

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**IZOLACE PROTEINŮ Z OVIDUKTÁLNÍ TEKUTINY KRÁVY AFINITNÍ  
CHROMATOGRÁFÍ NA DNA-CELULOSE**

Isolation of proteins from bovine oviductal fluid by affinity chromatography  
on DNA-cellulose

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Řešitel: Rozálie Litváková

Školitel: RNDr. Jiří Liberda, Ph.D.

Praha 2012

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Jiřího Liberdy, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Jsem si vědoma 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

Podpis:

### **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi byli jakkoli nápomocni při tvorbě mé bakalářské práce. Především mému školiteli RNDr. Jiřímu Liberdovi, Ph.D. za poskytnutí cenných rad, za trpělivost při vedení mé práce a pomoc při jejím formálním zpracování. Za rady při úpravách práce děkuji také paní prof. RNDr. Marii Tiché, CSc.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Petru Přikrylovi, Ph.D. za provedení metody MALDI-TOF MS.

V neposlední řadě děkuji kolegyním za příjemnou spolupráci a zvláštní poděkování patří mé rodině a blízkým za podporu a pochopení při mé cestě za vzděláním.

# Obsah

<b>Obsah .....</b>	<b>4</b>
<b>Abstrakt .....</b>	<b>6</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>7</b>
<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>8</b>
<b>1 Úvod .....</b>	<b>9</b>
1.1 Reprodukční trakt krávy .....	9
1.1.1 Vaječníky .....	10
1.1.2 Vejcovody .....	10
1.1.3 Děloha .....	11
1.1.4 Pochva a poševní předsíň.....	11
1.2 Reprodukční cyklus .....	12
1.3 Oplodnění.....	12
1.3.1 Oogeneze .....	12
1.3.2 Příprava spermií a fúze s vajíčkem.....	13
1.4 Ovidukální tekutina.....	14
1.4.1 Proteiny oviduktání tekutiny.....	15
1.4.1.1 Inhibitory proteas .....	15
1.4.1.2 Glykoproteiny.....	16
1.5 Antimikrobiální aktivita.....	17
1.6 Cíl práce .....	18
<b>2 Materiál a metody .....</b>	<b>19</b>
2.1 Použitý materiál .....	19
2.1.1 Chemikálie .....	19
2.1.2 Biologický materiál.....	20
2.1.3 Další materiál.....	20
2.2 Metody .....	20
2.2.1 Izolace ovidukální tekutiny.....	20
2.2.2 Afinity chromatografie na DNA-celulose .....	20
2.2.2.1 Složení použitých roztoků.....	20
2.2.2.2 Kolonové uspořádání.....	20
2.2.2.3 Vsádkové uspořádání .....	21
2.2.3 Diskontinuální SDS-elektroforéza.....	21
2.2.3.1 Složení použitých roztoků.....	22
2.2.3.2 Postup.....	22

2.2.4	Antimikrobiální aktivita separovaných frakcí .....	23
2.2.4.1	Použité roztoky.....	23
2.2.4.2	Postup .....	23
2.2.5	Antimikrobiální aktivita celkové oviduktální tekutiny.....	24
2.2.5.1	Použité roztoky.....	24
2.2.5.2	Postup .....	24
2.2.6	Enzymová aktivita glykosidas ve směsi proteinů kravského oviduktu .....	24
2.2.6.1	Použité roztoky.....	24
2.2.6.2	Postup .....	25
2.2.7	MALDI-TOF MS identifikace.....	25
2.2.8	Příprava sloupce pro afinitní chromatografii na DNA-divinylsulfonem aktivovaném polyakrylamid-allyl-aminovém kopolymeru .....	25
2.2.8.1	Použité roztoky.....	25
2.2.8.2	Izolace DNA z vepřových jater .....	25
2.2.8.3	Příprava polyakrylamid-allyl-aminové matrice .....	26
2.2.8.4	Příprava afinitního nosiče: DNA-divinylsulfonem aktivovaný polyakrylamid-allyl-aminový kopolymer .....	26
<b>3</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>27</b>
3.1	Izolace oviduktální tekutiny.....	27
3.2	Separace proteinů afinitní chromatografií a jejich identifikace .....	27
3.2.1	Kolonové uspořádání .....	27
3.2.2	Kolonové uspořádání s koncentračním gradientem.....	29
3.2.3	Vsádkové uspořádání .....	31
3.3	Antimikrobiální aktivita separovaných proteinů .....	33
3.4	Antimikrobiální aktivita oviduktální tekutiny .....	35
3.5	Glykosidasová aktivita oviduktální tekutiny .....	36
<b>4</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>Shrnutí výsledků .....</b>	<b>41</b>
	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>42</b>

## **Abstrakt**

Z kravských vejcovodů byla izolována oviduktální tekutina. Tekutina byla lyofilizována a získané proteiny separovány pomocí afinitní chromatografie na DNA-celulose. Proteiny v proteklé a vázané frakci byly identifikovány elektroforeticky, ve frakci vázané následně i metodou MALDI-TOF MS. U celkové oviduktální tekutiny byla pozorována antimikrobiální aktivita. Dále byla sledována glykosidasová aktivita izolovaných proteinů oviduktální tekutiny. Byla navržena a provedena příprava sloupce, u něžž nebude vlivem glykosidasových aktivit docházet k degradaci.

**Klíčová slova:** kravská oviduktální tekutina, proteiny podobné histonům, antimikrobiální aktivita

## **Abstract**

Oviductal fluid was collected from cow oviducts. Obtained material was lyophilized and separated by affinity chromatography on DNA-cellulose. Proteins in non-binding and eluted fractions were identified electrophoretically, while those in the eluted fraction were further determined through application of the MALDI-TOF MS method. The complete oviductal fluid demonstrated antimicrobial activity. Furthermore, glycosidase activity of proteins isolated from oviductal fluid was also tested. A column has been designed and prepared in order to avoid the possibility of glycosidase activity leading to degradation. In czech.

**Keywords:** bovine oviductal fluid, histone-like proteins, antimicrobial activity

## Seznam použitých zkratek

AA	- Akrylamid
APS	- Persíran amonný
BIS	- N,N'-methylenbisakrylamid
CBB	- Coomasie Brilliant Blue R - 250
EDTA	- Kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. „ <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> “)
MALDI	- z angl. „ <i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i> “
MS	- z angl. „ <i>Mass spectrometry</i> “
SDS	- Dodecylsulfát sodný (z angl. „ <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> “)
TEMED	- N,N,N',N'-Di(dimethylamino)ethan
TOF	- z angl. „ <i>Time of Flight</i> “
Tris	- Tris(hydroxymethyl)aminomethan

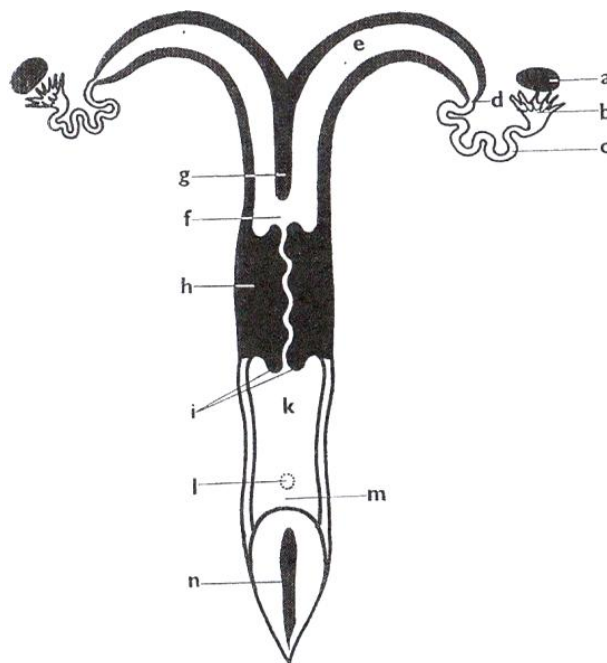


# 1 Úvod

Mezi obecná kritéria živých soustav patří mimo jiné i schopnost samostatné reprodukce. Reprodukce je komplexní proces vedoucí k zformování zárodku organismu. Při nepohlavním rozmnožování živočichů dochází k vzniku potomstva, které disponuje stejnou genetickou informací organismu jako organismus mateřský, převážně buněčným dělením. U jedinců rozmnožujících se pohlavně dozrávají haploidní pohlavní buňky (gamety) meiotickým dělením v reprodukčních orgánech. V případě jedнопohlavních (gonochoristů) je u jedince přítomen pouze jeden typ pohlavních žláz (gonád), podle něhož rozlišujeme samce a samice; u oboupohlavních (hermafroditů) jsou u jedince přítomny oba typy žláz současně. Samčí gamety dozrávají ve varlatech a nazývají se spermie, samičí pohlavní buňky, vajíčka, jsou tvořeny ve vaječnicích. Dojde-li k splynutí samčí a samičí gamety, vzniká diploidní zygota. Tomuto procesu se říká oplození vajíčka (fertilizace).<sup>1</sup>

## 1.1 Reprodukční trakt krávy

Samičí pohlavní orgány hrají významnou roli nejen pro tvorbu pohlavních buněk a produkci hormonů, ale také slouží jako prostředí pro samotný proces oplození vajíčka a jeho další vývoj. Jsou tvořeny párovými vaječnicími a vejcovody, dále dělohou, pochvou a vulvou<sup>2,3</sup> (Obr. 1).



**Obr. 1 Schematické znázornění reprodukčního traktu krávy (upraveno dle<sup>2</sup>):** a – vaječník, b – nálevka vejcovodu, c – vejcovod, d – děložní ústí vejcovodu, e – děložní rohy, f – děložní tělo, g – děložní přepážka, h – děložní krček, i – děložní čípek, k – pochva, l – vyústění močové trubice, m – poševní předsíň, n – stydká štěrbin

Koncové části samičího pohlavního ústrojí jsou vyvinuty ve prospěch přijetí samce a rovněž slouží jako porodní cesty při vypuzování plodu. V porovnání s ostatními tělesnými soustavami není pohlavní soustava nutná pro životaschopnost vlastního organismu, avšak je nezbytná pro zachování druhu<sup>3,4</sup>. Uložení pohlavních orgánů znázorněno na Obr. 2 (str. 11).

### 1.1.1 Vaječníky

Vaječníky (*ovaria*) jsou párové pohlavní žlázy zodpovědně jednak za tvorbu a vývoj samičích pohlavních buněk (*oocyty*), jednak za produkci pohlavních hormonů estrogenu a progesteronu. Velikost vaječníků krávy se, v závislosti na stáří, pohybuje okolo 3–4 cm na délku a 2–3 cm na šířku. Vaječníky sestávají z části dřeňové a korové. Dřeň je tvořena řídkým vazivem a je protkána cévami a nervy. Kůru vaječníků tvoří vazivové stroma, v němž jsou uloženy vaječné váčky, nazývané folikuly. Tyto váčky jsou v různých vývojových stádiích, podle nichž rozeznáváme primární folikuly, sekundární folikuly a tzv. Graafovy folikuly. Primární folikuly v sobě ukrývají vaječnou buňku a v době pohlavního zrání přechází v sekundární. Jako Graafovy folikuly nazýváme již prasklé váčky, ze kterých se uvolnilo vajíčko. Tento proces je znám jako ovulace. Osud prasklého Graafova folikulu se odvíjí od stavu uvolněného vajíčka. Došlo-li k jeho oplození, utváří se místě folikulu tzv. žluté tělísko, které je zodpovědné za produkci hormonu progesteronu. Tím je zabráněno dozrávání dalších folikulů, a tak i ovulaci. V případě, že vajíčko nebylo oplozeno, utváří se žluté tělísko nepravé, které v případě krávy po 13-14 dnech zaniká a mění se v bílo-žlutou skvrnu.<sup>2,4,5</sup>

### 1.1.2 Vejcovody

Spolu s dělohou, pochvou a poševní předsíní patří vejcovody (*oviductus*) mezi vývodné pohlavní cesty. Vejcovody jsou úzké, klikaté transportní trubičky, v případě krávy o délce okolo 25 cm<sup>(4)</sup>. Jsou tvořeny hladkou svalovinou s řasinkovým epitelem a sekrečními buňkami, které napomáhají pohybu vajíčka. S vaječníky nejsou spojeny přímo. Jejich kontakt je zprostředkován nálevkovitým ústím vejcovodu (*infundibulum*), které se v blízkosti vaječníku rozevívá a umožňuje tak zachycení vajíčka. Vajíčko poté putuje střední částí vejcovodu (*ampulla*) až do zúžené děložní části (*isthmus*). Vejcovody neslouží pouze k transportu vajíček do děložního rohu, ale zastávají důležitou funkci při kapacitaci spermií, oplození a dalším vývoji časného embrya před jeho uhnízděním v děloze.<sup>2,4</sup>

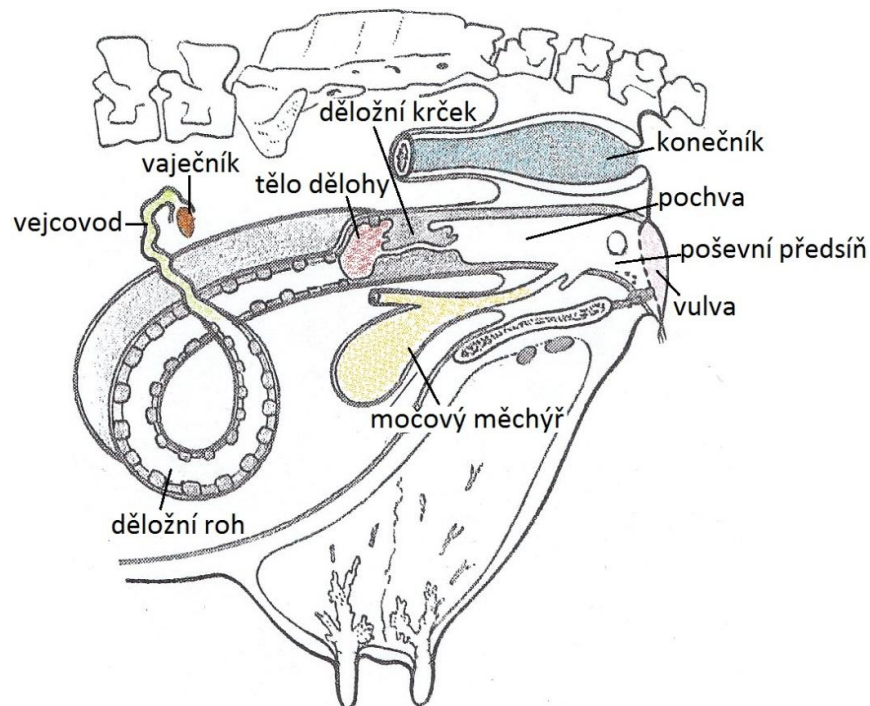
### 1.1.3 Děloha

Děloha (*uterus*) je dutý silnostěnný orgán, v němž probíhá vývoj oplozeného vajíčka přes embryo až po plod. Kráva má dělohu dvourohou. Ta je tvořena děložním tělem, dvěma rohy a krčkem (Obr. 1, str. 9). Děloha se nachází v pánevní oblasti a částečně zasahuje i do dutiny břišní. Stěnu tvoří hladká svalovina, která svými silnými stahy při porodu vypudí zralý plod. Vnitřní prostor dělohy je vystlán sliznicí s hojným počtem žláz, jejichž sekrece napomáhá při uhnízdění embrya.<sup>2-4</sup>

