

3265

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Diplomová práce

**Studium enzymatické aktivity folikulární tekutiny
zralých a nezralých folikulů**

Štěpán Ren

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Jiří Liberda, Ph.D

Konzultant:

RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D

Praha 2009

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Jiřího Liberdy, Ph.D a konzultantky RNDr. Pavly Postlerové, Ph.D, a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 30.4. 2009


.....
podpis

Úvodem své diplomové práce bych rád poděkoval všem, kteří mi vytvořili podmínky pro její vypracování, zejména mému školiteli RNDr. Jiřímu Liberdovi, Ph.D za jeho velkou trpělivost a profesionální pomoc při práci v laboratoři. Dále bych velmi poděkoval RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D za citlivý přístup a odbornou pomoc během mé práce. V neposlední řadě děkuji svým rodičům za důvěru v mé schopnosti a finanční podporu při studiu.

Štěpán Ren

1	ÚVOD	1
1.1	Pohlavní rozmnožování	1
1.2	Samičí pohlavní orgány	1
1.2.1	Vaječníky (<i>ovaria</i>)	1
1.2.2	Vejcovod (<i>tubae uterinae</i>)	1
1.2.3	Děloha (<i>uterus</i>).....	2
1.3	Pohlavní cyklus samic.....	2
1.4	Samčí pohlavní orgány	2
1.4.1	Varlata (<i>testes</i>)	2
1.4.2	Nadvarlata (<i>epididymides</i>)	3
1.4.3	Chámovody (<i>ductus deferentes</i>).....	3
1.4.4	Semenné vaky (<i>glandulae vesiculosae</i>)	3
1.4.5	Předstojná žláza (<i>prostata</i>).....	3
1.4.6	Močová trubice (<i>urethra masculina</i>)	4
1.5	Pohlavní buňky	4
1.5.1	Samičí pohlavní buňky.....	4
1.5.1.1	Zona pellucida.....	5
1.5.2	Samčí pohlavní buňky.....	6
1.6	Reprodukční proces	6
1.6.1	Ovidukální rezervoár.....	6
1.6.2	Kapacitace spermií	7
1.6.3	Oplodnění	8
1.7	Folikulární tekutina	9
1.7.1	Typ a původ folikulární tekutiny.....	10
1.7.2	Složení folikulární tekutiny.....	10
1.8	Enzymy v reprodukci	11
1.8.1	Významné enzymy v samčím reprodukčním traktu.....	11
1.8.2	Významné enzymy v samičím reprodukčním traktu	13
1.9	Cíl práce.....	14
2	MATERIÁL A METODY	15
2.1	Použitý materiál	15
2.1.1	Chemikálie	15

2.1.2	Biologický materiál	17
2.1.3	Další materiál	17
2.2	Izolace folikulární tekutiny z kravských a prasečích folikulů	18
2.3	Stanovení koncentrace proteinů	18
2.3.1	Porovnání hmotnosti zlyofilizovaného vzorků bez a s dialýzou	18
2.3.2	Srážení síranem amonným	19
2.3.3	Stanovení kyselinou bichinoninovou (BCA)	19
2.4	Elektromigrační metody	20
2.4.1	SDS-elektroforesa v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) dle Laemmliho ^[78]	20
2.4.2	2D elektroforesa	22
2.4.2.1	Izoelektrická fokusace jako první rozměr 2D elektroforesy	22
2.4.2.2	SDS-PAGE jako druhý rozměr 2D elektroforesy	23
2.4.3	Vizualizace proteinů po SDS-PAGE	24
2.4.3.1	Barvení Coomassie Brilliant Blue	24
2.4.3.2	Barvení stříbrem	24
2.4.4	Červená nativní elektroforesa v polyakrylamidovém gelu (RN-PAGE) v kontinuálním pufrovém systému	25
2.4.5	Western blot - elektropřenos proteinů na NC-membránu	26
2.5	Detekce glykoproteinů	27
2.5.1	Detekce glykoproteinů v gelu	27
2.5.2	Detekce glykoproteinů a sialových kyselin na nitrocelulosové membráně	28
2.5.3	Interakce proteinů na membráně s biotinem značenými lektiny	30
2.6	Detekce enzymatických aktivit	32
2.6.1	Substrátová zymografie	32
2.6.1.1	Detekce proteolytické aktivity	32
2.6.1.2	Detekce aktivity hyaluronidasy	33
2.6.2	Stanovení aktivity kyselých fosfatasy	34
2.6.3	Detekce enzymatické aktivity glykosidas	34
2.7	Odstranění sérum albuminu a IgG	35
3	VÝSLEDKY	37
3.1	Izolace folikulárních tekutin	37

3.2	Stanovení koncentrace proteinů	37
3.3	Proteinová charakterizace folikulární tekutiny	38
3.3.1	SDS-elektroforesa	38
3.3.2	Odstranění sérum albuminu	40
3.3.3	2D-elektroforesa.....	41
3.3.4	Červená nativní elektroforesa	43
3.4	Detekce glykoproteinů ve folikulárních tekutinách.....	43
3.4.1	Detekce glykoproteinů v gelu	44
3.4.1	Detekce glykoproteinů na nitroceluloseové membráně.....	44
3.4.2	Detekce sacharidových řetězců pomocí lektinů.....	45
3.5	Enzymatická charakteristika folikulárních tekutin	46
3.5.1	Detekce proteolytické aktivity	46
3.5.2	Detekce hyaluronidasové aktivity	47
3.5.3	Detekce specifické aktivity kyselých fosfatasy.....	48
3.5.4	Stanovení specifické aktivity glykosidas ve FF	50
4	DISKUSE.....	53
5	ZÁVĚR	53
6	LITERATURA.....	57

Seznam použitých zkratek

AA	- akrylamid
APS	- persíran amonný
Bis AA	- N, N'-methylen-bisakrylamid
Bis-Tris	- bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BSA	- hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumin)
CBB R-250	- Coomassie Brilliant Blue R-250
CN	- 4-chlor-1-naftol
DMF	- N,N-dimethylformamid
FF	- folikulární tekutina
FSH	- folikuly stimulující hormon
GPI	- glykosylphosphatidyl inositol
HEPES	- 2-[4-(hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonová kyselina
kap.	- kapitola
KN	- vzorky folikulární tekutiny z nezralých kravských folikulů
KZ	- vzorky folikulární tekutiny ze zralých kravských folikulů
Mr	- relativní molekulová hmotnost
NC-membrána	- nitroceluloseová membrána
NHS-biotin	- N-hydroxysukcinimidobiotin
obr.	- obrázek
PA gel	- polyakrylamidový gel
PBS	- fosfátem tlumený fyziologický roztok (z angl. Phosphate-Buffered Saline)
pI	- isoelektrický bod
PN	- vzorky folikulární tekutiny z nezralých prasečích folikulů
PZ	- vzorky folikulární tekutiny ze zralých prasečích folikulů
RN-PAGE	- červená nativní elektroforesa v polyakrylamidovém gelu
SDS	- dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	- SDS-elektroforesa v polyakrylamidovém gelu
St	- standard
str.	- stránka

TEMED - N,N,N',N' - tetramethylethylendiamin
Tris - tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ZP - zona pellucida

1 ÚVOD

1.1 Pohlavní rozmnožování

Rozmnožovací schopnost patří mezi nejdůležitější procesy u všech živých organismů. Umožňuje živým organismům zvyšovat počet jedinců svého druhu a vyvíjet se. Je to tedy vlastnost, která umožňuje zachování jednotlivých druhů a časovou kontinuitu života [1].

Savci se rozmnožují pohlavně. Při pohlavním rozmnožování se vytvářejí specializované pohlavní buňky (haploidní gamety), samičí vajíčko a samčí spermie, které splývají v diploidní zygotu [2].

1.2 Samičí pohlavní orgány

1.2.1 Vaječníky (*ovaria*)

Vaječníky jsou párové pohlavní žlázy samice. Mají zploštělý tvar a velikost okolo 4-5 cm. Vaječníky jsou uloženy v pánevní dutině, zavěšeny na dvojitým listu pobřišnice (*mesovariu*). Vaječník je tvořen zárodečným epitelem, tuhým vazivem (*tunica albuginea ovarii*) a kůrou (*cortex ovarii*), ve které se nalézají folikuly v různém stupni vývoje. Zcela ve středu orgánu je dřev (*medulla ovarii*) se svazky krevních i mízních cév, nervů a snopců hladké svaloviny. Hlavní funkce vaječnicků jsou tvorba pohlavních buněk a syntéza samičích pohlavních hormonů (estrogeny, progesteron) [1, 2].

1.2.2 Vejcovod (*tubae uterinae*)

Vejcovod je párová nálevkovitá trubice z hladké svaloviny, která zajišťuje transport vajíčka po ovulaci směrem k děloze. Vejcovod má dvě ústí, jedno do dělohy (*cavitas uteri*) a druhé do dutiny břišní (*ostium abdominale tubae uterinae*). Vejcovod, stejně jako vaječníky, jsou fixovány pomocí pobřišnicové duplikatury (*mesosalpinxu*). Vnitřek vejcovodu pokrývá sliznice, která je zřasená a tvoří tak hustý labyrint. K oplození vajíčka spermií dochází zpravidla v ampulární části vejcovodu [1, 2].

1.2.3 Děloha (*uterus*)

Děloha je nepárový dutý orgán hruškovitého tvaru a je členěna na tělo (*corpus uteri*), úžinu děložní (*isthmus uteri*) a hrdlo děložní (*cervix uteri*). Do dutiny děložní (*cavitas uteri*) ústí shora vejcovody skrz děložní rohy. Ve spodní oblasti děložního hrdla přechází děloha do pochvy; zaoblený úsek, který vyčnívá do pochvy, označujeme jako děložní čípek (*portio vaginalis cervicis*). Na stavbě děložní stěny se podílejí 3 vrstvy: endometrium, myometrium a perimetrium [1, 2].

1.3 Pohlavní cyklus samic

Vnější projevem ovulace je říje (*estrus*), projevující se navenek neklidem samice a ochotou přijmout samce. Vlivem estrogenů dochází k prokrvení a otoku patrném na vulvě, otevírá se děložní krček a vytéká hlen zpočátku čirý, později zakrvavený. Kromě změn na pohlavním ústrojí je možno pozorovat řadu dalších změn – mění se složení krve, množství i kvalita mléka (u dojných krav) [3].

Období mezi říjemi je říjový cyklus (pohlavní cyklus). Skot patří mezi polyestrický druh zvířat, tzn. výskyt říje u jedince vícekrát za rok.

Fáze pohlavního cyklu samic je možné shrnout následujícím způsobem:

1. Proestrus – období přípravy k říji trvající asi 3 dny;
2. Estrus (říje) – období vlastní říje trvající 1 – 2 dny charakterizované typickými změnami na vývodních cestách pohlavních orgánů a projevem říjového chování (otevření děložního krčku, uvolňování a výtok hlenu z pochvy, ovulace, v chování samice se projevuje výrazné pohlavní vzrušení a ochota k páření);
3. Metestrus – poříjová období zklidňovací trvající asi 4 dny, vznik žlutého tělíska;
4. Diestrus – meziříjová období klidu. Pokud došlo k oplození, přetrvává žluté tělísko, což u polyestrických zvířat způsobí růst nového folikulu a začíná nový cyklus [3].

1.4 Samčí pohlavní orgány

1.4.1 Varlata (*testes*)

Varlata jsou samčí párovou pohlavní žlázou. Jejich hlavní funkcí je tvorba spermií a syntéza samčích pohlavních hormonů (testosteron). Na povrchu varlete je vrstva z tuhého

vaziva (*tunica albuginea testis*). Uvnitř se nachází vazivem separovaný prostor na malé lalůčky, kterými prochází řada stočených kanálků. V nich probíhá vlastní tvorba spermií. Kanálky se spojují do větších kanálů, které vyúsťují do nadvarlete [1, 2].

1.4.2 Nadvarlata (*epididymides*)

Nadvarle je párový orgán protáhlého tvaru. Rozlišujeme 3 části nadvarlat, hlava, tělo a ocas nadvarlete (*caput, corpus et cauda epididymidis*). Do nadvarlete jsou přesouvány spermie z varlete, aby zde dozrály a získaly patřičnou schopnost pohybu. Pokud nejsou nahromaděné spermie odvedeny do chámovodu při ejakulaci, po určité době se rozpadnou a resorbují [1, 2].

1.4.3 Chámovody (*ductus deferentes*)

Chámovod je párová svalová trubice, navazující na koncovou část nadvarlete. Jeho funkce zahrnuje odvádění spermií z šourku skrze tříselný kanál (*canalis inguinalis*) do dutiny břišní. Zde ústí do močové trubice. Spolu s nervy, cévami (krevní i mízní) a svalovou tkání (*musculus cremaster*) vytváří chámovod útvar zvaný provazec semenný (*funiculus spermaticus*). Ten je zachován až do průchodu tříselným kanálem [1, 2].

1.4.4 Semenné vaky (*glandulae vesiculosae*)

Měchýřkové žlázy jsou párové žlázy umístěné za prostatou na zadní straně močového měchýře. Tyto žlázy ústí do chámovodu, kam přivádějí vlastní alkalický sekret bohatý na proteiny a fruktosu. Ten se dále mísí se sekretem nadvarlete a se spermiemi [1, 2].

1.4.5 Předstojná žláza (*prostata*)

Nepárová předstojná žláza je uložena těsně pod močovým měchýřem. Předstojnou žlázou prochází močová trubice (*urethra*), do které v těle žlázy vyúsťují oba chámovody. Vlastní žlázkové tělo jsou umístěny v robustním svalově-vazivovém těle orgánu. Prostata obohacuje ejakulát o několik dalších látek [1, 2].

1.4.6 Močová trubice (*urethra masculina*)

Část močové trubice u muže zastává funkci pohlavní cesty. Močová trubice začíná ve spodní části močového měchýře. Dále prochází prostatou, skrze svalovinu dna pánevního a proniká do nepárového topořivého tělesa penisu, na jehož konci ústí [1, 2].

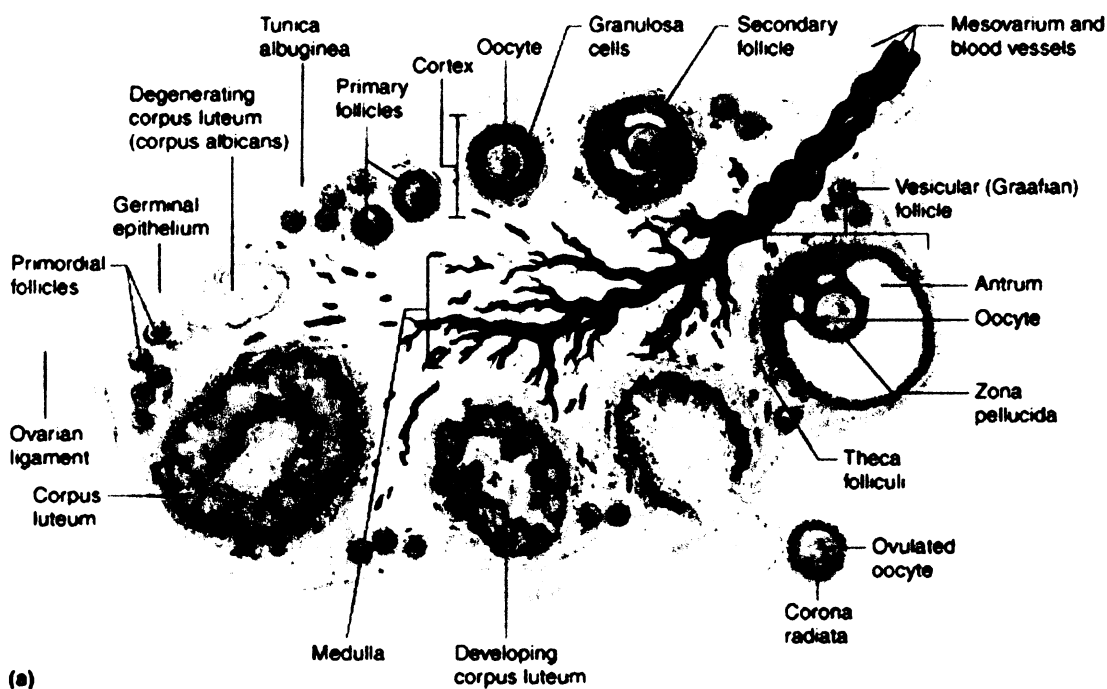
1.5 Pohlavní buňky

Vznik obou pohlavních buněk se obecně nazývá gametogeneze. Pohlavní buňky savců se tvoří z prapohlavních buněk, které se diferencují ze somatických buněk již při rýhování vajíčka a putují do gonád během zárodečného vývoje jedince. Vývoj pohlavních buněk a tvorba pohlavních hormonů je řízena gonadotropními hormony z adenohypofýzy [1, 4].

1.5.1 Samičí pohlavní buňky

Samičí pohlavní buňky - vajíčka (*oocyty*) vznikají a vyvíjejí se ve vaječnicích. U savců hovoříme o tzv. folikulárním typu vývoje, kdy úlohu zásobování oocyty přebírají buňky vaječniku a vytvářejí kolem něj epitelový váček – folikul. S vývojem vajíčka prodělává změny i folikul (*obr. 1, str. 5*). Zralý folikul s vajíčkem připraveným k ovulaci se nazývá Graafův folikul [1]. Po jeho prasknutí jsou vajíčka, spolu s kumulárními buňkami uchycenými k vajíčku vysokomolekulární kyselinou hyaluronovou, zachycena v ampule vejcovodu [5].

Vajíčko se zastaveným vývojem v metafázi II. meiotického dělení sekretuje glykoproteinový obal zvaný *zona pellucida*. Ovulované vajíčko, vstupující do oviduktu, je obklopeno *zona pellucida* a kumulárními buňkami. Vnější buněčný obal, *cumulus oophorus*, je tvořen folikulárními (kumulárními) buňkami obklopenými extracelulární matrix, která je složena převážně z kyseliny hyaluronové. Mezi plasmatickou membránou vajíčka a *zona pellucida* je periviteliní prostor vyplněný folikulární tekutinou obsahující proteiny, sacharidy, volné aminokyseliny, glykosaminoglykany, steroidy a enzymy (hyaluronidasu, kolagenasu, transaminasu, kyselou fosfatasu) [5, 6].



obr. 1: Folikulární typ vývoje [7]

1.5.1.1 Zona pellucida

Zona pellucida hraje důležitou roli v procesu rozmnožování [8, 9, 10]. *Zona pellucida* (ZP) je pružná, 2-25 μm silná extracelulární glykoproteinová síť, syntetizovaná a sekretovaná rostoucím oocytem, a u některých druhů také granulosoými buňkami folikulu. Savčí ZP obvykle tvoří 2-4 glykoproteinové rodiny [8]. Dobře byla její struktura a funkce prozkoumána u myši. Bylo zjištěno, že glykoproteiny ZP3 (120 kDa) a ZP2 (83 kDa) tvoří fibrilární strukturu opakujících se heterodimerů. Tyto filameny jsou vzájemně propojeny disulfidově spojeným homodimerem ZP1 (200 kDa). Všechny tři ZP glykoproteiny drží pohromadě nekovalentními vazbami [11].

