávaný protilátkou 5C5 *(Tab. 1)* (Zigo et al., 2015).

***Tabulka 1:*** *Protilátky značící proteiny přítomné na kančích ejakulovaných spermiích a jejich charakterizace, převzato a upraveno ze* Zigo et al. (2015).

| Protilátka | Oblast rozpoznávána na ejakulovaných spermiích | WB proteomu spermie | Lokalizace proteinů na spermiích rozpoznávaných protilátkami |
|---|---|---|---|
| 4C7 | Akrozomální oblast | 45 kDa | Povrch ejakulovaných a kapacitovaných spermií |
| 4C11 | Akrozomální oblast | 45 kDa | Povrch ejakulovaných a kapacitovaných spermií |
| 5C5 | Akrozomální oblast | 24, 27 kDa | Povrch kapacitovaných spermií, epid. tekutina |
| 1D1 | Akrozomální oblast | 51 kDa | Povrch kapacitovaných spermií |
| 2D10 | Akrozomální oblast | 200 kDa | Povrch kapacitovaných spermií |
| 1E3 | Akrozomální oblast | 32, 35, 38 kDa | Povrch ejakulovaných a kapacitovaných spermií, epid. tekutina, prostata |
| 2E1 | Akrozomální oblast | 200 kDa | Povrch ejakulovaných a kapacitovaných spermií |
| 1H9 | Apikální oblast | 35, 45 kDa | Povrch kapacitovaných spermií, ledviny |

Na základě křížové reaktivity protilátky 5C5 s proteinem lidských spermií a dosavadních znalostí o výskytu a funkci proteinu Rab-2A v savčích spermiích a reprodukčním traktu jsme stanovili následující dílčí hypotézy:

- protein Rab-2A je rozpoznáván protilátkou 5C5 na povrchu lidských spermií
- protein Rab-2A se vyskytuje v extracelulárních veziklech izolovaných z lidské semenné plazmy
- protein Rab-2A se nachází v perinukleární théce lidských spermií
- protein Rab-2A je schopen vázat glykoproteiny lidské ZP

## 3.2 CÍLE PRÁCE

Pro potvrzení stanovených hypotéz jsme sestavili následující cíle:

1) Otestovat monoklonální protilátky připravené proti povrchovým proteinům prasečích spermiích na lidských spermiích a zjistit tak možnou křížovou reaktivitu jednotlivých protilátek.

2) Na základě křížové reaktivity protilátky 5C5 na lidských spermiích, která rozpoznává protein Rab-2A na povrchu kančích spermií, jsme se rozhodli identifikovat tento protein v lidských spermiích.

3) Zjistit lokalizaci proteinu Rab-2A v lidských spermiích v různých funkčních stavech.

4) Detekovat protein Rab-2A v lidských spermiích od pacientů s patologickými spermiogramy a výsledky porovnat s detekcí u pacientů s normozoospermií.

5) Zjistit, zda je protein Rab-2A součástí proteinů perinukleární théky lidských spermií.

6) Detekovat Rab-2A v semenné plazmě a sekrečních exozomech.

7) Ověřit, zda protein Rab-2A odpovídá vazbě glykoproteinů lidské ZP na proteinové extrakty spermií.

# 4. MATERIÁLY A METODY

## 4.1 BIOLOGICKÉ MATERIÁLY

### 4.1.1 LIDSKÉ SPERMIE

Zamražené i čerstvé vzorky lidských ejakulátů byly získány s informovaným souhlasem od dárců z IVF center ProCrea Swiss, Praha a Gennet, Praha. Kryokonzervované vzorky byly uchovány v 1 ml mikrozkumavkách v tekutém dusíku při -196 °C.

### 4.1.2 LIDSKÉ *ZONA PELLUCIDA*

Fragmenty lidských *zona pellucida* byly získány z oocytů od dárkyň z IVF centra ProCrea Swiss, Praha na základě informovaného souhlasu pacientek a rozhodnutí etické komise BIOCEV.

## 4.2 CHEMIKÁLIE

| **Název chemikálie** | **Výrobce** |
|---|---|
| Merkaptoetanol | Sigma-Aldrich, USA |
| Aceton | Lachner, ČR |
| 30% Acrylamide/Bis Solution | Bio-Rad, USA |
| Avidin konjugovaný s křenovou peroxidázou | Sigma-Aldrich, USA |
| Bromfenolová modř | Sigma-Aldrich, USA |
| Calcium ionophore | Sigma-Aldrich, USA |
| Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) | Serva, Německo |
| Dimethylformamid | Sigma-Aldrich, USA |
| Etanol | Penta, ČR |
| Ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt dihydrate (EDTA) | Sigma-Aldrich, USA |
| EZ-Link® Sulfo-NHS-SS-Biotin | Thermo Fisher Scientific, USA |

| | |
|---|---|
| Formaldehyd | Lachner, ČR |
| Gelatin, from cold water fish skin | Sigma-Aldrich, USA |
| Glycerol | Sigma-Aldrich, USA |
| Glycin | Serva, Německo |
| Gradient™ 40/80 | Origio, Dánsko |
| Hoechst (33342) | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Hydrogenuhličitan sodný | Lachema, ČR |
| Hydroxid sodný | Penta, ČR |
| Chlorid amonný | Lachema, ČR |
| Chlorid draselný | Lachner, ČR |
| Chlorid sodný | Lachner, ČR |
| Kyselina chlorovodíková | Lachner, ČR |
| Kyselina octová | Sigma-Aldrich, USA |
| Lectin PNA z *Arachis hypogaea* („peanut“), Alexa Fluor™ 568 Conjugate | Invitrogen, USA |
| Metanol | Lachner, ČR |
| N-propylgalát | Sigma-Aldrich, USA |
| Nonfat dry milk | Bio-Rad, USA |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma-Aldrich, USA |
| Persíran amonný (APS z angl. „Ammonium persulfate“) | Sigma-Aldrich, USA |
| Pierce™ IP lysis buffer | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Pierce™ Protein A/G Agarose beads (20422) | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Pierce ™ RIPA Buffer | Thermo Fisher Scientific, USA |

| | |
|---|---|
| Precision Plus Protein™ Dual Color Standard | Bio-Rad, USA |
| Protease inhibitor cocktail tablets (cOmplete Mini) | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Ponceau S solution | Sigma-Aldrich, USA |
| Sacharóza | Sigma-Aldrich, USA |
| Sodium dodecyl sulfát (SDS) | Sigma-Aldrich, USA |
| Sperm Preparation Medium | Origio, Dánsko |
| Sperm Wash | Origio, Dánsko |
| SuperBlock TM Blocking Buffer v PBS | Thermo Fisher Scientific, USA |
| SuperSignal$^{R}$ West Femto | Thermo Fisher Scientific, USA |
| SuperSignal$^{R}$ West Pico | Thermo Fisher Scientific, USA |
| N,N,N′,N′-tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED) | Bio-Rad, USA |
| Tetramethylethylene | Bio-Rad, USA |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) | Serva, Německo |
| Triton X-100 | Serva, Německo |
| Tween® 20 | Serva, Německo |
| VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI (Inc., H-1200-10) | Vector Laboratories, USA |

## 4.3 PUFRY

| **Složení pufru** |
|---|
| Alkalický lyzační puf (0,1 M NaOH, 0,05 M EDTA, 2 % SDS, 2 % merkaptoetanol) |
| Elektrodový pufr (10x koncentrovaný: 60,6 g Tris, 288 g glycinu, 20 g SDS, doplněno do 2 l $dH_2O$) |

| |
|---|
| Fosfátový pufr – PBS (0,01 M „Phosphate-buffered saline“, 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,4) |
| Fyziologický roztok (0,9 % NaCl, $dH_2O$) |
| Transferový pufr (28,8 g glycinu, 6 g Tris, 400 ml 20 % metanolu, doplněno do 2 l $dH_2O$) |
| Trisový pufr – TBS (25 mM „Tris-buffered saline“, 150 mM NaCl, pH 7,6) |

## 4.4 KOMERČNÍ KITY

| **Název kitu** | **Výrobce** |
|---|---|
| Total Exosome Isolation Kit (from plazma) (4484450) | Invitrogen, USA |
| Qubit™ Protein Assay Kit (Q33212) | Invitrogen, USA |
| Pierce™ Cell Surface Protein Isolation Kit (89881) | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Pierce™ Silver Stain Kit (24612) | Thermo Fisher Scientific, USA |

## 4.5 PROTILÁTKY

| **Primární protilátky** | **Výrobce** | **Ředění pro WB** | **Ředění pro IF** |
|---|---|---|---|
| Myší monoklonální protilátka proti laktadherinu (1H9) | Vyrobeno v Laboratoři reprodukční biologie, Biotechnologický ústav AV ČR | 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 | 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 |
| Myší monoklonální protilátka proti proakrozinu (4C7) | Vyrobeno v Laboratoři reprodukční biologie, Biotechnologický ústav AV ČR | 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 | 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 |
| Myší monoklonální protilátka proti Rab-2A (5C5) | Vyrobeno v Laboratoři reprodukční biologie, Biotechnologický ústav AV ČR | 1:10 | 1:5 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Myší monoklonální protilátka proti Clusterinu (Apolipoprotein J) (Hs-3) | Vyrobeno v Laboratoři reprodukční biologie, Biotechnologický ústav AV ČR | 1:100 | |
| Myší monoklonální protilátka proti α tubulinu (DM1A clone – T6199) | Sigma-Aldrich, USA | 1:3000 | |
| Myší monoklonální protilátka proti fosfotyrozinu, 4G10 (05-1050) | Sigma-Aldrich, USA | | 1:300 |
| Králičí polyklonální protilátka proti CD9/MRP-1 (bs-2489R) | Bioss, USA | 1:250 | |
| Králičí polyklonální protilátka proti Histonu H2B (testis specific) (ab23913) | Abcam, USA | 1:250 | |
| Králičí polyklonální protilátka proti Rab-2 (ab154729) | Abcam, USA | 1:250 | 1:50 |
| Myší monoklonální protilátka proti CD46 (M177) | Invitrogen, USA | | |

| **Sekundární protilátky** | **Výrobce** | **Ředění pro WB** | **Ředění pro IF** |
|---|---|---|---|
| Kozí protilátka proti myším IgG konjugovaná s Alexa Fluor ™ 488 | Invitrogen, USA | | 1:300 |
| Kozí protilátka proti králičím IgG konjugovaná s Alexa Fluor ™ 488 | Invitrogen, USA | | 1:300 |
| Kozí protilátka proti myším IgG | Bio-Rad, USA | 1:3000 | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| konjugovaná s HRP (170-6516) | | | |
| Kozí protilátka proti králičím IgG konjugovaná s HRP (170-6515) | Bio-Rad, USA | 1:3000 | |

## 4.6 LABORATORNÍ VYBAVENÍ

- Azure c600 Gel Imaging System (Azure Biosystems, USA)
- DeltaVision OMX™ V4 (GE Healthcare, Švédsko; Light Microscopy Core Facility, IMG CAS, ČR)
- Eppendorf® Centrifuge 5804/5804R (Sigma-Aldrich, USA)
- Galaxy® 14 S CO2 Incubator (Eppendorf, Německo)
- Invertovaný konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 880 NLO (Zeiss, Německo)
- ISAS – Integrated Semen Analysis System (sériové číslo: 00AFCF80; Proiser R+D Systems, Španělsko)
- Mikroskop NICON E-400 FLUORES (Nicon, Japonsko)
- Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad, USA)
- Power Pac$^{TM}$ HC (Bio-Rad, USA)
- Qubit fluorometr (Invitrogen, USA)
- Sonikátor (Hielschner, Německo)
- Thermomixing Blok MB-102 (BIOER. Čína)
- Ultracentrifuga (Beckman Coulter, USA)
- Vodní lázeň GRAD GD100 (Grant Instruments Ltd, Velká Británie)

## 4.7 METODY

### 4.7.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ LIDSKÝCH SPERMIÍ

Kryokonzervované lidské ejakuláty od dárců z IVF center byly rozmrazeny inkubací ve vodní lázni při 37 °C po dobu 10 minut. Pro selekci pouze kvalitních spermií byla použita denzitní gradientové centrifugace. Do 15ml zkumavky byl postupně navrstven 1 ml 80% média předehřátého na 20-25 °C, na něj byl po stěně zkumavky opatrně nanesen 1 ml předehřátého 40% média a nakonec 1 ml resuspendovaného ejakulátu. Pro manipulaci s lidskými spermiemi byly použity speciální špičky s rozšířeným koncem (ThermoFisher-Scientific, USA). Vzorky byly centrifugovány při laboratorní teplotě, při 300 *g* po dobu 25 minut. Morfologicky kvalitní spermie, jež mají vyšší hustotu než spermie s narušenou morfologií se po gradientové centrifugaci nacházely na dně zkumavky, kde je hustota gradientu nejvyšší. Naopak spermie s poškozenou morfologií byly přítomny v méně hustém gradientu. Fragmenty spermií a leukocyty pak vytvořily prstenec na rozhrání semenné plazmy a 40% gradientu. Peleta selektovaných spermií byla následně dvakrát promyta ve Sperm Wash médiu, centrifugována při 300 *g*, po dobu 10 minut, a nakonec resuspendována v 1 ml fyziologického roztoku předehřátého na 37 °C. Poté byla mikroskopicky zkontrolována kvalita spermií (morfologie, koncentrace a pohyblivost) pomocí CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis, *Kap. 4.7.3*) a vzorky spermií byly dále zpracovány.

### 4.7.2 *IN VITRO* KAPACITACE LIDSKÝCH SPERMIÍ

K promyté peletě ejakulovaných spermiích byl přidán 1 ml Sperm Preparation média předehřátého na 37 °C a vzorky byly ponechány kapacitovat po dobu 2 hodin v inkubátoru s 5% $CO_2$ při 37 °C. Po inkubaci byly vzorky stočeny při 300 *g*, 10 minut a následně promyty ve Sperm Wash médiu a dále zpracovány.

### 4.7.3 COMPUTER-ASSISTED SPERM ANALYSIS (CASA)

Ze vzorků lidských ejakulovaných a kapacitovaných spermií (*Kap. 4.7.1* a *4.7.2*), naředěných ve fyziologickém roztoku, byly odebrány 2 µl a naneseny do počítací komůrky (Leja® standard, o hloubce 20 µm). V každém vzorku bylo pomocí softwaru Computer-Assisted Sperm Analysis (ISAS®; Proiser R+D Systems) při 60 snímcích za sekundu vyhodnocováno vždy 6 různých polí daného vzorku (Castellini et al., 2011).

CASA je speciální software schopný rozpoznat každou spermii ve vzorku a vyhodnotit dráhu její motility společně s dalšími kinetickými parametry, jako jsou parametry rychlosti vyjádřené v μm/s: rychlost křivočarého pohybu („curvilinear velocity“ = VCL), rychlost přímočarého pohybu („straight line velocity“ = VSL) a průměrná rychlost dráhy pohybu („average path velocity“ = VAP); parametry progresivity vyjádřené v procentech: index linearity („linearity index“ = LIN), index přímosti („straightness index“ = STR) a oscilační index („oscillation Index“ = WOB) a další parametry jako je laterální pohyb hlavičky spermie („head lateral moving“ = ALH, μm) a frekvence úderu bičíku („beat frequency cross“ = BCF, Hz). Detekce hyperaktivovaných spermií proběhla s ohledem na parametry ALH, LIN a STR (Suarez, 2008).

### 4.7.4 *IN VITRO* INDUKCE AKROZOMÁLNÍ REAKCE U LIDSKÝCH SPERMIÍ

Ke spermiím po *in vitro* kapacitaci byl přidán Calcium ionophore v koncentraci 1:100 (ve Sperm Preparation médiu) a spermie byly inkubovány v inkubátoru při 37 °C a 5% $CO_2$ po dobu jedné hodiny. Vzorky byly opět centrifugovány při 300 *g*, 10 minut a promyty ve Sperm Wash médiu.

### 4.7.5 SELEKCE SPERMIÍ PO AKROZOMÁLNÍ REAKCI OD SPERMIÍ S INTAKTNÍM AKROZOMEM (PATENT 308864)

Pro selekci spermií po akrozomální reakci byla použita metoda, vyvinutá Laboratoří reprodukční biologie, založená na přítomnosti proteinu CD46 na povrchu spermií, u nichž došlo k narušení integrity akrozomu. Spermie po *in vitro* indukci AR byly promyty ve Sperm Wash médiu a naředěny ve fyziologickém roztoku na koncentraci 4x $10^6$ buněk/ml. Ke 40 μl takto připravené suspenze spermií bylo přidáno 20 μl magnetických nanočástic (Clemente-Associates Inc., USA) s konjugovanou protilátkou proti proteinu CD46. Vzorky byly inkubovány 15 minut při laboratorní teplotě a poté umístěny na 10 minut na magnetický bloček. Spermie, u nichž proběhla akrozomální reakce byly navázány na magnetické nanočástice a vychytány magnetem, zatímco spermie s intaktním akrozomem zůstaly v suspenzi. Následně byly ze spermií izolovány proteiny metodou popsanou v *Kap. 4.7.6.* Spermie byly uvolněny z vazby na nanočástice přidáním vzorkového SDS pufru pro lyzaci spermií a následným povařením vzorků při 95 °C.

### 4.7.6 IZOLACE PROTEINŮ Z LIDSKÝCH SPERMIÍ POMOCÍ SDS

Vzorky spermií získaných od pacientů s normozoospermií či různými patologiemi byly zpracovány dle kapitoly *4.7.1*, stejně tak spermie v různých funkčních stavech připravené dle kapitol *4.7.2 a 4.7.4*. K peletě takto zpracovaných spermií byl přidán vzorkový SDS pufr (na 10 milionů spermií 100 µl pufru) s inhibitory proteáz. Vzorky byly inkubovány na ledě po dobu 30 minut a každých 5 minut vortexovány. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány při 10 000 *g*, 2 minuty při 4 °C. Supernatant byl přendán do nové mikrozkumavky. V případě nízké koncentrace izolovaných proteinů byl ke vzorkům přidán aceton (šestinásobek objemu vzorku) a vzorky byly ponechány inkubovat při - 20 °C po dobu jedné hodiny za občasného míchání. Poté byly vzorky centrifugovány při 7000 *g,* 15 minut při 4 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta spermií opět resuspendována ve vzorkovém SDS pufru. Vzorky byly zredukovány přidáním 5% merkaptoetanolu a povařeny v termobloku za stálého třepání při 95 °C, 5 minut. Nakonec byla změřena koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích pomocí Qubit™ Protein Assay Kitu a před nanesením na gel byl přidán 1 µl bromfenolové modři.

Pro izolaci proteinů z médií po AR a kapacitaci spermií byla média centrifugována při 2000 *g,* 10 minut a přenesena do nové mikrozkumavky. Poté byla opět centrifugována při 10 000 *g*, 10 minut a supernatant byl přenesen do nové mikrozkumavky. 100 µl supernatantu bylo precipitováno acetonem a precipitované proteiny byly následně rozpuštěny v redukujícím SDS pufru.

### 4.7.7 MĚŘENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ VE VZORKU

Měření koncentrace proteinů ve vzorku bylo provedeno za použití fluorometru Qubit a Qubit™ Protein Assay Kitu. Ke 199 µl pufru Qubit™ byl přidán 1 µl Qubit™ reagent. Ke 198 µl takto připraveného roztoku byly přidány 2 µl vzorku pro měření koncentrace proteinů. Vzorky byly vortexovány a inkubovány 15 minut ve tmě. Po inkubaci byly vzorky vloženy do přístroje a byla změřena jejich koncentrace podle které byla následně vypočítána nanáška daného vzorku na gel, aby odpovídala koncentraci 10 µg/ml.

### 4.7.8 IZOLACE POVRCHOVÝCH PROTEINŮ Z LIDSKÝCH SPERMIÍ

Pro izolaci proteinů z povrchu spermií byl použit Pierce® Cell Surface Protein Isolation Kit. Ejakuláty od dárců s normozoospermií byly selektovány na gradientu a dvakrát promyty. 12 mg EZ-Link-® Sulfo-NHS-SS-Biotinu bylo rozpuštěno ve 48 ml

vychlazeného 1x koncentrovaného PBS. Ke každému vzorku pelety spermií byly přidány 4 ml takto připraveného roztoku biotinu a vzorky byly inkubovány při 4 °C za stálého otáčení po dobu 30 minut. Poté byly vzorky centrifugovány při 300 *g*, 4 °C, 10 minut, supernatant odstraněn a pelety spermií 2x promyty v 5 ml 1x koncentrovaném TBS (pH 7,4). Dále byl k peletám promytých spermií přidán lyzační pufr (Lysis buffer) z izolačního kitu. Vzorky byly ponechány 30 minut na ledě a každých 5 minut sonikovány po dobu 5 sekund. Po lyzaci byly vzorky stočeny při 10 000 *g*, 2 minuty a teplotě 4 °C. Peleta se zbytky buněk byla odstraněna a supernatant obsahující izolované proteiny byl dále použit. Na kolonky (Pierce™ Spin Columns, Thermo-Fisher Scientific, USA) bylo naneseno 500 µl nosiče se Streptavidinem (Pierce® Streptavidin Ultra Link® Resin) a poté byly dvakrát promyty promývacím roztokem (Wash Solution) z izolačního kitu. Následně byl na kolonky nanesen lyzát, který byl na kolonkách ponechán při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny za stálého míchání. Po inkubaci byly kolonky centrifugovány při 1000 *g*, 1 minutu. Supernatant obsahující proteiny, které nebyly biotinylovány byl uschován jako kontrola izolace. Kolonky byly opět dvakrát promyty promývacím roztokem (Wash Solution), a poté bylo na kolonky naneseno 100 µl roztoku SDS-DTT (ke 450 µl SDS bylo přidáno 23,7 µl DTT). Vzorky byly inkubovány v termobloku za stálého třepání po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Nakonec byly vzorky centrifugovány při 1000 *g*, 2 minuty. Získaný supernatant obsahoval biotinylované proteiny spermií. Před nanesením na gel byla u vzorků změřena koncentrace proteinů a přidán 1 µl bromfenolové modři.

### 4.7.9 IMUNOPRECIPITACE – PŘÍPRAVA VZORKŮ NA HMOTNOSTNÍ SPEKROMETRII

Vzorky spermií od normozoospermiků byly dvakrát promyty ve fyziologickém roztoku a peleta spermií byla resuspendována ve 200 µl RIPA pufru s 0,1 % SDS a inhibitory proteáz. Suspenze spermií byla dále inkubována 30 minut na ledě a každých 5 minut vortexována, následně byly vzorky centrifugovány při 10 000 *g*, 5 minut, při teplotě 4 °C. Supernatant byl rozdělen do mikrozkumavek po 100 µl a ke každému vzorku bylo přidáno 50 µl protilátky 5C5. Vzorky byly vortexovány a inkubovány přes noc při 4 °C v termobloku za stálého třepání. Druhý den byly vzorky naneseny na kolonky s agarózovými kuličkami s konjugovaným A/G proteinem (Pierce™ Protein A/G Agarose beads), které byly předtím 3x promyty slabým lyzačním pufrem (Pierce™ IP lysis buffer). Dále byly vzorky inkubovány na kolonkách při laboratorní teplotě po dobu

dvou hodin za stálého míchání. Po 2 hodinách byly vzorky stočeny při 1000 *g*, 4 °C, 1 minutu. K supernatantu obsahujícím proteiny, které se nenavázaly na agarózové kuličky, bylo přidáno 100 µl SDS pufru a byl použit jako kontrola. Peleta obsahující zachycené proteiny byla 3x promyta ve 200 µl PBS-Tween 20 (0,05 % Tween v PBS) centrifugací při 1000 *g*, 1 minutu. Kolonky s agarózovými kuličkami byly poté přeneseny do nových mikrozkumavek, byl na ně nanesen redukující SDS pufr (s 5% merkaptoetanolem)
a vzorky byly inkubovány při 90 °C po dobu 5 minut. Nakonec byly vzorky stočeny při 1000 *g*, 5 minut a imunoprecipitát (supernatant) byl použit pro SDS-PAGE.

### 4.7.10 IZOLACE PROTEINŮ Z PERINUKLEÁRNÍ THÉKY

Čerstvý ejakulát získaný od tří dárců s normozoospermií byl centrifugován při 500 *g* po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Ze vzorku byla odsáta semenná plazma a zamrazena pro následné využití k izolaci exozomů. Peleta spermií byla dvakrát promyta v 25 mM TBS (pH 7,6) a centrifugována při 500 *g*, po dobu 10 minut. Pro úspěšnou izolaci proteinů z PT bylo zapotřebí oddělit hlavičky spermií od bičíků, čehož bylo dosaženo sonikací spermií na sonikátoru s nastavenou amplitudou 80 mikronů. Promytá peleta spermií byla nejprve resuspendována v TBS s inhibitory proteináz (cOmplete Mini) v objemovém poměru; 10:1 (pufr:spermie) a sonikována na ledě 30 sekund s minutovými intervaly a pěti opakováními. Při mikroskopické kontrole mělo nejméně 95 % spermií oddělenou hlavičku od bičíku. Suspenze byla opět dvakrát promyta v TBS a peleta resuspendována v TBS s inhibitory proteináz a navrstvena na roztok 80% sacharózy (1 ml suspenze spermií v TBS a 12 ml 80% sacharózy) do ultracentrifugačních zkumavek (Ultra Clear, Beckman Coulter USA). Vzorky byly ultracentrifugovány při 40 000 rpm po dobu 65 minut ve výkyvném rotoru (SW 40 Ti Swinging-Bucket Rotor) na ultracentrifuze (Beckman Coulter). Oddělené hlavičky po ultracentrifugaci tvořily peletu na dně zkumavky, zatímco bičíky tvořily prstenec na rozhraní TBS a sacharózy. Peleta hlaviček byla přendána do nové zkumavky, dvakrát promyta a mikroskopicky zkontrolována. Následovala extrakce proteinů PT z hlaviček spermií. Vzorky byly resuspendovány a inkubovány v 0,2% Tritonu X-100 (20 ml 1% Tritonu X-100 v 80 ml TBS) na ledě 1 hodinu. Poté byly vzorky centrifugovány při 2500 *g* a teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Supernatant obsahující proteiny vnitřní akrozomální membrány byl přenesen do nové mikrozkumavky a uchován jako kontrola. Peleta spermií byla nejprve promyta a následně resuspendována a inkubována po dobu jedné hodiny

v 1 M KCl (v TBS). Vzorky byly opět odstředěny při 2500 *g*, supernatant obsahující iontově vázané proteiny PT zamražen a peleta hlaviček spermií opět promyta. Nakonec byly vzorky ponechány přes noc ve 100 mM NaOH (v TBS) za stálého točení při 4 °C. Druhý den byly vzorky stočeny při 2500 *g*, 10 minut a 4 °C. Nakonec byl supernatant obsahující kovalentně vázané proteiny PT dialyzován pomocí kolonek (Pierce Concentrator, PES, 3K MWCO, 0,5 ml, Thermo-Fisher Scientific, USA) centrifugací při 12 000 *g*, 4 °C, dokud nedošlo k neutralizaci pH vzorku. Peleta obsahující zbytky spermií, převážně jádra byla promyta, resuspendována v SDS a zamražena. Supernatanty získané z každého kroku extrakce byly zamraženy jako kontroly izolace pro následné použití na SDS-PAGE.