Cestu do dělohy fyziologicky uzavírá děložní krček, a to vždy mimo porod a dobu říje. Hlen produkovaný děložním krčkem obsahuje mucin, proteiny, enzymy a další organické sloučeniny, které ovlivňují mobilitu spermií směrem do dělohy. Je-li kráva březí, hlen chrání dělohu před vniknutím spermií a bakterií, a tak zabraňuje případnému propuknutí infekce.<sup>3</sup>

### 1.1.4 Pochva a poševní předsíň

Na dělohu navazuje svalová trubice zvaná pochva (*vagina*). Plní funkci kopulačního orgánu pro zasunutí pyje během páření. Její prostředí je osídleno mikroorganismy zajišťujícími nízké pH, čímž tvoří přirozenou bariéru proti patogenům. Pochva přechází v poševní předsíň (*vestibulum vaginae*), jež slouží také jako vývodná močová cesta. Na jejich rozhraní ústí močová trubice a u krav, které se ještě nepářily, je zde zřetelná kruhová slizniční řasa, panenská blána (*hymen*).<sup>3,4</sup>



Obr. 2 Uložení pohlavních orgánů krávy (upraveno dle<sup>6</sup>)

## 1.2 Reprodukční cyklus

Jakmile je samice pohlavně dozralá, nastávají u ní periodické změny způsobené vylučováním pohlavních hormonů. Tyto změny napomáhají vytvoření správných podmínek pro oplození vajíčka a souhrnně je nazýváme říje (*estrus*). Období mezi jednotlivými říjemi pak říjový cyklus.

Skot patří mezi polyestrická zvířata, tedy ta, u nichž se říjový cyklus opakuje několikrát do roka. Rozlišujeme tato stádia cyklu:<sup>3</sup>

1. *Proestrus* – období přípravné, 2 – 3 dny; na vaječniku dozrávají Graafovy folikuly; estrogeny podporují prokrvení pohlavních orgánů a sekreci cervikálního hlenu
2. *Estrus* – říje, trvá 1–2 dny; dochází k silnějšímu prokrvení pohlavních orgánů a výtoku hlenitého sekretu z pochvy, který láká samce k páření; u krávy dochází za 6–16 hodin po skončení říje k ovulaci
3. *Postestrus* – 10 dní; vývoj žlutého tělíska na vaječniku
4. *Metestrus* – asi 5 dní; zánik žlutého tělíska, ústup prokrvení; nastupuje, pokud nedošlo k oplodnění vajíčka, jinak nastává březost
5. *Diestrus* – mezidobí; u polyestrických zvířat je velmi krátké, nebo chybí

## 1.3 Oplodnění

Splynutí dvou gamet předchází jejich tvorba a zrání. Setkají-li se ve správný čas na správném místě, utvoří zygotu, která roste v embryo a plod. Za správné místo považujeme vejcovody, kde dochází k tvorbě rezervoáru spermií a jejich kapacitaci.

### 1.3.1 Oogeneze

Oogeneze je proces dozrávání samičích pohlavních buněk, vajíček. Můžeme ho rozdělit na tři stádia: rozmnožování, růst a zrání.

K rozmnožování buněk dochází již v samotném zárodku samice na povrchu jejích vaječníků. Z buněk zárodečného epitelu zde vzniká velké množství buněk oogonických. Většina jich pronikne dovnitř vaječniku, kde jsou obaleny vrstvou folikulárních buněk a dávají tak za vznik oocytům I. řádu. Až při pohlavním dozrávání samice dochází k přeměně těchto primárních folikulů ve folikuly rostoucí a Graafovy. Tato přeměna je fází růstu.

Období zrání nastává až po ovulaci, kdy je vajíčko uvolněno do vejcovodu. První zrací dělení, meioza I, představuje rozdělení oocytu I. řádu na oocyt II. řádu a tzv. pólové tělísko. Tělísko nese polovinu nepotřebných chromozomů a takřka žádnou cytoplazmu; ta

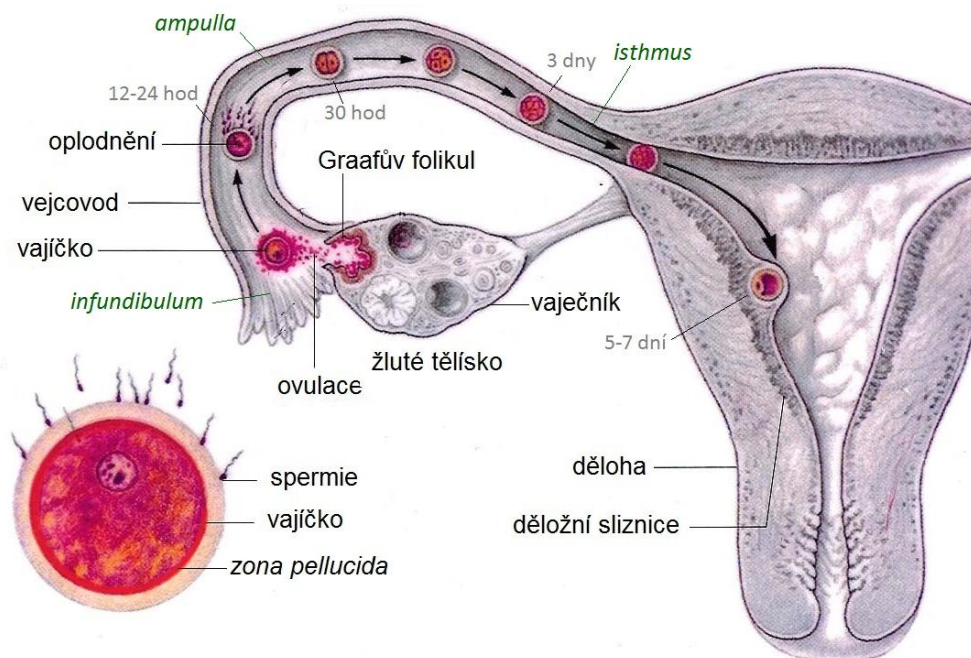
zůstává v oocytu. K nastartování druhého zracího dělení, meiozy II, je zapotřebí vniknutí spermie do cytoplazmy oocytu. Oocyt II. řádu se potom rozdělí opět na dvě buňky, na velké vajíčko a další malé pólové tělísko.<sup>2</sup>

### 1.3.2 Příprava spermií a fúze s vajíčkem

Ejakulované spermie, na rozdíl od spermií epididymálních (nadvarletních), nejsou schopné oplodnění. Nejprve musí dojít k jejich kapacitaci interakcí se složkami ovidukální tekutiny. Proteinové složení povrchu spermií umožňuje navázání na stěnu oviduktu a vytvoření tzv. ovidukálního rezervoáru<sup>7</sup>. Během kapacitace dochází ke změnám složení těchto proteinů, čímž se z ovidukálního rezervoáru určité procento spermií uvolní. Uvolněné spermie projdou dalšími změnami, které jim pomoci chemotaxe a termotaxe umožní vyhledat vajíčko<sup>8,9</sup>.

Už ve vaječniku je vajíčko pokryto ochranným obalem z kumulárních buněk (*cumulus oophorus*)<sup>10</sup>. Buňky vajíčko jednak chrání, jednak mu poskytují výživu. Viskoelastické vlastnosti buněk jsou dány sekretovanou kyselinou hyaluronovou<sup>11</sup>. Pod vrstvou kumulárních buněk se nachází další bariéra, kterou musí spermie proniknout, glykoproteinový obal *Zona pellucida*. U myši je *Zona pellucida* tvořena glykoproteiny ZP1, ZP2 a ZP3<sup>12</sup>. Glykoprotein ZP3 na sobě nese oligosacharidy, navázané O-glykosidovými vazbami přes serin a theronin, které jsou zodpovědné za vazebnou aktivitu spermie. Mezi ně patří například oligosacharidy s terminální  $\alpha$ -galaktózou,  $\beta$ -N-acetylglukosaminem, fukosou nebo manosou<sup>13-15</sup>.

Poté, co spermie za pomoci hyaluronidasy<sup>16</sup> projde vrstvou kumulárních buněk, následuje akrozomální reakce se zónou pellucidou, kterou spouští navázání spermie k ZP3<sup>(17)</sup>. Během této reakce dochází ke zvýšení koncentrace vápenatých iontů a zvýšení pH<sup>(17)</sup> v cytoplazmě spermie, čímž se spouští signální kaskáda. Spermie tím ztrácí afinitu k ZP3 a naváže se k ZP2<sup>18</sup>. Další lytické enzymy (akrosin) obalu spermie pak mohou narušit zónu pellucidu a za pomoci bičíku spermie proniká dovnitř vajíčka, kde dojde k splynutí jejich membrán<sup>19</sup>. Po fúzi spermie s vajíčkem uvolní kortikální granula vajíčka svůj obsah do tzv. perivitellinního prostoru. Ten se nachází mezi zónou pellucidou a buněčnou membránou vajíčka (oolemou). Dojde k zesíťování zóny pellucidy, a tím k zpevnění obalu a zabránění pronikání dalších spermií<sup>20</sup>. Takto vzniklá zygota se vyvíjí v embryo, které se uhnízdí v děloze a dále roste v plod. Průběh fertilizace schematicky znázorněn na Obr. 3 (str. 14).



Obr. 3 Schematické znázornění průběhu fertilizace (upraveno dle<sup>21</sup>)

#### 1.4 Oviduktální tekutina

Oviduktální tekutina tvoří prostředí pro selekci spermií, pro jejich zachycení k oviduktu, kapacitaci a pro časný vývoj embrya, než se uhnízdí v děloze. Složení je podobné krevnímu séru a děložní tekutině, avšak výrazně se liší v koncentracích jednotlivých sloučenin<sup>22</sup> a také v průběhu estrálního cyklu. Sekrece oviduktální tekutiny je ve vlastních částech cyklu rozdílná, k největší produkci dochází v období říje<sup>22</sup>. Hlavními složkami oviduktální tekutiny jsou některé metabolity (glukosa, laktát, pyruvát)<sup>23</sup>, proteiny a glykoproteiny<sup>24</sup>, fosfolipidy a cholesterol<sup>25</sup>, volné aminokyseliny<sup>24</sup> a ionty některých solí<sup>26</sup>. Tyto komponenty zajišťují správné pH a chrání embryo před osmotickým tlakem.

V kravské oviduktální tekutině bylo identifikováno dvacet kodogenních aminokyselin, z toho jsou nejvíce zastoupeny tyto: glycin, glutamová kyselina, alanin, lysin a arginin. Koncentrace glutamové kyseliny, glycinu, argininu a lysinu se výrazně mění během estrálního cyklu, zatímco zbylé aminokyseliny vykazovaly přibližně stejnou hodnotu po celou dobu cyklu<sup>24</sup>.

Ovidukty jsou biologicky aktivní dynamická tkáň, v níž pod vlivem estrogenu a progesteronu dochází k sekreci vlastních proteinů. Dále ovidukty transportují proteiny séra, hlavně albumin.

### 1.4.1 Proteiny oviduktání tekutiny

Nemálo významnou součástí oviduktální tekutiny jsou proteiny. Nejvíce zastoupen je albumin, následuje  $\gamma$ -globulin,  $\alpha$ -globulin a v malé míře i  $\beta$ -globulin<sup>24</sup>. Mezi proteiny oviduktu jsou i proteiny závislé na sekreci estrogenu, což jsou specifické glykoproteiny oviduktu, které jsou konzervovány napříč mnoha druhy. Tyto glykoproteiny asociují s gametami samčími a samičími a z nich vzniklým embryem v raném stádiu. Glykoproteiny jsou zprostředkovatelé interakcí, které potencují vázání spermií na zonu pellucidu a u prasete snižují polyspermii. V oviduktální tkáni byly identifikovány některé další proteiny: komplement C3b, imunoglobulin A – těžký řetězec, C-konec preprokolagenu a klusterin. C-konec preprokolagenu může být využíván k syntéze extracelulární matrix. Klusterin se jeví jako multifunkční protein a je spojován s přestavbou tkáně a molekulárním transportem.

#### 1.4.1.1 Inhibitory proteas

U několika živočišných druhů bylo identifikováno množství enzymů a inhibitorů. Některé pocházejí ze séra, jiné ze specifické sekrece oviduktů jako třeba TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) a PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor)<sup>27</sup>. Protože prostředí oviduktů obsahuje aktivní proteasy, je k procesu fertilizace a k vývoji embrya nezbytně nutná přítomnost těchto inhibitorů.

Rodina TIMP specificky inhibuje matrixové metaloproteasy jako jsou kolagenasy, stromelysiny a gelatinasy. Ukázalo se, že TIMP-1 reguluje několik funkcí v různých typech buněk. Hraje roli při podpoře růstu, embryonického vývoje a udržování a přestavby extracelulární matrix<sup>28</sup>. Přítomnost TIMP-1 je pravděpodobně důležitá pro správný vývoj embrya. Podporuje jeho růst a reguluje přestavbu extracelulární matrix, a to jak embrya, tak oviduktu. Také chrání embryo před degradací<sup>29</sup>.

