

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Biochemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium proteinů spermií různých savčích druhů

Study of sperm proteins in different mammalian species

Bc. Alžběta Pohlová

školitelka: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

Praha 2016

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Pavly Postlerové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

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

V Praze dne

Podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomáhali během studia a při tvorbě této práce. V první řadě bych chtěla poděkovat mé školitelce RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za velkou trpělivost, podporu a pomoc při vzniku mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Ing., Mgr. Michalu Zigovi, Ph.D. a Ing. Aleně Kubátové za množství cenných rad a profesionální pomoc při práci v laboratoři. Všem členům skupiny Reprodukční biologie z Biotechnologického ústavu AV ČR bych chtěla poděkovat za příjemné pracovní a tvůrčí prostředí. Poděkování patří i celému oddělení imunogenetiky z Ústavu biochemie a genetiky živočichů SAV za poskytnutí býčích spermií a úžasnou spolupráci při jejich zpracování. Spolupráce probíhala v rámci společného projektu AV ČR a SAV. Na tomto místě bych chtěla poděkovat i MVDr. Rostislavu Šimkovi a týmu Veterinární kliniky Jesenice u Prahy za poskytnutý materiál.

Zvláštní poděkování patří mé rodině a blízkým za nekončící podporu, důvěru a pochopení během mého studia.

Abstrakt

Rozmnožování je základní charakteristikou všech zvířat a nezbytným krokem k produkci nové generace. Studium proteinů spermií je rozhodující pro pochopení vzájemného rozpoznání spermie a vajíčka. Zabývali jsme se povrchovými proteiny, které se podílejí na vazbě na *zona pellucida* a zkoumali, zda jsou tyto proteiny zachovány v rámci savčích druhů. Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie byla použita k testování panelu monoklonálních protilátek, které byly připraveny proti povrchovým proteinům spermií prasete, na býčích a myších spermiích. Byla nalezena zkřížená mezidruhová reaktivita některých protilátek proti kančím spermiím na ejakulovaných spermiích býka a na epididymálních spermiích myši. Dále jsme izolovali proteiny spermií různých savčích druhů: prasete, býka, psa, kocoura, myši a člověka. Proteiny byly separovány elektroforeticky v přítomnosti SDS a byly porovnány proteinové a glykoproteinové profily epididymálních, ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií. Interakce spermií se *zona pellucida* byly studovány na elektroforeticky separovaných povrchových proteinech spermií prasete a býka reakcí s biotinem- značenými glykoproteiny *zona pellucida*. Protilátky značící povrchové proteiny kančích spermií se *zona pellucida* vázající aktivitou byly použity ke sledování původu daného proteinu v tekutinách a tkáních reprodukčního traktu.

Klíčová slova: proteiny spermií, SDS-elektroforéza, imunofluorescence, receptory pro vazbu na *zona pellucida*

Abstract

Reproduction is an essential feature of all animals and a fundamental step to produce new generations. Study of sperm proteins is crucial for understanding of the sperm-egg recognition. We searched out sperm surface proteins involving in the zona pellucida (ZP) binding and studied whether these proteins are preserved throughout mammalian species. Indirect immunofluorescent technique was used to test a panel of monoclonal antibodies prepared against boar sperm surface proteins on spermatozoa of bull and mice. We found a cross-reactivity of some antibodies against boar sperm with bull ejaculated and mouse epididymal spermatozoa. Further, we isolated sperm proteins from different mammalian species, such as pig, bull, dog, cat, mouse and human. Proteins were separated by SDS-electrophoresis and protein/glycoprotein profiles from epididymal, ejaculated and *in vitro* capacitated sperm were compared. The interaction of sperm with ZP was studied on electrophoretically-separated sperm surface proteins from pig and bull with biotin-labeled ZP glycoproteins. Antibodies, which reacted with boar sperm surface proteins with ZP-binding activity, therefore could be potential egg-binding receptors, were used for monitoring of the sperm protein origin in reproductive fluids and tissues.

(In Czech)

Keywords: sperm proteins, SDS-electrophoresis, immunofluorescence, zona pellucida-binding receptors

Obsah

Seznam použitých zkratk	10
1 Úvod	12
1.1 Pohlavní buňky – stavba a vývoj	12
1.1.1 Vajíčko	12
1.1.1.1 Zona pellucida	13
1.1.2 Spermie	15
1.1.3 Vývoj spermií ve varleti	16
1.1.4 Zrání spermií v epididymu – epididymální maturace	17
1.2 Ejakulace spermií	19
1.2.1 Proteiny semenné plasmy	19
1.3 Ovidukální rezervoár	20
1.4 Kapacitace spermií	21
1.4.1 Kapacitace spermií <i>in vitro</i>	22
1.5 Oplození	23
1.6 Proteiny spermie	24
1.6.1 Receptory na spermii pro vazbu <i>zona pellucida</i> vajíčka	25
1.6.2 Izolační metody proteinů spermií	26
1.7 Cíl práce	28
2 Materiál a metody	29
2.1 Použitý materiál	29
2.1.1 Chemikálie	29
2.1.2 Biologický materiál	31
2.2 Metody	31
2.2.1 Základní zpracování spermií	31
2.2.2 Izolace spermií z epididymu	32
2.2.3 <i>In vitro</i> kapacitace kančích spermií	32
2.2.4 <i>In vitro</i> kapacitace býčích spermií	33
2.2.5 Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie	33
2.2.5.1 Hodnocení kapacitačního stavu kančích spermií	34
2.2.5.2 Hodnocení kapacitačního stavu býčích spermií	34
2.2.5.3 Imunolokalizace proteinů na spermiích	35

2.2.6	Extrakce proteinů spermií pomocí SDS	36
2.2.7	Extrakce povrchových proteinů spermie.....	36
2.2.8	Izolace proteinů z tkání samčích orgánů prasete	37
2.2.9	Izolace proteinů tekutin reprodukčních orgánů prasete	38
2.2.10	Přečištění proteinů pomocí 2-D Clean-Up Kit.....	38
2.2.11	Elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (diskontinuální elektroforéza dle Laemmliho).....	39
2.2.12	2D-elektroforéza	41
2.2.12.1	Příprava vzorků pro 2D-elektroforézu	41
2.2.12.2	Izoelektrická fokusace.....	41
2.2.12.3	SDS-PAGE.....	42
2.2.13	Vizualizace proteinů v gelu.....	42
2.2.13.1	Barvení Coomassie Brilliant Blue.....	42
2.2.13.2	Barvení stříbrem	42
2.2.14	Přenos proteinů rozdělených SDS-elektroforézou na membránu (Western blot)	43
2.2.15	Detekce sacharidových řetězců pomocí konkanavalinu A	44
2.2.16	Imunodetekce proteinů na membráně.....	44
2.2.17	Studie vazby proteinů spermií s glykoproteiny <i>zona pellucida</i>	45
2.2.17.1	Izolace oocytů prasete a skotu.....	45
2.2.17.2	Izolace glykoproteinů <i>zona pellucida</i>	46
2.2.17.3	Biotinylace glykoproteinů <i>zona pellucida</i>	46
2.2.17.4	Vazebná studie na PVDF membráně.....	47
3	Výsledky	48
3.1	Světelný mikroskop.....	48
3.2	Izolace spermií z epididymu.....	48
3.3	<i>In vitro</i> kapacitace	49
3.3.1	Hodnocení kapacitačního stavu kančích spermií	49
3.3.2	Hodnocení kapacitačního stavu býčích spermií.....	49
3.4	Imunolokalizace proteinů na spermích.....	50
3.4.1	Imunofluorescence na kančích spermích.....	50
3.4.1.1	Epididymální spermie.....	52
3.4.1.2	Ejakulované spermie	53

3.4.1.3	Kapacitované spermie	54
3.4.2	Imunofluorescence na býčích spermích	54
3.4.2.1	Epididymální spermie	56
3.4.2.2	Ejakulované spermie	56
3.4.2.3	Kapacitované spermie	57
3.4.3	Imunofluorescence na myších epididymálních spermích	58
3.4.4	Shrnutí zkřížené mezidruhové reaktivity protilátek	59
3.5	Extrakce proteinů pomocí SDS	61
3.6	Extrakce povrchových proteinů spermie	61
3.7	Izolace proteinů z tkání kančích orgánů a z tekutin reprodukčního traktu kance	61
3.8	Porovnání proteinového profilu spermíí	62
3.8.1	Epididymální spermie	62
3.8.2	Ejakulované spermie	63
3.8.3	Kapacitované spermie	64
3.9	Porovnání proteinů z povrchu spermíí	65
3.9.1	Epididymální spermie	66
3.9.2	Ejakulované spermie	67
3.9.3	Kapacitované spermie	68
3.10	Porovnání glykoproteinového profilu spermíí různých druhů savců	68
3.10.1	Epididymální spermie	69
3.10.2	Ejakulované spermie	70
3.10.3	Kapacitované spermie	71
3.11	2D-elektroforéza proteinů epididymálních spermíí psa a kocoura	71
3.12	Imunodetekce proteinů kančích spermíí na PVDF membráně	73
3.12.1	Protilátky 4C7 a 4C11	74
3.12.2	Protilátky 5C5 a 1E3	75
3.12.3	Protilátky 1D1 a 1H9	76
3.12.4	Protilátka 2D10 a 2E1	77
3.12.5	Souhrn imunodetekcí proteinů na PVDF membráně	78
3.13	Studie vazby proteinů spermíí s glykoproteiny <i>zona pellucida</i>	79
3.13.1	Izolace a biotinylace glykoproteinů <i>zona pellucida</i>	79
3.13.2	Vazebná studie proteinů kančích spermíí	79

3.13.3 Shoda imunodetekce proteinů monoklonálními protilátkami s vazbou glykoproteinů <i>zona pellucida</i>	80
3.13.4 Vazebná studie proteinů býčích spermií	81
4 Diskuze.....	83
5 Shrnutí výsledků.....	89
6 Literatura	91

Seznam použitých zkratk

3B10, 1C7, 4C7, 4C11, 5C5, 1D1, 2D10, 3D5, 3D7, 1E3, 2E1, 4E8, 5F2, 1G7, 2G9, 1H9 a 2H10	Klony monoklonálních protilátek připravených proti povrchovým proteinům kančích spermií
ACR-2	Monoklonální protilátka proti akrosinu
APS	Persíran amonný
BIS	N,N'-methylen-bis-akrylamid
BSA	Hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumine)
CBB	Coomassie Brilliant Blue R-250
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-amonio]propan-1-sulfonát
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylyndol, fluorofor
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTT	Dithiotreitol
FITC	Fluorescein isothiokyanát, fluorofor
Fuc	Fukosa
GAMPx	sekundární kozí protilátka proti myším IgG konjugovaná s křenovou peroxidasou (z angl. Goat Anti-Mouse Horseradish Peroxidase conjugate)
Gal	Galaktosa
Glc	Glukosa
GalNac	N-acetylgalaktosamin
GlcNac	N-acetylglukosamin
GPI	Glykofosfatidylinositol
HEPES	2-[4-(hydroxyethyl)-1-piperaziny]ethansulfonová kyselina
IgG	Imunoglobulin G
IPG pufr	Amfolyt pro isoelektrickou fokusaci
lacNac	N-acetyl-D-laktosamin

NeuAc	Kyselina N-acetylneuraminová, také kyselina sialová
NC membrána	Nitrocelulosová membrána
PAA	Polyakrylamid
PBS	Fyziologický roztok tlumený fosfátem (z angl. Phosphate-Buffered Saline)
PNA	Lektin z podzemnice olejně (z angl. Peanut agglutinin)
PVDF membrána	Polyvinylidenfluoridová membrána
SDS	Dodecylsírán sodný
TBM	Médium s obsahem Tris (z angl. Tris-Buffered Medium)
TBS	Fyziologický roztok tlumený Tris (z angl. Tris-Buffered Saline)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin isothiokyanát, fluorofor
ZP	<i>Zona pellucida</i>

3 Úvod

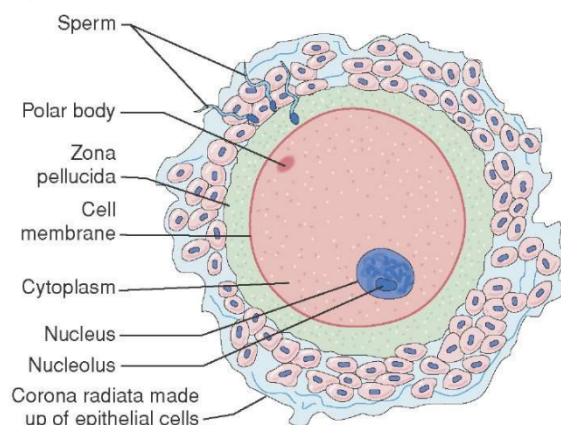
Jedním ze základních projevů všech živých organismů je schopnost rozmnožování. Tato schopnost je nezbytnou podmínkou pro přenesení genetické informace a pro zachování biologického druhu. U savců dochází k pohlavnímu rozmnožování. Při pohlavním rozmnožování vzniká nový jedinec po splynutí haploidních pohlavních buněk, z nichž jedna pochází ze samčího organismu (spermie) a druhá z organismu samičího (vajíčko).

3.1 Pohlavní buňky – stavba a vývoj

U savců známe dva typy pohlavních buněk, samičí vajíčko a samčí spermii. Vývoj pohlavních buněk, gametogeneze, probíhá v pohlavních orgánech jedince, ve varleti a ve vaječnících.

3.1.1 Vajíčko

Vajíčko, samičí pohlavní buňka, je největší buňka v organismu a obsahuje všechny organely jako somatické buňky (Obr. 1). Jedinou výjimkou je jádro nesoucí pouze jednu sadu chromosomů. Jedinou součástí vajíčka jsou kortikální granule, které se nacházejí těsně pod plasmatickou membránou (*oolemou*). Účastní se tzv. kortikální reakce. Po fúzi membrán vajíčka a spermie dochází k uvolnění obsahu těchto váčků do perivitelinního prostoru. Vyplavené hydrolytické enzymy mění strukturu a zesíťování glykoproteinů *zona pellucida*, čímž dochází k blokaci polyspermního oplození.¹



Obr. 1: Schéma vajíčka s glykoproteinovým obalem *zona pellucida* a s kumulárními buňkami²

Povrch vajíčka je chráněn glykoproteinovým obalem nazvaným *zona pellucida*. Kumulární buňky (*cumulus oophorus*), obklopující celé vajíčko i se *zona pellucida*, produkují velké množství kyseliny hyaluronové, čímž tvoří mukózní obal.³

Savčí vajíčko vzniká a vyvíjí se ve folikulech vaječníků procesem zvaným oogeneze. První fáze oogeneze probíhá již v embryonálním období samice, kdy se na vaječniku mitotickým dělením zárodečných epiteliálních buněk tvoří velké množství diploidních oogonií. Ještě před narození se z oogonií vytváří primární oocyt, který vstupuje do prvního meiotického dělení zastaveného v profázi I. V tomto stádiu je vajíčko až do ovulace. Ve druhé (růstové) fázi oogeneze primární oocyt, zastavený v profázi I, roste a získává potřebné živiny pro vývoj budoucí embrya od nejbližší vrstvy folikulárních buněk (kumulárních buněk). Během této fáze se mění a roste i folikul, ve kterém se vajíčko vyvíjí. Těsně před ovulací dokončuje oocyt první meiotické dělení, čímž vzniká haploidní sekundární oocyt a první pólóvé tělísko. Sekundární oocyt ihned vstupuje do dalšího meiotického dělení, které je zastaveno v metafázi II. V tomto stádiu dochází k ovulaci a vajíčko, spolu se *zona pellucida* a vrstvou kumulárních buněk, uvolněno z folikulu do vejcovodu (oviduktu). Vajíčko dokončuje druhé meiotické dělení jen v případě, že došlo ke splynutí membrán vajíčka se spermií.⁴

3.1.1.1 Zona pellucida

Zona pellucida (ZP) je nebuněčný obal savčího vajíčka. Savčí ZP je pružná glykoproteinová síť tvořená rostoucím vajíčkem. U savců je tvořena 3 nebo 4 glykoproteiny. Glykoproteiny ZP jsou sulfatované a obsahují O- i N-glykosidicky vázané oligosacharidy, které jsou zodpovědné za vzájemné rozpoznání obou gamet. Během fertilizace plní ZP mnoho nepostradatelných funkcí. V první řadě slouží k ochraně vyvíjejícího se vajíčka. Při kontaktu se spermiemi dochází k druhově specifické vazbě spermií na glykoproteiny ZP. Po oplození vajíčka spermií dochází v důsledku vyplavení obsahu kortikálních granulí z vajíčka k morfologickým změnám ZP, která se stává neprostupnou pro další spermie, čímž dochází k blokaci polyspermie.⁵

Nejdéle známé je složení, struktura a funkce myší *zona pellucida*. Bylo zjištěno, že je tvořena třemi glykoproteiny mZP1 (200 kDa), mZP2 (83 kDa) a mZP3 (120 kDa). Základním strukturním prvkem myší ZP jsou opakující se fibrilární vlákna tvořená dvojicí glykoproteinů mZP2 a mZP3 (heterodimery) navzájem spojená glykoproteinem ZP1.⁶ Při primárním kontaktu spermie s vajíčkem je spermií s intaktním akrosomem

rozpoznán glykoprotein mZP3, který je zároveň i induktorem exocytosis akrosomu spermie tzv. akrosomové reakce.⁷ Sekundární vazba spermie na vajíčko je zprostředkována přes glykoprotein mZP2.⁸ *Zona pellucida* myšího vajíčka obsahuje N- a O-glykosidicky vázané vysoce manosylové oligosacharidové struktury.⁹ Jako koncové jednotky N-vázaných oligosacharidů byly nalezeny N-acetyl-D-laktosamin (lacNac), sialovaný lacNac, Sd^a antigen a koncový N-acetylglukosamin (GlcNac). U O-vázaných oligosacharidů byla nalezena jako koncová jednotka převážně sialová kyselina.¹⁰

U prasečího modelu byly identifikovány tři glykoproteiny ze dvou glykoproteinových rodin s molekulovými hmotnostmi 90 kDa (při redukujících podmínkách 60 – 65 kDa a 20 – 25 kDa) a 55 kDa (pZP3). Glykoprotein *zona pellucida* 3 (pZP3) obsahuje 2 různé polypeptidy pZP3 α a pZP3 β a dohromady tvoří kolem 80 % glykoproteinového podílu vaječného obalu *zona pellucida*.¹¹ Při dalším studiu proteinů pZP3 α a pZP3 β bylo zjištěno, že jde o homology myšího glykoproteinu mZP3 a že se účastní vazby se spermií.¹²

U skotu byly nejdříve identifikovány 4 glykoproteiny nazvané bZP1, bZP2, bZP3 a bZP4. Při studiu sekvencí N-koncových aminokyselin bylo zjištěno, že bZP2 a bZP4 jsou pravděpodobně fragmenty bZP1. Pomocí protilátek proti prasečím glykoproteinům pZP3 α i pZP3 β bylo prokázáno, že se glykoprotein bZP3 účastní vazby se spermií.^{13, 14} Při studiu sacharidového složení glykoproteinů *zona pellucida* vajíčka skotu bylo zjištěno, že je tvořen z 23 % neutrálními sacharidovými řetězci, jejichž hlavní zastoupení tvoří manosylové oligosacharidové struktury, a ze 77 % je tvořen kyselými řetězci s převažující sialovou kyselinou.¹⁵ Pro vazbu spermie na *zona pellucida* vajíčka byly dlouho považovány koncové manosylové jednotky ZP,¹⁶ další vazebné studie však ukázaly, že se spermie vážou na terminální kyselinu sialovou.¹⁷

U psů a koček byly shodně nalezeny 3 glykoproteiny *zona pellucida*. Funkce glykoproteinů ZP3 a ZP2 je pravděpodobně stejná jako u myšího modelu, tedy zprostředkování primární a sekundární vazby spermie na vajíčko.¹⁸

Zona pellucida lidského vajíčka je obsahuje 4 glykoproteiny nazvané hZP1, hZP2, hZP3 a hZP4.¹⁹ V dalším studiu bylo prokázáno, že na hZP2 (~120 kDa) se vážou pouze spermie po akrosomové reakci, zatímco na hZP3 (~58 kDa) a hZP4 (~65 kDa) se vážou kapacitované spermie s intaktním akrosomem.²⁰ U lidských spermií je vazba spermie na

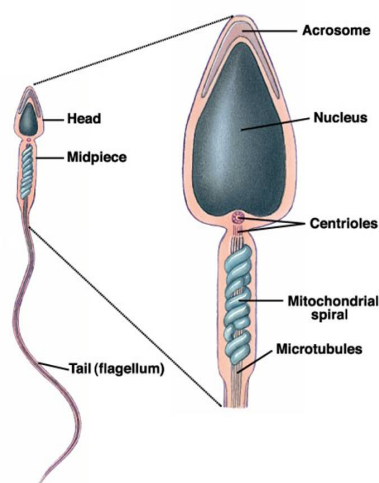
zona pellucida vajíčka zprostředkována přes terminální sacharidové struktury glykoproteinu ZP3 nazvané sialyl-Lewis^x (NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc).²¹

Aminokyselinové složení glykoproteinů *zona pellucida* je v rámci savčích druhů různě evolučně zachovalé. Lidské glykoproteiny hZP1, hZP2, hZP3 vykazují 64, 57 a 67% homologii s myšími glykoproteiny mZP1, mZP2 a mZP3 (ZP4 je u myši pseudogen). Při porovnání sekvence aminokyselin lidských a prasečích glykoproteinů ZP2, ZP3 a ZP4 vychází 64, 74 a 68% homologie (ZP1 je u prasat pseudogen). Při srovnání lidských glykoproteinů hZP1, hZP2, hZP3 a hZP4 s glykoproteiny *zona pellucida* u makaka dostáváme až 96, 94, 94 a 92% homologii v aminokyselinové sekvenci.²²

Druhově specifická vazba spermií je způsobena různým složením sacharidových struktur glykoproteinů *zona pellucida* vajíčka.²³

3.1.2 Spermie

Spermie, samčí pohlavní buňka, je tvořena dvěma základními částmi, hlavičkou a bičíkem, které jsou spojeny krčkem (Obr. 2). Hlavička spermie je tvořena jádrem, akrosomem, cytoskeletálními strukturami a malým množstvím cytoplasmy. Jádro spermie je haploidní, obsahuje jednu sadu chromozomů a nese vysoce kondenzovaný chromatin. Akrosom je membránový váček s hydrolytickými enzymy nezbytný k oplození vajíčka. Bičík spermie se skládá ze svazku mikrotubulů tzv. axonemy obklopené hustými vlákny. Ve střední části bičíku jsou kolem axonemy spirálově stočené mitochondrie.²⁴

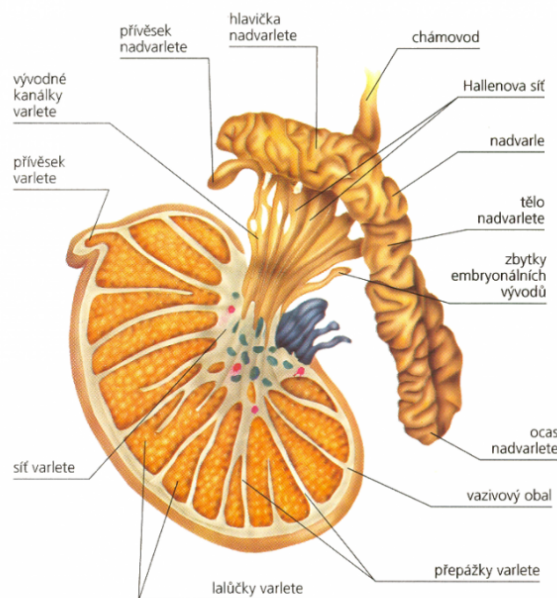


Obr. 2: Schéma stavby spermie a průřez spermií²⁵

Hlavička spermie má zcela specifické uspořádání membrán. Od okolního prostředí je celá spermie oddělena plasmatickou membránou, kterou lze rozdělit do několika funkčních segmentů. Plasmatická membrána v oblasti akrosomu je zodpovědná za rozpoznání a primární vazbu na vajíčko. Ekvatoriální segment hraje významnou roli při fúzi membrán spermie a vajíčka. Pod plasmatickou membránou se nachází vnější a vnitřní akrosomová membrána, které mají během fertilizace zcela odlišné funkce. Zatímco vnější akrosomová membrána při akrosomové reakci fúzuje s plasmatickou membránou a výsledkem je uvolnění akrosomového obsahu, vnitřní membrána nese receptory pro sekundární vazbu na *zona pellucida* vajíčka.²⁶ Velikost a tvar spermií se mezi jednotlivými savčími druhy liší.