U prasečího modelu byly nalezeny 2 glykoproteinové rodiny ZP: 90K (60-65 kDa a 20-25 kDa proteiny) a 55K (pZP3). pZP3 tvoří 80% glykoproteinového podílu *zona pellucida* a obsahuje 2 odlišné polypeptidy: pZP3 α a pZP3 β [12]. U kravského modelu byly detekovány 4 glykoproteinové rodiny bZP1, bZP2, bZP3 a bZP4 [13]. Podobně jako u prasečího modelu bylo prokázáno, že vazby se spermií se pravděpodobně účastní ZP3 glykoprotein [12, 13].

Tyto glykoproteiny obsahují O- i N-glykosidicky vázané oligosacharidy. Cukerné složky nesou záporně nabitě sulfátové a karboxylové skupiny, které jsou důležité pro vzájemné rozpoznávání gamet [11].

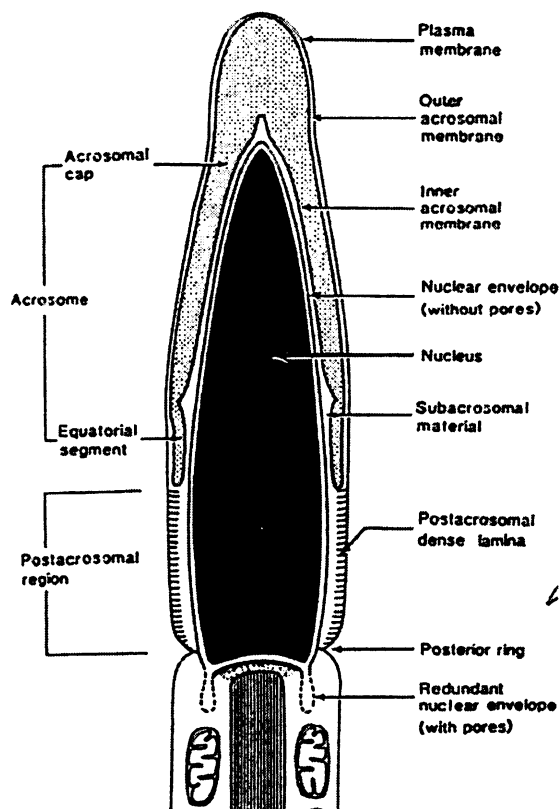
1.5.2 Samčí pohlavní buňky

Samčí pohlavní buňky se vyvíjejí v semenných kanálcích varlete ze zárodečného epitelu.

Hotová spermie je tvořena hlavičkou (*obr. 2*), spojovací částí (krčkem), střední částí a bičíkem. Část hlavičky je tvořena akrosomem (velká sekreční granule). Akrosom obsahuje enzymy štěpící glykosaminoglykany a proteolytické enzymy nezbytné při fertilizaci. Jádro spermie je haploidní. Ve střední části spermie jsou shromážděny spirálovitě stočené mitochondrie [1].

Spermie po svém vývoji ve varleti není schopná oplodnit vajíčko. Tuto schopnost získává při průchodu nadvarletem (*epididymem*). Tento proces se nazývá epididymální maturace – zrání spermie. Největší změny prodělává plasmatická membrána spermie. Některé proteiny pocházející z testes jsou zaměňovány za proteiny z epididymální tekutiny nebo jsou různým způsobem modifikovány [5, 14, 15].

Je známo, že semenná plasma má na spermie prokazatelně dekapacitační účinek. Dekapacitované ejakulované spermie nejsou schopny oplodnit vajíčko. K jejich rekapacitaci dochází v samičím pohlavním traktu [5, 14, 15].



obr. 2: Stavba hlavičky spermie [5]

1.6 Reprodukční proces

1.6.1 Oviduktální rezervoár

Při putování samičím reprodukčním traktem jsou spermie zachyceny v isthmické části vejcovodu pomocí interakce se sacharidovými strukturami epitelu oviduktu. Takto zachycené spermie tvoří tzv. oviduktální rezervoár, který je umožněn interakcí proteinového povrchu spermií s glykokonjugáty oviduktálního epitelu [16].

Schopnost spermie reagovat s oviduktálními glykokonjugáty se během fertilizačního procesu mění, pravděpodobně díky změnám plasmatické membrány spermie, změnám proteinového pláště spermie a přítomnosti inhibičních, resp. aktivačních faktorů nebo enzymů v oviduktální tekutině. Tato interakce se může druhově lišit [17]. U býků se tvorby oviduktálního rezervoáru pravděpodobně účastní protein PDC-109 vázaný na povrchu spermie a oligosacharidové řetězce epitelu oviduktu obsahující fukosylové struktury [18, 19]. U prasete se této interakce s největší pravděpodobností účastní AQN 1 spermadhesin, který je schopen vázat galaktosylové a manosylové struktury přítomné na oviduktálním epitelu [20, 21]. Spermie mohou být v oviduktálním rezervoáru vázány hodiny až dny a jsou tak chráněny před degradací. Tím je udržována jejich fertilizační aktivita [22]. Impulsem pro uvolnění spermií z rezervoáru je ovulace vajíčka. Funkcí rezervoáru je jednak oddálení kapacity a tím synchronizace s ovulací vajíčka, dále zabránění polyspermie [5, 23], ale také selekce oplození schopných spermií [24].

1.6.2 Kapacitace spermií

Kapacitace je proces, který v sobě zahrnuje veškeré změny, které spermie prodělává při průchodu samičím reprodukčním traktem [25]. Tyto změny jsou reversibilní a zahrnují především odstranění a modulaci proteinového pláště spermií, případně adsorpci produktů samičího reprodukčního traktu. Při ejakulaci se na povrch spermie váží proteiny (dekapacitační faktory), které jsou v samičím traktu odstraňovány a jsou tak odkrývány receptory pro rozpoznávání a vazbu spermie se *zona pellucida*. Dochází k přeskupení domén plasmatické membrány a je odstraňován cholesterol z povrchu spermií, čímž se sníží rigidita membrány a tím je usnadněna následná akrosomální reakce [26]. Ejakulované spermie, které neprošly kapacitací, nejsou schopny oplodnit vajíčko [27].

Kapacitované spermie ztrácejí afinitu k epitelu oviduktu a jsou tak uvolňovány z oviduktálního rezervoáru. Jejich uvolňování napomáhá i hyperaktivace spermií. Hyperaktivace motility je způsob pohybu bičíku spermie, druhově specifický, který umožňuje snazší průchod glykoproteiny *zona pellucida* oocytu. Hyperaktivované spermie také snáze a rychleji pronikají viskózním prostředím kumulárních buněk v okolí ovulovaného oocytu [28].

1.6.3 Oplodnění

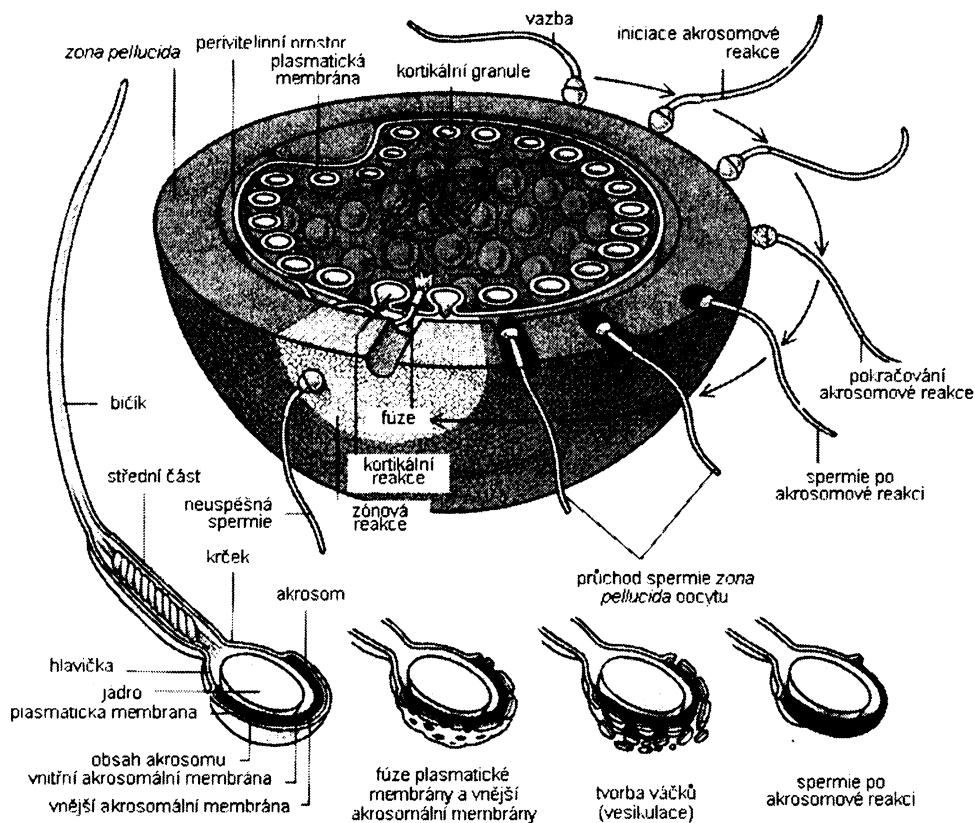
Při interakci oocytu a spermie daného živočišného druhu ve správný čas a na správném místě dochází k oplodnění (fertilizaci). Fertilizace zahrnuje několik dějů (*obr. 3, str. 9*). Prvním úkolem kapacitované spermie je průnik kumulárním matrix. Poté dochází k primární vazbě spermie na *zona pellucida* oocytu, a to vazbou lektinového typu, kdy interagují povrchové proteiny spermie se sacharidovými zbytky glykoproteinů *zona pellucida*. Tato vazba přes určité signální mechanismy spouští akrosomovou reakci, která uvolní enzymy obsažené v akrosomu, aby usnadnily průchod spermie *zona pellucida* [5].

Akrosomová reakce zahrnuje mnohonásobnou fúzi vnější akrosomové membrány a plasmatické membrány spermie, následuje vylití obsahu akrosomu přes porušenou membránu. Akrosom je membránová struktura v hlavičce spermie, která obsahuje velké množství hydrolytických enzymů. Některé z těchto enzymů se běžně vyskytují v lysozomech, jiné enzymy jsou specifické pro spermie (akrosin, kyselá fosfatasa, β -galaktosidasa, hyaluronidasa, neuraminidasa, fosfolipasa atd.) [5, 14, 15].

Poté dochází k sekundárnímu kontaktu gamet, který je zprostředkován molekulami na vnitřní akrosomální membráně spermie a *zona pellucida* oocytu. Po průchodu *zona pellucida* plasmatická membrána spermie (konkrétně její ekvatoriální segment) splyne s plasmatickou membránou oocytu. Tím je iniciována kortikální reakce, aby bylo zabráněno vstupu dalších spermií do oocytu [5].

Kortikální reakce je pravděpodobně zprostředkována signalizační kaskádou přes fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát. Fúze spermie a oocytu aktivuje tzv. druhé posly inositol trifosfát a diacylglycerol. Dochází k uvolnění Ca^{2+} iontů z intracelulárních zásob a následně dochází k aktivaci proteinkinasy C. To způsobí fúzi membrány oocytu s membránou kortikálních granulí a vylití jejich obsahu do perivitelinního prostoru. Enzymy obsažené v kortikálních granulích (proteasy, ovoperoxidasa a N-acetylglokosaminidasa) způsobují změny na *zona pellucida* (zónová reakce). Ta se tak stává rigidnější a brání průniku dalších spermií do oocytu (blok polyspermie). Zbránění polyspermie je způsobeno jednak zónovou reakcí, dále změnami na oolemě a vytvořením nové vrstvy z obsahu kortikálních granulí [5].

V poslední fázi dojde ke splynutí jader obou gamet a vzniku zygoty – počátku nového jedince [5].



obr. 3: Průběh oplodnění (nahore) a akrosomové reakce (ve spodní části) na myším modelu (upraveno podle [9])

1.7 Folikulární tekutina

Folikulární tekutina (FF) je viskózní nažloutlá tekutina, která se akumuluje v extracelulárním prostoru ovariálních folikulů. V prvních fázích růstu folikulu se nejprve vytváří tekutina mezi granulárními buňkami. Jak se granulární buňky dělí, zvyšuje se také produkce a akumulace tekutiny. Tímto procesem se vytváří folikulární dutina, antrum. Celý proces proliferace granulárních buněk a akumulace folikulární tekutiny v antru je řízen FSH a estrogény. Dochází k neustálému zvyšování objemu tekutiny v antru a k růstu folikulu. V této fázi vývoje folikulu je patrný mezidruhový rozdíl ve velikosti folikulární dutiny [29, 30]. Složení folikulární tekutiny ovlivňuje folikulární steroidogenezi, maturaci oocyty, ovulaci a transport oocyty do oviduktu [30]. FF je také připisována funkce chemoatraktantu pro spermie [31]. Jednou z molekul, které jsou přítomny ve FF a mohou jako chemoatraktant sloužit, je progesteron [32]. Nízkomolekulární peptidy s chemoatraktivním účinkem byly nalezeny ve FF prasat a lidí [33, 34]. Byl také popsán

pozitivní vliv FF na motilitu, kapacitaci a s tím následně spojenou akrosomovou reakci u lidských spermií [35].

1.7.1 Typ a původ folikulární tekutiny

Na základně původu rozdělujeme FF na primární, sekundární a terciární. Primární FF je sekretovaná granulárními buňkami a je viskózní. Sekundární FF se nachází v antru těsně před ovulací, kdy dochází k expanzi buněk folikulární dutiny. Původem je tato FF z periferní plazmy. Terciární FF obsahuje zvýšenou koncentraci leukocytů a zbytky folikulu po ovulaci a ruptuře folikulu. Dosavadní výzkumy prokázaly, že všechny tři typy FF jsou metabolicky aktivní [36].

1.7.2 Složení folikulární tekutiny

Folikulární tekutina obsahuje především proteiny, aminokyseliny, cukry, enzymy, mukopolysacharidy, gonadotropiny, steroidy, soli atd. [37].

Proteinové složení FF je podobné plazmě. Proteiny FF jsou převážně nízkomolekulární a svůj původ mají v cévním systému a do FF se dostávají přes folikulární laminu. Některé látky jsou do FF transportovány z lokálních buněk. Granulární buňky mají biosyntetický potenciál a sekretují do FF enzymy, proteiny a mukopolysacharidy [37]. Koncentrace proteinů FF se pohybuje okolo 58 mg/ml, ale může dosahovat i vyšších hodnot v závislosti na různých faktorech, především však mezidruhových rozdílech. Pokles koncentrace proteinů nastává při zrání a růstu folikulu [38]. Koncentrace albuminu a β -globulinů bývají vyšší oproti plazmě, kdežto IgA, IgG, fibrinogen a α - a γ -globuliny mají ve FF nižší koncentraci než v plazmě [39]. Ve FF lze detekovat různé spektrum aminokyselin, především však Asp, Thr, Glu, Gln, Gly, Ala a Met, a to v podobných koncentracích jako v plazmě [38]. FF obsahuje velké množství enzymů (proteasy, peptidasy, hydrolasy), jejichž koncentrace se může měnit v průběhu zrání folikulu [37]. Byla zjištěna přítomnost pouze několika cukrů ve FF. Hlavním cukrem je glukosa, která tvoří až 80% z celkové koncentrace cukrů ve FF [39]. Dále byly ve FF zjištěny tyto látky: kyselina mléčná, sialové kyseliny, kyselina citrónová, cholesterol a fukosa [40].

1.8 Enzymy v reprodukci

Savčí reprodukce zahrnuje děje, které jsou založeny na vzájemných interakcích nejen mezi gametami, ale i molekulami na povrchu spermie a látkami přítomnými v samčím a samičím pohlavním traktu. Většina interakcí v reprodukčním procesu je založena na vazbě protein-sacharid, jako je tvorba oviduktálního rezervoáru spermií či rozpoznání a vazba spermie na *zona pellucida* vajíčka. Během těchto dějů jde o vazbu proteinu přítomného na povrchu spermie k sacharidovým složkám glykoproteinů oviduktálního epitelu či glykoproteinového obalu vajíčka [5, 41-43]. Spermie je během průchodu samčím i samičím reprodukčním traktem vystavena působení reprodukčních tekutin, které mají přímý vliv na proteiny a glykoproteiny na jejím povrchu. Enzymy (proteasy a glykosidasy) přítomné v epididymální tekutině mohou upravovat molekuly na povrchu spermie během jejich průchodu epididymem. Takové maturační změny byly popsány u několika proteinů spermie u různých savčích druhů (manosidasa, fertilin, zonadhesin, gACE) [44-47]. Během maturace v epididymu se mění také lektin-vázající vlastnosti povrchu spermií, což je přičítáno aktivitě glykosidas a glykosyltransferas v epididymální tekutině [5, 48, 49]. Glykosidasy nalezené v oviduktální tekutině mohou mít vliv na sacharidovou složku glykoproteinů na povrchu spermie během kapacitace, popřípadě mohou ovlivňovat následnou interakci spermií k *zona pellucida* vajíčka. Během kapacitace býčích spermií *in vitro* pomocí oviduktální tekutiny došlo k redukci některých lektin-vázajících míst na spermii. Tyto modifikace mohou být zásadní pro následné fertilizační kroky [50]. Navíc zvýšená aktivita některých glykosidas a glykosyltransferas v oviduktální tekutině, během luteální fáze hormonálního cyklu samice, by mohla naznačovat jejich významnou roli v modifikaci povrchu buněk a regulaci vazby spermie k oviduktálnímu epitelu [51-54].

1.8.1 Významné enzymy v samčím reprodukčním traktu

V samčím reprodukčním traktu u různých druhů savců se proteasy vyskytují jednak v akrosomu spermie, dále v epididymis a v testes. Proteolytická aktivita v semenné plasmě je u většiny druhů savců malá. Výjimku představuje semenná plasma lidská, kde byly nalezeny proteasy pocházející z prostaty patřící do rodiny kallikreinů [55]. Byly popsány enzymy s proteolytickou aktivitou produkované testes, které se mohou účastnit regulace vývoje spermie nebo jsou zabudovávány do jejich plasmatické membrány (ADAM – proteiny s disintegrinovou a metaloproteasovou doménou, MMPs – matrixové

metaloproteasy). Hlavní funkcí proteas, přítomných v epididymální tekutině, je modifikace povrchových proteinů spermií během jejich průchodu epididymem [56].

Akrosin (EC 3.4.21.10.) patří mezi nejvíce prostudované proteasy akrosomu savčí spermie. Je to bazická serinová proteasa. Akrosinu jsou přisuzovány dvě základní funkce v průběhu fertilizace a to sekundární vazba spermie na *zona pellucida* a napomáhání při průniku spermie *zona pellucida* oocytu [57]. Vyskytuje se v inaktivním stavu jako zymogen proakrosin v akrosomu savčích spermií. Během akrosomové reakce dochází k jeho autoaktivaci [58].