PAI-1 je inhibitor serinových proteas (jako třeba Urokinase Plasminogen Activator nebo Tissue-type Plasminogen Activator). Kontroluje přestavbu extracelulární matrix, migraci buněk a metastáze tumorů<sup>27</sup>. Dále reguluje aktivaci pro-matrixových metaloproteas, které jsou součástí kaskád vedoucích k degradaci extracelulární matrix. U krávy bylo prokázáno, že produkce PAI-1 nezávisí na fázi cyklu. U prasnice je produkován ve všech částech oviduktu. Podobně jako u TIMP-1, jeho syntéza je výrazně vyšší v isthmu než v ostatních částech oviduktu. PAI-1 interaguje s epitelem oviduktu a s oocyty v oviduktu i děloze. U prasnice je asociován k vnější vrstvě zony pellucidy oocytů a skrz ni u

blastomer (až 16 buněčných) embryí<sup>27</sup>. Pravděpodobně chrání integritu zony pellucidy, blastomery a oviduktální tkáň.

#### 1.4.1.2 Glykoproteiny

Studium oviduktálních glykoproteinů stále probíhá, a tak proteiny, které byly purifikovány z různých biologických zdrojů, dostaly různé názvy. Vesměs se však nazývají oviduktální specifické glykoproteiny. Zorientovat se ve všech dosud popsaných glykoproteinech původem z oviduktů není pro tuto práci zásadní a vyžadovalo by to studii přesahující její rámec. Proto zde budu hovořit o dosud identifikovaných a sekvenovaných glykoproteinech z oviduktů pod jednotným názvem oviduktální glykoproteiny. Pro úplnost uvádím některé názvy, pod kterými jsou tyto proteiny dohledatelné. Jsou to oviduct glycoprotein, oviduct-specific glycoprotein, estrogen-dependent glycoprotein, estrus-associated glycoprotein, oviduct-specific estrus associated glycoprotein, oviduct secretory glycoprotein, oviductin.

Oviduktální glykoproteiny (dále OGP) byly popsány u různých druhů savců. Jsou to vysokomolekulární proteiny většinou o velikosti 70 – 130 kDa<sup>27</sup>. Maximální koncentrace OGP byla identifikována v období okolo ovulace, fertilizace a časného vývoje embrya. Biosyntéza OGP klesá k bazální koncentraci s vyšší produkcí progesteronu a liší se v různých částech oviduktu. U krávy byla zjištěna syntéza OGP v ampulli a isthmu expresí z kultivované tkáně<sup>30</sup>.

Je zde patrná nápadná konzervace sekvence napříč živočišnými druhy. Kompletní cDNA sekvence a z ní dedukovaná aminokyselinová sekvence prasečího OGP<sup>31</sup> se vysoce shoduje (cca 80-90%) se sekvencí krávy<sup>32</sup>, ovce<sup>27</sup>, ženy<sup>33</sup>, myši<sup>34</sup>, křečka<sup>35</sup>, paviána<sup>36</sup> a makaka<sup>37</sup>. U prasnice, krávy a ovce je shoda co do délky, ostatní OGP jsou tvořeny větším počtem aminokyselin. Aminokyselinové sekvence vykazují vysokou shodu N-terminálního konce, zatímco C-terminální konec se liší i v N- a O-glykosylacích, což může mít za následek druhovou specifitu<sup>38</sup>.

Všechny sekvence zkoumaných OGP vykazují podobnost s různými chitinasami klasifikovanými jako glykosyl hydrolasy rodiny 18<sup>38</sup>. Chitinasy katalyzují hydrolýzu chitinu a  $\beta$ -1,4-vázaného homopolymeru *N*-acetyl-D-glukosaminu. Podobnost je vysoká v oblasti aktivního centra chitinasy a liší se v jedné nebo dvou aminokyselinách, které jsou pravděpodobně esenciální pro enzymovou aktivitu. Pravděpodobně je zde zachována schopnost vázání cukrů, což může napomáhat při vazbě OGP s gametami.



Charakteristickým znakem OGP je tendence asociovat se zonou pellucidou a perivitellinním prostorem savčích oviduktálních oocytů a embryí<sup>38</sup>. Spekuluje se, že má důležitou roli ve fyziologii a biochemii početí. Asociace k zoně pellucidě a perivitellinnímu prostoru oocytů a embryí byla prokázána u paviana<sup>39</sup>, krávy<sup>27</sup>, ovce<sup>40</sup>, prasnice<sup>41</sup>, křečka<sup>42</sup>. Studie *in vitro* prokázala vázání na membrány spermií u krávy, což může zvyšovat schopnost kapacity<sup>43</sup>. Studie *in vitro* u člověka<sup>44</sup> a křečka<sup>45</sup> ukazují, že vazba spermie-OGP vede ke zvýšení interakce se zonou pellucidou i penetrace. Při obohacení *in vitro* fertilizace ovcí o ovčí OGP se zlepšilo rýhování embryí<sup>46</sup>. U prasnice vede přidání OGP ke snížení počtu pevně vázaných spermií na zonu pellucidu, a tím pádem k zabránění polyspermii a následné ztrátě embrya<sup>47</sup>.

Protože *ampulla* je místo, kde dochází k interakci oocytu a spermie s OGP, oplodnění a rané fázi vývoje embrya, je OGP, zde v největší míře produkovaný, pravděpodobně velmi důležitý pro celý proces fertilizace.

## 1.5 Antimikrobiální aktivita

První bariéru proti napadení patogeny zajišťuje imunitní systém. Jeho aktivita je nezbytně nutná i v místech reprodukčního traktu jak samice, tak samce. Mezi důležité komponenty imunitního systému patří celá řada rodin antimikrobiálních peptidů a proteinů jako jsou  $\alpha$ - a  $\beta$ -defensiny, katelicidiny<sup>48</sup> a proteasové inhibitory.

Ve varlatech myší a krys byly identifikovány  $\alpha$ -,  $\beta$ -defensiny, u myší dále jim podobné antimikrobiální proteiny Bin1b<sup>49</sup>. Bylo zjištěno, že kuřecí semeno obsahuje antimikrobiální protein Avian  $\beta$ -defensin 3<sup>50</sup>, který může hrát roli i v regulaci pohyblivosti spermií, jejich dozrávání a v imunitě proti spermiím<sup>51,52</sup>. Dále byla zjištěna přítomnost histonů H1 a H2B ve vaječnicích a vejcovodech kuřat<sup>53</sup> a byla prokázána jejich antimikrobiální aktivita. Antimikrobiální a endo-toxin neutralizační aktivita byla prokázána i u histonů H2A a H2B z placenty člověka<sup>54</sup>.

## **1.6 Cíl práce**

Cílem mé práce je získat histony ze směsi proteinů z kravského oviduktu využitím jejich afinity k DNA. Následně bych chtěla zkoumat antimikrobiální aktivitu takto získaných histonů a zodpovědět tak otázku, zda se mohou podílet na imunitní obraně v reprodukčním traktu.

## 2 Materiál a metody

### 2.1 Použitý materiál

#### 2.1.1 Chemikálie

4-Nitrofenyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid	- Serva, Heidelberg, Německo
4-Nitrofenyl- $\beta$ -D-glukopyranosid	- Fluka, Buchs, Švýcarsko
Akrylamid	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Allylamin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Bisakrylamid	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Bromfenolová modř	- Lachema, Brno, ČR
Buňky <i>Escherichia coli</i> serotyp K-12	- Dar (laboratoř č. 216 na katedře biochemie PřF UK)
Citrát sodný	- Lachema, Brno, ČR
Coomasie Brilliant Blue R - 250	- Serva, Heidelberg, Německo
Divinylsulfon	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
DNA-celulosa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Dodecylsulfát sodný	- BDH Chemicals Ltd., Poole, England
Ethanol	- Lachema, Brno, ČR
Glycerol	- Lachema, Brno, ČR
Glycin	- Serva, Heidelberg, Německo
Hydrogenuhlíčitan amonný	- Penta, Chrudim, ČR
Hydrogenuhlíčitan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Hydroxid sodný	- Lachema, Brno, ČR
Chlorid draselný	- Lachema, Brno, ČR
Chlorid sodný	- Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR
Kyselina ethylendiamintetraoctová	- Lachema, Brno, ČR
Kyselina octová	- Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR
LBA medium	- Dar (laboratoř č. 216 na katedře biochemie PřF UK)
Lysin	- Serva, Heidelberg, Německo
Methanol	- Lachema, Brno, ČR
N,N,N',N'-Di(dimethylamino)ethan	- Serva, Heidelberg, Německo

N,N'-methylenbisakrylamid	- Serva, Heidelberg, Německo
Persíran amonný	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Polymer lysozymu	- Připraven na katedře biochemie PřF UK
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	- Lachema, Brno, ČR
Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid	- Fluka, Buchs, Švýcarsko

### 2.1.2 Biologický materiál

Reprodukční orgány krávy	- Jatka Plzeň, a. s.
Vepřová játra	- Zakoupena v řeznictví

### 2.1.3 Další materiál

Polystyrenová mikrotitrační destička	- NUNC, Dánsko
--------------------------------------	----------------

## 2.2 Metody

### 2.2.1 Izolace oviduktální tekutiny

Kravske ovidukty byly nůžkami odděleny od vaječníku a rohu dělohy a promyty 0,2 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Získaný roztok byl dialyzován při 4°C proti destilované vodě, namražen a následně lyofilizován. Byla provedena chromatografická separace preparátu a následná elektroforetická charakterizace.

### 2.2.2 Afinity chromatografie na DNA-celulose

#### 2.2.2.1 Složení použitých roztoků

- **0,5 M Tris:** 60,6 g Tris do 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,35 upraveno 10% HCl
- **2 M KCl:** 149,1 g KCl do 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$
- **Nanášecí pufr:** 0,01 M Tris + 0,1 M KCl  
2 ml 0,5 M Tris + 5 ml 2 M KCl, do 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$
- **Eluční pufr:** 0,01 M Tris + 1 M KCl  
2 ml 0,5 M Tris + 50 ml 2 M KCl, do 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$

#### 2.2.2.2 Kolonové uspořádání

DNA-celulosa byla rozpuštěna v nanášecím pufru a ponechána přes noc v lednici. Získaná suspenze byla převedena do separační kolony (Sigma) o objemu 10 ml.

V nanášecím pufru bylo rozpuštěno 30 mg preparátu proteinů kravského oviduktu získaného dle kap. 2.2.1 (str. 20) v 14 ml nanášecího pufru ( $A_{280\text{nm}} \cong 2$ ) a vzorek byl

aplikován na kolonu. Kolona byla promývána nanášecím pufrem až do získání frakce s absorbcí pod 0,1. Absorbance byla měřena na přístroji Heλios γ (Thermo Electron Corporation) při 280 nm proti nanášecímu pufru. Následovalo promývání pufrů elučním.

Vybrané příslušné frakce byly spojeny, dialyzovány proti destilované vodě při 4°C následně namrazeny a lyofilizovány.

#### **Koncentrační gradient:**

V nanášecím pufru bylo rozpuštěno 10 mg preparátu proteinů kravského oviduktu získaného dle kap. 2.2.1 (str. 20) a vzorek byl aplikován na kolonu. Kolona byla promývána nanášecím pufrem až do získání frakce s absorbcí pod 0,1. Absorbance byla měřena na přístroji Heλios γ při 280 nm proti nanášecímu pufru. K promývání elučním pufrů byly připraveny koncentrace 0,01 M Tris + 0,1 M; 0,28 M; 0,46 M; 0,64 M; 0,82 M; 1 M KCl. Byla změřena absorbance jednotlivých frakcí proti pufru elučnímu a konduktivita spojených frakcí, které byly následně dialyzovány proti destilované vodě při 4°C a následně namrazeny a lyofilizovány.

#### **2.2.2.3 Vsádkové uspořádání**

Bylo rozpuštěno přibližně 30 mg preparátu proteinů kravského oviduktu získaného dle kap. 2.2.1 (str. 20) v 11,5 ml nanášecího pufru ( $A_{280\text{nm}} \cong 2$ ).

Rozpuštěná DNA-celulosa byla převedena do mikrozkušavek a po dobu 10 minut stočena na stolní centrifuze Eppendorf MiniSpin Plus při 14 000 x g. Byl odebrán přebytečný nanášecí pufr, aplikován vzorek a peleta byla řádně rozmíchána. Vzorky byly opět stočeny na centrifuze, byl odebrán supernatant a změřena jeho absorbance (Heλios γ) proti nanášecímu pufru při 280 nm. Při poklesu absorbance pod 0,1 byla DNA-celulosa s naneseným vzorkem propláchnuta pufrů elučním a peleta byla řádně rozmíchána. Poté byly mikrozkušavky stočeny a byl odebrán supernatant, byla změřena jeho absorbance (Heλios γ) proti elučnímu pufru a DNA-celulosa byla opět promyta elučním pufrů.

Vybrané příslušné frakce byly spojeny, dialyzovány proti destilované vodě při 4°C následně namrazeny a lyofilizovány.

#### **2.2.3 Diskontinuální SDS-elektroforéza**

Pro orientační identifikaci proteinů v jednotlivých frakcích byla provedena diskontinuální SDS-elektroforéza dle Laemmliho<sup>55</sup>.

### 2.2.3.1 Složení použitých roztoků

- **Roztok A:** 30% akrylamid  
29,2 g AA + 0,8 g bis-AA + 70 ml H<sub>2</sub>O
- **Roztok B:** 1,5 M Tris·HCl o pH 8,3  
18,5 g Tris + 100 ml H<sub>2</sub>O, pH upraveno HCl
- **Roztok C:** 0,5 M Tris·HCl o pH 6,8  
6 g Tris + 100 ml H<sub>2</sub>O, pH upraveno HCl
- **Roztok D:** 10% SDS  
10 g SDS + 90 ml H<sub>2</sub>O
- **Roztok E:** 10% APS  
1 g APS + 9 ml H<sub>2</sub>O
- **Elektrodový pufr:** 4x koncentrovaný, pH 8,3  
9 g Tris + 43,2 g glycinu + 3 g SDS do 600 ml H<sub>2</sub>O  
před použitím ředěno 60 ml do 240 ml H<sub>2</sub>O
- **Vzorkový pufr neredukující:**  
7 ml H<sub>2</sub>O + 2 ml roztoku C + 3,4 ml glycerolu + 3 ml roztoku D + 0,4 ml 0,1% BM
- **Separční gel 15%:**  
2,5 ml roztoku B + 5 ml roztoku A + 2,5 ml H<sub>2</sub>O + 100 µl roztoku D  
těsně před nalitím bylo přidáno 4,5 µl TEMEDu a 40µl roztoku E
- **Zaostřovací gel 4%:**  
1,5 ml H<sub>2</sub>O + 625 µl roztoku C + 25 µl roztoku D + 325 µl roztoku A + 40 µl BM  
těsně před nalitím bylo přidáno 3,8 µl TEMEDu a 35 µl roztoku E
- **Barvicí lázeň:**  
0,5 g CBB + 450 ml methanolu + 100 ml kyseliny octové + 450 ml H<sub>2</sub>O
- **Odbarvovací lázeň:**  
250 ml methanolu + 100 ml kyseliny octové + 650 ml H<sub>2</sub>O
- **Vzorek standardu:**  
směs kopolymeru lysozymu, 1 mg/ml

### 2.2.3.2 Postup

Z odmaštěných sklíček byla sestavena aparatura firmy Bio-Rad pro nalití gelu. Byl připraven 15% separční gel, který byl po nalití mezi sklíčka převrstven vodou. Po

zpolymerování byla filtračním papírem voda odsáta a byla nalita vrstva zaostřovacího 4% gelu, do něhož byl vsunut hřeben pro tvorbu jamek k aplikaci vzorků.