Rozmrazené vzorky jednotlivých frakcí, jež jsme získali při izolaci proteinů z PT spermie, byly precipitovány přidáním acetonu (šestinásobek objemu vzorku) po dobu jedné hodiny v mrazáku při - 20 °C a každých 15 minut protřepány. Po precipitaci byly vzorky centrifugovány při 7000 *g*, 4 °C po dobu 15 minut. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována v redukujícím SDS (s 5% merkaptoetanolem) a povařena v termobloku za stálého třepání při 95 °C, 5 minut. Nakonec byla ve všech vzorcích změřena koncentrace proteinů pomocí Qubit fluorometru a přidán 1 µl bromfenolové modři

### 4.7.11 IZOLACE EXOZOMŮ Z LIDSKÉ SEMENNÉ PLAZMY

Semenná plazma (SP) byla získána od dárců s normálním spermiogramem. Nejprve byla získána SP centrifugací ejakulátu při 300 *g* po dobu 10 minut. Poté byla SP centrifugována při 2000 *g*, 10 minut a 4 °C a následně při 10 000 *g*,10 minut při 4 °C. Supernatant byl odebrán do nové mikrozkumavky. Pro izolaci exozomů se SP byl využit komeční kit (Total Exosome Isolation Kit). Na 100 µl SP bylo přidáno 30 µl sterilně připraveného 1x koncentrovaného PBS a inhibitory proteáz a vzorek byl vortexován. Poté bylo přidáno 30 µl roztoku Exosome Precipitation Reagent z kitu a vzorek byl opět vortexován. Následovala inkubace vzorku 10 minut při laboratorní teplotě a centrifugace při 10 000 *g*, 5 minut při 4 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta obsahující vezikuly byla resuspendována v alkalickém lyzačním pufru (0,1 M NaOH, 0,05 M EDTA, 2% SDS, 2% merkaptoetanol). Vezikuly byly dále 3x sonikovány na ledě po dobu 10 sekund, a poté 10 minut inkubovány při 90 °C v termobloku za stálého třepání. Ke vzorku byly přidány 2 µl 4 M kyseliny octové a vzorek byl vortexován 30 sekund

s následnou inkubací při 90 °C po dobu 20 minut. Po inkubaci byly vzorky smíchány s redukujícím SDS pufrem (obsahující 5% merkaptoetanol) v poměru 1:1, opět inkubovány při 90 °C, 5 minut a zamrazeny pro následné použití na SDS-PAGE elektroforézu. Před nanesením vzorků na gel byla změřena koncentrace proteinů, a poté byl přidán 1 µl bromfenolové modři.

### 4.7.12 SDS ELEKTROFORÉZA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU (SDS-PAGE)

Nejprve byla sestavena aparatura pro vertikální elektroforézu (Mini Protean III Cell, Bio-Rad). Dále byl připraven 12% separační gel (2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 4 ml 30% akrylamidu, 3,5 ml $dH_2O$, 100 µl 10% SDS, 70 µl 10% APS, 4,5 µl TEMED), který byl nalit mezi dvě skla, převrstven $dH_2O$ a ponechán polymerovat při laboratorní teplotě 25 minut. Poté byl připraven 4% zaostřovací gel (1,52 ml $dH_2O$, 624 µl 1 M Tris pH 6,8, 325 µl 30% akrylamidu, 25 µl 10% SDS, 35 10% µl APS, 3,8 µl TEMED), jenž byl navrstven na separační gel. Mezi skla byly umístěné 15ti jamkové hřebínky a gel byl ponechán polymerovat přibližně 15 minut. Dále byly skla s gely přemístěny do aparatury a zality 1x koncentrovaného elektrodovým pufrem. Následně byly vyndány hřebínky a naneseny vzorky, přičemž objem nanášeného vzorku byl vypočítán dle koncentrace proteinů naměřené ve vzorku pomocí přístroje Qubit Fluorometru aby výsledná koncentrace odpovídala 10 µg/ml. Jako marker pro určení molekulových hmotností proteinů byl použit Precision Plus Protein™ Dual Color Standard, který byl nanášen na jamku v objemu 4 µl. Nejprve byla elektoforéza spuštěna při 80 V, dokud proteiny nedosáhly hranice separačního gelu. Poté bylo napětí zvýšeno na 140 V a elektroforéza běžela přibližně 1,5 hodiny.

### 4.7.13 VIZUALIZACE PROTEINŮ V GELU

#### 4.7.13.1 BARVENÍ COOMASSIE BRILLIANT BLUE

Po skončení SDS elektroforézy *(Kap. 4.7.12)* byly gely nejprve 2x promyty v $dH_2O$ a poté barveny v roztoku CBB (0,25 g CBB, 45 ml metanolu, 9 ml kyseliny octové a 45 ml $dH_2O$) po dobu 1 hodiny. Pro odbarvení pozadí byl gel promyt odbarvovacím roztokem (250 ml metanolu, 100 ml kyseliny octové, 650 ml $dH_2O$).

#### 4.7.13.2 BARVENÍ STŘÍBREM

Pro barvení proteinů stříbrem byl použit Pierce™ Silver Stain Kit. Gely po SDS elektroforéze *(Kap. 4.7.12)* byly nejprve 2x promyty v $dH_2O$ po dobu 5 minut, a poté byly 2x fixovány 15 minut ve fixačním roztoku (30% etanol:10% kyselina octová). Po fixaci byly gely 2x promyty v 10% etanolu po dobu 5 minut a 2x v $dH_2O$. Následně byly gely inkubovány a promývány podle instrukcí daných výrobcem. Nakonec byly gely inkubovány 2-3 minuty ve vyvolávacím roztoku dokud se neobjevily obarvené proteinové proužky. Reakce byla zastavena přidáním 5% kyseliny octové.

### 4.7.14 WESTERN BLOT A IMUNODETEKCE PROTEINŮ

Chromatografické papíry (Whatman™, Sigma-Aldrich, USA), houbičky i PVDF membrána (Immobilon®-P Polyvinylidene difluoride membranes, Sigma-Aldrich, USA), jež byla nejprve aktivována inkubací v metanolu po dobu 5 minut, byly na 15 minut ponořeny do transferového pufru. Po skončení SDS-PAGE byly gely vyjmuty ze skel a také umístěny do vaničky s transferovým pufrem. Do kazety mezi houbičky a chromatografické papíry Whatman byl přendán gel a něj byla položena PVDF membrána. Western blot běžel při 500 mA po dobu jedné hodiny v transferovém pufru na ledě. Po dokončení Western blotu byly membrány promyty $dH_2O$ a obarveny 0,1% Ponceau S pro kontrolu přítomnosti proteinů na membráně. Následně byla membrána třikrát promyta roztokem PBS-Tween (0,05 % Tween 20 v PBS) a blokována v 5% mléce naředěném v PBS po dobu jedné hodiny. Po blokaci byla membrána opět dvakrát promyta v PBS-Tween a inkubována přes noc s primární protilátkou při teplotě 4 °C. Jako negativní kontrola sloužila membrána, která byla přes noc inkubovány namísto primární protilátky v PBS. Druhý den byla membrána 3x promyta v PBS-Tween a ponechána inkubovat po dobu 1 hodiny se sekundární protilátkou. Od sekundární protilátky byla membrána v intervalu 10 minut 4x promyta v PBS-Tween a na nakonec byla promyta v PBS. Vizualizace signálu byla povedena substrátem SuperSignal$^R$ West Femto/Pico za využití přístroji Azure c600 biosystems.

### 4.7.15 IMUNOFLUORESCENČNÍ DETEKCE PROTEINŮ SPERMIÍ

Pro zjištění lokalizace proteinu Rab-2A v lidských spermiích byla použita nepřímá fluorescenční mikroskopie (NIF) společně s protilátkou 5C5 z panelu monoklonálních protilátek. Jako kontrola pak byla využívána komerční protilátka proti proteinu Rab-2.

Suspenze ejakulovaných a kapacitovaných lidských spermií a spermií po indukci AR byla připravena dle kapitol *4.7.1-4*. 10 µl takto připravené suspenze spermií bylo naneseno na sklíčko a k tomu přidáno 70 µl fixačního roztoku aceton-metanol (1:1, v:v) zajišťující permeabilizaci membrány spermie. Pro fixaci bez permeabilizace plazmatické membrány buněk byl využíván 3,6 % PFA. Vzorky byly ponechány fixovat ve vlhké komůrce 7 minut v případě fixace aceton-metanol a po dobu 10 minut při využití PFA fixace. Poté byly sklíčka 3x opláchnuta ve fyziologickém roztoku a preparáty blokovány ve 100 µl blokačního pufru SuperBlock ™ po dobu 30 minut. Po blokaci byla sklíčka opět 3x promyta ve fyziologickém roztoku a inkubována s primární protilátkou přes noc. Druhý den byla sklíčka 3x promyta a byla na ně nanesena sekundární protilátka, se kterou byly vzorky inkubovány ve vlhké komůrce 1 hodinu. Vzorky byly promyty od sekundární protilátky fyziologickým roztokem a destilovanou vodou a na sklíčka bylo naneseno 100 µl PNA lektinu naředěném ve fyziologickém roztoku (1:300). Sklíčka byla ponechána inkubovat 20 minut ve vlhké komůrce, a poté byla promyta fyziologickým roztokem. Nakonec bylo přidáno montovací médium VECTASHIELD s DAPI, které umožňuje vizualizaci jader spermií vazbou na DNA a preparát byl překryt krycím sklíčkem. Detekce proběhla za využití fluorescenčního a konfokálního mikroskopu.

Pro přípravu vzorků na SIM mikroskopii byl využit stejný postup jako v případě fluorescenční a konfokální mikroskopie. Byla pouze použita speciální krycí sklíčka (tloušťka č. 1.5 H, 170 ± 5 µM, Paul Marienfeld GmbH a Co. KG, Německo) a pro vizualizaci jader byl v případě SIM mikroskopie použit Hoechst v koncentraci 1:100. Na závěr byly suché vzorky fixovány 90% glycerolem s 5% N-propylgalátem.

Pro ověření povrchového značení protilátky 5C5 byla tato protilátka inkubována v suspenzi spermií v koncentraci 1:2 při 37 °C po dobu 1 hodiny a po inkubaci se sekundární protilátkou fixována roztokem 2 % formaldehydu. Stejným způsobem byla provedena také inkubace s protilátkou proti Rab-2 v koncentraci 1:50 sloužící jako kontrola.

### 4.7.16 IZOLACE A BIOTINYLACE GLYKOPROTEINŮ *ZONA PELLUCIDA*

Fragmenty *zona pellucida* (ZP) byly získány z 88 lidských oocytů v GV stádiu. Nejprve byla provedena tepelná solubilizace fragmentů ZP inkubací ve vodní lázni při 74 °C po dobu 30 minut. Pro odstranění nečistot byly vzorky centrifugovány při 10 000 *g*, 4 °C,

10 minut. Supernatant obsahující glykoproteiny ZP byl přenesen do nové mikrozkumavky a byla změřena koncentrace proteinů pomocí Qubit Fluorometru.

Na izolované glykoproteiny lidských ZP byl dále navázán biotin. K roztoku glykoproteinů v destilované vodě o koncentraci 0,35 mg/ml bylo přidáno 0,1 ml x 0,5 M $NaHCO_3$, pH 9 (x = objem vzorku). Na 1 ml vzorku bylo dále přidáno 0,1 mg EZ-Link® Sulfo-NHS-SS-Biotinu ve 25 µl dimethylformamidu a vzorky byly inkubovány po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 1M $NH_4Cl$, pH 6,0 (15 µl/ml roztoku). Glykoproteiny ZP byly poté promývány v Pierce® Concentrators (20K MWCO, 7 ml) pomocí 20mM Tris HCl, pH 7,8 (obsahujícího 0,4M NaCl), při 4500 *g*, 4 °C, po dobu jedné hodiny a nakonec uskladněny při -20 °C.

### 4.7.17 FAR-WESTERN BLOT ANALÝZA S BIOTINYLOVÁNÝMI GLYKOPROTEINY ZP

Nitrocelulózová membrána s rozdělenými proteiny spermií byla promyta v PBS, a poté deaktivována hodinovou inkubací v 1% želatině. Dále byla membrána promyta v PBS s 0,05 % Tween 20 a inkubována přes noc s biotinylovanými glykoproteiny ZP v PBS v koncentraci 200 µl/ml při 4 °C. Druhý den byla membrána 5x promyta po 10 minutách v PBS s 0,05 % Tween 20 a nakonec inkubována v roztoku avidinu konjugovaného s křenovou peroxidázou (v koncentraci 1:1000) po dobu jedné hodiny při laboratorní teplotě. Detekce byla provedena pomocí chemiluminiscenčního substrátu SuperSignal$^R$ West Femto na přístroji Azure c600.

### 4.7.18 STATISTIKA

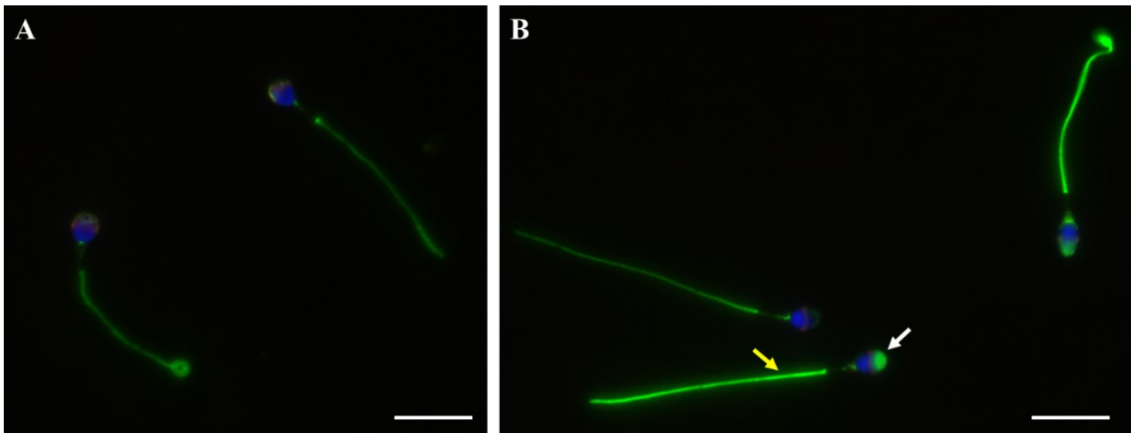
Intenzita proteinových proužků detekovaných na membránách po imunodetekci byla hodnocena denzitomerticky v programu ImageJ (National Institutes of Health, USA) a získaná data byla hodnocena Studentovým t-testem ve statistickém programu JASP (University of Amsterdam, Nizozemí). Naměřené hodnoty pak byly znázorněny v grafech připravených v programu Microsoft Excel.

# 5. VÝSLEDKY

## 5.1 HODNOCENÍ KAPACITOVANÉHO STAVU LIDSKÝCH SPERMIÍ

*In vitro* kapacitace lidských ejakulovaných spermií (připravených dle *Kap. 4.7.1*) byla provedena dle metody popsané v *Kap. 4.7.2.* Dokončení kapacitace spermie je spojeno s hyperaktivací, která je charakterizována změnou charakteru pohybu bičíku měřitelnou pomocí CASA (Suarez, 2008), a také fosforylací tyrozinových zbytků především v oblasti bičíku spermie (Piehler et al., 2006; Sati et al., 2014). Pro hodnocení kapacitovaného stavu lidských spermií byla použita protilátka 4G10 proti fosfotyrozinu *(Obr. 12),* a také CASA *(Tab. 2) (Kap. 4.7.3)*.

Na lidských ejakulovaných spermiích *(Obr. 12A)* byl detekován slabý fluorescenční signál protilátky 4G10 v oblasti akrozomu a v hlavní části bičíku spermie, zatímco u spermií po *in vitro* kapacitaci *(Obr. 12B)* byl v těchto částech zaznamenán silný fluorescenční signál protilátky 4G10, což svědčí o nárůstu fosforylovaných proteinů ve spermii. Na preparátech ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných lidských spermií bylo spočítáno 200 náhodně vybraných spermií. Ve vzorku ejakulovaných spermií bylo přítomno pouze 15 % spermií se silným fluorescenčním signálem, zbytek spermií vykazoval pouze slabý signál, zatímco ve vzorku spermií, u kterých byla *in vitro* indukována kapacitace bylo detekováno 86 % spermií se silným signálem protilátky 4G10.




***Obr. 12**: **Imunofluorescenční značení protilátky 4G10** na **(A)** lidských ejakulovaných a **(B)** in vitro kapacitovaných spermiích. Bílá šipka značí fosforylaci tyrozinových zbytků v oblasti akrozomu, žlutá v oblasti bičíku spermie. Značení protilátky 4G10 je znázorněno zeleně, červeně je vizualizován akrozom spermie pomocí PNA lektinu, jádra jsou znázorněna modře pomocí DAPI, zvětšení 600x, měřítko 10 µm.*

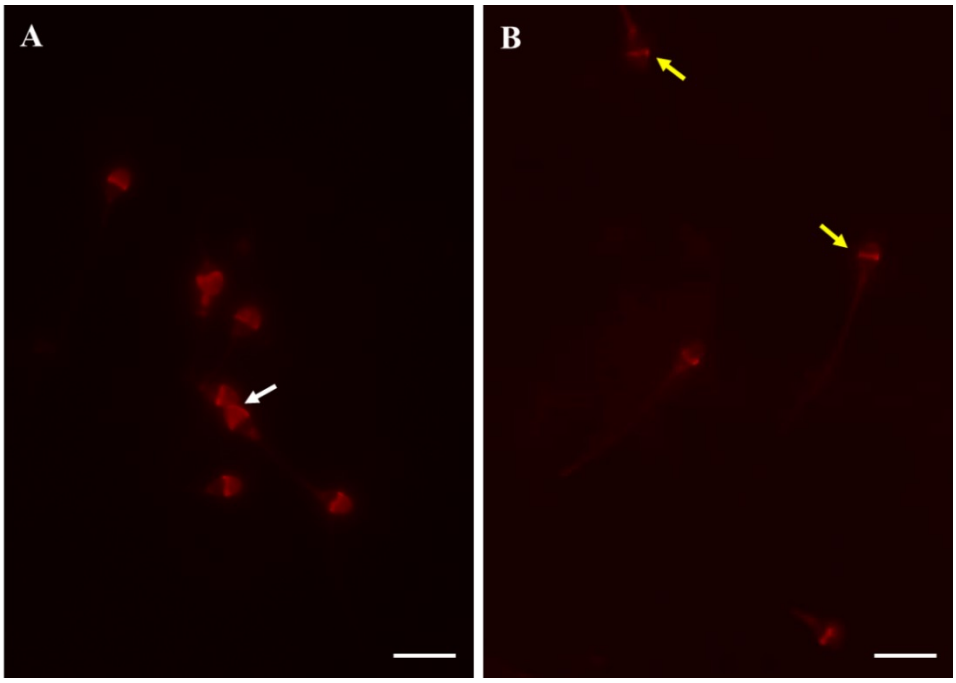
Hyperaktivace spermie je charakterizována asymetrickým ohybem bičíku s vysokou amplitudou (Suarez, 2008). Pomocí softwaru CASA bylo provedeno hodnocení kapacitovaného stavu lidských spermií s ohledem na parametry AHL, LIN a STR *(Tab.2)*. AHL parametr vyjadřuje výkyv hlavičky spermie, který se u kapacitovaných spermií v porovnání se spermiemi ejakulovanými zvyšuje. LIN a STR jsou parametry určující linearitu pohybu spermie, která je naopak u kapacitovaných spermií nižší než u spermií ejakulovaných, takže i naměřené hodnoty jsou nižší v případě kapacitovaných spermií. U kapacitovaných vzorků se také zvýšilo procento neprogresivně motilních spermií (z 52 na 66 %), což potvrzuje změnu charakteru pohybu bičíku spolu se sníženou linearitou pohybu v před, která nastává u kapacitovaných spermií, přičemž procento progresivně motilních spermií se nezměnilo.

***Tabulka 2: Porovnání parametrů ALH (laterální pohyb), LIN (index linearity) a STR (index přímosti) naměřených pomocí CASA na vzorcích ejakulovaných a kapacitovaných lidských spermií.***

| Kontrola kapacitace | Ejakulované spermie | Kapacitované spermie |
|---|---|---|
| ALH (laterální pohyb) | 1,7 µm | 2,0 µm |
| LIN (index linearity) | 29,2 % | 22,1 % |
| STR (index přímosti) | 55,1 % | 47,4 % |

## 5.2 HODNOCENÍ INDUKCE AKROZOMÁLNÍ REAKCE LIDSKÝCH SPERMIÍCH

Úspěšnost *in vitro* indukce akrozomální reakce (AR) spermií , provedené dle metody popsané v *Kap. 4.7.4,* byla hodnocena pomocí PNA lektinu, který se váže na glykokalyx vnější akrozomální membrány spermie a vizualizuje tak přítomnost akrozomu ve spermii (Mortimer et al., 1987). U spermií s intaktním akrozomem *(Obr. 13A)* byl přítomný fluorescenční signál v oblasti celého akrozomu spermie, zatímco u spermií, u kterých již došlo k AR byl pomocí PNA lektinu vizualizován pouze ekvatoriální segment spermie *(Obr. 13B)*, kde po AR zůstávají zbytky vnější akrozomální membrány (Bedford et al., 1979; Yanagimachi, 2011). Z celkového počtu 200 náhodně vybraných spermií bylo na preparátech připravených ze vzorků lidských ejakulovaných spermií přítomno 92 % spermií s intaktním akrozomem a pouze 8 % spermií mělo porušený akrozom. Oproti tomu na preparátech spermií, u kterých byla *in vitro* indukována AR, bylo napočítáno pouze 14 % spermií s intaktním akrozomem a u 86 % spermií již došlo ke ztrátě akrozomu.

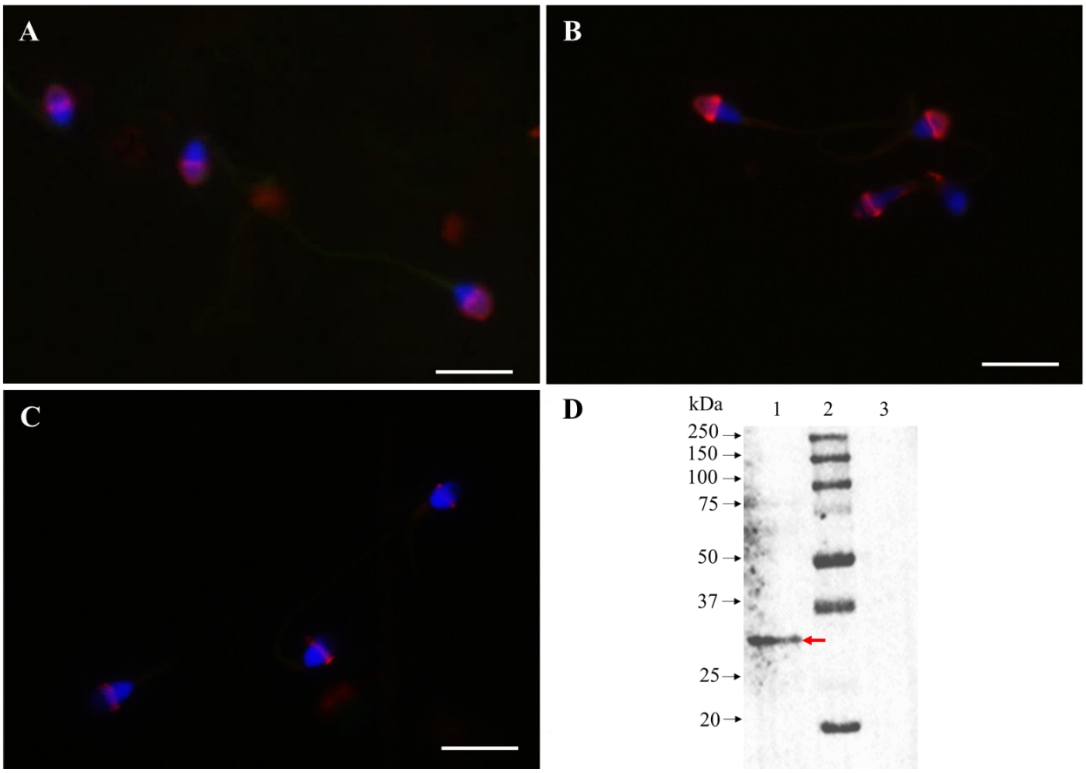



***Obr. 13: Detekce akrozomu pomocí PNA lektinu*** *na* ***(A)*** *lidských ejakulovaných spermií a na* ***(B)*** *spermiích, u kterých byla in vitro indukována akrozomální reakce. Bílá šipka ukazuje na spermii s intaktním akrozomem, žluté šipky na spermii po AR. Červený fluorescenční signál značí vazbu PNA lektinu na sacharidové struktury vnější akrozomální membrány, zvětšení 600x, měřítko 10 µm.*

## 5.3 TESTOVÁNÍ MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK NA LIDSKÝCH SPERMIÍCH

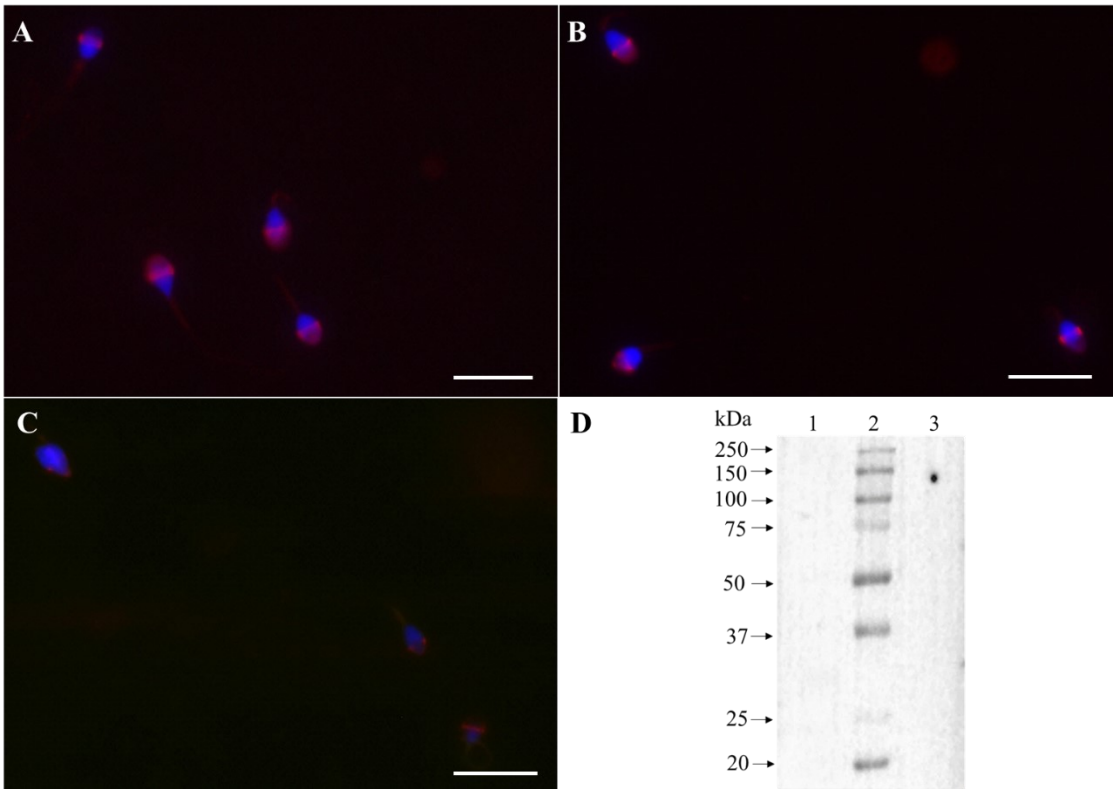
Pro studium proteinů přítomných na povrchu savčích spermií byl v Laboratoři reprodukční biologie připraven panel monoklonálních protilátek. Protilátky byly získány izolací proteinů přítomných na povrchu prasečích ejakulovaných spermií, kterými byly následně imunizovány samice myší. Takto bylo získáno celkem 8 protilátek rozeznávajících povrchové proteiny lokalizované v akrozomální oblasti hlavičky spermie. Pomocí imunoprecipitace proteinů rozeznávaných protilátkami a následné analýze hmotnostní spektrometrií se podařilo identifikovat tři proteiny: prekurzor akrozinu, rozeznávaný protilátkou 4C7, laktadherin/P47 rozeznávaný protilátkou 1H9 a protein Rab-2A, jenž byl detekován pomocí protilátky 5C5 (Zigo et al., 2015). Tyto tři vybrané protilátky jsme následně otestovali také na lidských spermiích pomocí metody nepřímé imunofluorescence *(Kap. 4.7.15)* a Western blot (WB) imunodetekce *(Kap. 4.7.14)*.