Při lidské reprodukci se vedle serinové proteasy akrosinu (trypsin-like) uplatňují i další důležité proteasy patřící do kallikreinové rodiny (hK1, hK2, PSA) [51]. Prostatický specifický antigen (PSA) je proteasa produkovaná prostatou a byl nalezen v lidské semenné plasmě. Biologická funkce žláзовého kallikreinu 2 (hK2) a PSA spočívá v štěpení dominantního proteinu lidských semenných vaků semenogelinu I a II (Sg I, II) [59, 60]. Po ejakulaci Sg I, II vytváří nekovalentní komplex – koagulum, znehybňující spermie v ejakulátu. Po jeho štěpení pomocí PSA a hK2 dochází k ztekucení a uvolnění spermie se pohybují rychleji. Existuje hypotéza, že fragmenty Sg I, II působí jako aktivátory motility spermií [61].

Mezi další významné enzymy v samčím reprodukčním traktu patří prostatická kyselá fosfatasa (PAP), která je nejvíce zastoupenou fosfatasou v lidské prostatické tekutině. PAP je glykoprotein (Mr 102 000) se 7% sacharidové složky a je primárně tvořena v epiteliálních buňkách prostaty. Aktivita PAP v lidské semenné plasmě je až 200x vyšší než v jiných orgánech [62, 63]. PAP hydrolyzuje široké spektrum fosfomonoesterů s pH optimem v rozmezí 3-5. Přírodním substrátem pro PAP je fosforylcholinofosfát. Stanovení aktivity PAP je používáno jako diagnostický marker pro detekci rakoviny prostaty [64, 65]. U mužů postižených asthenospermií (méně než 40% spermií je pohyblivých) nacházíme v semenné plasmě vyšší hladinu PAP [66, 67].

Mezi nejvýznamnější glykosidasy nalezené v samčím pohlavním traktu, konkrétně v epididymální tekutině, patří hyaluronidasa, α - a β -manosidasa, α - a β -glukosidasa, β -glukuronidasa, α - a β -galaktosidasa a N-acetylhexosaminidasa. Těmto enzymům se přisuzuje role při opracovávání povrchu spermie během jejich průchodu epididymem [14].

Hyaluronidasa patří mezi významné enzymy savčí spermie a byla nalezena u spermií mnoha savčích druhů. Bývá označována jako SPAM 1 (Sperm Adhesion Molecule) a jde o GPI-ukotvený (glykosylphosphatidyl inositol) protein v membráně spermie.

Membránově vázaná forma hyaluronidasy byla nalezena nejen na povrchu spermií, ale i na vnitřní akrosomové membráně po akrosomální reakci. Vedle této nerozpustné formy enzymu byla u spermií dokázána přítomnost rozpustné formy hyaluronidasy [68-71]. Ze studií membránově vázaného SPAM 1 proteinu u různých živočišných druhů vyplynulo, že se jedná o multifunkční protein. Byly navrženy tři funkce tohoto proteinu:

1) První funkce je hyaluronidasová aktivita membránově vázaného (SPAM 1) proteinu, která usnadňuje penetraci spermií extracelulární matrix obsahující kyselinu hyaluronovou [72].

2) Druhá funkce SPAM 1 proteinu souvisí se zvýšením intracelulární hladiny Ca^{2+} , které doprovází akrosomální exocytosu [73].

3) Třetí funkce SPAM 1 proteinu má spojitost se sekundárním vazebným kontaktem, který nastává po akrosomové reakci, a se schopností pronikat *zona pellucida* [72, 73].

Stanovení aktivity hyaluronidasy v semenné plasmě sloužilo jako index pro sledování vlivu vnějších faktorů na poškození akrosomální membrány kančích spermií [74] nebo jako parametr charakterizující fertilizační schopnost lidského ejakulátu [75].

1.8.2 Významné enzymy v samičím reprodukčním traktu

Ve folikulární tekutině byly nalezeny lysozomální enzymy jako hyaluronidasa, endopeptidasy a kolagenasa, které napomáhají ovulaci a prasknutí folikulu depolymerizací mukopolysacharidů buněk stěny folikulu [38].

Metaloproteasy a jejich inhibitory byly nalezeny v oviduktální a folikulární tekutině. Pravděpodobně hrají důležitou roli v přípravě prostředí v oviduktu během fertilizace a embryonálního vývoje [76]. Metaloproteasam ve folikulární tekutině je připisována aktivita při remodelaci tkáně [77]. Dále byly ve folikulární tekutině nalezeny endopeptidasy, aminopeptidasy a dipeptidasy. Aktivita proteas a peptidas ve FF zdravých folikulů je vyšší než folikulů s cystickou fibrosou [38].

V oviduktální tekutině prasnic a krav byly nalezeny tyto glykosidasy: α -L-fukosidasa, β -D-galaktosidasa, α -D-manosidasa, β -D-manosidasa, β -N-acetyl-galaktosaminidasa a β -N-acetyl-glukosaminidasa. Během luteální fáze hormonálního cyklu samic byla určena vyšší aktivita některých z těchto enzymů. Odhaduje se, že mají vliv na interakci mezi spermií a epitelem oviduktu a dále při rozpoznávacím procesu obou gamet při oplodnění [53, 54].

Ve folikulární tekutině byly nalezeny enzymy s intracelulární funkcí (aminotransferasy, fosfatasy, esterasy a dehydrogenasy), které pravděpodobně pochází z poškozených buněk folikulu [36].

1.9 Cíl práce

Folikulární tekutina je významnou tělní tekutinou, která přímo ovlivňuje vývoj a zrání vajíčka ve folikulu v samičích ovarích. Po ovulaci putují složky této tekutiny spolu s vajíčkem oviduktem a pravděpodobně ovlivňují jak prostředí lumen oviduktu, což může vést např. k uvolnění spermií z oviduktálního rezervoáru z istmu oviduktu, tak případnou taxi spermie k vajíčku, popřípadě interakci spermie s vajíčkem. Biochemické složení této tekutiny není zcela detailně prozkoumáno.

Cílem předkládané práce byla biochemická charakterizace folikulární tekutiny ze zralých a nezralých folikulů prasnice a krávy se zaměřením na detekci a stanovení enzymatických aktivit. Zaměřili jsme se na tyto jednotlivé cíle:

1. Izolace folikulární tekutiny (FF).
2. Stanovení koncentrace proteinů ve FF.
3. Proteinová a biochemická charakterizace FF pomocí SDS-PAGE (1D) a 2D elektroforesy, detekce glykoproteinů a sacharidových řetězců pomocí lektinů.
4. Detekce proteolytických aktivit a hyaluronidasové aktivity ve FF pomocí zymografických metod.
5. Stanovení aktivity kyselých fosfatasy a specifických aktivit vybraných glykosidas ve FF.

2 Materiál a metody

2.1 Použitý materiál

2.1.1 Chemikálie

1-N-acetyl-P-D-galaktosamin	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
akrylamid (AA)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
amfolytů-IPG	- GE Healthcare, Uppsala, Švédsko
avidin značený křenovou peroxidasou	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
benzamidin-hydrochlorid	- Fluka, Buchs, Švýcarsko
bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)- methan (BIS-Tris)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
bovine serum albumin (BSA)	- Imuna, Šarišské Michaľany, SR
bromfenolová modř	- Lachema, Brno, ČR
Coomassie brilliant blue R-250 (CBB R-250)	- Serva, Heidelberg, Německo
4-chlor-1-naftol	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1- propansulfonát (CHAPS)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
dihydrogenfosforečnan sodný	- Lachema, Brno, ČR
dithiothreitol (DDT)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
dodecylsulfát sodný (SDS)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
dusičnan stříbrný	- Lachema, Brno, ČR
formaldehyd	- Lachema, Brno, ČR
gelatine from porcine skin (želatina)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
glycerol	- Lachema, Brno, ČR
glycin	- Reanal, Budapešť, Maďarsko
hyaluronan (HA)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
hydrogenfosforečnan sodný	- Lachema, Brno, ČR
hydrogenuhličitan amonný	- Lachema, Brno, ČR

hydrogenuhličitan sodný	- Lachema, Brno, ČR
hydroxid sodný	- Lachema, Brno, ČR
2-[4-(hydroxyethyl)-1-piperaziny]ethansulfonová kyselina (HEPES)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
chlorid kobaltnatý	- Lachema, Brno, ČR
chlorid sodný	- Lachema, Brno, ČR
chlorid vápenatý	- Fluka, Buchs, Švýcarsko
IPG pufr pH 3-10	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
jodacetamid	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
kyselina citrónová	- Lachema, Brno, ČR
kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	- Serva, Heidelberg, Německo
kyselina hyaluronová	- Contipro, Ústí nad Orlicí, ČR
kyselina octová	- Lachema, Brno, ČR
merkapt ethanol	- Loba Chemie, Fishamend, Rakousko
methanol	- Lachema, Brno, ČR
močovina	- Lachema, Brno, ČR
mravenčan sodný	- Lachema, Brno, ČR
N,N,N', N'-tetramethylethylendiamin	- Serva, Heidelberg, Německo
N,N,N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	- Serva, Heidelberg, Německo
N,N'-metylen-bisakrylamid (BIS)	- Serva, Heidelberg, Německo
N,N-dimethylformamid (DMF)	- Lachema, Brno, ČR
N-hydroxysulfosukcinimid-biotin (NHS-biotin)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
N-tris[hydroxymethyl]methylglycin (Tricin)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
octan sodný	- Lachema, Brno, ČR
persíran amonný (APS)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
p-nitrofenol	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
p-nitrofenolfosfát	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
p-nitrofenyl- α -D-fukopyranosid	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
p-nitrofenyl- α -D-galaktopyranosid	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
p-nitrofenyl- α -D-manopyranosid	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

p-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
p-nitrofenyl-β-D-glukopyranosid	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ponceau R	- Loba Feinchemie, Fishamend, Rakousko
Ponceau S	- Loba Feinchemie, Fishamend, Rakousko
síran amonný	- Lachema, Brno, ČR
síran měďnatý	- Lachema, Brno, ČR
sodná sůl kyseliny bicinchoninové (BCA)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
thiosíran sodný	- Lachema, Brno, ČR
2,4,6-trichloranisol (TCA)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
trichloroctová kyselina	- Lachema, Brno, ČR
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	- Serva, Heidelberg, Německo
Triton X-100	- Serva, Heidelberg, Německo
Tween 20	- Serva, Heidelberg, Německo
uhličitan sodný	- Lachema, Brno, ČR
vinan sodný	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Čistota uvedených komerčně dodaných chemikálií byla P.A. nebo vyšší.

2.1.2 Biologický materiál

Urogenitální trakty - jatka Český Brod, Kouřim

Biologický materiál byl zpracován do 2 hodin po preparaci, uchováván v chladnu (4°C).

2.1.3 Další materiál

Mikrotitrační polystyrénové destičky - NUNC, Dánsko

Nitrocelulosová membrána (NC-membrána) - Amersham Biosciences, Vídeň, Rakousko

2.2 Izolace folikulární tekutiny z kravských a prasečích folikulů

Z urogenitálního traktu prasnice a krávy byly nůžkami odděleny ovidukty od rohu dělohy a vaječníku. Pomocí injekční stříkačky byla folikulární tekutina z vaječníků (FF) jímána do značených mikrozkušavek a rozdělena podle velikosti folikulu na folikulární tekutinu ze zralých a nezralých folikulů. Zralé folikuly měly interval velikosti 4-9 mm, nezralé 1-3 mm. Byla zamezena kontaminace vzorků krví. Tekutiny byly centrifugovány. Čirá nažloutlá folikulární tekutina byla přepipetována do nových označených mikrozkušavek, zamrazena a uchovávána při - 20°C. Byly tak získány 4 druhy vzorků: tekutina z kravských zralých folikulů (KZ), tekutina z kravských nezralých folikulů (KN), tekutina z prasečích zralých folikulů (PZ) a tekutina z prasečích nezralých folikulů (PN). Bylo zpracováno přibližně 50 kravských a 60 prasečích ovárií.

2.3 Stanovení koncentrace proteinů

2.3.1 Porovnání hmotnosti zlyofilizovaného vzorků bez a s dialýzou

Bez dialýzy

Postup:

1. Do čtyř zvážených mikrozkušavek bylo napipetováno po 100 µl vzorků FF.
2. Vzorky byly ve zkumavkách zlyofilizovány.
3. Nakonec byly zkumavky se zlyofilizovanými vzorky zváženy a odečteny původní váhy prázdných zkumavek.

S dialýzou

Postup:

1. Promytí a povaření dialyzační trubice (MW 3500).
2. Dialyzační trubice byla rozdělena na 4 části, do kterých bylo napipetováno po 1 ml od každého vzorku KZ, KN, PZ a PN. Za stálého míchání byly vzorky ponechány dialyzovat proti 5 l destilované vody 36 hodin při pravidelné výměně.
3. Do čtyř zvážených mikrozkušavek bylo napipetováno po 100 µl zdialyzovaných vzorků FF.
4. Vzorky byly ve zkumavkách zlyofilizovány.

5. Nakonec byly zkumavky se zlyofilizovanými vzorky zváženy a odečteny původní váhy prázdných zkumavek.
6. Bylo provedeno porovnání hmotností zlyofilizovaných vzorků s dialýzou a bez.

2.3.2 Srážení síranem amonným

Jedná se o vysolování proteinů z jejich původního roztoku. Dochází ke kompetici proteinu se síranovými a amonnými ionty o molekuly vody. Protein precipituje z roztoku v závislosti na koncentraci síranu amonného v roztoku z důvodu vyšší afinity síranových i amonných iontů k vodě.

Postup:

1. Příprava 5 M síranu amonného.
2. Přidání síranu amonného do 4 vzorků folikulární tekutiny (KZ, KN, PZ A PN), aby výsledná koncentrace v roztoku byla 30%.
3. Vzorky byly centrifugovány při 8000 x g po dobu 60 vteřin a supernatanty byly odebrány. Pelety byly zachovány.
4. Do supernatantů byl přidán síran amonný do jeho výsledné 60% koncentrace v roztoku.
5. Vzorky byly centrifugovány při 8000 x g po dobu 60 vteřin a supernatanty byly odebrány. Pelety byly zachovány.
6. Do supernatantů byl přidán síran amonný do jeho výsledné 90% koncentrace v roztoku.
7. Vzorky byly centrifugovány při 8000 x g po dobu 60 vteřin a supernatanty byly odebrány. Pelety byly zachovány.
8. Pelety byly rozpuštěny v 1 ml dest. vody a zdialyzovány viz 3.6.1 postup s dialýzou.

2.3.3 Stanovení kyselinou bicinchoninovou (BCA)

Jedná se o modifikaci metody stanovení proteinů dle Lowryho. Sodná sůl kyseliny bicinchoninové (BCA) tvoří komplex s ionty Cu^{2+} tvořené reakcí peptidové vazby určitých aminokyselin s Cu^{2+} – protein komplex, který se tvoří v zásaditém prostředí při následné redukci Cu^{2+} na Cu^{+} . Koncentrace proteinů odpovídá množství zredukovaného Cu^{2+} . Byla

prokázána interakce cysteinu, cystinu, tryptofanu, tyrosinu a peptidové vazby s Cu^{2+} . Finálně se kolorimetricky stanovuje fialovo-modrá barva, která je způsobena komplexem BCA s Cu^+ v zásaditém prostředí.

Složení roztoků:

Roztok A: 1% BCA (sodná sůl kyseliny bicinchoninové), 2% Na_2CO_3 , 0,16% vinan sodný, 0,4% NaOH, 0,95% NaHCO_3

Roztok B: 4% CuSO_4

Mix A + B: 50 dílů A + 1 díl B

Postup:

1. Od každého vzorku FF (KZ, KN, PZ a PN) bylo připraveno 30 μl 10x zředěného nativního vzorku (tj. 3 μl folikulární tekutiny + 27 μl destilované vody).
2. Pro kalibraci byl připraven roztok BSA jako standardu o celkovém objemu 15 μl a výchozí koncentraci 2 mg/ml.
3. Vše bylo důkladně rozsuspendováno.
4. Ke všem vzorkům a standardům byla přidána 300 μl směs roztoků A + B (50:1).
5. Vše bylo inkubováno 30 min. při 37°C.
6. Poté byly vzorky temperovány na pokojovou teplotu.
7. Vzorky a standardy byly důkladně rozsuspendovány a nanášeno na mikrotitrační destičku po 100 μl .
8. Stanovení koncentrace na čtečce Biotrak II (Amersham Bioscience) při 570 nm.

2.4 Elektromigrační metody

2.4.1 SDS-elektroforesa v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) dle Laemmliho^[78]

Aniontový detergent SDS se pevně váže k proteinům a rozbaluje je. Vysoký negativní náboj navázaného SDS překrývá vlastní náboj proteinu a výsledné komplexy SDS-bílkovina pak mají shodné poměry počtu nábojů na jednotku hmoty a podobný tvar. Následkem toho se při SDS-PAGE proteiny dělí na principu „molekulového síta“, tzn. jejich pohyblivost klesá se stoupající molekulovou hmotností.

Složení roztoků:

A. Roztok akrylamidu (30%): 29,2 g AA + 0,8 g Bis AA do 100 ml H₂O

B. 1,5 M Tris-HCl o pH 8,8: 18,5 g Tris do 100 ml H₂O; pH upraveno pomocí HCl

C. 0,5 M Tris-HCl o pH 6,8: 6 g Tris do 100 ml H₂O; pH upraveno pomocí HCl

D. 10 % SDS: 10 g SDS do 100 ml H₂O

E. Vzorkový pufr:

	neredukující	redukující
H ₂ O	4,4 ml	3,7 ml
0,5 M Tris-HCl o pH 6,8	1,0 ml	1,0 ml
glycerol	0,8 ml	0,8 ml
10% SDS	1,6 ml	1,6 ml
0,1% bromfenolová modř	0,2 ml	0,5 ml
merkapt ethanol	-	0,4 ml

F. Elektrodotový pufr: 9 g Tris + 43,2 g glycinu + 3 g SDS do 600 ml H₂O; před použitím ředěno 80 ml zásobního roztoku 320 ml H₂O

G. 10% APS: 1 g APS do 10 ml H₂O

Zaostřovací gel 4%: 1,52 ml H₂O + 0,625 ml roztoku C + 0,025 ml roztoku D + 0,325 ml roztoku A. Těsně před aplikací bylo přidáno 3,8 μl TEMEDu a 35 μl roztoku G

SeparáčnÍ gel 12%: 2,5 ml roztoku B + 4,0 ml roztoku A + 3,5 ml H₂O + 100 μl roztoku D. Těsně před aplikací bylo přidáno 4,5 μl TEMEDu a 35 μl roztoku G.

SeparáčnÍ gel 15%: 2,5 ml roztoku B + 5,0 ml roztoku A + 2,5 ml H₂O + 100 μl roztoku D. Těsně před aplikací bylo přidáno 4,5 μl TEMEDu a 35 μl roztoku G.