3.1.3 Vývoj spermií ve varleti

Varle (*testis*) je párová samčí pohlavní žláza u člověka a domácích savců uložená v šourku. Je tvořeno stočenými semenotvornými kanálky se zárodečnými buňkami – spermatogoniemi. Během vývoje jsou spermie chráněny a vyživovány Sertoliho buňkami. Semenotvorné kanálky se uvnitř varlete spojují a přecházejí v kanálek nadvarlete (epididymu) (Obr. 3).²⁷



Obr. 3: Schéma varlete a nadvarlete²⁸

Vznik a vývoj spermií tzv. spermatogeneze probíhá v semenotvorných kanálcích varlete. Celý tento proces probíhá ve vlnách pod vlivem stimulačních pohlavních hormonů. První fáze vývoje začíná na okraji semenných kanálků mitotickým dělením spermatogonií za vzniku primárních spermatocytů. Tyto diploidní buňky se meiotickým dělením mění na haploidní sekundární spermatocyty, které okamžitě vstupují do druhého meiotického dělení. Vzniklá buňka je kulatá haploidní spermatida na vnitřním okraji semenných kanálků. Pro vznik charakteristického tvaru spermie prochází spermatidy dalším vývojem zvaným spermiogeneze. Během tohoto procesu dochází ve spermatidě k mnoha změnám. V jádru spermie se tvoří silně kondenzovaný chromatin. Z Golgiho aparátu se tvoří akrosom, dochází k formování bičíku a kumulaci mitochondrií v jeho střední části. Nově vznikající spermie odvrhne i přebytečné množství cytoplasmy.²⁴

Morfologický vznik spermií je tímto dokončen, přesto spermie stále nejsou motilní a nejsou schopny oplodnit vajíčko. Další vývoj tzv. zrání spermií probíhá v epididymu, kam jsou spermie dopraveny v testikulární tekutině, která je produkována Sertoliho buňkami.²⁹

3.1.4 Zrání spermií v epididymu – epididymální maturace

Nově vzniklé spermie po svém testikulárním vývoji nejsou motilní, nejsou schopné rozpoznat a ani oplodnit vajíčko. Tyto schopnosti získávají maturací při průchodu nadvarletem. Nadvarle (*epididymis*) je párový orgán přiléhající těsně k varleti na jeho horní a zadní stěně. Je to velmi dlouhý stočený kanálek, který ústí do chámovodu. Tento orgán rozdělujeme do tří částí – hlava (*caput*), tělo (*corpus*) a ocas (*cauda*). Maturované spermie jsou uchovávané v ocasu nadvarlete až do ejakulace, kdy opouští nadvarle chámovodem.⁴

Při průchodu epididymem jsou spermie v přímém kontaktu s epididymální tekutinou, kterou produkují epiteliální buňky. Epididymální tekutina obsahuje lipidy-vázající proteiny, antimikrobiální peptidy a proteiny, které se mohou podílet na vazbě *zona pellucida* nebo na fúzi spermie s vajíčkem. Během posledních let bylo v lidské epididymální tekutině i v tekutině různých druhů savců identifikováno mnoho proteinů. Byly popsány lidské epididymální proteiny, které jsou produktem genů HE1-HE6. Nejlépe prozkoumanými proteiny jsou HE1, známý také jako CTP (z angl. cholesterol transfer protein, Niemann-Pick typ C2) a protein HE5, neboli CD52.³⁰ Byly také nalezeny lipocalin 5, transferrin, clusterin, lactoferrin, CRISP a další. Mezi látky sekretované

epididymálními buňkami bylo nalezeno množství různých enzymů a jejich inhibitorů – proteasy a inhibitory proteas, glutathion peroxidasa, prostaglandin-D synthasa a glykosidasy. Mezi další látky obsažené v epididymální tekutině patří např. ionty (Na^+ , K^+ , Cl^-), kyselina sialová, laktát a D-fruktosa. Složení tekutiny je podél epididymu proměnlivé a zastoupení jednotlivých složek se liší mezi savčími druhy.^{31, 32, 33, 34}

Jednou z hlavních změn při zrání v epididymu je rozvoj motility spermie. Přesné místo zisku motility se u savčích druhů liší, ale po průchodu *cauda epididymis* jsou spermie všech savců plně motilní. Na rozvoji motility spermie se podílí fosforylace specifických proteinů bičíku.³⁵

Během epididymální maturace dochází k mnoha změnám na plasmatické membráně. Intramembránové proteiny pocházející z testes jsou přeuspořádány. Dochází k úpravám a překrytí těchto proteinů či jejich nahrazení za proteiny epididymální tekutiny. Proteiny sekretované epididymálními buňkami se mohou vázat na povrch spermií slabými nebo iontovými interakcemi, nebo se mohou integrovat přímo do plasmatické membrány.³⁵ U lidských spermií byl nalezen protein P34H, který se na povrch plasmatické membrány dostává právě při průchodu spermií epididymem.³⁶ Tento protein je zodpovědný za vazbu na *zona pellucida* vajíčka.³⁷

Při průchodu epididymem mohou být do plasmatické membrány spermie zabudovány i větší membránové struktury jako vazebné receptory, lipidové rafty a transmembránové proteiny. Spermie mohou interagovat s membránovými váčky tzv. epididymosomy, které jsou produkovány speciálními sekrečními buňkami epididymu.³⁸

Epididymální buňky velmi aktivně produkují cholesterol, který je zabudován do plasmatické membrány hlavičky spermie. Cholesterol a některé glykoproteiny stabilizují plasmatickou membránu spermie a chrání ji před předčasnou akrosomovou reakcí. Pomocí enzymů přítomných v epididymální tekutině dochází k úpravám povrchových proteinů spermií jako je fosforylace, sulfatace či změny v glykosylaci.³⁹ S maturací spermií souvisí i rostoucí záporný náboj spermie a změny v lektin vazajících schopnostech spermie. Změny během zrání spermie probíhají i na vnější akrosomové membráně, kde dochází k přeuspořádání antigenů, v jádru dochází k zesíťování jaderných proteinů tzv. protaminů a ke vzniku disulfidických vazeb na proteinech bičíku.⁴

3.2 Ejakulace spermií

Při ejakulaci opouští spermie ocas nadvarlete chámovodem, kterým jsou dopraveny do močové trubice. Během transportu spermií chámovodem dochází k jejich míchání se sekretem produkovaným epitelem chámovodu. Do močové trubice ústí také přídatné pohlavní žlázy, což je označení pro semenné váčky, prostatu a Cowperovy žlázy. Z močové trubice jsou spermie spolu se semennou plasmou vypuzeny v podobě tzv. ejakulátu ven ze samčího reprodukčního traktu. Množství ejakulátu a počet spermií se mezi savčími druhy liší. Semenná plasma je tvořena sekretem zmíněných přídatných pohlavních žláz a v menší míře i sekretem z epididymu a chámovodu. Poskytuje spermiím prostředí vhodné k přežití a k průchodu samičím reprodukčním traktem. Semenná plasma obsahuje D-fruktosu, kyselinu citronovou, ionty zinku, hořčíku a vápníku. Dále obsahuje prostaglandiny, cholesterol a velké množství proteinů.⁴⁰

Během ejakulace je plasmatická membrána spermie přímo vystavená semenné plasmě. Ze semenné plasmy se na povrch spermie navazují látky na ochranu spermie před nepříznivým prostředím samičího reprodukčního traktu např. antigeny krevních skupin, imunosupresivní faktory a histokompatibilní antigeny. Na membránu spermie se také navazují proteiny, které slouží především jako ochranný obal pro receptory rozpoznání vajíčka a vazbu na *zona pellucida*. Jiné proteiny ze semenné plasmy zvyšují schopnost spermie se vázat na sacharidové struktury oviduktu a tvořit tak oviduktální rezervoár spermií v samičím reprodukčním traktu.⁴¹

3.2.1 Proteiny semenné plasmy

V semenné plasmě prasat bylo nalezeno asi 40 proteinů. Nejvíce zastoupené proteiny jsou spermadhesiny, které tvoří asi 50 % proteinového podílu semenné plasmy.⁴² U prasete bylo identifikováno 5 proteinů této rodiny PSP-I, PSP-II, AWN, AQN-1 a AQN-3 a jejich různé glykosylované formy. Spermadhesiny mají 110-130 aminokyselin a molekulovou hmotnost od 12 do 16 kDa.⁴³ Spermadhesiny hrají roli ve stabilizaci plasmatické membrány spermie⁴⁴ a jsou důležité při tvorbě oviduktálního rezervoáru,^{45,46} kapacitaci i při vazbě na *zona pellucida* vajíčka.⁴⁷ Proteiny PSP-I a PSP-II tvoří heterodimer, který se váže na celý povrch spermie.⁴⁸ Bylo zjištěno, že komplex proteinů PSP-I/PSP-II má imunosupresivní funkci. Tento komplex interaguje s lymfocyty v samičím reprodukčním traktu.⁴⁹ Spermadhesiny AWN, AQN-1 a AQN-3 patří do skupiny heparin vázajících proteinů.⁵⁰ AWN a AQN tvoří komplexy i s dalším proteinem semenné

plasmy DQH.⁵¹ DQH (pB1) ve své molekule obsahuje fibronektinovou doménou a je homologní k proteinům hojně zastoupeným v býčí semenné plasmě.⁵²

V semenné plasmě býků bylo nalezeno více než 40 proteinů. BSP A3, BSP 30 kDa a BSP-PDC 109 jsou nejvíce zastoupené proteiny a tvoří až 60 % proteinového podílu semenné plasmy.⁵³ Tyto proteiny se vážou na plasmatickou membránu spermie přes cholinové fosfolipidy (fosfatidylcholin a sfingomyelin). Během kapacitace hrají významnou roli při lipidové modifikaci membrány a při samotném cholesterolovém efluxu.⁵⁴

Psí semenná plasma je tvořena především tekutinou prostaty a bylo v ní identifikováno několik skupin proteinů.⁵⁵ Nejdéle známá je psí prostatická specifická esterasa (CPSE z angl. canine prostate specific esterase), která je hlavním produktem prostaty⁵⁶ a je homologem lidského prostatického specifického antigenu (PSA z angl. prostate-specific antigen)⁵⁷. V psí semenné plasmě byly dále nalezeny zinek-vázající proteiny⁵⁸ a stejně jako u prasat⁵⁰ heparin-vázající proteiny.⁵⁹

V semenné plasmě kocourů bylo elektroforeticky detekováno více než 30 proteinů.⁶⁰ a byly zde nalezeny také tzv. prostamosomy, membránové váčky s proteiny, známé i u jiných savčích druhů.⁶¹

Hlavní složkou lidské semenné plasmy je protein semenogelin (52 kDa), který je produktem semenných vaků a tvoří gelovitou konzistenci ejakulátu.⁶² Dalším proteinem identifikovaným v lidské semenné plasmě je prostatický specifický antigen (PSA). Jedná se o 33 kDa serinovou proteasu, která štěpí semenogelin a podílí se na ztekucení ejakulátu.⁶³ Mezi další nalezené proteiny patří prostatická kyselá fosfatasa (PAP), beta-mikroseminoprotein a mnoho dalších.⁶⁴ Nejnovější studie se zaměřují na výzkum proteinů semenné plasmy, např. PSA, jako nástrojů pro rozvoj biologických ukazatelů (biomarkerů) mužské neplodnosti.⁶⁵

3.3 Ovidukální rezervoár

Spermie po ejakulaci putují reprodukčním traktem samice z pochvy přes dělohu do vejcovodu (oviduktu). U většiny savců dochází v isthmické části vejcovodu k zachycení spermií na stěně oviduktu. Zachycené spermie vytváří tzv. ovidukální rezervoár. Vazba spermie na epitel oviduktu je lektinového charakteru, spermie se specificky vážou na sacharidové struktury proteinů ovidukálního epitelu. Na svém povrchu nesou spermie proteinové receptory získané při epididymální maturaci nebo ze semenné plasmy při

ejakulaci. Studium těchto povrchových receptorů bylo zjištěno, že se spermie různých druhů savců vážou na odlišné sacharidové struktury glykokonjugátů oviduktu.⁶⁶

Býčí spermie se přes protein PDC-109 (BSP protein) specificky váže na koncové fukosové struktury vázané $\alpha(1-4)$ na N-acetylglukosamin.^{67, 68}

Spermadhesin AQN-1 na spermii kance se váže na terminální manosylové struktury glykoproteinů oviduktálního epitelu.⁴⁶

Pobyt spermií v oviduktálním rezervoáru zpomaluje proces kapacitace, čímž se prodlužuje jejich životnost. Spermie jsou tak schopné čekat na vajíčko několik hodin i dní. V oviduktálním rezervoáru prochází spermie procesem kapacitace, který je nezbytný pro vazbu spermie na *zona pellucida* a pro oplodnění vajíčka. Mimo jiné dochází během kapacitace k hyperaktivaci motility spermie a ke změnám povrchových proteinů spermie, tedy ke ztrátě nebo modifikaci proteinů zodpovědných za vazbu na oviduktální epitel. Po kapacitaci se spermie postupně uvolňují z oviduktálního rezervoáru. Právě postupné uvolňování spermií zásadně redukuje počet spermií, které prochází dále vejcovodem k vajíčku, a tím i snižuje pravděpodobnost polyspermiího oplození.⁶⁶

3.4 Kapacitace spermií

Kapacitace je hromadný název pro všechny biochemické a morfologické změny spermie, které probíhají v samičím reprodukčním traktu. Po ejakulaci je spermie motilní, ale není schopná oplodnit vajíčko. Při ejakulaci se na povrch spermií ze semenné plasmy navázaly tzv. dekapacitační faktory. Tyto faktory obalují povrchové glykoproteiny spermie a chrání vazebné receptory. Průchodem dělohou a vejcovodem se dekapacitační faktory ze spermie postupně uvolňují a spouští se kapacitace.⁴

Největší změny prodělává spermie navázaná v oviduktálním rezervoáru. Jednou z charakteristických změn během kapacitace je odstranění cholesterolu z plasmatické membrány spermie. U býků byly popsány proteiny semenné plasmy, které pomáhají při odstranění cholesterolu a reorganizaci lipidů v plasmatické membráně spermie. Tyto proteiny se vážou na cholinové fosfolipidy a stabilizují plasmatickou membránu spermie.⁵⁴ Membrána se po uvolnění cholesterolu stává tekutější (fluidnější), což usnadňuje proces fúze membrán při následné akrosomové reakci a splynutí membrán spermie a vajíčka. V plasmatické membráně spermie následně dochází k reorganizaci proteinů, glykoproteinů a lipidů. Utvářejí se tak nové proteinové komplexy a receptory

schopné vázat se na *zona pellucida* vajíčka.⁶⁹ Dochází také ke změně v lektinových schopnostech spermie. Tato změna je způsobena ztrátou proteinů nebo odhalením sacharidových struktur glykoproteinů spermie, anebo působením glykosyltransferas a glykosidas v samičím pohlavním traktu.⁴³

Během kapacitace dochází ke spuštění signální kaskády, která vede k fosforylaci proteinů spermie. Nejdříve v přítomnosti HCO_3^- dochází ke zvýšení pH a koncentrace Ca^{2+} uvnitř spermatické buňky a efluxu cholesterolu. Tento iontový influx aktivuje adenylátcyklasu, která produkuje cAMP. Nárůst cAMP aktivuje signální kaskádu a fosforylaci určitých proteinů.⁷⁰

Charakteristická pro kapacitované spermie je hyperaktivace motility. Tento specifický rychlý pohyb bičku usnadňuje spermii průchod matrixem kumulárních buněk i obalem *zona pellucida* vajíčka. Hyperaktivace spermii a přeuspořádání proteinů na povrchu spermii vede ke ztrátě afinity spermii k oviduktálnímu epitelu a dochází k postupnému uvolňování spermii z oviduktálního rezervoáru.^{66,71}

Kapacitované spermie uvolněné z oviduktálního rezervoáru jsou plně motilní a mají schopnost chemotaxe a termotaxe, tedy najít vajíčko. Jsou schopné navázat se na *zona pellucida* a oplodnit vajíčko.

3.4.1 Kapacitace spermii *in vitro*

Pro studium spermii, mechanismů oplození (vazebné studie) a pro asistovanou reprodukci, jak u zvířecích modelů, tak u člověka, je nutné spermie kapacitovat v *in vitro* podmínkách.

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, v semenné plasmě jsou obsažené proteiny, které působí jako dekapacitační faktory. Prvním krokem *in vitro* kapacitace spermii je odstranění semenné plasmy z ejakulátu. Spermie vhodné ke kapacitaci jsou získány tzv. Swim up metodou, tedy vyplaváním spermii do Percollového gradientu.⁷²

Kapacitační médium nahrazuje fyziologickou tekutinu a napodobuje tak podmínky průchodu spermii samičím reprodukčním traktem. Kapacitačních médií je mnoho a jejich složení se liší mezi jednotlivými savčími druhy. Existují základní složky média, které jsou pro průběh kapacitace nezbytné. Hlavní složkou kapacitačního média býčích spermii je heparin, který indukuje proces kapacitace. Heparin se váže na povrchové proteiny ejakulované spermie, které pochází ze semenné plasmy (BSP), čímž dojde k jejich

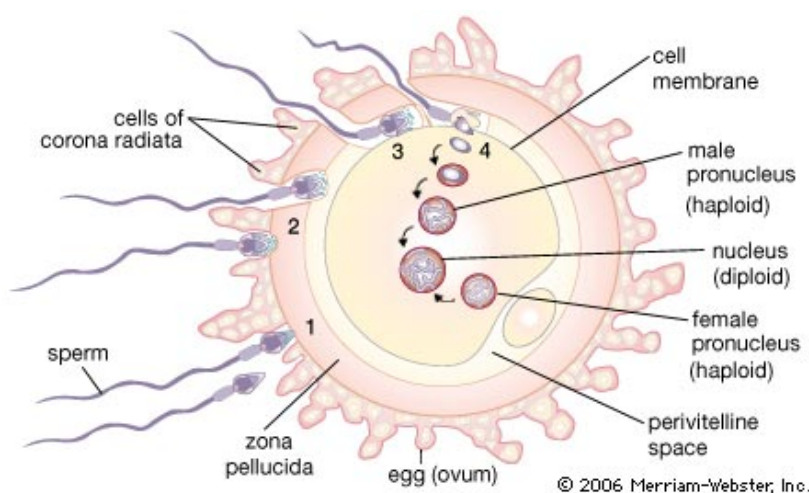
uvolnění z plasmatické membrány. Ztráta těchto proteinů z povrchu spermie následně vyvolá i změny v lipidovém složení membrány a dochází k efluxu cholesterolu.⁵⁴

Další složkou média je také sérový albumin příslušného druhu (BSA, HSA, PSA). Albumin je důležitý pro správnou funkci, životnost spermie a pro následnou akrosomovou reakci. Na albumin se také během kapacitace navazuje cholesterol uvolněný z plasmatické membrány spermií. Další nezbytnou složkou kapacitačního média je zdroj energie pro spermie, nejčastěji glukosa, fruktosa, pyruvát nebo laktát v závislosti na savčím druhu. V základu média nalezneme ionty Ca^{2+} a HCO_3^- , které jsou důležité pro spuštění cholesterolového efluxu a pro spuštění signalizačních kaskád vedoucí k fosforylaci proteinů spermie. Kapacitační médium musí mít správnou osmolalitu (~300 mOsmol/kg) a správné pH (7-7,5). Kapacitace probíhá při 37 °C v prostředí s 5 % CO_2 . Délka kapacitace se u jednotlivých druhů liší.⁷³

Zamražení spermií (kryoprezervace) používané pro inseminaci při *in vitro* fertilizaci vyvolává na spermiích některých zvířecích druhů (např. skotu) změny podobné kapacitaci.⁷⁰

3.5 Oplození

Spermie překonávají obtížnou cestu samičím pohlavním traktem, během které stále dochází k jejich dozrávání. Při správném načasování se kapacitovaná spermie setká s ovulovaným vajíčkem ve vejcovodu samice. Interakce spermie s vajíčkem probíhá postupně a zahrnuje mnoho kroků (Obr. 4).



Obr. 4: Schéma interakce spermie s vajíčkem.⁷⁴ 1) průnik spermie matrixem kumulárních buněk vajíčka, 2) primární vazba na zona pellucida a akrosomová reakce 3) sekundární vazba na zona pellucida, 4) fúze membrán spermie a vajíčka.

Spermie musí nejprve projít matrixem komplexu kumulárních buněk obklopujícím vajíčko. Hlavní složkou kumulárního matrix je polymerovaná kyselina hyaluronová spojená s proteiny. Pouze kapacitované spermie s intaktním akrosomem jsou schopné projít tímto obalem vajíčka. Na plasmatické membráně spermií je protein PH-20 s hyaluronidasovou aktivitou.⁷⁵ Tento enzym byl popsán u křečka, kance, býka, makaka i u člověka.⁷⁶

V následujícím kroku se spermie s intaktním akrosomem váže na *zona pellucida* vajíčka. Tato vazba je lektinového typu a je druhově specifická. Proteinové receptory na povrchu spermie se vážou na specifické sacharidové struktury glykoproteinu *zona pellucida* ZP3. Tato vazba indukuje kaskádu signálů, která končí spuštěním tzv. akrosomové reakce. V hlavičce spermie dochází k mnohonásobné fúzi vnější akrosomové membrány s membránou plasmatickou, a tím k uvolnění hydrolytických enzymů z akrosomu (např. akrosinu, hyaluronidasy). Tyto enzymy štěpí *zona pellucida* vajíčka, což spolu s pohyby bičíku usnadňuje spermii proniknout přes tento glykoproteinový obal. Díky akrosomové reakci se zpřístupní vnitřní akrosomová membrána, která nese proteinové receptory pro sekundární vazbu na glykoproteiny *zona pellucida* ZP2 vajíčka. Po průchodu *zona pellucida* se spermie dostává do kontaktu s plasmatickou membránou vajíčka. Ekvatoriální část plasmatické membrány hlavičky spermie splývá s oolemou. Fúze první spermie s vajíčkem vyvolá tzv. kortikální reakci, při které dochází k vylití obsahu kortikálních granulí vajíčka do perivitelinního prostoru. Enzymy uvolněné z granulí mění strukturu glykoproteinů *zona pellucida*, která se stává neprostupná pro další spermie. Dochází tak k blokaci polyspermie. Průnik spermie do vajíčka je také signálem pro dokončení druhého meiotického dělení vajíčka. Posledním krokem oplození je fúze jader obou gamet a vznik diploidní buňky, zygoty.⁴

3.6 Proteiny spermie

Proteiny spermie jsou stejně jako proteiny somatických buněk zapojeny do mnoha dějů v buňce. Pomocí hmotnostní spektrometrie již byly identifikovány některé proteiny spermií různých savčích druhů např. člověka⁷⁷, koně⁷⁸ a myši⁷⁹. Z publikovaných výsledků vyplývá, že asi čtvrtina proteinů spermie je zapojena do dějů k získání potřebné energie a metabolických procesů např. glykolýzy, β -oxidace mastných kyselin a respirace. Proteiny plasmatické membrány, které jsou zodpovědné za rozpoznání a vazbu *zona pellucida* vajíčka, v minoritním zastoupení.

3.6.1 Receptory na spermii pro vazbu *zona pellucida* vajíčka

Vazba spermie na glykoproteinový obal vajíčka je několikafázový proces. Kapacitovaná spermie nese na svém povrchu proteiny, které jsou komplementární k receptorům na *zona pellucida* vajíčka a jsou zodpovědné za primární vazbu gamet. Při prvním kontaktu se spermie těmito proteiny specificky vážou na sacharidové struktury glykoproteinu ZP3. Tato vazba je převážně lektinového typu a je druhově specifická.⁴

Nejlépe prostudovaný je myší model, u kterého bylo nalezeno a identifikováno několik proteinů, které hrají roli ve vazbě na *zona pellucida*. Jako hlavní receptor pro vazbu na vajíčko byl u myších spermii nalezen protein β 1,4-galaktosyltransferasa (GalTase)⁸⁰, který váže galaktosové a N-acetylgalaktosaminové zbytky na koncový N-acetylglukosamin oligosacharidů glykoproteinu mZP3 a následně aktivuje AR.⁸¹ Jedná se o transmembránový protein, který je zabudován do membrány při vývoji spermie ve varleti. Během maturace spermii v epididymu je překryt glykokonjugáty a neprodělává žádné změny. Tyto glykokonjugáty jsou ze spermie odstraněny během kapacitace a poté je protein schopný vazby na *zona pellucida* vajíčka.⁸² Protein β 1,4-galaktosyltransferasa byl nalezen i u dalších savčích druhů jako je prase, býk a kůň.⁸³ Další z potenciálních receptorů na spermii byl nalezen sp56, který byl nejdříve detekován na akrosom intaktních spermii⁸⁴, později byl však tento protein identifikován uvnitř akrosomu.⁸⁵ Během dalšího studia proteinu sp56 bylo zjištěno, že během kapacitace se tento protein dostává z akrosomálního matrix do plasmatické membrány spermie.⁸⁶

Jako další receptory na myších spermii byly identifikovány 95 kDa protein Zona receptor kinasa, fukosyltransfera, α -manosidasa, SLIP1 (sulfoglykolipid immobilizing protein), α -fukosidasa a SED1.²³

Na spermii prasete bylo detekováno mnoho potenciálních proteinů zodpovědných za vazbu *zona pellucida* vajíčka. Hlavními kandidáty jsou spermadhesiny AWN, AQN-1 a AQN-3,^{47,87} které se shodně vážou na Gal β (1-3)-GalNAc a Gal β (1-4)-GlcNAc sacharidové struktury glykoproteinů *zona pellucida*⁸⁸, a povrchový protein DQH⁴⁸. Další receptory, které se vážou na *zona pellucida*, byly identifikovány proteiny zonadhesin, adhesion protein APz, fukosu-vázající protein, sp38 a proakrosin/akrosin.²³ Protein P47 je periferní membránový protein se schopností vázat se na glykoproteinový obal vajíčka.⁸⁹ Tento protein byl detekován už na testikulárních spermii v oblasti akrosomu. Protein P47 je homologem myšího proteinu SED1.⁹⁰

Proteiny schopné vázat se na nativní lidskou zona pellucida byly identifikovány fukosyl-transferasa V (FUT5)⁹¹ a hCRISP1.⁹² Jako další potenciální receptory byly identifikovány proteiny PH-20⁷⁵ a α -manosidasa.⁹³

3.6.2 Izolační metody proteinů spermií

Izolace proteinů spermií je rozhodující faktor při studiu proteinů. Již v minulosti bylo ukázáno, že různé extrakční činidla a postupy vedou k izolaci odlišného spektra proteinů. Proteiny na povrchu spermií, které jsou potenciálními receptory pro vazbu na *zona pellucida* vajíčka, jsou minoritní složkou proteinového vybavení spermie. Pro jejich studium je vhodné vybrat metodu, která selektivně rozdělí proteiny spermií do různých frakcí podle jejich vlastností nebo místa výskytu. Existuje několik metod, které se snaží izolovat proteiny z plasmatické membrány. Tyto metody mají ale svá omezení. Jedním z problémů je různé procento znečištění membránové frakce intracelulárními proteiny. Dalším problémem může být izolace periferních a intramembránových proteinů a zachování jejich biologické aktivity.⁹⁴

Nejběžnější metodou izolace membránových proteinů je použití detergentů, které vytvoří obal kolem membránových proteinů. Rozlišujeme několik typů detergentů. Iontové, silné detergenty s nabitou polární hlavou, mezi které se řadí např. sodium dodecyl sulfát (SDS). V prostředí těchto detergentů dochází ke kompletní denaturaci proteinu. Dalším typem jsou neiontové detergenty, které jsou mírné a nenedenaturující. Mezi tyto proteiny patří Triton X-100 a X-114. Třetím typem jsou obojetné detergenty používané především pro 2D-elektroforézu a isoelektrickou fokusaci. Metoda izolace pomocí detergentů je snadná, ale není cílená.⁹⁵

Další metoda izolace membránových proteinů je založená na izolaci tzv. detergent-rezistentních membrán (DRM z angl. detergent-resistant membranes). V těchto membránových útvarech je vysoká koncentrace cholesterolu a GPI-vázaných proteinů.⁹⁶

Oddělení plasmatické membrány od ostatních membrán spermie a intracelulárního obsahu je možné pomocí kavitace s použitím tekutého dusíku.^{97,98} K oddělení membrán je možné také použít frakcionační centrifugaci na sacharosovém gradientu. V dalším studiu proteinů je pak možné pracovat samostatně s frakcí proteinů z plasmatické membrány.⁹⁹

V dnešní době je značně používaná metoda izolace povrchových proteinů spermií pomocí afinitní chromatografie. K označení povrchových proteinů a jejich specifickou

izolaci se používá biotin a avidin. Avidin může být ukotven např. na kuličky v afinitní kolonce.¹⁰⁰ Alternativou může být i použití monoklonálních protilátek navázaných na magnetických kuličkách¹⁰¹ nebo použití kuliček s koloidním oxidem křemičitým.¹⁰² K izolaci specifických povrchových proteinů spermií zodpovědných za vazbu na vajíčko byla použita i afinitní chromatografie s navázanými fragmenty *zona pellucida*.¹⁰³

3.7 Cíl práce

Nezbytným krokem ke vzniku nového života je splnutí dvou gamet, samčí a samičí. Před samotným splnutím musí dojít ke kontaktu obou gamet a specifickému navázání spermií na vajíčko. Studium proteinů spermií zodpovědných za rozeznání a vazbu na *zona pellucida* vajíčka je tedy klíčovým krokem k pochopení tohoto složitého děje. Předešlé studie ukazují, že vazba spermie na *zona pellucida* (ZP) je pravděpodobně zprostředkována postranními sacharidovými řetězci glykoproteinů ZP a proteinů na povrchu spermií. Navíc bylo zjištěno, že je tato vazba druhově specifická.

Cílem předkládané diplomové práce bylo:

- 1) Testování panelu monoklonálních protilátek připravených proti povrchovým proteinům kančích spermií na spermiích v různých funkčních stavech (epididymální, ejakulované a *in vitro* kapacitované). Zjištění případné zkřížené mezidruhové reaktivity těchto protilátek na býčích a myších spermiích.
- 2) Izolace proteinů epididymálních, ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií od různých savčích druhů. Jejich elektroforetické dělení a barvení separovaných proteinů a glykoproteinů. Dále pak mezidruhové porovnání proteinových a glykoproteinových profilů spermií.
- 3) Imunodetekce proteinů kančích spermií a jejich lokalizace v tkáních a tekutinách reprodukčního traktu prasete pomocí panelu monoklonálních protilátek.
- 4) Studie vazby proteinů spermií s glykoproteiny *zona pellucida*.