**Protilátka 4C7** (rozpoznávající na kančích spermiích protein **proakrozin**) byla testována na lidských ejakulovaných spermiích v různých koncentracích a za redukujících i neredukujících podmínek izolace proteinů. Během imunofluorescenční analýzy nebyl zaznamenán žádný signál protilátky 4C7 na lidských ejakulovaných a kapacitovaných spermiích a ani na spermiích po indukci AR za použití fixace roztokem acetonu a metanolu a různých koncentrací protilátky (reprezentativní *Obr. 14A-C*). Při koncentraci 1:20 protilátky 4C7 a za neredukujících podmínek přípravy proteinů se nám podařilo detekovat pouze proteinový proužek o přibližné molekulové hmotnosti 30 kDa *(Obr. 14D)*. Detekovaný protein však neodpovídal molekulové hmotnosti (47 kDa) proteinu detekovanému na kančích spermiích, proakrozinu (Zigo et al., 2015).



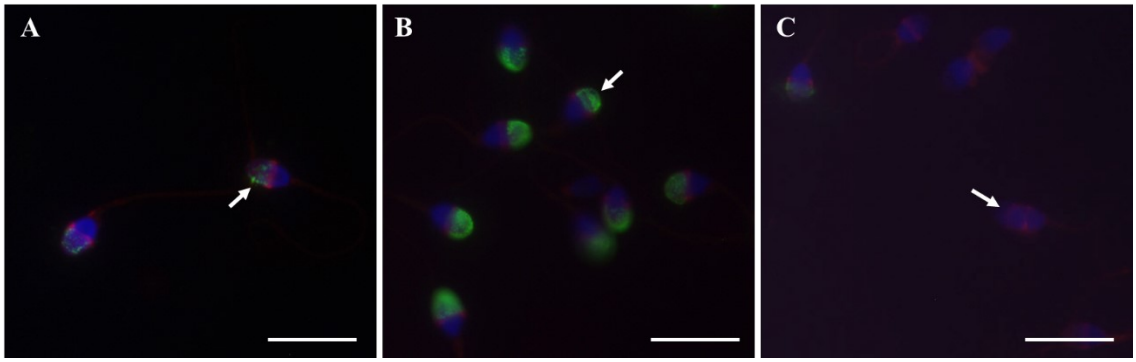

***Obr. 14: Imunofluorescenční značení protilátky 4C7*** *na* ***(A)*** *lidských ejakulovaných,* ***(B)*** *kapacitovaných spermiích a* ***(C)*** *spermiích po indukci akrozomální reakce, modře jsou znázorněna jádra spermií pomocí DAPI, červeně PNA lektin značící akrozom spermií, protilátka 4C7 na lidských spermií neznačila, zvětšení 600x, měřítko 10 µm.* ***(D) Imunodetekce protilátky 4C7*** *v celkových lyzátech lidských ejakulovaných spermií, 1 – lyzát proteinů v neredukujících podmínkách, 2 – molekulové standardy, 3 – lyzát proteinů v redukujících podmínkách.*

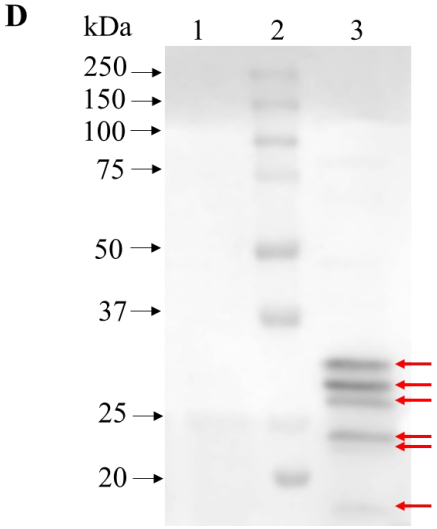
Během testování **protilátky 1H9** (rozpoznávající prasečí **laktadherin/P47**) na lidských ejakulovaných, kapacitovaných spermiích a na spermiích po indukci AR se nám metodou NIF za použití fixace aceton-metanol a různých koncentrací nepodařilo získat pozitivní reakci protilátky 1H9 (reprezentativní *Obr. 15A-C*). Signál protilátky 1H9 nebyl detekován ani na membránách s proteinovými lyzáty lidských ejakulovaných spermií izolovaných za redukujících i neredukujících podmínek *(Obr. 15D)*.




***Obr. 15: Imunofluorescenční značení protilátky 1H9*** *na* ***(A)*** *lidských ejakulovaných,* ***(B)*** *kapacitovaných spermiích a* ***(C)*** *spermiích po indukci akrozomální reakce, modře jsou znázorněna jádra spermií pomocí DAPI, červeně PNA lektin značící akrozom spermií, protilátka 1H9 na lidských spermiích neznačila, zvětšení 600x, měřítko 10 µm.* ***(D) Imunodetekce protilátky 1H9*** *v celkových lyzátech lidských ejakulovaných spermií, 1 – lyzát proteinů v neredukujících podmínkách, 2 – molekulové standardy, 3 – lyzát proteinů v redukujících podmínkách.*

**Protilátka 5C5** (rozpoznávající prasečí **Rab-2A)** byla také testována na lidských spermiích fixovaných roztokem aceton-metanol. Při koncentraci protilátky 5C5 1:5 bylo na lidských ejakulovaných spermiích detekováno slabší bodové značení protilátky 5C5 v oblasti akrozomu spermie *(Obr. 16A)*, zatímco na kapacitovaných spermiích bylo detekováno silné značení v oblasti akrozomální čepičky *(Obr. 16B)*. Na spermiích, u kterých již proběhla akrozomální reakce nebyl detekovatelný žádný signál protilátky 5C5 *(Obr. 16C)*. V lyzátech lidských ejakulovaných spermií bylo za redukujících podmínek a ředění protilátky 1:10 detekováno několik forem proteinu Rab-2A o přibližné molekulové hmotnosti 30, 28, 26, 24, 22 a 18 kDa *(Obr. 16D),* z nichž se nejčastěji v dalších experimentech objevovaly izoformy 28, 26, 24 a 18 kDa.



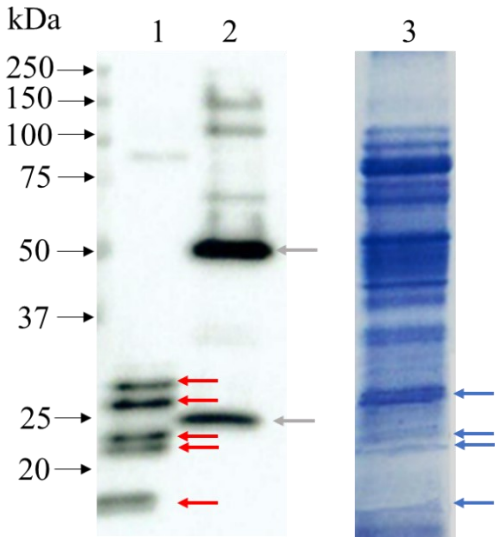




***Obr. 16: Imunofluorescenční značení protilátky 5C5*** *na lidských* ***(A)*** *ejakulovaných,* ***(B)*** *kapacitovaných spermií a* ***(C)*** *spermií po indukci akrozomální reakce, modře jsou znázorněna jádra spermií pomocí DAPI, červeně PNA lektin značící akrozom spermií, protilátka 5C5 zeleně, zvětšení 1000x, měřítko 10 µm.* ***(D) Imunodetekce protilátky 5C5*** *v celkových lyzátech lidských ejakulovaných spermií, 1 – lyzát proteinů v neredukujících podmínkách, 2 – molekulární standardy, 3 – lyzát proteinů v neredukujících podmínkách; šipkami jsou označeny detekované izoformy proteinu Rab-2A.*

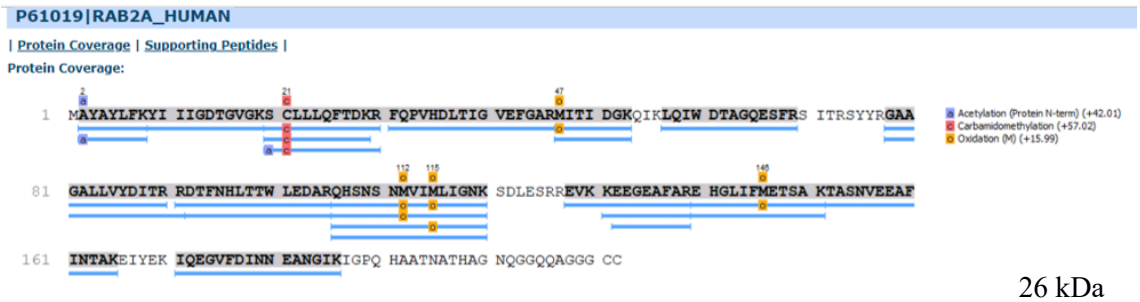
## 5.4 IDENTIFIKACE PROTEINU ROZPOZNÁVANÉHO PROTILÁTKOU 5C5 V LIDSKÝCH SPERMIÍCH

Pro ověření, zda protein rozpoznávaný protilátkou 5C5 na lidských spermiích je skutečně protein Rab-2A, byly vzorky připraveny pro proteinovou identifikaci. Pro cílenou izolaci proteinu rozpoznávaného protilátkou 5C5 jsme se nejprve pokusili o imunoprecipitaci proteinu protilátkou 5C5 *(Kap. 4.7.9)*. Bohužel se nám však ani po několika opakování nepodařilo protein rozpoznávaný protilátkou 5C5 precipitovat a na *Obr. 17 (dráha 2)* jsou viditelné pouze proteinové proužky o velikosti 50 a 23 kDa značící těžký a lehký řetězec protilátky 5C5. Identifikace proteinu byla tedy provedena z celkového lyzátu proteinů izolovaných z ejakulovaných spermií. Z gelu po SDS elektroforéze s rozdělenými proteiny izolovanými z ejakulovaných spermií, které byly obarveny dle metody popsané v *Kap. 4.7.13.1 (Obr. 17, dráha 3)* byly vyřezány oblasti o velikosti 26, 24, 22 a 18 kDa, odpovídající vypočítané molekulové hmotnosti z imunodetekce proteinu protilátkou 5C5

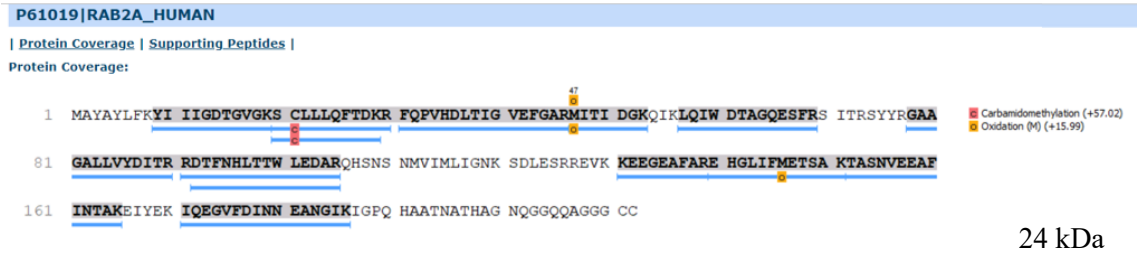
(*Obr. 17, dráha 1)*. Proteinový proužek o velikosti 28 kDa nebyl viditelný na gelu a z tohoto důvodu také nebyl zahrnut do analýzy hmotnostní spektrometrie (MS). Analýza MS byla provedena v Servisním pracovišti Hmotnostní spektrometrie, BTÚ AV ČR. Pomocí MS se podařilo identifikovat protein Rab-2A ve všech proužcích rozpoznávaných protilátkou 5C5 na membráně (26, 24, 22 a 18 kDa). Na *Obr. 18* jsou zvýrazněny sekvence jednotlivých forem odpovídající sekvenci lidského proteinu Rab-2A.



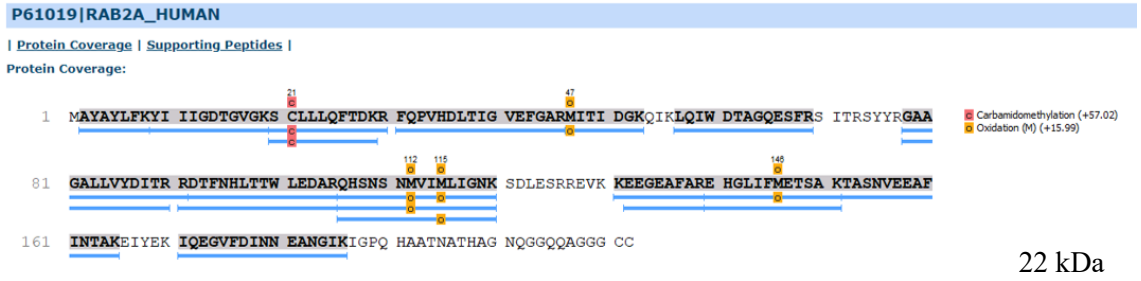

***Obr. 17: Imunodetekce proteinu Rab-2A pomocí protilátky 5C5 pro účely identifikace proteinu**: 1 – celkový lyzát proteinů izolovaný z ejakulovaných spermií, 2 – imunoprecipitát, 3 – gel barvený na proteiny pro MS analýzu. Červenými šipkami jsou znázorněny jednotlivé detekované formy proteinu – 28, 26, 24, 22 a 18 kDa, modré šipky ukazují proteinové proužky pro identifikaci proteinu rozpoznávaného 5C5 pomocí MS. Šedé šipky ukazují těžký (50 kDa) a lehký (25 kDa) řetězec protilátky 5C5 v imunoprecipitátu.*



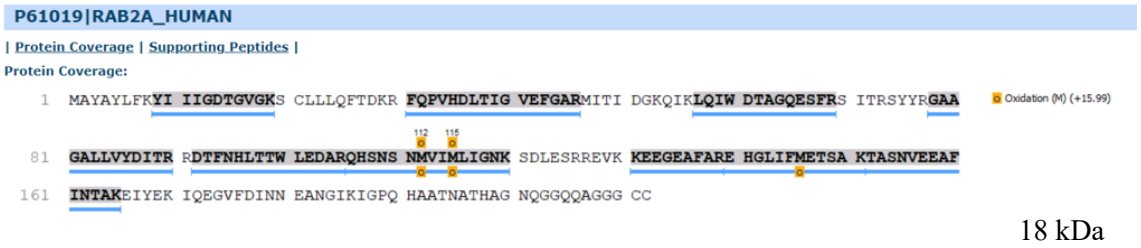

26 kDa




24 kDa




22 kDa




18 kDa

26 kDa

| Peptide |
|---|
| K.TASNVEEAFINTAK.E |
| K.LQIWDTAGQESFR.S |
| K.IQEGVFDINNEANGIK.I |
| R.EHGLIFM(+15.99)ETSAK.T |
| R.DTFNHLTTWLEDAR.Q |
| R.EHGLIFMETSAK.T |
| R.GAAGALLVYDITR.R |
| K.SC(+57.02)LLLQFTDKR.F |
| R.RDTFNHLTTWLEDAR.Q |
| R.FQPVHDLTIGVEFGAR.M |
| K.SC(+57.02)LLLQFTDK.R |
| K.YIIIGDTGVGK.S |
| R.QHSNSNM(+15.99)VIM(+15.99)LIGNK.S |
| R.QHSNSNM(+15.99)VIMLIGNK.S |
| R.QHSNSNMVIM(+15.99)LIGNK.S |
| K.KEEGEAFAR.E |
| R.EVKKEEGEAFAR.E |
| R.QHSNSNMVIMLIGNK.S |
| R.M(+15.99)ITIDGK.Q |
| K.EEGEAFAR.E |
| R.GAAGALLVYDITRR.D |
| R.MITIDGK.Q |
| M.A(+42.01)YAYLFK.Y |
| M.AYAYLFK.Y |
| K.S(+42.01)C(+57.02)LLLQFTDKR.F |
| **total 25 peptides** |

24 kDa

| Peptide |
|---|
| K.TASNVEEAFINTAK.E |
| K.LQIWDTAGQESFR.S |
| R.GAAGALLVYDITR.R |
| R.EHGLIFM(+15.99)ETSAK.T |
| R.FQPVHDLTIGVEFGAR.M |
| K.SC(+57.02)LLLQFTDK.R |
| R.DTFNHLTTWLEDAR.Q |
| K.YIIIGDTGVGK.S |
| K.SC(+57.02)LLLQFTDKR.F |
| K.IQEGVFDINNEANGIK.I |
| R.QHSNSNM(+15.99)VIM(+15.99)LIGNK.S |
| R.RDTFNHLTTWLEDAR.Q |
| K.KEEGEAFAR.E |
| R.M(+15.99)ITIDGK.Q |
| **total 13 peptides** |

22 kDa

| Peptide |
|---|
| K.LQIWDTAGQESFR.S |
| K.TASNVEEAFINTAK.E |
| R.FQPVHDLTIGVEFGAR.M |
| R.GAAGALLVYDITR.R |
| R.EHGLIFM(+15.99)ETSAK.T |
| K.SC(+57.02)LLLQFTDKR.F |
| R.EHGLIFMETSAK.T |
| K.SC(+57.02)LLLQFTDK.R |
| K.IQEGVFDINNEANGIK.I |
| R.QHSNSNM(+15.99)VIM(+15.99)LIGNK.S |
| R.RDTFNHLTTWLEDAR.Q |
| R.DTFNHLTTWLEDAR.Q |
| K.YIIIGDTGVGK.S |
| K.KEEGEAFAR.E |
| R.QHSNSNM(+15.99)VIMLIGNK.S |
| R.QHSNSNMVIM(+15.99)LIGNK.S |
| M.AYAYLFK.Y |
| R.M(+15.99)ITIDGK.Q |
| R.GAAGALLVYDITRR.D |
| K.EEGEAFAR.E |
| **total 20 peptides** |

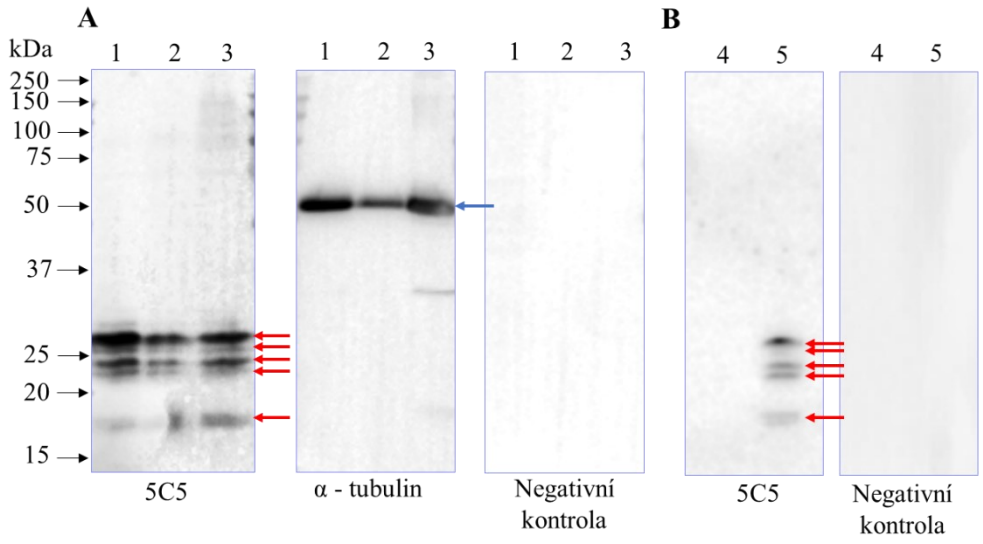
18 kDa

| Peptide |
|---|
| K.LQIWDTAGQESFR.S |
| K.TASNVEEAFINTAK.E |
| R.GAAGALLVYDITR.R |
| R.QHSNSNM(+15.99)VIM(+15.99)LIGNK.S |
| R.FQPVHDLTIGVEFGAR.M |
| R.EHGLIFM(+15.99)ETSAK.T |
| K.YIIIGDTGVGK.S |
| R.DTFNHLTTWLEDAR.Q |
| K.KEEGEAFAR.E |
| **total 9 peptides** |

***Obr. 18: Výsledky analýzy hmotnostní spektrometrie proteinu rozpoznávaného protilátkou 5C5****. 26, 24, 22 a 18 kDa forma proteinu Rab-2A se zvýrazněnými sekvencemi, jež byly rozpoznány hmotnostní spektrometrií a odpovídají sekvenci lidského proteinu Rab-2A. Kompletní data získané z MS se nachází v příloze na str. 87.*

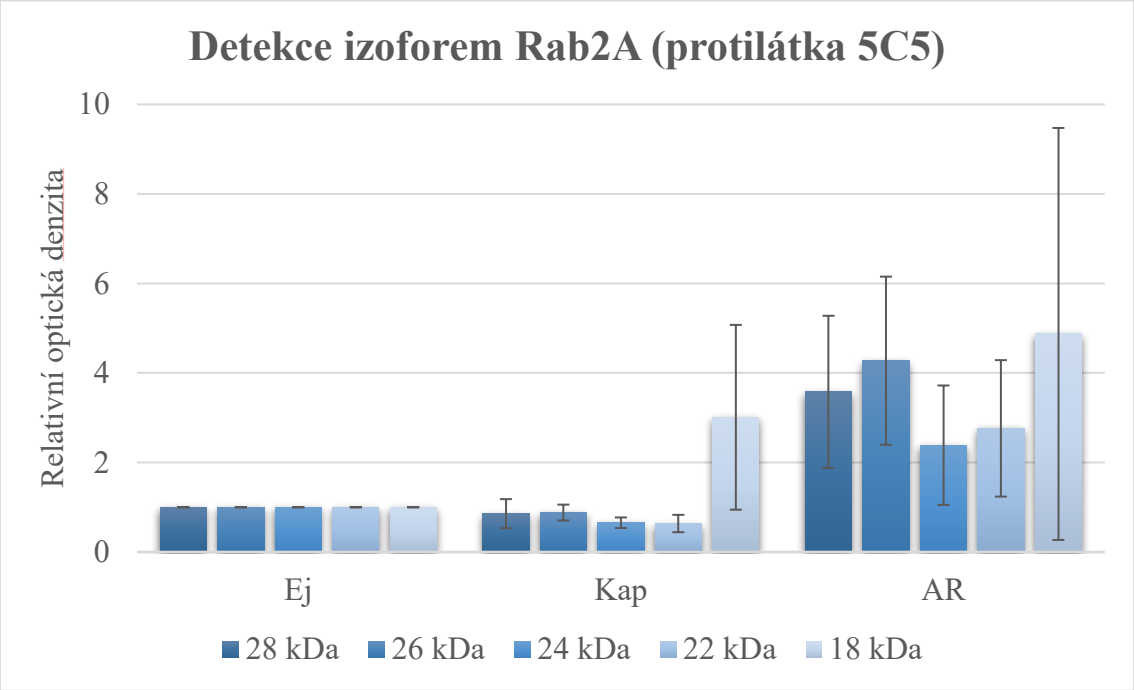
## 5.5 DETEKCE PROTEINU RAB-2A V PROTEINOVÉM EXTRAKTU LIDSKÝCH SPERMIÍCH

Pro ověření přítomnosti proteinu Rab-2A ve spermiích v různých funkčních stavech byly za redukujících podmínek izolovány celkové proteiny z ejakulovaných, *in vitro* kapacitovaných spermií a ze spermií u kterých byla indukována akrozomální reakce. Extrakty proteinů připravených dle *Kap. 4.7.6.* byly separovány pomocí SDS elektroforézy *(Kap. 4.7.12)* a následně přeneseny na membránu metodou Western blot *(Kap. 4.7.14)*. V extraktech spermií ejakulovaných, kapacitovaných i po AR byly protilátkou 5C5 detekovány již zmíněné formy proteinu Rab-2A. Ve všech vzorcích normozoospermiků se převážně vyskytovaly formy o molekulových hmotnostech 28, 26, 24, 22 a 18 kDa *(Obr. 19A)*. V *grafu č. 1* je zastoupení jednotlivých forem proteinu u extraktů ze spermií kapacitovaných a po AR vztažené k množství proteinu v extraktech ejakulovaných spermií. Abychom zjistili, kdy je protein Rab-2A uvolňován ze spermií, použili jsme jako nanášku na gel také média po kapacitaci a po AR spermií, ze kterých byly izolovány proteiny metodou popsanou v *Kap. 4.7.6*. Zmíněné formy proteinu Rab-2A jsme detekovali v médiu po AR spermií *(Obr.19B, dráha 5)*, zatímco v médiu po kapacitaci protein přítomný nebyl *(Obr. 29B, dráha 4)*.



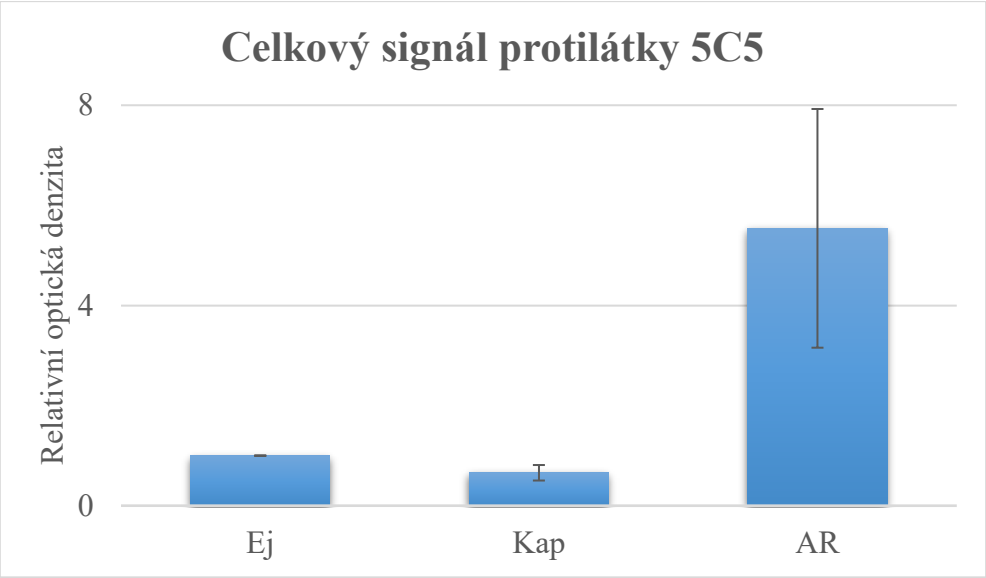

***Obr. 19: Imunodekce proteinu Rab-2A protilátkou 5C5 v proteinových extraktech lidských spermií.*** ***(A)*** *1 – ejakulované spermie, 2 – kapacitované spermie, 3 – spermie po indukci AR.* ***(B)*** *4 – médium po kapacitaci spermií, 5 – médium po AR spermií. Jako pozitivní kontrola sloužila protilátka proti α-tubulinu (50 kDa, modrá šipka). Červené šipky označují nejčastěji detekované formy Rab-2A (28, 26, 24, 22 a 18 kDa). Jedná se o reprezentativní obrázek.*

Z vyhodnocení denzitometrické analýzy dat získaných ze tří měření (kryokonzervovaných ejakulátů od 3 pacientů s normozoospermií) vztažené k referenčnímu proteinu α-tubulinu vyplývá, že nejvyšší průměrná exprese Rab-2A byla detekována u spermií po AR, u kterých byly také zaznamenány vysoké směrodatné odchylky *(Graf 2)*.



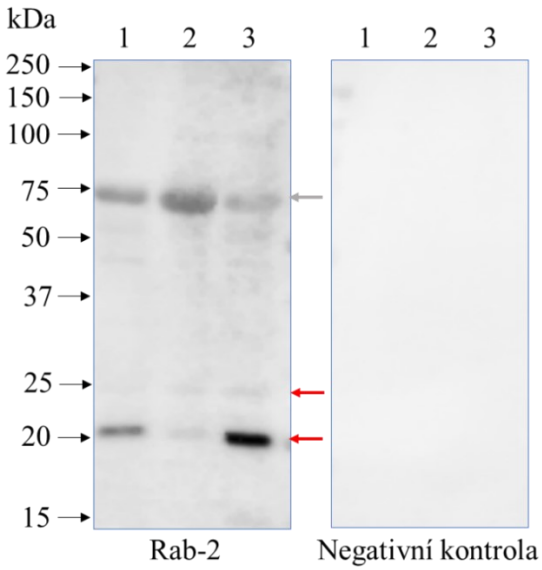

***Graf 1: Denzitometrická analýza jednotlivých izoforem proteinu Rab-2A*** *(28, 26, 24, 22 a 18 kDa) detekovaných protilátkou 5C5 v extraktech lidských kapacitovaných (Kap) spermiích a spermiích po indukci akrozomální reakce (AR) vztažená k hodnotám naměřených u ejakulovaných spermií (Ej). Na úrovni jednotlivých izoforem nebyl nalezen signifikantní rozdíl (p>0,05) v množství proteinu, pro statistické vyhodnocení byl použit Studentův t-test; v grafu jsou vyznačeny směrodatné odchylky ± SE.*

.




***Graf 2: Průměr intenzity signálu naměřený u všech izoforem proteinu Rab-2A rozpoznávaného protilátkou 5C5*** *v extraktech spermií ejakulovaných (Ej), kapacitovaných (Kap) a po indukci akrozomální reakce (AR) vztažené k naměřenému signálu protilátky proti α-tubulinu. Ve vzorcích nebyl nalezen signifikantní rozdíl (p>0,05) v celkovém množství proteinu Rab-2A, pro statistické vyhodnocení byl použit Studentův t-test; v grafu jsou vyznačeny směrodatné odchylky ± SE.*

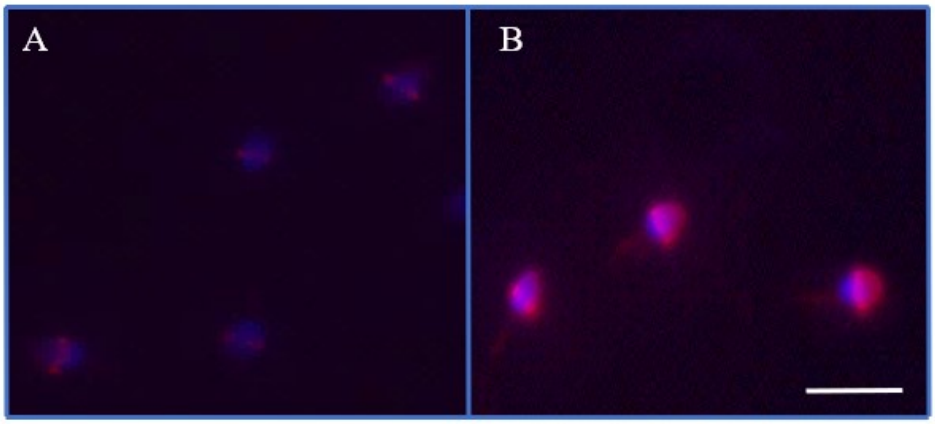
Pro kontrolu značení protilátky 5C5 byla použita komerční protilátka proti Rab-2. Vzorky ejakulovaných, kapacitovaných spermií a spermií po indukci AR (vzorky kryokonzervovaných ejakulátů získaných od tří pacientů s normozoospermií) byly zpracovány stejným způsobem jako v případě detekce protilátkou 5C5. Komerční protilátkou proti proteinu Rab-2 jsme detekovali protein o velikosti 20 kDa a slabé značení protilátky v oblasti 24 kDa ve všech vzorcích spermií *(Obr. 20)*. Značení protilátky okolo 75 kDa se objevilo také v některých negativních kontrolách, proto ho můžeme považovat za nespecifickou reakci se sekundární protilátkou *(Obr. 20, šedá šipka)*. Ve vzorcích nebyl nalezen signifikantní rozdíl (p>0,05) v celkovém množství proteinu Rab-2A.



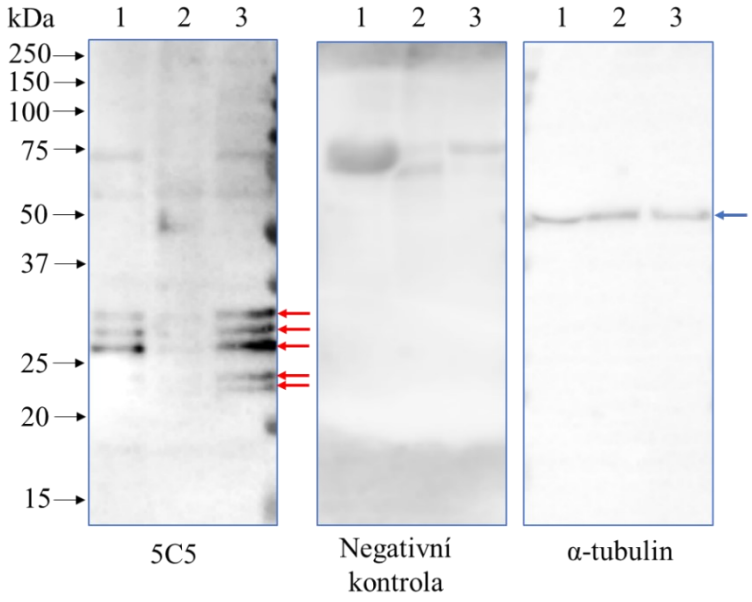

***Obr. 20: Imunodetekce protilátkou proti Rab-2 v proteinových extraktech lidských spermií,*** *1 –molekulové standardy, 2 – ejakulované spermie, 3 – kapacitované spermie, 4 – spermie po indukci AR. Červené šipky značí detekci proteinu v oblasti 20 a 24 kDa, šedá šipka (75 kDa) značí pravděpodobně nespecifickou reakci se sekundární protilátkou.*

## 5.6 SELEKCE SPERMIÍ S INTAKTNÍM AKROZOMEM

Za účelem ověření, zda výsledky detekované u proteinových extraktů izolovaných ze spermií po indukci AR nejsou zkresleny podílem spermií, u kterých k AR nedošlo, jsme se rozhodli využít metodu vyvinutou Laboratoří reprodukční biologie *(Kap. 4.7.5,* jedná se o unikátní patentovanou metodu selekce spermií s intaktním akrozomem) a tyto dvě frakce spermií separovat *(Obr. 21)*. Z výsledků vyplývá, že se protein Rab-2A nachází ve výrazně vyšším množství u spermií s intaktním akrozomem *(Obr. 22, dráha 3)*, zatímco u spermií, u kterých již došlo k AR *(Obr. 22, dráha 2)* byl detekován velmi slabý signál protilátky 5C5.



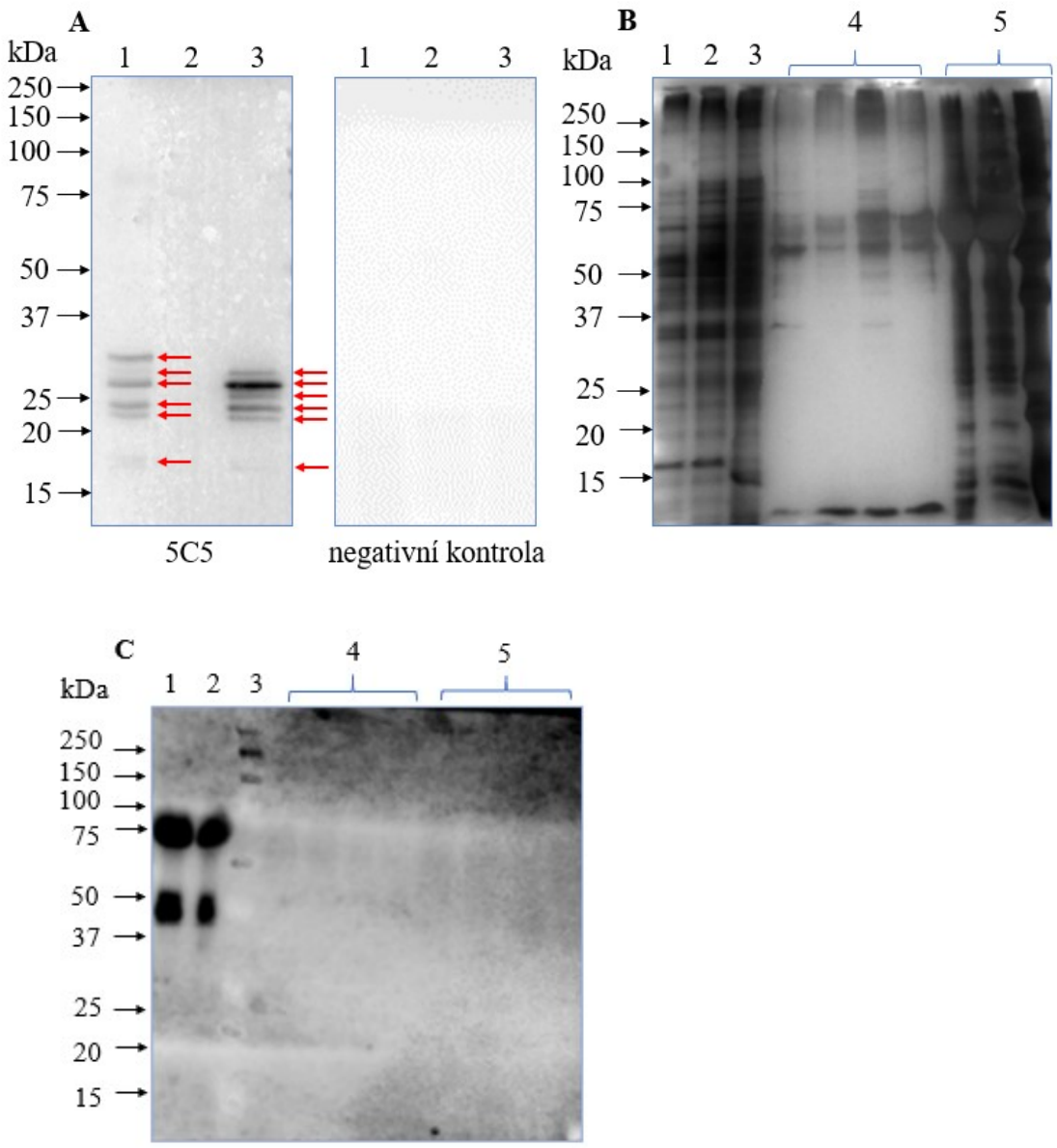

***Obr. 21: Vizualizace akrozomu spermií pomocí PNA u dvou frakcí spermií po selekci.*** ***(A)*** *selektované spermie navázané na magnetické částice konjugované s protilátkou CD46 (spermie s porušeným či chybějícím akrozomem),* ***(B)*** *spermie nenavázané na magnetické částice (spermie s intaktním akrozomem).*




***Obr. 22: Detekce Rab-2A (5C5) v extraktech proteinů*** *izolovaných ze: 1 – spermií po indukci AR, 2 – selektovaných spermií navázaných magnetické částice konjugované s protilátkou CD46 (spermie s porušeným či chybějícím akrozomem), 3 – spermie nenavázané na magnetické částice (spermie s intaktním akrozomem). Červené šipky označují detekované izoformy proteinu Rab-2A (30, 28, 26, 24 a 22 kDa), modrá šipka ukazuje detekci referenčního proteinu α-tubulinu (50 kDa).*

## 5.7 DETEKCE PROTEINU RAB-2A V PROTEINOVÉM EXTRAKTU Z POVRCHU LIDSKÝCH SPERMIÍCH

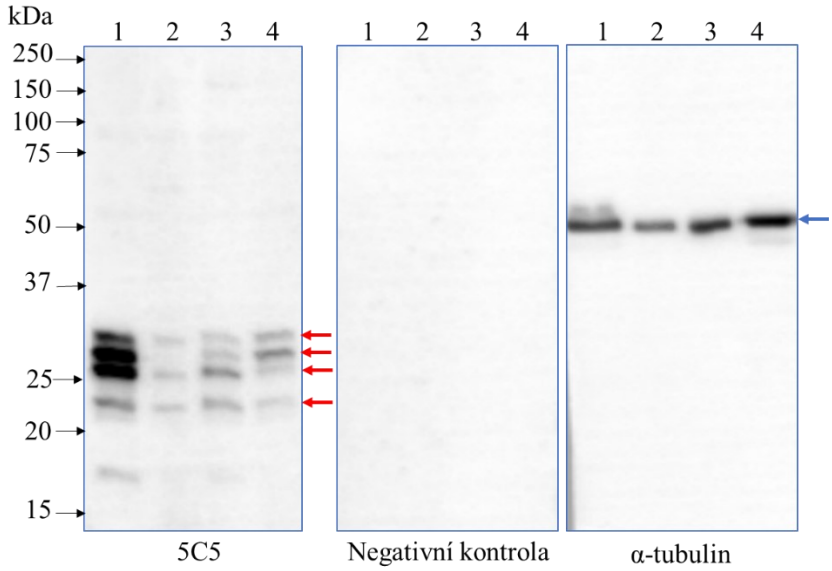
Abychom zjistili, zda se protein Rab-2A nachází na povrchu lidských spermií, stejně jako to bylo popsáno u prasat (Zigo et al., 2015), pokusili jsme se metodou značení proteinů pomocí biotinu *(Kap. 4.7.8)* izolovat pouze povrchové proteiny z lidských spermií. Bohužel se nám však ani po několika opakování nepodařilo povrchové proteiny řádně izolovat. Po barvení gelu stříbrem *(Kap. 4.7.13.2)* *(Obr. 23B)* jsme detekovali malé množství povrchových proteinů o velikosti nižší než 50 kDa. Protein Rab-2A byl v několika formách detekován protilátkou 5C5 pouze ve zbytkovém extraktu po biotinylaci proteinů a v celkovém lyzátu spermií *(Obr. 23A, dráha 1 a 3)*, který sloužil jako pozitivní kontrola, zatímco v extraktu povrchových proteinů Rab-2A přítomný nebyl *(Obr. 23A, dráha 2).* Jako kontrola izolace povrchových proteinů byla použita protilátka Hs-3 proti clusterinu (Apolipoprotein J), který by se měl nacházet pouze na povrchu spermií *(Obr. 23C)* (Capkova et al., 2016; Capková et al., 2002). Ten jsme však detekovali pouze v kontrolním celkovém lyzátu ejakulovaných a kapacitovaných spermií. clusterin (70 kDa) nebyl detekován ve frakci povrchových proteinů a ani ve zbytkovém extraktu po biotinylaci proteinů.



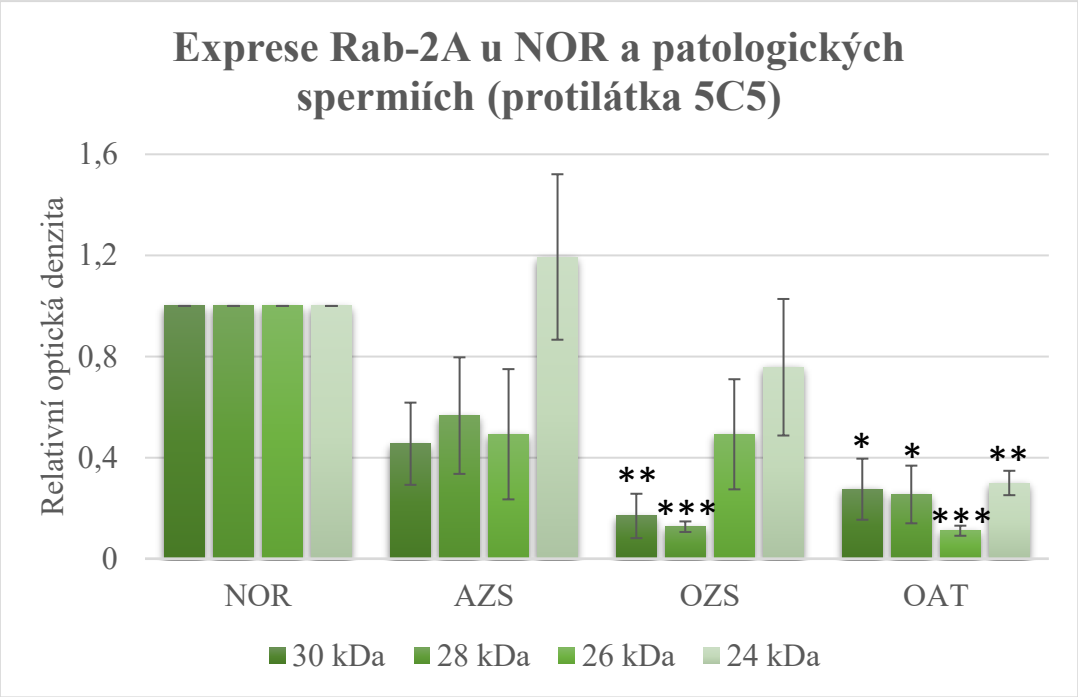

***Obr. 23: Detekce proteinu Rab-2A v proteinech izolovaných z povrchu lidských ejakulovaných spermií.*** ***(A)*** *Imunodetekce protilátkou 5C5 v proteinových extraktech spermií po biotinylaci, 1 – celkový lyzát ejakulovaných spermií, 2 – biotinylované proteiny zachycené na agarose konjugované s avidinem, 3 – nezachycená frakce proteinů po biotinylaci. Červené šipky označují detekované izoformy proteinu Rab-2A (30, 28, 26, 24, 22 a 18 kDa).* ***(B)*** *Gel barvený stříbrem po separaci povrchových proteinů, 1 – celkový lyzát ejakulovaných spermií, 2 – celkový lyzát kapacitovaných spermií, 3 – molekulární standardy, 4 – biotinylované proteiny zachycené na agarose s avidinem, 5 – nezachycená frakce proteinů po biotinylaci.* ***(C)*** *Imunodetekce protilátkou Hs-3 značící povrchový protein spermií (clusterin), 1 – celkový lyzát ejakulovaných spermií, 2 – celkový lyzát kapacitovaných spermií, 3 – molekulární standardy, 4 – biotinylované proteiny zachycené na agarose s avidinem, 5 – nezachycená frakce proteinů po biotinylaci.*

## 5.8 DETEKCE PROTEINU RAB-2A V EXTRAKTU SPERMIÍ OD PACIENTŮ S PATOLOGICKÝM SPERMIOGRAMEM

Následně jsme provedli analýzu exprese proteinu Rab-2A u pacientů s patologickým spermiogramem. Byla provedena imunodetekce přítomnosti Rab-2A ve vzorcích od tří pacientů se sníženou motilitou spermií (astenozoospermie, AZS), tří pacientů se sníženým počtem spermií (oligozoospermie, OZS) a tří pacientů se sníženým počtem, pohyblivostí, a také s narušenou morfologií spermií (oligoastenoteratozoospermie, OAT). Výsledky byly porovnány se vzorky od tří pacientů s normozoospermií *(Obr. 24)*. Vzorky spermií byly zpracovány stejně jako v předchozích případech. Ze spermií byly za redukujících podmínek izolovány proteiny dle metody popsané v *Kap. 4.7.6*. Detekce byla provedena pomocí protilátky 5C5 a pro kontrolu množství proteinu ve vzorku byla použita protilátka proti α-tubulinu. Pomocí protilátky 5C5 byly ve všech studovaných vzorcích spermií nejčastěji detekovány izoformy proteinu Rab-2A o molekulových hmotnostech 30, 28, 26 a 24 kDa. Z denzitometrické analýzy *(Graf 3)* je patrná snížená exprese většiny izoforem proteinu Rab-2A u všech tří patologií (AZS, OZS, OAT).




***Obr. 24: Imunodetekce proteinu Rab-2A pomocí protilátky 5C5 v proteinových extraktech spermií od pacientů s různým spermiogramem****: 1 – normozoospermie (NOR), 2 – astenozoospermie (AZS), 3 - oligozoospermie (OZS), 4 –oligoastenoteratozoospermie (OAT). Červené šipky označují nejčastěji detekované formy proteinu Rab-2A (30, 28, 26 a 24 kDa) ve všech vzorcích.*

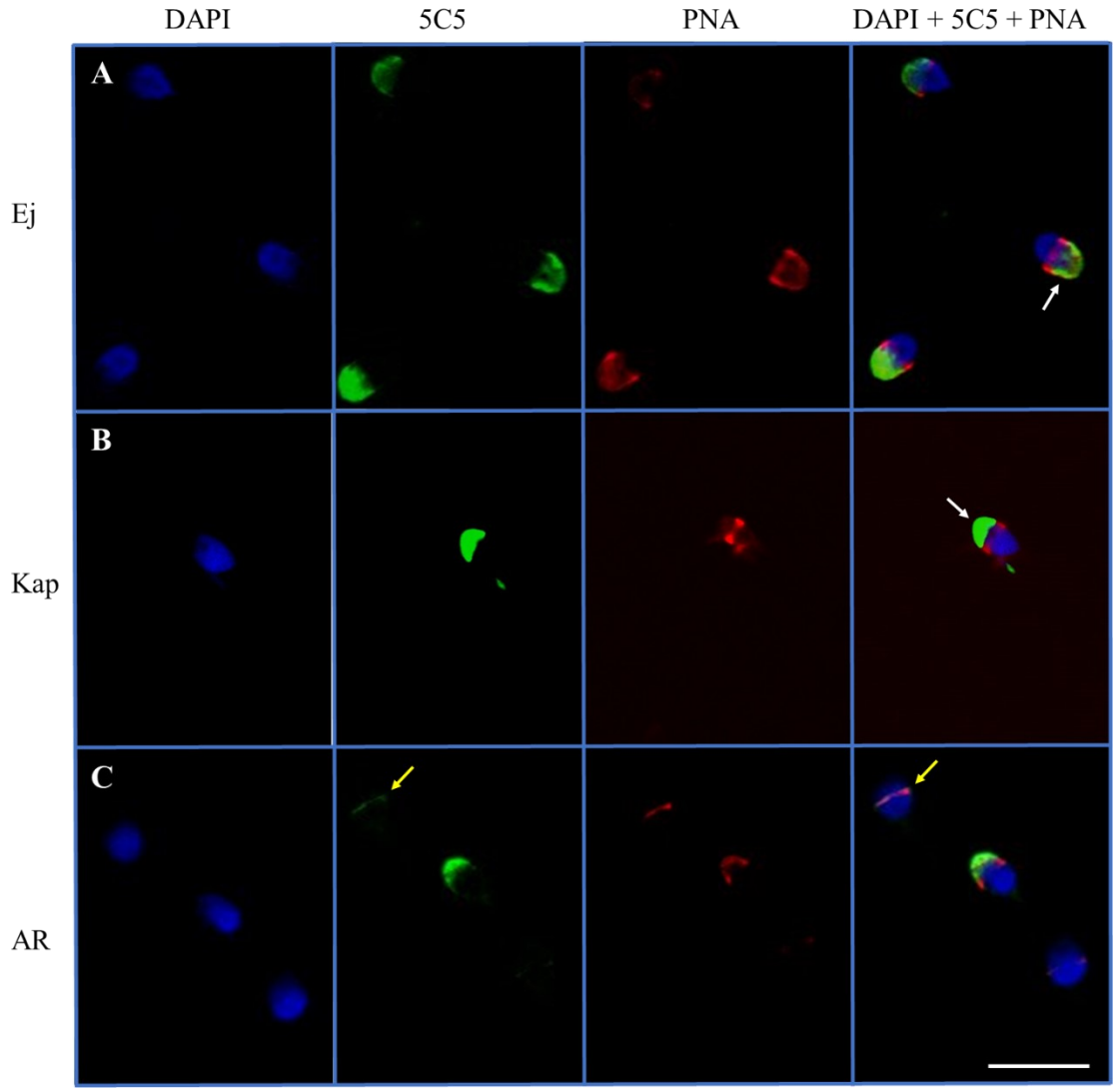



***Graf 3: Graf znázorňující rozdílnou expresi izoforem proteinu Rab-2A ve spermiích detekovaného protilátkou 5C5 u pacientů s patologickým spermiogramem****: astenozoospermie (AZS), oligozoospermie (OZS), oligoastenoteratozoospermie (OZS) vztaženou ke vzorkům spermií od pacientů s normozoospermií (NOR), normalizováno k množství detekovaného tubulinu ve vzorku. Signifikantní rozdíly v množství proteinu jsou znázorněné hvězdičkou* (*$p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$), bez hvězdičky nebyly rozdíly v množství proteinů signifikantní, pro statistické vyhodnocení byl použit Studentův t-test; v grafu jsou vyznačeny směrodatné odchylky ± SE.*

## 5.9 LOKALIZACE RAB-2A V LIDSKÝCH SPERMIÍCH

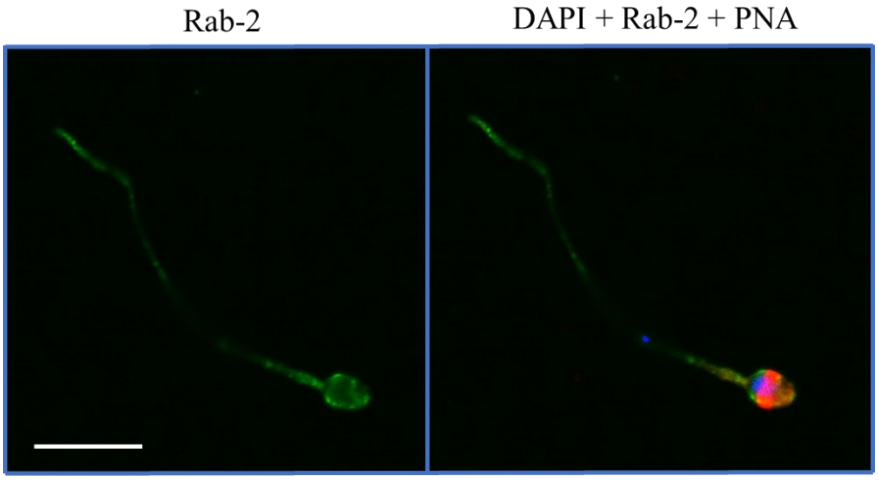
Pro zjištění přesné lokalizace proteinu Rab-2A v lidských spermiích byla použita metoda nepřímé imunofluorescence *(Kap. 4.7.15)* za využití konfokální a superrezoluční mikroskopie. Protein Rab-2A byl vizualizován pomocí myší protilátky 5C5 a sekundární protilátky konjugované s Alexa Fluor 488. Jako kontrola byla použita komerční polyklonální protilátka proti proteinu Rab-2. Akrozom spermie byl vizualizován pomocí PNA lektinu konjugovaného s Alexa Fluor 568 a jádra spermií pomocí DAPI v montovacím médiu. Preparáty byly připraveny z ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií a ze spermií, u kterých byla *in vitro* indukována akrozomální reakce a fixovány roztokem aceton-metanol (1:1).

Pomocí konfokální mikroskopie byla potvrzena přítomnost proteinu Rab-2A v oblasti akrozomu lidských ejakulovaných (Ej) a kapacitovaných (Kap) spermiích *(Obr. 25, bílé šipky)*, přičemž silnější signál protilátky 5C5 byl zachycen v případě kapacitovaných spermií. Na spermiích, u kterých došlo k indukci akrozomální reakce (AR), byl pozorován pouze slabý signál protilátky 5C5 v oblasti ekvatoriálního segmentu (žlutá šipka, kde po akrozomální reakci zůstává část vnější akrozomální membrány (Bedford et al., 1979).



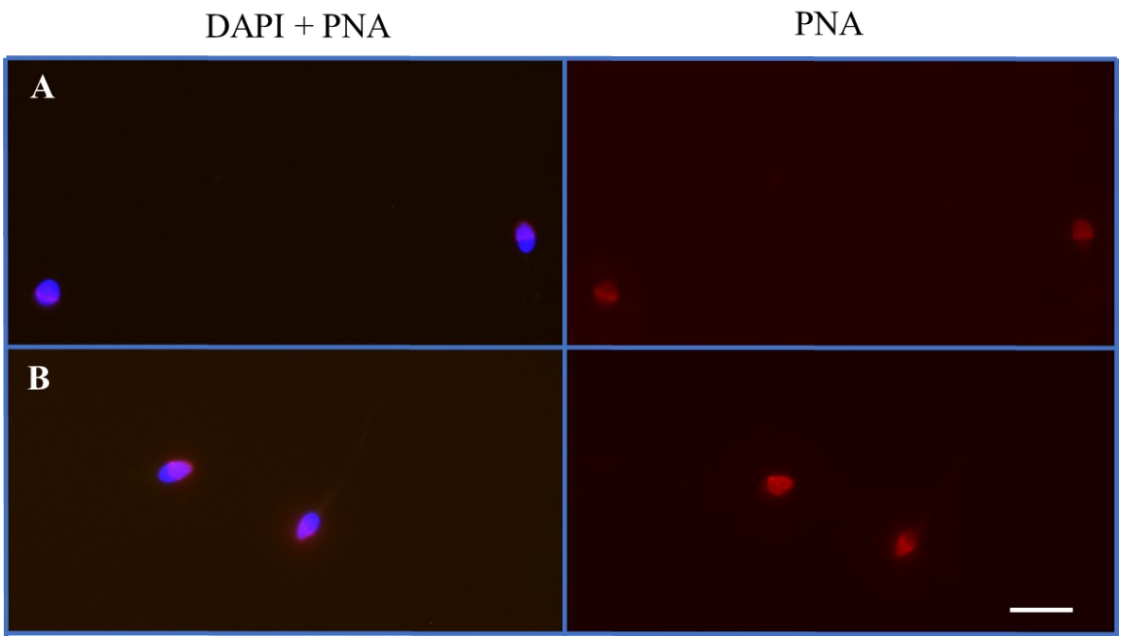

***Obr. 25: Imunolokalizace proteinu Rab-2A pomocí protilátky 5C5*** *(zeleně) na* ***(A) ejakulovaných spermiích (Ej), (B) kapacitovaných spermiích (Kap) a (C) spermiích po indukci AR pomocí konfokální mikroskopie****, PNA značící akrozom (červeně), jádra spermií značená pomocí DAPI (modře), zvětšení 630x, měřítko 10 µm. Bílé šipky značí signál protilátky 5C5 v oblasti intaktního akrozomu spermie. Žluté šipky značí signál protilátky 5C5 v oblasti ekvatoriálního segmentu spermie po akrozomální exocytóze.*

Jako kontrolu značení protilátky 5C5 jsme opět využili komerční protilátku proti proteinu Rab-2. Preparáty lidských ejakulovaných spermií byly připraveny stejným způsobem jako v případě detekce protilátkou 5C5. Jak můžeme vidět na *Obr. 26* signál protilátky proti Rab-2 byl detekován v celé oblasti hlavičky i bičíku spermie.



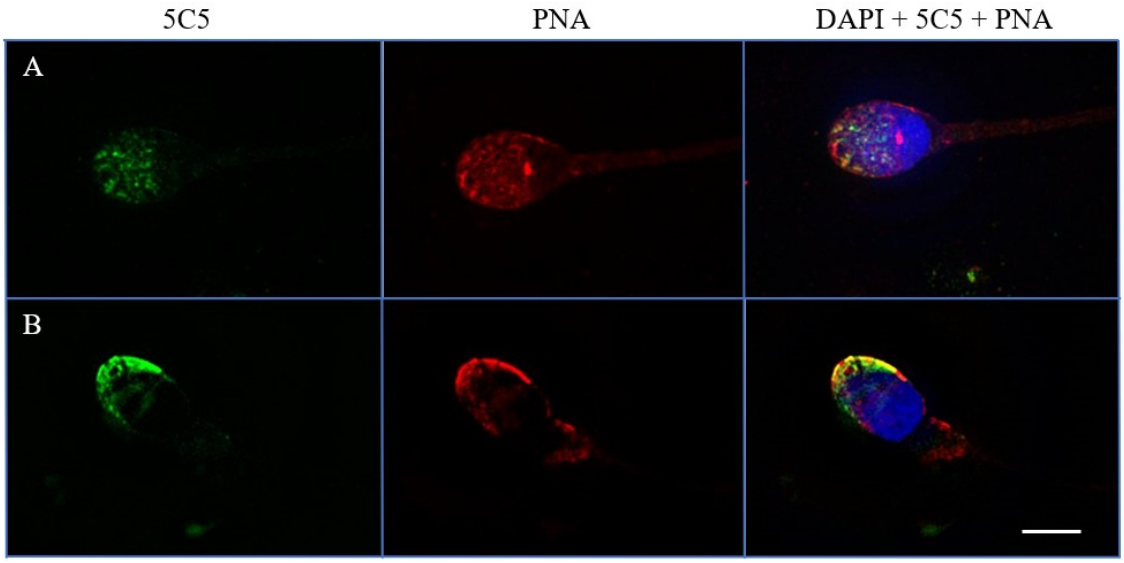

***Obr. 26: Imunodetekce proteinu Rab-2A pomocí komerční protilátky proti proteinu Rab-2*** *(zeleně)* ***na lidských ejakulovaných spermiích pomocí konfokální mikroskopie****, PNA značící akrozom (červeně), jádra spermií vizualizována pomocí DAPI (modře), zvětšení 630x, měřítko 10 μm.*

Jako negativní kontrola sloužily preparáty spermií, které byly inkubovány pouze s příslušnou sekundární protilátkou značenou Alexa Fluor 488, a také PNA lektinem *(Obr. 27)*. Detekce byla provedena na fluorescenčním mikroskopu a na žádné negativní kontrole nebyl zaznamenán nespecifický signál sekundární protilátky.

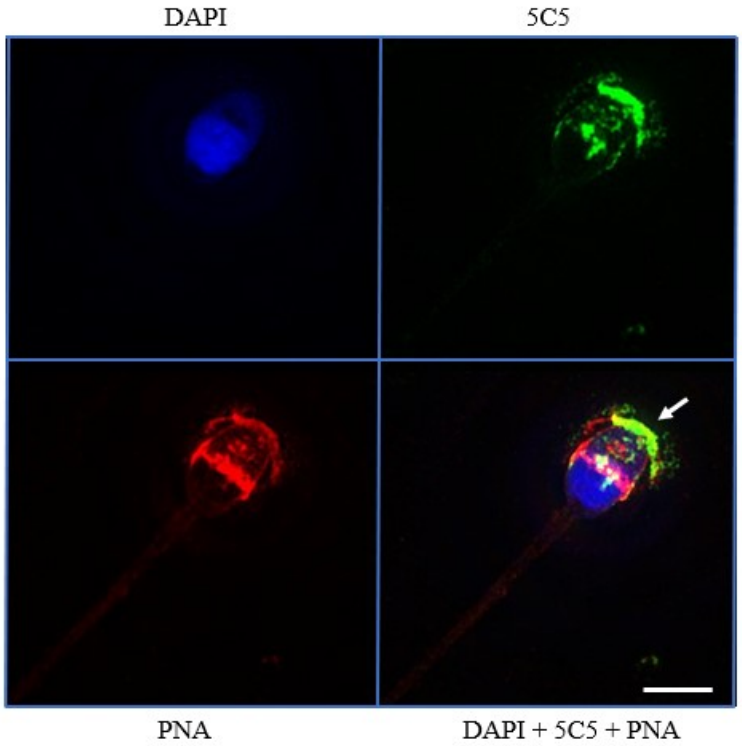



***Obr. 27: Negativní kontroly pro lokalizaci Rab-2A na lidských spermiích.*** *(**A**) Vzorky ejakulovaných spermií inkubované pouze se sekundární protilátkou proti myším Ig konjugované s Alexa Fluor 488 (zeleně) sloužící jako negativní kontrola pro vzorky značené protilátkou 5C5, PNA znázorňující akrozom (červeně). (**B**) Vzorky spermií inkubované pouze se sekundární protilátkou proti králičím Ig konjugované s Alexa Fluor 488 (zeleně) sloužící jako negativní kontrola pro vzorky značené komerční protilátkou proti proteinu Rab-2, PNA značící akrozom (červeně), zvětšení 600x, měřítko 10 µm.*

Pro detailnější lokalizaci proteinu Rab-2A v lidských spermiích byla použita strukturní iluminační mikroskopie (SIM) *(Obr. 28 a 29)*. Vzorky pro SIM mikroskopii byly připraveny dle metody popsané v *Kap. 4.7.15.* Na *Obr. 28* je možné pozorovat detailní lokalizaci proteinu Rab-2A v ejakulované spermii buď v oblasti celého akrozomu *(Obr. 28A)*, které odpovídá vizualizaci akrozomu pomocí vazby PNA lektinu, nebo s výraznějším značením protilátky v apikální oblasti akrozomální čepičky *(Obr. 28B)*. Na *Obr. 29* se nám pak podařilo zachytit průběh akrozomální reakce, při kterém lze pozorovat jak protein Rab-2A odchází společně se zánikem plazmatické a vnější akrozomální membrány značené PNA lektinem.

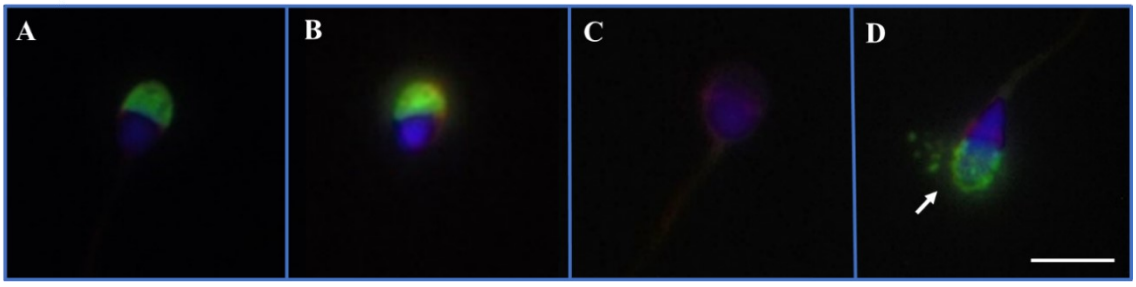



***Obr. 28: Vizualizace proteinu Rab-2A pomocí protilátky 5C5 na lidských ejakulovaných spermiích technikou superrezoluční mikroskopie**. **(A)** Signál protilátky 5C5 (zeleně) v oblasti celého akrozomu, **(B)** Protilátka 5C5 se silnějším signálem v apikální oblasti akrozomální čepičky, PNA značící akrozom (červeně), jádra spermie vizualizována pomocí Hoechst (modře), zvětšení 630x, měřítko 3 μm.*



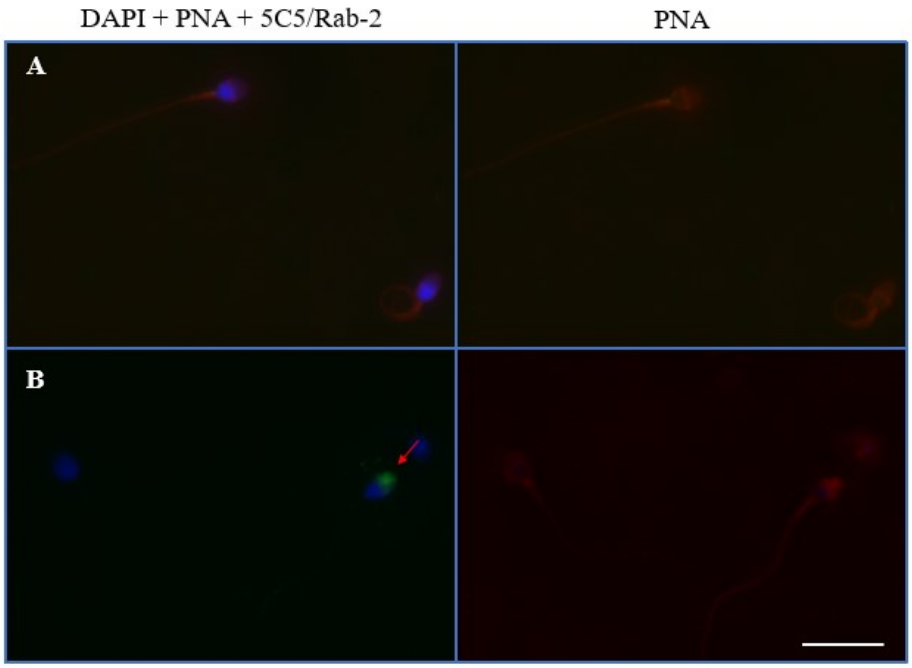

***Obr. 29: Značení Rab-2A pomocí protilátky 5C5** (zeleně) **v průběhu akrozomální reakce lidských spermiích zachycená pomocí SIM mikroskopie**, PNA značící akrozom (červeně), Hoechst značící jádro spermie (modře), zvětšení 630x, měřítko 3 μm. Bílá šipka ukazuje na akrozomální exocytózu, při které protein Rab-2A odchází ze sperme.*

Pro zjištění, zda se protein Rab-2A, stejně jako u kančích spermií, nachází i na povrchu lidských spermií byla použita fixace vzorků roztokem 3,6 % PFA. U takto fixovaných vzorků by nemělo dojít k permeabilizaci plazmatické membrány spermie, jako je tomu u fixace roztokem aceton-metanol a protilátka by tak neměla proniknout do intracelulárního prostoru spermie. Protein Rab-2A byl za využití fluorescenční mikroskopie detekován protilátkou 5C5 na povrchu ejakulovaných *(Obr. 30A)* i kapacitovaných *(Obr. 30B)* spermií a na spermiích, u kterých byla indukována AR, nebyl detekován žádný signál protilátky 5C5 *(Obr. 30C)*. Na obrázku *Obr. 30D* je zachyceno jak protein Rab-2A odchází z povrchu spermie v průběhu akrozomální reakce.




***Obr. 30: Imunolokalizace Rab-2A pomocí protilátky 5C5*** *(zeleně)* ***na vzorcích lidských spermií fixovaných roztokem 3,6% PFA.*** *Protilátka značí povrchový protein na povrchu:* ***(A)*** *ejakulovaných,* ***(B)*** *kapacitovaných spermií,* ***(C)*** *spermií po indukci AR a* ***(D)*** *průběh AR. PNA značí akrozom spermie (červeně), jádro spermie značeno DAPI (modře), zvětšení 600x, měřítko 10 µm. Bíla šipka ukazuje na zachycený průběh akrozomální reakce, při které Rab-2A odchází z povrchu spermie.*

Pro ověření povrchového značení protilátky 5C5 byla tato protilátka inkubována v suspenzi spermií dle metody popsané v *Kap. 4.7.15.* Stejným způsobem byla provedena také inkubace s protilátkou proti Rab-2 sloužící jako kontrola. Zatímco u protilátky 5C5 jsme nedetekovali žádný signál *(Obr. 31A)*, v případě komerční protilátky Rab-2 byl detekován signál v oblasti akrozomu spermie *(Obr. 31B)*.

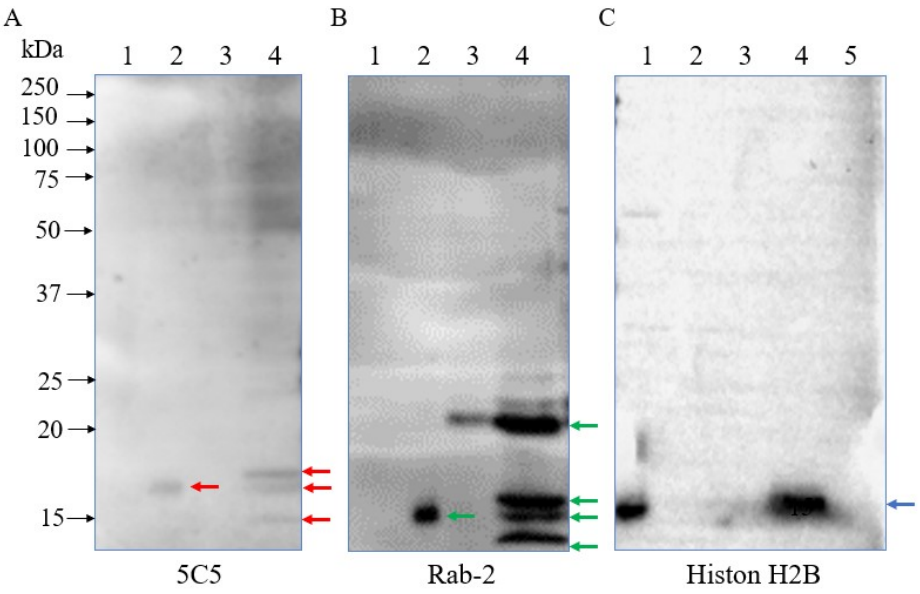



***Obr. 31: Imunolokalizace proteinu Rab-2A protilátkami (A) 5C5 a (B) Rab-2*** *(zeleně)* ***na vzorcích lidských spermií v suspenzi.*** *Akrozom značen PNA lektinem (červeně), jádro pomocí DAPI (modře), zvětšení 600x, měřítko 10 µm. Červená šipka ukazuje na signál detekovaný protilátkou Rab-2 a povrchu spermie.*

## 5.10 Detekce proteinu Rab-2A v perinukleární théce lidských spermií

Dle metody popsané v *Kap. 4.7.10* jsme se pokusili o izolaci kovalentně vázaných proteinů PT z lidských ejakulovaných spermií, kde by se měl námi hledaný protein Rab-2A, vhledem k jeho detekci v PT býčích spermií, nacházet (Mountjoy et al., 2008). Při izolaci kovalentně vázaných proteinů PT, jsme získali několik dalších proteinových frakcí: proteiny z oblasti vnitřní akrozomální membrány (IAM), iontově vázané proteiny PT a zbytky hlaviček spermií spolu s jádry. Jako pozitivní kontrolu izolace jsme zvolili histon H2B, který byl popsán jako součást kovalentně vázaných proteinů PT u spermií býků, spolu s celkovým extraktem proteinů z ejakulovaných spermií (Ritu B. Aul a Oko, 2001; Tovich a Oko, 2003). Histon H2B (15 kDa) se nám podařilo detekovat pouze ve frakci proteinů se zbytky hlaviček a jader spermií a v celkovém extraktu ejakulovaných spermií *(Obr. 32C, dráha 1 a 4)*. Přítomnost proteinu Rab-2A v PT lidských spermií jsme nebyli schopni potvrdit ani po několika opakování izolace i imunodetekce, a to za využití jak monoklonální protilátky 5C5, tak komerční protilátky proti proteinu Rab-2 *(Obr. 32A,*

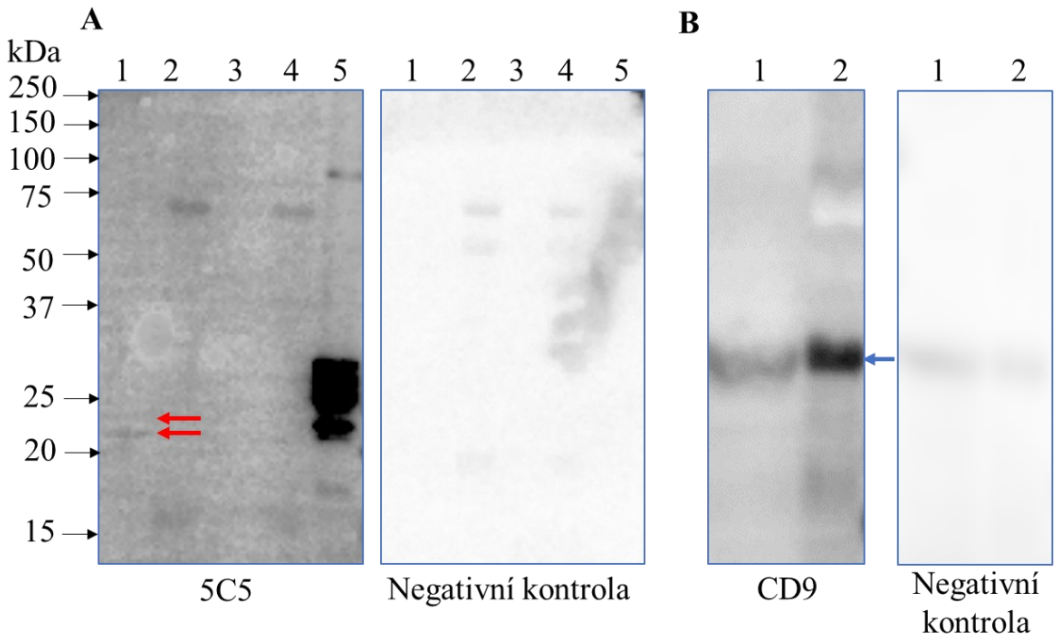
*B)*. Za prodloužené expozice jsme pomocí protilátky 5C5 detekovali pouze několik nízkomolekulárních forem (18, 17 a 15 kDa) proteinu Rab-2A v extraktu proteinů ze zbytků hlaviček a jader spermií *(Obr. 32A, dráha 4)*, a také jednu (přibližně 17kDa) formu v extraktu iontově vázaných proteinů *(Obr. 32A, dráha 2)*. U komerční protilátky proti proteinu Rab-2A se nám za prodloužené expozice podařilo detekovat protein o molekulové hmotnosti 20 kDa a několik dalších nízkomolekulárních forem (16, 15 a 13 kDa) proteinu Rab-2A v extraktu proteinů ze zbytků hlaviček a jader spermií *(Obr. 32B, dráha 4)*. Protein o molekulové hmotnosti 15 kDa byl zaznamenán ve frakci iontově vázaných proteinů PT *(Obr. 32B, dráha 2)* a 20kDa formu také v extraktu proteinů IAM *(Obr. 32B, dráha 3)*.




***Obr. 32: Detekce proteinu Rab-2A v proteinových extraktech získaných při izolaci proteinů PT lidských spermií*** *pomocí* ***(A)*** *protilátky 5C5 a* ***(B)*** *protilátky Rab-2. Jako pozitivní kontrola izolace proteinů PT sloužila* ***(C)*** *protilátka detekující histon H2B. A, B): 1 – extrakt kovalentně vázaných proteinů PT, 2 – extrakt iontově vázaných proteinů PT, 3 – extrakt proteinů vnitřní akrozomální membrány (IAM), 4 – extrakt proteinů ze zbytků hlaviček a jader spermií, C): 1 - celkový extrakt ejakulovaných spermií normozoospermika, 2 – extrakt iontově vázaných proteinů PT, 3 – extrakt kovalentně vázaných proteinů PT, 4 – extrakt proteinů ze zbytků jader spermií, 5 – extrakt proteinů vnitřní akrozomální membrány (IAM).*

## 5.11 Detekce Rab-2A v semenné plazmě a sekrečních exozomech

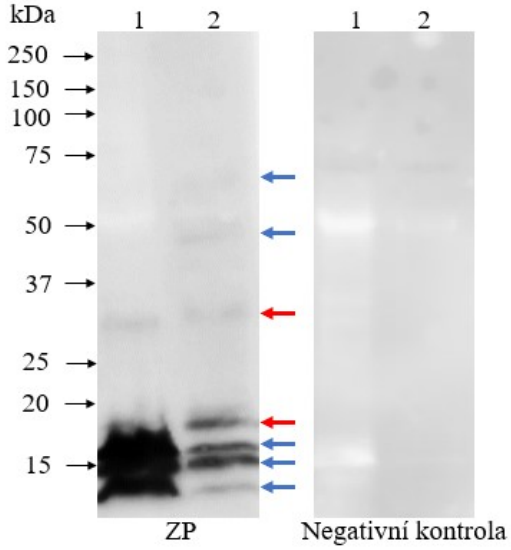
Dále nás zajímal výskyt proteinu Rab-2A v semenné plazmě a sekrečních exozomech. Exozomy z lidské semenné plazmy byly izolovány za využití komerčně dostupného kitu pro izolaci vezikul (Total Exosome Isolation Kit). Z exozomů byly následně izolovány proteiny metodou alkalické lyze *(Kap. 4.7.11)*. Protilátkou 5C5 jsme detekovali slabý signál v oblasti 22 a 24 kDa v exozomech pocházejících ze semenné plazmy *(Obr. 33A, dráha 1)*. V samotné semenné plazmě jsme však nedetekovaly žádný signál protilátky 5C5 *(Obr. 33A, dráha 2)*. Jako pozitivní kontrola opět sloužil celkový lyzát ejakulovaných spermií. Protilátka proti tetraspaninu CD9 (27 kDa) byla použita jako pozitivní kontrola izolace exozomů z lidské semenné plazmy *(Obr. 33B)*.




***Obr. 33: Detekce proteinu Rab-2A v sekrečních exozomech a semenné plazmě pomocí protilátky 5C5****: 1 - exozomy (alkalická lyze), 2 - semenná plazma (alkalická lyze), 3 - exozomy, (RIPA), 4 - semenná plazma (RIPA), 5 – celkový extrakt z ejakulovaných spermií. Protilátka proti proteinu* ***CD9*** *sloužila jako pozitivní kontrola pro detekci exozomů, 1 - semenná plazma, 2 - exozomy (alkalická lyze).*

## 5.12 STUDIE VAZBY PROTEINŮ SPERMIÍ S GLYKOPROTEINY *ZONA PELLUCIDA*

Pro ověření, zda protein Rab-2A odpovídá vazbě glykoproteinů lidské ZP na proteinové extrakty spermií, stejně jako tomu bylo v případě prasečích proteinů, byly izolovány glykoproteiny ZP dle *kap. 4.7.16* (Zigo et al., 2015). Z lidských ejakulovaných a kapacitovaných spermií byly izolovány celkové extrakty proteinů *(Kap. 4.7.6)*. Izolované proteiny spermií byly rozděleny pomocí SDS elektroforézy *(Kap. 4.7.12)* a poté byl proveden WB *(Kap. 4.7.14)*. Membrána s proteiny byla následně inkubována s biotinem značenými glykoproteiny ZP *(Kap. 4.7.17)*. Navázané glykoproteiny ZP na proteiny spermií byly poté vizualizovány pomocí avidin peroxidázy. Na *Obr. 34* je vidět signál v oblasti 66, 47, 30, 18, 16, 15 a 13 kDa, přičemž 30 a 18kDa forma proteinu Rab-2A, kterou jsme detekovali pomocí protilátky 5C5 v předchozích experimentech, by mohla odpovídat proteinu s vazebnou aktivitou ke glykoproteinů ZP (označeného červenými šipkami).




***Obr. 34: Far-western blot vazebná studie s biotinylovanými glykoproteiny ZP*** *na proteinových extraktech lidských 1- ejakulovaných a 2 – kapacitovaných spermiích.*

# 6. DISKUZE

Událostí zahajující proces fertilizace je druhově specifická vazba spermie na *zona pellucida* (ZP) vajíčka, též označovaná jako primární vazba. Během primární vazby dochází k interakci proteinů přítomných na povrchu kapacitované spermie s oligosacharidovými řetězci glykoproteinů ZP (Clark, 2014). V akrozomální oblasti hlavičky spermie byla popsána řada potenciálních receptorů mající vazebnou afinitu ke specifickým sacharidovým zbytkům ZP (Tumova et al., 2021). Pro studium těchto povrchových proteinů spermií, které by mohly hrát roli v primární vazbě spermie na ZP vajíčka, byl Laboratoří reprodukční biologie připraven panel monoklonálních protilátek. Z protilátek vytvořených proti povrchovým proteinům prasečích spermií byly vybrány pouze protilátky rozpoznávající proteiny v akrozomální oblasti hlavičky spermie, které byly zároveň detekovány metodou Western blot *(Tab. 1 na str. 19)* U těchto 8 vybraných protilátek byla dále zjišťována jejich imunolokalizace v reprodukčních tkáních a tekutinách, a také jejich vazebná schopnost na glykoproteiny ZP. Pouze 3 protilátky (4C7, 1H9 a 5C5) rozpoznávaly proteiny, které odpovídaly vazbě prasečích glykoproteinů ZP na proteinové extrakty spermií (Zigo et al., 2015). V předkládané diplomové práci jsme se tedy rozhodli zaměřit na tyto tři vybrané protilátky a zjistit jejich křížovou reaktivitu u lidských spermií.