BarvenÍ gelů: 0,5 g CBB + 450 ml methanolu + 100 ml kyseliny octové + 450 ml H₂O

OdbarvenÍ gelů: 250 ml methanolu + 100 ml kyseliny octové + 650 ml H₂O

Standard: Precision plus proteinTM standards (Bio-Rad)

Postup:

1. Pro elektroforesu byl použit přístroj Mini-Protean[®] III od firmy Bio-Rad. 15% separační gel byl nalit mezi dvě vertikální skla upevněná do stojanu pro nalévání gelů, převrstven vodou a ponechán polymerovat.
2. Po vysušení gelů filtračním papírem byla nalita vrstva 4% zaostřovacího gelu, do níž byl zasunut hřeben pro tvorbu jamek.
3. Lyofilizované vzorky FF o koncentraci 1 mg proteinů na 100 μ l vzorkového redukujícího pufru byly před nanesením inkubovány 5 minut v horké vodní lázni. Vzorky v neredukujícím pufru považeny nebyly.
4. Po ukončení polymerace byla sestavena aparatura pro provedení elektroforesy. Do katodového i anodového prostoru byl nalit elektrodový pufr. Po odstranění hřebenů byly do jamek nanášeny vzorky o objemu 10 μ l pomocí mikrostříkačky. Vana byla doplněna elektrodovým pufrem.
5. Elektrody byly připojeny ke zdroji napětí. Jako zdroj napětí byl použit přístroj Power Pac 1000 (Bio-Rad). Elektroforesa probíhala zpočátku při napětí 70 V, po překročení rozhraní gelů bylo nastaveno napětí 130 V. Elektroforesa trvala 90 min.
6. Po skončení elektroforesy byly gely propláchnuty destilovanou vodou a barveny buď CBB nebo stříbrem (viz. kap. 2.4.3).

2.4.2 2D-elektroforesa

Dvojrzměrná elektroforesa je kombinace dvou elektroforetických dělení. Proteiny se nejdříve dělí isoelektrickou fokusací podle svých isoelektrických bodů. V kolmém směru se pak elektroforesou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsiranu sodného (SDS-PAGE) jednotlivé proteiny rozdělí podle molekulových hmotností. Tímto způsobem lze analyzovat velmi komplexní směsi obsahující mnoho desítek bílkovin.

2.4.2.1 Izoelektrická fokusace jako první rozměr 2D-elektroforesy

Složení roztoků:

Rehydratační pufr: 8 M močovina, 2% CHAPS, 2% roztok amfolytů-IPG pufr pH 3-10, bromfenolová modř, 20 mM DTT

Ekvilibrační pufr: 6 M močovina, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 20% glycerol, 2% SDS

Postup:

1. Na jeden strip s rozmezím pH 3-10 (7 cm) bylo použito 120 μg proteinů, v rehydratačním pufru o celkovém objemu 125 μl na strip.
2. Do jamky bylo napipetováno 125 μl roztoku s proteiny pro fokusaci, do roztoku byl ponořen strip gelem dolů a celá jamka byla vyplněna minerálním olejem.
3. Jamky byly zakryty víkem a stripy byly rehydratovány 17 hodin při laboratorní teplotě.
4. Rehydratované stripy byly přemístěny do přístroje pro fokusaci Ettan IPGphor II (Amersham Biosciences), opět zality minerálním olejem a za podmínek maximálního proudu 60 μA /strip a postupného zvyšování napětí do hodnoty minimálně 6 kVh.
5. Po dosažení hodnoty 6 kVh, byly stripy vyjmuty a zamrazeny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ před dalším zpracováním.
6. Před SDS-PAGE (kap. 2.4.1) byl strip inkubován 20 minut v ekvilibračním pufru s 10 mg/ml DTT a poté 20 minut v ekvilibračním pufru s přídatkem jodacetamidu (20 mg/ml) na třepačce při laboratorní teplotě.

2.4.2.2 SDS-PAGE jako druhý rozměr 2D-elektroforesy

Standard: Precision plus proteinTM standards

Postup:

1. Separační (15%-ní) i zaostřovací gel byl připraven stejně jako při SDS-elektroforese (kap. 2.4.1).
2. Do zaostřovacího gelu byl vložen plastový hřeben pro tvorbu jamky pro umístění stripu.
3. Další průběh 2D-elektroforesy byl stejný jako u jednorozměrné elektroforesy (kap. 2.4.1).
4. Vizualizace proteinů byla provedena stříbrem (kap. 2.4.3.2).

2.4.3 Vizualizace proteinů po SDS-PAGE

2.4.3.1 Barvení Coomassie Brilliant Blue

Složení roztoků:

Barvicí roztok: 0,5 g Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250, 450 ml methanolu, 100 ml kyseliny octové, 450 ml H₂O

Odbarvovací roztok: 250 ml methanolu, 100 ml kyseliny octové, 650 ml H₂O

Fixační roztok: 250 ml methanol + 50 ml glycerol + 50 ml kyselina octová + 150 ml H₂O

Postup:

1. Pro barvení gelů byl používán barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue R-250, kdy dochází k vazbě barviva převážně přes aminoskupiny proteinů. Gely byly barveny po dobu 1 hodiny.
2. Po barvení byla zbylá CBB odstraněna z gelu promýváním v odbarvovacím roztoku po dobu 2 hodin, během odbarvování byla lázeň několikrát vyměněna. Gely byly inkubovány 10 min ve fixačním roztoku a zataveny do celofánu.

2.4.3.2 Barvení stříbrem

Složení roztoků:

Fixační roztok: 50% methanol, 12% kyselina octová, 0,05% formaldehyd

Promývací roztok: 20% ethanol

Senzitivující roztok: 0,02% Na₂S₂O₃ · 5H₂O

Barvicí roztok: 0,2% (w/v) AgNO₃ + 0,076% formaldehyd

Vyvolávací roztok: 6% (w/v) Na₂CO₃ + 0,0004 % (w/v) Na₂S₂O₃ · 5H₂O + 0,05% formaldehyd

Terminační roztok: 50% methanol, 12% kyselina octová

Postup:

1. Proteiny v gelu byly přes noc inkubovány ve fixačním roztoku.
2. Gel byl 3x 20 min promyt promývacím roztokem.
3. Následovala preinkubace v senzitivujícím roztoku po dobu 1 min.
4. Promytí 3x 20 s destilovanou vodou.
5. Gel byl 20 min ponechán v barvicím roztoku.

6. Promytí 2x 20 s destilovanou vodou.
7. Následovala redukce vyvolávacím roztokem, dokud se gel dostatečně nevybarvil.
8. Ukončení barvení terminačním roztokem.
9. Gel byl opláchnut destilovanou vodou, usušen a naskenován.

2.4.4 Červená nativní elektroforesa v polyakrylamidovém gelu (RN-PAGE) v kontinuálním pufrovém systému

Principiálně dochází při této metodě k navázání barviva Ponceau na NH₂ skupiny proteinů, popřípadě spolu látky interagují pomocí nekovalentních interakcí. Dochází k udělení záporného náboje proteinu díky sulfátovým skupinám barviva bez denaturace proteinu. Uniformní záporný náboj zaručí putování proteinů ke kladné anodě. Dělení proteinů tedy z části probíhá podle své Mr.

Složení roztoků:

30% roztok akrylamidu (AA): 29,2 g akrylamidu + 0,8 g Bis AA/100 ml H₂O

Katodový pufr: 50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris-HCl (pH 7), 0,012 % Ponceau S/R

Anodový pufr: 50 mM Bis-Tris-HCl (pH 7)

Vzorkový pufr: 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7), 20% glycerol, 0,02% Ponceau S/R,

10% roztok APS: 20 mg APS + 180 μl H₂O

Standard: BSA

Složení koncentračního a separačního gelu pro RN - PAGE

	4 %	12 %
destilovaná voda	1500 μl	3500 μl
anodový pufr	625 μl	2500 μl
roztok AA	325 μl	4000 μl
1 % Ponceau S a R	29,4 μl	120 μl
APS	35 μl	40 μl
TEMED	3,8 μl	4,5 μl

Postup:

1. Vzorky pro červenou nativní elektroforesu byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml čistého proteinu nebo 10 mg/ml proteinových směsí, rozpuštěním ve vzorkovém pufru bez povaření.
2. Byla sestavena aparatura pro elektroforesu Mini-Protean[®] III od firmy Bio-Rad. Jako zdroj napětí byl použit přístroj Power Pac 1000 (Bio-Rad).
3. Elektroforesa probíhala zpočátku při napětí 70 V (20 min), po překročení rozhraní gelů bylo nastaveno napětí 130 V (200 min při použití Ponceau S/R). Z důvodu zahřívání a případné denaturace proteinů během elektroforesy byla aparatura po celou dobu separace v chladicím boxu při 4°C.
4. Po skončení elektroforesy byly gely propláchnuty destilovanou vodou a barveny v roztoku barviva Coomassie Brilliant Blue R-250 (kap. 2.3.3.1).

2.4.5 Western blot - elektropřenos proteinů na NC-membránu

Princip této metody spočívá v přenesení proteinů z gelu po SDS-elektroforese na nitrocelulosovou membránu. Na membráně vznikne „kopie“ proteinů separovaných na gelu, umožňující lepší interakci látek s proteiny při použití v dalších metodách.

Složení roztoků:

Přenosový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 20% methanol, pH 8,2

Postup:

1. Byla provedena SDS-PAGE (kap. 2.3.1) proteinů FF. Zaostrovací gel byl oddělen.
2. Nitrocelulosová membrána (NC-membrána) a polyakrylamidový gel byly 10 min ekvilibrovány v přenosovém pufru.
3. Gel byl uložen spolu s jednou NC-membránou do kazety mezi tři vrstvy filtračních papírů Whatman a dvě houby z obou stran. Kazeta byla vložena do přístroje pro elektropřenos firmy Bio-Rad spolu s chladicím blokem a přístroj byl naplněn přenosovým pufrem.
4. Elektrody byly připojeny k pólům zdroje Power Pac 1000 (Bio-Rad). Elektropřenos probíhal 1,5 hodiny při 500 mA.
5. Kontrola přenosu proteinů na membránu byla provedena barvením v 0,5% Ponceau

v 1% kyselině octové, pozadí bylo odbarveno opakovaným promýváním membrány destilovanou vodou.

6. Membrána použita k dalším studiím nebo byla vysušena mezi listy filtračního papíru a uskladněna při -20°C .

2.5 Detekce glykoproteinů

2.5.1 Detekce glykoproteinů v gelu

Pro detekci glykoproteinů v polyakrylamidovém gelu byl použit Glycoprotein Detection Kit od firmy Sigma-Aldrich. Pro barvení sacharidových řetězců glykoproteinů je využito kyseliny jodisté, která oxiduje viciální dioly na aldehydy především na periferních sacharidech a sialových kyselinách. Aldehydy poté interagují s Schiffovým činidlem. Intenzita barvy proužků je zvýšena pomocí oxidu siřičitého, který se uvolňuje z redukujícího roztoku disiřičitanu sodného.

Složení roztoků:

Fixační roztok: 50% methanol

Oxidační roztok: kyselina jodistá

Schiffovo činidlo

Redukující roztok: disiřičitan sodný

Postup:

Individuální kroky byly provedeny dle této tabulky:

Kroky	Objemy	Časový interval
1. Fixace	200 ml	30 minut
2. Vymývání	200 ml	2 x 10 minut
3. Oxidace	100 ml	30 minut
4. Vymývání	200 ml	2 x 10 minut
5. Barvení	100 ml	1-2 hodiny nebo dokud barva proužků nebude fialová
6. Redukce	100 ml	60 minut
7. Vymývání	200 ml	barva proužků zintenzivní výměnou čisté dest. vody
8. Uskladnění	400 ml	přes noc

2.5.2 Detekce glykoproteinů a sialových kyselin na nitrocelulosové membráně

Byl použit Immune-Blot[®] Kit od firmy Amersham Biosciences k detekci sacharidových struktur v molekulách glykoproteinů. Principiálně se jedná o specifické značení sacharidů biotinem a následnou detekci barevných produktů enzymatické reakce se substrátem peroxidasy, která je konjugovaná na avidin. Dále byla také provedena detekce terminálního monosacharidu glykanu na přítomnost sialové kyseliny.

Složení roztoků:

200 mM acetátový pufr pH 5,5: 44 ml 200 mM octanu sodného (1,2 g v 44 ml dest. vody) smíchat s 6 ml 200 mM kys. octové (69 µl konc. kys. octové v 6 ml dest. vody)

5 mM EDTA ve 100 mM acetátovém pufru pH 5,5: 0,19 g EDTA rozpuštěno v 50 ml 200 mM acetátového pufru a následně zředěno na 100 ml dest. vodou

PBS (pH 7,2): Phosphate buffered saline; izotonický roztok NaCl pufovaný fosfátovým pufrům (10x koncentrovaný); rozpuštěno v 1 litru H₂O: 90 g NaCl, 12 g Na₂HPO₄, 9 g NaH₂PO₄; před použitím ředěno 10x

0,5% roztok želatiny: 0,1 g želatiny do 20 ml PBS, při rozpouštění nutno zahřát

0,01 M Tris-HCl pH 7,4 se 100 µg CoCl₂

Detekce sacharidových struktur

Postup:

1. Po SDS-PAGE (kap. 2.4.1) byl proveden elektropřenos proteinů na nitrocelulosovou membránu (kap. 2.4.5).
2. Membrána byla promývána 10 ml PBS po dobu 10 minut.
3. Následovala oxidace 10 mM NaIO₄ v acetát/EDTA pufru (21,4 mg jodistanu sodného do 10 ml) – inkubace v temnu (pod alobalem) po dobu 20 minut za jemného třepání.
4. Promytí membrány 3x 10 minut 10 ml PBS.
5. Biotinylace glykoproteinů – 2 µl hydrazidu v 10 ml acetát/EDTA pufru (příprava těsně před použitím) – inkubace po dobu 60 minut za třepání.
6. Promytí membrány 3x 10 minut 10 ml PBS.
7. Blokování – 0,5% roztok želatiny v PBS – 10 ml na membránu přes noc v lednici.
8. Promytí membrány 3x 10 minut 10 ml PBS.
9. Inkubace s avidin-peroxidasou – 200 µl roztoku avidin-peroxidasy v 10 ml PBS – inkubace 60 minut za třepání.
10. Promytí membrány 3x 10 minut 10 ml PBS.
11. Inkubace se substrátovým roztokem 4-chlor-1-naftolu (CN):
 - a) 5 mg CN rozpuštěno v 200 µl DMF.
 - b) následně zředěno na 10 ml 0,01 M Tris-HCl (pH 7,4) se 100 µg CoCl₂.
 - c) před samotnou reakcí se přidáno H₂O₂ do konečné koncentrace 0,1% (33 µl 30% H₂O₂).
 - d) membrána promývána v 10 ml připraveného roztoku po dobu 5 minut bez přístupu světla.
 - e) enzymová reakce je zastavena promytím membrány destilovanou vodou.

Detekce sialových kyselin

Postup:

1. Po SDS-PAGE (kap. 2.4.1) byl proveden elektropřenos proteinů na nitroceluloseovou membránu (kap. 2.4.5).
2. Membrána byla promývána 10 ml studeným PBS po dobu 10 minut.
3. Následovala oxidace 1 mM NaIO₄ v acetát/EDTA pufru (2,14 mg jodistanu sodného do 10 ml) – inkubace v temnu (pod alobalem) po dobu 20 minut za jemného třepání při 4°C.
4. Promytí membrány 3x 10 minut 10 ml PBS.
5. Biotinylace glykoproteinů – 2 µl hydrazidu v 10 ml acetát/EDTA pufru (příprava těsně před použitím) – inkubace po dobu 60 minut za třepání.
6. Promytí membrány 3x 10 minut 10 ml PBS.
7. Blokování – 0,5% roztok želatiny v PBS – 10 ml na membránu přes noc v lednici.
8. Promytí membrány 3x 10 minut 10 ml PBS.
9. Inkubace s avidin-peroxidasou – 200 µl roztoku avidin-peroxidasy v 10 ml PBS – inkubace 60 minut za třepání.
10. Promytí membrány 3x 10 minut 10 ml PBS.
11. Inkubace se substrátovým roztokem 4-chlor-1-naftolu (CN):
 - a) 5 mg CN rozpuštěno v 200 µl DMF.
 - b) následně zředěno na 10 ml 0,01 M Tris-HCl (pH 7,4) se 100 µg CoCl₂.
 - c) před samotnou reakcí se přidáno H₂O₂ do konečné koncentrace 0,1% (33 µl 30% H₂O₂).
 - d) membrána promývána v 10 ml připraveného roztoku po dobu 5 minut bez přístupu světla.
 - e) enzymová reakce je zastavena promytím membrány destilovanou vodou.

2.5.3 Interakce proteinů na membráně s biotinem značenými lektiny

Proteiny folikulární tekutiny byly po SDS-PAGE přeneseny na NC-membránu. Byl použit Biotinylated Lectin Kit I od firmy Vector Laboratories obsahující biotinem značené lektiny. Vizualizace byla způsobena přeměnou substrátu peroxidasou konjugovanou s avidinem na barevný produkt v místě vazby lektinu.

Roztoky:

PBS (pH 7,2): Phosphate buffered saline; izotonický roztok NaCl pufrovaný fosfátovým pufrem (10x koncentrovaný); rozpuštěno v 1 litru H₂O: 90 g NaCl, 12 g Na₂HPO₄, 9 g NaH₂PO₄; před použitím ředěno 10x

Hepes pufr: 10 mM Hepes (pH 7,5) s 0,15 M NaCl a 0,1 mM CaCl₂

Použité lektiny, jejich mezinárodní zkratka a sacharidová specifita

lektin	zkratka	sacharidová specifita
Dolichos biflorus	DBA	α-D-GalNAc
Maackia amurensis	MAA	α-D-Sia-(2-3)
Ulex europaeus	UEA	α-L-Fuc-(1-2)
Canavalia ensiformis	Con A	manosylové a glukosylované struktury
Arachis hypogaea	PNA	β-D-Gal-(1-3)-α-D-GalNAc
Ricinus communis	RCA	β-D-Gal-(1-4)

Postup:

1. Po SDS-PAGE (kap. 2.4.1) byl proveden elektropřenos proteinů na nitrocelulosovou membránu (kap. 2.4.5).
2. Promytí membrány v PBS 10 minut.
3. Desaktivace volných vazebných míst na membráně 0,5% želatinou v PBS 1,5 hodiny při 37°C.
4. 2x promyto PBS s 0,02% Tweenem.
5. Inkubace s roztokem biotoinem značeného ligandu 20 µg/1 ml v Hepes pufru 1-2 hodiny při 37°C.
6. 3x promyto PBS s 0,02% Tweenem.
7. Inkubace s avidin-peroxidasou: 10 µg zásobního roztoku (25 µg/100 µl) do 10 ml – 45-60 minut při 37 °C.
8. 3x promyto PBS s 0,02% Tweenem.
9. Inkubace se substrátovým roztokem 4 -chlor-1-naftolu (CN):
 - a) 5 mg CN rozpuštěno v 200 µl DMF.
 - b) následně zředěno na 10 ml 0,01 M Tris-HCl pH 7,4 se 100 µg CoCl₂.

- c) před samotnou reakcí se přidáno H_2O_2 do konečné koncentrace 0,1% (33 μl 30% H_2O_2).
- d) membrána promývána v 10 ml připraveného roztoku po dobu 5 minut bez přístupu světla.
- e) enzymová reakce je zastavena promytím membrány destilovanou vodou.