4 Materiál a metody

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Chemikálie

chemikálie	firma
2-merkптоethanol	Sigma-Aldrich, USA
3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-amonio]propan-1-sulfonát (CHAPS)	Sigma-Aldrich, USA
ACR-2, monoklonální protilátka proti akrosinu	Laboratoř reprodukční biologie, BTÚ, AVČR
Akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Avidin konjugovaný s peroxidasou	Sigma-Aldrich, USA
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid amonný	Lachema, ČR
Chlorid draselný	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid sodný	Lachner, ČR
Chlorid vápenatý	Sigma-Aldrich, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB)	Serva, Německo
Cystein	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, USA
Dithiotreitol (DTT)	Thermo Fischer Scientific, USA
Dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
Dusičnan stříbrný	Chemapol, ČR
Ethanol	Penta, ČR
EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin	Thermo Fischer Scientific, USA
Formaldehyd	Lachner, ČR
Gentamycin	Lek Pharmaceuticals, Slovinsko
Glukosa	Sigma-Aldrich, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, USA
Glycin	Serva, Německo
Hydroxid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogenuhličitan sodný	Lachema, ČR
IPG pufr	GE Healthcare, Velká Británie

Jodacetamid	Serva, Německo
Konkanavalin A	Vector Laboratories, USA
Kyselina 2-[4-(hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonová (HEPES)	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina chlorovodíková	Penta, ČR
Kyselina octová	Lachner, ČR
Methanol	Lachner, ČR
Minerální olej DryStrip Cover Fluid	GE Healthcare, Velká Británie
Monoklonální protilátky (3B10, 1C7, 4C7, 4C11, 5C5, 1D1, 2D10, 3D5, 3D7, 1E3, 2E1, 4E8, 5F2, 1G7, 2G9, 1H9 a 2H10)	Laboratoř reprodukční biologie, BTÚ, AVČR
Močovina	GE Healthcare, Velká Británie
N-hydroxysukcinimidobiotin	Sigma-Aldrich, USA
N,N'-methylen-bis-akrylamid (BIS)	Sigma-Aldrich, USA
N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Bio-Rad, USA
Percoll	Sigma-Aldrich, USA
Persíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich, USA
PNA-TRITC	Vector Laboratories, USA
Precision Plus Protein Standards All Blue	Bio-Rad, USA
Pyruvát	Sigma-Aldrich, USA
Rybí želatina	Sigma-Aldrich, USA
Sekundární protilátka proti myším IgG konjugovaná s křenovou peroxidasou (GAMPx)	Bio-Rad, USA
Sekundární protilátkou proti myším IgG fluorescenčně značená (Goat-Anti-Mouse IgG conjugated FITC/Alexa 488)	Thermo Fischer Scientific, USA
Sérový albumin hovězí (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
SuperSignal	Thermo Fischer Scientific, USA
Thiomočovina	Lachner, ČR
Thiosíran sodný (pentahydrát)	Chemapol, ČR
TL médium	Minitube, Německo

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva, Německo
Triton X-100	Serva, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, USA
Uhličitan sodný	Penta, ČR
Vectashield-DAPI	Vector Laboratories, USA

4.1.2 Biologický materiál

Kančí reprodukční orgány a epididymální spermie byly získány z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. v Liběchově, Česká Republika. Ejakulované kančí spermie byly získány z Chovservis a.s. v Hradci Králové, Česká Republika.

Býčí reprodukční orgány a epididymální spermie byly získány z jatek v Senci a Malé Mači, Slovensko. Ejakulované býčí spermie byly dodány ze Slovenských biologických služeb a.s., Nitra, Slovensko. Vaječníky pro izolaci vajíček krávy a prasnice byly získány z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. v Brně, Česká Republika.

Reprodukční orgány psa a kočky byly získány z Veterinární kliniky Jesenice, s.r.o. v Praze.

Myší epididymální spermie byly získány z Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i. v Praze, Česká republika. Byl použit myší kmen Black 6.

Lidské spermie byly získány ISCARE IVF, a.s., Praha, Česká republika. Dárci spermií se spermioqram, který splňoval normální parametry (počet spermií, motilita, morfologie).

4.2 Metody

4.2.1 Základní zpracování spermií

Prvním krokem při práci se spermiemi byla mikroskopická kontrola ejakulátu. Na mikroskopické podložní sklíčko bylo nanášeno 10 μ l suspenze spermií a byla vizuálně zkontrolována motilita spermií.

Dalším krokem bylo odstranění semenné plazmy centrifugací suspenze spermií při 200 \times g po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Byla použita centrifuga UNIVERSAL 30F (Hettich Zentrifugen, Německo). Supernatant byl odstraněn odsátím.

Vzniklá peleta spermií byla 2 \times promyta 10 ml roztoku PBS (20mM fosfátový dvousložkový pufr pH 7,2, 150mM NaCl) centrifugací při 200 \times g po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Po promytí spermií byla peleta velmi opatrně resuspendována ve

známém objemu roztoku PBS a byla provedena finální kontrola vzorku (motilita a koncentrace spermií).

Koncentrace spermií byla stanovena počítáním buněk v Bürkerově hemocytometrické komůrce (plocha čtverečku 0,04 mm², hloubka 10 µm) pod světelným mikroskopem Nikon E100 (Nikon, Japonsko) při 100násobném zvětšení. Množství spermií bylo opakovaně spočítáno v 10 čtverečcích mřížky a přepočítáno dle vzorce na počet buněk $\times 10^6$ v 1 ml objemu. Všechny uvedené roztoky byly před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu. Při manipulaci se spermii byly použity speciální špičky.

4.2.2 Izolace spermií z epididymu

Izolace epididymálních spermií z kance a býka byla provedena vysátím epididymálních kanálků pomocí injekční stříkačky. Epididymis byl zaškrcen v oblasti chámovodu a mezi *caput a cauda*, injekční stříkačkou byla odsáta epididymální tekutina s obsahem spermií. Izolovaná suspenze byla naředěna PBS na dvojnásobný objem a centrifugací při 200 \times g po dobu 20 minut při laboratorní teplotě byla získána peleta epididymálních spermií. Získané kančí a býčí epididymální spermie byly 3 \times promyty roztokem PBS a centrifugovány při 200 \times g po dobu 15 minut.

Pro izolaci epididymálních spermií psa a myši byl použit čerstvý orgán z operací, čerstvý epididymis kocoura se získat nepodařilo, a proto byl pro izolaci spermií použit rozmražený orgán. *Cauda* epididymis těchto savčích druhů byl rozstříhán na malé kousky, které byly v roztoku PBS inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 15 minut a spermie byly vyplaveny do roztoku. Pro odstranění tkáňových buněk byla získaná suspenze přefiltrována přes sítko s velikostí ok 30 µm. Získané epididymální spermie byly promyty 3 \times roztokem PBS a centrifugovány při 300 \times g po dobu 10 minut. Všechny uvedené roztoky byly před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu. Při manipulaci se spermii byly použity speciální špičky.

4.2.3 *In vitro* kapacitace kančích spermií

Suspenze ejakulovaných kančích spermií byla 2 \times promyta roztokem TBS (130mM NaCl, 20mM Tris; pH 7,4) a centrifugována při 200 \times g po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Po centrifugaci byl odsát supernatant, promyté spermie byly resuspendovány ve

2-4 ml kapacitačního média TBM (20mM Tris, 113,1mM NaCl, 3mM KCl, 10mM CaCl₂, 11mM glukosa, 5mM pyruvát, 1 amp. gentamycin (80 mg/2 ml); pH 7,7) opatrně navrstveny na Percollový gradient (2 ml 80%, 1,5 ml 70%, 1,5 ml 55% a 2 ml 40%). Centrifugace spermií v Percollovém gradientu byla prováděna při 200 × g po dobu 45 minut při laboratorní teplotě. Pro kapacitaci *in vitro* byly dále použity spermie z oblasti rozhraní 70% a 80% Percollu. Zbylé Percollové fáze byly opatrně ze zkumavky odsáty, spermie z 80% roztoku Percollu byly opatrně 2 × promyty v TBM a centrifugovány při 200 × g vždy 10 minut. Po druhém promytí byly spermie resuspendovány a naředěny roztokem BSA v TBM (1 mg/ml) na koncentraci 5 × 10⁷ buněk/ml. Kapacitace probíhala v suspenzi po 500 μl v termostatu při 37 °C v prostředí 5% CO₂ po dobu 4 hodin. Po kapacitaci byly spermie centrifugovány při 200 × g po dobu 10 minut a resuspendovány v roztoku PBS. Všechny uvedené roztoky a média byly před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu. Při manipulaci se spermii byly použity speciální špičky.

4.2.4 *In vitro* kapacitace býčích spermií

Suspenze ejakulovaných býčích spermií byla naředěna roztokem PBS a centrifugována při 200 × g po dobu 10 minut. Následně byly ejakulované spermie promyty kapacitačním TL médiem (Minitube, Německo) a centrifugovány při 200 × g po dobu 10 minut. Spermie byly naředěny na finální koncentraci 10⁸ buněk/ml v kapacitačním TL médiu. Kapacitace probíhala v suspenzi po 500 μl v termostatu při 39 °C v prostředí 5% CO₂ po dobu 4 hodin. Po kapacitaci byly spermie centrifugovány při 200 × g po dobu 10 minut a resuspendovány v roztoku PBS. Všechny uvedené roztoky a média byly před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu.

4.2.5 Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie

Pro hodnocení kapacitačního stavu spermií a pro testování panelu monoklonálních protilátek byla použita nepřímá fluorescence. Příprava jednotlivých preparátů je popsána v následujících podkapitolách.

Negativní kontrola byla vždy připravena stejným postupem jako preparáty s výjimkou primární protilátky. Inkubace s primární protilátkou byla u negativní kontroly nahrazena inkubací s roztokem PBS.

Hodnocení připravených preparátů bylo provedeno pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E-400 (Nikon, Japonsko) s imerzním objektivem Plan Apo VC 60x oil (Nikon, Japonsko). Snímky byly snímány pomocí CCD kamery VDS1300 (Vosskühler, Německo) a softwaru NIS Elements AR (Laboratory Imaging, Česká Republika).

4.2.5.1 Hodnocení kapacitačního stavu kančích spermií

Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie s použitím monoklonální protilátky ACR-2 proti akrosomovému proteinu akrosinu byla použita pro stanovení funkčního stavu kančích spermií před a po *in vitro* kapacitaci.¹⁰⁴ Ze suspenze ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií v roztoku PBS byly připraveny nátěry (10 μ l) na mikroskopická podložní sklíčka. Nakapané preparáty byly fixovány vymraženým acetonem po dobu 10 minut při laboratorní teplotě a poté omyty roztokem PBS s 0,05% Tween 20. Na podložní sklíčko byla přidána monoklonální protilátka ACR-2, inkubace probíhala po dobu 60 minut při 37 °C ve vlhké komůrce. Po ukončení inkubace byly preparáty opakovaně promyty roztokem PBS s 0,05% Tween 20 a byla nanesena sekundární protilátka proti myším IgG konjugovaná s FITC, inkubace probíhala po dobu 60 minut při 37 °C ve vlhké komůrce. Po inkubaci byly preparáty opět promyty roztokem PBS s 0,05% Tween 20 a následně destilovanou vodou. Po osušení bylo na preparát nanесeno montovací médium Vectashield s DAPI a preparát byl překryt krycím sklíčkem.

4.2.5.2 Hodnocení kapacitačního stavu býčích spermií

Ke stanovení kapacitačního stavu býčích spermií před a po *in vitro* kapacitaci byla použita monoklonální protilátka P-Tyr-01 proti fosfotyrosinu. Dále byla provedena kontrola integrity akrosomu pomocí PNA.¹⁰⁵ PNA (z angl. Peanut agglutinin) je lektin pocházející z podzemnice olejné, který se specificky váže na postranní sacharidový řetězec Gal- β (1-3)-GalNAc glykoproteinů na vnější akrosomové membráně. Ze suspenze ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií v roztoku PBS byly připraveny nátěry (10 μ l) na mikroskopická podložní sklíčka. Připravené preparáty byly fixovány v ledovém roztoku acetonu a methanolu (1:1) po dobu 10 minut a poté omyty PBS s 0,05% Tween 20. Na podložní sklíčko byla přidána monoklonální protilátka P-Tyr-01 v ředění 1:200 v PBS, inkubace probíhala po dobu 60 minut při 37 °C ve vlhké komůrce.

Po inkubaci byly preparáty opakovaně promyty roztokem PBS s 0,05% Tween 20 a byla nanesena sekundární protilátka proti myším IgG konjugovaná s FITC (1:300), inkubace probíhala po dobu 30 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Po inkubaci byly preparáty opět promyty roztokem PBS s 0,05% Tween 20 a následně inkubovány s 50 μ l PNA-TRITC v PBS (1:300) po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly preparáty omyty roztokem PBS s 0,05% Tween 20 a destilovanou vodou, následně bylo na preparát nanесeno montovací médium Vectashield s DAPI a preparát byl překryt krycím sklíčkem.

4.2.5.3 Imunolokalizace proteinů na spermiích

Imunolokalizace proteinů na spermiích byla provedena pomocí panelu monoklonálních protilátek proti proteinům izolovaným z povrchu kančích ejakulovaných spermií, který byl připraven naší laboratoří.¹⁰⁶ Klony protilátek použité při charakterizaci proteinů na povrchu kančích spermií byly označeny takto: 3B10, 1C7, 4C7, 4C11, 5C5, 1D1, 2D10, 3D5, 3D7, 1E3, 2E1, 4E8, 5F2, 1G7, 2G9, 1H9 a 2H10.

Z buněčné suspenze kančích epididymálních, ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií v koncentraci 1×10^6 /ml byly připraveny nátěry buněk po 10 μ l na podložní mikroskopická sklíčka.

Býčí epididymální, ejakulované a *in vitro* kapacitované spermie byly před nanesením na mikroskopické podložní sklíčko fixovány v suspenzi 3,7% paraformaldehydu po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly spermie centrifugovány při $200 \times g$ po dobu 5 minut, paraformaldehyd byl odstraněn odsátím a spermie byly $2 \times$ promyty roztokem PBS. Po promytí byly na mikroskopická podložní sklíčka připraveny nátěry býčích spermií po 10 μ l.

Ze suspenze myších epididymálních spermií byly na podložní mikroskopická sklíčka připraveny nátěry buněk po 10 μ l.

Inkubace se supernatantem monoklonální protilátky probíhala ve vlhké komůrce po dobu 60 minut při 37 °C. Po inkubaci byly preparáty důkladně promyty roztokem PBS s 0,05% Tween 20 a následovala inkubace s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou proti myším IgG (Goat Anti-Mouse IgG konjugovaná s FITC) ředěnou 1:500 v roztoku PBS, ve vlhké komůrce po dobu 60 minut při 37 °C. Po ukončení inkubace byly preparáty opět důkladně promyty roztokem PBS s 0,05%

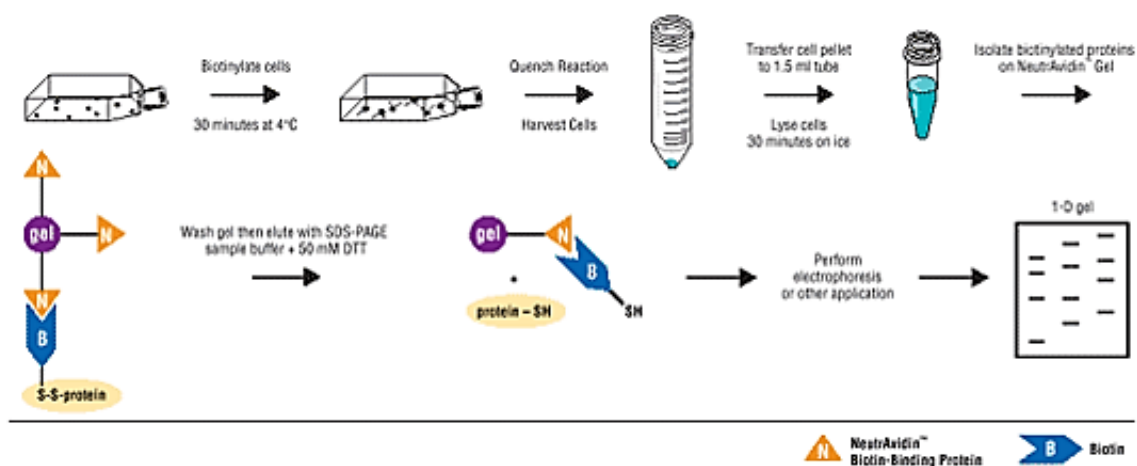
Tween 20 a následně destilovanou vodou. Po osušení bylo na preparát naneseno montovací médium Vectashield-DAPI k označení jaderné DNA a preparát byl překryt krycím sklíčkem.

4.2.6 Extrakce proteinů spermií pomocí SDS

Ze suspenze spermií po základním zpracování (kap. 2.2.1, str. 31) bylo odebráno potřebné množství pro SDS elektroforézu. K peletě 1×10^8 buněk bylo přidáno 100 μ l SDS neredukujícího vzorkového pufru (50mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glycerol, 2% SDS, 0,0013% bromfenolová modř) nebo redukujícího vzorkového pufru (s přidavkem merkaptoethanolu do výsledné koncentrace 0,0013%) a směs byla důkladně resuspendována. Připravené vzorky byly inkubovány ve vroucí vodní lázni po dobu 3 minut a poté zchlazeny na ledu. Vzniklý lyzát byl následně centrifugován 2 minuty při $10000 \times g$ a proteiny rozpuštěné v supernatantu byly použity pro elektroforetické rozdělení.

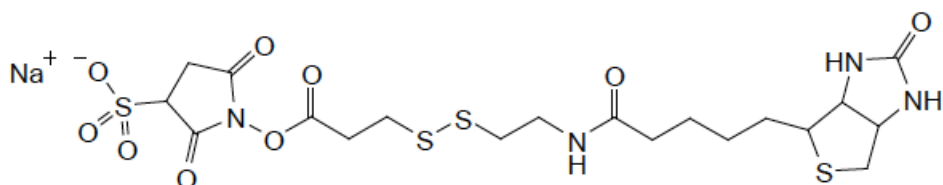
4.2.7 Extrakce povrchových proteinů spermie

Z epidymálních, ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií byly extrahovány povrchové proteiny pomocí Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Fischer Scientific, USA). Při izolaci proteinů bylo postupováno dle návodu výrobce (Obr. 5).



Obr. 5: Schéma extrakce povrchových proteinů spermie pomocí Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Fischer Scientific, USA).

Prvním krokem bylo značení povrchových proteinů buněk biotinem. Peleta spermií (4×10^8 buněk) promytá roztokem PBS, byla inkubována s 10 ml biotinylační směsi (2,5 mg EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotinu (Obr. 6) v PBS) za stálého otáčení po dobu 30 minut při 4 °C.



Obr. 6: Chemický vzorec EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotinu

Reakce byla ukončena přidavkem 500 μ l zhášecího činidla (angl. Quenching Solution), které obsahuje volné $-NH_2$ skupiny. Buňky byly centrifugovány při $500 \times g$ po dobu 3 minut a následně $3 \times$ promyty 10 ml roztokem TBS (25mM Tris-HCl, 150mM NaCl; pH 7,2).

Za použití lyzačního pufru s inhibitory proteas byla provedena lýze buněk. K peletě biotinem značených buněk bylo přidáno 500 μ l lyzačního činidla. Buňky byly resuspendovány a inkubovány na ledu po dobu 30 minut. Během inkubace byla suspenze buněk každých 5 minut intenzivně promíchána na vortexu. Po inkubaci byla suspenze centrifugována při $10000 \times g$ po dobu 2 minut při 4 °C. Získaný buněčný lyzát byl nanesen na kolonku s imobilizovaným NeutrAvidinem na agarosových kuličkách a za stálého třepání 60 minut inkubován při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl lyzát z kolonky odstraněn centrifugací při $1000 \times g$ po dobu 1 minuty. Agarosové kuličky s navázanými povrchovými proteiny spermie byly $3 \times$ promyty dodaným promývacím roztokem (angl. Wash Buffer).

Navázané proteiny byly eluovány z avidinové afinitní kolonky inkubací ve 400 μ l SDS vzorkového pufru (50mM Tris-HCl, 10% glycerol, 2% SDS; pH 6,8) s přidavkem 50mM DTT za stálého otáčení po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Centrifugací při $1000 \times g$ po dobu 2 minut byl získán supernatant obsahující povrchové proteiny spermie. Takto připravené vzorky byly uchovány při -20 °C.

4.2.8 Izolace proteinů z tkání samčích orgánů prasete

Proteiny byly izolovány z tkání samčích reprodukčních orgánů (varle, nadvarle, prostata, semenné vajíčky) a z ledviny, která byla použita jako negativní kontrola. Tkáň jednotlivých orgánů (asi 100 mg) byla homogenizována v 1% Triton X-100 v roztoku 30mM Tris-HCl, 50mM KCl s pH 7,8 ve speciálních zkumavkách s homogenizačními kuličkami. Pro dosažení lepší homogenizace tkáně byl vzorek opakovaně chlazen na ledu (3 minuty) a homogenizován (20 sekund). Pro homogenizaci byl použit homogenizátor Precellys 24 (Bertin Technologies, Francie). Homogenát byl centrifugován 2 minuty při $10\,000 \times g$. Získaný supernatant s proteiny byl přečištěn pomocí 2-D Clean-Up kitu (kap.2.2.10, str. 38) a proteiny následně rozpuštěny v redukujícím vzorkovém pufru.

Koncentrace izolovaných proteinů byla fluorometricky stanovena pomocí Quant-It Protein Assay Kit (Invitrogen, USA) a Qubit Fluorometer (Invitrogen, USA).

4.2.9 Izolace proteinů tekutin reprodukčních orgánů prasete

Suspenze epididymálních spermií (kap. 2.2.2, str. 32) byla naředěna roztokem PBS na dvojnásobný objem a centrifugací při $200 \times g$ po dobu 20 minut při laboratorní teplotě byla získána epididymální tekutina a peleta epididymálních spermií. Epididymální tekutina byla znovu centrifugována při $10\,000 \times g$ po dobu 10 min při 4°C .

Semenná plazma byla získána centrifugací ejakulovaných spermií při $200 \times g$ po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Získaný supernatant byl znovu centrifugován při $10\,000 \times g$ po dobu 10 min při 4°C .

Semenné vajíčky byly opatrně odděleny od okolní tkáně a byla z nich vytlačena tekutina, která byla centrifugována při $3500 \times g$ po dobu 10 min při 4°C .

Tekutiny reprodukčního traktu byly přečištěny pomocí 2-D Clean-Up kitu a získané proteiny byly rozpuštěny v redukujícím vzorkovém pufru. Koncentrace izolovaných proteinů byla fluorometricky stanovena pomocí Quant-It Protein Assay Kit (Invitrogen, USA) a Qubit Fluorometer (Invitrogen, USA).

4.2.10 Přečištění proteinů pomocí 2-D Clean-Up Kit

Získané supernatanty při izolaci proteinů z tkání kančího reprodukčního traktu, tekutiny reprodukčního traktu a vzorky proteinů před 2D-elektroforézou byly přečištěny

pomocí 2-D Clean-Up kitu (GE Healthcare, Velká Británie). V průběhu čištění vzorku dochází k vysrážení proteinů pomocí srážecích roztoků a odmytí neproteinových složek.

4.2.11 Elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (diskontinuální elektroforéza dle Laemmliho¹⁰⁷)

Pro elektroforetické rozdělení proteinů byl použit 15% polyakrylamidový separační gel. Příprava 15% separačního gelu:

- 2,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8)
- 2,5 ml dest. H₂O
- 5,0 ml roztoku akrylamidu (tj. 29,2% akrylamid a 0,8% BIS)
- 100 μ l 10% SDS.

Těsně před nalitím gelu mezi skla bylo do roztoku separačního gelu přidáno:

- 4,5 μ l TEMED
- 35 μ l 10% APS.

Připravený separační gel byl nalit mezi skleněné desky a převrstven destilovanou vodou. Gel byl nechán polymerovat asi 1 hodinu.

Pro elektroforetické rozdělení proteinů kančích spermií a jejich následnou imunodetekci byl použit rozdělovací gel s gradientem koncentrace akrylamidu (7,5-21 %). Nejprve byly připraveny roztoky s koncentrací 7,5 % a 21 % akrylamidu.

Příprava 7,5% separačního gelu:

- 2,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8)
- 5,0 ml dest. H₂O
- 2,5 ml roztoku akrylamidu (tj. 29,2% akrylamid a 0,8% BIS)
- 100 μ l 10% SDS.

Příprava 21% separačního gelu:

- 2,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8)
- 0,5 ml dest. H₂O
- 7,0 ml roztoku akrylamidu (tj. 29,2% akrylamid a 0,8% BIS)
- 100 μ l 10% SDS.

Rozdělovací gel s gradientem koncentrace akrylamidu byl připraven pomocí soustavy spojených nádob. Do jedné nádoby byl nalit roztok separačního gelu o nižší

koncentraci akrylamidu a do druhé nádoby roztok o vyšší koncentraci akrylamidu. Oba roztoky byly neustále míchány magnetickým míchadlem. Těsně před aplikací gelu mezi skla bylo do obou gelů přidáno:

- 2,3 μ l TEMED
- 18 μ l 10% APS.

Prostor mezi nádobami byl otevřen a pomocí peristaltické pumpy (GE Healthcare, Velká Británie) byl roztok polyakrylamidu nasáván z nádob a hadičkou zakončenou jehlou byl vrstven mezi elektroforetická skla. Lineárního gradientu bylo dosaženo při správném poměru míchání roztoků, průtoku mezi nádobami a odtoku směsi roztoků. Připravený separační gel byl převrstven destilovanou vodou a ponechán polymerovat asi 60 minut.

Příprava 4% zaostřovacího gelu:

- 625 μ l 0,5M Tris-HCl (pH 6,8)
- 1,52 ml dest. H₂O
- 325 μ l roztoku akrylamidu (tj. 29,2% akrylamid a 0,8% BIS)
- 25 μ l 10% SDS.

Těsně před nalitím gelu mezi skla bylo do roztoku zaostřovacího gelu přidáno:

- 3,8 μ l TEMED
- 35 μ l 10% APS.

Z povrchu separačního gelu byla odsáta voda a byla nanесena vrstva zaostřovacího gelu. Do zaostřovacího gelu byl okamžitě zasunut hřeben pro tvorbu jamek. Gel byl nechán polymerovat asi 20 minut.

Byla sestavena aparatura pro elektroforézu Mini PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad, USA). Do katodového i anodového prostoru byl nalit stejný elektrodový pufr (0,025M Tris, 0,192M glycin, 0,1% SDS, pH 8,3). Po odstranění hřebenu byly do jamek nanесeny vzorky pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky. Objem nanášených vzorků byl 10-15 μ l na jamku.

Molekulová hmotnost separovaných proteinů byla určena podle barvených molekulových proteinových standardů Precision Plus Protein Standards All Blue (Bio-Rad, USA). Vzorky proteinů pro elektroforetické rozdělení byly extrakty spermií

připravené pomocí neredukujícího a redukujícího vzorkového pufru (kap. 2.2.6, str. 36), proteiny z povrchu spermií (kap. 2.2.7, str. 36) a extrakty tkání a tekutin reprodukčního traktu (kap. 2.2.8 a 2.2.9, str. 38).

Jako zdroj stejnosměrného proudu byl použit Power Pac 1000 (Bio-Rad, USA). Zpočátku elektroforéza probíhala při napětí 90 V (asi 20 minut) a po přechodu proteinů do separačního gelu bylo nastaveno napětí na 150 V (asi 60 minut).

4.2.12 2D-elektroforéza

4.2.12.1 Příprava vzorků pro 2D-elektroforézu

Proteiny epididymálních spermií byly získány extrakcí pomocí SDS redukujícího pufru (kap. 2.2.6, str. 36), přečištěny pomocí 2-D Clean Up kitu (kap. 2.2.10, str. 38) a rozpuštěny v rehydratačním pufru (7M močovina, 2M thiomočovina, 4% CHAPS, 1% Triton X-100, 20mM Tris, 0,002% bromfenolová modř, 2% roztok amfolytu (IPG pufr), bromfenolová modř a 1% DTT). Koncentrace izolovaných proteinů byla fluorometricky stanovena pomocí Quant-It Protein Assay Kit (Invitrogen, USA) a Qubit Fluorometer (Invitrogen, USA). Připravené vzorky proteinů na 2D-elektroforézu o koncentraci 100 μg ve 180 μl rehydratačního pufru byly použity pro rehydrataci stripů s rozmezím pH 3-10 o délce 7 cm. Do jamky rehydratační destičky Immobiline DryStrip Reswelling Tray (GE Healthcare, Velká Británie) bylo nanášeno 150 μl připraveného proteinového vzorku. Strip s gelem byl ponořen do roztoku vzorku gelem dolů a celá jamka byla následně vyplněna minerálním olejem DryStrip Cover Fluid. Rehydratační destička byla zakryta víkem. Rehydratace stripu probíhala při laboratorní teplotě přes noc.

4.2.12.2 Izoelektrická fokusace

Prvním krokem 2D-elektroforézy byla izoelektrická fokusace proteinů. Rehydratované stripy byly vyjmuty z rehydratační destičky, byl odsát přebytečný minerální olej a strip byl vložen do přístroje pro fokusaci Ettan IPGphor (GE Healthcare, Velká Británie). Ke stripu s gelem byly připevněny elektrody a byl opět zalit minerálním olejem. Fokusace probíhala za postupného zvyšování napětí do hodnoty 6 kVh (asi 4 hodiny), maximální proud na jeden strip byl 60 μA . Po ukončení fokusace byl strip s gelem vyjmut z fokusačního přístroje a zamrazen a při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ uchován pro další použití.

4.2.12.3 SDS-PAGE

Druhým rozměrem 2D-elektroforézy byla elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (kap. 2.2.11, str. 39).