Vzorky (získané dle kap. 2.2.2, str. 20) byly rozpuštěny ve vzorkovém pufru neredukujícím (na koncentraci 10 mg/ml), případně byla vzorkovým pufrům vymyta lyofilizační baňka z důvodu nedostatku separovaných proteinů, a před nanesením byly 10 minut povařeny. Byla sestavena aparatura pro elektroforézu, do níž byl vložen stojan s gely, ze kterých byly po zatuhnutí odstraněny hřebeny. Prostor elektroforetické vany byl naplněn elektrodovým pufrům a mikropipetou byly do jamek gelu aplikovány vzorky.

Elektrody byly zapojeny do přístroje Electrophoresis Constant Power Supply 3000/150 firmy Pharmacia. Počáteční napětí bylo nastaveno na 90 V, po zaostření proteinů na rozhraní gelů bylo zvýšeno na 150 V. Elektroforéza byla ukončena, jakmile bromfenolová modř dosáhla spodního okraje gelu (asi po 90 minutách).

Gely byly vyjmuty ze skel a umístěny do barvicí lázně pro detekci proteinů. Druhý den byly gely vloženy do lázně odbarvovací a následně usušeny v celofánových foliích a/nebo skenovány.

## **2.2.4 Antimikrobiální aktivita separovaných frakcí**

### **2.2.4.1 Použité roztoky**

- LBA medium
- roztok albuminu v LBA mediu (1 mg/ml)
- buňky *E. coli* (serotyp K-12) v LBA mediu, naředěno na  $A_{405\text{nm}} \cong 0,1$

### **2.2.4.2 Postup**

Pro nedostatečné množství chromatograficky separovaných proteinů (získaných dle kap. 2.2.2.2, str. 20) byly lyofilizační baňky vymyty 250  $\mu\text{l}$  LBA media bez přípravy roztoků o známé koncentraci.

Do jamek mikrotitrační destičky bylo v sloupcích 1-4 a řadách A-H odpipetováno 100  $\mu\text{l}$  roztoku albuminu o koncentraci 1mg/ml v LBA mediu. Do prvních jamek ve sloupcích bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  separovaných vzorků z kravského oviduktu, do dvou z frakce nanášecí, do dvou z frakce eluční. Postupně bylo přenášením 100  $\mu\text{l}$  provedeno dvojkové ředění mezi jamkami A až G, jamky H byly ponechány bez vzorků proteinů. Do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku buněk *E. coli*.

Bylo provedeno měření absorbancí při 405 nm na přístroji SUNRISE TECAN, které bylo opakováno každou hodinu až do  $A > 1$ . Během měření byl preparát inkubován při 37°C v termostatu GALLENKAMP.

## 2.2.5 Antimikrobiální aktivita celkové oviduktální tekutiny

### 2.2.5.1 Použité roztoky

- LBA medium
- roztok albuminu v LBA mediu (1 mg/ml)
- roztok proteinů kravského oviduktu v LBA mediu (100 mg/ml)
- buňky *E. coli* (serotyp K-12) v LBA mediu, naředěno na  $A_{405\text{nm}} \cong 0,1$

### 2.2.5.2 Postup

Do dvou sloupců mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100  $\mu\text{l}$  roztoku albuminu. Do prvních jamek bylo aplikováno 100  $\mu\text{l}$  roztoku proteinů kravského oviduktu a byla provedena dvojková ředící řada, vyjma poslední jamky. Do všech jamek bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  buněk *E. coli*. Byla změřena absorbance při 405 nm na přístroji SUNRISE TECAN. Destička byla inkubována v přístroji GALLENKAMP při 37°C a měření bylo opakováno každou hodinu. Z naměřených absorbancí byl sestrojen graf závislosti absorbance na čase.

## 2.2.6 Enzymová aktivita glykosidas ve směsi proteinů kravského oviduktu

### 2.2.6.1 Použité roztoky

- 0,1 M citronan sodný  
29,4 g citronanu sodného + 1000 ml H<sub>2</sub>O
- 0,1 M kyselina octová
- **roztok A:** 0,1 M citrát-acetátový pufr, pH 4,8  
0,1 M kyselina octová + 0,1 M citronan sodný tak, aby pH = 4,8
- **roztok B:** 0,1 M citrát-acetátový pufr, pH 7,2  
0,1 M kyselina octová + 0,1 M citronan sodný tak, aby pH = 7,2
- **roztok A $\alpha$ :** 10 mM *p*-nitrofenyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid  
6 mg *p*-nitrofenyl- $\alpha$ -D-glukopyranosidu + 2 ml roztoku A
- **roztok A $\beta$ :** 10 mM *p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-glukopyranosid  
6 mg *p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-glukopyranosidu + 2 ml roztoku A



- **roztok B $\alpha$** : 10 mM *p*-nitrofenyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid  
6 mg *p*-nitrofenyl- $\alpha$ -D-glukopyranosidu + 2 ml roztoku B
- **roztok B $\beta$** : 10 mM *p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-glukopyranosid  
6 mg *p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-glukopyranosidu + 2 ml roztoku B
- **1 M NaOH**: 0,4 g NaOH + 10 ml H<sub>2</sub>O

### 2.2.6.2 Postup

Do čtyř sloupců mikrotitrační destičky bylo aplikováno 100  $\mu$ l roztoku A, do dalších čtyř sloupců 100  $\mu$ l roztoku B. Do první jamky ve sloupci bylo aplikováno k příslušným roztokům (A nebo B) 100  $\mu$ l roztoků substrátu A $\alpha$ , A $\beta$ , B $\alpha$  a B $\beta$  vždy dvakrát vedle sebe. Bylo provedeno ředění dvojkovou řadou v rámci sloupců, poslední jamky byly ponechány bez substrátu. Do všech jamek bylo aplikováno 100  $\mu$ l preparátu kravských oviduktálních proteinů (získaných dle kap. 2.2.1, str. 20) o koncentraci 1 mg/ml. Mikrotitrační destička byla umístěna do termostatu GALLENKAMP a vzorky byly inkubovány při 37°C.

Po třech hodinách inkubace bylo do každé jamky aplikováno 50  $\mu$ l 1 M NaOH a byla změřena absorbance při 405 nm na přístroji SUNRISE TECAN.

### 2.2.7 MALDI-TOF MS identifikace

Byla provedena elektroforéza dle kap. 2.2.3 (str. 21) vybraných vzorků vázané frakce. Gel byl odeslán na pracoviště Ústavu patologické fyziologie a CEH, 1. lékařské fakulty UK v Praze, RNDr. Petru Přikrylovi, Ph.D.

### 2.2.8 Příprava sloupce pro afinitní chromatografii na DNA-divinylsulfonem aktivovaném polyakrylamid-allyl-aminovém kopolymeru

#### 2.2.8.1 Použité roztoky

- izolační roztok  
0,05 M Na<sub>2</sub>EDTA + 0,5 M NaCl + 0,05 % SDS
- 30% akrylamid/bisakrylamid  
29,2 g AA + 0,8 g bis-AA + 70 ml H<sub>2</sub>O
- 10% APS

#### 2.2.8.2 Izolace DNA z vepřových jater

Vepřová játra byla nakrájena a s 500 ml izolačního roztoku homogenizována v mixéru. Homogenizát byl převeden do kádinky a byl ponechán 20 minut inkubovat při 60°C. Směs

byla ochlazená a 15 minut centrifugována při 6 000 x g na centrifuze Ianetzki K-23. Byl odebrán supernatant, ke kterému byl přidán přibližně stejný objem studeného izopropylalkoholu (- 20°C), roztok byl promíchán a ponechán 5 minut stát na ledu. Izolovaná DNA byla namotána na tyčinku a přenesena do 20 ml 75% ethanolu. Po promíchání byl roztok centrifugován 15 minut při 6 000 x g (Ianetzki K-23). Peleta byla rozpuštěna v 50 ml destilované vody, namražena a lyofilizována.

### **2.2.8.3 Příprava polyakrylamid-allyl-aminové matrice**

Bylo smícháno 10 ml 30% roztoku akrylamidu/bisakrylamidu s 200 µl allylaminu, 70 ml destilované vody, 100 µl 10% APS a 10 µl TEMEDu. Po polymeraci byl vzniklý gel mechanicky rozdrcen na částice průměru 250 µm pasážíváním skrz síto. Vzniklý gel byl promyt 2 l destilované vody a uchován v lednici.

### **2.2.8.4 Příprava afinitního nosiče: DNA-divinylsulfonem aktivovaný polyakrylamid-allyl-aminový kopolymer**

Do 200 ml 0,3 M NaHCO<sub>3</sub> bylo přidáno 100 ml připraveného polyakrylamid-allyl-aminového kopolymeru (připravený dle kap. 2.2.8.3). Byl přidán 1 ml divinylsulfonu a roztok byl 90 minut míchán. Směs byla na fritě promyta 2 l destilované vody. Bylo přidáno 200 mg dialyzovaného preparátu DNA z vepřových jater a směs byla promyta na fritě 2 l destilované vody. Následně byl ke směsi přidán roztok lysinu v NaHCO<sub>3</sub> (1,8g lysinu v 20 ml 3 M NaHCO<sub>3</sub>), směs byla ponechána 2 hodiny míchat a suspenze byla třikrát dekantována 250 ml 20% vodného roztoku ethanolu. Poté byla směs promyta 2 l destilované vody.

## **3 Výsledky**

### **3.1 Izolace oviduktální tekutiny**

Kravské ovidukty byly nůžkami odděleny od vaječníku a rohu dělohy a promyty 0,2 M  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ . Roztok byl následně dialyzován při 4°C proti destilované vodě, namražen a lyofilizován. Takto získaná směs oviduktálních proteinů byla dále separována afinitní chromatografií na DNA-celulose a jednotlivé frakce z chromatografie byly identifikovány pomocí SDS-elektroforézy.

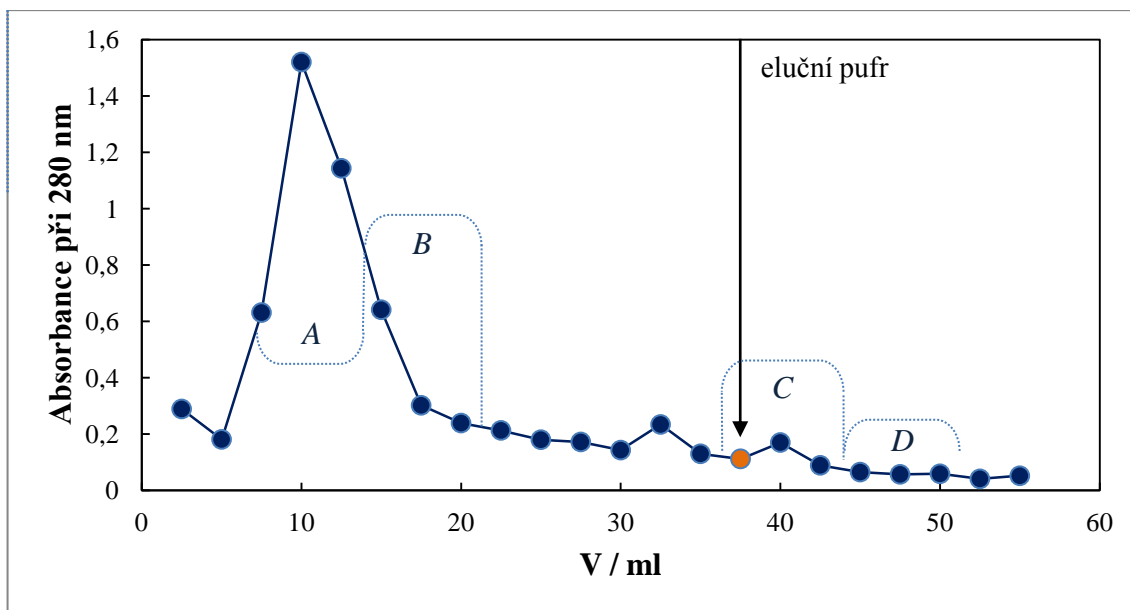
### **3.2 Separace proteinů afinitní chromatografií a jejich identifikace**

#### **3.2.1 Kolonové uspořádání**

Proteiny kravského oviduktu byly separovány pomocí afinitní chromatografie na koloně DNA-celulose (viz kap. 2.2.2.2, str. 20). Byl nanášen vzorek (30 mg) kravských oviduktálních proteinů získaných dle kap. 2.2.1, (str. 20) rozpuštěný v nanášecím pufru (0,01 M Tris + 0,1 M KCl). Kolona byla promyta nanášecím pufrem do poklesu absorbance (Helios  $\gamma$ , 280 nm) pod 0,1 a poté byly komponenty interagující s kolonou vymyty pufrem elučním (0,01 M Tris + 1 M KCl).