2.6 Detekce enzymatických aktivit

2.6.1 Substrátová zymografie

2.6.1.1 Detekce proteolytické aktivity

Želatinová substrátová zymografie byla využita pro detekci proteolytické aktivity ve vzorcích FF. Principem této metody je rozdělení proteinů pomocí SDS-elektroforesy v PA gelu s kopolymerovanou želatinou. Redenaturace proteinů po SDS-PAGE je zajištěna promýváním roztokem Tritonu X-100. Aktivita je viditelná po inkubaci v daném pufru s přidavkem inhibitorů určitých proteas a barvení CBB R-250. Na místech proteinů s proteolytickou aktivitou jsou viditelná světlá místa na tmavém pozadí.

Složení roztoků:

A. Inkubační roztok pro zjištění celkových proteas:

50 mM Tris-HCl, pH 8,4 s obsahem 5 mM CaCl_2 (6,055 g Tris + 5,55 g CaCl_2 doplnit do 1000 ml, pH upraveno pomocí HCl)

B. Inkubační roztok s inhibitorem serinových proteas:

50 mM Tris-HCl, pH 8,4 s obsahem 5 mM CaCl_2 + 10 mM benzamidin-HCl

C. Inkubační roztok s inhibitorem metaloproteas:

50 mM Tris-HCl, pH 8,4 s obsahem 5 mM CaCl_2 + 5 mM EDTA

Postup:

1. Byl připraven 15% separační gel (viz kap. 2.4.1) s 0,2% želatinou a 4% zaostřovací gel bez přidavku želatiny.
2. Byly připraveny vzorky proteinů o koncentraci 1 mg/ml neredukujícího vzorkového pufru.
3. Podmínky elektroforesy byly stejné jako v kap. 2.4.1

4. Po proběhnutí elektroforesy byly gely promyty 3x destilovanou vodou.
5. Vymytí SDS z gelu bylo provedeno pomocí 2,5% Tritonu X-100, roztok byl měněn 4x během jedné hodiny.
6. Následovalo znovu promytí 3x destilovanou vodou.
7. Gely byly inkubovány 18 hod při 37°C v pufru A, B nebo C (během inkubace byl pufr 1x vyměněn) přes noc.
8. Po vyjmutí z inkubačního roztoku byly gely promyty 3x destilovanou vodou a barveny v roztoku CBB (kap. 2.4.3.1).

2.6.1.2 Detekce aktivity hyaluronidasy

Pro detekci hyaluronidasové aktivity ve vzorcích FF byla využita hyaluronanová substrátová zymografie. Principem této metody je rozdělení proteinů pomocí SDS elektroforesy v PA gelu s kopolymerovanou kyselinou hyaluronovou. Redenaturace proteinů po SDS-PAGE je zajištěna promýváním roztokem Tritonu X-100. Aktivita je viditelná po inkubaci v pufru o daném pH a po barvení alcianovou modří. Na místech proteinů s hyaluronidasovou aktivitou jsou viditelná světlá místa na tmavším pozadí.

Složení roztoků:

Roztok hyaluronanu (HA): 160 mg HA/100 ml dest. vody, 24 hod. mícháno při 4°C

Pufr pH 3,7: 0,1 M mravenčanovém pufru (pH upraveno kyselinou mravenčí) s 0,15 M NaCl

Pufr pH 7,4: 50 mM Hepes (pH upraveno roztokem NaOH) s 0,15 M NaCl

Alcianová modř: 0,5% alcianové modři v 3% kys. octové

Postup:

1. Byla provedena SDS-PAGE (viz kap. 2.4.1), do separačního gelu (10%-ního) místo vody bylo přidáno 2,5 ml HA roztoku, vzorky nativní FF byly rozpouštěny ve stejném objemu vzorkového pufru, nanášeno 10 µl.
2. Gely byly promývány 3% Tritonem X-100 v 50 mM Hepes pufru (pH 7,4) nebo 0,1 M mravenčanovovém pufru (pH 3,7), během 1 hod byl roztok 1x vyměněn.
3. Následovala inkubace 16 hod. v pufru (pH 3,7 nebo pH 7,4) při 37°C.
4. Gely byly promyty 2x destilovanou vodou a barveny v alcianové modři po dobu 1 hod.

5. Po odbarvení v 7% kys. octové byly gely promyty 2x dest. vodou a fixovány v roztoku 50% methanol/10% kys. octová.

2.6.2 Stanovení aktivity kyselé fosfatasy

Kyselá fosfatasa odštěpuje fosfátové skupiny substrátu, p-nitrofenylfosfátu. Celá reakce je zastavena denaturací enzymu hydroxidem sodným. Zásadité pH umožňuje spektrofotometrickou detekci vzniklého p-nitrofenolu, při 405 nm.

Inkubační roztoky:

A: 0,25 M citrát-fosfátového pufru, pH 4,5

B: 0,25 M fosfátového pufru, pH 7

Postup:

1. Vymytí mikrotitrační destičky 150 μ l inkubačních roztoků pro odstranění případných nečistot v jamkách.
2. Příprava vzorků: naředění folikulární tekutiny (100x) v A: citrát-fosfátovém pufru, B: fosfátovém pufru.
3. Příprava 0,1% p-nitrofenylfosfátu.
4. Příprava 0,1 M NaOH.
5. Nanesení 100 μ l vzorků (nativní FF) do jamek mikrotitrační destičky.
6. Nanesení 100 μ l 0,1% p-nitrofenylfosfátu do jamek se vzorkem.
7. Zastavení reakce přidávkem 100 μ l 0,1 M NaOH přesně po 1 minutě.
8. Spektrofotometrické měření absorbance vzniklého p-nitrofenolu při 405 nm na čtečce Tecan Sunrise (ReTiSoft, Inc.).

2.6.3 Detekce enzymatické aktivity glykosidas

Jako jedna z metod stanovení glykosidas v roztoku se používá detekce aniontu p-nitrofenolu, který vzniká působení glykosidas na substrát p-nitrofenyl glykosidů. Celá reakce je zastavena přidáním zásady, což způsobí přeměnu uvolněného aglykonu, tedy p nitrofenolu, na jeho spektrofotometricky detekovatelnou anionickou formu [79].

glykosidasa

p-nitrofenyl-glykosid → p-nitrofenol + zásada → p-nitrofenol

Inkubační roztoky:

A: 0,25 M citrátového pufru, pH 4,5

B: 0,25 M fosfátového pufru, pH 7

Použité substráty

Pro enzym	Substrát
α-galaktosidasa	p-nitrofenyl-α-D-galaktopyranosid
α-manosidasa	p-nitrofenyl-α-D-mannopyranosid
α-fukosidasa	p-nitrofenyl-α-D-fukopyranosid
β-galaktosidasa	p-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid
β-glukosidasa	p-nitrofenyl-β-D-glukopyranosid
hexosaminidasa	1-N-acetyl-P-D-galaktosamin

Postup:

1. Inkubace 20 μl vzorku/standardu (p-nitrofenylu) se 180 μl pufru A nebo B a 100 μl 1 mM substrátu při 37°C po dobu 15 hodin v jamkách mikrotitrační destičky.
2. Reakce byla zastavena přidáním 1 ml 1 M glycinu o pH 10.
3. Absorbance byla změřena při 405 nm.
4. Byla vytvořena kalibrační závislost koncentrace produktu enzymatické reakce p-nitrofenolu na absorbanci při 405.
5. Aktivita byla vyjádřena v μmol/min*mg proteinu.

2.7 Odstranění sérum albuminu a IgG

K odstranění sérového albuminu a imunoglobulinu ze vzorků byl použit *ProteoPrep® Blue Albumin and IgG Depletion Kit* (Sigma-Aldrich). Principiálně dochází k odstranění specifickou interakcí sérového albuminu a imunoglobulinu s nosičem kolonky kitu, resp. s Blue Sepharosou.

Složení roztoků:**A. Ekvilibrační roztok:** Tris.urea pufr, pH 7,8**B. ProteoPrep[®] blue albumin and IgG depletion Kit médium** (kód produktu P1120)**Postup:**

1. Bylo přidáno 0,4 ml média na kolonku.
2. Kolonka byla centrifugována 8000 x g po dobu 10-15 vteřin a tekutina byla odebrána z kolonky.
3. Krok č.1 a 2 byl opakován ještě 2 x.
4. Na 4 kolonky bylo přidáno 40 μ l folikulární tekutiny KZ, KN, PZ a PN a inkubováno 10 minut při laboratorní teplotě.
5. Kolonka byla centrifugována 8000 x g po dobu 60 vteřin a eluát byl odebrán z kolonky.
6. Eluát byl znovu nanesen na kolonku a inkubován 10 min. při laboratorní teplotě.
7. Kolonka byla centrifugována 8000 x g po dobu 60 vteřin a eluát byl odebrán z kolonky.
8. Eluát byl odebrán z kolonky.
9. Na kolonku bylo naneseo 100 μ l ekvilibračního pufru.
10. Kolonka byla centrifugována 8000 x g po dobu 60 vteřin a eluát byl odebrán z kolonky.
11. Eluát byl odebrán z kolonky.
12. Na kolonku bylo naneseo 100 μ l neredukujícího pufru pro SDS-PAGE a celá kolonka byla povařena ve vodní lázni 5 minut.
13. Kolonka byla centrifugována 8000 x g po dobu 60 vteřin a eluát byl odebrán z kolonky.
14. Eluát byl odebrán z kolonky
15. Eluáty z kroků č. 8, 11 a 14 byly použity pro SDS-PAGE (viz. kap. 2.4.1).

3 Výsledky

3.1 Izolace folikulárních tekutin

Úspěšně se podařilo izolovat folikulární tekutinu (FF) z 50 kravských a 60 prasečích ovaríí a zároveň získanou tekutinu rozdělit dle stupně zrání folikulu na FF ze zralých folikulů a FF z nezralých folikulů. Objem získané FF z kravských zralých folikulů byl 12 ml a objem získané FF z kravských nezralých folikulů byl 3 ml. Objem získané FF z prasečích zralých folikulů byl 8 ml a objem získané FF z prasečích nezralých folikulů byl 2 ml. Zamezili jsme kontaminaci krví. Tekutiny byly následně několikrát zcentrifugovány a zamrazeny. Vzorky byly uchovávány při -20°C.

3.2 Stanovení koncentrace proteinů

Bylo provedeno porovnání hmotností zlyofilizovaných vzorků FF (KZ, KN, PZ a PN) bez dialýzy a s dialýzou (kap. 2.3.1). Vzorky bez dialýzy obsahují i nízkomolekulární látky (soli, cukry atd.), proto výsledná hmotnost neodpovídá pouze hmotnosti proteinů. Vzorky FF po dialýze tyto látky neobsahují, jelikož byly oddialyzovány. Vyšší pokles hmotnosti byl zaznamenán u vzorků ze zralých folikulů (*tab. 1, str. 38*). Další použitou metodou stanovení proteinů bylo postupné srážení síranem amonným (kap. 2.3.2). Touto metodou byly stanoveny pouze proteiny. Nejvyšší koncentrace proteinů byla zjištěna u vzorků FF z nezralých folikulů prasnic i krav (*tab. 1, str. 38*), mimo stanovení metodou BCA. Nejvyšší koncentrace byla detekována u kravských vzorků FF a to u všech metod mimo stanovení pomocí BCA (*tab. 1, str. 38*). Metoda stanovení koncentrace proteinů ve FF pomocí BCA (kap. 2.3.3), kdy se používá nativních vzorků FF, se ukázala být nejméně přesná. Při této metodě dochází k interferenci i ostatních látek neproteinového charakteru, což ji činí pro naše účely nepoužitelnou.

vzorek	koncentrace mg/ml			
	bez dialýzy	po dialýze	srážení síranem amonným	BCA
KZ	67	58	54	61
PZ	58	52	50	74
KN	83	66	59	62
PN	78	62	57	72

Tab 1 Stanovení koncentrace proteinů ve folikulární tekutině

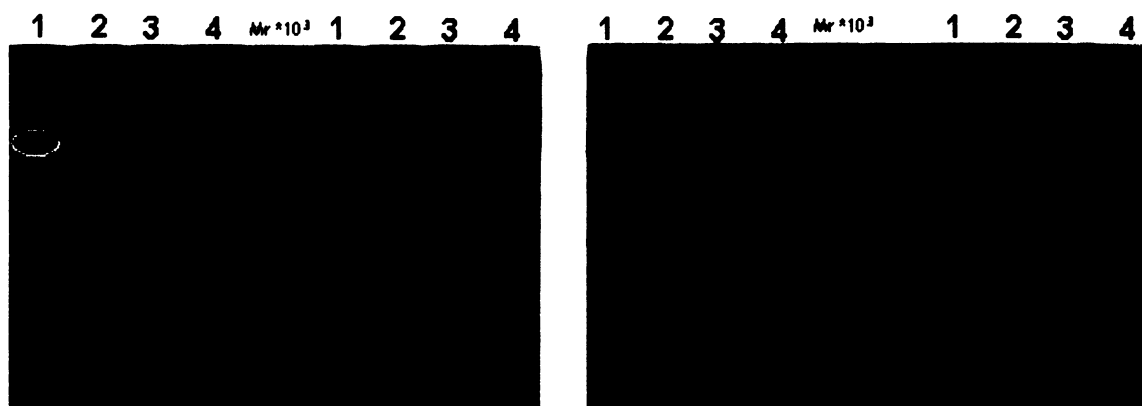
(A) lyofilizát ze vzorků bez dialýzy, (B) lyofilizát ze vzorků po dialýze, (C) po postupném srážení 5 M síranem amonným a (D) stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

KZ – tekutina z kravských zralých folikulů, KN – tekutina z kravských nezralých folikulů, PZ – tekutina z prasečích zralých folikulů, PN – tekutina z prasečích nezralých folikulů

3.3 Proteinová charakterizace folikulární tekutiny

3.3.1 SDS-elektroforesa

Proteiny folikulární tekutiny ze zralých a nezralých folikulů krávy a prasnice byly rozděleny pomocí SDS-PAGE (kap. 2.4.1) v 15%-ním separačním gelu podle svých relativních molekulových hmotností (M_r). Gely byly barveny CBB-R250 (*obr. 4, str. 49*). Ve vzorcích nejsou viditelné rozdíly v proteinovém složení. Většina proteinů je o M_r větší než 50 000. Ve žlutém kroužku je označen sérový albumin jako dominantní protein, v červeném kroužku je označena přítomnost imunoglobulinů.



obr. 4 SDS-elektroforesa vzorků folikulární tekutiny izolované z vaječnků krav a prasnic v různých fázích zrání

15%-ní separační gel, nanášené množství vzorků rozpuštěných v neredukujícím vzorkovém pufru obsahovalo 10 µg proteinů a nanášené množství roztoku standardů (St) bylo 5 µl.

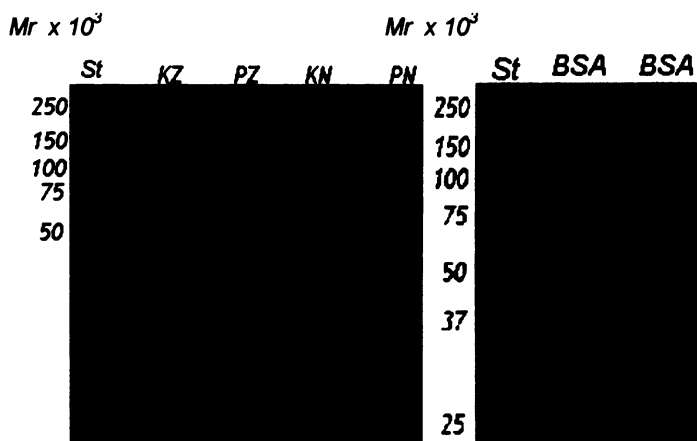
KZ – tekutina z kravských zralých folikulů, KN – tekutina z kravských nezralých folikulů,

PZ – tekutina z prasečích zralých folikulů, PN – tekutina z prasečích nezralých folikulů,

St – Precision plus proteinTM standards

objemy vzorků nanesených do jamek gelu: 1 = 5 µl, 2 = 10 µl, 3 = 15 µl a 4 = 20 µl

Dále byla provedena SDS-PAGE (kap. 2.4.1) v redukujících podmínkách z důvodu potvrzení posunu Mr sérového albuminu v redukujících podmínkách oproti neredukujícím. Na obr. 5 (str. 40) je zřetelný posun sérového albuminu v redukujícím prostředí oproti neredukujcímu (obr. 4). V redukujícím pufru odpovídá Mr BSA zhruba 55 000, oproti vzorkům v redukujícím, kde má BSA Mr zhruba 65 000.



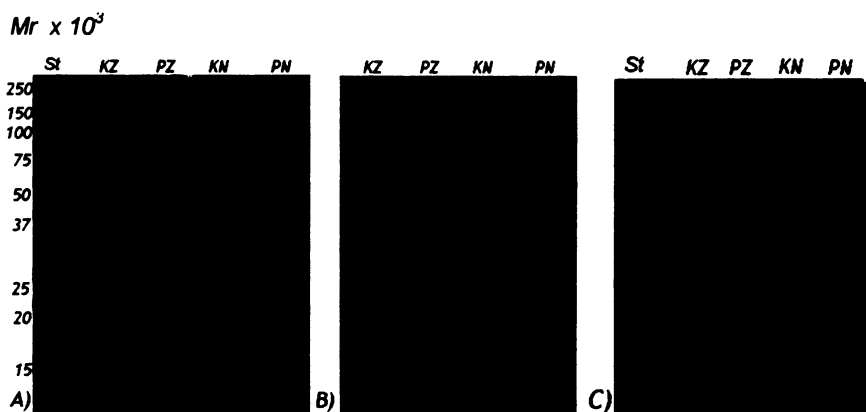
obr. 5 SDS-elektroforesa vzorků redukujícím vzorkovým pufrem a porovnání polohy BSA v redukujícím a neredukujícím vzorkovém pufrem

15%-ní separační gel, nanášené množství vzorků rozpuštěných v redukujícím vzorkovém pufrem obsahovalo 100 μg proteinů a nanášené množství roztoku standardů (St) a BSA bylo 5 μl .

KZ – tekutina z kravských zralých folikulů, KN – tekutina z kravských nezralých folikulů, PZ – tekutina z prasečích zralých folikulů, PN – tekutina z prasečích nezralých folikulů, St – Precision plus proteinTM standards, BSA nered – sérový albumin v neredukujícím pufrem, BSA red – sérový albumin v redukujícím pufrem

3.3.2 Odstranění sérum albuminu

Pro odstranění dominantních proteinů sérum albuminu a imunoglobulinů, které mohou potlačit vizualizaci ostatních proteinů, byl použit ProteoPrep[®] Blue Albumin and IgG Depletion Kit (kap. 2.7). Náplň kolonky tvoří Blue Sepharosa, s níž výše zmíněné proteiny interagují. Na obr. 6 (str. 41) je patrné, že použití této metody se pro naše účely neosvědčilo, jelikož při porovnání proteinového složení z obr. 4 (str. 39) došlo k výrazné ztrátě i ostatních proteinů, nikoliv jen sérum albuminu a imunoglobulinů. To potvrzuje i sensitivnější barvení stříbrem na obr. 7 (str. 41). Pro další charakterizace byly použity původní vzorky.