Pro druhý rozměr 2D-elektroforézy byl použit 15% separační gel. Do zaostřovacího gelu byl vložen speciální hřebínek pro tvorbu jamky na strip. Před vlastní elektroforézou byl strip inkubován 15 minut v ekvilibračním pufru (6M močovina, 50mM Tris-HCl pH 6,8, 30% glycerol, 2% SDS) s přidavkem 1% DTT na horizontální třepačce při laboratorní teplotě. Následně byl inkubován dalších 15 minut v ekvilibračním pufru s přidavkem 2% jodacetamidu. Před nanesením na gel byl strip omyt destilovanou vodou.

4.2.13 Vizualizace proteinů v gelu

4.2.13.1 Barvení Coomassie Brilliant Blue

Coomassie Brilliant Blue (CBB) je modré barvivo, které se váže na proteiny, zejména na arginin, lysin a aromatické aminokyseliny v proteinech, v polyakrylamidovém gelu. Po odmytí přebytečného CBB zůstanou místa na gelu obsahující proteiny označena viditelnými modrými proužky.

Po skončení elektroforetického rozdělení proteinů (kap. 2.2.11, str. 39) byl gel opatrně vyjmut ze skel a promyt destilovanou vodou. Následně byl barven minimálně 60 minut v roztoku barviva Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25 g CBB, rozpuštěno v 45 ml methanolu, 9 ml kyseliny octové a 45 ml dest. vody). Po obarvení byl gel promýván odbarvovacím roztokem (250 ml methanolu, 100 ml kyseliny octové, 650 ml H₂O) až do odbarvení pozadí gelu.

4.2.13.2 Barvení stříbrem

Metoda barvení proteinů v polyakrylamidovém gelu stříbrem je 10-100 × citlivější než barvení proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue. Principem vizualizace proteinů je vazba stříbrných kationtů (Ag⁺) na –SH a –COOH funkční skupiny některých aminokyselin. Po redukci na kovové stříbro jsou místa obsahující proteiny značena tmavými proužky na světlém pozadí gelu.

Pokud byly proteiny nedostatečně obarveny Coomassie Brilliant Blue, byl gel následně inkubován ve fixačním roztoku (50 ml methanolu, 12 ml kyseliny octové,

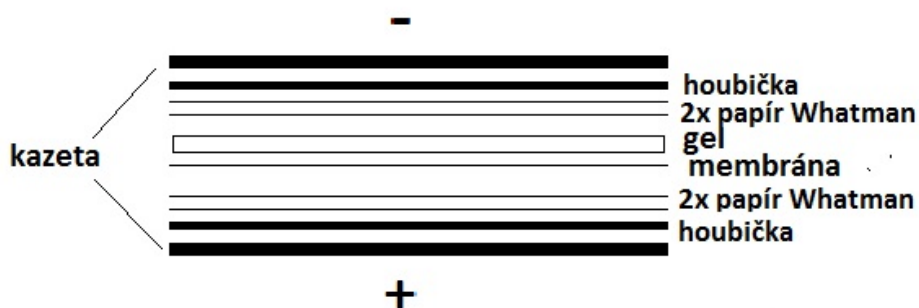
50 μ l 37% formaldehydu, doplněno do 100 ml dest. vodou) po dobu 60 minut při laboratorní teplotě (případně přes noc ve 4 °C). Další postup inkubace gelu:

- 3× 20 minut v 50% ethanolu
- 1 minuta v roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/l)
- 3× 20 sekund v destilované vodě
- 20 minut v roztoku AgNO_3 (0,2 g AgNO_3 , 75 μ l 37% formaldehydu, doplněno do 100 ml dest. H_2O)
- 2× 20 sekund v destilované vodě
- vizualizace (přibližně 10 min) v roztoku Na_2CO_3 (6 g Na_2CO_3 , 50 μ l 37% formaldehydu, 400 μ g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, doplněno do 100 ml dest. H_2O)
- 2× 2 minuty v destilované vodě

Nakonec byl gel inkubován (asi 10 minut) fixačním roztokem (250 ml methanolu, 50 ml glycerolu, 50 ml kyseliny octové a 150 ml dest. vody) a zataven do celofánu.

4.2.14 Přenos proteinů rozdělených SDS-elektroforézou na membránu (Western blot¹⁰⁸)

Před elektropřenosem proteinů z polyakrylamidového gelu byla PVDF-membrána (Merck Millipore, USA) nejprve promyta 100% methanolem, pak dest. vodou a následně inkubována 15 minut v přenosovém pufru (0,025M Tris, 0,192M glycin, 20% methanol, pH 8,2). Při použití nitrocelulosové membrány (NC) byla membrána před použitím inkubována 15 minut v přenosovém pufru. V přenosovém pufru byly ponořeny i houby a filtrační papíry Whatman. Gel byl spolu s membránou, filtračními papíry a houbami vožen do kazety (Obr. 7).



Obr. 7: Schéma sestavení kazety s gelem a membránou pro elektropřenos

Kazeta byla vložena do přístroje pro elektropřenos Mini Protean 3 Cell (Bio-Rad, USA) spolu s chladícím bločkem. Celý přístroj byl ponořen do ledové tříště.

Elektrody byly připojeny ke zdroji Power Pac 1000 (Bio-Rad, USA). Elektropřenos probíhal 90 minut při 500 mA.

Po ukončení přenosu byla membrána opatrně vyjmuta z kazety a promyta destilovanou vodou. Membrána byla dále použita pro detekci glykoproteinů, imunodetekci proteinů na membráně a vazebnou studii.

4.2.15 Detekce sacharidových řetězců pomocí konkanavalinu A

K detekci glykoproteinů byl použit konkanavalin A, sacharidy-vázající protein (lektin), který se specificky váže na koncové α -D-manosylové a α -D-glukosylové jednotky sacharidových řetězců.

Detekce glykoproteinů konkanavalinem A byla provedena na proteinech rozdělených elektroforeticky v 15% polyakrylamidovém gelu (kap. 2.2.11, str. 39). Proteiny byly následně přeneseny na NC membránu (kap. 2.2.14, str. 43). V dalším kroku proběhla tzv. deaktivace volných míst na povrchu membrány 1% roztokem rybí želatiny v PBS při 4 °C přes noc. Po promytí membrány v PBS s 0,05% Tween 20 byla NC membrána inkubována s konkanavalinem a značeným biotinem v 10 ml pufru (10mM HEPES, 0,15M NaCl a 0,1mM CaCl₂; pH 7,5) v koncentraci (5 μ l/ml) po dobu 2 hodin při 37 °C. Po inkubaci byla membrána promyta roztokem PBS s 0,05% Tween 20 (5 \times 10 min) a následně inkubována s avidinem konjugovaným s křenovou peroxidasou v roztoku 0,1M Tris-HCl, pH 8,0 po dobu 60 minut při 37 °C. Po promytí byl na membránu přidán chemiluminiscenční substrát SuperSignal. Detekce signálu probíhala v přístroji ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Velká Británie). Negativní kontrola byla připravena stejným postupem s výjimkou inkubace s konkanavalinem A, která byla nahrazena inkubací s PBS.

4.2.16 Imunodetekce proteinů na membráně

Po elektropřenosu proteinů rozdělených SDS-elektroforézou na PVDF membránu byla membrána promyta v roztoku PBS. Následovala tzv. deaktivace volných míst na povrchu membrány 1% roztokem rybí želatiny v PBS při laboratorní teplotě po dobu

4 hodin. Poté byla membrána 3 × 10 minut promývána roztokem PBS s 0,05% Tween 20. Jako primární protilátky byly použity monoklonální protilátky, které byly připravené v naší laboratoři proti proteinům z povrchu kančích ejakulovaných spermii, v různém ředění v PBS (4C7 1:20, 4C11 1:20, 5C5 1:50, 1D1 1:25, 2D10 1:20, 1E3 1:50, 2E1 1:50, 5F2 1:10 a 1H9 1:20).

PVDF membrána byla inkubována s primární protilátkou při 4 °C přes noc. Po navázání primární protilátky na přenesené proteiny byla membrána opět promývána roztokem PBS s 0,05% Tween 20 (9 × 10 minut). Následovala inkubace se sekundární protilátkou proti myším IgG konjugovaná s křenovou peroxidasou (GAMPx) ředěnou 1:12 000 v PBS při 37 °C po dobu 60 minut, a poté byla membrána promývána 6 × 10 minut roztokem PBS s 0,05% Tween 20. Negativní kontrola byla připravena shodně s výjimkou inkubace s primární protilátkou, která byla nahrazena inkubací s PBS.

Po promytí byl na membránu přidán chemiluminiscenční substrát SuperSignal. Detekce signálu probíhala v přístroji ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Velká Británie).

4.2.17 Studie vazby proteinů spermií s glykoproteiny zona pellucida

Pro studium vazby proteinů izolovaných z povrchu spermií prasete a býka s glykoproteiny zona pellucida (ZP) daného savčího druhu byly proteiny spermie nejprve rozděleny pomocí SDS-elektroforézy, poté přeneseny na PVDF membránu a inkubovány s roztokem biotinem značených glykoproteinů ZP.

4.2.17.1 Izolace oocytů prasete a skotu

Rozmrazené vaječníky prasete a skotu (asi 50 ks) byly za neustálého promývání vychlazeným fyziologickým roztokem (0,9% NaCl) rozemlety pomocí kuchyňského masového mlýnku. Rozemletý materiál byl přefiltrován přes nylonové síto s velikostí ok 1000 μm a přes gázu, stále byl promýván fyziologickým roztokem (asi 1800 ml). Přefiltrovaná směs byla nechána 15 minut sedimentovat a následně byl od směsi opatrně odsát přebytečný roztok (asi 80 %) vakuovou trubicí. Zbýlý sediment byl doplněn fyziologickým roztokem na dvojnásobný objem a přefiltrován přes nylonové sítko s velikostí ok 350 μm za stálého promývání fyziologickým roztokem. Opět byla směs nechána sedimentovat po dobu 15 minut a následně byl odsát přebytečný roztok.

Následně byla suspenze, za stálého promývání fyziologickým roztokem, přefiltrována přes nylonové sítko s oky o velikosti 250 μm . Dalším krokem bylo přefiltrování suspenze přes sítko s velikostí ok 80 μm , na kterém došlo k zachycení oocytů. Po důkladném promytí fyziologickým roztokem byly oocyty odsáty pomocí injekční stříkačky. Zpracovávaný materiál byl během celého izolačního postupu držen při 0 °C.

Pro přečištění suspenze oocytů byla použita centrifugace na Percollovém gradientu. Na Percollový gradient ve fyziologickém roztoku (40%, 20% a 10% po 1 ml) v silnostěnné zkumavce byla nanášena suspenze oocytů (3-5 ml). Centrifugace probíhala po dobu 30 minut při 2000 \times g při laboratorní teplotě na centrifuze UNIVERSAL 30F (Hettich Zentrifugen, Německo). Oocyty byly nalezeny a nasbírány pipetou na rozhraní fází 0-10 %. Nasbírané oocyty byly následně dvakrát promyty fyziologickým roztokem a uchovány při -20 °C.

4.2.17.2 Izolace glykoproteinů *zona pellucida*¹⁰⁹

Oocyty izolované z vaječníků byly po malých dávkách homogenizovány ve skleněném homogenizátoru dle Pottera-Elvehjema ponořeném do ledu ve fyziologickém roztoku po dobu 3 minut. Při homogenizaci došlo k oddělení pevné vrstvy ZP a kumulárních buněk. Homogenát byl okamžitě přefiltrován přes nylonové sítko s velikostí ok 65 μm , na němž byly zachyceny úlomky ZP. Úlomky ZP byly promyty destilovanou vodou a poté následovala tepelná solubilizace, inkubace ZP při 74 °C po dobu 30 minut. Případné nečistoty byly po ochlazení odstraněny centrifugací (10 000 \times g, 10 min). Získaný supernatant byl roztokem glykoproteinů ZP, u kterého byla změřena koncentrace proteinů pomocí Quant-It Protein Assay Kit (Invitrogen, USA) a Qubit Fluorometer (Invitrogen, USA). Roztok byl zamrazen a uchován při -20 °C do dalšího použití.

4.2.17.3 Biotinylace glykoproteinů *zona pellucida*¹¹⁰

Glykoproteiny *zona pellucida* získané izolačním postupem (kap. 2.2.17.2) byly značeny biotinem. K roztoku glykoproteinů v PBS o koncentraci 0,35 mg/ml byl přidán 0,1 \times ml 0,5M NaHCO₃, pH 9,0 (x = objem vzorku). Byla připravena biotinylační směs (0,1 mg N-hydroxysukcinimidobiotin ve 25 μl dimethylformamidu) a přidána ke každému 1 ml vzorku. Biotinylace probíhala při laboratorní teplotě po dobu 30 minut

a poté byla zastavena přidávkem 1M NH₄Cl, pH 6,0 (100 μl). Následně byl roztok dialyzován v Spectra/Por MWCO 6/8000 membráně (Spectrum Medical, USA) po dobu 48 hodin proti TBS (20mM Tris-HCl, 0,4M NaCl; pH 7,8). Po dialýze byl roztok biotinylovaných glykoproteinů *zona pellucida* zamrazen a uchován při -20 °C.

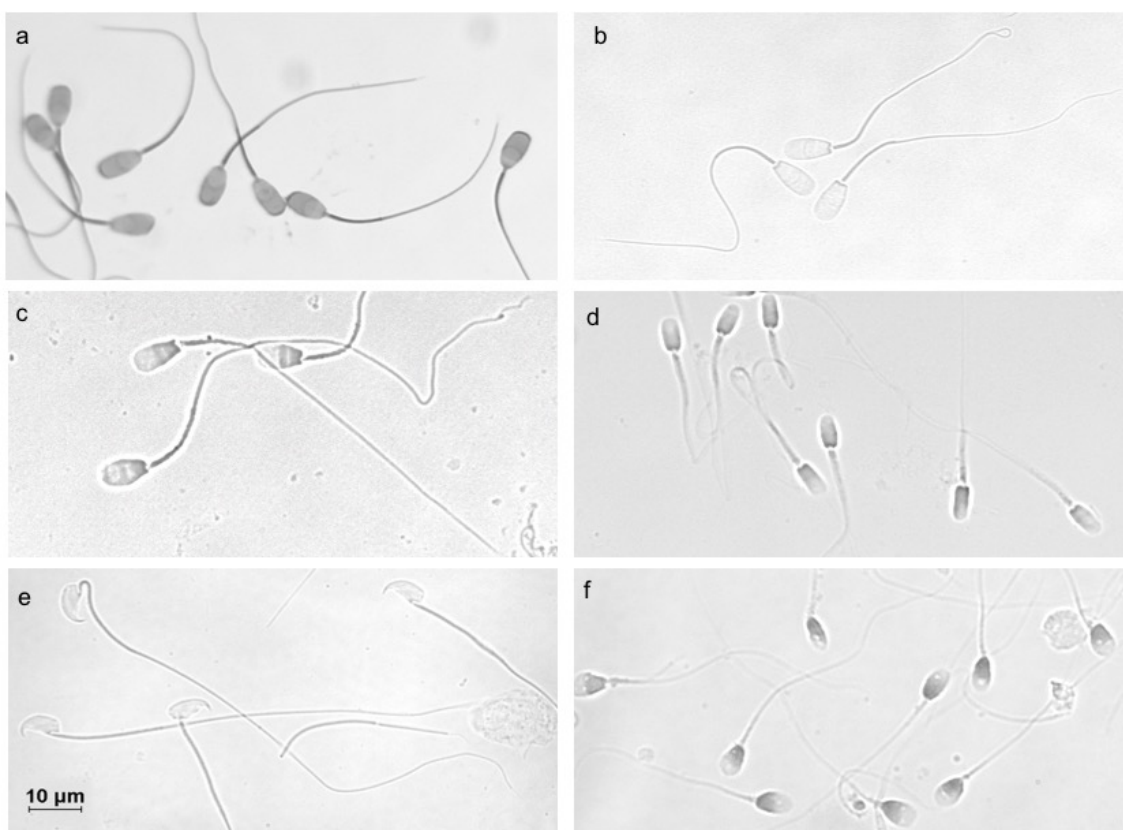
4.2.17.4 Vazebná studie na PVDF membráně

Po elektropřenosu proteinů rozdělených SDS-elektroforézou na PVDF membránu byla membrána promyta v roztoku TBS (25mM Tris-HCl, 150mM NaCl; pH 7,2). Následovala deaktivace volných míst na povrchu membrány roztokem 1% rybí želatiny v TBS při 37 °C po dobu 4 hodin. V dalším kroku byla membrána inkubována s glykoproteiny *zona pellucida* značenými biotinem (kap. 2.2.17.3, str. 46) v roztoku TBS (100 μg/ml) při 4 °C přes noc. Po inkubaci byla membrána 6 × 10 minut promyta roztokem TBS s 0,05% Tween 20 a následovala inkubace s avidinem konjugovaným s křenovou peroxidasou (2,5 μg/10 ml) v roztoku 0,1M Tris-HCl, pH 8,0 po dobu 60 minut při 37 °C. Po inkubaci byla membrána promyta 8 × 10 minut. Po promytí byl na membránu přidán chemiluminiscenční substrát SuperSignal (Thermo Fischer Scientific, USA). Detekce signálu probíhala v přístroji ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Velká Británie).

5 Výsledky

5.1 Světelný mikroskop

Světelným mikroskopem byla pozorována různá morfologie hlaviček spermií prasete, býka, psa, kocoura, myši a člověka (Obr. 8). Spermie různých druhů savců se liší svým tvarem a velikostí. Hlavičky kančích (a), býčích (b), psích (c), kocouřích (d) a lidských (f) spermií jsou oválné a svým tvarem jsou si velmi podobné. Hlavičky spermií myši se ale zásadně liší. Na hlavičce myši spermie byl pozorován specifický zahnutý háček (e).



Obr. 8: Světelná mikroskopie. Morfologie spermií různých savčích druhů: a) prase, b) býk, c) pes d) kocour, e) myš a f) člověk.

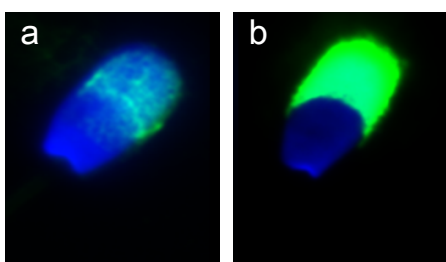
5.2 Izolace spermií z epididymu

Z *cauda epididymis* prasete, býka, psa, kocoura a myši byly izolovány epididymální spermie vysátím injekční stříkačkou nebo vyplavením spermií do roztoku PBS (kap. 2.2.2, str. 32). Tyto spermie byly použity pro nepřímou imunofluorescenční mikroskopii s panelem monoklonálních protilátek (kap. 2.2.5.3, str. 35) a extrakci proteinů pomocí SDS (kap. 2.2.6, str. 36).

5.3 *In vitro* kapacitace

5.3.1 Hodnocení kapacitačního stavu kančích spermií

Byla provedena kapacitace kančích spermií v *in vitro* podmínkách (kap. 2.2.3, str. 32). Pro stanovení funkčního stavu spermií před a po *in vitro* kapacitaci byla použita monoklonální protilátka ACR-2 připravená proti akrosinu (kap. 2.2.5.1, str. 34). Na připravených preparátech byly pozorovány dva vzory fluorescence (Obr. 9). U nekapacitovaných spermií byla pozorována slabší nerovnoměrná fluorescence v akrosomové oblasti. U kapacitovaných spermií byla velmi silně značená celá akrosomová část hlavičky.



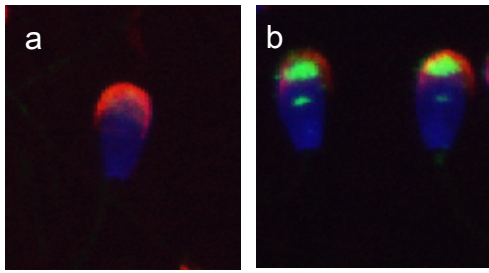
Obr. 9: Pozorované imunofluorescenční značení nekapacitovaných (a) a kapacitovaných (b) spermií prasete. Zelené značení odpovídá vazbě protilátky ACR-2, modře značeno jádro pomocí DAPI.

Na nátěrech ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných kančích spermií bylo spočítáno 200 náhodně vybraných spermií. V populaci ejakulovaných spermií bylo nalezeno 78 % nekapacitovaných spermií, 16 % kapacitovaných spermií a 6 % spermií nebylo značeno. Ve vzorku po *in vitro* kapacitaci bylo nalezeno 17 % nekapacitovaných spermií, 70 % kapacitovaných spermií a 13 % spermií nebylo značeno.

5.3.2 Hodnocení kapacitačního stavu býčích spermií

Byla provedena kapacitace býčích spermií v *in vitro* podmínkách (kap. 2.2.4, str. 33). Pro stanovení kapacitačního stavu spermií před a po *in vitro* kapacitaci byla použita protilátka p-Tyr-01 proti fosfotyrosinu a byla provedena kontrola integrity akrosomu pomocí lektinu PNA (kap. 2.2.5.2, str. 34).

Na připravených preparátech byly pozorovány různé typy fluorescence (Obr. 10, str. 50). U nekapacitovaných spermií fluorescence protilátky proti fosfotyrosinu (zelená) nebyla viditelná. U kapacitovaných spermií značila tato protilátka silně v akrosomové části a malou část ekvatoriální části hlavičky spermie. Fluorescence PNA lektinu (červená) byla pozorována na hlavičce spermie v případě zachované integrity akrosomu.



Obr. 10: Ukázka vzoru pozorované fluorescence na nekapacitovaných (a) a kapacitovaných (b) spermích býka. Zelené značení odpovídá vazbě protilátky proti fosfotyrosinu, červeně značení vazby lektinem PNA a modře značeno jádro pomocí DAPI.

Na nátěrech ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných býčích spermích bylo spočítáno 200 náhodně vybraných spermích. V populaci ejakulovaných spermích bylo nalezeno 60 % nekapacitovaných a 40 % kapacitovaných spermích. Ve vzorku po *in vitro* kapacitaci bylo nalezeno 34 % nekapacitovaných a 66 % kapacitovaných spermích. PNA lektinem bylo značeno v obou vzorcích více než 95 % spermích.

5.4 Imunolokalizace proteinů na spermích

Imunolokalizace proteinů spermích byla provedena pomocí panelu monoklonálních protilátek připravených proti povrchovým proteinům izolovaných z kančích ejakulovaných spermích. Tyto protilátky byly nejdříve testovány na epididymálních, ejakulovaných a na *in vitro* kapacitovaných spermích prasete. Následně byla testována mezidruhová reaktivita vybrané protilátky na epididymálních, ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných býčích spermích a na ejakulovaných spermích myši (kap.2.2.5.3, str. 35).

5.4.1 Imunofluorescence na kančích spermích

Vzorky epididymálních, ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných kančích spermích na mikroskopickém sklíčku byly inkubovány s monoklonálními protilátkami a následně se sekundární protilátkou konjugovanou s FITC. Nátěr byl převrstven montovacím médiem VectaShield s DAPI k označení jádra.

Negativní kontrola byla připravena stejným postupem s výjimkou primární protilátky, která byla nahrazena roztokem PBS. U negativní kontroly nebyla fluorescence viditelná. Shrnutí výsledků imunofluorescenčního pozorování je v Tab. 1, str. 51.

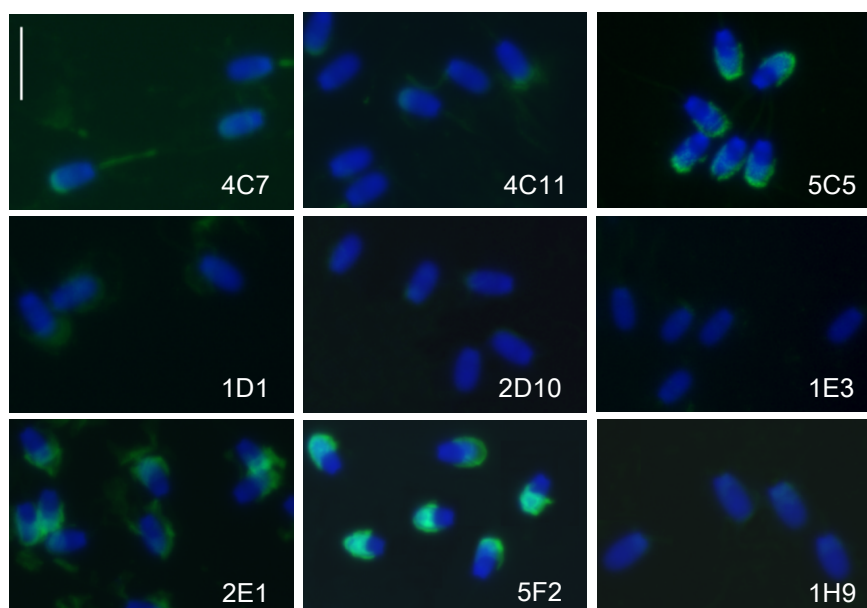
Tab.1: Shrnutí testování panelu monoklonálních protilátek připravených proti povrchovým proteinům z povrchu kančích spermíí testovaný na epididymálních, ejakulovaných a in vitro kapacitovaných kančích spermíích. V tabulce je uvedena oblast spermie, kterou se daná protilátka značila a intenzita pozorované fluorescence dané protilátky na jednotlivých typech spermíích.

Protilátka	Oblast značená protilátkou na kančích ejakulovaných spermíích	Intenzita imunofluorescence na kančích spermíích		
		Epididymální	Ejakulované	Kapacitované
3B10	Mitochondriální část bičíku	-	+	+
1C6	Neznačena	-	-	-
4C7	Akrosomová oblast	-	++++	+++
4C11	Akrosomová oblast	-	++++	+++
5C5	Akrosomová oblast	+	++	++++
1D1	Akrosomová oblast	-	+	++++
2D10	Akrosomová oblast	-	++	+++
3D5	Hlavní část bičíku	+	++	++
3D7	Akrosomová oblast	-	+	+
1E3	Akrosomová oblast	-	++	+++
2E1	Akrosomová oblast	+	++	+++
4E8	Mitochondriální část bičíku	++	++	+++
5F2	Akrosomová oblast	+++	+++	++++
1G7	Mitochondriální část bičíku	+	++	++
2G9	Neznačena	-	-	-
1H9	Apikální část	-	++++	+++
2H10	Postakrosomová oblast	+	++	++

Intenzita fluorescence, se kterou protilátka značila spermie: spermie neznačena (-), značena slabě (+), středně (++), silně (+++) a velmi silně (++++).

Na počátku experimentu bylo testováno 17 monoklonálních protilátek na epididymálních, ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných kančích spermích. Protilátky se vážaly a značily různé oblasti spermíí. Intenzita pozorované fluorescence se u spermíí v různých stádiích vývoje lišila. Pozorováním fluorescence jednotlivých protilátek bylo zjištěno, že dvě protilátky (1C6 a 2G9) spermie vůbec neznačí. Další 4 protilátky (3B10, 3D5, 4E8 a 1G7) značily mitochondriální nebo hlavní část bičíku. Těchto 6 protilátek bylo z dalšího testování vyřazeno. Protilátky, které dobře značily akrosomovou část hlavičky spermie, na které se nacházejí potenciální receptory pro vazbu *zona pellucida* vajíčka, byly vybrány k dalšímu studiu. Konkrétně se jednalo o 10 protilátek s označením 4C7, 4C11, 5C5, 1D1, 2D10, 3D7, 1E3, 2E1, 5F2 a 1H9 (v tabulce jsou tyto protilátky vyznačeny žlutě). Z toho protilátka 3D7 značila slabě, proto nebyla dále testována. V dalších podkapitolách jsou uvedeny imunofluorescenční obrázky těchto vybraných protilátek.