Na povrchu kančích ejakulovaných i kapacitovaných spermiích byl protilátkou 4C7 detekován protein o molekulové hmotnosti 45 kDa, který byl poté identifikován jako proakrozin (Zigo et al., 2015). Proakrozin je zymogenní formou akrozinu, nacházející se především v akrozomální matrix, a také ve vnitřní akrozomální membráně, kde se předpokládá jeho funkce jako sekundárního vazebného receptoru na ZP (Tesařík et al., 1988). Přítomnost tohoto proteinu na povrchu akrozomu prasečích spermií však naznačuje, že by (pro-)akrozin mohl hrát roli také jako primární vazebný receptor na ZP (Kongmanas et al., 2015; Zigo et al., 2015). Pokusili jsme se tedy o detekci proakrozinu v lidských spermiích za využití protilátky 4C7. Pomocí nepřímé imunofluorescence se nám nepodařilo detekovat signál protilátky 4C7 v lidských spermiích. Metodou WB jsme detekovali pouze proteinový proužek o přibližné molekulové hmotnosti 30 kDa. Detekovaný protein však neodpovídá molekulové hmotnosti proteinu detekovaném na kančích spermiích, proakrozinu (47 kDa). Přítomnost proakrozinu v lidských spermiích však byla prokázána již dříve (Gilboa et al., 1973), a proto předpokládáme,

že protilátka 4C7 vytvořená proti kančímu proakrozinu pouze nebyla schopna rozpoznat epitop lidského proakrozinu.

Protein rozpoznávaný protilátkou 1H9 byl popsán na povrchu kančích ejakulovaných i kapacitovaných spermiích a později identifikován jako laktadherin (Zigo et al., 2015). Laktadherin (P47) je kančí homolog myšího proteinu MFGE8/SED1. Jedná se o periferně vázaný protein nacházející se v akrozomální oblasti membrány spermie, u kterého byla již dříve popsána jeho schopnost vazby na ZP vajíčka (Ensslin et al., 1998; Ensslin a Shur, 2003; Zigo et al., 2015). Přesto, že byl homolog myšího SED1 popsán i na plazmatické membráně lidských spermií (Copland et al., 2009) se nám pomocí protilátky 1H9 tento protein nepodařilo detekovat na lidských ejakulovaných, kapacitovaných ani na spermiích po AR. Což svědčí o specifitě dané protilátky cílené na prasečí protein.

Protilátkou 5C5 byl na prasečích spermiích detekován protein o molekulových hmotnostech 24 a 27 kDa, jenž byl pomocí hmotnostní spektrometrie identifikován jako Rab-2A (Zigo et al., 2015). U kance byl protein Rab-2A přítomen na povrchu epididymálních, ejakulovaných i kapacitovaných spermií, u kterých byla intenzita signálu nejvyšší (Zigo et al., 2015). Bylo to vůbec poprvé, co byl protein Rab-2A, jakožto GTPáza regulující vezikulární transport, popsán na povrchu spermií. Při dalším zkoumání byla také zjištěna vazebná afinita proteinu Rab-2A na prasečí glykoproteiny ZP a byla navržena jeho možná role v primární vazbě spermie na oocyt (Zigo et al., 2015). Na lyzátech lidských ejakulovaných spermiích se nám za využití protilátky 5C5 podařilo detekovat proteinové proužky o velikosti 30, 28, 26, 24, 22 a 18 kDa, z nichž se nejčastěji v dalších experimentech objevovaly izoformy 28, 26, 24 a 18 kDa. Na vzorcích lidských ejakulovaných i kapacitovaných spermií jsme detekovali signál protilátky 5C5 v oblasti akrozomu spermie. U spermií po indukci AR nebyl detekován žádný signál protilátky 5C5. Je zajímavé, že ačkoli byla v případě kančích spermií zvolena povrchová fixace a v případě lidských spermií byla membrána v průběhu fixace permeabilizována, signál detekovaný v případě ejakulovaných i kapacitovaných lidských spermií byl velmi podobný signálu detekovaném u prasečích spermií, kde bylo taktéž silnější značení protilátky 5C5 u kapacitovaných spermií (Zigo et al., 2015). Domníváme se však, že v případě kančích spermií mohlo taktéž dojít k permeabilizaci plazmatické membrány, neboť při přípravě preparátů kančích spermií byla na sklíčko nanesena suspenze spermií, která byla ponechána zaschnout na vzduchu při laboratorní teplotě (Zigo et al., 2015).

Již dříve bylo popsáno, že při této přípravě preparátů může dojít k narušení integrity plazmatické i akrozomální membrány spermií (Haas et al., 1988).

Vzhledem ke zjištěné křížové reaktivitě protilátky 5C5 na lidských spermiích jsme se rozhodli tuto protilátku dále charakterizovat. Abychom ověřili identitu proteinu rozpoznávaného protilátkou 5C5 na lidských spermiích, rozhodli jsme se protein nejprve imunoprecipitovat pro cílenou izolaci proteinu a následnou analýzou hmotnostní spektrometrií. Ani po několika pokusech jsme však nebyli schopni protein protilátkou 5C5 precipitovat. Za pravděpodobný důvod neúspěšné precipitace považujeme, že protilátka 5C5 nemá přístup k epitopu na proteinu v nativním stavu, což potvrdily také naše pozdější experimenty. Nakonec jsme se tedy rozhodli provést identifikaci proteinu, rozpoznávaného protilátkou 5C5, z celkového lyzátu proteinů izolovaných z lidských ejakulovaných spermií, ve kterých byl protein detekovaný protilátkou 5C5 v různých molekulových hmotnostech. Lidský protein Rab-2A byl identifikován v proteinových proužcích o velikosti 26, 24, 22 a 18 kDa. Ostatní detekované proteinové proužky nebyly zřetelně viditelné po obarvení gelu na proteiny, a proto nebyly zahrnuty do analýzy. Z výsledků hmotnostní spektrometrie vyplývá, že jednotlivé izoformy lidského proteinu Rab-2A se liší četnými posttranslačními modifikacemi, jako je oxidace, acetylace a metylace, což zapříčiňuje i rozdílnou molekulovou hmotnost detekovaných forem proteinu Rab-2A. Na základě ověřené křížové reaktivity protilátky 5C5 na lidských spermiích jsme se zaměřili na protein Rab-2A a pokusili jsme se popsat jeho lokalizaci a funkci v lidských spermiích za využití této protilátky.

Přítomnost Rab-2A jsme potvrdili imunodetekcí protilátky 5C5 v celkovém proteinovém extraktu ejakulovaných i kapacitovaných spermií, a také ve spermiích, u kterých byla *in vitro* indukována AR. Denzitometrická analýza odhalila statisticky nevýznamný pokles hladiny proteinu Rab-2A vzhledem k ejakulovaným spermiím u většiny izoforem Rab-2A (28, 26, 24 a 22 kDa) v případě spermií po kapacitaci. Zatímco ve spermiích, u kterých byla indukována AR, byl vzhledem k ejakulovaným spermiím detekován nárůst hladiny zmíněných izoforem, který však také nebyl statisticky významný. Nejvyšší nárůst signálu jsme detekovali v případě 18kDa formy, a to jak u spermií po indukci AR, tak u kapacitovaných spermií. Je zajímavé, že právě tato forma Rab-2A byla detekována jen u některých pacientů, proto jsou také v případě 18 kDa formy vysoké odchylky měření. Nejvyšší celkový signál protilátky 5C5 (tedy všech forem) byl naměřen u spermiích po indukci AR, u kterých však byly také zjištěny vysoké odchylky v měření

u jednotlivých pacientů. Naopak nejnižší celkový signál 5C5 byl detekován u spermií po kapacitaci s nízkými odchylkami měření. Stejné výsledky pak byly získány také z detekce komerční protilátky proti proteinu Rab-2, která byla použita jako kontrola k protilátce 5C5. Pokles hladiny Rab-2A u lidských kapacitovaných spermií je v souladu s detekcí Rab-2A popsanou u kančích i myších spermií, u kterých byla také zaznamenána snížená hladina Rab-2A po kapacitaci spermií (Bae et al., 2019; Kwon et al., 2014). Tato zjištění jsou však v rozporu se signálem protilátky 5C5 naměřeném pomocí NIF, který se stejně jako v případě prasečích spermií, u lidských kapacitovaných spermií jevil naopak silnější (Zigo et al., 2015). Signál protilátky 5C5 zaznamenaný pomocí NIF však nebyl kvantifikován a výsledky tak mohou být zkreslené. V případě spermií po indukci AR jsou naše zjištění taktéž v rozporu s výsledky získanými při NIF, ze kterých vyplývá, že protein Rab-2A odchází ze spermie v průběhu AR. Abychom tedy ověřili, kdy protein Rab-2A ze spermie odchází, rozhodli jsme se detekovat přítomnost Rab-2A v médiích po kapacitaci a AR spermií. Rab-2A jsme detekovali v médiu po AR, kde byly přítomny všechny jeho formy, zatímco v médiu po kapacitaci protein detekován nebyl. Tím se potvrdila naše teorie o uvolňování proteinu Rab-2A z kapacitované spermie v průběhu AR.

Protichůdné výsledky získané metodami NIF a imunodetekcí na membráně by mohly být vysvětleny tím, že Rab-2A odchází z povrchu spermie, či vnější akrozomální membrány v průběhu AR, ale může zůstávat zachován v oblasti perinukleární théky (Mountjoy et al., 2008), kde jsme protein, při námi zvolené fixaci buněk, pomocí NIF pravděpodobně nebyli schopni detekovat, a protilátka se tak nemohla dostat až k vrstvě proteinů obklopující jádro spermie, jejíž by protein Rab-2A mohl být součástí (diskutováno níže). Je také možné, že Rab-2A nacházející se v akrozomu, který jsme detekovali NIF, má přístupnější epitop pro protilátku 5C5, zatímco Rab-2A, který by se mohl nacházet v perinukleární oblasti a podílí se na formování akrozomu, má epitop rozpoznávaný protilátkou 5C5 skrytý, a proto ho nejsme schopni detekovat NIF. To také potvrzují naše výsledky získané z imunodetekce na membráně, při které jsme Rab-2A detekovali pouze v lyzátech spermií, připravených za redukčních podmínek.

Domníváme se také, že spermie po kryokonzervaci již mohly být částečně kapacitovány, či dokonce u části spermií mohlo dojít k AR. Tím by se tedy snížila přítomnost Rab-2A v případě ejakulovaných spermií, a také by to zkreslilo data získaná u kapacitovaných spermií i spermií u kterých byla indukována AR. V případě kryokonzervovaných vzorků také nemusí docházet k řádné *in vitro* indukci akrozomální reakce, na rozdíl od čerstvého

ejakulátu. Bohužel jsme však neměli dostatek dárců pro ověření hladiny proteinu Rab-2A v extraktech proteinů získaných z čerstvých ejakulátů, a tak bude třeba tyto předběžná data dále ověřit. Jelikož ověření kapacitovaného stavu spermií, stejně jako hodnocení úspěšné indukce akrozomální reakce bylo provedeno na čerstvém ejakulátu, je tedy pravděpodobné, že úspěšnost indukce akrozomální reakce mohla být v případě vzorků ejakulátu po kryokonzervaci nižší než v případě čerstvě získaného ejakulátu. Po provedení *in vitro* indukce AR bylo také detekováno určité procento spermií s intaktním akrozomem, díky kterým mohly být výsledky detekce Rab-2A v extraktech zkresleny. Abychom tedy potvrdili přítomnost Rab-2A ve spermiích, které prodělaly AR, rozhodli jsme se využít metodu, vyvinutou naší laboratoří, která spočívá v selekci spermií s intaktním akrozomem *(patent 308864).* Tato metoda byla vyvinuta za účelem selekce nejvhodnějších spermií pro IVF a zajišťuje odstranění spermií, které již prodělaly AR a na jejichž povrchu je vystavena vnitřní akrozomální membrána, na které se nachází protein CD46 (Frolikova et al., 2016). Takovéto spermie jsou vázány na protilátku proti CD46 konjugovanou s magnetickými nanočásticemi, díky kterým jsou spermie s narušenou morfologií akrozomu odstraněny ze vzorku spermií s intaktním akrozomem. Z výsledků po selekci spermií vyplývá, že se Rab-2A nachází ve výrazně vyšším množství u spermií s intaktním akrozomem, kde jsme detekovali nejsilnější signál protilátky 5C5, zatímco u spermií, u kterých již AR proběhla, jsme detekovali velmi slabý signál protilátky 5C5. Slabý signál protilátky 5C5 v populaci spermií po indukci AR může být opět vysvětlen přítomností Rab-2A v oblasti PT (Mountjoy et al., 2008).

Na základě studií navrhujících Rab-2A jako biomarker samčí fertility (Kwon et al., 2015b, 2015a) nás zajímalo, zda se výskyt proteinu Rab-2A liší u pacientů s patologickým spermiogramem. Rozhodli jsme se změřit hladinu proteinu Rab-2A za využití protilátky 5C5 u vzorků pacientů s AZS, OZS a OAT, a výsledky porovnat s detekcí 5C5 u NOR. Denzitometrická analýza exprese Rab-2A ve spermiích detekovaného protilátkou 5C5 odhalila sníženou expresi většiny forem proteinu Rab-2A (30, 28, 26) u všech tří patologií (AZS, OZS, OAT). Nárůst byl zaznamenán pouze v případě 24kDa formy u AZS. 22 a 18kDa forma nebyly zahrnuty do měření, neboť nebyly přítomny u všech pacientů. Nejnižší hladinu proteinu jsme naměřili v případě OAT (spermií, které mají kromě sníženého počtu a pohyblivosti také narušenou morfologii), u kterých však byly signifikantní rozdíly v množství detekovaného proteinu. Za pravděpodobné vysvětlení považujeme fakt, že v případě teratozoospermie mají

spermie často defekty v oblasti akrozomu, kde se Rab-2A nachází (Bae et al., 2019; Mountjoy et al., 2008; Zigo et al., 2015), či akrozom postrádají úplně. Tento jev je též označován jako globozoospermie. Jedná se o vzácnou spermatogenní poruchu charakterizovanou výskytem zralých spermií postrádající akrozom, v důsledku čehož mají spermie kulatý tvar hlavičky (Alvarez Sedó et al., 2012). Právě narušený vývoj akrozomu způsobený abnormálním vývojem proakrozomálních váčků odvozených od Golgiho komplexu je spojován s defekty v proteinech tvořící PT (Alvarez Sedó et al., 2012). Mezi proteiny PT, která je nezbytná pro správnou tvorbu, implantaci a také expanzi akrozomu přes jádro spermie, byl identifikován také protein Rab-2A (Mountjoy et al., 2008; Oko a Sutovsky, 2009). Nevíme však, zda je narušená morfologie spermií znakem sníženého množství Rab-2A během spermiogeneze, či zda se jedná o sekundární jev spojený s faktem, že spermie postrádá akrozom, kde se protein nachází. Bylo by tedy zajímavé, zjistit přítomnost Rab-2A ve stádiích spermiogeneze mužů s těmito patologiemi. Snížený počet, či pohyblivost spermií pak může značit různé jiné defekty ve spermatogenezi, v důsledku kterých mohlo dojít ke snížení výskytu proteinu Rab-2A (Tüttelmann et al., 2018).

Je zajímavé, že zatímco Kwon et al. (2015b, 2015a) popsali Rab-2A jako negativní marker samčí plodnosti, kdy byla nadměrná exprese Rab-2A detekována v kapacitovaných spermiích od kanců s malými vrhy mláďat a jeho exprese negativně korelovala s velikostí vrhu, my jsme zaznamenali spíše opačný trend, kdy v případě patologických spermií byla detekována snížená hladina proteinu Rab-2A vzhledem k detekci u NOR. Jedinou výjimku tvořila 24kDa izoforma proteinu Rab-2A, u které jsme zaznamenali naopak nárůst v případě AZS. Kwon et al. (2015b, 2015a) detekovali v prasečích spermií Rab-2A také o velikosti 24 kDa. Předpokládáme tedy, že se jedná o tutéž izoformu proteinu, která by mohla v případě kančích spermií obdobně značit zhoršenou pohyblivost spermií. Rozdílné výsledky mohly být dány i faktem, že jsme měřili hladinu Rab-2A pouze u ejakulovaných patologických spermií a ne u spermií po kapacitaci. Bylo by tedy zajímavé zjistit také expresi Rab-2A u patologických spermií po kapacitaci a výsledky porovnat. To jsme bohužel z důvodu nedostatku čerstvých ejakulátů od dárců s patologickým spermiogramem nebyli schopni provést.

Pro zjištění přesné lokalizace Rab-2A v lidských spermií jsme využili konfokální mikroskopii spolu se SIM, pomocí kterých jsme potvrdili přítomnost Rab-2A v oblasti celého akrozomu lidských ejakulovaných i kapacitovaných spermiích. Jako silnější

se nám, stejně jako v případě použití fluorescenční mikroskopie, jevil signál detekovaný u kapacitovaných spermií, avšak ani tato data nebyla kvantifikována, a tak to nemůžeme říci s jistotou. Tato zjištění odpovídají také detekci Rab-2A protilátkou 5C5 na kančích spermiích (Zigo et al., 2015), jsou ale v rozporu se snížením hladiny Rab-2A po kapacitaci, kterou jsme naměřili metodou WB a která byla popsána při experimentech na kančích spermií (Kwon et al., 2014). U spermií po indukci AR byl detekován slabý signál v oblasti ekvatoriálního segmentu spermie, kde po akrozomální exocytóze zůstává zbytek vnější akrozomální a plazmatické membrány spermie, a kde jako první dochází k fúzi spermie s vajíčkem (Bedford et al., 1979). Jako kontrola značení protilátky 5C5 byla opět využita komerční protilátka proti proteinu Rab-2, kterou jsme detekovali signál v celé hlavičce i bičíku ejakulované spermie. Předpokládáme tedy, že protilátka proti Rab-2 rozeznává jinou sekvenci proteinu než protilátka 5C5. Není však jasné, kterou z forem Rab-2 tato komerční protilátka přesně rozpoznává, zda Rab-2A nebo Rab-2B. Výrobce tuto skutečnost neuvádí. Tyto dva proteiny vykazují 83% homologii ve své aminokyselinové sekvenci. Nicméně v oblasti C-konce proteinů je značná diverzita. Proto se domníváme, že tato komerční protilátka pravděpodobně rozpoznává spíše Rab-2B protein a naše protilátka 5C5 je specifická právě pro Rab-2A a váže se na epitop v oblasti C-konce proteinu.

Pomoci SIM mikroskopie se nám pak podařilo zachytit průběh akrozomální reakce, při které můžeme pozorovat, jak dochází k fúzi mezi plazmatickou membránou spermie a vnější akrozomální membránou, při které Rab-2A odchází ze spermie. Je zajímavé, že signál protilátky 5C5 se přibližně shoduje se značením PNA lektinu, který by se měl vázat na glykokalyx vnější akrozomální membrány spermie (Mortimer et al., 1987). Z toho bychom tedy mohli usuzovat, že se Rab-2A nachází v oblasti vnější akrozomální membrány lidských spermií, či přímo na plazmatické membráně spermií. O přítomnosti Rab-2A na povrchu plazmatické membrány spermií svědčí také data získaná na prasečích spermií, u kterých byla dokonce navržena vazebná aktivita Rab-2A na glykoproteiny ZP (diskutováno níže) (Zigo et al., 2015).

Abychom ověřili teorii, zda se Rab-2A nachází na povrchu lidských spermií, rozhodli jsme se provést fixaci roztokem 3,6 % PFA, při které by nemělo dojít k permeabilizaci plazmatické membrány a měli bychom tak detekovat pouze proteiny přítomné na povrchu membrány spermie (Haas et al., 1988). Při tomto způsobu fixace jsme detekovali stejný signál protilátky 5C5 jako v případě permeabilizace roztokem aceton-metanol. Signál

5C5 byl přítomný v oblasti akrozomu u ejakulovaných i kapacitovaných spermií, přičemž intenzita signálu se opět jevila silnější u kapacitovaných spermií. Abychom si povrchovou detekci Rab-2A ověřili, a vyloučili možnost, že i v případě fixace roztokem PFA došlo k permeabilizaci membrány, inkubovali jsme spermie s protilátkou 5C5 přímo v suspenzi a následně provedli fixaci pomocí aceton-metanolu. U spermií inkubovaných s protilátkou 5C5 jsme nedetekovali žádný signál, avšak v případě kontrolní protilátky Rab-2, která byla použita stejným způsobem, jsme detekovali signál v oblasti akrozomu spermie. Je tedy možné, že epitop proteinu Rab-2A v nativním stavu rozpoznávaný protilátkou 5C5 je na povrchu spermií nepřístupný. Jak již bylo zmíněno, neznáme přesnou sekvenci, kterou rozpoznává naše protilátka 5C5 a ani u komerční Rab-2 tento údaj nebyl uveden. Hypotézu o nepřístupném epitopu podporuje také fakt, že v případě fixace roztokem PFA dochází k zesíťování proteinů na povrchu buňky a může dojít k lepší přístupnosti epitopu rozpoznávaného protilátkou 5C5 (Thavarajah et al., 2012).

V dalším experimentu jsme spermie nejprve ošetřili 0,75 M roztokem KCl, který by měl odstranit povrchovou vrstvu proteinů (Zigo et al., 2019) a mohl by tak zpřístupnit epitop Rab-2A pro vazbu protilátky 5C5. Avšak ani poté jsme nedetekovali žádný signál protilátky 5C5, a proto tento experiment nebyl zahrnut do výsledků.

Pro zjištění, zda se Rab-2A skutečně nachází na povrchu lidských spermií, jsme se pokusili cíleně izolovat povrchové proteiny spermií pomocí jejich biotinylace. Protein Rab-2A jsme protlátkou 5C5 však detekovali pouze ve zbytkovém extraktu proteinů po biotinylaci. Přesto, že jsme metodu prováděli opakovaně, a to jak na ejakulovaných tak i na kapacitovaných spermií, izolace povrchových proteinů zřejmě nebyla úspěšná. Po obarvení gelu stříbrem jsme v extraktu povrchových proteinů detekovali převážně proteiny o vyšší moleklové hmotnosti (> 50 kDa), zatímco nízkomolekulární proteiny, kde by se měl nacházet Rab-2A, přítomné nebyly. Vhledem k tomu, že při izolaci povrchových proteinů z prasečích spermií, při které se protilátkou 5C5 podařilo detekovat 24kDa formu proteinu Rab-2A v extraktu povrchových proteinů kapacitovaných spermií (Zigo et al., 2015), byl použit stejný kit, se domníváme, že mohl být problém s kapacitou avidinových částic. Je možné, že se menší proteiny značené biotinem nezachytily z důvodu obsahu nižšího množství biotinu, neboť mají méně bazických aminokyselin, které mohou být biotinylované. Je také možné, že se nám některé proteiny nepodařilo z avidinových částic zcela uvolnit z důvodu nedostatečné redukce disulfidových můstků v derivátu biotinu, která je potřebná pro izolaci takto označených proteinů. Tuto

skutečnost nám naznačuje také neúspěšná detekce námi zvoleného povrchového proteinu clusterinu, který nebyl přítomen ani v jedné z frakcí získaných z izolace povrchových proteinů. Přítomnost proteinu Rab-2A na povrchu plazmatické membrány lidských spermií jsme tedy nakonec nebyli schopni s jistotou potvrdit. Bylo by tedy zapotřebí změnit metodu izolace povrchových proteinů, či alespoň vyzkoušet jiný způsob extrakce.

Mountjoy et al. (2008) popsal Rab-2A v oblasti vnější akrozomální membrány, avšak pouze v časném stádiu býčí spermatidy. Po dokončení elongace spermatidy Rab-2A zůstává zachován na vnější plazmatické membráně pouze v oblasti ekvatoriálního segmentu, a také na celé vnitřní akrozomální membráně, kde se stává součástí subakrozomální vrstvy proteinů PT, zajišťující ukotvení akrozomu k jádru spermie (Oko a Sutovsky, 2009). Rozhodli jsme se tedy ověřit, zda je Rab-2A součástí proteinů PT také v lidských spermiích, a to za využití stejné metody popsané při izolaci býčích kovalentně vázaných proteinů PT (Mountjoy et al., 2008). Jako kontrolu jsme zvolili histon H2B, který byl také popsán jako součást kovalentně vázaných proteinů PT býčích spermií (Aul a Oko, 2001; Tovich a Oko, 2003). Histon H2B jsme detekovali pouze ve frakci proteinů se zbytky hlaviček a jader spermií, ale ne ve frakci kovalentně vázaných proteinů PT. Je tedy pravděpodobné, že se nám tato frakce proteinů z lidských spermií nepodařila izolovat. Protilátkou 5C5 jsme za prodloužené expozice detekovali pouze několik nízkomolekulárních forem (18, 17 a 15 kDa) proteinu Rab-2A v extraktu proteinů ze zbytků hlaviček a jader spermií. Ve frakci proteinů vnitřní akrozomální membrány, kde by se měl Rab-2A také nacházet (Mountjoy et al., 2008), se nám za prodloužené expozice podařilo detekovat velmi slabý signál pouze komerční protilátky Rab-2 v oblasti 20 kDa. Ve frakci iontově vázaných proteinů byl přítomný signál obou protilátek a ve frakci kovalentně vázaných proteinů PT se nám protein Rab-2A ani po několika opakování izolace i imunodetekce detekovat nepodařilo. Přítomnost PT v různých stádiích lidské spermiogeneze již byla prokázána pomocí fluorescenční mikroskopie (Alvarez Sedó et al., 2009), pokud je nám však známo, doposud se nikomu nepodařilo tuto proteinovou vrstvu izolovat. Domníváme se tedy, že buď nebyla úspěšná izolace kovalentně vázaných proteinů PT, anebo protein Rab-2A v lidských spermií není součástí proteinové vrstvy obklopující jádro spermie, ale je součástí spíše jaderných proteinů, kde jsme ho také detekovali. Vzhledem k tomu, že se jednalo o frakci proteinů z jader, ale také ze zbytků hlaviček spermií však nejsme schopni říci, zda se Rab-2A nachází v jádře či jiné části spermie. Je zajímavé, že při testování metody na kančích spermiích,

se nám protilátkou 5C5 Rab-2A v extraktu kovalentně vázaných proteinů PT detekovat podařilo. Tento výsledek však nebyl zahrnut do předkládané diplomové práce. Z toho můžeme usuzovat, že námi zvolená metoda funguje, ne však na lidských spermiích a metodika pro izolaci proteinů PT dle Mountjoy et al. (2008) není pro lidské spermie využitelná. Dalším vysvětlením může být fakt, že protilátka 5C5 pouze není schopná rozpoznat formu proteinu Rab-2A nacházející se v oblasti PT spermií. Může se jednat o formu zkrácenou na C-konci sekvence, kterou by protilátka 5C5 mohla rozpoznávat.

Původ proteinu Rab-2A ve spermiích a jeho zdroj v reprodukčních orgánech zatím nebyl zcela odhalen. Zigo, et. al. (2015) detekovali 24 a 27 kDa formu Rab-2A v kančí epididymální tekutině, na základě čehož autoři navrhují původ Rab-2A v epididymu. Vzhledem k tomu, že je Rab-2A ukotven do membrány přes prenylovaný C-konec (Geyer a Wittinghofer, 1997), by byl pravděpodobný způsob jeho sekrece do epididymální tekutiny skrze membránové sekreční vezikuly, zvané epididymozomy (Simpson et al., 2008; Zigo et al., 2015). Tuto hypotézu podporuje také nedávná proteomické studie, která odhalila přítomnost Rab-2A v exozomech pocházejících ze semenné plazmy beranů (Leahy et al., 2020). U lidí byla již dříve zjištěna přítomnost Rab-2A jak v epididymozomech izolovaných z lidských nadvarlat (Thimon et al., 2008), tak i v lidských sekrečních veziklech pocházejících z prostaty, známých jako prostazomy (Utleg et al., 2003). Za účelem ověření, zda se protein Rab-2A skutečně nachází v sekrečních veziklech, jsme se pokusili o izolaci exozomů z lidské semenné plazmy. K izolaci exozomů ze semenné plazmy jsme využili komerční kit Total Exosome Isolation Kit (4484450) a pro následnou izolaci proteinů z exozomů byla použita metoda alkalické lyze. Při této izolaci se nám v získaném proteinovém extraktu exozomů podařilo protilátkou 5C5 za prodloužené expozice detekovat slabý signál v oblasti 24 a 22 kDa. Domníváme se tedy, že množství proteinu nacházejících se ve váčcích je velmi malé, a proto je obtížné ho v exozomech detekovat. Z tohoto důvodu jsme zřejmě nebyli schopni detekce Rab-2A v semenné plazmě, kde bude celkové množství proteinu ještě nižší. Jako kontrola izolace exozomů nám sloužil tetraspanin CD9, který se nachází ve většině exozomů a je běžně užíván jako marker (Simpson et al., 2008). Nejsme však schopni říci, jaký typ exozomů se nám ze semenné plazmy podařilo izolovat, neboť populací exozomů vyskytujících v semenné plazmě je mnoho (Baskaran et al., 2020). Bylo by tedy zajímavé tyto exozomy dále popsat, a také ověřit jejich přítomnost pomocí elektronové mikroskopie.

V dalším experimentu studie Zigo et al., (2015) pak bylo zjištěno, že proteiny o molekulových hmotnostech 24 a 27 kDa, rozpoznávané protilátkou 5C5 v extraktech kančích spermií, odpovídají vazbě biotinem značených glykoproteinů ZP na proteiny spermie a byla tak navržena možná role Rab-2A v primární vazbě spermie na ZP vajíčka. Pro ověření poslední hypotézy o úloze Rab-2A v lidských spermiích, kterou jsme si v rámci předkládané diplomové práce stanovili, jsme izolovali glykoproteiny lidské ZP, které jsme označili biotinem a následně provedli vazebnou studii na proteinových extraktech lidských kapacitovaných a ejakulovaných spermií. Detekovali jsme vazebnou aktivitu ZP na několik proteinů spermií (66, 47, 30, 18, 16, 15 a 13 kDa, z čehož by 30 a 18kDa proteinový proužek odpovídal izoformám proteinu Rab-2A detekovaným protilátkou 5C5 v extraktech lidských spermií. Vzhledem k nedostupnosti dostatečného množství vzácného biologického materiálu, jakým bezesporu lidské ZP jsou, jsme však experiment nemohli opakovat vícekrát. Navíc se nám zcela nezdařila izolace povrchových proteinů spermií, které by byly k danému experimentu jistě vhodnější, protože se jedná o vazbu receptorů pro ZP lokalizovaných na povrchu plazmatické membrány spermií. Vypovídající hodnota vazebné studie by byla také vyšší při využití glykoproteinů ZP izolovaných ze zralých vajíček, tedy ve stádiu druhé metafáze (MII). Nicméně fakt, že se jednalo o neralé oocyty v GV stádiu by mohl výsledky zkreslovat, neboť sacharidové struktury na povrchu oocytu, se kterými spermie interaguje, se mění v průběhu zrání vajíčka (Takahashi et al., 2013).

# 7. ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce bylo přispět k objasnění přítomnost a roli proteinu Rab-2A v lidských spermiích. Pomocí protilátky 5C5, která byla vytvořena Laboratoří reprodukční biologie, se nám jako prvním podařilo detekovat protein Rab-2A v lidských spermií. Specifitu protilátky jsme potvrdili za využití hmotnostní spektrometrie. Metodou nepřímé imunofluorescence jsme protein Rab-2A lokalizovali v oblasti celého akrozomu lidských ejakulovaných i kapacitovaných spermií. Zjistili jsme také, že Rab-2A ze spermie odchází v průběhu akrozomální exocytózy. Imunodetekce Rab-2A protilátkou 5C5 v proteinových extraktech lidských spermií odhalila přítomnost 30, 28, 26, 24, 22 a 18kDa izoforem Rab-2A, z nichž se ve vzorcích od různých pacientů nejčastěji objevovaly izoformy o velikosti 28, 26, 24 a 18 kDa. Dále jsme odhalili sníženou hladinu většiny izoforem proteinu Rab-2A ve vzorcích od pacientů se sníženým množstvím spermií v ejakulátu, zhoršenou pohyblivostí a narušenou morfologií spermií. Výjimku tvořila pouze 24kDa forma Rab-2A, u které jsme zaznamenali nárůst v případě spermií se zhoršenou pohyblivostí. Dalším z cílů práce bylo zjistit, zda je protein Rab-2A součástí perinukleární théky lidských spermií. To se nám však zřejmě z důvodu nevhodné metody izolace této proteinové vrstvy ani po několika opakování objasnit nepodařilo. Přítomnost proteinu Rab-2A jsme odhalili v membránových váčcích pocházejících z lidské semenné plazmy, kde jsme protilátkou 5C5 detekovali slabý signál v oblasti 24 a 22 kDa. Přestože jsme za využití několika různých metod nebyli schopni s jistotou potvrdit přítomnost Rab-2A na povrchu lidských spermií, podařilo se nám detekovat několik proteinů spermií s vazebnou aktivitou ke glykoproteinům lidské ZP, mezi kterými by proteinové proužky 30 a 18kDa mohly odpovídat izoformám proteinu Rab-2A detekovaným protilátkou 5C5 v extraktech lidských spermií. Tato práce potvrdila přítomnost proteinu Rab-2A v lidských spermiích a navrhuje možné role tohoto proteinu v samčích gametách, na které by mohl být zaměřen další výzkum.

# 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY


Aizawa, M., Fukuda, M., 2015. Small GTPase Rab2B and Its Specific Binding Protein Golgi-associated Rab2B Interactor-like 4 (GARI-L4) Regulate Golgi Morphology *. J. Biol. Chem. 290, 22250–22261. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.669242

Alvarez Sedó, C., Oko, R., Sutovsky, P., Chemes, H., Rawe, V.Y., 2009. Biogenesis of the sperm head perinuclear theca during human spermiogenesis. Fertil. Steril. 92, 1472–1473. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.051

Alvarez Sedó, C., Rawe, V.Y., Chemes, H.E., 2012. Acrosomal biogenesis in human globozoospermia: immunocytochemical, ultrastructural and proteomic studies. Hum. Reprod. 27, 1912–1921. https://doi.org/10.1093/humrep/des126

Arienti, G., Carlini, E., Polci, A., Cosmi, E.V., Palmerini, C.A., 1998. Fatty Acid Pattern of Human Prostasome Lipid. Arch. Biochem. Biophys. 358, 391–395. https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0876

Arienti, G., Carlini, E., Verdacchi, R., Palmerini, C.A., 1997. Transfer of aminopeptidase activity from prostasomes to sperm. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. 1336, 269–274. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(97)00036-6

Aul, R. B., Oko, R.J., 2001. The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B variant associated with the forming acrosome during spermiogenesis. Dev. Biol. 239, 376–387. https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0427

Aul, Ritu B., Oko, R.J., 2001. The Major Subacrosomal Occupant of Bull Spermatozoa Is a Novel Histone H2B Variant Associated with the Forming Acrosome during Spermiogenesis. Dev. Biol. 239, 376–387. https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0427

Austin, C.R., 1951. Observations on the Penetration of the Sperm into the Mammalian Egg. Aust. J. Biol. Sci. 4, 581–596. https://doi.org/10.1071/bi9510581

Bae, J.-W., Kim, S.-H., Kim, D.-H., Ha, J.J., Yi, J.K., Hwang, S., Ryu, B.-Y., Pang, M.-G., Kwon, W.-S., 2019. Ras-related proteins (Rab) are key proteins related to male fertility following a unique activation mechanism. Reprod. Biol. 19, 356–362. https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.10.001

Baskaran, S., Panner Selvam, M.K., Agarwal, A., 2020. Chapter Four - Exosomes of male reproduction, in: Makowski, G.S. (Ed.), Advances in Clinical Chemistry. Elsevier, pp. 149–163. https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.08.004

Bedford, J.M., Moore, H.D.M., Franklin, L.E., 1979. Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. Exp. Cell Res. 119, 119–126. https://doi.org/10.1016/0014-4827(79)90341-0

Belmonte, S.A., López, C.I., Roggero, C.M., De Blas, G.A., Tomes, C.N., Mayorga, L.S., 2005. Cholesterol content regulates acrosomal exocytosis by enhancing Rab3A plasma membrane association. Dev. Biol. 285, 393–408. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.07.001

Berruti, G., Paiardi, C., 2011. Acrosome biogenesis. Spermatogenesis 1, 95–98. https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16820

Berruti, G., Ripolone, M., Ceriani, M., 2010. USP8, a Regulator of Endosomal Sorting, Is Involved in Mouse Acrosome Biogenesis Through Interaction with the Spermatid ESCRT-0 Complex and Microtubules1. Biol. Reprod. 82, 930–939. https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.081679

Bock, J.B., Matern, H.T., Peden, A.A., Scheller, R.H., 2001. A genomic perspective on membrane compartment organization. Nature 409, 839–841. https://doi.org/10.1038/35057024

Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F., 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. Nature 349, 117–127. https://doi.org/10.1038/349117a0

Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F., 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. Nature 348, 125–132. https://doi.org/10.1038/348125a0

Bozzola, J.J., Polakoski, K., Haas, N., Russell, L.D., Campbell, P., Peterson, R.N., 1991. Localization of boar sperm proacrosin during spermatogenesis and during sperm maturation in the epididymis. Am. J. Anat. 192, 129–141. https://doi.org/10.1002/aja.1001920204

Breucker, H., Schäfer, E., Holstein, A.-F., 1985. Morphogenesis and fate of the residual body in human spermiogenesis. Cell Tissue Res. 240, 303–309. https://doi.org/10.1007/BF00222339

Brody, I., Ronquist, G., Gottfries, A., 1983. Ultrastructural Localization of the Prostasome - an Organelle in Human Seminal Plasma. Ups. J. Med. Sci. 88, 63–80. https://doi.org/10.3109/03009738309178440

Buffone, M.G., Foster, J.A., Gerton, G.L., 2004. The role of the acrosomal matrix in fertilization. Int. J. Dev. Biol. 52, 511–522. https://doi.org/10.1387/ijdb.072532mb

Bustos, M.A., Lucchesi, O., Ruete, M.C., Mayorga, L.S., Tomes, C.N., 2012. Rab27 and Rab3 sequentially regulate human sperm dense-core granule exocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, E2057–E2066. https://doi.org/10.1073/pnas.1121173109

Capková, J., Geussová, G., Peknicová, J., 2002. New monoclonal antibody to human apolipoprotein J. Folia Biol. (Praha) 48, 40–42.

Capkova, J., Kubatova, A., Ded, L., Tepla, O., Peknicova, J., 2016. Evaluation of the expression of sperm proteins in normozoospermic and asthenozoospermic men using monoclonal antibodies. Asian J. Androl. 18, 108–113. https://doi.org/10.4103/1008-682X.151400

Carlini, E., Palmerini, C.A., Cosmi, E.V., Arienti, G., 1997. Fusion of Sperm with Prostasomes: Effects on Membrane Fluidity. Arch. Biochem. Biophys. 343, 6–12. https://doi.org/10.1006/abbi.1997.9999

Carlsson, L., Lennartsson, L., Nilsson, B.O., Nilsson, S., Ronquist, G., 2000. Growth–Inhibitory Effect of Prostasomes on Prostatic Cancer Cell Lines in Culture. Eur. Urol. 38, 468–474. https://doi.org/10.1159/000020326

Carlsson, Lena, Påhlson, C., Bergquist, M., Ronquist, G., Stridsberg, M., 2000. Antibacterial activity of human prostasomes. The Prostate 44, 279–286. https://doi.org/10.1002/1097-0045(20000901)44:4<279::AID-PROS4>3.0.CO;2-2

Castellini, C., Dal Bosco, A., Ruggeri, S., Collodel, G., 2011. What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? Fertil. Steril. 96, 24–27. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.096

Chang, M.C., 1951. Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. Nature 168, 697–698. https://doi.org/10.1038/168697b0

Chavrier, P., Gorvel, J.-P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J., Zerial, M., 1991. Hypervariable C-termmal domain of rab proteins acts as a targeting signal. Nature 353, 769–772. https://doi.org/10.1038/353769a0

Clark, G.F., 2014. A role for carbohydrate recognition in mammalian sperm-egg binding. Biochem. Biophys. Res. Commun., Fertilization and Early Development 450, 1195–1203. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.051

Clermont, Y., 1966. Renewal of spermatogonia in man. Am. J. Anat. 118, 509–524. https://doi.org/10.1002/aja.1001180211

Clermont, Y., Leblond, C.P., 1955. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the “periodic acid-schiff” technique. Am. J. Anat. 96, 229–253. https://doi.org/10.1002/aja.1000960203

Copland, S.D., Murphy, A.A., Shur, B.D., 2009. The mouse gamete adhesin, SED1, is expressed on the surface of acrosome-intact human sperm. Fertil. Steril. 92, 2014–2019. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.09.004

Dam, A.H.D.M., Feenstra, I., Westphal, J.R., Ramos, L., van Golde, R.J.T., Kremer, J. a. M., 2007. Globozoospermia revisited. Hum. Reprod. Update 13, 63–75. https://doi.org/10.1093/humupd/dml047

De Blas, G.A., Roggero, C.M., Tomes, C.N., Mayorga, L.S., 2005. Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. PLoS Biol. 3, e323. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030323

Delves, G.H., Stewart, A.B., Cooper, A.J., Lwaleed, B.A., 2007. Prostasomes, Angiogenesis, and Tissue Factor. Semin. Thromb. Hemost. 33, 75–79. https://doi.org/10.1055/s-2006-958465

Dumas, J.J., Zhu, Z., Connolly, J.L., Lambright, D.G., 1999. Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins. Structure 7, 413-s2. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80054-9

Echard, A., Opdam, F.J.M., de Leeuw, H.J.P.C., Jollivet, F., Savelkoul, P., Hendriks, W., Voorberg, J., Goud, B., Fransen, J.A.M., 2000. Alternative Splicing of the Human Rab6A Gene Generates Two Close but Functionally Different Isoforms. Mol. Biol. Cell 11, 3819–3833. https://doi.org/10.1091/mbc.11.11.3819

Ensslin, M., Vogel, T., Calvete, J.J., Thole, H.H., Schmidtke, J., Matsuda, T., Töpfer-Petersen, E., 1998. Molecular Cloning and Characterization of P47, a Novel Boar Sperm-Associated Zona Pellucida-Binding Protein Homologous to a Family of Mammalian Secretory Proteins. Biol. Reprod. 58, 1057–1064. https://doi.org/10.1095/biolreprod58.4.1057

Ensslin, M.A., Shur, B.D., 2003. Identification of Mouse Sperm SED1, a Bimotif EGF Repeat and Discoidin-Domain Protein Involved in Sperm-Egg Binding. Cell 114, 405–417. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00643-3

Fabiani, R., Johansson, L., Lundkvist, örjan, Ronquist, G., 1994. Enhanced recruitment of motile spermatozoa by prostasome inclusion in swim-up medium. Hum. Reprod. 9, 1485–1489. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138735

Frolikova, M., Sebkova, N., Ded, L., Dvorakova-Hortova, K., 2016. Characterization of CD46 and β1 integrin dynamics during sperm acrosome reaction. Sci. Rep. 6, 33714. https://doi.org/10.1038/srep33714

Geyer, M., Wittinghofer, A., 1997. GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. Curr. Opin. Struct. Biol. 7, 786–792. https://doi.org/10.1016/S0959-440X(97)80147-9

Gilboa, E., Elkana, Y., Rigbi, M., 1973. Purification and Properties of Human Acrosin. Eur. J. Biochem. 39, 85–92. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb03106.x

Goitre, L., Trapani, E., Trabalzini, L., Retta, S.F., 2014. The Ras Superfamily of Small GTPases: The Unlocked Secrets, in: Trabalzini, L., Retta, S.F. (Eds.), Ras Signaling: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 1–18. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-791-4_1

Goody, R.S., Müller, M.P., Wu, Y.-W., 2017. Mechanisms of action of Rab proteins, key regulators of intracellular vesicular transport. Biol. Chem. 398, 565–575. https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0274

Haas, G.G., DeBault, L.E., D'Cruz, O., Shuey, R., 1988. The effect of fixatives and/or air-drying on the plasma and acrosomal membranes of human sperm. Fertil. Steril. 50, 487–492. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)60138-3

Holstein, A.-F., Schulze, W., Davidoff, M., 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. Reprod. Biol. Endocrinol. 1, 107. https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-107

Hutagalung, A.H., Novick, P.J., 2011. Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. Physiol. Rev. 91, 119–149. https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2009

Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S.A., Chiba, K., Hirohashi, N., 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 4892–4896. https://doi.org/10.1073/pnas.1018202108

Kang-Decker, N., Mantchev, G.T., Juneja, S.C., McNiven, M.A., Deursen, J.M.A. van, 2001. Lack of Acrosome Formation in Hrb-Deficient Mice. Science 294, 1531–1533. https://doi.org/10.1126/science.1063665

Khawar, M.B., Gao, H., Li, W., 2019. Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. Front. Cell Dev. Biol. 7. https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00195

Kirkman-Brown, J.C., Barratt, C.L.R., Publicover, S.J., 2003. Nifedipine reveals the existence of two discrete components of the progesterone-induced [Ca2+]i transient in human spermatozoa. Dev. Biol. 259, 71–82. https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00137-4

Knobil, E., Neill, J.D., 1996. The Physiology of Reproduction. Psychoneuroendocrinology 7, 641–642.

Kongmanas, K., Kruevaisayawan, H., Saewu, A., Sugeng, C., Fernandes, J., Souda, P., Angel, J.B., Faull, K.F., Aitken, R.J., Whitelegge, J., Hardy, D., Berger, T., Baker, M.A., Tanphaichitr, N., 2015. Proteomic Characterization of Pig Sperm Anterior Head Plasma Membrane Reveals Roles of Acrosomal Proteins in ZP3 Binding. J. Cell. Physiol. 230, 449–463. https://doi.org/10.1002/jcp.24728

Kravets, F.G., Lee, J., Singh, B., Trocchia, A., Pentyala, S.N., Khan, S.A., 2000. Prostasomes: Current concepts. The Prostate 43, 169–174. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(20000515)43:3<169::AID-PROS2>3.0.CO;2-D

Kwon, W.-S., Rahman, M.S., Lee, J.-S., Kim, J., Yoon, S.-J., Park, Y.-J., You, Y.-A., Hwang, S., Pang, M.-G., 2014. A comprehensive proteomic approach to identifying capacitation related proteins in boar spermatozoa. BMC Genomics 15, 897. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-897

Kwon, W.-S., Rahman, M.S., Lee, J.-S., Yoon, S.-J., Park, Y.-J., Pang, M.-G., 2015a. Discovery of Predictive Biomarkers for Litter Size in Boar Spermatozoa. Mol. Cell. Proteomics 14, 1230–1240. https://doi.org/10.1074/mcp.M114.045369

Kwon, W.-S., Rahman, M.S., Ryu, D.-Y., Park, Y.-J., Pang, M.-G., 2015b. Increased male fertility using fertility-related biomarkers. Sci. Rep. 5, 1–11. https://doi.org/10.1038/srep15654

Leahy, T., Rickard, J.P., Pini, T., Gadella, B.M., Graaf, S.P. de, 2020. Quantitative Proteomic Analysis of Seminal Plasma, Sperm Membrane Proteins, and Seminal Extracellular Vesicles Suggests Vesicular Mechanisms Aid in the Removal and Addition of Proteins to the Ram Sperm Membrane. PROTEOMICS 20, 1900289. https://doi.org/10.1002/pmic.201900289

Lilja, H., Laurell, C.-B., 1984. Liquefaction of coagulated human semen. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 44, 447–452. https://doi.org/10.3109/00365518409083836

Lin, Y.-H., Lin, Y.-M., Kuo, Y.-C., Wang, Y.-Y., Kuo, P.-L., 2011. Identification and characterization of a novel Rab GTPase-activating protein in spermatids. Int. J. Androl. 34, e358–e367. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01126.x

Lopez, C.I., Belmonte, S.A., De Blas, G.A., Mayorga, L.S., 2007. Membrane-permeant Rab3A triggers acrosomal exocytosis in living human sperm. FASEB J. 21, 4121–4130. https://doi.org/10.1096/fj.06-7716com

Luchter-Wasylewska, E., Wasylewski, M., 2007. What are Prostasomes? IUBMB Life 59, 791–792. https://doi.org/10.1080/15216540701592423

Michaut, Cn, T., G, D.B., R, Y., Ls, M., 2000. Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97. https://doi.org/10.1073/pnas.180206197

Moore, I., Schell, J., Palme, K., 1995. Subclass-specific sequence motifs identified in Rab GTPases. Trends Biochem. Sci. 20, 10–12. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)88939-2

Mortimer, D., Curtis, E.F., Miller, R.G., 1987. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. Reproduction 81, 127–135. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0810127

Mountjoy, J.R., Xu, W., McLeod, D., Hyndman, D., Oko, R., 2008. RAB2A: A Major Subacrosomal Protein of Bovine Spermatozoa Implicated in Acrosomal Biogenesis. Biol. Reprod. 79, 223–232. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.065060

Oko, R., Maravei, D., 1995. Distribution and possible role of perinuclear theca proteins during bovine spermiogenesis. Microsc. Res. Tech. 32, 520–532. https://doi.org/10.1002/jemt.1070320605

Oko, R., Maravei, D., 1994. Protein Composition of the Perinuclear Theca of Bull Spermatozoa1. Biol. Reprod. 50, 1000–1014. https://doi.org/10.1095/biolreprod50.5.1000

Oko, R., Sutovsky, P., 2009. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. J. Reprod. Immunol., Bio-immunoregulatory Mechanisms Associated with Reproductive Organs: Relevance in Fertility and in Sexually Transmitted Infections 83, 2–7. https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.05.008

Oko, R.J., 1995. Developmental expression and possible role of perinuclear theca proteins in mammalian spermatozoa. Reprod. Fertil. Dev. 7, 777–797. https://doi.org/10.1071/rd9950777

Olson, G.E., Winfrey, V.P., NagDas, S.K., 1998. Acrosome biogenesis in the hamster: ultrastructurally distinct matrix regions are assembled from a common precursor polypeptide. Biol. Reprod. 58, 361–370. https://doi.org/10.1095/biolreprod58.2.361

Ostermeier, C., Brunger, A.T., 1999. Structural Basis of Rab Effector Specificity: Crystal Structure of the Small G Protein Rab3A Complexed with the Effector Domain of Rabphilin-3A. Cell 96, 363–374. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80549-8

Paiardi, C., Pasini, M.E., Gioria, M., Berruti, G., 2011. Failure of acrosome formation and globozoospermia in the wobbler mouse, a Vps54 spontaneous recessive mutant. Spermatogenesis 1, 52–62. https://doi.org/10.4161/spmg.1.1.14698

Palfreyman, M.T., Jorgensen, E.M., 2008. Roles of SNARE Proteins in Synaptic Vesicle Fusion, in: Wang, Z.-W. (Ed.), Molecular Mechanisms of Neurotransmitter Release, Contemporary Neuroscience. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 35–59. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-481-0_3

Peterson, R.N., Bozzola, J., Polakoski, K., 1992. Protein transport and organization of the developing mammalian sperm acrosome. Tissue Cell 24, 1–15. https://doi.org/10.1016/0040-8166(92)90076-J

Piehler, E., Petrunkina, A.M., Ekhlasi-Hundrieser, M., Töpfer-Petersen, E., 2006. Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation. Cytometry A 69A, 1062–1070. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20338

Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., Frenoux, J.-M., Vericel, E., Grizard, G., Vernet, P., Drevet, J.R., 2006. Lipid Remodeling of Murine Epididymosomes and Spermatozoa During Epididymal Maturation1. Biol. Reprod. 74, 1104–1113. https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.049304

Ronquist, G., Brody, I., 1985. The prostasome: its secretion and function in man. Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr. 822, 203–218. https://doi.org/10.1016/0304-4157(85)90008-5

Roosen-Runge, E.C., 1977. The Process of Spermatogenesis in Animals. CUP Archive.

Ruete, M.C., Lucchesi, O., Bustos, M.A., Tomes, C.N., 2014. Epac, Rap and Rab3 act in concert to mobilize calcium from sperm's acrosome during exocytosis. Cell Commun. Signal. 12, 43. https://doi.org/10.1186/s12964-014-0043-0

Sati, L., Cayli, S., Delpiano, E., Sakkas, D., Huszar, G., 2014. The Pattern of Tyrosine Phosphorylation in Human Sperm in Response to Binding to Zona Pellucida or Hyaluronic Acid. Reprod. Sci. 21, 573–581. https://doi.org/10.1177/1933719113504467

Schlichting, I., Almo, S.C., Rapp, G., Wilson, K., Petratos, K., Lentfer, A., Wittinghofer, A., Kabsch, W., Pai, E.F., Petsko, G.A., Goody, R.S., 1990. Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis. Nature 345, 309–315. https://doi.org/10.1038/345309a0

Short, B., Preisinger, C., Körner, R., Kopajtich, R., Byron, O., Barr, F.A., 2001. A GRASP55-rab2 effector complex linking Golgi structure to membrane traffic. J. Cell Biol. 155, 877–884. https://doi.org/10.1083/jcb.200108079

Simpson, R.J., Jensen, S.S., Lim, J.W.E., 2008. Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. PROTEOMICS 8, 4083–4099. https://doi.org/10.1002/pmic.200800109

Singh, V., 2014. Textbook of Clinical Embryology - E-book. Elsevier Health Sciences.

Skinner, M.K., Griswold, M.D., 2004. Sertoli Cell Biology. Elsevier.

Stenmark, H., 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10, 513–525. https://doi.org/10.1038/nrm2728

Stenmark, H., Olkkonen, V.M., 2001. The Rab GTPase family. Genome Biol. 2, reviews3007.1. https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-5-reviews3007

Suarez, S.S., 2008. Control of hyperactivation in sperm. Hum. Reprod. Update 14, 647–657. https://doi.org/10.1093/humupd/dmn029

Sullivan, R., Frenette, G., Girouard, J., 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. Asian J. Androl. 9, 483–491. https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00281.x

Sutovsky, P., Manandhar, G., Wu, A., Oko, R., 2003. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: Implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. Microsc. Res. Tech. 61, 362–378. https://doi.org/10.1002/jemt.10350

Takahashi, K., Kikuchi, K., Uchida, Y., Kanai-Kitayama, S., Suzuki, R., Sato, R., Toma, K., Geshi, M., Akagi, S., Nakano, M., Yonezawa, N., 2013. Binding of Sperm to the Zona Pellucida Mediated by Sperm Carbohydrate-Binding Proteins is not Species-Specific in Vitro between Pigs and Cattle. Biomolecules 3, 85–107. https://doi.org/10.3390/biom3010085

Tang, X.M., Lalli, M.F., Clermont, Y., 1982. A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. Am. J. Anat. 163, 283–294. https://doi.org/10.1002/aja.1001630402

Tesařík, J., Drahorád, J., Pěknicová, J., 1988. Subcellular immunochemical localization of acrosin in human spermatozoa during the acrosome reaction and zona pellucida penetration. Fertil. Steril. 50, 133–141. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)60021-3

Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V.K., Elizabeth, J., Rao, U.K., Ranganathan, K., 2012. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. J. Oral Maxillofac. Pathol. JOMFP 16, 400–405. https://doi.org/10.4103/0973-029X.102496

Thimon, V., Frenette, G., Saez, F., Thabet, M., Sullivan, R., 2008. Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. Hum. Reprod. 23, 1698–1707. https://doi.org/10.1093/humrep/den181

Thorne-Tjomsland, G., Clermont, Y., Hermo, L., 1988. Contribution of the golgi apparatus components to the formation of the acrosomic system and chromatoid body in rat spermatids. Anat. Rec. 221, 591–598. https://doi.org/10.1002/ar.1092210205

Tisdale, E.J., Balch, W.E., 1996. Rab2 is essential for the maturation of pre-Golgi intermediates. J. Biol. Chem. 271, 29372–29379. https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.29372

Tisdale, E.J., Bourne, J.R., Khosravi-Far, R., Der, C.J., Balch, W.E., 1992. GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. J. Cell Biol. 119, 749–761. https://doi.org/10.1083/jcb.119.4.749

Touchot, N., Chardin, P., Tavitian, A., 1987. Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 8210–8214. https://doi.org/10.1073/pnas.84.23.8210

Tovich, P.R., Oko, R.J., 2003. Somatic Histones Are Components of the Perinuclear Theca in Bovine Spermatozoa *. J. Biol. Chem. 278, 32431–32438. https://doi.org/10.1074/jbc.M303786200

Tumova, L., Zigo, M., Sutovsky, P., Sedmikova, M., Postlerova, P., 2021. Ligands and Receptors Involved in the Sperm-Zona Pellucida Interactions in Mammals. Cells 10, 133. https://doi.org/10.3390/cells10010133

Tüttelmann, F., Ruckert, C., Röpke, A., 2018. Disorders of spermatogenesis. Med. Genet. 30, 12–20. https://doi.org/10.1007/s11825-018-0181-7

Tuvim, M.J., Adachi, R., Hoffenberg, S., Dickey, B.F., 2001. Traffic Control: Rab GTPases and the Regulation of Interorganellar Transport. Physiology 16, 56–61. https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2001.16.2.56

Utleg, A.G., Yi, E.C., Xie, T., Shannon, P., White, J.T., Goodlett, D.R., Hood, L., Lin, B., 2003. Proteomic analysis of human prostasomes. The Prostate 56, 150–161. https://doi.org/10.1002/pros.10255

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat. Cell Biol. 9, 654–659. https://doi.org/10.1038/ncb1596

Villarreal, M.R., 2006. English:  the diagram shows a simple description of a human spermatozoon with special detail of the head.

Wassarman, P.M., Jovine, L., Litscher, E.S., Qi, H., Williams, Z., 2004. Egg–sperm interactions at fertilization in mammals. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., Genesis and Fate of the Preimplantation Embryo - Intrinsic and Extrinsic Influences 115, S57–S60. https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2004.01.025

Yanagimachi, R., 2011. Mammalian Sperm Acrosome Reaction: Where Does It Begin Before Fertilization? Biol. Reprod. 85, 4–5. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092601

Yao, R., Ito, C., Natsume, Y., Sugitani, Y., Yamanaka, H., Kuretake, S., Yanagida, K., Sato, A., Toshimori, K., Noda, T., 2002. Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 11211–11216. https://doi.org/10.1073/pnas.162027899

Yunes, R., Michaut, M., Tomes, C., Mayorga, L.S., 2000. Rab3A Triggers the Acrosome Reaction in Permeabilized Human Spermatozoa1. Biol. Reprod. 62, 1084–1089. https://doi.org/10.1095/biolreprod62.4.1084

Zerial, M., McBride, H., 2001. Rab proteins as membrane organizers. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2, 107–117. https://doi.org/10.1038/35052055

Zigo, M., Dorosh, A., Pohlová, A., Jonáková, V., Šulc, M., Maňásková-Postlerová, P., 2015. Panel of monoclonal antibodies to sperm surface proteins as a tool for monitoring localization and identification of sperm–zona pellucida receptors. Cell Tissue Res. 359, 895–908. https://doi.org/10.1007/s00441-014-2072-9

Zigo, M., Manaskova-Postlerova, P., Jonakova, V., Kerns, K., Sutovsky, P., 2019. Compartmentalization of the proteasome-interacting proteins during sperm capacitation. Sci. Rep. 9, 12583. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49024-0

# 9. PŘÍLOHY

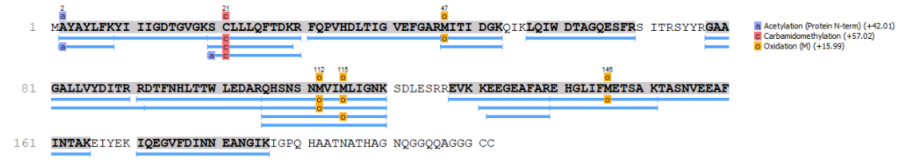
*Následující přílohy jsou výsledky získané z analýzy hmotnostní spektrometrie:*

**P61019|RAB2A_HUMAN**

rab2A

| Protein Coverage | Supporting Peptides |

**Protein Coverage:**




**Supporting Peptides:**

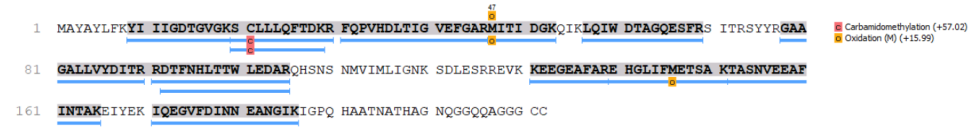
| Peptide | Uniq | -10lgP | Mass | Length | ppm | m/z | z | RT | 1/k0 Range | Fraction | Precursor Id | Source File | Intensity 5C5_2 | #Feature | #Feature 5C5_2 | Start | End | PTM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| K.TASNVEEAFINTAK.E | Y | 122.24 | 1493.7362 | 14 | 2.2 | 747.8710 | 2 | 28.39 | 0.9677-0.9961 | 4 | 13149 | 5C5_2_2142.d | 2.94E4 | 7 | 7 | 152 | 165 | |
| K.LQIWDTAGQESFR.S | N | 121.35 | 1549.7524 | 13 | 3.9 | 775.8803 | 2 | 31.39 | 0.9460-0.9745 | 4 | 16595 | 5C5_2_2142.d | 4.24E4 | 2 | 2 | 57 | 69 | |
| K.IQEGVFDINNEANGIK.I | Y | 110.01 | 1759.8740 | 16 | 3.0 | 880.9399 | 2 | 29.97 | 1.0177-1.0460 | 4 | 14878 | 5C5_2_2142.d | 2.08E4 | 2 | 2 | 171 | 186 | |
| R.EHGLIFM(+15.99)ETSAK.T | N | 108.38 | 1377.6598 | 12 | 2.1 | 689.8331 | 2 | 24.36 | 0.9209-0.9494 | 4 | 9003 | 5C5_2_2142.d | 3.43E4 | 2 | 2 | 140 | 151 | Oxidation (M) |
| R.DTFNHLTTWLEDAR.Q | Y | 105.37 | 1717.8060 | 14 | 1.2 | 859.9044 | 2 | 34.38 | 1.0222-1.0506 | 4 | 19238 | 5C5_2_2142.d | 3.77E4 | 4 | 4 | 92 | 105 | |
| R.EHGLIFMETSAK.T | N | 100.78 | 1361.6649 | 12 | 0.1 | 681.8344 | 2 | 27.95 | 0.9209-0.9494 | 4 | 12637 | 5C5_2_2142.d | 6.31E3 | 2 | 2 | 140 | 151 | |
| R.GAAGALLVYDITR.R | N | 95.94 | 1318.7245 | 13 | 3.8 | 660.3668 | 2 | 34.27 | 0.8912-0.9198 | 4 | 18991 | 5C5_2_2142.d | 3.66E4 | 8 | 8 | 78 | 90 | |
| K.SC(+57.02)LLLQFTDKR.F | N | 92.90 | 1379.7231 | 11 | 0.5 | 690.8636 | 2 | 30.30 | 0.9529-0.9813 | 4 | 15298 | 5C5_2_2142.d | 1.77E4 | 3 | 3 | 20 | 30 | Carbamidomethylation |
| R.RDTFNHLTTWLEDAR.Q | Y | 91.07 | 1873.9071 | 15 | 0.9 | 625.6385 | 3 | 30.83 | 0.8134-0.8420 | 4 | 15958 | 5C5_2_2142.d | 1.29E4 | 3 | 3 | 91 | 105 | |
| R.FQPVHDLTIGVEFGAR.M | N | 90.60 | 1784.9209 | 16 | 0.9 | 595.9767 | 3 | 32.76 | 0.7651-0.7938 | 4 | 17905 | 5C5_2_2142.d | 4.07E3 | 2 | 2 | 31 | 46 | |
| K.SC(+57.02)LLLQFTDK.R | N | 86.50 | 1223.6219 | 10 | 1.6 | 612.8143 | 2 | 33.00 | 0.8695-0.8981 | 4 | 18038 | 5C5_2_2142.d | 8.56E3 | 1 | 1 | 20 | 29 | Carbamidomethylation |
| K.YIIIGDTGVGK.S | N | 86.23 | 1134.6284 | 11 | 2.0 | 568.3181 | 2 | 28.69 | 0.8317-0.8604 | 4 | 13270 | 5C5_2_2142.d | 2.58E4 | 3 | 3 | 9 | 19 | |
| R.QHSNSNM(+15.99)VIM(+15.99)LIGNK.S | Y | 85.62 | 1716.8287 | 15 | 2.3 | 573.2803 | 3 | 25.46 | 0.7927-0.8214 | 4 | 10086 | 5C5_2_2142.d | 3.4E4 | 3 | 3 | 106 | 120 | Oxidation (M) |
| R.QHSNSNM(+15.99)VIMLIGNK.S | Y | 82.64 | 1700.8339 | 15 | 0.0 | 567.9473 | 3 | 27.39 | 0.7950-0.8237 | 4 | 12067 | 5C5_2_2142.d | 6.38E3 | 2 | 2 | 106 | 120 | Oxidation (M) |
| R.QHSNSNMVIM(+15.99)LIGNK.S | Y | 81.70 | 1700.8339 | 15 | 0.8 | 567.9478 | 3 | 29.28 | 0.7869-0.8157 | 4 | 14046 | 5C5_2_2142.d | 1.5E3 | 1 | 1 | 106 | 120 | Oxidation (M) |
| K.KEEGEAFAR.E | Y | 67.69 | 1035.4984 | 9 | 2.2 | 518.7535 | 2 | 16.24 | 0.7800-0.8088 | 4 | 1269 | 5C5_2_2142.d | 2.44E4 | 2 | 2 | 131 | 139 | |
| R.EVKKEEGEAFAR.E | Y | 61.08 | 1391.7045 | 12 | 0.7 | 464.9054 | 3 | 16.27 | 0.7593-0.7881 | 4 | 1408 | 5C5_2_2142.d | 2.65E3 | 2 | 2 | 128 | 139 | |
| R.QHSNSNMVIMLIGNK.S | Y | 56.63 | 1684.8389 | 15 | 1.1 | 562.6163 | 3 | 31.32 | 0.7904-0.8191 | 4 | 16586 | 5C5_2_2142.d | 0 | 0 | 0 | 106 | 120 | |
| R.M(+15.99)ITIDGK.Q | Y | 53.05 | 792.4052 | 7 | 1.4 | 397.2072 | 2 | 20.00 | 0.6832-0.7121 | 4 | 4742 | 5C5_2_2142.d | 2.82E4 | 3 | 3 | 47 | 53 | Oxidation (M) |
| K.EEGEAFAR.E | N | 51.58 | 907.4035 | 8 | 3.6 | 454.7070 | 2 | 18.25 | 0.7455-0.7743 | 4 | 3054 | 5C5_2_2142.d | 5.65E3 | 1 | 1 | 132 | 139 | |
| R.GAAGALLVYDITRR.D | N | 50.29 | 1474.8256 | 14 | 0.3 | 738.4144 | 2 | 32.10 | 0.9893-1.0177 | 4 | 17200 | 5C5_2_2142.d | 1.54E3 | 1 | 1 | 78 | 91 | |
| R.MITIDGK.Q | Y | 45.65 | 776.4102 | 7 | 2.5 | 389.2102 | 2 | 22.94 | 0.7109-0.7398 | 4 | 7710 | 5C5_2_2142.d | 2.38E3 | 1 | 1 | 47 | 53 | |
| M.A(+42.01)YAYLFK.Y | Y | 38.28 | 916.4694 | 7 | -6.1 | 459.2355 | 2 | 38.02 | 0.7754-0.8042 | 4 | 22102 | 5C5_2_2142.d | 0 | 0 | 0 | 2 | 8 | Acetylation (Protein N-term) |
| M.AYAYLFK.Y | Y | 32.70 | 874.4589 | 7 | 3.2 | 438.2346 | 2 | 29.20 | 0.7305-0.7593 | 4 | 14029 | 5C5_2_2142.d | 8.44E2 | 1 | 1 | 2 | 8 | |
| K.S(+42.01)C(+57.02)LLLQFTDKR.F | N | 32.28 | 1421.7336 | 11 | 1.8 | 711.8697 | 2 | 36.85 | 0.9711-0.9995 | 4 | 21322 | 5C5_2_2142.d | 0 | 0 | 0 | 20 | 30 | Acetylation (Protein N-term); Carbamidomethylation |
| **total 25 peptides** | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

**P61019|RAB2A_HUMAN**

rab2A 12/14

| Protein Coverage | Supporting Peptides |

**Protein Coverage:**



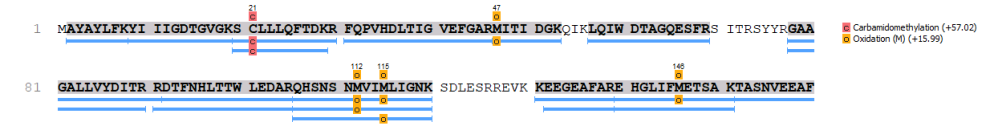

**Supporting Peptides:**

| Peptide | Uniq | -10lgP | Mass | Length | ppm | m/z | z | RT | 1/k0 Range | Fraction | Precursor Id | Source File | Intensity 5C5_1_2141 | #Feature | #Feature 5C5_1_2141 | Start | End | PTM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| K.TASNVEEAFINTAK.E | Y | 88.72 | 1493.7362 | 14 | 0.9 | 747.8702 | 2 | 28.09 | 0.9938-1.0222 | 3 | 19240 | 5C5_1_2141.d | 2.18E3 | 1 | 1 | 152 | 165 | |
| K.LQIWDTAGQESFR.S | N | 87.16 | 1549.7524 | 13 | 1.4 | 775.8785 | 2 | 31.29 | 0.9403-0.9688 | 3 | 25013 | 5C5_1_2141.d | 1.09E3 | 1 | 1 | 57 | 69 | |
| R.GAAGALLVYDITR.R | N | 82.33 | 1318.7245 | 13 | -0.3 | 660.3642 | 2 | 33.99 | 0.9380-0.9665 | 3 | 29407 | 5C5_1_2141.d | 3.81E3 | 2 | 2 | 78 | 90 | |
| R.EHGLIFM(+15.99)ETSAK.T | N | 72.69 | 1377.6598 | 12 | 0.3 | 689.8320 | 2 | 24.06 | 0.9221-0.9506 | 3 | 12881 | 5C5_1_2141.d | 1.05E3 | 1 | 1 | 140 | 151 | Oxidation (M) |
| R.FQPVHDLTIGVEFGAR.M | N | 65.62 | 1784.9209 | 16 | 0.4 | 595.9765 | 3 | 32.51 | 0.7812-0.8099 | 3 | 27242 | 5C5_1_2141.d | 6.66E2 | 2 | 2 | 31 | 46 | |
| K.SC(+57.02)LLLQFTDK.R | N | 55.48 | 1223.6219 | 10 | -0.7 | 612.8130 | 2 | 32.78 | 0.8695-0.8981 | 3 | 27670 | 5C5_1_2141.d | 2.94E2 | 1 | 1 | 20 | 29 | Carbamidomethylation |
| R.DTFNHLTTWLEDAR.Q | Y | 46.68 | 1717.8060 | 14 | -1.0 | 573.6042 | 3 | 34.17 | 0.7697-0.7984 | 3 | 29789 | 5C5_1_2141.d | 1.2E3 | 2 | 2 | 92 | 105 | |
| K.YIIIGDTGVGK.S | N | 42.30 | 1134.6284 | 11 | 2.1 | 568.3182 | 2 | 28.32 | 0.8317-0.8604 | 3 | 19569 | 5C5_1_2141.d | 1.41E3 | 1 | 1 | 9 | 19 | |
| K.SC(+57.02)LLLQFTDKR.F | N | 41.97 | 1379.7231 | 11 | -1.8 | 460.9106 | 3 | 30.09 | 0.7375-0.7662 | 3 | 22840 | 5C5_1_2141.d | 0 | 0 | 0 | 20 | 30 | Carbamidomethylation |
| K.IQEGVFDINNEANGIK.I | Y | 37.06 | 1759.8740 | 16 | 4.9 | 880.9418 | 2 | 29.67 | 1.0018-1.0302 | 3 | 22100 | 5C5_1_2141.d | 0 | 0 | 0 | 171 | 186 | |
| R.RDTFNHLTTWLEDAR.Q | Y | 34.18 | 1873.9071 | 15 | 1.7 | 625.6392 | 3 | 30.73 | 0.8145-0.8432 | 3 | 23996 | 5C5_1_2141.d | 3.11E2 | 1 | 1 | 91 | 105 | |
| K.KEEGEAFAR.E | Y | 29.32 | 1035.4984 | 9 | 0.8 | 518.7529 | 2 | 16.06 | 0.7766-0.8053 | 3 | 2231 | 5C5_1_2141.d | 1.26E3 | 1 | 1 | 131 | 139 | |
| R.M(+15.99)ITIDGK.Q | Y | 28.18 | 792.4052 | 7 | -1.0 | 397.2064 | 2 | 19.98 | 0.6821-0.7109 | 3 | 6892 | 5C5_1_2141.d | 0 | 0 | 0 | 47 | 53 | Oxidation (M) |
| **total 13 peptides** | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

## P61019|RAB2A_HUMAN

| Protein Coverage | Supporting Peptides |

**Protein Coverage:**



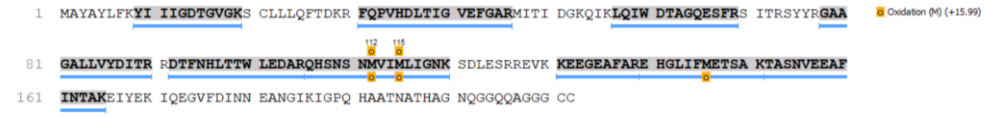

**Supporting Peptides:**

| Peptide | Uniq | -10lgP | Mass | Length | ppm | m/z | z | RT | 1/k0 Range | Fraction | Precursor Id | Source File | Intensity 5C5_3 | #Feature | #Feature 5C5_3 | Start | End | PTM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| K.LQIWDTAGQESFR.S | N | 107.72 | 1549.7524 | 13 | 0.9 | 775.8779 | 2 | 31.69 | 0.9540-0.9825 | 5 | 15464 | 5C5_3_2143.d | 5.48E3 | 2 | 2 | 57 | 69 | |
| K.TASNVEEAFINTAK.E | Y | 106.25 | 1493.7362 | 14 | 1.9 | 747.8707 | 2 | 28.53 | 0.9369-0.9654 | 5 | 12698 | 5C5_3_2143.d | 1.15E4 | 2 | 2 | 152 | 165 | |
| R.FQPVHDLTIGVEFGAR.M | N | 94.67 | 1784.9209 | 16 | 3.2 | 595.9780 | 3 | 32.87 | 0.8329-0.8615 | 5 | 16581 | 5C5_3_2143.d | 3.01E3 | 2 | 2 | 31 | 46 | |
| R.GAAGALLVYDITR.R | N | 93.46 | 1318.7245 | 13 | 1.6 | 660.3652 | 2 | 34.47 | 0.8912-0.9198 | 5 | 17704 | 5C5_3_2143.d | 1.96E4 | 2 | 2 | 78 | 90 | |
| R.EHGLIFM(+15.99)ETSAK.T | N | 85.00 | 1377.6598 | 12 | 2.0 | 689.8329 | 2 | 24.50 | 0.9186-0.9472 | 5 | 8935 | 5C5_3_2143.d | 7.51E3 | 2 | 2 | 140 | 151 | Oxidation (M) |
| K.SC(+57.02)LLQFTDKR.F | N | 83.65 | 1379.7231 | 11 | -3.0 | 690.8612 | 2 | 30.56 | 0.9529-0.9813 | 5 | 14404 | 5C5_3_2143.d | 3.72E3 | 2 | 2 | 20 | 30 | Carbamidomethylation |
| R.EHGLIFMETSAK.T | N | 80.25 | 1361.6649 | 12 | -1.5 | 681.8332 | 2 | 28.14 | 0.9198-0.9483 | 5 | 12323 | 5C5_3_2143.d | 8.02E2 | 1 | 1 | 140 | 151 | |
| K.SC(+57.02)LLQFTDK.R | N | 77.31 | 1223.6219 | 10 | 0.0 | 612.8133 | 2 | 33.20 | 0.8729-0.9015 | 5 | 16808 | 5C5_3_2143.d | 1.91E3 | 1 | 1 | 20 | 29 | Carbamidomethylation |
| K.IQEGVFDINNEANGIK.I | Y | 76.39 | 1759.8740 | 16 | 1.4 | 880.9384 | 2 | 30.15 | 1.0143-1.0426 | 5 | 14019 | 5C5_3_2143.d | 3.06E3 | 1 | 1 | 171 | 186 | |
| R.QHSNSNM(+15.99)VIM(+15.99)LIGNK.S | Y | 72.96 | 1716.8287 | 15 | 1.4 | 573.2797 | 3 | 25.62 | 0.7363-0.7651 | 5 | 9997 | 5C5_3_2143.d | 4.29E3 | 2 | 2 | 106 | 120 | Oxidation (M) |
| R.RDTFNHLTTWLEDAR.Q | Y | 67.82 | 1873.9071 | 15 | 1.3 | 625.6387 | 3 | 31.11 | 0.8145-0.8432 | 5 | 14939 | 5C5_3_2143.d | 1.39E3 | 1 | 1 | 91 | 105 | |
| R.DTFNHLTTWLEDAR.Q | Y | 67.81 | 1717.8060 | 14 | -0.3 | 859.9030 | 2 | 34.66 | 1.0188-1.0472 | 5 | 17904 | 5C5_3_2143.d | 5.84E3 | 2 | 2 | 92 | 105 | |
| K.YIIIGDTGVGK.S | N | 61.96 | 1134.6284 | 11 | 3.2 | 568.3187 | 2 | 28.78 | 0.8283-0.8569 | 5 | 12873 | 5C5_3_2143.d | 7.92E3 | 1 | 1 | 9 | 19 | |
| K.KEEGEAFAR.E | Y | 60.58 | 1035.4984 | 9 | 1.5 | 518.7531 | 2 | 15.90 | 0.7777-0.8065 | 5 | 1371 | 5C5_3_2143.d | 5.98E3 | 1 | 1 | 131 | 139 | |
| R.QHSNSNM(+15.99)VIMLIGNK.S | Y | 51.33 | 1700.8339 | 15 | -0.5 | 567.9470 | 3 | 27.58 | 0.7386-0.7674 | 5 | 11923 | 5C5_3_2143.d | 0 | 0 | 0 | 106 | 120 | Oxidation (M) |
| R.QHSNSNMVIM(+15.99)LIGNK.S | Y | 49.58 | 1700.8339 | 15 | 7.1 | 567.9513 | 3 | 29.41 | 0.7835-0.8122 | 5 | 13511 | 5C5_3_2143.d | 0 | 0 | 0 | 106 | 120 | Oxidation (M) |
| M.AYAYLFK.Y | Y | 46.59 | 874.4589 | 7 | 5.4 | 438.2355 | 2 | 29.32 | 0.7282-0.7570 | 5 | 13438 | 5C5_3_2143.d | 1.8E3 | 1 | 1 | 2 | 8 | |
| R.M(+15.99)ITIDGK.Q | Y | 40.54 | 792.4052 | 7 | 2.6 | 397.2077 | 2 | 19.93 | 0.6832-0.7121 | 5 | 4762 | 5C5_3_2143.d | 2.28E3 | 1 | 1 | 47 | 53 | Oxidation (M) |
| R.GAAGALLVYDITRR.D | N | 35.18 | 1474.8256 | 14 | 5.2 | 738.4179 | 2 | 32.33 | 0.9881-1.0165 | 5 | 16107 | 5C5_3_2143.d | 2.08E2 | 1 | 1 | 78 | 91 | |
| K.EEGEAFAR.E | N | 30.99 | 907.4035 | 8 | 4.5 | 454.7074 | 2 | 18.08 | 0.7386-0.7674 | 5 | 3105 | 5C5_3_2143.d | 7.23E2 | 1 | 1 | 132 | 139 | |
| **total 20 peptides** | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

## P61019|RAB2A_HUMAN

| Protein Coverage | Supporting Peptides |

**Protein Coverage:**




**Supporting Peptides:**

| Peptide | Uniq | -10lgP | Mass | Length | ppm | m/z | z | RT | 1/k0 Range | Fraction | Precursor Id | Source File | Intensity 5C5_4 | #Feature | #Feature 5C5_4 | Start | End | PTM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| K.LQIWDTAGQESFR.S | Y | 87.41 | 1549.7524 | 13 | -0.7 | 775.8766 | 2 | 31.45 | 0.9483-0.9768 | 6 | 16669 | 5C5_4_2144.d | 3.38E2 | 1 | 1 | 57 | 69 | |
| K.TASNVEEAFINTAK.E | Y | 85.98 | 1493.7362 | 14 | 0.6 | 747.8698 | 2 | 28.39 | 0.9380-0.9665 | 6 | 13352 | 5C5_4_2144.d | 1.83E3 | 1 | 1 | 152 | 165 | |
| R.GAAGALLVYDITR.R | Y | 83.68 | 1318.7245 | 13 | -1.3 | 660.3633 | 2 | 34.19 | 0.9346-0.9631 | 6 | 19558 | 5C5_4_2144.d | 2.79E3 | 2 | 2 | 78 | 90 | |
| R.QHSNSNM(+15.99)VIM(+15.99)LIGNK.S | Y | 56.23 | 1716.8287 | 15 | -8.6 | 573.2740 | 3 | 25.56 | 0.7363-0.7651 | 6 | 10652 | 5C5_4_2144.d | 0 | 0 | 0 | 106 | 120 | Oxidation (M) |
| R.FQPVHDLTIGVEFGAR.M | Y | 46.22 | 1784.9209 | 16 | 3.2 | 595.9780 | 3 | 32.64 | 0.7800-0.8088 | 6 | 17899 | 5C5_4_2144.d | 0 | 0 | 0 | 31 | 46 | |
| R.EHGLIFM(+15.99)ETSAK.T | Y | 45.98 | 1377.6598 | 12 | 2.3 | 689.8332 | 2 | 24.32 | 0.9186-0.9472 | 6 | 9361 | 5C5_4_2144.d | 7.47E2 | 1 | 1 | 140 | 151 | Oxidation (M) |
| K.YIIIGDTGVGK.S | Y | 38.22 | 1134.6284 | 11 | 2.2 | 568.3181 | 2 | 28.59 | 0.8294-0.8581 | 6 | 13575 | 5C5_4_2144.d | 0 | 0 | 0 | 9 | 19 | |
| R.DTFNHLTTWLEDAR.Q | Y | 37.69 | 1717.8060 | 14 | 5.3 | 573.6077 | 3 | 34.37 | 0.7685-0.7973 | 6 | 19732 | 5C5_4_2144.d | 7.8E2 | 2 | 2 | 92 | 105 | |
| K.KEEGEAFAR.E | Y | 32.77 | 1035.4984 | 9 | 1.5 | 518.7531 | 2 | 15.80 | 0.7708-0.7996 | 6 | 1381 | 5C5_4_2144.d | 8.71E2 | 1 | 1 | 131 | 139 | |
| **total 9 peptides** | | | | | | | | | | | | | | | | | | |