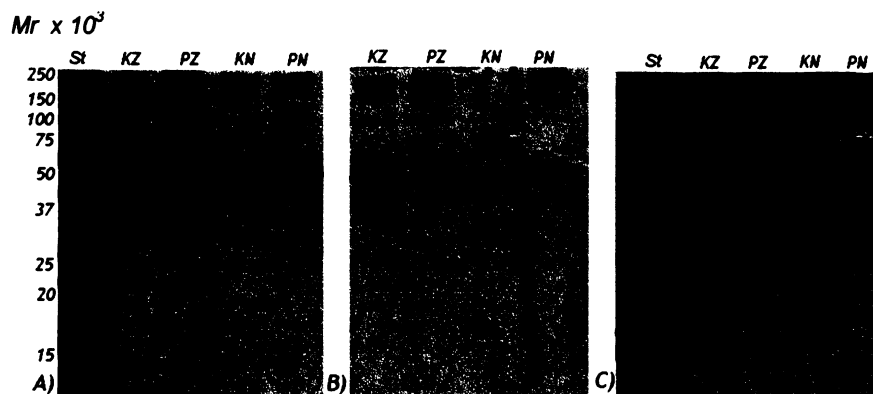


obr. 6 Odstranění sérum albuminu na kolonce s Blue Sepharosou - ProteoPrep® Blue Albumin and IgG Depletion Kit s následnou kontrolou pomocí SDS-elektroforesy

A) eluát vzorku, B) eluát kolony, C) rozsuspendovaná kolona

Nanášené množství vzorků rozpuštěných v neredukujícím vzorkovém pufru bylo 10 µl a standardu (St) bylo 5 µl; gely vizualizovány CBB R-250.

KZ – tekutina z kravských zralých folikulů, KN – tekutina z kravských nezralých folikulů, PZ – tekutina z prasečích zralých folikulů, PN – tekutina z prasečích nezralých folikulů, St – Precision plus protein™ standards



obr. 7 Odstranění sérum albuminu na kolonce s Blue Sepharosou - ProteoPrep® Blue Albumin and IgG Depletion Kit s následným barvením stříbrem

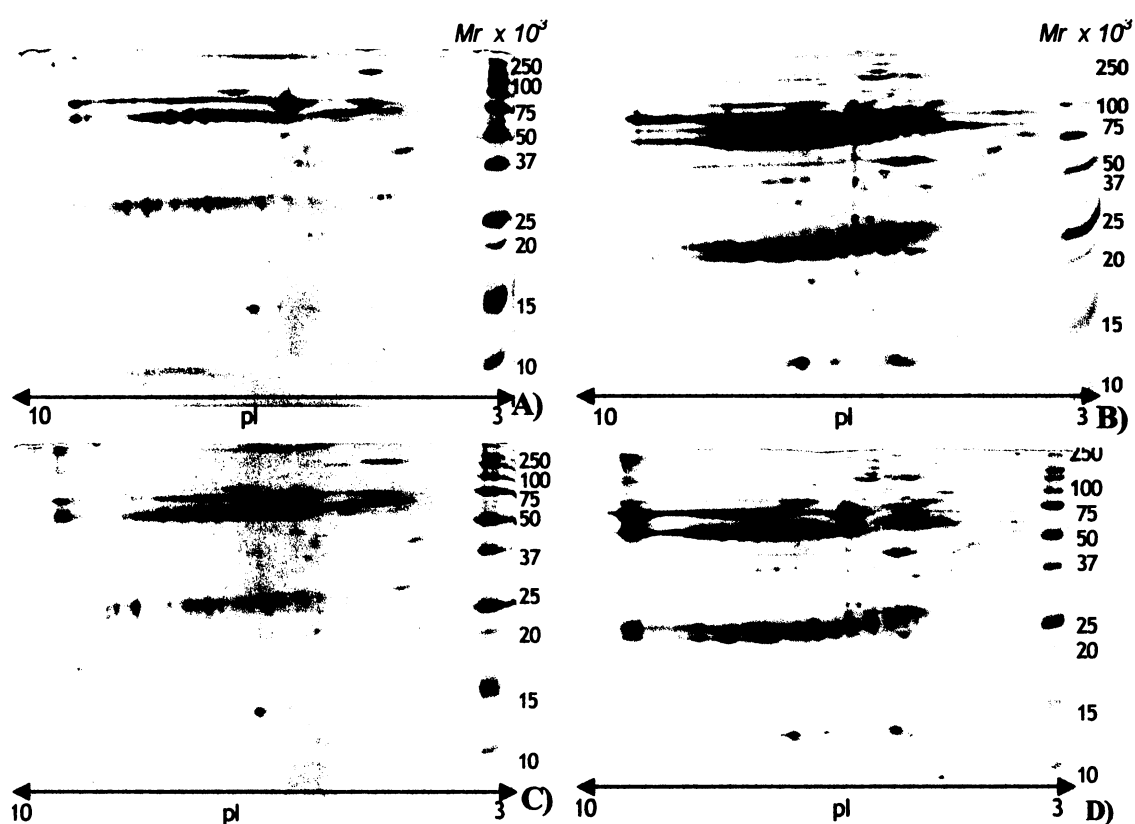
A) eluát vzorku, B) eluát kolony, C) rozsuspendovaná kolona,

Gely byly následně obarveny stříbrem pro lepší vizualizaci proteinů.

KZ – tekutina z kravských zralých folikulů, KN – tekutina z kravských nezralých folikulů, PZ – tekutina z prasečích zralých folikulů, PN – tekutina z prasečích nezralých folikulů, St – Precision plus protein™ standards

3.3.3 2D-elektroforesa

Další použitou metodou k zjištění proteinové charakterizace folikulární tekutiny byla 2D-elektroforesa (kap. 2.4.2). Proteiny folikulární tekutiny ze zralých a nezralých folikulů krávy a prasnice byly rozděleny nejdříve pomocí izoelektrické fokusace dle svého izoelektrického bodu (pI) a následně na SDS-PAGE v 15%-ním separačním gelu podle svých relativních molekulových hmotností (Mr). Gely byly barveny stříbrem. Ve vzorcích jsou viditelné mezidruhové rozdíly v proteinovém složení (obr. 8). Proteiny z kravských vzorků mají spíše neutrální pI, oproti proteinům z prasečích vzorků, které se nacházejí většinou v bazickém pI. Většina proteinů je o Mr větší než 20 000.



obr. 8 2D-elektroforesa vzorků folikulární tekutiny izolované z vaječníků krav a prasnic v různých fázích zrání

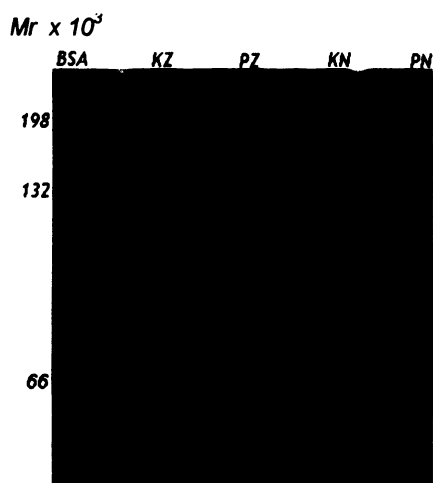
A) tekutiny z kravských zralých folikulů (KZ), B) tekutiny z prasečích zralých folikulů (PZ), C) tekutina z kravských nezralých folikulů (KN), D) tekutina z prasečích nezralých folikulů (PN)

první rozměr dělení dle pI; druhý rozměr SDS-PAGE 15%-ní separační gel; nanášené množství vzorku na první rozměr 100 μ g; nanášené množství standardu 5 μ l

3.3.4 Červená nativní elektroforesa

Proteiny folikulárních tekutin (KZ, KN, PZ a PN) byly dále charakterizovány červenou nativní elektroforesou (RN-PAGE) (kap. 2.4.4). Pro (RN-PAGE) byl připraven 12%-ní separační gel s přidavkem barviva Ponceau S a R. Gely byly barveny v roztoku barviva Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250).

Na *obr. 9* lze pozorovat mezidruhové rozdíly v proteinovém složení folikulární tekutiny, především v oblasti okolo M_r 100 000. V nativním prostředí *obr. 9* se, oproti elektroforesám v denaturujících podmínkách (*obr. 4, str. 39; obr. 5, str. 40; obr. 8, str. 42*), objevují rozdíly u vzorků FF s rozdílným stupněm zrání (KZ a KN, PZ a PN).



obr. 9 RN-PAGE vzorků folikulární tekutiny izolované z vaječníků krav a prasnic v různých fázích zrání

12%-ní separační gel, nanášené množství vzorků rozpuštěných ve vzorkovém pufru byly 3 μ l a standardů (St) bylo 5 μ l; gely vizualizovány CBB R-250

KZ – tekutina z kravských zralých folikulů, KN – tekutina z kravských nezralých folikulů,

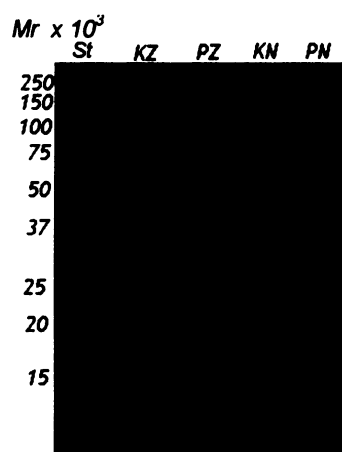
PZ – tekutina z prasečích zralých folikulů, PN – tekutina z prasečích nezralých folikulů,

St – Precision plus proteinTM standards

3.4 Detekce glykoproteinů ve folikulárních tekutinách

3.4.1 Detekce glykoproteinů v gelu

Proteiny FF byly separovány pomocí SDS-PAGE a následně byla provedena detekce na přítomnost glykoproteinů pomocí Glycoprotein Detection Kit od firmy Amersham Biosciences (kap. 2.5.1). Princip této metody je založen na detekci vytvořené Schiffovy báze po oxidaci sacharidových složek glykoproteinů. Na *obr. 10* nejsou viditelné rozdíly v obsahu glykoproteinů mezi vzorky FF ze zralých a nezralých folikulů, ale jsou vidět mezidruhové rozdíly mezi FF. U vzorků FF z kravských folikulů jsou vidět oblasti intenzivní barvy okolo Mr 60 000 a 250 000. U vzorků FF z prasečích folikulů jsou vidět 4 dominantní oblasti intenzity barvy v oblasti okolo Mr 60 000, 70 000, 150 000 a 250 000.



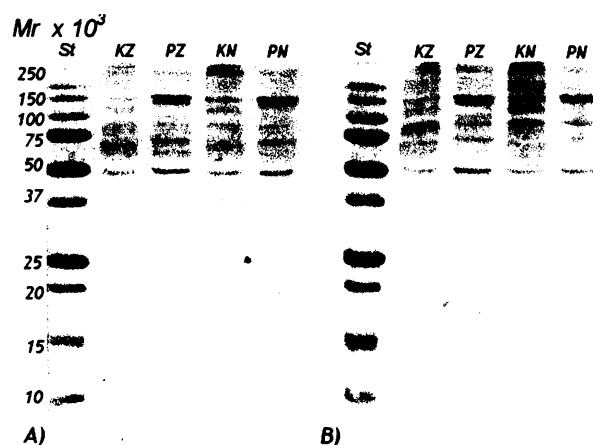
obr. 10 Detekce glykoproteinů FF v gelu po SDS-PAGE

KZ – tekutina z kravských zralých folikulů, KN – tekutina z kravských nezralých folikulů, PZ – tekutina z prasečích zralých folikulů, PN – tekutina z prasečích nezralých folikulů, St – Precision plus proteinTM standards

3.4.1 Detekce glykoproteinů na nitrocelulosové membráně

Pro další detekci glykoproteinů byl použit Immune-Blot[®] Kit od firmy Sigma-Aldrich. Metoda (kap. 2.5.2) je založena na interakci biotinu s avidin-peroxidase. Vizualizovány jsou pak barevné produkty enzymatické reakce se substrátem peroxidasy. Kromě obecné sacharidové struktury byla specificky detekována přítomnost sialových kyselin na terminálním monosacharidu. Ve výsledcích (*obr. 11, str. 45*) jsou příliš patrné rozdíly mezi zralými a nezralými folikuly, což je nejspíš způsobeno SDS použitým při SDS-PAGE (kap. 2.4.1). Z porovnání (*obr. 11A a 11B, str. 45*) vyplývá, že téměř všechny detekované

glykoproteiny jsou sialovány. U vzorků FF z kravských folikulů je vidět relativně souvislá intenzita barvy v oblasti okolo Mr 50-200 000. U vzorků FF z prasečích folikulů jsou vidět 2 dominantní oblasti intenzity barvy v oblasti okolo Mr 50 000 a 150 000. Oproti detekci glykoproteinů v gelu (*obr. 10*), kde jsou u vzorků FF z kravských folikulů detekovány glykoproteiny v oblasti okolo Mr 37 000, všechny detekované glykoproteiny u všech vzorků jsou relativně vysokomolekulární, tedy o Mr větší než 50 000.



obr. 11 Detekce glykoproteinů FF na nitrocelulosové membráně

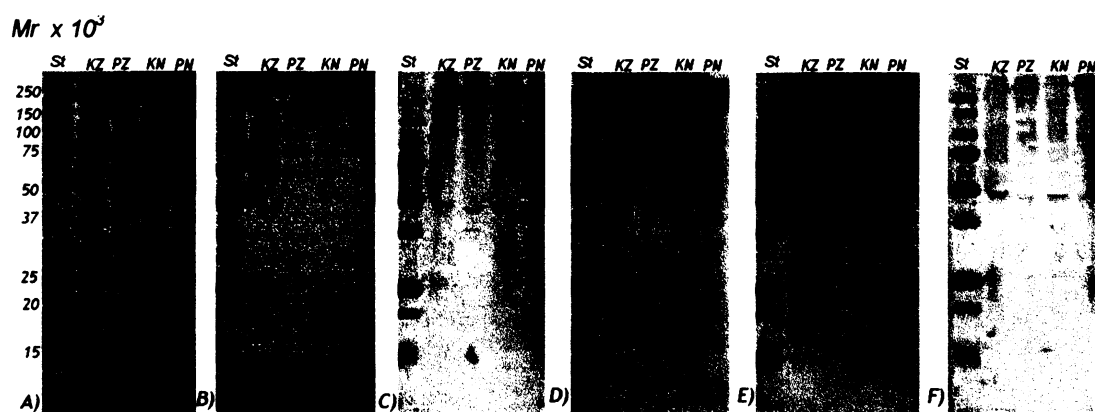
A) celkové sacharidové struktury glykoproteinů, B) sialové kyseliny terminálního monosacharidu

KZ – tekutina z kravských zralých folikulů, KN – tekutina z kravských nezralých folikulů, PZ – tekutina z prasečích zralých folikulů, PN – tekutina z prasečích nezralých folikulů, St – Precision plus proteinTM standards

3.4.2 Detekce sacharidových řetězců pomocí lektinů

Proteiny folikulární tekutiny (KZ, KN, PZ a PN) byly separovány pomocí SDS-PAGE (kap. 2.4.1) a přeneseny na NC-membránu (kap. 2.4.5). Na membráně byly detekovány různé typy sacharidových řetězců glykoproteinů pomocí lektinů značených biotinem (kap. 2.5.3). Míra interakce lektinů ke glykoproteinovým komponentám FF naznačuje obsah určitých sacharidových struktur, které jsou tyto lektiny schopny rozpoznávat. Z výsledků jsou patrné mezidruhové rozdíly, oproti tomu rozdíly mezi zralými a nezralými folikuly nejsou viditelné (*obr. 12, str. 46*). U lektinu DBA (*obr. 12B, str. 46*) se specifitu k α -D-GalNAc, MAA (*obr. 12C*) se specifitu k α -D-Sia-(2-3) a lektinu UEA (*obr. 12F, str. 46*), který má specifitu k α -L-Fuc-(1-2) je interakce k sacharidovým strukturám

slabá. Naproti tomu u Con A (*obr. 12A*), který má sacharidovou specifitu k manosylovým a glukosylovaným strukturám, u lektinu PNA (*obr. 12D*) se sacharidovou specifitou k β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc a u RCA (*obr. 12E*) se specifitou k β -D-Gal-(1-4) je zřejmá silnější interakce těchto lektinů k sacharidovým strukturám. Nejsilněji se váže k sacharidovým strukturám FF lektin RCA.



obr. 12 Detekce sacharidových řetězců glykoproteinů FF na nitrocelulosové membráně

A) Con A; B) DBA; C) MAA; D) PNA; E) RCA; F) UEA

Výsledná intenzita barvy je způsobená množstvím přeměněného substrátu na barevný produkt v místě vazby lektinu.