5.4.1.1 Epididymální spermie

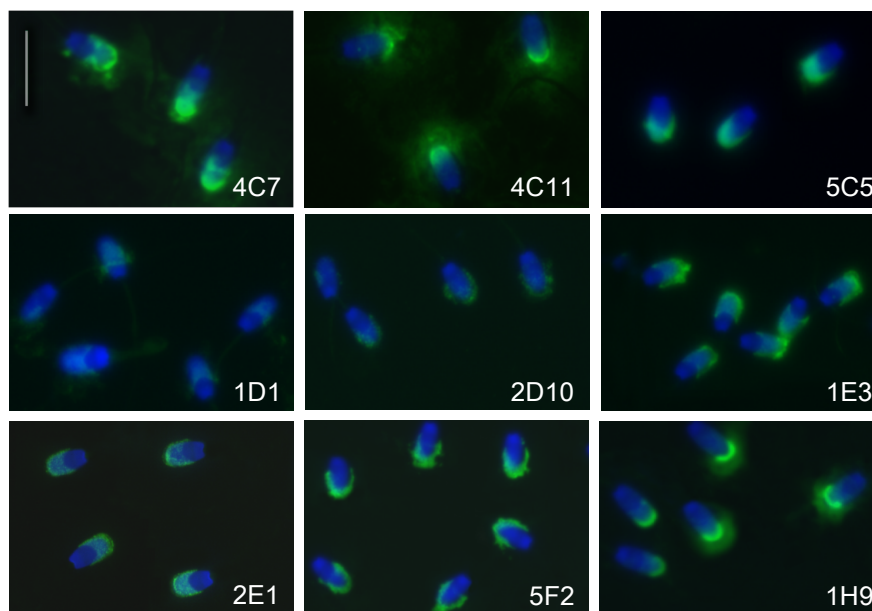


Obr. 11: Nepřímá imunofluorescence na kančích epididymálních spermích s použitím panelu monoklonálních protilátek proti povrchovým proteinům kančích spermíí. Zelené značení odpovídá vazbě dané protilátky, modře značeno jádro pomocí DAPI. Bílá linka je měřítko 10 μm .

Imunofluorescenční značení jednotlivých protilátek na spermiích je zachyceno na obrázku 11, str. 52. Z vybraných 9 protilátek značících silně akrosomovou oblast hlavičky značily pouze 3 protilátky na epididymálních spermiích kance. Protilátky 5C5 a 2E1 značily povrch spermie slaběji, zatímco protilátka s označením 5F2 značila spermie silně. Zbývající protilátky epididymální spermie neznačily.

5.4.1.2 Ejakulované spermie

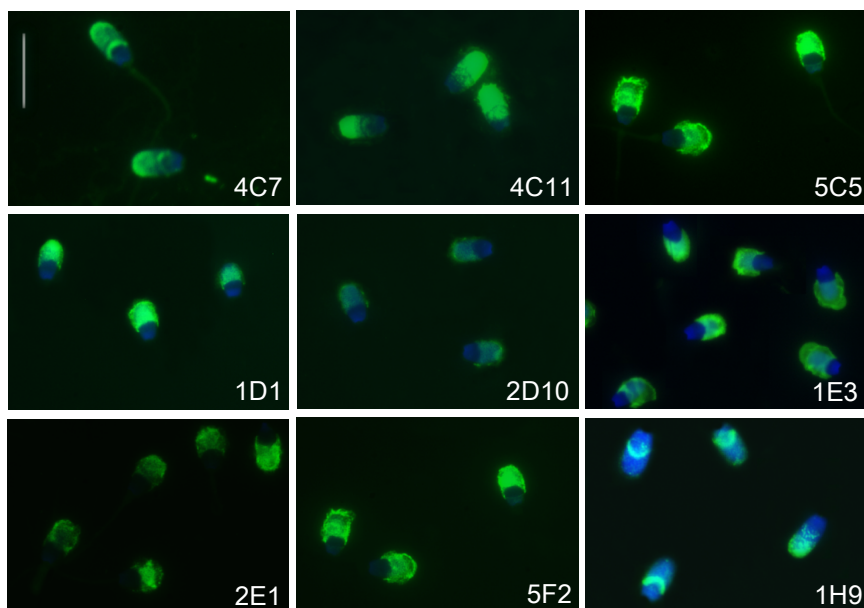
Imunofluorescenční značení jednotlivých protilátek na spermiích je zachyceno na obrázku 12. Na ejakulovaných spermiích byla nejslabší fluorescence pozorována u protilátky 1D1. U protilátek 5C5, 2D10, 1E3 a 2E1 byla pozorována středně silná intenzita fluorescence. O něco silněji značila spermie protilátka 5F2. Nejsilnější fluorescence byla pozorována u protilátek 4C7, 4C11 a 1H9.



Obr. 12: Nepřímá imunofluorescence na kančích ejakulovaných spermiích s použitím panelu monoklonálních protilátek proti povrchovým proteinům kančích spermií. Zelené značení odpovídá vazbě dané protilátky, modře značeno jádro pomocí DAPI. Bílá linka je měřítko 10 μm .

5.4.1.3 Kapacitované spermie

Imunofluorescenční značení jednotlivých protilátek na spermích je zachyceno na obrázku 13. Na kapacitovaných spermích prasete byla pozorována velmi silná fluorescence u všech protilátek v akrosomové části hlavičky. Nejsilnější intenzita fluorescence byla pozorována u protilátek 5C5, 1D1 a 5F2. Protilátka 1H9 značila silně v ekvatoriální části hlavičky se slabší fluorescencí v akrosomové části hlavičky spermie.



Obr. 13: Nepřímá imunofluorescence na kančích kapacitovaných spermích s použitím panelu monoklonálních protilátek proti povrchovým proteinům kančích spermií. Zelené značení odpovídá vazbě dané protilátky, modře značeno jádro pomocí DAPI. Bílá linka je měřítko 10 μm .

5.4.2 Imunofluorescence na býčích spermích

Z býčích epididymálních, ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermích, které byly v suspenzi fixovány paraformaldehydem, byly připraveny nátěry na mikroskopická podložní sklíčka. Monoklonální protilátky připravené proti proteinům z povrchu kančích spermií, které u kančích spermií silně značily akrosomovou část hlavičky spermie, byly vybrány pro testování možné zkřížené reaktivity na býčích spermích. Konkrétně se jednalo o 5 protilátek s označením 4C7, 5C5, 1E3, 2E1 a 1H9.

Připravené preparáty býčích spermií na mikroskopickém sklíčku byly inkubovány s monoklonálními protilátkami následně se sekundární protilátkou konjugovanou s FITC. Nátěr byl převrstven montovacím médiem VectaShield s DAPI k označení jádra.

Negativní kontrola byla připravena stejným postupem s výjimkou primární protilátky, která byla nahrazena roztokem PBS. U negativní kontroly nebyla fluorescence viditelná.

Z panelu monoklonálních protilátek připravených proti povrchovým proteinům kančích ejakulovaných spermií bylo 5 protilátek testováno na epididymálních, ejakulovaných a kapacitovaných spermiích býka. Shrnutí výsledků imunofluorescenčního pozorování je v Tab. 2. Z těchto pěti vybraných protilátek (4C7, 5C5, 1E3, 2E1 a 1H9) značila nejsilněji protilátka 1E3. Tato protilátka značila akrosomovou část hlavičky spermie na všech typech spermií. Protilátka 4C7 značila na všech typech spermií slabě linku v apikální části hlavičky. Protilátka 5C5 značila pouze na ejakulovaných spermiích, slabě tečkovaně po celé hlavičce spermie. Protilátky 2E1 a 1H9 na povrchu býčích spermií neznačily.

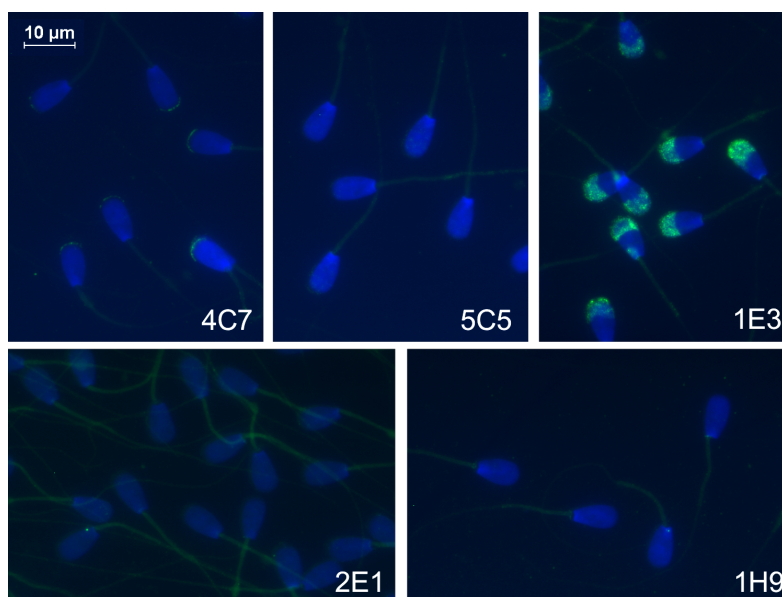
Tab. 2: Shrnutí testování vybraných monoklonálních protilátek připravených proti povrchovým proteinům z povrchu kančích spermií na epididymálních, ejakulovaných a in vitro kapacitovaných býčích spermiích. V tabulce je uvedena oblast spermie, kterou se daná protilátka značila a intenzita pozorované fluorescence dané protilátky na jednotlivých typech spermií.

Protilátka	Fluorescence na spermiích			Vzor značení
	Epididymální	Ejakulované	Kapacitované	
4C7	+	++	++	Apikální část hlavičky a mitoch. část bičíku
5C5	-	++	-	Tečkovaná hlavička a mitoch. část bičíku
1E3	++++	+++	++++	Akrosomová část
2E1	+	+	+	Mitoch. část bičíku
1H9	-	-	-	Neznačeno

Intenzita fluorescence, se kterou protilátka značila spermie: spermie neznačena (-), značena slabě (+), středně (++), silně (+++) a velmi silně (++++).

5.4.2.1 Epididymální spermie

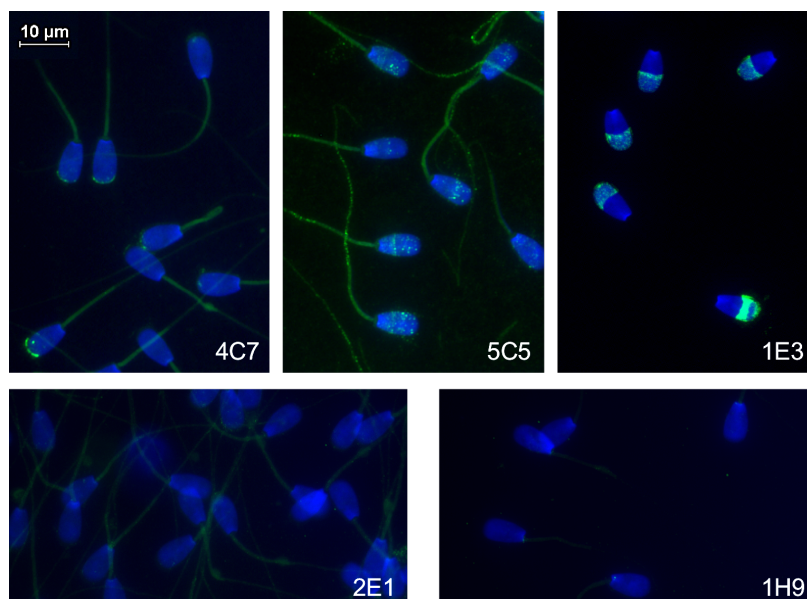
Imunofluorescenční značení jednotlivých protilátek na spermích je zachyceno na obrázku 14. Z pěti vybraných monoklonálních protilátek značily na epididymálních spermích býka pouze dvě protilátky. Protilátka 4C7 značila slabě linku na apikální části hlavičky spermie. Protilátka 1E3 značila silně v akrosomové oblasti hlavičky. Protilátka 2E1 značila slabě v pouze v mitochondriální části bičíku a zbývající dvě testované protilátky (5C5 a 1H9) na povrchu epididymálních spermích neznačily.



Obr. 14: Nepřímá imunofluorescence na býčích epididymálních spermích s použitím panelu monoklonálních protilátek proti povrchovým proteinům kančích spermí. Zelené značení odpovídá vazbě dané protilátky, modře značeno jádro pomocí DAPI.

5.4.2.2 Ejakulované spermie

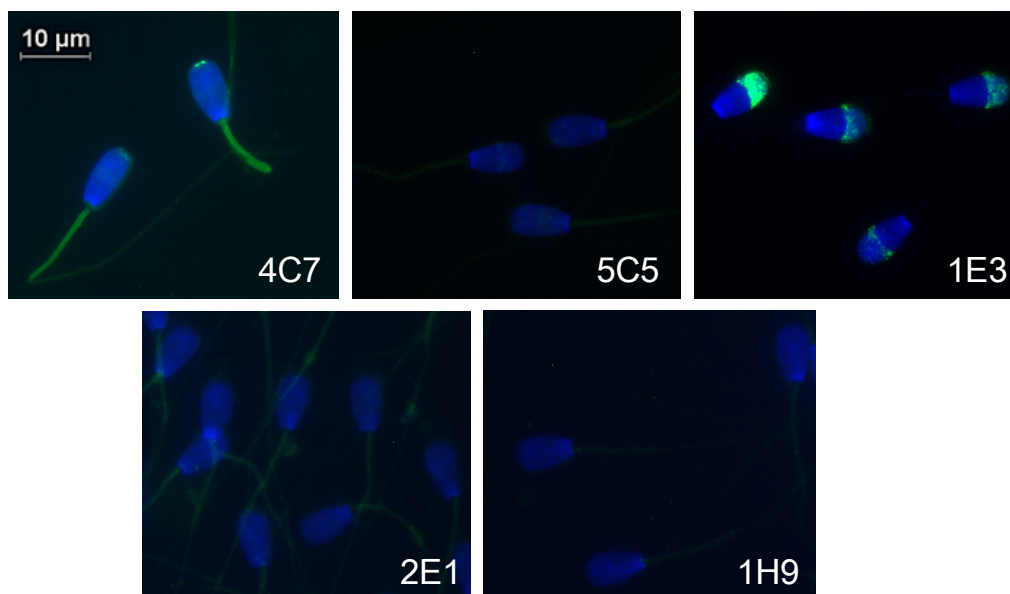
Imunofluorescenční značení jednotlivých protilátek na spermích je zachyceno na obrázku 15, str. 57. Z pěti vybraných monoklonálních protilátek značily na ejakulovaných spermích býka tři protilátky. Protilátka 4C7 značila slabě linku v apikální části hlavičky spermie a velmi slabě značila i mitochondriální část bičíku. Protilátka 5C5 značila na ejakulovaných spermích tečkovaně v celé oblasti hlavičky a slabé značení bylo pozorováno i na bičíku spermie. Protilátka 1E3 značila středně silně v akrosomové části hlavičky spermie. Protilátka 2E1 značila slabě jen v mitochondriální části bičíku. Protilátka 1H9 na ejakulovaných spermích neznačila.



Obr. 15: *Nepřímá imunofluorescence na býčích ejakulovaných spermích s použitím panelu monoklonálních protilátek proti povrchovým proteinům kančích spermí. Zelené značení odpovídá vazbě dané protilátky, modře značeno jádro pomocí DAPI.*

5.4.2.3 Kapacitované spermie

Imunofluorescenční značení jednotlivých protilátek na spermích je zachyceno na obrázku 16, str. 58. Z pěti vybraných monoklonálních protilátek značily na kapacitovaných spermích býka dvě protilátky. Protilátka nazvaná 4C7 značila linku na hlavičce některých spermí a mitochondriální část bičíku. Protilátka 1E3 značila středně silně v akrosomové části hlavičky spermí. Protilátka 2E1 značila velmi slabě mitochondriální část bičíku. Protilátky 5C5 a 1H9 na kapacitovaných spermích neznačily.



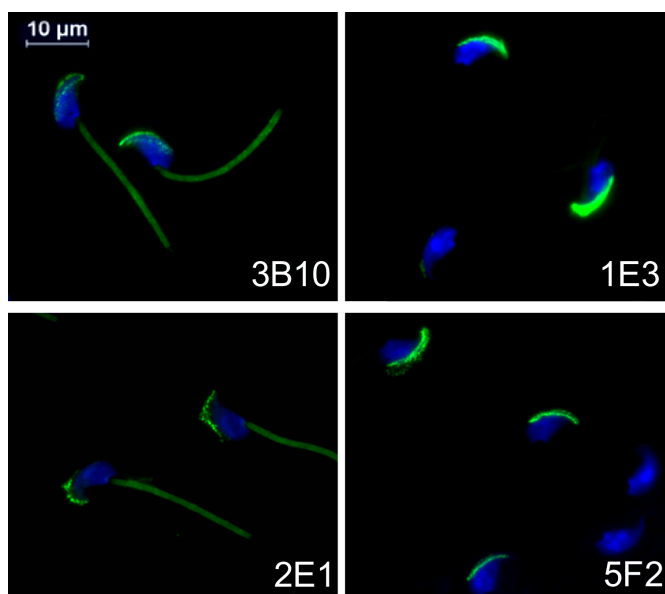
Obr. 16: Nepřímá imunofluorescence na býčích kapacitovaných spermích s použitím panelu monoklonálních protilátek proti povrchovým proteinům kančích spermí. Zelené značení odpovídá vazbě dané protilátky, modře značeno jádro pomocí DAPI.

5.4.3 Imunofluorescence na myších epididymálních spermích

Monoklonální protilátky připravené proti povrchovým proteinům kančích spermí byly testovány pouze na epididymálních myších spermích. Myší ejakulované spermie se nepodařilo získat. *In vitro* kapacitace epididymálních spermí nebyla provedena.

Nátěry myších epididymálních spermí byly inkubovány s monoklonálními protilátkami následně se sekundární protilátkou konjugovanou s FITC. Nátěr byl převrstven montovacím médiem VectaShield s DAPI k označení jádra.

Z panelu monoklonálních protilátek bylo na myších spermích testováno 16 protilátek. Protilátka 1C6 nebyla testována. Z 16 testovaných protilátek pouze 4 značily epididymální spermii. Konkrétně se jednalo o protilátky 3B10, 1E3, 2E1 a 5F2 (Obr. 17, str. 59). Všechny protilátky značily v akrosomové části hlavičky spermie. Protilátky 3B10 a 2E1 značily navíc i mitochondriální část bičíku. Zbylých 12 protilátek na myších epididymálních spermích neznačilo.



Obr. 17: *Nepřímá imunofluorescence na myších epididymálních spermích s použitím panelu monoklonálních protilátek proti povrchovým proteinům kančích spermí. Zelené značení odpovídá vazbě dané protilátky, modře značeno jádro pomocí DAPI.*

5.4.4 Shrnutí zkřížené mezidruhové reaktivity protilátek

Shrnutí testování panelu monoklonálních protilátek připravených proti povrchovým proteinům kančích spermí na spermích různých savčích druhů (prase, býk a myš) je v Tab 3, str. 60. Na spermích prasete značila většina protilátek akrosomovou část hlavičky spermí. Některé značily mitochondriální nebo hlavní část bičíku a dvě protilátky na spermích prasete neznačily. U některých protilátek byla pozorována zkřížená mezidruhová reaktivita na býčích a myších spermích (označeny žlutě). Například protilátka 1E3 značila spermie prasete, býka i myši. Silná fluorescence této protilátky byla pozorována na všech funkčních stádiích spermí s výjimkou kančích epididymálních spermí. Protilátka 4C7 značila na spermích prasete a býka odlišný vzor na hlavičce spermí. Protilátka 4C7 značila na spermích prasete a býka odlišný vzor na hlavičce spermí. U spermí prasete byla označena celá akrosomové části, u býčích spermí značila protilátka linku v apikální části hlavičky. Protilátka 3B10 na spermích prasete značila pouze mitochondriální oblast bičíku, zatímco na myších spermích značila silně i v akrosomové části hlavičky. Protilátka 5C5 značila u spermí prasete v akrosomové oblasti, u býčích ejakulovaných spermí značila protilátka v oblasti hlavičky a slabě i mitochondriální část bičíku. Protilátka 2E1 značila akrosomovou část hlavičky u spermí prasete a myši, u býčích spermí značila slabě pouze bičík.

Tab. 3: Srovnání reaktivity protilátek připravených proti povrchovým proteinům kančích spermií na spermiích různých savčích druhů (prase, býk a myš). V tabulce je uvedena intenzita fluorescenčního značení odpovídající testované protilátce a oblast značení na spermiích.

	Fluorescence na spermiích							Oblast značení
	Epididymální			Ejakulované		Kapacitované		
	Prase	Býk	Myš	Prase	Býk	Prase	Býk	
3B10	-	N	+++	+	N	+	N	P,M-Bičík mitoch. č. M-Akrosomová část
1C6	-	N	N	-	N	-	N	Neznačeno
4C7	-	+	-	++++	+	+++	+	P-Akrosomová část B-Apikální část a bičík mitoch. část
4C11	-	N	-	++++	N	+++	N	P-Akrosomová část
5C5	+	-	-	++	+	++++	-	P, B-Akrosom. část B-Bičík mitoch. část
1D1	-	N	-	+	N	++++	N	Akrosomová část
2D10	-	N	-	++	N	+++	N	Akrosomová část
3D5	+	N	-	++	N	++	N	Bičík – hlavní část
3D7	-	N	-	+	N	+	N	Akrosomová část
1E3	-	++++	+++	++	+++	+++	+++	P,B,M-Akrosom. část
2E1	+	-	+++	++	+	+++	+	P,M-Akrosom. část B,M-Bičík mitoch. č.
4E8	++	N	-	++	N	+++	N	Bičík – mitoch. část
5F2	+++	N	+++	+++	N	++++	N	Akrosomová část
1G7	+	N	-	++	N	++	N	Bičík – mitoch. část
2G9	-	N	-	-	N	-	N	Neznačeno
1H9	-	-	-	++++	-	+++	-	Apikální část
2H10	+	N	-	++		++	N	Postakrosomová část

Intenzita fluorescence, se kterou protilátka značila spermie: spermie neznačena (-), značena slabě (+), středně (++) , silně (+++) a velmi silně (++++). Protilátka nebyla testována (N). Oblast značení u spermií prasete (P), býka (B) a myši (M).

5.5 Extrakce proteinů pomocí SDS

Z epididymálních spermií kance, býka, psa, kocoura a myši byly připraveny proteinové extrakty pomocí SDS vzorkového pufru za neredukujících a redukujících podmínek (kap. 2.2.6, str. 36). Stejným postupem byly připraveny i extrakty proteinů z ejakulovaných spermií kance, býka a člověka a z *in vitro* kapacitovaných spermií kance a býka. Extrakce byly provedeny ze stejného počtu spermatických buněk. Takto připravené extrakty byly použity pro porovnání proteinového profilu spermií u různých savčích druhů. Extrakty z ejakulovaných a kapacitovaných spermií kance byly použity pro imunodetekci proteinů pomocí monoklonálních protilátek.

5.6 Extrakce povrchových proteinů spermie

Proteiny z povrchu spermií byly izolovány z epididymálních spermií kance, býka, psa a myši, dále z ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií kance a býka. Proteiny nebyly izolovány z povrchu kocouřích epididymálních spermií, protože tyto spermie byly získány pouze izolací z rozmrazených epididymů. Motilita těchto spermií byla snížena a během procesu zamražení mohlo dojít k poškození plasmatické membrány a poškození akrosomů.

Extrakce byla provedena pomocí komerčně dodávaného Pierce Cell Surface Protein Isolation kitu (kap. 2.2.7, str. 36). Takto připravené extrakty byly použity pro porovnání proteinového profilu spermií u různých savčích druhů. Povrchové proteiny extrahované z ejakulovaných a kapacitovaných spermií kance byly použity pro imunodetekci proteinů pomocí monoklonálních protilátek.

5.7 Izolace proteinů z tkání kančích orgánů a z tekutin reprodukčního traktu kance

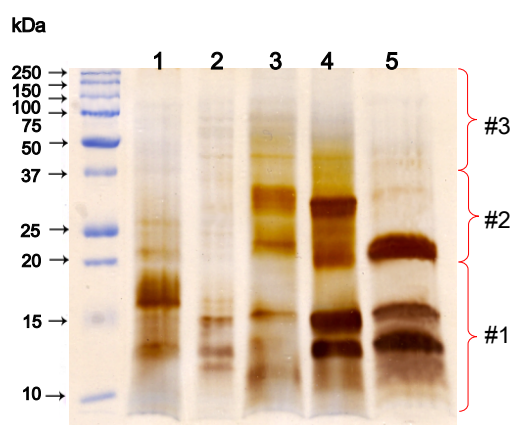
Proteiny z tkání orgánů prasete byly získány homogenizací tkání v roztoku Tritonu (kap. 2.2.8, str. 38) a přečištěny pomocí 2D Clean Up kitu (kap. 2.2.10, str. 38). Tekutiny získané z různých částí reprodukčního traktu prasete (kap. 2.2.9, str. 38) byly také přečištěny využitím 2D Clean Up kitu. Získané extrakty a tekutiny byly pomocí monoklonálních protilátek proti povrchovým proteinům kančích spermií použity k určení původu proteinů.

5.8 Porovnání proteinového profilu spermií

Proteiny epididymálních, ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií různých savčích druhů získané extrakcí SDS vzorkovým puforem za redukujících podmínek byly rozděleny elektroforeticky v přítomnosti SDS (kap. 2.2.11, str. 39). K vlastnímu rozdělení proteinů byl použit 15% separační polyakrylamidový gel. Vizualizace proteinů na gelu proběhla pomocí Coomasie Brilliant Blue (kap. 2.2.13.1, str. 42) a následně pomocí barvení stříbrem (kap. 2.2.13.2, str. 42).

5.8.1 Epididymální spermie

Elektroforetické rozdělení proteinů kančích, býčích, psích, kocouřích a myších epididymálních spermií je na Obr. 18.



Obr. 18: Porovnání proteinového profilu epididymálních spermií 1) prasete, 2) býka 3) psa, 4) kocoura a 5) myši. Proteiny byly rozděleny na 15% polyakrylamidovém gelu a vizualizovány barvením stříbrem.

Proteinové profily epididymálních spermií se mezi testovanými savčími druhy liší. Nejvíce se od ostatních druhů lišil proteinový profil myších spermií. U proteinů spermií prasete byly v oblasti mezi 10 a 20 kDa (#1) nalezeny dva proteinové proužky (13 a 17 kDa). Protein s 13 kDa se nacházel i u vzorků býčích a kocouřích spermií. Naopak u psích a myších spermií tento protein chyběl. Protein s mol. hm. přibližně 17 kDa byl nalezen pouze u epididymálních spermií prasete. U býčích spermií byly v dané oblasti (#1) dále nalezeny proteinové proužky s 12 a 15 kDa. U vzorku psích spermií byly detekovány proteinové proužky s molekulovými hmotnostmi přibližně

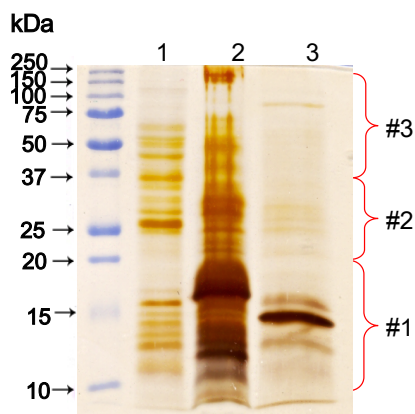
11, 14 a 16 kDa. Protein s 11 kDa byl nalezen pouze u psích spermií. U epididymálních kocouřích spermií byly detekovány již zmíněné dva proteiny s přibližnou molekulovou hmotností 13 a 15 kDa. U myších spermií byly detekovány proteiny v oblasti 14 a 16 kDa.

V oblasti mezi 20 a 37 kDa (#2) byly u epididymálních spermií prasete detekovány proteiny s mol. hm. přibližně 21 a 26 kDa. Odpovídající proteinový proužek (21 kDa) byl nalezen u vzorku z myších spermií. U býčích spermií byly slabě detekovány proteiny s molekulovou hmotností přibližně 20, 24 a 30 kDa. Mezi proteiny psích spermií byly v této oblasti detekovány dva proteiny (23 a 33 kDa). Protein v odpovídající 33 kDa byl nalezen také u extraktu z myších spermií. V extraktu ze spermií kocoura byly dále nalezeny proteiny v molekulové hmotnosti asi 20, 24 a 30 kDa. U myších spermií byly detekovány dva proteinové proužky s 23 a 32 kDa.

Oblast nad 37 kDa (#3) byla u všech extraktů epididymálních spermií velmi podobná, bohužel proteinové proužky nejsou dobře viditelné.

5.8.2 Ejakulované spermie

Elektroforetické rozdělení proteinů ejakulovaných spermií prasete, býka a člověka je na Obr. 19.



Obr. 19: Porovnání proteinového profilu ejakulovaných spermií 1) prasete, 2) býka a 3) člověka. Proteiny byly rozděleny na 15% polyakrylamidovém gelu a vizualizovány barvením stříbrem.