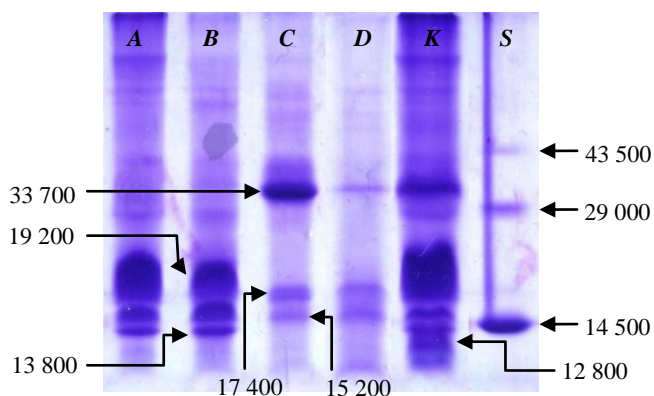
Získány byly čtyři frakce, v prvních dvou byly zachyceny proteiny neinteragující s kolonou, v dalších dvou proteiny vymyté elučním pufrem. Byly změřeny absorbance (Helios  $\gamma$ ) jednotlivých frakcí proti příslušnému pufru při 280 nm a z naměřených dat byl sestaven graf závislosti absorbance na elučním objemu (viz Obr. 4, str. 28).

Poměr mezi proteiny proteklými a vázanými je přibližně 13:1.



**Obr. 4 Afinitní chromatografie proteinů kravského oviduktu na koloně DNA-celulosy.** Chromatografie byla provedena dle kap. 2.2.2.2 (str. 20); byla separována směs kravských oviduktálních proteinů (30 mg) získaná dle kap. 2.2.1 (str. 20); byly získány proteklé frakce A a B v nanášecím pufru (0,01 M Tris + 0,1 M KCl) a vázané frakce C a D v elučním pufru (0,01 M Tris + 1 M KCl), frakce byly následně elektroforeticky identifikovány (viz Obr. 5).

Vybrané příslušné frakce byly spojeny a dialyzovány při 4°C proti destilované vodě. Následně byly namrazeny a lyofilizovány a pro jejich identifikaci byla provedena SDS-elektroforéza v neredukujícím prostředí vzorkového pufru (viz Obr. 5). Byly připraveny roztoky vzorků o koncentraci 10 mg/ml v případně proteklých frakcích a vzorku nanášeného na kolonu. Vzorek standardu (kopolymer lyozymu) byl připraven o koncentraci 1 mg/ml. U frakcí vázaných nebylo možné připravit vzorek o známé koncentraci v důsledku nedostatečného množství proteinů, a tak byla lyofilizační baňka vzorkovým pufrům vymyta.



**Obr. 5 Polyakrylamidová SDS-elektroforéza jednotlivých proteinových frakcí získaných kolonovou afinitní chromatografií.** A, B – frakce proteklé, C, D – frakce vázané, K – vzorek nanášený na kolonu (10 mg/ml), S – standard (kopolymer lyozymu, 1 mg/ml); do jamek bylo nanášeno 5 µl vzorků A, B, C, 2 µl vzorku D a 4 µl standardu S a 4 µl vzorku nanášeného na kolonu K; vzorky byly rozpuštěny v neredukujícím prostředí.

Vázané frakce se od frakcí proteklých výrazně liší v oblasti relativní molekulové hmotnosti okolo 33 700. Proteiny přibližných velikostí 15 200 a 17 400 lze identifikovat ve frakci vázané, ve frakci nevázané navíc i proteiny o velikostech asi 13 800 a 19 200. Ve vzorku nanášeném na kolonu jsou patrné proteiny odpovídající velikosti přibližně 12 800.

Pro identifikaci proteinových zón s relativní molekulovou hmotností 15 200, 17 400 a 33 700 detekovaných ve frakci vázané byly tyto zóny vyříznuty z gelu a proteiny proteolyticky štěpeny pomocí trypsinu. Směsi peptidů odpovídající jednotlivým zónám byly podrobeny MALDI-TOF MS/MS analýze. Grafy spekter získaných MALDI-TOF MS/MS analýzou budou k dispozici v době obhajoby práce.

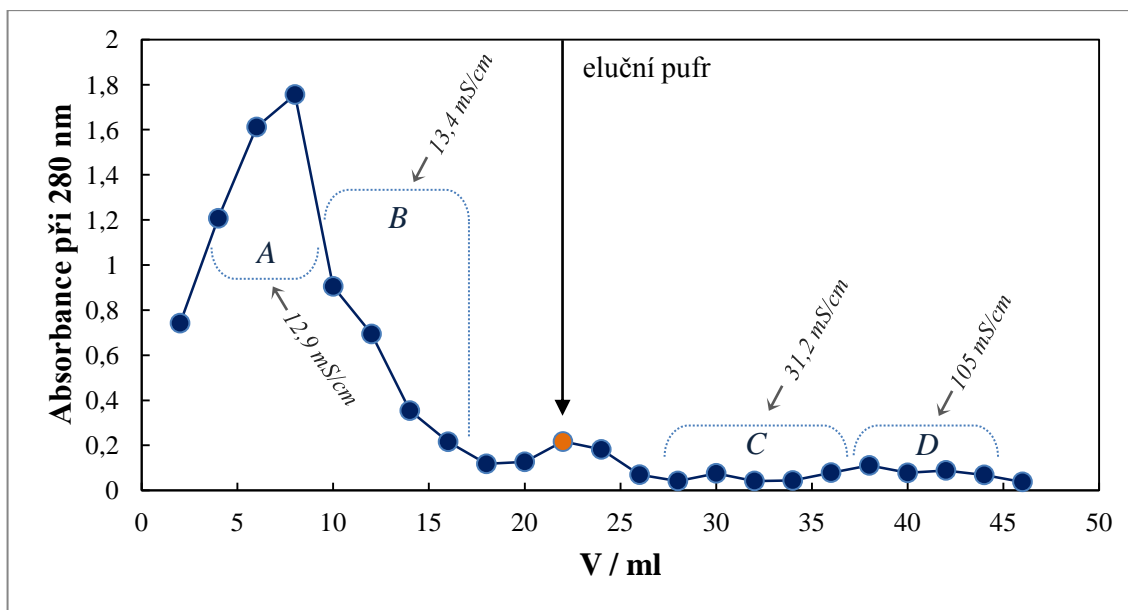
Proteolytické štěpení separovaných proteinových zón a MALDI-TOF MS/MS analýza byly provedeny RNDr. Petrem Přikrylem, Ph.D. z Ústavu patologické fyziologie a CEH, 1. lékařské fakulty UK v Praze.

### **3.2.2 Kolonové uspořádání s koncentračním gradientem**

Proteiny kravského oviduktu byly separovány pomocí afinitní chromatografie na koloně DNA-celulosy (dle 2.2.2.2, str. 20). Byl nanášen vzorek (10 mg) kravských oviduktálních proteinů získaných dle kap. 2.2.1, (str. 20) rozpuštěný v nanášecím pufru (0,01 M Tris + 0,1 M KCl). Po poklesu absorbance pod 0,1 (Helios  $\gamma$ , 280 nm) byla kolona promyta elučním pufrům s koncentračním gradientem KCl do koncentrace 1 M. Byly připraveny roztoky o koncentraci vždy 0,01 M Tris a 0,1 M; 0,28 M; 0,46 M; 0,64 M; 0,82 M; 1 M KCl.

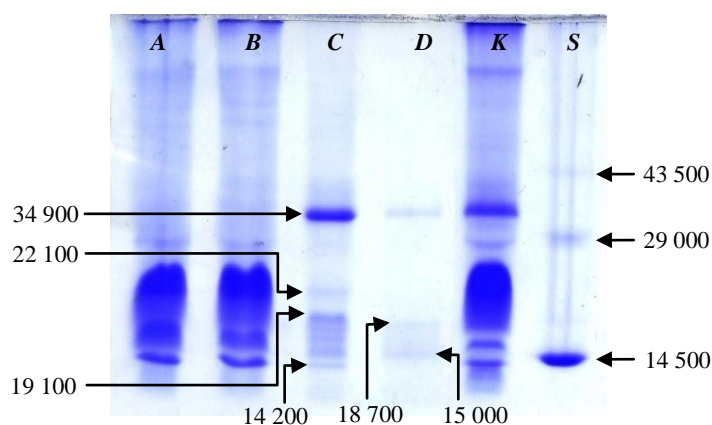
Byly získány čtyři frakce, v prvních dvou frakcích byly zachyceny proteiny neinteragující s DNA-celulosou. Do dalších frakcí byly eluovány proteiny s postupně vyšší afinitou ke koloně vymýváním postupně koncentrovanějším KCl. U spojených frakcí a použitých pufrů byla změřena konduktivita – A: 12,9 mS/cm, B: 13,4 mS/cm, C: 31,2 mS/cm, D: 105 mS/cm, nanášecí pufr: 12,6 mS/cm, eluční pufr: 105 mS/cm. Frakce byly dialyzovány při 4°C proti destilované vodě a následně namrazeny a lyofilizovány.

Z naměřených absorbancí byl sestrojen graf závislosti absorbance na elučním objemu (viz Obr. 6, str. 30). Poměr mezi proteiny proteklými a vázanými je přibližně 8:1.



**Obr. 6 Afinitní chromatografie proteinů kravského oviduktu na koloně DNA-celulosy s koncentračním gradientem.** Chromatografie byla provedena dle kap. 2.2.2.2 (str. 20); byla separována směs kravských oviduktálních proteinů (10 mg) získaná dle kap. 2.2.1 (str.20); Byly získány proteklé frakce A a B v nanášecím pufru (0,01 M Tris + 0,1 M KCl) a vázané frakce C a D vymyté elučním pufrém (o koncentraci vždy 0,01 M Tris a 0,1 M; 0,28 M; 0,46 M; 0,64 M; 0,82 M; 1 M KCl); byla naměřena konduktivita frakcí – A: 12,9 mS/cm, B: 13,4 mS/cm, C: 31,2 mS/cm, D: 105 mS/cm; frakce byly následně elektroforeticky identifikovány (viz Obr. 7).

Pro rozlišení proteinů jednotlivých frakcí byly vzorky podrobeny SDS-elektroforéze v neredukujícím prostředí vzorkového pufru (viz Obr. 7). Byly připraveny roztoky vzorků proteklých frakcí a vzorku nanášeného na kolonu o koncentracích 10 mg/ml. Vzorek standardu (kopolymer lysozemu) byl připraven o koncentraci 1 mg/ml. Pro opětovné nedostačující množství proteinů z frakcí vázaných bylo nutno lyofilizační baňku vymýt vzorkovým pufrém a nebyl tudíž připraven vzorek o známé koncentraci.



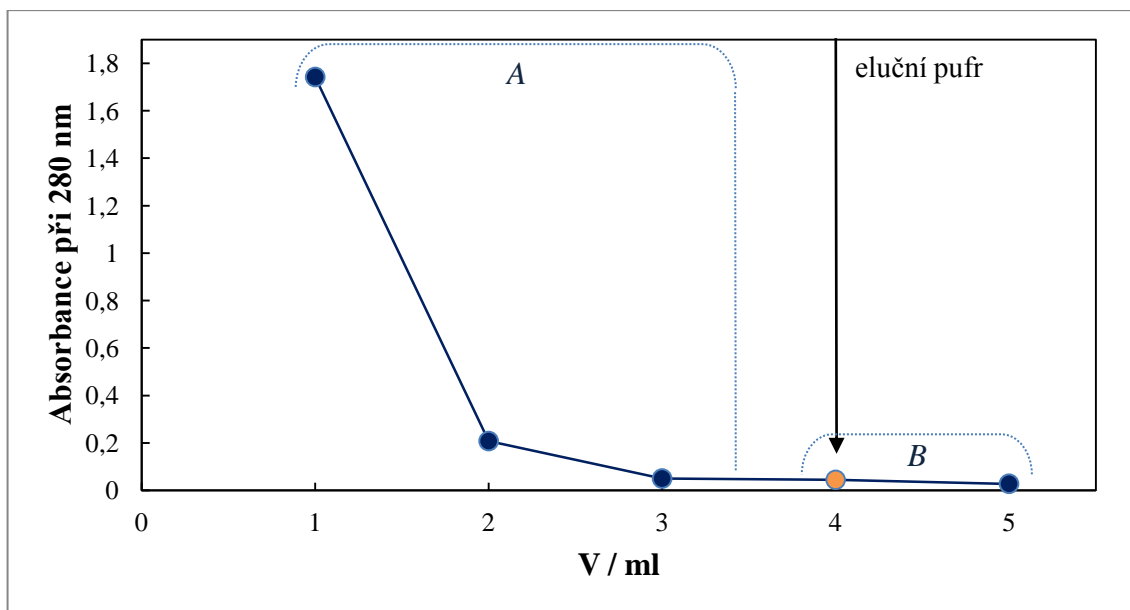
**Obr. 7 Polyakrylamidová SDS-elektroforéza jednotlivých proteinových frakcí získaných gradientovou afinitní chromatografií** A, B – frakce proteklé, C, D – frakce vázané, K – vzorek nanášený na kolonu (10 mg/ml), S – standard (kopolymer lysozemu, 1 mg/ml). Do jamek byly nanášeny vždy 2  $\mu$ l vzorků; vzorky byly rozpuštěny v neredukujícím prostředí.

Při rozlišení proteinových složek jednotlivých frakcí na SDS-elektroforéze je opět pozorovatelný výrazný rozdíl v oblasti relativní molekulové hmotnosti přibližně 34 900. Co se týče proteinů nižší relativní molekulové hmotnosti, můžeme je identifikovat jak ve frakci proteklé, tak ve frakci eluční. Ve frakci eluční lze přibližně odhadnout, že se tyto proteiny pohybují v oblasti velikostí 15 000 – 18 700 u frakce s vyšší konduktivitou, tedy s koncentrovanějším KCl. V eluční frakci s nižší konduktivitou lze vidět navíc proteiny v zóně 14 200 a 19 100. Obě eluční frakce se od sebe navzájem liší přítomností proteinů o velikosti asi 22 100, které jsou identifikovatelné ve frakci s nižší konduktivitou, tedy s nižší koncentrací KCl.

### **3.2.3 Vsádkové uspořádání**

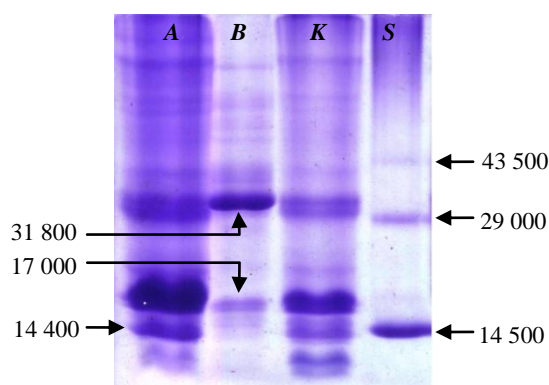
Roztok DNA-celulosity (používaný na metody kap. 2.2.2.2, str. 20) byl převeden do mikrozkušavek, stočen na centrifuze při 14 000 x g a byl z něj odebrán supernatant. Preparát proteinů kravského oviduktu (získaný dle kap. 2.2.1, str. 20) rozpuštěný v nanášecím pufru (0,01 M Tris + 0,1 M KCl) byl aplikován do mikrozkušavek s peletou DNA-celulosity a roztok byl promíchán. Po stočení na centrifuze při 14 000 x g byl odebrán supernatant a byla změřena jeho absorbance (Helios  $\gamma$ ) při 280 nm proti nanášecímu pufru. Po poklesu absorbance pod 0,1 byla peleta rozmíchána v elučním pufru (0,01 M Tris + 1 M KCl) a byl opakován stejný postup.

Byly získány dvě frakce, v první frakci byly zachyceny proteiny neinteragující s DNA-celulosou. Ve frakci druhé získané vymytím pelety 1 M KCl byly zachyceny proteiny navázané na DNA-celulosu. Z naměřených dat byl sestrojen graf závislosti absorbance na elučním objemu (viz Obr. 8, str. 32). Poměr mezi proteiny proteklými a vázanými je přibližně 750:1.



**Obr. 8 Afinitní chromatografie proteinů kravského oviduktu na koloně DNA-celulosy s vsádkovým uspořádáním:** Chromatografie byla provedena dle kap. 2.2.2.3, (str. 21); byla separována směs kravských oviduktálních proteinů (30 mg) získaná dle kap. 2.2.1 (str.20); byly získány proteklé frakce A a B v nanášecím pufru (0,01 M Tris + 0,1 M KCl) a vázané frakce C a D v elučním pufru (0,01 M Tris + 1 M KCl), frakce byly následně elektroforeticky identifikovány (viz Obr. 9).

Pro rozlišení proteinů jednotlivých frakcí byly vzorky podrobeny SDS-elektroforéze v neredukujícím prostředí vzorkového pufru (viz Obr. 9). Byly připraveny roztoky vzorku nanášeného na kolonu o koncentracích 10 mg/ml a vzorku standardu (kopolymer lysozymu) o koncentraci 1 mg/ml. Pro opětovné nedostačující množství proteinů z frakce proteklé i vázané bylo nutno lyofilizační baňky vymýt vzorkovým pufrém, nebyly tudíž připraveny vzorky o známé koncentraci.



**Obr. 9 Polyakrylamidová SDS-elektroforéza jednotlivých proteinových frakcí získaných vsádkovou afinitní chromatografií:** A – frakce proteklá, B – frakce vázaná, (koncentrace nezjištěny) K – vzorek nanášený na kolonu (10 mg/ml), S – standard kopolymeru lysozymu (1 mg/ml). Bylo nanášeno 5  $\mu$ l vzorků A a B, 2  $\mu$ l vzorku nanášeného na kolonu K a 4  $\mu$ l standardu S.

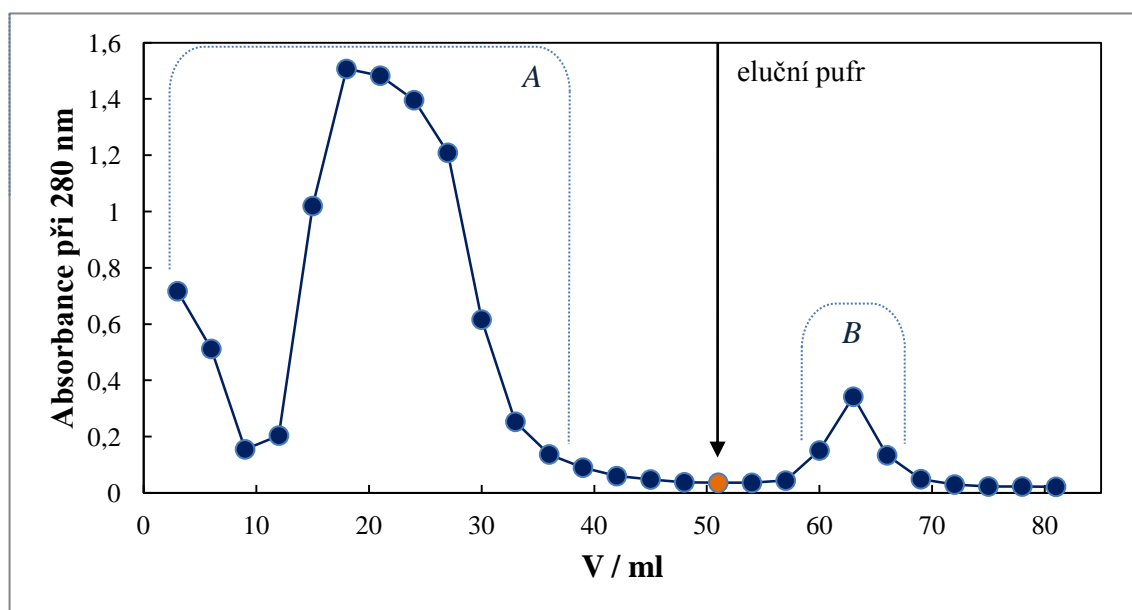
Na rozdíl od separací s kolonovým uspořádáním (kap. 3.2.1 a 3.2.2) se frakce vázaná od frakce proteklé výrazně neliší. V obou frakcích lze identifikovat zónu proteinů o



relativní molekulové hmotnosti přibližně 31 800 a 17 000. Ve frakci proteklé navíc i proteiny o velikostech přibližně 14 400. Tato metoda nebyla pro separaci proteinů efektivní, což mohlo být způsobeno již částečnou degradací sloupce.

### 3.3 Antimikrobiální aktivita separovaných proteinů

Proteiny kravského oviduktu (získané dle kap. 2.2.1, str. 20) byly separovány pomocí afinitní chromatografie na koloně DNA-celulose. Bylo nanášeno 30 mg preparátu rozpuštěného v nanášecím pufru (0,01 M Tris + 0,1 M KCl). Průběžně byly měřeny absorbance (Helios  $\gamma$ ) jednotlivých frakcí při 280 nm proti nanášecímu pufru. Při poklesu absorbance pod 0,1 byla kolona promyta elučním puftrem (0,01 M Tris + 1 M KCl) a byla měřena absorbance (Helios  $\gamma$ ) sbíraných frakcí při 280 nm proti pufru elučnímu. Vybrané příslušné frakce byly spojeny a dialyzovány proti destilované vodě při 4°C. Následně byly vzorky namrazeny a lyofilizovány a použity na stanovení antimikrobiální aktivity. Z naměřených dat byl sestrojen graf závislosti absorbance na elučním objemu (viz Obr. 10). Poměr mezi proteiny proteklými a vázanými je přibližně 21:1.



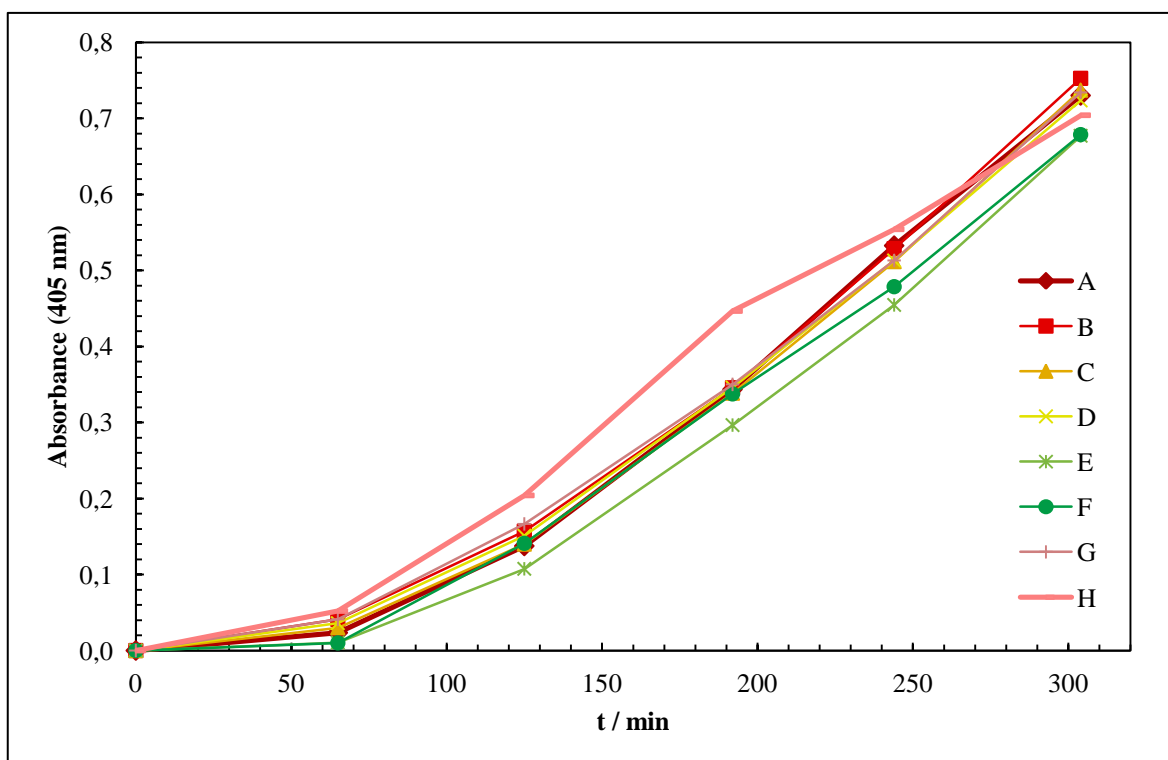
**Obr. 10 Afinitní chromatografie na koloně DNA-celulose:** Chromatografie byla provedena dle kap. 2.2.2.2 (str. 20); bylo naneseno 30 mg preparátu proteinů z kravského oviduktu získaného dle kap. 2.2.1 (str.20). Vzorek byl rozpuštěn v pufru nanášecím (0,01 M Tris + 0,1 M KCl); vázaná frakce byla eluována puftrem elučním (0,01 M Tris + 1 M KCl). Vyznačené frakce proteklé (resp. vázané) byly spojeny do roztoku A (resp. B) a následně elektroforeticky identifikovány (viz Obr. 11, str. 34).

Z lyofilizovaných vzorků byly připraveny roztoky proteinů v LBA mediu. Bylo rozpuštěno 2,2 mg proteinů z proteklé frakce v 250  $\mu$ l LBA. Ve frakci vázané nebyl dostatek proteinů pro přípravu roztoku o známé koncentraci, a tak musela být lyofilizační

baňka vymyta 250  $\mu$ l LBA. Do čtyř sloupců mikrotitrační destičky bylo nanášeno 100  $\mu$ l roztoku albuminu v LBA (o koncentraci 1 mg/ml) a do prvních jamek 100  $\mu$ l vzorku z proteklé nebo vázané frakce (dvě paralelní měření). Byla provedena dvojková ředící řada, vyjma poslední jamky. Do všech jamek bylo přidáno 100  $\mu$ l buněk *E. coli* (serotyp K-12).

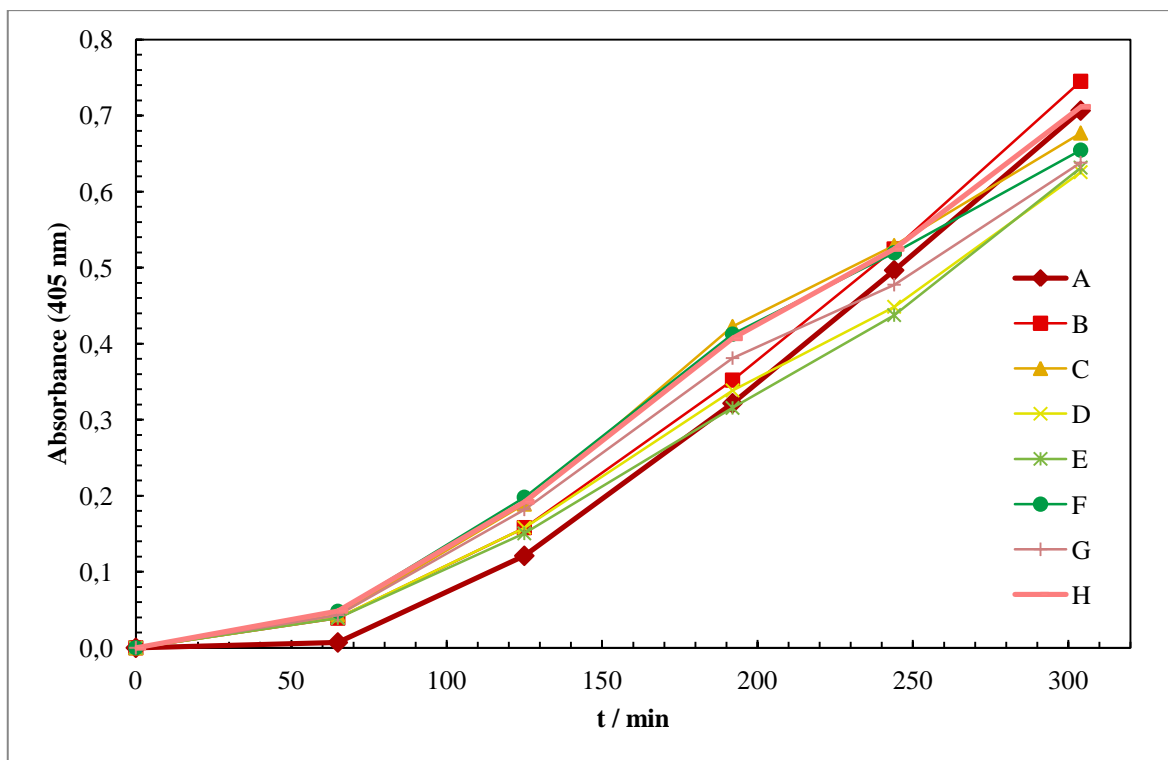
Nejvyšší koncentrace proteinů proteklé frakce tedy byla 0,138 mg/ml (na Obr. 11, řada A), nejnižší 0,002 mg/ml (na Obr. 11, řada G).

Každou hodinu byla měřena absorbance (na přístroji SUNRISE TECAN) inkubační směsi při 405 nm. Z naměřených hodnot byl sestaven graf závislosti absorbance na čase.



**Obr. 11 Antimikrobiální aktivita proteinů separovaných afinitní chromatografií – nevázaná frakce:** A-G – buňky *E. coli* s postupně nižší koncentrací separovaných proteinů (v mg/ml: 0,138; 0,069; 0,034; 0,017; 0,009; 0,004; 0,002), H – buňky *E. coli*. Do jamky mikrotitrační destičky bylo aplikováno 100  $\mu$ l roztoku albuminu v LBA (1 mg/ml) a 100  $\mu$ l roztoku proteinů z nevázané frakce (0,55 mg/ml) a byla provedena dvojková ředící řada (A-G); bylo přidáno 100  $\mu$ l buněk *E. coli*; do poslední jamky (H) bylo k 100  $\mu$ l albuminu přidáno 100  $\mu$ l buněk *E. coli*.

Pro nedostatečnou koncentraci separovaných proteinů není možné z grafu (Obr. 11) vyčíst antimikrobiální aktivitu nevázané frakce z afinitní chromatografie na DNA-celulose. Křivky zobrazující závislost absorbance na čase pro jednotlivé koncentrace proteinů (A-G) se navzájem takřka překrývají a nedá se říci, že by ležely výrazně pod křivkou znázorňující růst samotných buněk (H).



**Obr. 12 Antimikrobiální aktivita proteinů separovaných afinitní chromatografií – vázaná frakce:** A-G – buňky *E. coli* s postupně nižší koncentrace separovaných proteinů (nezjištěná), H – buňky *E. coli*. Do jamky mikrotitrační destičky bylo aplikováno 100  $\mu$ l roztoku albuminu v LBA (1 mg/ml) a 100  $\mu$ l roztoku proteinů z vázané frakce a byla provedena dvojková ředící řada (A-G) ; bylo přidáno 100  $\mu$ l buněk *E. coli*; do poslední jamky (H) bylo k 100  $\mu$ l albuminu přidáno 100  $\mu$ l buněk *E. coli*.

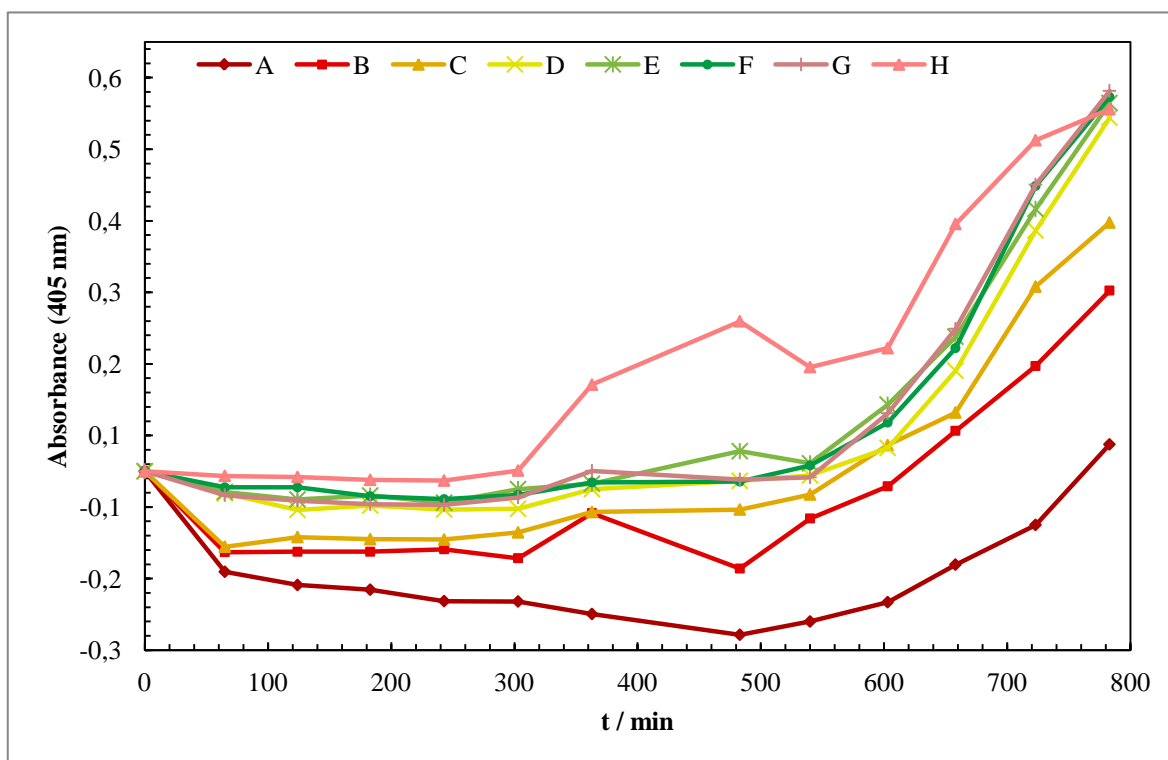
Koncentrace proteinů separovaných afinitní chromatografií na DNA-celulose z vázané frakce byla nižší než koncentrace proteinů nevázaných. Ani z tohoto grafu (Obr. 12) tedy nelze určit antimikrobiální aktivitu pro vázanou frakci. Jednotlivé křivky zobrazující závislost absorbance na čase pro různé koncentrace proteinů (A-G) se navzájem takřka překrývají a neleží pod křivkou znázorňující růst samotných buněk (H).

### 3.4 Antimikrobiální aktivita oviduktální tekutiny

Pro nedostatečnou koncentraci separovaných proteinů kravského oviduktu byla stanovena antimikrobiální aktivita celkové oviduktální tekutiny krávy, kde je možno identifikovat antimikrobiální aktivitu.

Byl rozpuštěn 1 mg preparátu kravských oviduktálních proteinů (získaný dle kap. 2.2.1, str. 20) v 1 ml LBA media. Do dvou sloupců mikrotitrační destičky bylo aplikováno 100  $\mu$ l roztoku albuminu (1 mg/ml) a do prvních jamek 100  $\mu$ l rozpuštěného preparátu. Byla provedena dvojková ředící řada, vyjma poslední jamky. Do všech jamek bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku buněk *E. coli* (serotyp K-12).

Koncentrace proteinů v první jamce byla 25 mg/ml, dále vždy poloviční až do koncentrace 0,39 mg/ml. Aktivita byla měřena proti buňkám *E. coli* (serotyp K-12). Buňky byly inkubovány při 37°C po dobu šesti hodin, přes noc byly přechovávány při 4°C a druhý den bylo pokračováno v měření během dalších pěti hodin s inkubací při 37°C. Byla měřena absorbance při 405 nm (na přístroji SUNRISE TECAN). Z naměřených hodnot absorbance byl sestrojen graf závislosti absorbance na čase (Obr. 13).



**Obr. 13 Antimikrobiální aktivita oviduktální tekutiny krávy:** A-G – buňky *E. coli* s postupně nižší koncentrací proteinů oviduktální tekutiny (v mg/ml: 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78; 0,39), H – buňky *E. coli*. Do jamky mikrotitrační destičky bylo aplikováno 100  $\mu$ l roztoku albuminu v LBA (1 mg/ml) a 100  $\mu$ l roztoku proteinů z kravských oviduktů (100 mg/ml) a byla provedena dvojková ředící řada (A-G); bylo přidáno 100  $\mu$ l buněk *E. coli*; do poslední jamky (H) bylo k 100  $\mu$ l albuminu přidáno 100  $\mu$ l buněk *E. coli*.

Z grafu můžeme usoudit, že směs proteinů z kravského oviduktu vykazuje jistou antimikrobiální aktivitu, a to nejvíce při nejvyšší a druhé nejvyšší použité koncentraci (tedy 25 a 12,5 mg/ml). V koncentracích nižších antimikrobiální aktivita není jednoznačně prokazatelná. Na grafu lze vidět výrazný skok a pokles v oblasti mezi 400 a 500 minutami způsobený uchováním inkubační směsi přes noc při 4°C.

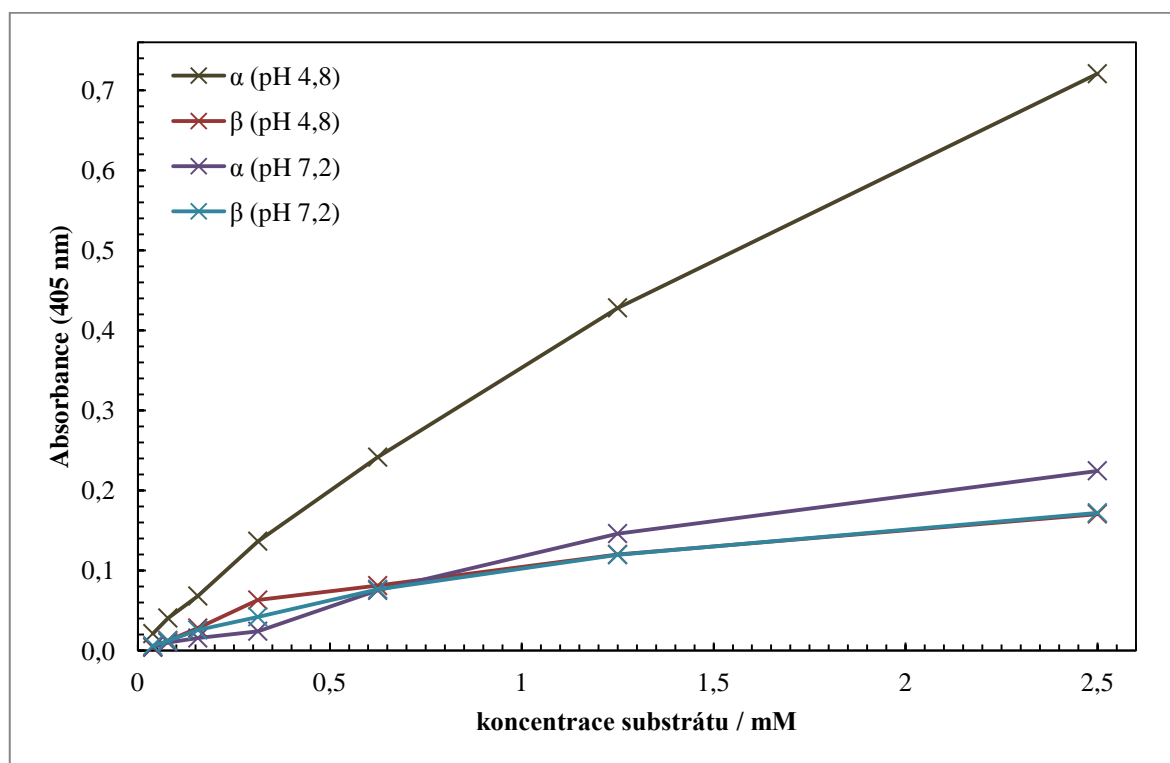
### 3.5 Glykosidasová aktivita oviduktální tekutiny

V mikrotitrační destičce bylo provedeno měření enzymové aktivity glykosidas v kravské oviduktální tekutině (získané dle kap. 2.2.1, str. 20) na substrátech *p*-nitrofenyl-

$\alpha$ -D-glukopyranosidu a *p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-glukopyranosidu. Do čtyř sloupců mikrotitrační destičky bylo aplikováno 100  $\mu$ l 0,1 M citrát-acetátového pufru o pH 4,8, do dalších čtyř 100  $\mu$ l 0,1 M citrát-acetátového pufru o pH 7,2. Do prvních jamek bylo přidáno 100  $\mu$ l substrátu ( $\alpha$  a  $\beta$ ) ve dvou paralelních měřeních. Byla provedena dvojková ředící řada, vyjma poslední jamky. Do všech jamek bylo přidáno 100  $\mu$ l rozpuštěného preparátu kravských oviduktálních proteinů o koncentraci 1 mg/ml.

Koncentrace substrátů v první jamce byla 2,5 mM, v dalších vždy poloviční, až do koncentrace 0,039 mM. Koncentrace preparátu kravských oviduktálních proteinů byla 0,5 mg/ml.

Po inkubaci při 37°C byla provedena vybarvovací reakce *p*-nitrofenolu 1 M NaOH a byla změřena absorbance (na přístroji SUNRISE TECAN) při 405 nm. Z naměřených hodnot byl sestrojen graf závislosti absorbance na koncentraci (viz Obr. 14).



**Obr. 14 Glykosidasová aktivita preparátu oviduktální tekutiny:** Závislost absorbance (při 405 nm) na koncentraci substrátu; křivka označená  $\alpha$ : substrát *p*-nitrofenyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid pro dvě různá pH (4,8 a 7,2), křivka označená  $\beta$ : substrát *p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-glukopyranosid pro dvě různá pH (4,8 a 7,2). Do jamek čtyř sloupců mikrotitrační destičky bylo aplikováno 100  $\mu$ l 0,1 M citrát-acetátového pufru o pH 4,8, do dalších 4 sloupců 100  $\mu$ l 0,1 M citrát-acetátového pufru o pH 7,2; postupně bylo přidáno 100  $\mu$ l 10 mM roztoku substrátu ( $\alpha$  nebo  $\beta$ ) tak, aby byly vždy dvě paralelní měření pro každý substrát v každém pufru; byla provedena dvojková ředící řada, přičemž poslední jamky ve sloupcích byly ponechány bez substrátu.

Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny dvojitým reciprokým vynesemím podle Lineweavera-Burka pro stanovení Michaelisových konstant. Na osu X byly vyneseny

hodnoty reciproké koncentrace ( $1/c$ ), na osu Y hodnoty reciproké absorbance ( $1/A$ ). Pro substrát *p*-nitrofenyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid byla vynechána nejnižší koncentrace při pH 7,2 a pro *p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-glukopyranosid nejnižší koncentrace při pH 4,8. Body byly proloženy přímkou a z její směrnice byly vypočítány hodnoty  $K_m$  (viz Tabulka 1). Afinita  $\alpha$ -glykosidas k substrátu byla přibližně stejná pro obě pH, u  $\beta$ -glykosidas byla afinita k substrátu vyšší při fyziologickém pH.

**Tabulka 1:** Hodnoty Michaelisových konstant preparátu z kravské oviduktální tekutiny pro dva substráty (*p*-nitrofenyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid a *p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-glukopyranosid) při dvou pH (4,8 a 7,2). Výpočet byl proveden z dvojité reciproké vynesení podle Lineweavera-Burka.

$K_m / \text{mM}$			
$\alpha$ (pH 4,8)	$\alpha$ (pH 7,2)	$\beta$ (pH 4,8)	$\beta$ (pH 7,2)
1,32	1,45	4,15	2,73

## 4 Diskuze

Reprodukce a tedy i proces fertilizace jsou zajišťovány přesně řízenými ději, pro které jsou důležité všechny proteinové a buněčné komponenty. Kromě kontaktu a splynutí gamet je potřeba zajistit aseptičnost prostředí, což je v imunologicky supresované tkáni, jíž reprodukční trakt je, velmi obtížné.

Ve své práci jsem se soustředila na izolaci proteinů, u kterých jsem, stejně jako v případě kuřecího reprodukčního traktu<sup>53</sup> a lidské placenty<sup>54</sup>, předpokládala antimikrobiální aktivitu. Zaměřila jsem se na izolaci histonů a jim podobných proteinů metodou afinitní chromatografie na DNA-celulose. Nejprve jsem proteiny kravské oviduktální tekutiny separovala při kolonovém uspořádání, kdy jsem získala čtyři frakce: dvě proteklé, s proteiny neinteragujícími s kolonou; dvě vázané, s proteiny s afinitou k DNA-celulose, eluované zvýšenou koncentrací chloridu draselného. Po elektroforetické separaci jednotlivých frakcí jsem identifikovala tři zóny. Předpokládáme, že ve spodních dvou (přibližné relativní molekulové hmotnosti 15 000 – 19 000) se nacházejí histony, což chceme potvrdit analýzou MALDI-TOF MS. Ve třetí zóně se nacházejí proteiny o relativní molekulové hmotnosti přibližně 33 000, zóna byla také vyhodnocena MALDI-TOF MS.

Při chromatografické separaci viditelně docházelo k degradaci sloupce DNA-celulosity, a tím ke snižování průtoku chromatografickou kolonou. Proto jsem sloupcové provedení převedla na vsádkové, ale rozdíl mezi oběma typy separací není výrazný. Účinnost vsádkové chromatografie byla sice nižší, což mohlo být způsobeno použitím již částečně degradované DNA-celulosity, ale v obou uspořádáních se v eluované frakci nacházejí přibližně stejně velké proteiny.

Za možnou příčinu degradace sloupce DNA-celulosity jsme považovali přítomnost glykosidických enzymů v izolovaném preparátu kravských oviduktálních proteinů. Stanovila jsem tedy glykosidasovou aktivitu, konkrétně  $\alpha$ - a  $\beta$ -glukosidas, a to při pH neutrálním, kdy jsou aktivní především sekretované formy glykosidas, a při pH 4,8, kdy jsou aktivní formy lyzosomální, a potvrdila tak možnou hypotézu o degradaci sloupce.

Pro další experimentální práci byl navržen sloupec sestávající z DNA na divinylsulfonem aktivovaném polyakrylamid-allyl-aminovém kopolymeru z důvodu výše zmíněné glykosidasové aktivity preparátu, ale také nízké efektivity separace na sloupci DNA-celulosity. Separaci na nově navrženém sloupci se budu věnovat ve své diplomové práci.

Dále jsem se věnovala stanovení antimikrobiální aktivity na kultuře *E. coli* serotypu K-12. Aktivitu jsem měřila ve frakci proteklé i vázané, ale z výše uvedených důvodů (pravděpodobná degradace sloupce a neefektivita separace) nebylo dostačující množství proteinů k směrodatnému stanovení. Potvrdila jsem však antimikrobiální aktivitu celkové oviduktální tekutiny<sup>56</sup>.

Antimikrobiální aktivitu oviduktálních proteinů jsem naměřila i při koncentracích nižších než jsou ty fyziologické, a proto předpokládáme, že proteiny s antimikrobiální aktivitou jsou velmi důležitou součástí imunologické obrany reprodukčních traktů, gamet a zárodku před patogenními mikroorganismy.

Identifikaci složek tekutin reprodukčních traktů, tedy i proteinů zajišťujících antimikrobiální aktivitu, a studium jejich působení považujeme za velmi přínosné pro pochopení dějů probíhajících při fertilizaci, stejně tak i dějů, které vedou k aborci nebo infertilitě. Věříme, že studium komponentů účastnících se procesu oplodnění napomůže řešení neplodnosti, která se objevuje u stále většího procenta párů.



## 5 Shrnutí výsledků

- Byla izolována oviduktální tekutina z vejcovodů krávy. Tekutina byla lyofilizována a následně chromatograficky separována.
- Z afinitní chromatografie na DNA-celulose byly získány frakce proteklé, neiteragující s kolonou, a frakce vázané na kolonu DNA-celulosity.
- Elektroforetickou charakterizací byly zjištěny přibližné relativní molekulové hmotnosti jednotlivých zón frakcí, ve frakci vázané byly identifikovány proteiny o přibližných molekulových hmotnostech 15 000 – 19 000 a 33 000. Na externím pracovišti byla provedena analýza MALDI-TOF MS vybraných zón.
- Byla zjištěna antimikrobiální aktivita proti kultuře *E. coli* (serotyp K-12) celkové oviduktální tekutiny. Antimikrobiální aktivita proteinů vázané frakce afinitní chromatografie na DNA-celulose nebyla pro nedostatečné množství těchto proteinů potvrzena.
- Byla sledována glykosidasová aktivita preparátu kravské oviduktální tekutiny na substrátech *p*-nitrofenyl- $\alpha$ -D-glukopyranosidu a *p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-glukopyranosidu při pH 4,8 a 7,2.

## Použitá literatura

- (1) Rosypal, S. *Nový přehled biologie*; 1st ed.; Scientia: Praha, 2003.
- (2) Komárek, V.; Sova, Z. *Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat: Vysokošk. učebnice*; 2nd ed.; SZN: Praha, 1971.
- (3) Cibulka, J.; Fučíková, A. *Základy fyziologie hospodářských zvířat*; Česká zemědělská univerzita v Praze, 2004.
- (4) Najbrt, R. *Veterinární anatomie: učebnice pro vys. školy veterinární. Díl 2.*; 1st ed.; SZN: Praha, 1982; p. 594.
- (5) Hunter, R. H. F. *Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animals*; Academic Press: London, 1980; p. 393.
- (6) Červený, Č.; Komárek, V.; Štěrbá, O. *Koldův atlas veterinární anatomie*; 1st ed.; Grada: Praha, 1999.
- (7) Lefebvre, R.; Suarez, S. S. *Biol. Reprod.* 1996, 54, 575.
- (8) Eisenbach, M. *Dev. Genet.* 1999, 25, 87.
- (9) Bahat, A.; Eisenbach, M. *Mol. Cell Endocrinol.* 2006, 252, 115.
- (10) Zhuo, L.; Kimata, K. *Cell Struct. Funct.* 2001, 26, 189.
- (11) Salustris, A.; Yanagishita, M.; Hascall, V. C. *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 13840.
- (12) Wassarman, P. M. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 24285.
- (13) Johnston, D. S.; Wright, W. W.; Shaper, J. H.; Hokke, C. H.; van den Eijnden, D. H.; Joziase, D. H. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 1888.
- (14) Bleil, J. D.; Wassarman, P. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988, 85, 6778.
- (15) Tulsiani, D. R. P.; Nagdas, S. K.; Cornwall, G. A.; Orgebin-Crist, M.-C. *Biol. Reprod.* 1992, 46, 93.
- (16) Lin, Y.; Mahan, K.; Lathrop, W. F.; Myles, D. G.; Primakoff, P. *J. Cell Biol.* 1994, 125, 1157.
- (17) Talbot, P.; Shur, B. D.; Myles, D. G. *Biol. Reprod.* 2003, 68, 1.
- (18) Mortillo, S.; Wassarman, P. M. *Development* 1991, 113, 141.
- (19) Bedford, J. M. *Biol. Reprod.* 1970, 2, 128.

- (20) Talbot, P.; Dandekar, P. *Microsc. Res. Techniq.* 2003, *61*, 349.
- (21) <http://www.trinity.edu/lespey/biol1307/lectures/lect5/fertilization.jpg>. (23.5.2012).
- (22) Roberts, G. P.; Parker, J. M.; Symonds, H. W. *J. Reprod. Fert.* 1975, *45*, 301.
- (23) Tay, J. I.; Rutherford, A. J.; Killick, S. R.; Maguiness, S. D.; Partridge, R. J.; Leese, H. J. *Hum. Reprod.* 1997, *12*, 2451.
- (24) Stanke, D. F.; Sikes, J. D.; DeYoung, D. W.; Tumbleson, M. E. *J. Reprod. Fert.* 1974, *38*, 493.
- (25) Killian, G. J.; Chapman, D. A.; Kavanaugh, J. F.; Deaver, D. R.; Wiggin, H. B. *J. Reprod. Fert.* 1989, *86*, 419.
- (26) Aguilar, J.; Reyley, M. *Anim. Reprod.* 2005, *2*, 91.
- (27) Buhi, W. C.; Alvarez, I. M.; Kouba, A. J. *Cells Tissues Organs* 2000, *166*, 165.
- (28) Sato, T.; Ito, A.; Mori, Y.; Yamashita, K.; Hayakawa, T.; Nagase, H. *J. Biochem.* 1991, *275*, 645.
- (29) Funahashi, H.; McIntush, E. W.; Smith, M. F.; Day, B. N. *Theriogenology* 1996, *47*, 277.
- (30) Blair, M.; Verhage, G. *Biology of Reproduction* 1990, *465*, 457-465.
- (31) Buhi, W. C.; Alvarez, I. M.; Choi, I.; Cleaver, B. D.; Simmen, F. A. *Biol. Reprod.* 1996, *55*, 1305.
- (32) Sendai, Y.; Abe, H.; Kikuchi, M.; Satoh, T.; Hoshi, H. *Biol. Reprod.* 1994, *50*, 927.
- (33) Arias, E. B.; Verhage, H. G.; Jaffe, R. C. *Biol. Reprod.* 1994, *51*, 685.
- (34) Sendai, Y.; Komiya, H.; Suzuki, K.; Onuma, T.; Kikuchi, M.; Hoshi, H.; Araki, Y. *Biol. Reprod.* 1995, *53*, 285.
- (35) Suzuki, K.; Sendai, Y.; Onuma, T.; Hoshi, H.; Hiroi, M.; Araki, Y. *Biol. Reprod.* 1995, *53*, 345.
- (36) Jaffe, R. C.; Arias, E. B.; O'Day-Bowman, M. B.; Donnelly, K. M.; Mavrogianis, P. A.; Verhage, H. G. *Biol. Reprod.* 1996, *55*, 421.
- (37) Verhage, H. G.; Mavrogianis, P. A.; Boomsma, R. A.; Schmidt, A.; Brenner, R. M.; Slayden, O. V.; Jaffe, R. C. *Biol. Reprod.* 1997, *57*, 525.
- (38) Verhage, H. G.; Mavrogianis, P. A.; O'Day-Bowman, M. B.; Schmidt, A.; Arias, E. B.; Donnelly, K. M.; Boomsma, R. A.; Thibodeaux, J. K.; Fazleabas, A. T.; Jaffe, R. C. *Biol. Reprod.* 1998, *58*, 1098.

- (39) Boice, M. L.; McCarthy, T. J.; Mavrogianis, P. A.; Fazleabas, A. T.; Verhage, H. G. *Biol. Reprod.* 1990, *43*, 340.
- (40) Murray, M. K.; Messinger, S. M. *Biol. Reprod.* 1994, *51*, 1126.
- (41) Buhi, W. C.; O'Brien, B.; Alvarez, I. M.; Erdos, G.; Dubois, D. *Biol. Reprod.* 1993, *48*, 1274.
- (42) L veill , M.-C.; Roberts, K. D.; Chevalier, S.; Chapdelaine, A.; Bleau, G. *Biol. Reprod.* 1987, *36*, 227.
- (43) King, R. S.; Killian, G. J. *Biol. Reprod.* 1994, *51*, 34.
- (44) O'Day-Bowman, M. B.; Mavrogianis, P. A.; Reuter, L. M.; Johnson, D. E.; Fazleabas, A. T.; Verhage, H. G. *Biol. Reprod.* 1996, *54*, 60.
- (45) Boatman, D. E.; Magnoni, G. E. *Biol. Reprod.* 1995, *52*, 199.
- (46) Hill, J. L.; Walker, S. K.; Brown, G. H.; Nancarrow, C. D. *Theriogenology* 1996, *46*, 1379.
- (47) Kouba, A. J.; Abeydeera, L. R.; Alvarez, I. M.; Day, B. N.; Buhi, W. C. *Biol. Reprod.* 2000, *63*, 242.
- (48) Izadpanah, A.; Gallo, R. L. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2005, *52*, 381.
- (49) Li, P.; Chan, H. C.; He, B.; So, S. C.; Chung, Y. W.; Shang, Q.; Zhang, Y.-D.; Zhang, Y.-L. *Science* 2001, *291*, 1783.
- (50) Shimizu, M.; Watanabe, Y.; Isobe, N.; Yoshimura, Y. *Poultry Sci.* 2008, *87*, 2653.
- (51) Yudin, A. I.; Generao, S. E.; Tollner, T. L.; Treece, C. A.; Overstreet, J. W.; Cherr, G. N. *Biol. Reprod.* 2005, *73*, 1243.
- (52) Zhou, C. X.; Zhang, Y.-L.; Xiao, L.; Zheng, M.; Leung, K. M.; Chan, M. Y.; Lo, P. S.; Tsang, L. L.; Wong, H. Y.; Ho, L. S.; Chung, Y. W.; Chan, H. C. *Nat. Cell Biol.* 2004, *6*, 458.
- (53) Silphaduang, U.; Hincke, M. T.; Nys, Y.; Mine, Y. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 2006, *340*, 648.
- (54) Kim, H. S.; Cho, J. H.; Park, H. W.; Yoon, H.; Kim, M. S.; Kim, S. C. *J. Immunol.* 2002, *168*, 2356.
- (55) Laemmli, U. K. *Nature* 1970, *227*, 680.
- (56) Kra merov , J.; Dr b, T.; Hanzl kov , E.; Tich , M.; P ikryl, P.; Liberda, J. *unpublished* 2012.