KZ – tekutina z kravských zralých folikulů, KN – tekutina z kravských nezralých folikulů,

PZ – tekutina z prasečích zralých folikulů, PN – tekutina z prasečích nezralých folikulů,

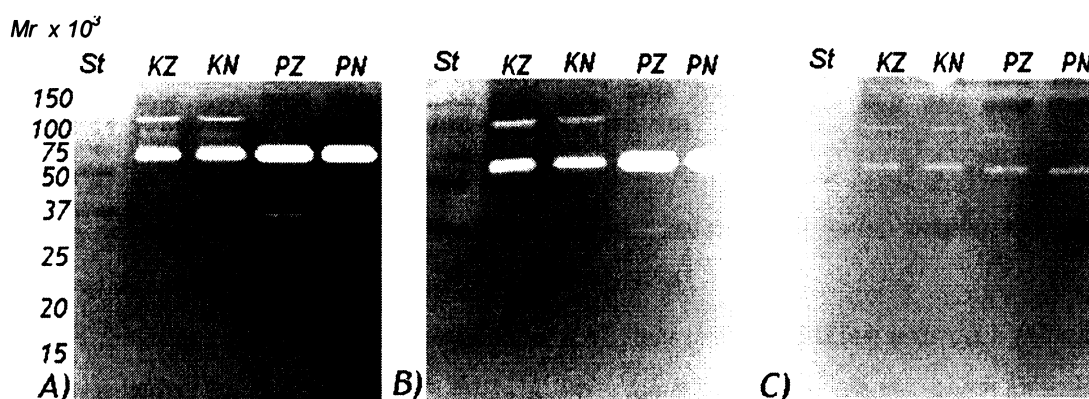
St – Precision plus proteinTM standards

3.5 Enzymatická charakteristika folikulárních tekutin

3.5.1 Detekce proteolytické aktivity

Pro detekci enzymatické aktivity proteas byla použita substrátová zymografie s kopolymerovanou želatinou (kap. 2.6.1.1). Proteiny folikulárních tekutin (KZ, KN, PZ a PN) byly separovány pomocí SDS-PAGE v 15%-ním separačním gelu. Po proběhnutí elektroforesy byly gely inkubovány přes noc při teplotě 37°C v inkubačních roztocích. Pro inhibici serinových proteas byl přidán benzamidin a pro inhibici metaloproteas EDTA. Na *obr. 13A* (*str. 47*) je u celkových proteas patrná dominantní aktivita v oblasti okolo Mr 65 000. Dále jsou vidět jak rozdíly v aktivitě proteas mezi oběma druhy, tak rozdíly

u vzorků s odlišným stupněm zrání. U vzorků z kravské FF je vidět na *obr. 13A* aktivita proteas v oblastech okolo Mr 85 000 a 105 000. U vzorků se zralou prasečí FF byla detekována aktivita v oblasti okolo Mr 37 000. Srovnáním *obr. 13A* a *obr. 13B* lze konstatovat, že většina detekovaných proteas není z rodiny metaloproteas. Oproti aktivitě na *obr. 13A* chybí aktivita na *obr. 13B* v oblasti okolo Mr 85 000 u vzorků kravské FF, která byla zainhibována EDTA. Na *obr. 13C* je vidět rozsáhlejší inhibice aktivity serinových proteas benzamidinem, nejvýraznější pokles intenzity je u prasečích vzorků FF v oblasti okolo Mr 65 000. Zcela zainhibovaná je aktivita v oblasti okolo Mr 37 000 u vzorku ze zralých FF prasnic.



obr. 13 Substrátová zymografie pro detekci aktivity proteas

A) celkové proteasy, B) bez metaloproteas a C) bez serinových proteas

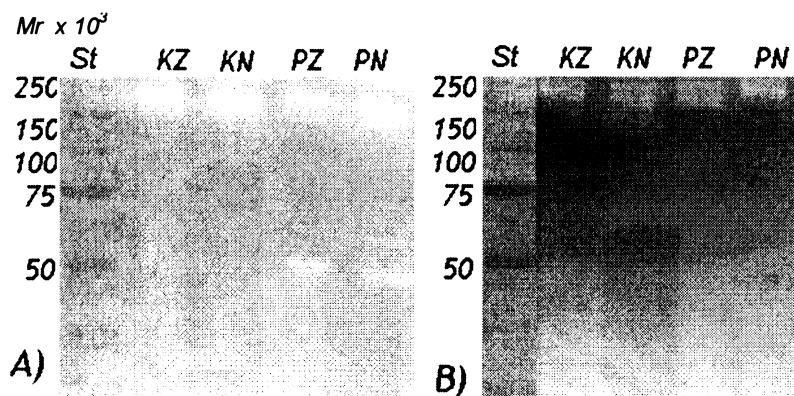
15%-ní separační gel, inkubace v roztoku A) s inhibítozem pro zjištění celkových proteas, B) s inhibítozem metaloproteas a C) s inhibítozem serinových proteas

KZ – tekutina z kravských zralých folikulů, KN – tekutina z kravských nezralých folikulů, PZ – tekutina z prasečích zralých folikulů, PN – tekutina z prasečích nezralých folikulů, St – Precision plus proteinTM standards

3.5.2 Detekce hyaluronidasové aktivity

Pro detekci enzymatické aktivity ve FF (KZ, KN, PZ a PN) hyaluronidas byla použita SDS-PAGE s 10%-ním separačním gelem (kap. 2.6.1.2). Po proběhnutí elektroforesy byly gely inkubovány přes noc při teplotě 37°C v inkubačních roztocích o různém pH. Na *obr. 14A* (*str. 48*) v kyselém i neutrálním pH *obr. 14B* (*str. 48*) je vidět dominantní aktivita

v oblasti okolo Mr 240 000. U vzorků prasnic v kyselém pH *obr. 14A* byla detekovaná aktivita v oblasti okolo Mr 50 000.



obr. 14 Substrátová zymografie pro detekci hyaluronidasy

A) v pH 3,7; B) v pH 7,4

10%-ní separační gel, použit hyaluronan jako substrát do gelu, inkubace v pufrech o kyselém (A) či neutrálním (B) pH 15 hodin při 37°C.

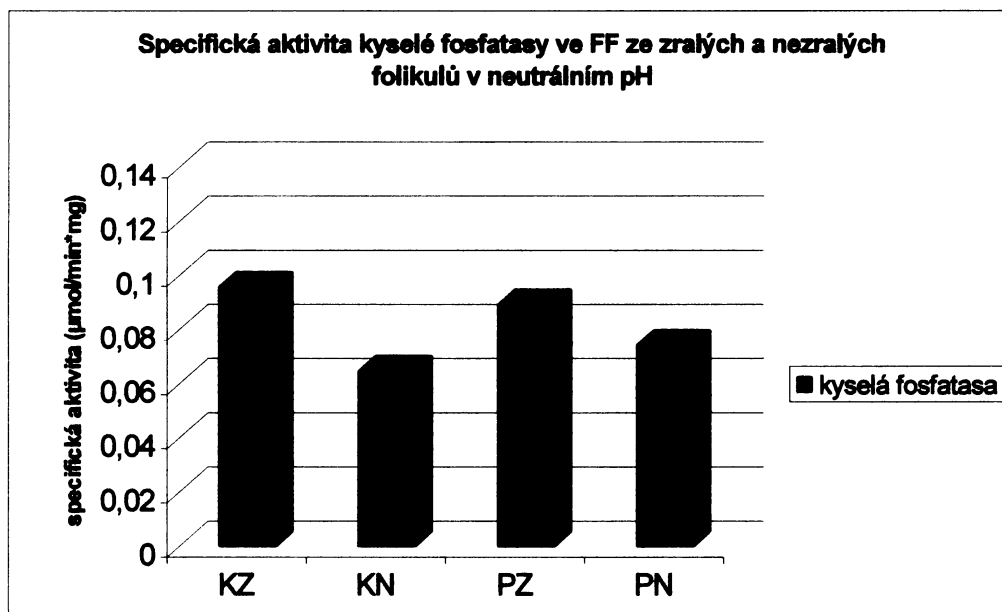
KZ – tekutina z kravských zralých folikulů, KN – tekutina z kravských nezralých folikulů,

PZ – tekutina z prasečích zralých folikulů, PN – tekutina z prasečích nezralých folikulů,

St – Precision plus protein™ standards

3.5.3 Detekce specifické aktivity kyselé fosfatasy

Pro stanovení specifické aktivity kyselé fosfatasy ve FF (KZ, KN, PZ a PN) bylo použito kolorimetrické metody v roztoku v kyselém a neutrálním pH (kap. 2.6.2). Stanovili jsme specifickou aktivitu jak v kyselém pH, tedy v pH optimu tohoto enzymu i v pH neutrálním, tedy fyziologickém. Výpočet specifické aktivity jsme provedli jako množství přeměněného substrátu (μmol) za čas (min). Tuto hodnotu jsme vztáhli na mg proteinu ve FF, stanoveného pomocí metody srážení síranem amonným (*tab. 1, str. 38*) (kap. 2.3.2). V grafu (*obr. 15, str. 49*) jsou patrné jak mezidruhové rozdíly ve specifické aktivitě, tak rozdíly mezi aktivitami mezi vzorky FF ze zralých a nezralých folikulů. Nejvyšší specifická aktivita byla stanovena u vzorků FF z folikulů o vyšším stupni zrání KZ a PZ. Z těchto dvou vzorků vykazuje nejvyšší specifickou aktivitu vzorek FF ze zralých kravských folikulů (KZ), naopak nejnižší specifická aktivita byla určena u vzorku FF z nezralých kravských folikulů (KN).



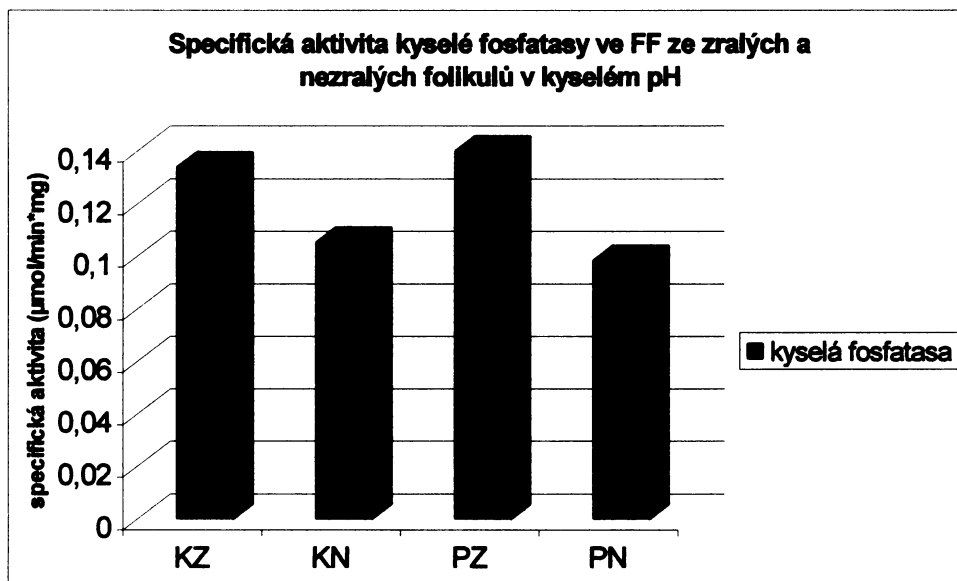
obr. 15 Specifická aktivita kyselých fosfatasy v neutrálním pH

Vzorky nativní folikulární tekutiny byly inkubovány ve fosfátový pufr pH 7 inkubace probíhala 1 minutu při laboratorní teplotě, aktivita byla vztažena na mg proteinu

KZ – tekutina z kravských zralých folikulů, KN – tekutina z kravských nezralých folikulů,

PZ – tekutina z prasečích zralých folikulů, PN – tekutina z prasečích nezralých folikulů

V grafu (obr. 16, str. 50) jsou zřetelně vyšší hodnoty specifické aktivity kyselých fosfatasy oproti stanovení v neutrálním pH (obr. 15), z důvodu změny pH použitého pufru z neutrálního na kyselý. Na grafu (obr. 16, str. 50) jsou vidět jak mezidruhové rozdíly ve specifické aktivitě, tak rozdíly mezi aktivitami mezi vzorky FF ze zralých a nezralých folikulů, kde dominuje aktivita vzorků FF ze zralých folikulů KZ a PZ. Nejvyšší specifická aktivita byla stanovena u vzorku FF ze zralých prasečích folikulů (PZ), naopak nejnižší specifická aktivita byla určena u vzorku FF z nezralých folikulů stejného druhu (PN).



obr. 16 Specifická aktivita kyselých fosfatasy v kyselém pH

Vzorky nativní folikulární tekutiny byly inkubovány v citrát-fosfátovém pufru pH 4,5, inkubace probíhala 1 minutu při laboratorní teplotě, aktivita byla vztahována na mg proteinu.

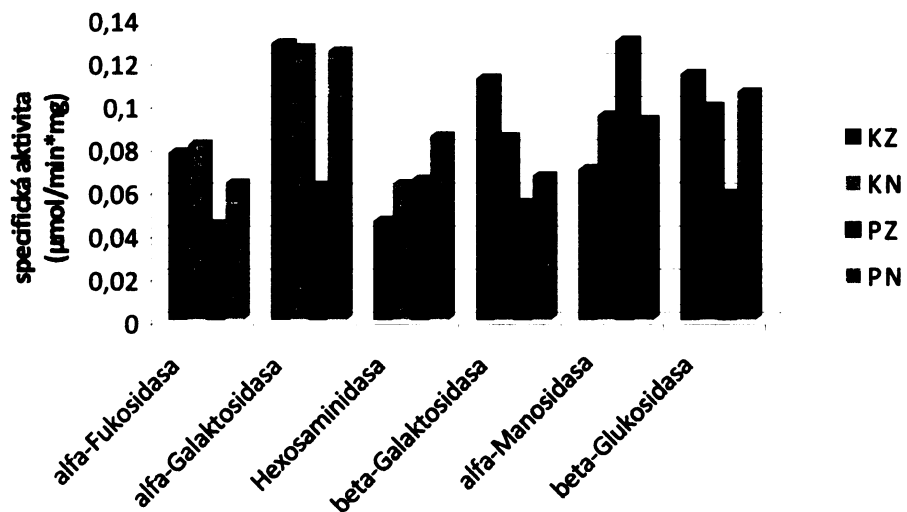
KZ – tekutina z kravských zralých folikulů, KN – tekutina z kravských nezralých folikulů,

PZ – tekutina z prasečích zralých folikulů, PN – tekutina z prasečích nezralých folikulů

3.5.4 Stanovení specifické aktivity glykosidas ve FF

Byly stanoveny specifické aktivity glykosidas (α -fukosidasy, α -galaktosidasy, hexosaminidasy, β -galaktosidasy, α -manosidasy a β -glukosidasy) ve FF (KZ, KN, PZ a PN) pomocí kolorimetrické metody v roztoku (kap. 2.6.3) v neutrálním a kyselém pH. Výpočet specifické aktivity jsme provedli jako množství přeměněného substrátu (μmol) za čas (min). Tuto hodnotu jsme vztáhli na mg proteinu ve FF, stanoveného pomocí metody srážení síranem amonným (tab 1, str. 38) (kap. 2.3.2). V grafu (obr. 17, str. 51) jsou patrné značné mezidruhové rozdíly ve specifické aktivitě u všech zkoumaných glykosidas. Nejvyšší rozdíly jsou patrné u α -fukosidasy, β -galaktosidasy a α -manosidasy. Nejvyšší specifická aktivita byla detekována ve FF ze zralých prasečích folikulů u α -manosidasy. Vysoká specifická aktivita byla dále stanovena u α -galaktosidasy ve vzorcích FF ze zralých i nezralých kravských folikulů a z nezralých prasečích folikulů. Značné rozdíly jsou v hodnotách specifických aktivit všech zkoumaných glykosidas v porovnání FF ze zralých a nezralých folikulů.

Specifická aktivita glykosidas ve FF ze zralých a nezralých folikulů v kyselém pH



obr. 17 Specifická aktivita glykosidas v kyselém pH

Vzorky nativní folikulární tekutiny byly inkubovány ve fosfátový pufr pH 7, inkubace probíhala 15 hodin při 37°C, aktivita byla vztažena na mg proteinu.

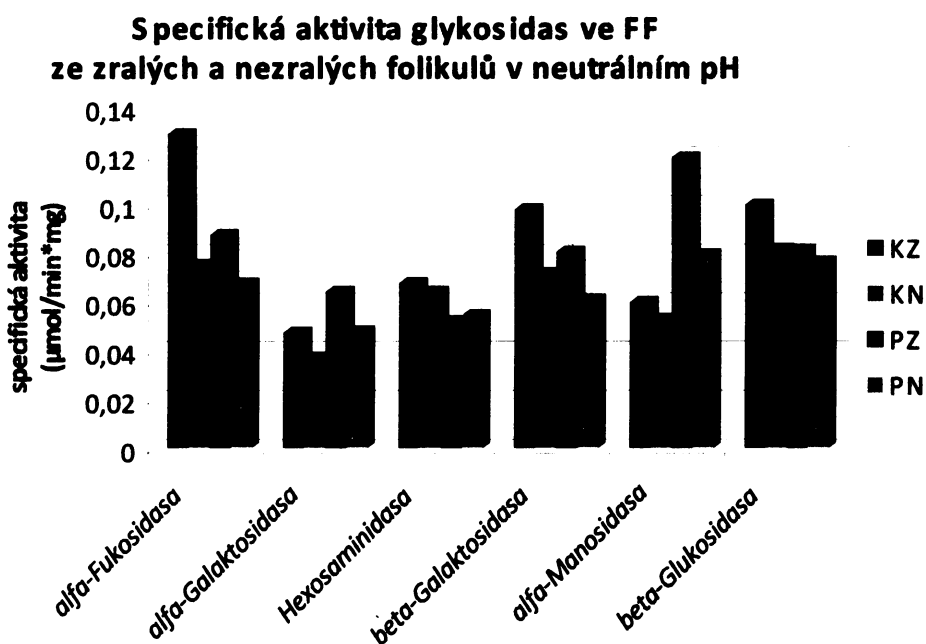
KZ – tekutina z kravských zralých folikulů, KN – tekutina z kravských nezralých folikulů,

PZ – tekutina z prasečích zralých folikulů, PN – tekutina z prasečích nezralých folikulů

Stejně jako v kyselém pH (*obr. 17*), v grafu vyjadřující specifickou aktivitu vybraných glykosidas v neutrálním pH (*obr. 18, str. 52*) jsou zřetelné značné mezidruhové rozdíly. Nejvyšší rozdíly jsou patrné u α -fukosidas, β -galaktosidas a α -manosidas. Nejvyšší specifická aktivita byla detekována ve FF ze zralých kravských folikulů u α -fukosidas. Vysoká specifická aktivita byla dále stanovena u α -manosidas ve FF ze zralých prasečích folikulů. Značné rozdíly jsou v hodnotách specifických aktivit všech zkoumaných glykosidas v porovnání FF ze zralých a nezralých folikulů. U α -fukosidas je patrný nejvyšší nárůst při porovnání specifické aktivity vzorků FF nezralých a zralých kravských folikulů. U α -manosidas je naopak patrný nejvyšší nárůst při porovnání specifické aktivity vzorků FF nezralých a zralých prasečích folikulů.

Porovnáním specifických aktivit v kyselém (*obr. 17*) a v neutrálním (*obr. 18, str. 52*) pH lze konstatovat, nejvyšší nárůst v případě α -fukosidas v neutrálním pH oproti kyselému pH a to především u vzorků FF ze zralých kravských folikulů. Naopak u α -galaktosidas je patrný nejvyšší pokles v neutrálním pH oproti kyselému pH, a to

u všech zkoumaných vzorků FF (KZ, KN a PN), mimo vzorku ze zralých prasečích folikulů (PZ).



obr. 18 Specifická aktivita glykosidas v neutrálním pH

Vzorky nativní folikulární tekutiny byly inkubovány v citrátovém pufru pH 4,5, inkubace probíhala 15 hodin při 37°C, aktivita byla vztažena na mg proteinu.

KZ – tekutina z kravských zralých folikulů, KN – tekutina z kravských nezralých folikulů, PZ – tekutina z prasečích zralých folikulů, PN – tekutina z prasečích nezralých folikulů

4 Diskuse

Proces reprodukce je komplexní děj složený z mnoha po sobě jdoucích kroků, které se musejí odehrát ve správném čase, místě a za správných podmínek. Jednou z důležitých událostí je setkání vajíčka a spermie v oviduktu. Vajíčko je vejcovodem transportováno spolu s folikulární tekutinou, jež se průchodem oviduktem mísí s tekutinou oviduktální.