Proteinové profily ejakulovaných spermií prasete a býka si byly podobné. Proteinový profil lidských spermií se v určitých oblastech lišil a bohužel proteinové proužky především v oblasti #3 nebyly dostatečně viditelné. U extraktů ze spermií prasete i býka bylo v oblasti mezi 10 a 20 kDa (#1) pozorováno mnoho proteinových proužků. Proteinové profily obou zvířat si byly podobné s výskytem proteinů v molekulových hmotnostech od 11 do 17 kDa. U extraktu býčích spermií byl nalezen výrazný proteinový proužek s přibližně 12 kDa, který v extraktu spermií prasete chyběl. U extraktu lidských spermií byly v této oblasti také nalezeny tři proteinové proužky o molekulové hmotnosti asi 13, 14 a 16 kDa.

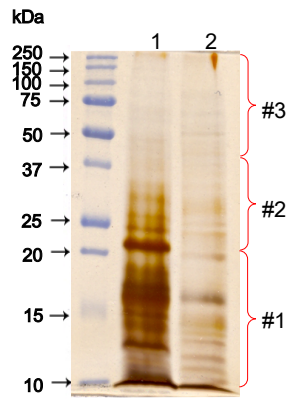
Při porovnání oblasti mezi 20 a 37 kDa (#2) bylo zjištěno, že proteinové proužky s molekulovými hmotnostmi přibližně 25 a 27 kDa se nacházejí u všech třech porovnávaných savčích druhů. U lidských spermií nebyly další proteinové proužky příliš viditelné. U spermií prasete a býka byly nalezeny proteiny s přibližnou molekulovou hmotností 34 a 36 kDa.

V oblasti nad 37 kDa (#3) bylo opět u extraktu spermií prasat a býků vidět několik proteinových proužků, které si vzájemně odpovídaly, zejména mezi 37 až 60 kDa. Dále byl u extraktu spermií prasete detekován protein s mol. hm. ~120 kDa, který u býčích spermií chyběl. Naopak jen u býčích spermií byl nalezen protein s mol. hm. ~170 kDa. V extraktu lidských spermií byl v této oblasti nalezen protein s molekulovou hmotností přibližně 90 kDa. Tento protein nebyl v jiných extraktech přítomen.

5.8.3 Kapacitované spermie

Elektroforetické rozdělení proteinů extrahovaných z *in vitro* kapacitovaných spermií prasat a býků je na Obr. 20, str. 65.

Proteinové profily obou zvířat si byly v určitých oblastech velmi podobné. V oblasti mezi 10 a 20 kDa (#1) bylo nalezeno mnoho vzájemně si odpovídajících proteinových proužků. Pouze v extraktu kapacitovaných spermií prasat byl detekován protein s molekulovou hmotností ~13 kDa. U býčích spermií byl nalezen proteinový proužek o 19 kDa, který v extraktu prasečích spermií chyběl.



Obr. 20: Porovnání proteinového profilu *in vitro* kapacitovaných spermií 1) prasete a 2) býka. Proteiny byly rozděleny na 15% polyakrylamidovém gelu a vizualizovány barvením stříbrem.

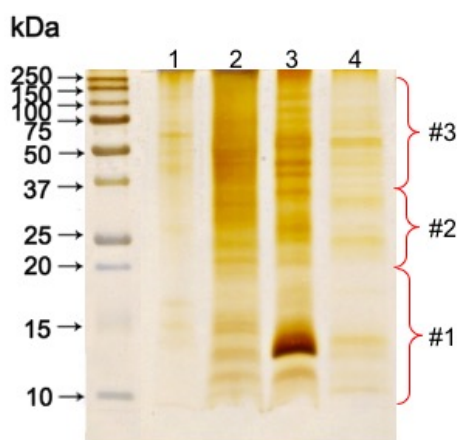
V oblasti mezi 20 a 37 kDa (#2) si byly oba extrakty velmi podobné. V oblasti nad 37 kDa (#3) byly proteinové proužky velmi slabě barveny, přesto se zdálo, že oba extrakty si i v této jsou velmi podobné.

5.9 Porovnání proteinů z povrchu spermií

Proteiny izolované z povrchu epididymálních, ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií (kap. 2.2.7, str. 36) různých savčích druhů byly elektroforeticky rozděleny (kap. 2.2.11, str. 39). K vlastnímu rozdělení proteinů byl použit 15% separační polyakrylamidový gel. Vizualizace proteinů na gelu byla provedena pomocí Coomassie Brilliant Blue (kap. 2.2.13.1, str. 42) a následně pomocí barvení stříbrem (kap. 2.2.13.2, str. 42).

5.9.1 Epididymální spermie

Elektroforeticky rozdělené proteiny z povrchu epididymálních spermií kance, býka, psa a myši jsou na Obr. 21.



Obr. 21: Porovnání profilu proteinů z povrchu epididymálních spermií 1) prasete, 2) býka 3) psa a 4) myši. Proteiny byly rozděleny na 15% polyakrylamidovém gelu a vizualizovány barvením stříbrem.

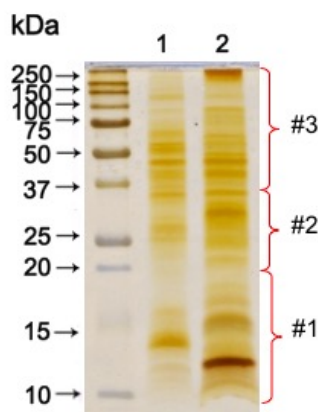
Profily povrchových proteinů se mezi zvířaty liší. Největší rozdíly v proteinech z povrchu spermií jsou u myších spermií. V oblasti mezi 10 a 20 kDa (#1) byly u povrchových proteinů prasat detekovány proužky s molekulovou hmotností přibližně 14, 15 a 16 kDa. V extraktu býčích spermií byl u molekulové hmotnosti 15 kDa nalezen zdvojený proužek. Dále byly u býčích a psích spermií nalezeny proteiny s přibližně 12 a 13 kDa. U extraktu myších spermií byly nalezeny proteiny s mol. hm. přibližně 11, 13 a 14 kDa.

V oblasti mezi 20 a 37 kDa (#2) byl u kančích spermií nalezen protein s mol. hm. přibližně 27 kDa, který byl přítomný i ve vzorku psích a myších spermií. U býčích spermií byly nalezeny proteiny s molekulovou hmotností asi 21, 24 a 30 kDa. V extraktu psích spermií byl také nalezen protein s mol. hm. 21 kDa, a dále pak proteiny s přibližně 25, 27 a 35 kDa. Profil proteinů myších spermií byl odlišný. Byly v něm nalezeny proteiny s molekulovými hmotnostmi 26, 35 a 37 kDa.

V oblasti nad 37 kDa (#3) byly profily povrchových proteinů savčích spermií podobné. Pouze protein s molekulovou hmotností asi 65 kDa byl nalezen v extraktu spermií prasete, psa a myši, ale chyběl u býčích spermií.

5.9.2 Ejakulované spermie

Elektroforeticky rozdělené proteiny získané z povrchu ejakulovaných kančích a býčích spermií jsou na Obr. 22.



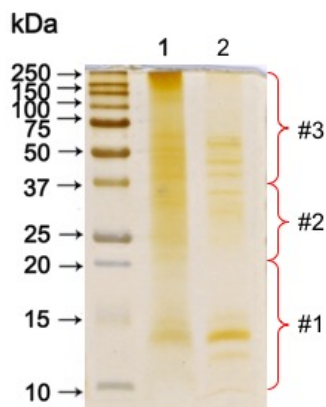
Obr. 22: Porovnání profilu proteinů extrahovaných z povrchu ejakulovaných spermií 1) prasete a 2) býka. Proteiny byly elektroforeticky rozděleny na 15% polyakrylamidovém gelu a vizualizovány pomocí barvení stříbrem.

V oblasti mezi 10 a 20 kDa (#1) byly v extraktu proteinů z povrchu kančích spermií detekovány proteiny s molekulovou hmotností přibližně 12, 14 a 17 kDa. Pouze v extraktu proteinů z povrchu býčích spermií byly nalezeny proteiny s molekulovou hmotností v oblastech 11 a 16 kDa.

V oblasti mezi 20 a 37 kDa (#2) byly pouze u býčích spermií nalezeny proteiny s molekulovou hmotností přibližně 22 a 32 kDa. V oblasti nad 37 kDa (#3) bylo detekováno mnoho proteinů, které se shodně nachází u obou studovaných vzorků.

5.9.3 Kapacitované spermie

Elektroforeticky rozdělené proteiny extrahované z povrchu kančích a býčích spermií kapacitovaných v *in vitro* podmínkách jsou na Obr. 23.



Obr. 23: Porovnání profilu proteinů z povrchu kapacitovaných spermií 1) prasete a 2) býka. Proteiny byly rozděleny na 15% polyakrylamidovém gelu a vizualizovány pomocí barvení stříbrem.

V oblasti mezi 10 a 20 kDa (#1) byly v extraktech obou savců detekovány proteiny s molekulovou hmotností přibližně 14 a 15 kDa. V extraktu proteinů z povrchu býčích spermií byl navíc nalezen protein s ~13 kDa. V oblasti mezi 20 a 37 kDa (#2) byl pouze v extraktu býčích spermií nalezen protein s molekulovou hmotností asi 36 kDa. V oblasti nad 37 kDa (#3) byly v obou extraktech detekovány proteiny, které si vzájemně odpovídají.

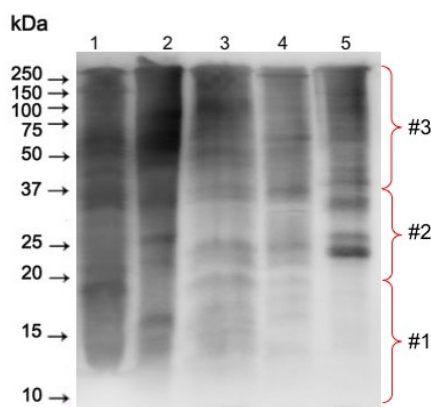
5.10 Porovnání glykoproteinového profilu spermií různých druhů savců

K vizualizaci glykoproteinů bylo použito pomocí vazby s konkanavalinem A (kap. 2.2.15, str. 44). Konkanavalin A je lektin, sacharidy-vázající protein, který se specificky váže na koncové α -D-manosylové a α -D-glukosylové jednotky sacharidových řetězců.

Byl použit k detekci glykoproteinů získaných z epididymálních, ejakulovaných a kapacitovaných spermií různých savčích druhů. Proteiny byly rozděleny elektroforeticky na 15% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na NC membránu. Membrána s proteiny byla inkubována v roztoku biotinem značeného konkanavalinu A a následně s avidinem konjugovaným s peroxidasou. K vizualizaci byl použit chemiluminiscenční substrát.

5.10.1 Epididymální spermie

Detekce postranních sacharidových řetězců proteinů z epididymálních spermií prasete, býka, psa, kocoura a myši je na Obr. 24.



Obr. 24: Glykoproteinové profily epididymálních spermií značené konkanavalinem A. SDS extrakty epididymálních spermií 1) prasete, 2) býka, 3) psa, 4) kocoura a 5) myši připravené v neredukujících podmínkách.

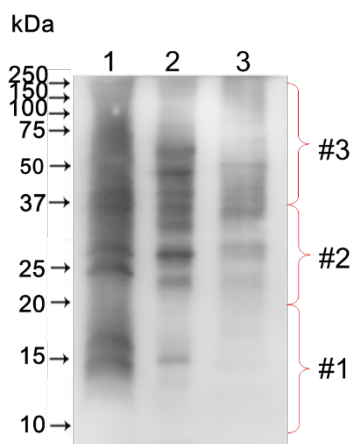
Mezi jednotlivými savčími druhy jsou patrné rozdíly v zastoupení glykoproteinů. V oblasti mezi 10 a 20 kDa (#1) byl u kančích spermií silně značen glykoprotein s molekulovou hmotností přibližně 18 kDa. U býčích spermií byl nalezen glykoprotein s přibližně 16 kDa, který v ostatních extraktech nebyl detekován. U psích spermií byly detekovány glykoproteiny s molekulovou hmotností přibližně 15, 17 a 20 kDa. U kocouřích spermií byly také detekovány glykoproteiny s mol. hm. 17 a 20 kDa. U myších spermií nebyly pozorovány výrazně značené glykoproteiny.

V oblasti mezi 20 a 37 kDa (#2) byly u spermií prasete nalezeny glykoproteiny s molekulovou hmotností přibližně 22 a 35-37 kDa. V extraktu býčích spermií byly značeny glykoproteiny s 23, 26 a 35 kDa. U psích a kocouřích spermií byly shodně detekovány glykoproteiny s mol. hm. přibližně 23, 25 a 37 kDa. U psích spermií byl navíc nalezen glykoprotein s molekulovou hmotností ~36 kDa. U myších spermií byly silně značen glykoprotein ~24 kDa a nalezeny další dva glykoproteiny s mol. hm. ~26 a 35 kDa.

V oblasti nad 37 kDa (#3) si byly glykoproteinové profily zvířat podobné. U spermií prasete byl nalezen glykoprotein s molekulovou hmotností asi 45 kDa. Glykoprotein v odpovídající oblasti byl nalezen i u myších spermií. U býčích a psích spermií byl nalezen glykoprotein v oblasti přibližně 48 kDa. U všech extraktů kromě psích spermiích byl nalezen glykoprotein s molekulovou hmotností asi 60 kDa.

5.10.2 Ejakulované spermie

Detekované glykoproteiny u ejakulovaných kančích, býčích a lidských spermií jsou na Obr. 25.



Obr. 25: Glykoproteinové profily ejakulovaných spermií značené konkanavalinem A. SDS extrakty z 1) kančích, 2) býčích a 3) lidských ejakulovaných spermií připravené v neredukujících podmínkách.

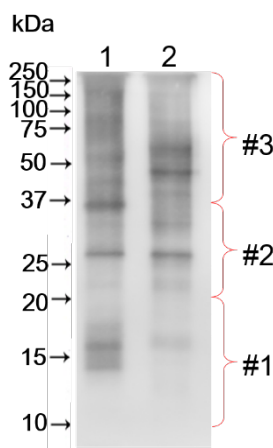
Mezi těmito vzorky byly patrné rozdíly v zastoupení glykoproteinů. V oblasti mezi 10 a 20 kDa (#1) byl u spermií prasete a býka nalezen shodně glykoprotein s molekulovou hmotností přibližně 15 kDa. Dále byl pouze u spermií prasete detekován glykoprotein s mol. hm. ~17 kDa. U lidských spermií bylo slabé značení glykoproteinů v oblasti 15 a 18 kDa.

V oblasti mezi 20 a 37 kDa (#2) byl u kančích spermií nalezen glykoprotein s mol. hm. přibližně 25 kDa a glykoprotein ~27 kDa, který byl detekován také u lidských spermií. U vzorku z býčích a lidských spermií byly nalezeny glykoproteiny s přibližně 23 a 26 kDa. Pouze u býčích spermií byl značen glykoprotein s molekulovou hmotností asi 32 kDa. U všech extraktů byl nalezen glykoprotein s přibližně 36 kDa.

V oblasti nad 37 kDa (#3) byly pouze u býčích spermií nalezeny dva glykoproteiny s molekulovou hmotností asi 48 a 65 kDa. U lidských spermií byl značený glykoprotein s přibližně 50 kDa.

5.10.3 Kapacitované spermie

Glykoproteinový profil kapacitovaných spermií prasete a býka je na Obr. 26.



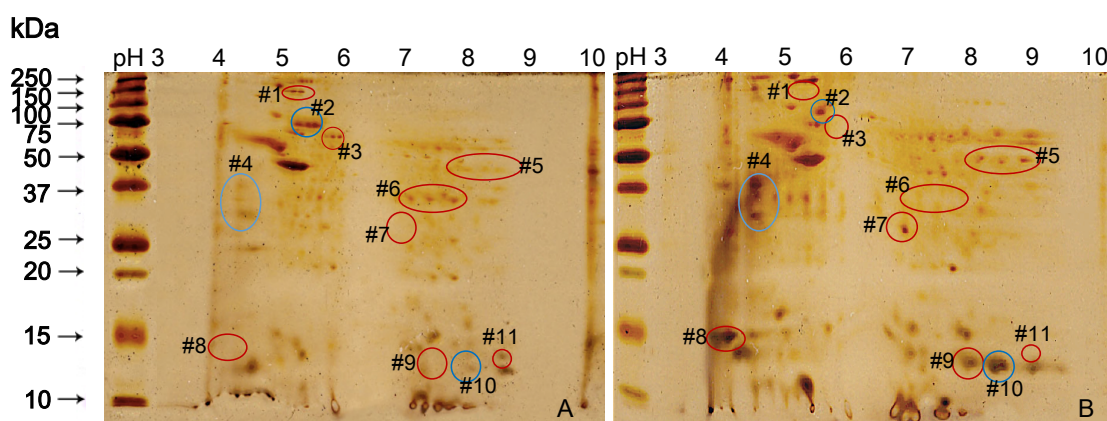
Obr. 26: Glykoproteinové profily spermií kapacitovaných v *in vitro* podmínkách značené konkanavalinem A. SDS extrakty kapacitovaných spermií 1) prasete a 2) býka připravené v neredukujících podmínkách.

V oblasti mezi 10 a 20 kDa (#1) byl u obou vzorků nalezen glykoprotein s molekulovou hmotností přibližně 16 kDa. Pouze u extraktu spermií prasete byly detekovány další glykoproteiny s mol. hm. 14 a 17 kDa. V oblasti mezi 20 a 37 kDa (#2) byly shodně u spermií obou zvířat nalezeny glykoproteiny s molekulovou hmotností přibližně 21 a 27 kDa. Glykoprotein 32 kDa byl nalezen pouze u býčích spermií, naopak glykoprotein s 36 kDa byl pouze u spermií prasete. V oblasti nad 37 kDa (#3) byly u spermií prasete detekovány glykoproteiny s molekulovou hmotností přibližně 45 a 52 kDa. U býčích spermií byly nalezeny glykoproteiny 48 a 60 kDa.

5.11 2D-elektroforéza proteinů epididymálních spermií psa a kocoura

Byla provedena 2D elektroforéza proteinů extrahovaných z epididymálních spermií psa a kocoura (kap. 2.2.12, str. 41). Proteiny byly extrahovány z epididymálních spermií pomocí SDS vzorkového pufru (kap. 2.2.6, str. 36) bez bromfenolové modři a následně

přečištěny pomocí 2D Clean Up kitu (kap. 2.2.10, str. 39). Dále byly proteiny rozpuštěny v rehydratačním pufru s 2 % IPG a 1 % DTT (kap. 2.2.12.1, str. 41). Takto připravené vzorky byly naneseny na strip s gelem. V prvním kroku byly proteiny rozděleny podle svých isoelektrických bodů v rozsahu pH 3-10 (kap. 2.2.12.2, str. 41). V druhém kroku byly proteiny rozděleny elektroforeticky v přítomnosti SDS na 15% polyakrylamidovém gelu (kap. 2.2.12.3, str. 41). Proteiny rozdělené v gelu byly vizualizovány pomocí barvení stříbrem (kap. 2.2.13.2, str. 42).



Obr. 27: 2D elektroforézy proteinů epididymálních spermií psa (A) a kocoura (B). První rozměr – isoelektrická fokusace v rozsahu pH 3-10, druhý rozměr – elektroforéza v přítomnosti SDS na 15% polyakrylamidovém gelu. Proteiny v gelu byly barveny stříbrem. Červeně označené proteinové body v jednom ze vzorků chybí. Modře označené proteinové body se liší množstvím detekovaného proteinu.

Proteiny epididymálních spermií psa a kocoura rozdělené 2D-elektroforézou jsou na Obr. 27. Proteinový profil těchto zvířat se mezi sebou lišil. Některé nejviditelnější rozdíly mezi jednotlivými vzorky byly označeny kolečkem.

Červeně označené proteinové body v jednom ze vzorků chybí. Ve vzorku proteinů psích spermií (Obr. 27A) byly nalezeny proteiny, které chyběly ve vzorku ze spermií kocouřích (Obr. 27B). Jednalo se např. o protein s pI 5 a 150 kDa (#1), dále pak o proteiny s pI 6 a 60 kDa (#3), 4 proteinové body v oblasti pI 7-8 a 35 kDa (#6) a o protein s pI 8,5 a 13 kDa (#11). Naopak tři proteinové body v oblasti pI 8-9 a 45 kDa (#5) byly detekovány pouze ve vzorku z epididymálních spermií kocoura (Obr. 27B). Stejně tak proteiny s pI 7 a 27 kDa (#7), s pI 4 a 14 kDa (#8) a s pI 7,5 a 12 kDa (#9).

Modře vyznačené proteinové body se liší množstvím nalezeného proteinu. Protein s pI 5,5 a 75 kDa (#2) byl výraznější ve vzorku psích spermií. Naopak proteiny s pI 4,5 a 30-40 kDa (#4) a s pI 8 a 12 kDa (#10) byly výraznější ve vzorku proteinů kocouřích (B) spermií než psích spermií (A).

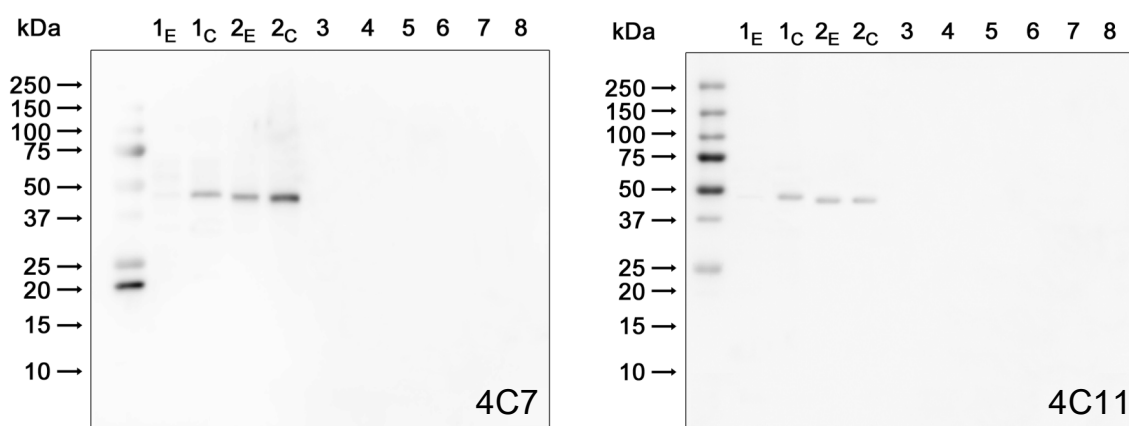
5.12 Imunodetekce proteinů kančích spermií na PVDF membráně

Povrchové proteiny z kančích ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií extrahované pomocí Pierce Cell Surface Protein Isolation kitu (kap. 2.2.7, str. 36), proteiny ze spermií extrahované pomocí SDS (kap. 2.2.6, str. 36), proteiny extrahované z tkání (kap. 2.2.8, str. 38) a tekutin kančího reprodukčního traktu (kap. 2.2.9, str. 38) byly elektroforeticky rozděleny v gradientovém polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (kap. 2.2.11, str. 39). Rozdělené proteiny v polyakrylamidovém gelu byly přeneseny na PVDF membránu (kap. 2.2.14, str. 43). K určení původu proteinu proběhla imunodetekce proteinů na PVDF membráně monoklonálními protilátkami proti povrchovým proteinům kančích spermií (kap. 2.2.16, str. 44).

PVDF membrána s proteiny byla inkubována s monoklonální protilátkou o daném ředění. Po promytí membrány následovala inkubace se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou. Pro vizualizaci byl použit chemiluminiscenční substrát. SDS extrakt z ejakulovaných a kapacitovaných spermií sloužil jako pozitivní kontrola. Extrakt z ledvin sloužil jako negativní kontrola.

5.12.1 Protilátky 4C7 a 4C11

Detekce proteinu s molekulovou hmotností přibližně 45 kDa protilátkou 4C7 na PVDF membráně je na Obr. 28. Tento protein byl přítomný na povrchu ejakulovaných i kapacitovaných spermií. V SDS extraktech ejakulovaných a kapacitovaných spermií byl detekován protein, který měl menší molekulovou hmotnost než detekovaný protein z povrchu spermií. Zvýšení molekulové hmotnosti proteinu ve vzorcích z povrchu spermií oproti SDS extraktům byl pravděpodobně v důsledku značení biotinem při izolaci proteinů. V extraktech z tkání ani v tekutinách reprodukčního traktu nebyl protein protilátkou detekován.

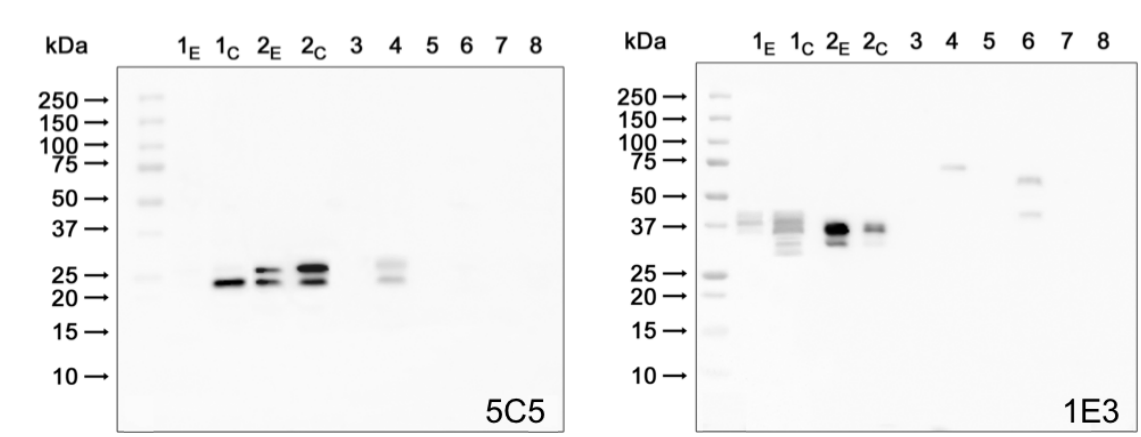


Obr. 28: Imunodetekce proteinů na PVDF membráně pomocí monoklonálních protilátek 4C7 (ředěná 1:20) a 4C11 (ředěná 1:20). 1_E) proteiny z povrchu ejakulovaných spermií, 1_C) proteiny z povrchu kapacitovaných spermií, 2_E) SDS extrakt z ejakulovaných spermií, 2_C) SDS extrakt z kapacitovaných spermií, 3) extrakt z varlat, 4) proteiny epididymální tekutiny, 5) proteiny tekutiny semenných váčků, 6) extrakt z prostaty, 7) proteiny semenné plasmy a 8) extrakt z ledvin

Detekce proteinu s molekulovou hmotností přibližně 45 kDa protilátkou 4C11 na PVDF membráně je na Obr. 28. Protein detekovaný protilátkou 4C11 byl přítomný na povrchu ejakulovaných a kapacitovaných spermií a v obou SDS extraktech spermií. Protein detekovaný v extraktech pomocí SDS měl menší molekulovou hmotnost než protein z povrchu spermií. Zvýšení molekulové hmotnosti proteinu ve vzorcích z povrchu spermií oproti SDS extraktům byl pravděpodobně v důsledku značení biotinem při izolaci proteinů. V extraktech z tkání ani v tekutinách reprodukčního traktu nebyl protein protilátkou detekován.

5.12.2 Protilátky 5C5 a 1E3

Protilátka 5C5 na PVDF membráně detekovala proteiny s molekulovou hmotností přibližně 24 a 27 kDa (Obr. 29). Na povrchu ejakulovaných spermií nebyla protilátkou detekována ani jedna z forem proteinu. Na povrchu kapacitovaných spermií byla přítomna pouze 24 kDa forma proteinu. V SDS extraktech byly obě formy proteinu protilátkou 5C5 detekovány. Protein byl detekován také v epididymální tekutině, ve které byly detekovány obě jeho formy.

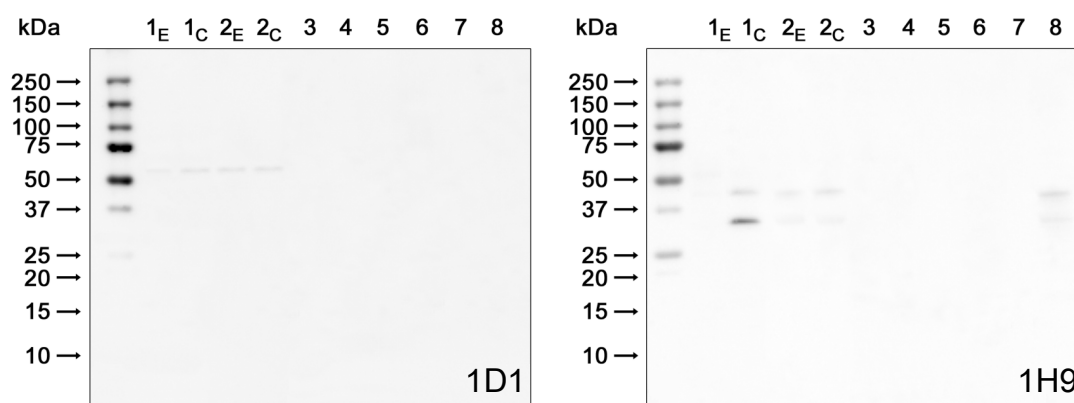


Obr. 29: Imunodetekce proteinů na PVDF membráně pomocí monoklonálních protilátek 5C5 (ředěná 1:50) a 1E3 (ředěná 1:50). 1_E) proteiny z povrchu ejakulovaných spermií, 1_C) proteiny z povrchu kapacitovaných spermií, 2_E) SDS extrakt z ejakulovaných spermií, 2_C) SDS extrakt z kapacitovaných spermií, 3) extrakt z varlat, 4) proteiny epididymální tekutiny, 5) proteiny tekutiny semenných váčků, 6) extrakt z prostaty, 7) proteiny semenné plasmy a 8) extrakt z ledvin

Protilátka 1E3 na membráně detekovala proteiny s hmotností asi 30, 32, 36 a 38 kDa (Obr. 29). Na povrchu ejakulovaných spermií byl protilátkou 1E3 detekován protein s molekulovou hmotností 38 kDa. Na povrchu kapacitovaných spermií byly přítomny všechny čtyři formy proteinu (30, 32, 36 a 38 kDa). V SDS extraktu z ejakulovaných spermií byly detekovány protilátkou 1E3 proteinové formy s 32 a 36 kDa a v celkovém extraktu kapacitovaných spermií byla detekována pouze 36 kDa forma proteinu. V epididymální tekutině byl protilátkou 1E3 detekován protein s molekulovou hmotností asi 70 kDa. Také v extraktu z prostaty byly detekovány dva proteiny v oblasti molekulových hmotností 60 a 38 kDa.

5.12.3 Protilátky 1D1 a 1H9

Protilátka 1D1 na PVDF membráně detekovala protein s molekulovou hmotností přibližně 55 kDa (Obr. 30). Protein byl detekován na povrchu ejakulovaných i kapacitovaných spermií a v SDS extraktech obou typů spermií. U SDS extraktů z celých spermií měl detekovaný protein vyšší molekulovou hmotnost než proteiny detekované v extraktech povrchových proteinů. V extraktech z tkání ani v tekutinách reprodukčního traktu nebyl protein protilátkou detekován.

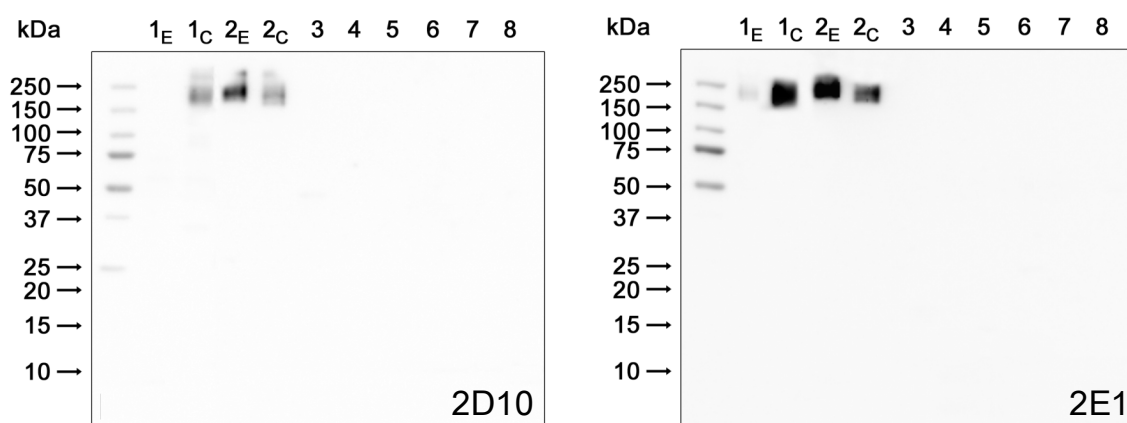


Obr. 30: Imunodetekce proteinů na PVDF membráně pomocí monoklonálních protilátek 1D1 (ředění 1:25) a 1H9 (ředění 1:20). 1_E) proteiny z povrchu ejakulovaných spermií, 1_C) proteiny z povrchu kapacitovaných spermií, 2_E) SDS extrakt z ejakulovaných spermií, 2_C) SDS extrakt z kapacitovaných spermií, 3) extrakt z varlat, 4) proteiny epididymální tekutiny, 5) proteiny tekutiny semenných váčků, 6) extrakt z prostaty, 7) proteiny semenné plasmy a 8) extrakt z ledvin

Protilátka 1H9 detekovala na PVDF membráně proteiny s molekulovou hmotností přibližně 35 a 45 kDa (Obr. 30). Na povrchu kapacitovaných spermií byly přítomny obě formy proteinu. Slabý signál byl přítomný i na povrchu ejakulovaných spermií a v extraktu z ledvin.

5.12.4 Protilátka 2D10 a 2E1

Monoklonální protilátka 2D10 detekovala na PVDF membráně protein s molekulovou hmotností přibližně 200 kDa (Obr. 31). Protein byl přítomný pouze na povrchu kapacitovaných spermií a v SDS extraktech z ejakulovaných a kapacitovaných spermií. V SDS extraktu ejakulovaných spermií byl detekován protein odpovídající vyšší molekulové hmotnosti než ve vzorcích připravených z kapacitovaných spermií. V extraktech z tkání ani v tekutinách reprodukčního traktu nebyl protein detekován.



Obr. 31: Imunodetekce proteinů na PVDF membráně pomocí monoklonálních protilátek 2D10 (ředěné 1:20) a 2E1 (ředěné 1:50). 1_E) proteiny z povrchu ejakulovaných spermií, 1_C) proteiny z povrchu kapacitovaných spermií, 2_E) SDS extrakt z ejakulovaných spermií, 2_C) SDS extrakt z kapacitovaných spermií, 3) extrakt z varlat, 4) proteiny epididymální tekutiny, 5) proteiny tekutiny semenných váčků, 6) extrakt z prostaty, 7) proteiny semenné plasmy a 8) extrakt z ledvin

Monoklonální protilátka 2E1 detekovala na PVDF membráně protein s molekulovou hmotností přibližně 200 kDa (Obr. 31). Protein byl detekován na povrchu kapacitovaných spermií. Na povrchu ejakulovaných spermií byl detekován slabší signál protilátky značící tento proteinu. V extraktech z tkání ani v tekutinách reprodukčního traktu protein detekován nebyl.

5.12.5 Souhrn imunodetekcí proteinů na PVDF membráně

Shrnutí výsledků imunodetekcí na PVDF membráně jednotlivými monoklonálními protilátkami je zobrazeno v tabulce 4. Pro jednotlivé protilátky je uvedena oblast spermie, kterou značily při imunofluorescenci. Dále je uvedena přibližná molekulová hmotnost proteinu detekovaného pomocí dané protilátky na PVDF membráně a imunolokalizace proteinu.

Tab. 4: Shrnutí imunodetekce proteinů na PVDF membráně pomocí panelu monoklonálních protilátek. Je uvedena oblast spermie, kterou protilátky značily při imunofluorescenci, přibližná molekulová hmotnost proteinu detekovaného pomocí dané protilátky na PVDF membráně a imunolokalizace tohoto proteinu.

Protilátka	Oblast značená protilátkou na ejakulované spermii	Mol. hm. značeného proteinu na PVDF membráně	Imunolokalizace proteinu na PVDF membráně
4C7	Akrosomová oblast	45 kDa	Povrch ejakulovaných a kapacitovaných spermií
4C11	Akrosomová oblast	45 kDa	Povrch ejakulovaných a kapacitovaných spermií
5C5	Akrosomová oblast	24, 27 kDa	Povrch kapacitovaných spermií a epididymální tekutina
1D1	Akrosomová oblast	55 kDa	Povrch kapacitovaných spermií
2D10	Akrosomová oblast	200 kDa	Povrch kapacitovaných spermií
1E3	Akrosomová oblast	30, 32, 36, 38 kDa	Povrch ejakulovaných a kapacitovaných spermií, epididymální tekutinu a extrakt z prostaty
2E1	Akrosomová oblast	200 kDa	Povrch ejakulovaných a kapacitovaných spermií
5F2	Akrosomová oblast	Negativní	Negativní
1H9	Apikální část	35, 45 kDa	Povrch kapacitovaných spermií a extrakt z ledviny

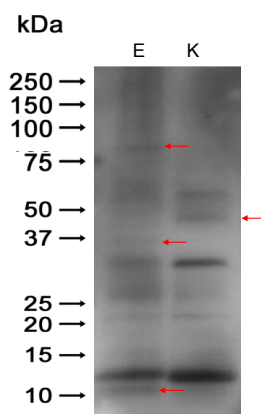
5.13 Studie vazby proteinů spermií s glykoproteiny *zona pellucida*

5.13.1 Izolace a biotinylace glykoproteinů *zona pellucida*

Oocyty byly získány z vaječníků prasete a skotu jejich homogenizací a opakovaným promýváním fyziologickým roztokem (kap. 2.2.17.1, str. 46). Oocyty byly následně přečištěny na Percollovém gradientu. Takto získané oocyty byly dále homogenizovány a z homogenátu byl izolován glykoproteinový obal vajíčka *zona pellucida*. Glykoproteiny *zona pellucida* byly v dalším kroku biotinylovány (kap. 2.2.17.2, str. 47) a následně použity pro vazebné studie s povrchovými proteiny kančích spermií.

5.13.2 Vazebná studie proteinů kančích spermií

Byly provedeny vazebné studie povrchových proteinů spermií prasete s glykoproteiny *zona pellucida* (ZP) vajíčka (kap. 2.2.17.4, str. 47). Elektroforeticky rozdělené povrchové proteiny ejakulovaných a kapacitovaných spermií na PVDF membráně byly inkubovány s biotinem značenými glykoproteiny ZP. Poté byla membrána inkubována s avidinem konjugovaným s křenovou peroxidasou a k vizualizaci interakce byl použit chemiluminiscenční substrát. Povrchové proteiny kančích spermií vázající glykoproteiny ZP jsou na Obr. 32.



Obr. 32: Vazebná studie povrchových proteinů kančích ejakulovaných (E) a kapacitovaných (K) spermií s glykoproteiny *zona pellucida*. Rozdíly ve vazebných proteinech označeny šipkou.

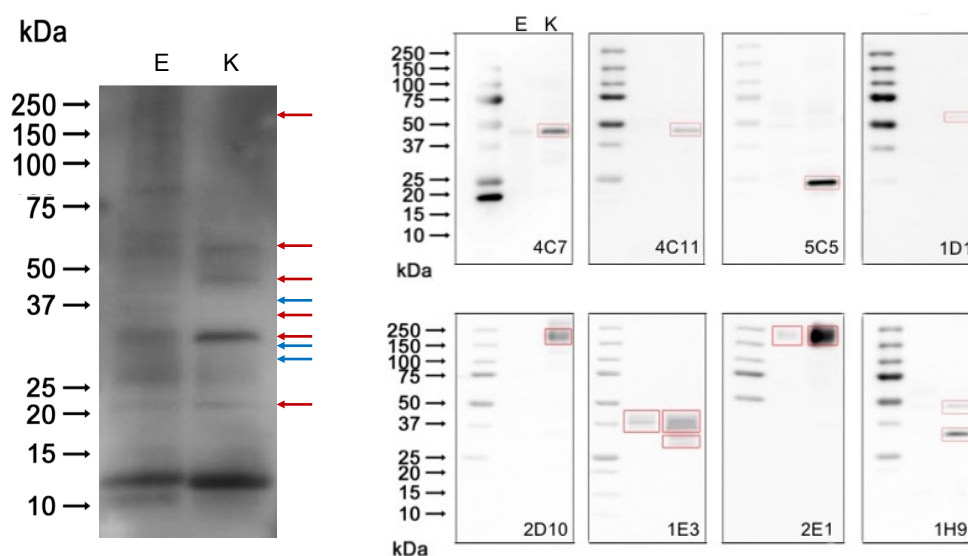
Většina vázajících proteinů se nacházela u obou funkčních stavů spermií, jak u ejakulovaných, tak u kapacitovaných spermií. Nejvýraznější byly proteiny s molekulovou hmotností asi 12 a 35 kDa. Další proteiny, které interagovaly

s glykoproteiny ZP a byly nalezeny u ejakulovaných i kapacitovaných spermií, byly v oblastech s molekulovou hmotností přibližně 22, 27 a 55 kDa.

Byly nalezeny i proteiny, které vázaly glykoproteiny *zona pellucida* ve vzorku pouze povrchových proteinů ejakulovaných spermií. Proteiny s molekulovou hmotností asi 11, 36 a 85 kDa u kapacitovaných spermií glykoproteiny nevázaly. U kapacitovaných spermií byl nalezen protein, vázající *zona pellucida*, s přibližně 45 kDa. Vazba tohoto proteinu na glykoproteiny *zona pellucida* nebyla detekována u ejakulovaných kančích spermií.

5.13.3 Shoda imunodetekce proteinů monoklonálními protilátkami s vazbou glykoproteinů *zona pellucida*

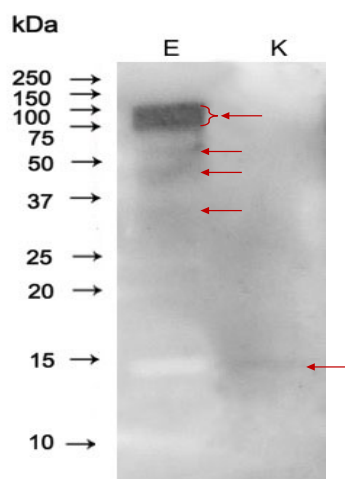
Po vizualizaci glykoproteinů *zona pellucida* vajíčka navázaných na proteinech z povrchu kančích ejakulovaných a kapacitovaných spermií, byly detekované proužky porovnány s oblastmi značenými monoklonálními protilátkami (Obr. 33).



Obr. 33: Vazebná studie povrchových proteinů spermií prasete s glykoproteiny *zona pellucida*. Vlevo – membrána s detekovanými glykoproteiny ZP, které se vázaly na proteiny izolované z povrchu kančích ejakulovaných (E) a kapacitovaných (K) spermií. Vpravo – PVDF membrány s povrchovými proteiny z ejakulovaných a kapacitovaných spermií s označenými oblastmi detekce monoklonálními protilátkami. Červená šipka – oblast detekce monoklonální protilátkou se shoduje s oblastí vazby glykoproteinů *zona pellucida* s povrchovými proteiny. Modrá šipka – v oblasti detekované monoklonální protilátkou nebyla nalezena vazba proteinů s glykoproteiny *zona pellucida*.

Protilátky 4C7 a 4C11 detekovaly na PVDF membráně proteiny se stejnou molekulovou hmotností asi 45 kDa. V odpovídající oblasti byla detekována i vazba proteinu s glykoproteiny *zona pellucida*. Protilátka 5C5 detekovala na povrchu kapacitovaných spermií protein s molekulovou hmotností přibližně 24 kDa. V odpovídající oblasti byla detekována i vazba proteinu s glykoproteiny *zona pellucida*. Monoklonální protilátka 1D1 detekovala protein s molekulovou hmotností přibližně 55 kDa a ve stejné oblasti byla detekována vazba s glykoproteiny *zona pellucida*. Protilátky 2D10 a 2E1 na membráně detekovaly proteiny s molekulovou hmotností 200 kDa. Vazba povrchových proteinů s glykoproteiny *zona pellucida* byla v této oblasti také detekována. Protilátka 1E3 detekovala na povrchu spermií proteiny o molekulových hmotnostech přibližně 30, 32, 36 a 38 kDa. Vazba povrchových proteinů s glykoproteiny *zona pellucida* nebyla v oblastech molekulových hmotností 30, 32 a 38 kDa detekována. U 36 kDa formy proteiny byla detekována vazba s glykoproteiny *zona pellucida*. Protilátka 1H9 detekovala proteiny s molekulovými hmotnostmi přibližně 35 a 45 kDa. Pro oba detekované proteiny byla nalezena shoda i při vazbě proteinů s glykoproteiny *zona pellucida*.

5.13.4 Vazebná studie proteinů býčích spermií



Obr. 34: Vazebná studie povrchových proteinů býčích ejakulovaných (E) a kapacitovaných (K) spermií s glykoproteiny *zona pellucida*.

Povrchové proteiny býčích spermií vázající glykoproteiny ZP jsou na Obr. 34. U povrchových proteinů ejakulovaných spermií býka byla detekována vazba proteinu s molekulovou hmotností v oblasti 75-100 kDa na glykoproteiny *zona pellucida*. Vazba povrchových proteinů kapacitovaných spermií nebyla v této oblasti detekována. Dále byly detekovány proteiny s mol. hm. přibližně 35, 45 a 60 kDa, které vázaly

glykoproteiny ZP. Mezi povrchovými proteiny kapacitovaných spermií byl detekován pouze jeden protein, který vázal glykoproteiny *zona pellucida*, v oblasti přibližně 15 kDa. Neschopnost detekovat povrchové proteiny kapacitovaných spermií s vazebnou aktivitou bylo pravděpodobně způsobeno nízkou koncentrací těchto proteinů v extraktu.

6 Diskuze

Proteiny spermií, stejně jako proteiny somatických buněk, se podílí na struktuře a cytoskeletálním složení buňky. Jsou zapojeny do mnoha metabolických procesů (jako je glykolýza, β -oxidace mastných kyselina nebo respirace) zajišťujících energii pro buňku. U spermií můžeme najít navíc speciální proteiny zodpovědně za rozpoznání a vazbu na *zona pellucida* vajíčka a také proteiny, které hrají roli při fúzi membrán obou gamet. Jak vyplývá z publikovaných studií, jsou tyto jedinečné proteiny v buňce spermie ve zcela minoritním zastoupení.^{77, 78, 79}

Proteiny plasmatické membrány spermií se liší svou biologickou funkcí a lokalizací na spermii. V oblasti akrosomu jsou povrchové proteiny zapojené do primární vazby spermie na *zona pellucida* vajíčka, zatímco proteiny z ekvatoriálního segmentu hlavičky se podílí na vazbě a fúzi plasmatických membrán spermie a vajíčka. Povrchové proteiny v oblasti bičíku mají vliv na motilitu spermie, především na její hyperaktivaci během kapacitace.⁷¹

Proteiny na povrchu spermií jsou tvořeny nejen během samotného vývoje spermií ve varleti, ale do plasmatické membrány spermií se mohou integrovat i během epididymální maturace³⁵ nebo jsou navázány na povrch spermií ze semenné plasmy při ejakulaci.⁴¹ Spermie v epididymu je přímo vystavená epididymální tekutině, ve které jsou obsažené různé enzymy (proteinasy, glykosidasy, atd.), jejichž působením dochází ke změnám ve struktuře a v posttranslačních modifikacích proteinů.³⁵ Během ejakulace se na povrch spermií vážou proteiny ze semenné plasmy, čímž dochází k překrytí a ochraně důležitých vazebných proteinů spermie před nepříznivým prostředím samičího reprodukčního traktu. Během kapacitace je většina proteinů semenné plasmy z povrchu spermií odstraněna a dochází k odhalení proteinů zodpovědných za primární vazbu na *zona pellucida* vajíčka.⁴ Proteinový profil spermií v různých funkčních stavech se proto může výrazně lišit.

Pro studium proteinů je zásadní i volba extrakční metody a činidla/detergentu. Byla publikována studie zaměřená na porovnání proteinových profilů spermií, při které byly proteiny získány různými extrakčními činidly.⁹⁴

V našich experimentech byla zvolena extrakce proteinů z celých spermií pomocí SDS vzorkového pufru a izolace proteinů povrchu spermatické buňky v různých stádiích její funkčního vývoje (epididymální, ejakulované a *in vitro* kapacitované). Takto izolované proteiny byly elektroforeticky charakterizovány a bylo provedeno porovnání

proteinových a glykoproteinových profilů vybraných druhů savců (prase, býk, kocour, pes, člověk a myš). U některých druhů se podařilo získat spermie ve všech jejich stádiích funkčních vývoje (prase, býk), u některých jsme získali pouze spermie buď epididymální (myš, kocour, pes) nebo ejakulované (člověk). U kančích a býčích ejakulovaných spermií byla provedena jejich *in vitro* kapacitace. Srovnávací studie proteinů izolovaných ze spermií ve dvou odlišných funkčních stavech (ejakulovaná spermie a po *in vitro* kapacitaci) v rámci jednoho savčího druhu (prase) již byly publikovány.^{94,111}

V extraktech proteinů izolovaných z celých spermií pomocí SDS vzorkového pufru jsou přítomné mnoho proteinů, které jsou součástí např. cytoskeletu buňky nebo jaderné proteiny. Proteiny zodpovědné za vazbu spermií na *zona pellucida* jsou lokalizovány na povrchu plasmatické membrány a v celkovém extraktu spermií jsou v minoritním zastoupení. Proto byla zvolena metoda cílené izolace proteinů z povrchu spermie pomocí značení spermatické buňky biotinem.¹¹¹

Proteinové profily epididymálních spermií izolovaných pomocí SDS vzorkového pufru i proteiny z povrchu spermií se mezi jednotlivými savčími druhy lišily. Nejvíce se od ostatních savčích druhů lišil proteinový profil myších epididymálních spermií. Elektroforeticky rozdělené proteiny izolované pomocí SDS i z povrchu ejakulovaných spermií všech testovaných savčích druhů, si byly v oblasti vyšších molekulových hmotností (25-75 kDa) velmi podobné. V SDS extraktu spermií si byly proteinové profily prasete a býka podobné s výskytem proteinů v molekulových hmotnostech od 11 do 17 kDa. V této oblasti molekulových hmotností by se mohlo jednat o proteiny pocházející ze semenné plasmy, a to o spermadhesiny⁴³ nebo BSP⁵⁴.

Stejně jako SDS extrakty, tak i extrakty z povrchu *in vitro* kapacitovaných spermií obsahovaly velké množství proteinů, které byly shodně přítomné u obou savčích druhů (prase a skot).

Mezidruhové rozdíly v proteinových a glykoproteinových profilech jsou způsobeny druhově specifickými molekulami, popř. odlišným typem sacharidových postranních řetězců glykoproteinů, které mohou také významně měnit molekulovou hmotnost daných proteinů.

Nezbytným krokem procesu oplození je rozpoznání obou gamet a následná vazba spermie na glykoproteinový obal vajíčka. Spermie na svém povrchu nese specifické receptory pro vazbu na *zona pellucida*.⁴ Aminokyselinové složení glykoproteinů *zona pellucida* je mezi savčími druhy vysoce homologní.²² Mezidruhová specifita vazby

spermie na vajíčko je převážně dána různým složením postranních sacharidových řetězců ZP.²³ Předpokladem je, že se receptory pro ZP na povrchu spermií, tedy i proteinové složení, jednotlivých savčích druhů od sebe liší, což potvrzují i studie těchto receptorů u různých savčích druhů, např. myši, prasete a člověka, kde bylo již identifikováno několik potenciálních receptorů pro tuto vazbu.²³

Studium proteinů spermie v předkládané práci probíhalo pomocí unikátních monoklonálních protilátek připravených proti povrchovým proteinům kančích ejakulovaných spermií, které byly připraveny v naší laboratoři.¹⁰⁶ Již dříve byly proteiny spermie studovány pomocí připravených protilátek, ale jednalo se převážně o protilátky připravené proti proteinům kančí semenné plasmy např. při studiu DQH¹¹² povrchového proteinu, beta-microseminoproteinu (MSP)¹¹³, inhibitoru akrosinu³⁴ a spermadhesinů AQN¹¹⁴, AWN¹¹⁵, PSP I a PSP II¹¹⁶ na kančích spermiích. V jiných publikacích byly použity protilátky připravené proti proteinům celých spermií pro studium lidských proteinů.^{117,118}

Panel monoklonálních protilátek, které byly připravené proti povrchovým proteinům kančích spermií, byl pomocí nepřímé imunofluorescenční metody testován na spermiích v různých funkčních stavech (epididymální, ejakulované a *in vitro* kapacitované). Ze 17 testovaných protilátek značilo 9 protilátek silně v akrosomové části hlavičky spermie. Většina protilátek se vážala na ejakulované a kapacitované spermie, kde byla pozorována velmi silná intenzita fluorescence. Vybrané protilátky byly dále testovány na možnou zkříženou reaktivitu na býčích a myších spermiích.

Z pěti vybraných protilátek (4C7, 5C5, 1E3, 2E1 a 1H9) testovaných na býčích spermiích značila nejsilněji protilátka 1E3. Tato protilátka značila akrosomovou část hlavičky spermií ve všech funkčních stavech. Protilátka 4C7 značila na všech typech spermií slabě linku v apikální části hlavičky. Protilátka 5C5 značila pouze na ejakulovaných spermiích, slabě tečkovaně po celé hlavičce spermie. Protilátky 2E1 a 1H9 na povrchu býčích spermií neznačily.

Na povrchu myších epididymálních spermií v akrosomové oblasti hlavičky značily protilátky 3B10, 1E3, 2E1 a 5F2. Protilátka 3B10 značila proteiny na kančích spermiích pouze v mitochondriální část bičíku ejakulovaných a kapacitovaných spermií. Protilátka 1E3 na kančích spermiích v akrosomové oblasti hlavičky značila proteiny, ale pouze na ejakulovaných a kapacitovaných spermiích. Protilátky 3E1 a 5F2 značily i na epididymálních spermiích prasete.

Vzhledem k větší podobnosti kančích spermií s býčími než s myšími spermii jsme očekávali zkříženou reaktivitu protilátek právě na býčích spermii. Protilátky připravené proti povrchovým proteinům kančích spermií značily na spermiih býka i myši. Protilátky, které u kančích spermií značily spermie v oblasti akrosomu, převážně značily akrosomovou část i u býčích spermií. Některé protilátky, které u kančích epididymálních spermií neznačily nebo značily slabě, značily u myších epididymálních spermií v oblasti akrosomu.

Pomocí těchto protilátek jsme testovali přítomnost daných proteinů v extraktech z povrchu ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných kančích spermií. Původ proteinů rozpoznávaných těmito protilátkami jsme studovaly pomocí imunodetekce v tekutinách a extraktech z tkání reprodukčních orgánů prasete.

Některé monoklonální protilátky (4C7, 4C11, 2D10, 2E1, 5C5, 1D1, 1E3) detekovaly na PVDF membráně povrchové proteiny ejakulovaných i kapacitovaných spermií v oblasti se stejnou molekulovou hmotností, kde byla také nalezena vazba proteinu s glykoproteiny ZP. Některé dvojice protilátek připravených proti proteinům povrchu kančích spermií detekovaly protein o stejné molekulové hmotnosti, jako např. 4C7 a 4C11, které značily protein o mol. hm. 45 kDa nebo 2D10 a 2E1 rozpoznávající protein 200 kDa.

Celá škála proteinů v širokém rozmezí molekulových hmotností izolovaných z povrchu spermií prasete interagovala s glykoproteiny ZP. Dříve již bylo identifikováno několik proteinů v oblasti mol. hm. 14-50 kDa vázající ZP, a to AQN-3 spermadhesin, P47, SP32 a fertilin β .¹¹⁹ Na rozdíl od prasat, u býčích spermií byla nalezena interakce povrchových proteinů převážně v oblasti vysokomolekulárních proteinů 75-100 kDa a v oblasti 35, 45 a 60 kDa pouze u ejakulovaných spermií. Pouze jediný protein (14 kDa) izolovaný z povrchu *in vitro* kapacitovaných býčích spermií vykazoval vazbu se ZP. Profil vazebných proteinů z ejakulovaných a kapacitovaných spermií se lišil. Rozdíly mezi proteinovými profily mohou být způsobeny buď uvolněním vázaných proteinů ze spermií během kapacitace a odhalením nových vazebných proteinů na plasmatické membráně, anebo různou přístupností proteinů během biotinylační reakce.

Proteiny značené protilátkami 4C7, 5C5 a 1H9 se v naší laboratoři podařilo izolovat pomocí imunoprecipitační metody s danými protilátkami z extraktu ejakulovaných kančích spermií a následně identifikovat pomocí MALDI-TOF/TOF hmotnostního spektrometru.¹⁰⁶

Protein rozpoznáný protilátkou 4C7 byl identifikován jako akrosinový prekurzor. Tento protein je hlavní složkou akrosomu, lokalizovaný v akrosomové tekutině a na vnitřní akrosomové membráně. U prasete se ukazuje, že se akrosin podílí na sekundární vazbě na vajíčko a na průchodu spermie glykoproteinovým obalem ZP.⁴³ Akrosin byl již dříve detekován na povrchu ejakulovaných a kapacitovaných spermíí.¹¹¹ Jeden z možných důvodů tohoto výskytu může být přítomnost akrosinu po spontánní akrosomové reakci ve vzorcích ejakulovaných a kapacitovaných spermíí. Uvolněný akrosin může následně i přes opakované promývání suspenze buněk zůstat zachycen na povrchu ostatních spermíí. Schopnost akrosinu vázat ZP byla popsána už dříve.¹²⁰

Protein rozpoznáný protilátkou 5C5 byl identifikován jako RAB-2A ze skupiny Ras proteinů. V extraktech celých spermíí byly nalezeny dvě formy proteinu RAB-2A, 24 a 27 kDa. Existence více forem proteinu RAB-2A může být způsobena hypervariabilitou C-koncové domény proteinu.¹²¹ Pouze 24 kDa forma proteinu byla detekována v extraktu z povrchu spermíí, a navíc pouze u kapacitovaných spermíí. Předpokládáme, že 27 kDa forma proteinu obsahuje navíc hydrofobní doménu, jak bylo ukázáno u RAB proteinů, a proto je odolná k izolaci při mírných extrakčních podmínkách.¹²² RAB-2A se vyskytují v epididymální tekutině, kam se pravděpodobně vzhledem ke svému ukotvení v membráně dostávají sekrecí v epididymosomech.¹²³ U býka byly nalezeny jiné proteiny RAB rodiny, které byly asociovány s těmito membránovými váčky.¹²⁴ U lidí byly RAB-2 proteiny nalezeny v prostosomech.¹²⁵ Bylo popsáno, že RAB proteiny mají nezbytnou roli jako regulátory transportních drah vesikulů.¹²⁶ Dřívější studie ukázaly, že RAB-2A může být také lokalizován uvnitř pohlavní buňky a může být zapojen do biogeneze akrosomu.¹²⁷ Funkce RAB-2A proteinů na povrchu spermíí stále zůstává nevyřešena.

Protein, rozpoznáný protilátkou 1H9 byl identifikován jako P47 (lactadherin), již dříve popsáný protein kančích spermíí vázající glykoproteiny ZP.⁸⁹ Protein P47 jsme detekovali pomocí imunofluorescence v apikální části hlavičky ejakulované spermie, což odpovídá publikovaným studiím.¹²⁸ Na PVDF membráně jsme detekovali protein v extraktu z tkáně ledviny. Také Ensslin et al.⁸⁹ popisuje výskyt proteinu v nereprodukčních orgánech jako sval nebo ledvina. My jsme detekovali dvě formy 45 kDa a 35 kDa, forma o nižší molekulové hmotnosti byla popsána poprvé, pravděpodobně se jedná o zkrácenou nebo jinak upravenou verzi P47. Petrunkina et al.¹²⁸ předpokládá, že je lactadherin zapojen do dalších fyziologických procesů spermatické buňky jako je kapacitace a akrosomová reakce. Nicméně jsou potřebné další studie, jakým

způsobem by mohl být P47 zapojen do spouštěcího mechanismu signálních kaskád vedoucích k akrosomové reakci a přípravě fúze spermie s vajíčkem.¹⁰⁷

7 Shrnutí výsledků

- 1) Ejakulované kančí a býčí spermie byly kapacitovány v *in vitro* podmínkách. Kapacitační stav spermií byl hodnocen nepřímou imunofluorescencí. Na kančích spermích byla použita monoklonální protilátka ACR-2 proti akrosomálnímu proteinu akrosinu. Na býčích spermích byla použita protilátka proti fosfotyrosinu. U býčích spermií byl použit lektin PNA pro kontrolu integrity akrosomu.
- 2) Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie byla použita k otestování panelu monoklonálních protilátek připravených proti povrchovým proteinům ejakulovaných spermií na epididymálních, ejakulovaných a na *in vitro* kapacitovaných kančích spermích. Ze 17 testovaných protilátek značilo 9 protilátek silně v akrosomové části hlavičky spermie. Většina protilátek se vážala na ejakulované a kapacitované spermie, kde byla pozorována velmi silná intenzita fluorescence.
- 3) Byla pozorována zkřížená mezidruhová reaktivita některých protilátek připravených proti povrchovým proteinům kančích spermií na býčích spermích, především na spermích ejakulovaných. Nejvýrazněji značila protilátka 1E3, která se vážala do oblasti akrosomu všech funkčních stádií spermií. Na myších epididymálních spermích značily některé protilátky akrosomovou část hlavičky myší spermie, zatímco na kančích epididymálních spermích neznačily nebo jejich značení bylo slabé.
- 4) Proteiny celých spermií a proteiny z povrchu spermií byly izolovány z epididymálních, ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií různých savčích druhů. Získané proteiny byly elektroforeticky rozděleny a byly porovnány proteinové/glykoproteinové profily. Při mezidruhovém porovnání epididymálních spermií se nejvíce lišil proteinový profil myších spermií. Při porovnání proteinů ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií prasete a kance byla zjištěna jejich vzájemná podobnost.

- 5) Proteiny psích a kocouřích epididymálních proteinů byly rozděleny pomocí 2D-elektroforézy. Při porovnání rozdělených proteinových profilů bylo nalezeno několik proteinů, které se nacházely pouze u jednoho z druhů. U některých proteinových bodů byla nalezena jen změna v množství detekovaného proteinu mezi druhy.
- 6) Pomocí monoklonálních protilátek připravených proti povrchovým proteinům kančích ejakulovaných spermií byla provedena imunodetekce proteinů na PVDF membráně proteinů v extraktu z povrchu spermií a v SDS extraktech. Tyto protilátky byly použity i pro lokalizaci proteinu v tkáních a tekutinách reprodukčního traktu. Bylo zjištěno, že protilátky 4C7 a 4C11 shodně značí protein s mol. hm. ~45 kDa. Protilátka 5C5 detekovala 24 a 27 kDa proteiny v extraktu ze spermií a i v epididymální tekutině. Protilátka 1D1 detekovala na spermiích protein s ~55 kDa. Protilátky 2D10 a 1E3 shodně detekovaly protein s mol. hm. ~200 kDa. Protilátka 1E3 detekovala 4 formy proteinu (30, 32, 36 a 38 kDa) v extraktech spermií a dále detekovala proteiny v epididymální tekutině a v extraktu z prostaty. Protilátka 1H9 značila proteiny s mol. hm. ~35 a 45 kDa v extraktu spermií a v extraktu ledviny.
- 7) Pro studium vazby spermií na vajíčko byly použity izolované povrchové proteiny ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií kance a býka a glykoproteiny *zona pellucida*, které byly značené biotinem. Glykoproteiny ZP vázalo mnoho proteinů kančích spermií. Na rozdíl od prasat, pouze několik proteinů býčích spermií vykazovalo vazbu s glykoproteiny ZP daného druhu. Navíc některé z proteinů kančích spermií vázající glykoproteiny ZP byly zároveň imunodetekovány monoklonálními protilátkami (4C7, 4C11, 2D10, 2E1, 5C5, 1D1, 1E3) na PVDF membráně.

8 Literatura

- 1) Wassarman, P.M., Albertini, D.F.: The Mammalian Ovum. V knize: The Physiology of Reproduction, Second Edition, (Knobil, E., Neil, J.D.), Raven Press, New York, 79-122 (1994)
- 2) <http://what-when-how.com/paramedic-care/lifespan-development-scientific-principles-paramedic-care-part-1/> ke dni 23.4.2016
- 3) Salustri, A., Yanagishita, M., Underhill, C.B., Laurent, T.C., Hascall, V.C.: Dev. Biol. 151(2), 541-51 (1992)
- 4) Yanagimachi, R.: Mammalian Fertilization. V knize: The Physiology of Reproduction, Second Edition, (Knobil, E., Neil, J.D.), Raven Press, New York, 190-280 (1994)
- 5) Abou-Haila, A., Bendahmane, M., Tulsiani, D.R.: Minerva Ginecol. 66(4), 09-19 (2014)
- 6) Wassarman, P.M.: Annu. Rev. Biochem. 57, 415-442 (1988)
- 7) Bleil, J.D., Wassarman, P.M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U s A. 85(18), 6778-82 (1988)
- 8) Bleil, J.D., Greve, J.M., Wassarman, P.M.: Dev. Biol. 128(2), 376-85 (1988)
- 9) Easton, R.L., Patankar, M.S., Lattanzio, F.A., Leaven, T.H., Morris, H.R., Clark, G.F., Dell, A.: J. Biol. Chem. 275(11), 7731-42 (2000)
- 10) Dell, A., Chalabi, S., Easton, R.L., Haslam, S.M., Sutton-Smith, M., Patankar, M.S., Lattanzio, F., Panico, M., Morris, H.R., Clark, G.F.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100(26), 15631-6 (2003)
- 11) Hedrick, J.L., Wardrip, N.J.: Dev. Biol. 121(2), 478-88 (1987)
- 12) Töpfer-Petersen, E., Mann, K., Calvete, J.J.: Biol. Chem. Hoppe. Seyler. 374(7), 411-7 (1993)
- 13) Noguchi, S., Yonezawa, N., Katsumata, T., Hashizume, K., Kuwayama, M., Hamano, S., Watanabe, S., Nakano, M.: Biochim. Biophys. Acta. 1201(1), 7-14 (1994)
- 14) Topper, E.K., Kruijt, L., Calvete, J., Mann, K., Töpfer-Petersen, E., Woelders, H.: Mol. Reprod. Dev. 46(3), 344-50 (1997)
- 15) Katsumata, T., Noguchi, S., Yonezawa, N., Tanokura, M., Nakano, M.: Eur. J. Biochem. 240, 448-453 (1996)

- 16) Amari, S., Yonezawa, N., Mitsui, S., Katsumata, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Takeda, Y., Nakano, M.: *Mol. Reprod. Dev.* 59(2), 221-6 (2001)
- 17) Velásquez, J.G., Canovas, S., Barajas, P., Marcos, J., Jiménez-Movilla, M., Gallego, R.G., Ballesta, J., Avilés, M., Coy, P.: *Mol. Reprod.* 74(5), 617-28 (2007)
- 18) Goudet, G., Mugnier, S., Callebaut, I., Monget, P.: *Biol. Reprod.* 78(5), 796-806 (2008)
- 19) Lefièvre, L., Conner, S.J., Salpekar, A., Olufowobi, O., Ashton, P., Pavlovic, B., Lenton, W., Afnan, M., Brewis, I.A., Monk, M., Hughes, D.C., Barratt, C.L.: *Hum. Reprod.* 19(7), 1580-6 (2004)
- 20) Chiu, P.C., Wong, B.S., Lee, C.L., Pang, R.T., Lee, K.F., Sumitro, S.B., Gupta, S.K., Yeung, W.S.: *Hum. Reprod.* 23(6), 1385-93 (2008)
- 21) Pang, P.C., Chiu, P.C., Lee, C.L., Chang, L.Y., Panico, M., Morris, H.R., Haslam, S.M., Khoo, K.H., Clark, G.F., Yeung, W.S., Dell, A.: *Science* 333(6050), 1761-1764 (2011)
- 22) Gupta, S.K., Bhandari, B., Shrestha, A., Biswal, B.K., Palaniappan, C., Malhotra, S.S., Gupta, N.: *Cell Tissue Res.* 349, 665-678 (2012)
- 23) Clark, G.F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450(3), 1195-203 (2014)
- 24) Eddy, E.M., O'Brian, D.A.: *The spermatozoon. V knize: The Physiology of Reproduction, Second Edition, (Knobil, E., Neil, J.D.), Raven Press, New York,* 29-62 (1994)
- 25) <http://www.slideshare.net/gwrandall/163-ch-19lecturepresentation>; ke dni 23.4.2016
- 26) Bearer, E.L., Friend, D.S.: *J. Electron. Microsc. Tech.* 16(4), 281-297 (1990)
- 27) Dylevský, I.: *Funkční anatomie. Grada, Praha.* (2009)
- 28) Svojtka, Vašut :*Atlas anatomie. Praha.* (1996)
- 29) Guraya, S.S.: *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals.* (1987)
- 30) Kirchhoff, C., Osterhoff, C., Pera, I., Schröter, S.: *Andrologia.* 30(4-5), 225-32 (1998)
- 31) Dacheux, J.L., Belleannée, C., Guyonnet, B., Labas, V., Teixeira-Gomes, A.P., Ecroyd, H., Druart, X., Gatti, J.L., Dacheux, F.: *Syst. Biol. Reprod. Med.* 58(4), 197-210 (2012)

- 32) Robaire B., Hinton B.T., Orgebin-Crist M-C. V knize: The Physiology of Reproduction, Third Edition, (Knobil, E., Neil, J.D.), Raven Press, New York. (2006)
- 33) Maňásková-Postlerová, P., Davidová, N., Jonáková, V.: J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 879(1), 100-6 (2011)
- 34) Davidová, N., Jonáková, V., Maňásková-Postlerová, P.: Cell Tissue Res. 338(2), 303-11 (2009)
- 35) Gatti, J.L., Castella, S., Dacheux, F., Ecroyd, H., Métayer, S., Thimon, V., Dacheux, J.L.: Anim. Reprod. Sci. 82-83, 321-39 (2004)
- 36) Boué, F., Bérubé, B., De Lamirande, E., Gagnon, C., Sullivan, R.: Biol. Reprod. 51(4), 577-87 (1994)
- 37) Boué, F., Sullivan, R.: Biol. Reprod. 54(5), 1018-24 (1996)
- 38) Martin-DeLeon, P.A.: Asian J. Androl. 17(5), 720-5 (2015)
- 39) Dacheux, J.L., Castella, S., Gatti, J.L., Dacheux, F.: Theriogenology 63, 319–341 (2005)
- 40) Mann, T.: J. Reprod. Fertil. 37(1), 179-88 (1974)
- 41) Markham, C.L., Coffey, D.S.R.: The Male Sex Accessory Tissues. V knize: The Physiology of Reproduction. (Knobil, E., Neil, J.D.), Raven Press, New York, 1435-1487 (1994)
- 42) González-Cadavid, V., Martins, J.A., Moreno, F.B., Andrade, T.S., Santos, A.C., Monteiro-Moreira, A.C., Moreira, R.A., Moura, A.A.: Theriogenology 82(5), 697-707 (2014)
- 43) Töpfer-Petersen, E., Ekhlasi-Hundrieser, M., Tsoлова, M.: Int. J. Dev. Biol. 52(5-6), 717-36 (2008)
- 44) Calvete, J.J., Mann, K., Schäfer, W., Raida, M., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E.: FEBS Lett. 365(2-3), 179-82 (1995)
- 45) Liberda, J., Maňásková, P., Prelovská, L., Tichá, M., Jonáková, V.: J. Reprod. Immunol. 71(2), 112-25 (2006)
- 46) Ekhlasi-Hundrieser, M., Gohr, K., Wagner, A., Tsoлова, M., Petrunkina, A., Töpfer-Petersen, E.: Biol. Reprod. 73(3), 536-45 (2005)
- 47) Dostálová, Z., Calvete, J.J., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E.: Eur. J. Biochem. 230(1), 329-36. (1995)

- 48) Manásková, P., Liberda, J., Tichá, M., Jonáková, V.: *Folia Biol.* 46(4), 143-51 (2000)
- 49) Veselský, L., Jonáková, V., Dostál, J., Holán, V., Voburka, Z., Drahorád, J., Manásková, P., Zelezná, B.: *Am. J. Reprod. Immunol.* 44(6), 325-35 (2000)
- 50) Jonáková, V., Kraus, M., Veselský, L., Cechová, D., Bezouska, K., Tichá, M.: *J. Reprod. Fertil.* 114(1), 25-34 (1998)
- 51) Jonáková, V., Manásková, P., Kraus, M., Liberda, J., Tichá, M.: *Mol. Reprod. Dev.* 56(2), 275-7 (2000)
- 52) Bezouska, K., Sklenár, J., Novák, P., Halada, P., Havlíček, V., Kraus, M., Tichá, M., Jonáková, V.: *Protein Sci.* 8(7), 1551-6 (1999)
- 53) Kelly, V.C., Kuy, S., Palmer, D.J., Xu, Z., Davis, S.R., Cooper, G.J.: *Proteomics* 6(21), 5826-33 (2006)
- 54) Manjunath, P., Thérien, I.: *J. Reprod. Immunol.* 53(1-2), 109-19 (2002)
- 55) Aquino-Cortez, A., da Silva, L.D.M., de Araújo, A.A., de Menezes, E.S.B., Moura, A.A.N.: *Ciência Rural* 46(5), 901-908 (2016)
- 56) Chapdelaine, P., Dubé, J.Y., Frenette, G., Tremblay, R.R.: *J. Androl.* 5(3), 206-10 (1984)
- 57) Dubé, J.Y., Lazure, C., Tremblay, R.R.: *Clin. Invest. Med.* 9(1), 51-4 (1986)
- 58) Mogielnicka-Brzozowska, M., Kowalska, N., Fraser, L., Kordan, W.: *Reprod. Domest. Anim.* 50(6), 1017-21 (2015)
- 59) de Souza, F.F., Martins, M.I., dos Santos Fernandes, C.E., Ribolla, P.E., Lopes, M.D.: *Theriogenology* 66(6-7), 1606-9 (2006)
- 60) Zambelli, D., Raccagni, R., Cunto, M., Andreani, G., Isani, G.: *Theriogenology* 74(8), 1396-402 (2010)
- 61) Polisca, A., Troisi, A., Minelli, A., Bellezza, I., Fontbonne, A., Zelli, R.: *Reprod. Domest. Anim.* 50(1), 91-6 (2015)
- 62) Lilja, H., Abrahamsson, P.A., Lundwall, A.: *J. Biol. Chem.*: 264(3), 1894-900 (1989)
- 63) Lilja, H.: *J. Clin. Invest.* 76(5), 1899-903 (1985)
- 64) Rodríguez-Martínez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., Calvete, J.J.: *Am. J. Reprod. Immunol.* 66(1), 11-22 (2011)
- 65) Gilany, K., Minai-Tehrani, A., Savadi-Shiraz, E., Rezadoost, H., Lakpour, N.: *J. Reprod. Infertil.* 16(2), 61-71 (2015)

- 66) Suarez, S.S.: *Cell Tissue Res.* 363(1), 185-94 (2016)
- 67) Gwathmey, T.M., Ignatz, G.G., Suarez, S.S.: *Biol. Reprod.* 69(3), 809-15 (2003)
- 68) Srivastava, N., Jerome, A., Srivastava, S.K., Ghosh, S.K., Kumar, A.: *Anim. Reprod. Sci.* 138(1-2), 1-13 (2013)
- 69) Gadella, B.M., Tsai, P.S., Boerke, A., Brewis, I.A.: *Int. J. Dev. Biol.* 52(5-6), 473-80 (2008)
- 70) Naresh, S.: *Cryobiology* 72(1), 7-13 (2016)
- 71) Lefebvre, R., Suarez, S.S.: *Biol. Reprod.* 54(3), 575-82 (1996)
- 72) Parrish, J.J., Krogenaes, A., Susko-Parrish, J.L.: *Theriogenology* 44(6), 859-69 (1995)
- 73) Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Moore, G.D., Bailey, J.L., Ning, X., Fornes, M., Kopf, G.S.: *J. Androl.* 19(2), 242-8 (1998)
- 74) <http://www.britannica.com/science/fertilization-reproduction/images-videos/Fertilization-of-a-human-egg/66050> ke dni 23.4.2016
- 75) Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W.F., Myles, D.G., Primakoff, P.: *J. Cell Biol.* 125(5), 1157-63 (1994)
- 76) Martin-Deleon, P.A.: *Int. J. Androl.* 34(5 Pt 2), 306-18 (2011)
- 77) Martínez-Heredia, J., Estanyol, J.M., Ballescà, J.L., Oliva, R.: *Proteomics* 6(15), 4356-69 (2006)
- 78) Swegen, A., Curry, B.J., Gibb, Z., Lambourne, S.R., Smith, N.D., Aitken, R.J.: *Reproduction.* 149(3), 235-44 (2015)
- 79) Baker, M.A., Hetherington, L., Reeves, G.M., Aitken, R.J.: *Proteomics.* 8(8), 1720-30 (2008)
- 80) Lopez, L.C., Bayna, E.M., Litoff, D., Shaper, N.L., Shaper, J.H., Shur, B.D.: *J. Cell Biol.* 101(4), 1501-10 (1985)
- 81) Shur, B.D., Hall, N.G.: *J. Cell Biol.* 95(2 Pt 1), 574-9 (1982)
- 82) Shur, B.D., Hall, N.G.: *J. Cell Biol.* 95(2 Pt 1), 567-73 (1982)
- 83) Larson, J.L., Miller, D.J.: *Biol. Reprod.* 57(2), 442-53 (1997)
- 84) Cheng, A., Le, T., Palacios, M., Bookbinder, L.H., Wassarman, P.M., Suzuki, F., Bleil, J.D.: *J. Cell Biol.* 125(4), 867-78 (1994)
- 85) Kim, K.S., Cha, M.C., Gerton, G.L.: *Biol. Reprod.* 64(1), 36-43 (2001)
- 86) Kim, K.S., Gerton, G.L.: *Dev. Biol.* 264(1), 141-52 (2003)

- 87) Calvete, J.J., Carrera, E., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E.: *Biol. Chem.* 377(7-8), 521-7 (1996)
- 88) Töpfer-Petersen, E., Romero, A., Varela, P.F., Ekhlasi-Hundrieser, M., Dostálová, Z., Sanz, L., Calvete, J.J.: *Andrologia.* 30(4-5), 217-24 (1998)
- 89) Ensslin, M., Vogel, T., Calvete, J.J., Thole, H.H., Schmidtke, J., Matsuda, T., Töpfer-Petersen, E.: *Biol. Reprod.* 58(4), 1057-64 (1998)
- 90) Ensslin, M.A., Shur, B.D.: *Cell.* 114(4), 405-17 (2003)
- 91) Chiu, P.C., Chung, M.K., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., Ho, P.C., Ng, E.H., Lee, K.F., Yeung, W.S.: *J. Cell Sci.* 120(1), 33-44 (2007)
- 92) Maldera, J.A., Weigel Muñoz, M., Chirinos, M., Busso, D., G E Raffo, F., Battistone, M.A., Blaquier, J.A., Larrea, F., Cuasnicu, P.S.: *Mol. Hum. Reprod.* 20(4), 341-9 (2014)
- 93) Tulsiani, D.R., Skudlarek, M.D., Orgebin-Crist, M.C.: *Biol. Reprod.* 42(5-6), 843-58 (1990)
- 94) Zigo, M., Jonáková, V., Maňásková-Postlerová, P.: *Electrophoresis.* 32(11), 1309-18 (2011)
- 95) Kragh-Hansen, U., le Maire, M., Møller, J.V.: *Biophys. J.* 75(6), 2932-46 (1998)
- 96) Nixon, B., Bielanowicz, A., McLaughlin, E. A., Tanphaichitr, N., Ensslin, M. A., Aitken, R. J.: *J. Cell Physiol.* 218(1), 122-34 (2009)
- 97) Noland, T.D., Olson, G.E., Garbers, D.L.: *Biol. Reprod.* 29(4), 987-98 (1983)
- 98) Canvin, A. T., Buhr, M. M.: *J. Reprod. Fertil.* 85(2), 533-40 (1989)
- 99) Somanath, P.R., Gandhi, K.K.: *Small Ruminant Research* 53(1-2), 67-74 (2004)
- 100) Zhao, Y., Zhang, W., Kho, Y., Zhao, Y.: *Anal. Chem.* 76(7), 1817-23 (2004)
- 101) Zhang, L., Wang, X., Peng, X., Wei, Y., Cao, R., Liu, Z., Xiong, J., Ying, X., Chen, P., Liang, S.: *J Proteome Res.* 6(1), 34-43 (2007)
- 102) Kim, Y., Elschenbroich, S., Sharma, P., Sepiashvili, L., Gramolini, A.O., Kislinger, T.: *Methods Mol. Biol.* 748, 227-241 (2011)
- 103) Flesch, F.M., Wijnand, E., van de Lest, C.H., Colenbrander, B., van Golde, L.M., Gadella, B.M.: *Mol. Reprod. Dev.* 60(1), 107-15 (2001)
- 104) Ded, L., Dostalova, P., Dorosh, A., Dvorakova-Hortova, K., Peknicova, J.: *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13(8), 87 2010
- 105) Kitiyanant, Y., Chaisalee, B., Pavasuthipaisit, K.: *Int. J. Androl.* 25(4), 215-22 (2002)

- 106) Zigo, M., Dorosh, A., Pohlová, A., Jonáková, V., Šulc, M., Maňásková-Postlerová, P.: *Cell Tissue Res.* **359**(3), 895-908 (2015)
- 107) Laemli, U.K.: *Nature* **227**, 680-685 (1970)
- 108) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**(9), 4350-4 (1979)
- 109) Hedrick, J.L., Wardrip, N.J.: *Anal. Biochem.* **157**(1), 63-70 (1986)
- 110) Hokke, C.H., Damm, J.B., Penninkhof, B., Aitken, R.J., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.: *Eur. J. Biochem.* **221**(1), 491-512 (1994)
- 111) Zigo, M., Jonáková, V., Šulc, M., Maňásková-Postlerová, P.: *Int. J. Biol. Macromol.* **61**, 322-8 (2013)
- 112) Maňásková, P., Peknicová, J., Elzeinová, F., Tichá, M., Jonáková, V.: *J. Reprod. Immunol.* **74**(1-2), 103-13 (2007)
- 113) Maňásková-Postlerová, P., Davidová, N., Sulc, M., Philimonenko, A., Hozák, P., Jonáková, V.: *Cell Tissue Res.* **44**(2), 341-53 (2011)
- 114) Veselský, L., Peknicová, J., Cechová, D., Kraus, M., Geussová, G., Jonáková, V.: *Am. J. Reprod. Immunol.* **42**(3), 187-97 (1999)
- 115) Dostálová, Z., Calvete, J.J., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E.: *Biochim. Biophys. Acta.* **1200**(1), 48-54 (1994)
- 116) Maňásková, P., Jonáková, V.: *J. Reprod. Immunol.* **78**(1), 40-8 (2008)
- 117) Peknicova, J., Chladek, D., Hozak, P.: *Am. J. Reprod. Immunol.* **53**(1), 42-9 (2005)
- 118) Peknicova, J., Capkova, J., Geussova, G., Ivanova, M., Mollova, M.: *Theriogenology.* **56**(2), 211-23 (2001)
- 119) van Gestel, R.A., Brewis, I.A., Ashton, P.R., Brouwers, J.F., Gadella, B.M.: *Mol. Hum. Reprod.* **13**(7), 445-54 (2007)
- 120) Töpfer-Petersen, E., Calvete, J.J.: *J. Reprod. Fertil.* **50**, 55-61 (1996)
- 121) Chavrier, P., Gorvel, J.P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J., Zerial, M.: *Nature.* **353**(6346), 769-72 (1991)
- 122) Stenmark, H., Olkkonen, V.M.: *Genome Biol.* **2**(5), (2001)
- 123) Simpson, R.J., Jensen, S.S., Lim, J.W.: *Proteomics.* **8**(19), 4083-99 (2008)
- 124) Girouard, J., Frenette, G., Sullivan, R.: *Int. J. Androl.* **34**(5-2), 475-86 (2011)
- 125) Utleg, A.G., Yi, E.C., Xie, T., Shannon, P., White, J.T., Goodlett, D.R., Hood, L., Lin, B.: *Prostate.* **56**(2), 150-61 (2003)
- 126) Pereira-Leal, J.B., Seabra, M.C.: *J. Mol. Biol.* **301**(4), 1077-87 (2000)

- 127) Mountjoy, J.R., Xu, W., McLeod, D., Hyndman, D., Oko, R.: Biol. Reprod. 79(2), 223-32 (2008)
- 128) Petrunkina, A.M., Läkamp, A., Gentzel, M., Ekhlesi-Hundrieser, M., Töpfer-Petersen, E.: Reproduction. 125(3), 377-87 (2003)