Folikulární tekutina (FF) obklopuje zrající oocyt během jeho folikulárního vývoje ve vaječniku. Z hlediska složení je folikulární tekutina tvořena především filtrátem z krevní plasmy a tudíž se její složení a proteinová koncentrace příliš od plasmy neliší. Hodnota koncentrace proteinů ve FF, popsána v dostupných publikacích a stanovená metodou BCA se pohybuje okolo 58 mg/ml [38] a tato hodnota se námi provedenými metodami, především pak postupným srážením síranem amonným (*tab. 1, str. 38*), potvrdila. Přičemž vyšší koncentraci proteinů jsme stanovili ve FF ze vzorků nezralých folikulů (*tab. 1, str. 38*). Dominantním proteinem ve FF je sérum albumin [39], pravděpodobně odpovídá proteinu s Mr okolo 55 000 v neredukujících podmínkách na elektroforeogramu SDS-PAGE (*obr. 4, str. 39*), jehož Mr v redukujícím prostředí odpovídá jeho skutečné molekulové hmotnosti 67 000 (*obr. 5, str. 40*). Jako dominantní se jeví také při nativní separaci proteinů pomocí RN-PAGE (*obr. 8, str. 42*). Většina proteinů FF u obou studovaných druhů je vysokomolekulární s Mr nad 40 000.

Folikulární tekutina kromě sérového albuminu obsahuje celou řadu enzymů původem ze séra (*cit*). V naší práci jsme sledovali aktivity proteas, kyselých fosfatasy a různých glykosidas (hyaluronidasy, hexosaminidasy, α -manosidasy, α -fukosidasy, β -glukosidasy, α - a β -glykosidasy) jak ve folikulární tekutině zralých, tak i nezralých folikulů. Porovnání proteinového složení FF pomocí různých biochemických metod (SDS-PAGE, nativní RN-PAGE, 2D-elektroforesy) ukázalo, že ve zralých i nezralých folikulech, resp. tekutinách, jsou přítomné analogické proteiny v přibližně si odpovídajících koncentracích. Také detekce sacharidových struktur glykoproteinů FF zralých a nezralých folikulů pomocí interakce s různými typy lektinů odhalila, že glykosylace proteinů obou typů FF se neliší a dále že proteiny FF jsou poměrně bohatě glykosylovány. Největší interakce byla zaznamenána s lektinem RCA rozpoznávajícím β -D-Gal-(1-4). Mezi další nejvíce zastoupené sacharidové struktury patří glukosylové, manosylové a β -D-galaktosa spojená s α -D-N-acetylgalaktosaminem detekované pomocí lektinů Con A a PNA. Ačkoliv nebyly nalezeny rozdíly v obsahu glykoproteinů a sacharidových struktur u FF z nezralých a

zralých folikulů, obsah glykoproteinů se jeví jako mezidruhově odlišný. Oproti tomu, při porovnání aktivity glykolytických enzymů zralých a malých folikulů se ukázalo, že folikulární tekutina zralých folikulů má při fyziologickém pH vyšší aktivitu všech námi studovaných glykosidas. Aktivita jiných enzymů jako proteas nebo hyaluronidasy se podstatně nemění se zráním folikulu. Výše popsané změny aktivity mohou být dány do souvislosti jednak s usnadněním degradace mezibuněčné matrix stěn folikulů, mohou se ovšem také podílet na změnách sacharidových epitopů oviduktálních epitelů, které s touto tekutinou vešly do styku.

Jedním z dosud ne zcela objasněných mechanismů v průběhu reprodukce je uvolnění spermie z oviduktálního rezervoáru. Vazba spermie k oviduktálnímu epitelu je zprostředkována interakcí lektinového typu protein-sacharid [17]. U prasat je za tuto vazbu nejspíše zodpovědná molekula AQN 1 spermadhesinu na povrchu spermie a galaktosylové či manosylové struktury na povrchu buněk oviduktálního epitelu [20, 21]. U krav se této interakce pravděpodobně účastní PDC-109 vázaný na spermii a L-fukosa sacharidových řetězců oviduktálního epitelu [18, 19]. Je možné, že za uvolněním spermie stojí ztráta schopnosti vazby spermie k oviduktu, k níž může dojít v důsledku enzymatického opracování epitelu oviduktu zvýšenou aktivitou příslušných glykosidas. Zvýšená aktivita některých glykosidas byla prokázána u skotu a prasat v oviduktální tekutině po ovulaci [53, 54]. Otázkou je, zda zvýšení aktivity souvisí se zvýšenou expresí glykosidas v oviduktu během ovulace nebo ke zvýšení enzymatické aktivity přispívají také glykosidasy pocházející z folikulární tekutiny. Z našich výsledků vyplývá, že aktivita určitých glykosidas stanovená ve fyziologickém pH je značně druhově specifická. Největší rozdíly ve specifické aktivitě mezi vzorky FF z nezralých a zralých folikulů byly nalezeny v případě α -fukosidasy u krávy a α -manosidasy u prasnice. Tento fakt naznačuje, že by se glykosidasy, přítomné ve FF a přicházející do oviduktu společně s ovulovaným oocytem, mohly podílet na druhově specifickém uvolňování spermií z oviduktálního rezervoáru. Potvrzení této hypotézy by mohla přinést genová exprese glykosidas v oviduktální tkáni v různých fázích cyklu samice.

Zahrnutí působení komponent folikulární tekutiny do událostí ovlivňujících setkání spermie a vajíčka sice na jedné straně zvyšuje množství na reprodukci se podílejících faktorů a komplikuje pohled na tento děj, na druhé straně však navíc přináší nové experimentálně podpořené hypotézy umožňující objasnit dosud ne zcela prozkoumaný mechanismus jednoho z kroků reprodukčního procesu.

5 ZÁVĚR

1. Byla izolovaná folikulární tekutina (FF) ze zralých a nezralých folikulů prasnice a krávy. Následně byla provedena proteinová charakterizace FF pomocí SDS-PAGE a 2D-elektroforesy. Byly pozorovány mezidruhové rozdíly v proteinových profilech. Naopak se nepodařilo zaznamenat rozdíly v proteinovém složení u FF ze zralých a nezralých folikulů.
2. Dalšími metodami charakterizace FF byla detekce glykoproteinů a sacharidových motivů pomocí lektinů. Podobně jako u proteinového složení nebyly prokázány žádné viditelné rozdíly v sacharidovém složení mezi FF z nezralých a ze zralých folikulů, a to jak při použití metod detekce v gelu, tak i na membráně. Stejně jako u proteinových profilů byly zaznamenány mezidruhové rozdíly. Významné rozdíly bylo možné sledovat u detekce sacharidových struktur pomocí Con A, který má sacharidovou specifitu k manosylovým a glukosylovaným strukturám, dále u detekce pomocí DBA, který má sacharidovou specifitu k α -D-GalNAc a u detekce pomocí PNA, který má svou specifitu k β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc.
3. Provedli jsme studium enzymatických aktivit pomocí zymografických metod. Byla nalezena proteolytická aktivita u všech zkoumaných vzorků (KZ, KN, PZ a PN). Jsou patrné rozdíly v aktivitě proteas jak mezi oběma druhy (kráva a prasnice), tak rozdíly u vzorků FF s odlišným stupněm zrání folikulu (zralé a nezralé). Nejvyšší aktivita byla pozorována u celkových proteas v oblasti okolo Mr 65 000. Největší mezidruhový rozdíl byl detekován u celkových proteas a při inhibici proteas EDTA, tedy při detekci proteas nemetalového typu. Byla detekována aktivita hyaluronidasy v kyselém pH v okolí Mr 240 000 u všech zkoumaných vzorků (KZ, KN, PZ a PN) a v oblasti okolo Mr 50 000 u vzorků FF z prasečích folikulů. V neutrálním pH byla pozorována aktivita v okolí Mr 240 000 u všech zkoumaných vzorků (KZ, KN, PZ a PN).
4. Byla stanovena specifická aktivita glykosidas (α -fukosidas, α -galaktosidas, hexosaminidas, β -galaktosidas, α -manosidas a β -glukosidas) ve FF pomocí

kolorimetrické metody v pH kyselém a neutrálním, tedy fyziologickém. V obou pH jsou patrné značné mezidruhové rozdíly ve specifické aktivitě u všech zkoumaných glykosidas. Porovnáním specifických aktivit v kyselém a v neutrálním pH jsme zjistili nejvyšší nárůst v případě α -fukosidasy u KZ v neutrálním pH oproti kyselému. Naopak u α -galaktosidasy (KZ, KN a PN) je patrný nejvyšší pokles v neutrálním pH oproti kyselému pH. Nejvyšší specifická aktivita u vzorků FF z prasnic byla detekována ve FF ze zralých prasečích folikulů (PZ) u α -manosidasy v kyselém i neutrálním pH. Aktivitu této glykosidasy lze považovat za dominantní ve FF u tohoto savčího druhu. U vzorků ze zralých kravských folikulů byla nalezena nejvyšší specifická aktivita v neutrálním (fyziologickém) pH u α -fukosidasy, která se jeví jako nejaktivnější ve FF u tohoto druhu.

6 Literatura

1. Romanovský, A. a kol.: *Obecná biologie*, SPN, Praha (1988)
2. Knoz, J.: *Obecná zoologie II*, SPN, Praha (1990)
3. Majzlík, I.: *Chov zvířat I*, Česká zemědělská univerzita, Agronomická fakulta (2003)
4. Wessells, N.K., Hopson, J.L.: *Animal Development*, v knize *Biology*, 1st edition, Random House, Inc., kapitola 16 (1988)
5. Yanagimachi, R.: *Mammalian Fertilization*, v knize *The Physiology of Reproduction*, vol. 1, 2nd edition (Knobil, E., Neill, J.D.), Raven Press, Ltd., New York (1994)
6. Evans, J.P., Florman, H.M.: *Nature Medecine* **8**, 57-63 (2002)
7. <http://www.anselm.edu/homepage/jpitocch/genbio/follicledevelop.jpg>
8. Wassarman, P.M.: *Ann Rev Biochem* **57**, 415-442 (1988)
9. Wassarman, P.M.: *Develop* **108**, 1-17 (1990)
10. Wassarman, P.M.: *Mt. Sinai. J. Med.* **69**, 148-55 (2002)
11. Wassarman, P.M.: *Molecular and endocrine events in male reproduction*. In: Nieschlag, E., Habenicht, U-F (eds) *Spermatogenesis, fertilization, contraception*. Springer, Berlin, 345-366 (1992)
12. Hedrick, J.L., Wardrip, N.J.: *Anal Biochem* **157**, 63-70 (1986)
13. Topper, E.K., Kruijt, L., Calvete, J., Mann, K., Töpfer-Petersen, E., Woelders, H.: *Mol Reprod Dev.* **46**, 344-50 (1997)
14. Cooper, T.G.: *The Epididymis, sperm maturation and fertilization*, Springer-Verlag, Berlin (1986)
15. Guraya, S.S.: *Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1987)
16. Töpfer-Petersen, E., Wagner, A., Friedrich, I., Petrunkina, A., Ekhlasi-Hundrieser, M., Waberski, M., Drommer, W.: *J. Exp. Zool.* **292**, 210–215 (2002)
17. Diekman, A.B.: *Cell Mol Life Sci.* **60**, 298-308 (2003)

18. Lefebvre, R., Lo, M.C., Suarez, S.S.: *Biol Reprod.* 56, 1198-204 (1997)
19. Ignatz, G.G., Lo, M.C., Perez, C.L., Gwathmey, T.M., Suarez, S.S.: *Biol Reprod.* 64, 1806-11 (2001)
20. Ekhlesi-Hundrieser, M., Gohr, K., Wagner, A., Tsoлова, M., Petrunkina, A., Töpfer-Petersen, E.: *Biol Reprod.* 73, 536-45 (2005)
21. Liberda, J., Maňásková, P., Prelovská, L., Tichá, M., Jonáková, V. J.: *Reprod Immunol.* 71, 112-25 (2006)
22. Suarez, S.S.: *Cells Tissues Organs* 168, 105-112 (2001)
23. Smith, T.T., Yanagimachi, R.: *J. Reprod. Fertil.* 91, 567-573 (1991)
24. Suarez, S.S.: *Int J Dev Biol.* 52, 455-62 (2006)
25. Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Moore, G.D., Bailey, J.L., Ning, X., Fornes, M., Kopf, G.S.: *J. Androl.* 19, 242-248 (1998)
26. Cross, N.L.: *Biol. Reprod.* 59, 7-11 (1998)
27. Fazeli, A., Duncan, A.E., Watson, P.F., Holt, W.V.: *Biol. Reprod.* 60, 879-886 (1999)
28. Suarez, S.S., Ho, H.C.: *Reprod. Dom. Anim.* 38, 119-124 (2003)
29. Mossman, H.W., Duke, K.L.: *Comparative morphology of the mammalian ovary*, Univ Wisconsin Press, Madison, (1973)
30. Mc Natty, K.P., Jones, R.E.: *The vertebrate ovary*, Plenum Press, New York, 215 – 259, (1978)
31. Eisenbach, M., Giojalas, L.C.: *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7, 276-85 (2006)
32. Teves, M.E., Barbano, F., Guidobaldi, H.A., Sanchez, R., Miska, W., Giojalas, L.C.: *Fertil Steril.* 86, 745-9 (2006)
33. Ralt, D., Manor, M., Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I., Ben-Shlomo, I., Makler, A., Yuli, I., Dor, J., Blumberg, S., Mashiach, S.: *Biol Reprod.* 50, 774-85 (1994)
34. Serrano, H., Canchola, E., García-Suárez, M.D.: *Biochem Biophys Res Commun.* 283, 782-4 (2001)
35. Yao, Y., Ho, P., Yeung, W.S.: *Fertil Steril.* 73, 680-6 (2000)

36. Guraya, S.S.: Follicular fluid, v knize: Biology of Ovarian Follicles in Mammals, Springer-Verlag, Berlin Hedelberg (1985)
37. Lipner, H. Estwood, E.B., Greep, R.: Handbook of physiology-endocrinology, vol II, sect. 7, Am Physiol Soc, Washington DC, 409 – 437 (1973)
38. Gwatkin, R.B.L., Motta, P.M., Hafez, E.S.E.: Biology of the ovary, Nijhoff, The Hague, 209 – 214, (1980)
39. Mc Natty, K.P., Makris, A., Osathanondh, R., Ryan, K.J.: J Clin Endocrinol Metab, 49, 851, (1980)
40. Edwards, R.G.: J Reprod Fertil. 37, 189 (1974)
41. Talbot, P., Shur, B.D., Myles, D.G.: Biol Reprod. 68, 1-9 (2003)
42. Töpfer-Petersen, E., Ekhlasi-Hundrieser, M., Tsolova, M.: Int J Dev Biol. 52, 717-36 (2008)
43. Shur, B.D.: Int J Dev Biol. 52, 703-15 (2008)
44. Tulsiani, D.R., NagDas, S.K., Skudlarek, M.D., Orgebin-Crist, M.C.: Dev Biol. 167, 584-95 (1995)
45. Lum, L., Blobel, C.P.: Dev Biol. 191, 131-45 (1997)
46. Bi, M., Hickox, J.R., Winfrey, V.P., Olson, G.E., Hardy, D.M.: Biochem J. 375, 477-88 (2003)
47. Thimon, V., Métayer, S., Belghazi, M., Dacheux, F., Dacheux, J.L., Gatti, J.L.: Biol Reprod. 73, 881-90 (2005)
48. Tulsiani, D.R., Orgebin-Crist, M.C., Skudlarek, M.D.: J Reprod Fertil Suppl. 53, 85-97 (1998)
49. Tulsiani, D.R.: Microsc Res Tech. 61, 18-27 (2003)
50. Taitzoglou, I.A., Kokoli, A.N., Killian, G.J.: Int J Androl. 30, 108-14 (2003)
51. Tulsiani, D.R., Chayko, C.A., Orgebin-Crist, M.C., Araki, Y.: Biol Reprod. 54, 1032-7 (1996)
52. Lefebvre, R., Lo, M.C., Suarez, S.S.: Biol Reprod. 56, 1198-204 (1997)

53. Carrasco, L.C., Romar, R., Avilés, M., Gadea, J., Coy, P.: *Reproduction*. 136, 833-42 (2008)
54. Carrasco, L.C., Coy, P., Avilés, M., Gadea, J., Romar, R.: *Reprod Fertil Dev*. 20, 808-17 (2008)
55. McCormack, R.T., Rittenhouse, H.G., Finlay, J.A., Sokoloff, R.L., Wang, T.J., Wolfert, R.L., Lilja, H., Oesterling, J.E.: *Urology* 45, 729-44 (1995)
56. Metayer, S., Dacheux, F., Dacheux, J.L., Gatti, J.L.: *Biol. Reprod.* 66, 1219–1229 (2002)
57. Barros, C., Crosby, J.A., Moreno, R.D.: *Cell Biol. Int.* 20, 33–39 (1996)
58. Baba, T., Watanabe, K., Kashiwabara, S.I., Aray, Y.: *FEBS Lett.* 244, 296–300 (1989)
59. Lilja, H., Oldbring, J., Rannevik, G., Laurell, C.B.: *J Clin Invest* 80, 281-285 (1987)
60. Malm, J., Hellmann, J., Magnusson, J., Laurell, C.B., Lilja, H.: *Eur J Biochem* 238, 48-53 (1996)
61. Lilja, H.: *World J Urol* 11, 188-191 (1993)
62. Vincent, J.B., Crowder, M.W., Averill, B.A.: *Trends Biochem Sci* 17, 105–110 (1992)
63. Van Eten, R.L.: *Ann NY Acad Sci* 390, 27-51 (1982)
64. McTigue, J.J., Van Eten, R.L.: *Biochim Biophys Acta* 523, 407-21 (1978)
65. Van Eten, R.L., Davidson, R., Stevis, P.E., MacArthur, H., Moore, D.L.: *J Biol Chem* 266, 2313-19 (1991)
66. Foti, A.G., Herschman, H., Cooper, J.F.: *Cancer Res* 37, 4120-24 (1977)
67. Meng, T.C., Lin, M.F.: *J Biol Chem* 273, 22096–22104 (1998)
68. Lin, Y., Kimmel, L.H., Myles, D.G., Primakoff, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 10071-10075 (1993)
69. Meyer, M.F., Kreil, G., Aschauer, H.: *FEBS Letters* 413, 385-388 (1997)
70. Day, A.E., Quilter, C.R., Sargant, C.A., Mileham, A.J.: *Anim. Genet.* 33, 211-214 (2002)
71. Lathrop, W.P., Carmichael, E.P., Myles, D.G., Primakoff, P.: *J. Cell Biol.* 111, 2939-2949 (1990)

72. Hunnicutt, G.R., Primakoff, P., Myles, D.G.: *Biol. Reprod.* 55, 80-86 (1996)
73. Cherr, G.N., Yudin, A.I., Overstreet, J.W.: *Matrix Biol.* 20, 515-525 (2001)
74. Berger, T., Clegg, E.D.: *J. Anim. Sci.* 60, 1295-1302 (1985)
75. Abdul-aziz, M., MacLusky N.J., Bhavnani, B.R., Casper, R.F.: *Fertil. Steril.* 64, 1147-1153, (1995)
76. Gabler, C., Killian, G.J., Einspanier, R.: *Reproduction* 122, 121–130 (2001)
77. Duncan, W.C., McNeilly, A.S., Illingworth, P.J.: *J Clin Endocrinol Metab* 83, 2470–8 (1998)
78. Laemmli, U.K.: *Nature* 227, 680-685 (1970)
79. Rauscher, E.: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 4, VCH, Weinheim, 157–161 (1984)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a přímení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka