

3147

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Praha 2007

Eva Hanzlíková

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

**STUDIUM VAZBY SPERMIE NA OVIDUKTÁLNÍ EPITEL
PRASNICE**

Diplomová práce

EVA HANZLÍKOVÁ

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Jiří Liberda, Ph.D.

Praha 2007

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla upřímně poděkovat RNDr. Jiřímu Liberdovi, Ph.D. za poskytnutí cenných rad, porozumění a pomoc při psaní mé diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Tomáši Drábovi za pomoc, zejména v začátcích, při seznamování s novými laboratorními technikami a Bc. Anetě Mádlové za vytváření dobré nálady při práci, oběma děkuji za cenné rady a připomínky během experimentů .

A konečně mé zvláštní poděkování patří lidem, zvláště pak rodičům, kterým vděčím za finanční a psychickou podporu, pochopení a trpělivost..

Prohlášení

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

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

V Praze dne 3.5.07.....

.....
Hana Li'ková

Podpis

1. ÚVOD	3
1.1 Pohlavní ústrojí.....	3
1.1.1 Pohlavní ústrojí prasnice	3
1.1.2. Pohlavní ústrojí kance	4
1.1.3 Fáze pohlavního cyklu prasnice	6
1.2. Pohlavní buňky	6
1.2.1 Vajíčko	6
1.2.2 Spermie.....	7
1.3 Fertilizace	8
1.3.1 Epididymální maturace spermií.....	8
1.3.2 Ejakulace	9
1.3.3 Reservoár spermií	10
1.3.4 Kapacitace a hyperaktivace	10
1.3.5 Akrosomová reakce	11
1.3.6 Oplodnění vajíčka spermií.....	12
1.4 Kančí semenná plasma (KSP)	12
1.4.1 Složení (viz. tab. 1).....	12
1.4.2 Vazebné vlastnosti proteinů kančí semenné plasmy	14
1.5. Tekutiny oviduktu	16
1.5.1 Složení oviduktálních tekutin	16
1.5.2 Interakce proteinů kančí semenné plasmy s tekutinami a epitelem oviduktu (viz tab. 3, 4, 5).....	17
1.6 Cíl práce.....	20
2. METODY A MATERIÁL	21
2.1 Biologický materiál	21
2.2 Chemikálie.....	21
2.3 Ostatní materiál	23
2.4 Separční metody	24
2.4.1 Isolace proteinů z oviduktálních tekutin.....	24
2.4.2 Rozdělení kančí semenné plasmy.....	24
2.5 Analytické metody.....	24
2.5.1 Stanovení obsahu neutrálních sacharidů dle Dubios [60]	24
2.5.2 Stanovení obsahu sialových kyselin (ferrin-orcinol assay) [61]	25
2.5.3 SDS-elektroforesa dle Laemmliho [62].....	25
2.5.5 Barvení glykoproteinů roztokem dusičnanu stříbrného	27
2.5.5 Barvení proteinů roztokem dusičnanu stříbrného.....	27
2.6 Modifikace proteinů	27
2.3.1 Hydrolytické štěpení pomocí 2 M trifluoroctové kyseliny.....	27
2.6.2 Hydrolytické štěpení pomocí 0,1 M kyselinou sírovou.....	27
2.6.3 Štěpení pomocí glykosidas	28
2.7 studium proteinových interakcí	29
2.7.1 Příprava biotinylovaných derivátů [63].....	29
2.7.2 Příprava proteinů značených FITC nebo RITC [64]	29
2.7.3 ELBA (Enzym Linked Binding Assay).....	29
2.7.4 Far Western blot [65].....	30

2.7.6 Sledování vlivu autoproteolysy oviduktální tekutiny na vazbu s kančí semennou plasmou.....	32
3. VÝSLEDKY	33
3.1 Afinitní chromatografie kančí semenné plasmy na heparinu imobilizovaném na polyakrylamidovém gelu	33
3.2 Izolace a charakterizace složek oviduktální tekutiny	34
3.3.1 SDS elektroforesa oviduktální tekutiny.....	34
3.3.2 Obsah sacharidů a sialových kyselin	35
3.3 Studium interakce oviduktální tekutiny s kančí semennou plasmou.....	36
3.3.1 Interakce elektroforeticky rozdělených složek oviduktální tekutiny se značenou semennou plasmou	36
3.3.2 Interakce značených komponent oviduktální tekutiny s kančí spermií	36
3.3.3 ELBA (Enzyme Linked Binding Assay)	39
3.3.4 Vliv modifikace komponent oviduktální tekutiny na jejich interakci s proteiny kančí semenné plasmy.....	41
3.3.4.1 Vliv kyselého hydrolysy složek oviduktální tekutiny	41
3.3.4.2 Vliv štěpení komponent oviduktální tekutiny glykosidasami	43
3.3.4.3 Vliv proteolytického štěpení složek oviduktální tekutiny	46
4. DISKUSE	47
5. SOUHRN VÝSLEDKŮ	50
6. SEZNAM ZKRATEK	51
7. SEZNAM LITERATURY	53

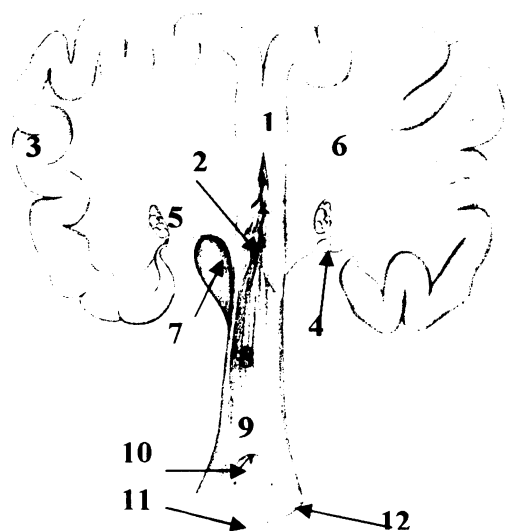
1. ÚVOD

1.1 Pohlavní ústrojí

Fertilizace je velmi důležitý proces, neboť pomáhá udržovat kontinuitu života a zabezpečuje zachování druhů. Fertilizace je výsledkem souhry mnoha po sobě jdoucích dějů. Pochopení těchto procesů nám pak umožní zabránit nebo vyřešit problémy spojené s nedostatečnou rozmnožovací schopností. Může nám také pomoci vybrat samce nejvhodnější pro chov. Jako modelový organismus bylo vybráno prasce domácí (*Sus scrofa f. domestica*).

1.1.1 Pohlavní ústrojí prasnice

Pohlavní ústrojí prasnice se skládá z pochvy (vagina – kopulační orgán), děložního hrdla (*cervix*), těla dělohy (*corpus uteri*), rohů dělohy (*cornua uterina*), vejcovodů (*oviduct*), vaječníků (*ovaria*), viz. obr. 1a. Mezi hlavní části oviduktu patří isthmická (zúžená) a ampulární část, která přiléhá k vaječнику (viz obr. 1b, str. 3). V isthmické části oviduktu dochází k tvorbě reservoáru spermií, který napomáhá ke zvýšení úspěšnosti páření (viz. kap. 1.3.3) [1]. Děložní hrdlo je místem tvorby viskózní zátky, která zabraňuje úniku semene z dělohy a zabraňuje oplodnění jiným kancem. Zátka je vytvářena sekrety Cowperových žláz kance (viz. kap. 1.1.3) [2]. Ve vaječnicích zrají vajíčka, která jsou při ovulaci uvolněna do oviduktu. V oviduktu jsou oplodněna a také se zde odehrává časný embryonální vývoj. Oplodněná vajíčka putují do dělohy, kde se uhnízdí v děložní výstelce (*endometrium*) a vyvíjí až do narození [1].

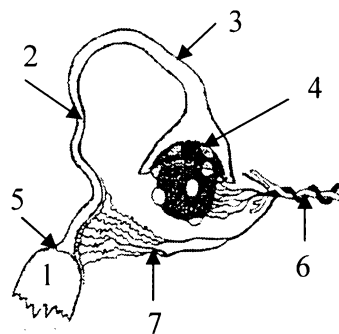


Obr. 1a [3]: Pohlavní ústrojí prasnice (vlevo)

- 1- tělo dělohy
- 2- děložní hrdlo
- 3- roh dělohy
- 4- vejcovod (oviduct)
- 5- ovarium (vaječník)
- 6- široký děložní vak
- 7- močový měchýř
- 8- vagina (pochva)
- 9- předsíň pochvy
- 10- vnější ústí močové trubice
- 11- clitoris
- 12- vulvový pysk (vulva = vstup do pochvy)

Obr. 1b [4]: Detail oviduktu (vpravo)

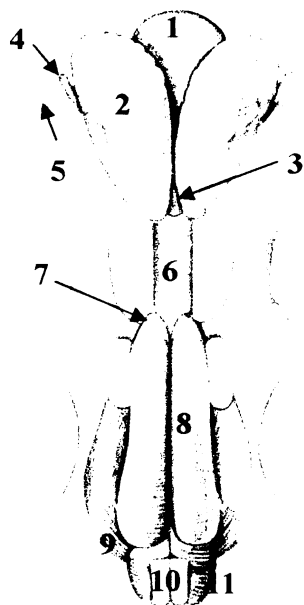
1-roh dělohy; 2- isthmus; 3- ampulla; 4- vaječník; 5- uterotubální spojení; 6- cévní zásobení oviduktu; 7-tepna uterotubálního spojení;



1.1.2. Pohlavní ústrojí kance

Pohlavními orgány kance jsou varlata (*testes*), nadvarlata (*epididymis*), chámovody (*ductus deferens*), penis (kopulační orgán) a přídatné pohlavní žlázy. Mezi přídatné pohlavní žlázy patří: prostata (předstojná žláza), semenné vaky a Cowperovy žlázy (bulbouretrální žlázy), (viz obr. 2a a 2b, str. 4). Ve varlatech se tvoří spermie a také samčí pohlavní hormony (př. testosteron). Po opuštění varlat putují spermie do epididymu, kde dozrávají při epididymální maturaci (viz kap. 1.3.1) [1]. Nadvarle se rozděluje na hlavu (*caput*), tělo (*corpus*) a ocas (*cauda*), ve kterém jsou spermie skladovány až do svého vypuzení při ejakulaci. Spermie mohou být v epididymu skladovány 1 až 2 měsíce. Při ejakulaci (viz kap. 1.3.2) jsou spermie nasávány chámovodem z *cauda epididymu* a přes pánevní část močové trubice a penis vypuzeny do pohlavního traktu samice [5].

Sekrety přídatných pohlavních žláz zvyšují objem ejakulátu a vytváří příznivé prostředí pro spermie a ovlivňují vazebné vlastnosti spermie [1]. Semenné vaky produkují většinu objemu ejakulátu. Jejich sekret obsahuje spermadehesiny (viz kap. 1.4.1), které se váží na povrch spermie během ejakulace (viz kap. 1.3.2). Sekret semenných vaků také poskytuje výživu spermii. Produkty prostaty jsou při ejakulaci vylučovány těsně před spermii a spolu s nimi. Tyto sekrety upravují reakci prostředí v močové trubici [5]. Sekrety Cowperových žláz tvoří v děložním hrdle prasnice viskózní zátku [2].

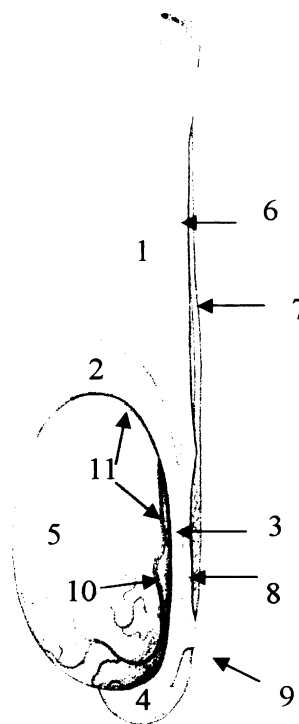


Obr. 2a [3]: Pohlavní ústrojí kance (přidatné žlázy)

- 1- močový měchýř
- 2- semenné vaky
- 3- prostata
- 4- močovod
- 5- chámovod
- 6- močová trubice
- 7- bulbouretrální žlázy
- 8- bulboglandulární sval
- 9- ischiokavernózní sval
- 10- m. bulbospongiosus
- 11- zatahovač penisu

Obr.2b [3]: pohlavní ústrojí kance

- 1- semenný provazec
- 2- hlava nadvarlete (*caput epididymidis*)
- 3- tělo nadvarlete (*corpus epididymis*)
- 4- ocas nadvarlete (*cauda epididymidis*)
- 5- varle (*testis*)
- 6- chámovod (*ductus deferens*)
- 7- proximální okruží varlete
- 8- distální okruží varlete
- 9- vaz ocasu nadvarlete
- 10- marginální část tepny varlete
- 11- varlatový vak



1.1.3 Fáze pohlavního cyklu prasnice

Pohlavní cyklus se rozděluje na 5 fází: *proestrus*, *estrus* (říje), *postestrus*, *metestrus* a *diestrus*. *Proestrus* je období zrání folikulu. Trvá 2-3 dny. Je charakterizováno růstem a zráním folikulu. Dochází ke zvýšení hladiny FSH a estradiolu v krvi a následnému zduření vulvy [1]. *Estrus* (říje) je období ochoty samice přijmout samce. Říje trvá 2-3 dny. Objevuje se mohutné překrvení dělohy a vulvy, zvyšuje se tvorba hlenu v děložním krčku a z pochvy může vytékat čirý viskózní hlen. U prasnic se vyskytuje tzv. reflex znehybnění – prasnice je v přítomnosti kance nepohyblivá. K ovulaci dochází několik hodin před skončením zevních příznaků říje a nastává nezávisle na páření (tzn. není indukována). Ovulace probíhá asynchronně, folikuly neovulují najednou, ale během 1-2 hodin (průměrně 12 folikulů) [6]. *Postestrus* představuje období rozvoje žlutého tělíska. *Mesestrus* je fáze začátku dozrávání žlutého tělíska. Navazuje na ukončení říje. Projevuje se vliv LH hormonu a vytváří se progesteron. *Diestrus* je poslední fází pohlavního cyklu. Při ní se zcela vyvine žluté tělísko a dochází k nárůstu hmoty endometria dělohy a ustupuje edém vulvy. Trvá 5-6 dní [1].

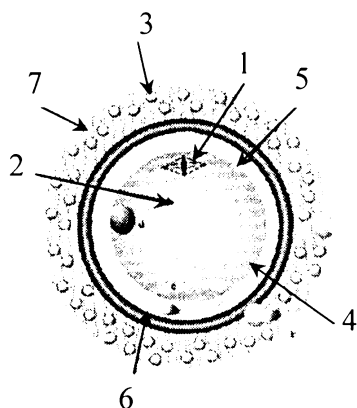
1.2. Pohlavní buňky

1.2.1 Vajíčko

Vajíčko (oocyt) je produktem samičích pohlavních orgánů a je haploidní. Je vytvářeno oogenezí ve vaječniku. Proces oogeneze začíná vytvořením oogonií z diploidních primordiálních gonocytů (2n). Oogonie prodělávají mitotické dělení za vzniku primárního oocytu (stále 2n), který začne I. meiotické dělení, ale v profázi je toto dělení zastaveno a pokračuje až po ovulaci, kdy vzniká ootida a malá pólová buňka. II. meiotické dělení se dokončí až po vniknutí spermie do vajíčka [7].

Oocyt se skládá z jádra, cytoplasmy, cytoskeletonu, organel, plasmatické membrány (*oolema*) a zony pellucidy. Vajíčko je dále obklopeno obalem zvaný *cumulus oophorus* (viz obr. 3, str 6). *Cumulus oophorus* je tvořen z kumulárních buněk a jejich matrixu, který je složen převážně z hyaluronové kyseliny. Kumulární buňky se vyvíjejí z folikulárních buněk během oogeneze vajíčka. Kumulární buňky přiléhajících k *zona pellucida* se nazývají *corona radiata* a vyživují vajíčko. *Zona pellucida* je glykoproteinový obal a prostor mezi ním a oolemou se nazývá

periviteliní prostor. *Zona pellucida*, stejně jako *cumulus oophorus*, chrání vajíčko a selektuje nezralé a morfologicky defektní spermie. Po oplození dojde k zabránění vniku dalších spermií (blok polyspermie, viz. kap. 1.3.6) a to vylitím kortikálních granulí, jejichž obsah modifikuje zonu pellucidu (ztvrdnutí). Kortikální granule jsou lokalizovány na vnitřní straně plasmatické membrány vajíčka [4].



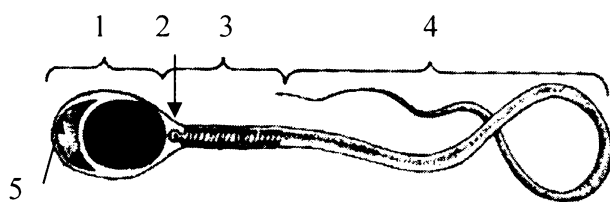
Obr. 3 [8]: Vajíčko

- 1 – jádro
- 2 – cytoplasma
- 3 – kortikální granule
- 4 - oolema (plasmatická membrána vajíčka)
- 5 – periviteliní prostor
- 6 – zona pellucida
- 7 – cumulus oophorus

1.2.2 Spermie

Spermie se tvoří v semenotvorných kanálcích ve varlatech spermatogenezí. Spermatogeneze začíná z prapohlavních buněk mitotickým dělením za vzniku diploidní spermatogonie, která se také mitoticky dělí a dává vznik primárnímu spermatocytu (diploidní; $2n$). Primární spermatocyt prodělává první meiotické dělení a vytváří se sekundární spermatocyt (haploidní), který dává vzniknout spermatidě. Ta vstupuje do procesu nazývaného spermateliosa. V tomto procesu dochází např. ke ztrátě cytoplasmy, kondenzování chromatinu, tvorbě akrosomu a bičíku a uspořádávání mitochondrií do prostoru mitochondriální spirály (viz. obr. 4a, str. 7). Po skončení spermateliozy vzniká morfologicky zralá spermie. [7].

Spermie má tyto hlavní části: hlavička, krček a bičík, viz. obr. 4a a 4b (str. 7). Hlavička obahuje jádro, kde je uložena genetická informace, cytoskeleton, malé množství cytoplasmy a akrosom. Akrosom, je specializovaná organela typická pro spermii, která se odvozuje z Golgiho aparátu. Jsou v ní uloženy hydrolytické enzymy. Bičík je orgánem pohybu spermie a můžeme ho rozdělit na tři části. První část se nazývá střední část (orig. middle piece) obsahuje mitochondrie, které se šroubovitě obtácejí okolo středu bičíku. Následuje je hlavní část a koncová část. Spojení mezi hlavičkou a bičíkem zajišťuje krček [9].

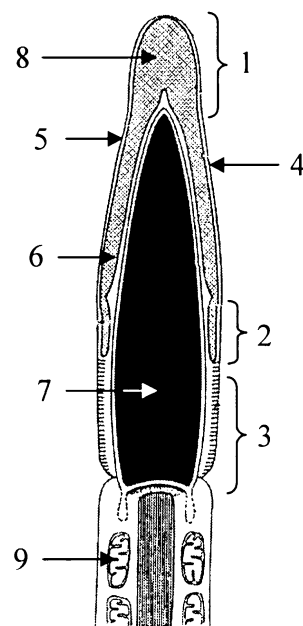


Obr. 4a (nahore) [9]: Spermie:

1- hlavička; 2- krček; 3- střední část bičíku; 4- hlavní a koncová část bičíku; 5- akrosom; 6- jádro; 7- centriola; 8- mitochondrie

Obr 4b (vpravo) [4]: Detail hlavičky spermie:

1- akrosomální čepička; 2- ekvatoriální segment; 3- postakrosomální region; 4- plasmatická membrána; 5- vnější akrosomová membrána; 6- vnitřní akrosomová membrána; 7- jádro; 8- akrosom; 9- mitochondrie (lokalizovány na bičíku)



1.3 Fertilizace

Fertilizace je děj, při kterém dochází ke splynutí samčí a samičí pohlavní buňky a vzniku zygoty a následně nového jedince [7].

1.3.1 Epididymální maturace spermií

Spermie opouštějící testes je téměř morfologicky zralá, ale není schopná oplození. Tuto schopnost získává zráním v epididymu. Epididymální maturace zahrnuje mnoho dějů týkajících se úprav membrány spermie. Dochází k fyziologickým změnám, změnám v metabolismu a k funkčním modifikacím. Mění se složení a rozmístění proteinů, lipidů a náboje [10, 11, 12].

Povrchové proteiny spermie jsou v epididymu odstraňovány, přidávány nebo maskovány a některé zůstávají nezměněny [13, 14]. Koncentrace hlavních povrchových proteinů spermie vykazuje nárůst při průchodu spermie od hlavy (*caput*) k ocasu (*cauda*) epididymis [15].

Membránové lipidy nevykazují tak výrazné změny. Největší změnu v distribuci vykazuje cholesterol, který se v testikulárních spermiiích vyskytuje pouze nad akrosómalní doménou. Naproti tomu v plasmatické membráně epididymální spermie se cholesterol vyskytuje heterogenně po celé hlavičce a bičíku [16].

Spermie nese negativní náboj. Hustota tohoto náboje (na μm^2) se mění v průběhu epididymální maturace. Spermie odebrané z vývodného kanálku z *testes* mají největší hustotu náboje, tato hustota v proximálním těle epididymu klesá, a pak mírně stoupá. Spermie z koncových oblastí epididymu vykazují hodnotu hustoty náboje významně nižší v porovnání se spermiiemi z vývodného kanálku z *testes*[12].

1.3.2 Ejakulace

Při ejakulaci se zralé spermie doposud skladované v nadvarleti vypuzují ven přes chámovod a močovou trubici do pohlavního traktu samice [7]. Ejakulaci můžeme rozdělit na tři vlny. První fáze se nazývá předspematická (pSRF = pre-sperm fraction) a obsahuje pravděpodobně produkty uretrálních žláz a prostaty. Přispívá 5-20% k celkovému objemu ejakulátu [5]. Pak následuje SRF (sperm-rich fraction), to je frakce bohatá na spermie. Tato frakce obsahuje také tekutiny epididymu, ve které byly spermie skladovány, sekrety ze semenných vaků a prostaty. Zaujímá 30-50% objemu ejakulátu. Poslední frakcí je PSRF (post-sperm rich fraction), čili frakce následující po SRF. I obsahuje spermie (v nižší koncentraci než SRF), ale skládá se hlavně ze sekretů semenných vaků (u kance mají 30% podíl na ejakulátu), prostaty a ke konci především ze sekretů Cowperových žláz. Přispívá 40-60% k celkovému objemu ejakulátu [17]. Sekrety Cowperových žláz zodpovídají za tvorbu děložní zátky v prasnici [2].

Ejakulace není pouhé vypuzení spermii, ale dochází při ní také k modifikaci membrány spermie [10, 18, 19]. Na povrch membrány se asociují spermadhesiny (viz. kap. 1.4.1), především AWN a na něj se navazují další spermadhesiny a tak vytvářejí okolo spermie ochranný obal, který chrání spermii před poškozením a nepříznivým prostředím v samici. Po doputování spermie do isthmu oviduktu hraje tento obal pravděpodobně i roli při tvorbě reservoáru spermii a to interakcemi s glykoproteiny a glykosaminoglykany (GAG) přítomných na epithelu oviduktu [20].

1.3.3 Reservoár spermií

Spermie v samičím traktu putují z místa ejakulace až do oviduktu. Zde spermie vytvoří reservoár. Význam tohoto uspořádání spočívá v udržování spermií v životaschopném a oplodnění schopném stavu až do doby ovulace, protože ne vždy dojde k páření v nejvhodnější dobu [1].

Reservoár je lokalizován v isthmu oviduktu. Spermie se sice naváží i na ampulu oviduktu, ale s postupem času zde počet spermií klesá rychleji než počet spermií v isthmu [21]. To je pravděpodobně způsobeno přítomností mukozního materiálu vázajícího spermie, který je lokalizován převážně v isthmické části oviduktu a v ostatních částech je zastoupen jen málo [21].

Spermie se do oviduktálního reservoáru váží přes akrosomovou doménu na hlavičce a váží se na apikální konce epitelálních buněk [21]. Vazba na epitelální buňky je zprostředkována pomocí sacharidových interakcí [22]. Spermie se pravděpodobně navazují na protein SBG (sperm binding glycoprotein), který je lokalizován na apikální straně membrány epitelálních buněk. Tento protein vystavuje Ga-I β (1-3)GalNAc [23]. SBG se převážně vyskytuje v horních 2/3 isthmického kanálku blízko lumenu ampule. Množství SBG v isthmu a ampule je v poměru 3:1 [24]. Na vazbě na epitel se nejvíce podílí heparin vázající spermadhesiny (viz. kap. 1.4.1), zvláště AQN 1. Tuto vazbu inhibuje mannan, hyaluronová kyselina a sialované O-glykoproteiny [22].

Navázané spermie vykazují snížený příjem vápenatých kationtů a snížení jejich cytosolické koncentrace, dále pak dochází k potlačení tyrosinové fosforylace [25, 26]. Rezervované spermie mají mnohem vyšší integritu membrány v porovnání se spermii v suspenzi [25]. Což jsou všechno děje, které směřují proti kapacitaci.

1.3.4 Kapacitace a hyperaktivace

Spermie deponované v oviduktálním reservoáru jsou při ovulaci vajíčka kapacitovány a hyperaktivovány [27]. Kapacitace je souhrn dějů a změn v metabolismu a plasmatické membráně spermie. Dochází k efluxu cholesterolu a tím k destabilizaci membrány [28]. Dochází i ke změně distribuce membránových proteinů caveolinu-1 a flotilinu-1 [28, 29]. Mění se i lokalizace jiných membránových proteinů [30, 31].

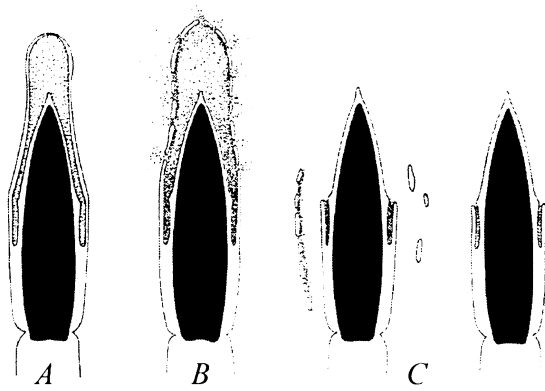
Při kapacitaci dochází ke zvýšení koncentrace cytosolického vápníku [31] a nárůstu

tyrosinové fosforylace proteinů [32]. Hyperaktivace se objevuje na závěr kapacitace a je charakterizován nárůstem rychlosti bičíku a změnou modelu pohybu bičíku [33].

1.3.5 Akrosomová reakce

Akrosomová reakce může být pravá nebo vajíčkem neindukovaná. Vajíčkem neindukovaná akrosomová reakce může spermie prodělat kdykoliv v samičím pohlavním traktu a vede ke smrti spermie. Naproti tomu pravá akrosomová reakce proběhne po navázání na *zonu pellucidu* (primární vazba) a je nezbytně nutná pro fertilizaci [4]. Je to děj, při kterém dochází ke splynutí vnější akrosomové membrány a plasmatické membrány spermie a následnému vylití obsahu akrosomu, viz obr. 5. Obsahem akrosomu jsou různé enzymy (např. akrosin, hyaluronidasa), které pomáhají spermii proniknout zónou pellucidou. [7]. Vyvolání akrosomové reakce *zonou pellucidou* není striktně druhově závislé [4].

Obr. 5 [4]: Akrosomová reakce



A – před akrosomovou reakcí (membrány jsou neporušené)

B – v průběhu akrosomové reakce (desintegrace plasmatické a vnější akrosomové membrány a vylití obsahu akrosomu)

C – po akrosomové reakci (odhalení vnitřní akrosomové membrány)

1.3.6 Oplodnění vajíčka spermii

Oplodnění je proces, při kterém dojde ke spojení samčí a samičí pohlavní buňky za vzniku zygoty [7].

Navázání spermie na *zonu pellucidu* přes plasmatickou membránu spermie se nazývá primární vazba, po které následuje akrosomová reakce. Po akrosomové reakci se na vnitřní akrosomové membráně odhalí nová vazebná místa a spermie se váže sekundární vazbou na *zonu pellucidu* [4]. Pak se pomocí hydrolytického působení akrosinu a jiných enzymů a mechanického pohybu bičíku dostane spermie k oolemě vajíčka (plasmatická membrána vajíčka), kde se uchytí pomocí receptorů typu integrinů a nejen jich. Následuje splynutí membrán a spermie se dostává do cytoplasmy vajíčka, ve které dojde k degradaci centrozomu a mitochondrií spermie. Nakonec dojde ke splynutí prvojadern spermie a vajíčka a vzniku zygoty [7].

Aby nedošlo k průniku dalších spermii do vajíčka a vzniku polyspermie, nastává sled reakcí, které se nazývají blok polyspermie. Blok polyspermie můžeme rozdělit na dva kroky. První je rychlý blok, který je vytvářen depolarizací membrány vajíčka. Druhý, pomalejší krok, je vylití kortikálních granulí do perivitellinního prostoru. Tento druhý krok způsobuje zesíťování glykoproteinů *zóny pellucidy* a tím znemožnění vstupu dalších spermii [9].

1.4 Kančí semenná plasma (KSP)

Kančí semenná plasma je produktem přídatných pohlavních žláz a to především prostaty a semenných vaků.

1.4.1 Složení (viz. tab. 1)

V kančí semenné plasmě najdeme proteiny, různé aminokyseliny, peptidy lipidy, mastné kyseliny, ionty, látky uplatňující se v imunitních reakcích (př. IgG, IGF, EGF) a další látky [17]. Proteiny jsou zastoupeny hlavně spermadhesiny a DQH proteinem (patří do rodiny proteinů s fibronektinovou doménou). Spermadhesiny jsou proteinová rodina (patří do superrodiny proteinů s CUB doménou), která je exprimována v samčím pohlavním traktu. Mezi

spermadhesiny patří proteiny AQN 1, 2; AWN 1, 2, 3; PSP I a PSP II [34, 35, 36] Tyto spermadhesiny rozdělujeme na heparin vázající frakci (H+) a heparin nevážající frakci (H-). Mezi H- spermadhesiny patří PSP-I (Mr = 14 000) a PSP-II (Mr = 14 000) [37]. A do H+ frakce řadíme spermadhesiny AQN (Mr = 12 000-16 000), AWN (Mr = 14 000-16 000), DQH protein (Mr = 13 000) a HNK protein (Mr = 14 000) [38].

Dalšími proteiny, které se v semenné plasmě vyskytují, jsou nízkomolekulární *zona pellucida* vázající proteiny [38]. To je skupina glykoproteinů o Mr 16 000-23 000, které se váží na ejakulované spermie a vykazují velkou afinitu k homologním proteinům zony pellucidy ZPGPs. Také je s nimi spojena hemaglutinační aktivita KSP [39]. Dále se zde vyskytují inhibitory motility spermií SMI-1 a SMI-2. Tyto dva inhibitory mají velmi podobnou aminokyselinovou sekvenci a rozdíl v jejich schopnosti inhibovat není významný, dokáží také inhibovat chymotripsin [40]. Inhibitor SMI-1 má identickou aminokyselinovou sekvenci jako prasečí prostatický β -mikroseminoprotein, který kompetitivně inhibuje Na^+/K^+ ATPasu z prasečího cerebrálního kortexu [41]. β -mikroseminoprotein je exprimován v sekrečních kanálcích v testes [42]. V neposlední řadě v KSP můžeme najít enzymy a to především arylsulfatasy A a B. Arylsulfatasa A je přítomna pouze v KSP, kdežto arylsulfatasa B byla detekována i v extracelulární tekutině varlat a krevním séru. Obě arylsulfatasy jsou produktem semenných vaků [43].

tab. 1 [38]: Přehled hlavních proteinů v kančí semenné plasmě jejich Mr.

frakce KSP	Protein	Mr
heparin vázající proteiny	AWN	14 000 – 16 000
	AQN	12 000 – 16 000
	DQH	13 000
	HNK	14 000
heparin nevážící proteiny	PSP I	14 000
	PSP II	14 000

1.4.2 Vazebné vlastnosti proteinů kančí semenné plasmy

Spermadhesiny se v kančí semenné plasmě vyskytují jako monomerní proteiny velmi málo. Nejčastěji je nalezneme jako agregáty [37, 44]. Heparin nevázející proteiny tvoří heterodimer PSPI/PSPII. U heparin vázejícími spermadhesiny se uskutečňují interakce mezi AQN a AWN s DQH [45].

Heterodimer PSP-I/PSP-II nevykazuje afinitu ke kyselým polysacharidům (heparin, dextran sulfát, chondroitin sulfát, fukoidan a hyaluronová kyselina), kdežto PSP-II se váže s heparinem, sulfatovaným dextranem a fukoidanem [37]. PSP-I neváže žádný z těchto kyselých polysacharidů [37.] Heterodimer, stejně jako PSP-II, váže glykoproteiny zony pellucidy [46]. PSP-I glykoproteiny zony pellucidy neváže [46]. Vazba heterodimeru PSP-I/PSP-II se pravděpodobně neúčastní interakce gamet, protože heterodimer je na povrchu spermií navázán jen slabě a je snadno odstranitelný proděláním *in vitro* kapacitace [46].

Spermadhesiny AQN 1 – 3 reagují s O-glykosidicky vázanými oligosacharidovými řetězci, ale nereagují s glykoproteiny, které obsahují pouze N-glykosidicky vázané oligosacharidy [47]. AQN 1 – 3 nereagují s jednotlivými nevázanými sacharidy ani s jejich deriváty, kyselé polysacharidy váží slabě [47]. AQN 1 vykazuje silnější vazbu s desialyzovaným mucinem ze submaxilárních býčích žláz (přítomnost jen O-vázaných oligosacharidů) [47]. DQH protein se od AQN proteinů výrazně liší. Má mnohem vyšší aglutinační aktivitu lidských erytrocytů, silněji reaguje s kyselými polysacharidy a sialyzovanými glykoproteiny [47]. Nereaguje s desialyzovanými glykoproteiny, s animocukry a s N-acetylgalaktosaminem vázaný na protein přes serin. Ale stejně jako AQN spermadhesiny nereaguje s jednoduchými sacharidy [47].

AQN 1 a 3 váží glykoproteiny obsahující oligosacharidy Gal α (1-4)GlcNAc a Gal β (1-3)Gal β NAc [48]. 5-N-acetylneuraminová kyselina vázaná α (2-3/6) na galaktosové zbytky snižuje afinitu vazby glykosylovaných ligandů k AQN 1, ale nemá vliv na vazbu k AQN 3 [48]. AQN 3 preferenčně váže glykoproteiny buď s lineárními nebo tri- a tetra-antenárními N-acetylglukosaminovými zbytky než diantenární [48]. Oba spermadhesiny, AQN 1 a 3, váží glykoproteiny zony *pellucidy* [48].

Spermadhesin AWN 1 váže proteiny obsahující O-vázaný oligosacharid NeuAc α (2-3/6)Gal β (1-3)GalNAc [49]. Váže také NeuAc α (2-3/6)Gal β (1-4)GlcNAc v N-vázané triantenární

oligosacharidové struktury fetuinu, ale stejnou strukturu v diantenárním uspořádání neváže [49]. AWN 1 vykazuje vyšší afinitu ke glykoproteinům s O-vázanými oligosacharidy než s proteiny s N-vázanými [49]. Odstranění koncových sialových kyselin snižuje vazbu glykoproteinů k AWN 1. AWN 1 váže glykoproteiny zony *pellucida*, ale váže je silněji než AQN 1 a 3 [49].

Tab. 2 [50]: Interakce DQH proteinu a spermadhesinů a jejich agregátů s kyselými polysacharidy, s fosforylcholinem a zónou *Pellucidou*. (Fr. I = DQH, AQN 1-3, AWN 1,2, PSP I a II; Fr. II = DQH, AQN 2,3, AWN 1,2; Fr. III = DQH, AQN 2,3, AWN 1; Fr. IV = PSP I, PSP II; Fr. V = AQN 1, SPI (seminální proteinásový inhibitor), X (ne zcela identifikovaný protein). Počet (+) vyjadřuje relativní vazebnou aktivitu.

Protein	Heparin	Dextran sulfát	Chondroitin sulfát	Fucoidan	Hyaluronová kyselina	Zona <i>Pellucida</i>	Fosforylcholin
DQH	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
AQN1	+	+	+	+	+	++	+
AQN2	+	+	+	+	+	++	-
AQN3	+	+	+	+	+	++	++
AWN1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
AWN2	++	++	++	++	++	++	+++
PSP I	-	(+)	-	-	-	-	-
PSP II	++	+++	(+)	+++	-	(+)	+
Fr. I	+++	++	+++	++	++	++	++
Fr. II	++	++	+++	++	+	+	++
Fr. III	++	+	+++	+	+	+	++
Fr. IV	-	-	-	-	-	-	-
Fr. V	+	+	++	+	+++	++	+

1.5. Tekutiny oviduktu

1.5.1 Složení oviduktálních tekutin

O složení oviduktálních tekutin není příliš známo. Není ani příliš prozkoumána funkce již identifikovaných proteinů. Důvodem je složitější získávání těchto tekutin (oproti semenné plasmě), které se navíc ještě liší jak individuálně, tak zde hraje i roli fáze pohlavního cyklu prasnice.

Oviduktální tekutiny jsou vytvářeny sekrečními epiteliálními buňkami oviduktu. Tvorba a složení těchto tekutin se liší v závislosti na fázi říje a nejvyšší sekrece se objevuje při ovulaci vajíčka [6]. Sekrece specifických proteinů je také ovlivněna přítomností gamet. Odezva oviduktálního epitelu je jiná v přítomnosti spermie a jiná v přítomnosti vajíčka [51]. Funkce tekutin oviduktu závisí na jejím složení. Najdeme zde ionty, aminokyseliny, výživné látky, proteiny, glykoproteiny, enzymy a další [1, 6].

V oviduktální tekutině v porovnání s krevní plasmou najdeme nižší koncentraci glukosy a vyšší koncentraci laktátu a pyruvátu [52]. Koncentrace těchto látek se liší v závislosti na říji a lokalitě oviduktu. Koncentrace glukosy v ampule oviduktu je vyšší u prasnic v pre-ovulační fázi než u prasnic po páření [52]. V ampula-isthmickém spojení je koncentrace glukosy výrazně vyšší u prasnic pre-ovulační fázi než u ostatních skupin [52]. Koncentrace laktátu je v ampulární oblasti oviduktu vyšší u prasnic po páření než u prasnic v téže oblasti v pre-ovulační fázi [52]. Tyto poklesy a nárůsty koncentrací nejsou spojeny s lokálním vlivem vaječníku nebo s přítomností embrya. Koncentrace glukosy, laktátu a pyruvátu jsou pravděpodobně regulovány systémovými mechanismy [53].

V oviduktální tekutině nalezneme IGF-I a IGF-II (Insuline-like Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), prostaglandiny F2 α , E1 a E2. Jejich koncentrace je také závislá na fázi říje a nejvyšší je při ovulaci [54, 55, 56]. EGF se vyskytuje na apikálním okraji epiteliálních buněk, jeho receptor je umístěn v plasmatické membráně epiteliálních buněk. EGF má v oviduktu pravděpodobně autokrinní/parakrinní roli [56].

V oviduktu se nachází hyaluronan, který je lokalizován v intraluminální tekutině a na povrchu epiteliálních buněk v místě tvorby reservoáru spermií [57]. Receptor pro hyaluronan (CD44) je exprimován v závislosti na fázi říje [57]. Více je exprimován v preovulační fázi než po ovulaci, hlavně v uterotubálním spojení [57]. Rozdíl je také u inseminovaných prasnic

v porovnání s prasnicemi bez inseminace [57]. Inseminované prasnice vykazují nižší expresi CD44, a to jak v uterotubálním spojení tak i v ampulo-isthmickém spojení [57].

Na apikální straně membrány epitelálních buněk oviduktu je lokalizován protein SBG (sperm binding glycoprotein), přes který se pravděpodobně spermie navazují na ovidukt [23]. Tento protein vystavuje Gal β (1-3)GalNAc. SBG se převážně vyskytuje v horních 2/3 isthmického kanálku blízko lumenu ampuly. Množství SBG v isthmu a ampule je v poměru 3:1 [23].

Oviduktální tekutiny vykazují proteasovou aktivitu. Byla prokázána aktivita serinových proteas a metaloproteas [58].

1.5.2 Interakce proteinů kančí semenné plasmy s tekutinami a epitelem oviduktu (viz tab. 3, 4, 5)

Ačkoliv otázkou fertilizace se věda zabývá již poměrně dlouhou dobu a jsou dobře charakterizovány proteiny kančí semenné plasmy a jejich vazebné vlastnosti s různými polysacharidy a glykoproteidy, tak problematika interakce KSP s oviduktálními tekutinami a epitelem oviduktu se teprve začíná prozkoumávat.

Heparin vázající proteiny (AQN, AWN, DQH) a jejich agregáty mají vyšší afinitu k epitelu oviduktu než heparin nevážající frakce (PSP-I, PSP-II) a jejich agregát PSPI/II [59]. Ale tato vazba je snadněji inhibována tekutinami oviduktu [58]. Vazbu H⁺ na epitel oviduktu také inhibuje D-galaktosa (-17%) a BSM = mucin z podčelistních žláz býka (jako model O-vázaných sacharidových strukturní) (-40%) [58]. Spermadhesin AWN váže nejsilněji z H⁺ proteinů buňky oviduktu (a také oviduktální tekutiny) [59]. AQN I a frakce II (agregované formy H⁺ proteinů; AQN, AWN, DQH) se váže na apikální glykokalyx ampuly, isthmu a uterotubálního spojení oviduktu. Váže se na manosylové komponenty oviduktu [59].

Vazba H⁺ frakce KSP na oviduktální tekutiny je slabší v porovnání s vazbou na epitel (viz tab. 3). Tuto vazbu inhibují stejné sloučeniny jako vazbu na epitel (D-galaktosa (-15%), BSM (-30%)) a navíc D-manosa (-20%) [58]. Sulfatované polysacharidy nemají významný inhibiční vliv (viz tab. 4) [59].

H⁻ frakce KSP má vyšší afinitu k buňkám než k tekutinám oviduktu. Tekutiny oviduktu je schopen vázat jen PSP-II. Interakci H⁻ s oviduktálními tekutinami inhibuje D-Man (-30%), L-Fuc (-15%), mannan (-20%), k. hyaluronová (-40%), BSM (-60%), fetuin (-35%) [58]. Ty samé látky

také inhibují vazbu H- na epitel oviduktu, jen se liší síla ovlivnění: D-Man (-20%), L-Fuc (-15%), mannan (-20%), k. hyaluronová (-60%), BSM (-55%), fetuin (-20%) (viz tab. 5) [58].

Obě frakce kančí semenné plasmy (H+ i H-) v oviduktálních tekutinách reagují především s glykoproteiny [58].

Pokusy s lektiny WGA (afinita k N-acetyl β (1-4)glukosamin) a Con A (afinita k α -D-glukose a α -manopyranosidům) ukázaly, že se váží hlavně na epitel oviduktu, tekutiny prakticky nevázaly. Přičemž Con A vykazoval silnější vazbu než WGA [58].

tab. 3 [59]: Vazebná aktivita epitelu a tekutin oviduktu s H+ a H- frakcí KSP. Počet (+) vyjadřuje relativní vazebnou aktivitu.

frakce	oviduktální epitel	oviduktální tekutina
H+	++++	+++
H-	++	+

tab. 4 [59]: Inhibice interakce H+ frakce KSP s epitelem a tekutinami oviduktu. ^a - inhibice vyjádřená v % vazebné aktivity v přítomnosti inhibitoru.

inhibitor	epiteliální buňky (%) ^a	oviduktální tekutina (%) ^a
D-manosa	95	90
D-glukosa	100	100
D-galaktosa	85	90
N-acetyl.D-galaktosamin	100	95
L-fukosa	98	100
mannan	62	65
PSM	55	55
BSM	53	55
Fetuin	80	82
Ovalbumin	100	100

tab 5 [58]: *Inhibice interakce H- frakce KSP s epitelem a tekutinami oviduktu. ^a - inhibice vyjádřená v % vazebné aktivity v přítomnosti inhibitoru.*

inhibitor	epiteliační buňky (%)^a	ovidukální tekutina (%)^a
D-manosa	60	80
L-fukosa	75	75
mannan	80	80
hyaluronová kyselina	60	60
BSM	40	45
fetuin	65	80

1.6 Cíl práce

Tvorba reservoáru spermií v istmické části oviduktu je jedním z klíčových kroků fertilizace. Na tomto procesu participují povrchové proteiny spermie a povrchové proteiny epiteliálních buněk oviduktu spolu s proteiny oviduktálních tekutin. Identifikací molekul účastnících se této interakce bychom mohli tento děj snadno podpořit nebo inhibovat.

- Stanovit obsah neutrálních sacharidů a sialových kyselin v proteinech oviduktálních tekutin.
- Potvrdit závislost interakce spermie a ovidukt na sacharidových částech glykoproteinů oviduktu pomocí enzymatických deglykosylací POT.
- Určit, které sacharidy se nejvíce podílejí na vazbě proteinů oviduktálních tekutin s proteiny kančí semenné plasmy.
- Lokalizovat místo vazby proteinů oviduktálních tekutin na povrch spermie pomocí fluorescenčně mikroskopických technik.
- Sledovat stabilitu proteinů oviduktálních tekutin a vliv autolysy POT na vazbu s kančí semennou plasmou.

2. METODY A MATERIÁL

MATERIÁL

2.1 Biologický materiál

Urogenitální trakty prasnic byly získány na jatkách v Písku a v Českém Brodě. Byly použity čerstvé.

Frakce heparin-vázajících (H+) a heparin-nevázajících (H-) proteinů kančí semenné plasmy byly izolovány na katedře biochemie PřF UK (viz kap. 2.4.2).

2.2 Chemikálie

N-acetylneuraminová kyselina	- Sevac, Praha, ČR
Akrylamid	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Křenová peroxidasa zanečená avidinem	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Bromfenolová modř	- Lachema, Brno, ČR
Bovine Serum Albumin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Bovine Submaxillary Mucin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	- Serva, Heidelberg, Německo
3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid	- ICN Biochemicals, Cleveland, Ohio
Dihydrogenfosforečnan sodný	- Lachema, Brno, ČR
N,N-dimethylformamid	- Lachema, Brno, ČR
Dodecylsulfát sodný	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Dusičnan stříbrný	- Lachema, Brno, ČR
Emulsin	- dar (Prof. RNDr. G. Entlicher, CSc.)
Ethylenglykol	- Lachema, Brno, ČR
Fenol	- Biedel-De Haën AG, Seezle-Hannover, Německo
Fetuin	- Sevac, Praha, ČR
Formaldehyd	- Lachema, Brno, ČR
α -L-Fukosidasa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
α -Galaktosidasa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

β -Galaktosidasa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
D-glukosa	- Lachema, Brno, ČR
β -Glukosidasa	- Koch-light laboratories Ltd., Colnbrook, England
Glutaraldehyd	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Glycerol	- Lachema, Brno, ČR
Glycin	- Reanal, Budapešť, Maďarsko
Heparin	- Léčiva, Praha, ČR
Hydrogenfosforečnan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Hydrogenuhličitan amonný	- Lachema, Brno, ČR
Hydrogenuhličitan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Hydrolyzovaný vepřový protein	- dar (Zemědělské zásobování a nákup, Praha)
4-chlor-1-naftol	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Chlorid sodný	- Lachema, Brno, ČR
Chlorid vápenatý	- Fluka, Buchs, Švýcarsko
chlorid železitý	- Lachema, Brno, ČR
Kasein dle Hammersteina	- Reanal, Budapešť, Maďarsko
Kyselina ethylendiamintetraoctová	- Serva, Heidelberg, Německo
Kyselina jodistá	- Feinchemie, Sebnitz, Německo
Kyselina octová	- Lachema, Brno, ČR
Kyselina sírová	- Penta, Chrudim, ČR
Lidský albumin	- dar (RNDr. Věra Jonáková, DrSc.)
Lysozym (kopolymer) – standard pro SDS-ELFO	- dar (praktika biochemie PřF UK)
Merkaptoethanol	- Loba Chemie, Fishamend, Rakousko
Methanol	- Lachema, Brno, ČR
3-methylalkohol-isoamylalkohol	- Lachema, Brno, ČR
N,N'-metylen-bisakrylamid	- Serva, Heidelberg, Německo
α -methylmannopyranosid	- Lachema, Brno, ČR
močovina	- Lachema, Brno, ČR

Neuraminidasa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
N-hydroxysukcinimidobiotin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Octan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Orcinol (5-methylsorcinol)	- Lachema, Brno, ČR
Ovalbumin	- dar (praktika biochemie PřF UK)
Perboritan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Persíran amonný	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Ponceau RR	- Loba Feinchemie, Fishamend, Rakousko
Porcine submaxillary mucin	- dar
Rhodamin B isothiokynat	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Rybí želatina	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Sušené mléko	- dar
Trifluoroctová kyselina	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Trichloroctová kyselina	- Lachema, Brno, ČR
N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin	- Serva, Heidelberg, Německo
Thiosíran sodný	- Lachema, Brno, ČR
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	- Serva, Heidelberg, Německo
Triton X-100	- Serva, Heidelberg, Německo
Tween 20	- Serva, Heidelberg, Německo
Uhlíčan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Vepřová želatina	- dar (Zemědělské zásobování a nákup, Praha)

2.3 Ostatní materiál

Mikrotitrační polystyrénové destičky pro ELBA testy (F16 MAXISORP LOOSE)	- NUNC, Dánsko
Nitrocelulózová membrána (Hybond [®])	- Amersham, UK

METODY

2.4 Separační metody

2.4.1 Isolace proteinů z oviduktálních tekutin

Z urogenitálního traktu prasnice byly nůžkami odděleny ovidukty od rohu dělohy a vaječníku. Každý z oddělených oviduktů byl dvakrát promyt 0,2 M NH_4HCO_3 pomocí injekční stříkačky a tekutina byla jímána do kádinky. Proteiny získané z 6 párů oviduktů byly zamrazeny a lyofilizovány.

2.4.2 Rozdělení kančí semenné plasmy

Kančí semenná plasma byla izolována na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství (VÚVeL) v Brně.

Kančí semenná plasma byla rozdělena pomocí afinitní chromatografie, která byla provedena na koloně s imobilizovaným heparinem na polyakrylamidovém gelu (kolona byla připravena na PřF UK). Kolona byla ekvilibrována 100 ml 0,2 M NH_4HCO_3 . Poté bylo nanášeno 10 ml vzorku KSP v koncentraci 5 mg/ml pufru. Průtoková rychlost byla 1 ml/min. Jímané frakce byly proměřeny při 280 nm. Frakce s absorpance vyšší než 0,1 byly slity. Takto se získala H- frakce KSP. Poté byla kolona promyta 3 M NaCl a eluát byl opět proměřen při 280 nm. Takto se získala H+ frakce KSP. Obě frakce byly dialyzovány proti destilované vodě a pak lyofilizovány.

2.5 Analytické metody

2.5.1 Stanovení obsahu neutrálních sacharidů dle Dubios [60]

- Ke vzorku rozpuštěném v destilované vodě v koncentraci 1 mg/ml byl přidán z dávkovací lahve 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové.
- Směs byla okamžitě protřepána a ponechána stát 30 minut při laboratorní teplotě.
- Na spektrofotometru He λ ios γ (Thermo, Electron Corporation, UK) byla změřena absorpance při 490 nm proti kontrole (destilovaná voda s reakčními činidly).
- Ke kalibraci byl použit vodný roztok D-glukosy.

2.5.2 Stanovení obsahu sialových kyselin (ferrin-orcinol assay) [61]

- POT byly rozpuštěny v destilované vodě v koncentraci 1 a 2 mg/ml.
- 150 μ l vzorku bylo napipetováno do skleněné zkumavky a k němu přidáno 50 μ l destilované vody a 200 μ l Bial reagent (0,2 g orcinolu (5-methylresorcinol); 81,4 ml konc. HCl; 2 ml 1% FeCl₃; doplněno destilovanou vodou do 100 ml)
- Směs byla zamíchána na vortexu a zahřáta na 100 °C po dobu 15 min.
- Po zchlazení reakční směsi na pokojovou teplotu byl přidán 1 ml 3-methylpropanol, zamícháno na vortexu a ponecháno 5 min v ledové lázni (T = 0°C).
- Následovala centrifugace 3 min při 500 g. Pro měření byla použita horní fáze 3-methylpropanolu.
- Na spektrofotometru Heλios γ (Thermo, Electron Corporation, UK) byla změřena absorbance při 570 nm proti kontrole (destilovaná voda s reakčními činidly).
- Ke kalibraci byl použit roztok N-acetylneuraminové kyseliny.

2.5.3 SDS-elektroforesa dle Laemmliho [62]

- Pro dělení proteinů tekutin oviduktu a H⁺, H⁻ frakce kančí semenné plasmy byl použit 15% polyakrylamidový separační gel.
- Příprava 15% separačního gelu: 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl pufru o pH 8,8 + 2,5 ml H₂O + 5,0 ml roztoku Bis/AA (29,2% akrylamid a 0,8 % BIS) + 100 μ l 10% SDS. Těsně před aplikací byl přidán TEMED (4,5 μ l) a 10% APS (35 μ l). Ponecháno polymerovat 1 hodinu při laboratorní teplotě.
- Příprava 4% zaostřovacího gelu: 625 μ l 0,5 M Tris/HCl pufru o pH 6,8 + 1520 μ l H₂O + 325 μ l roztoku Bis/AA (29,2% akrylamid a 0,8% BIS) + 25 μ l 10% SDS. Těsně před použitím byl přidán TEMED (3,8 μ l) a 10% APS (35 μ l). Ponecháno 15 minut polymerovat při laboratorní teplotě.
- Byly připraveny vzorky pro elektroforesu v koncentraci 1 mg/ml (čistý protein) nebo 10 mg/ml (směs proteinů) neredukujícího vzorkového pufru (0,063 M Tris/HCl, pH 6,8 s 10% glycerolem, 2% SDS a 0,0013% bromfenolovou modří). Vzorky byly 5 minut inkubovány ve vroucí vodní lázni. Pro odhad molekulových hmotností rozdělených proteinů byl použit kopolymer lysozymu.

- Byla sestavena aparatura pro elektroforesu Mini-Protean[®] III, Electrophoresis Cell od firmy Bio-Rad. Do katodového i anodového prostoru byl nalit stejný elektrodový pufr (0,025 M Tris, 0,192 M glycin a 0,1% SDS, pH 8,3). Po odstranění hřebenů byly do jamek nanášeny vzorky pomocí mikrostříkačky. Objem nanášených vzorků byl 10-20 μ l.
- Jako zdroj napětí byl použit přístroj Electrophoresis Constant Power Supply 3000/150 firmy Pharmacia. Elektroforesa probíhala zpočátku při napětí 70 V (20 min.), po překročení rozhraní gelů bylo nastaveno napětí na 130 V (80 min.).
- Po skončení elektroforesy byly gely barveny přes noc v roztoku barviva Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 (0,5 g CBB R-250 + 450 ml methanolu + 100 ml kyseliny octové + 450 ml H₂O). Poté byly odbarveny v odbarvovacím roztoku (250 ml methanolu + 100 ml kyseliny octové + 650 ml H₂O). Nakonec byly gely opláchnuty destilovanou vodou a zataveny v celofánu.

2.5.4 Barvení glykoproteinů roztokem dusičnanu stříbrného

- Byla provedena SDS-elektroforesa proteinů tekutin oviduktu podle Laemmliho (viz. kap. 2.5.3).
- Po oddělení zaostřovacího gelu, byl separační gel dán na 30 min do fixačního roztoku (20% CCl₃COOH).
- Poté na 30 min. do 1% kyseliny jodisté.
- Následovalo promytí v roztoku ethanol-voda (3:10).
- Ponoření gelu do senzitivujícího roztoku (0,02% Na₂ S₂O₃) na 2 min.
- Následovalo krátké promytí v destilované vodě.
- 60 min trvalo barvení gelu (0,2% AgNO₃; 0,05% formaldehyd).
- Pak byl gel opět rychle promyt v destilované vodě.
- Nalít vyvíjecí roztok (6% Na₂CO₃; 0,0004% Na₂S₂O₃; 0,0005% formaldehyd), který byl dvakrát vyměněn.
- Vyvíjení bylo ukončeno 10% kyselinou octovou dříve, než se začal obarvovat kopolymer lysozymu.

2.5.: Barvení koproteinů roztokem dusičnanu stříbrného

- Byla provedena SDS-elektroforesa proteinů tekutin oviduktu podle Laemmliho (viz. kap. 2.5.3).
- Po oddělení zaostřovacího gelu, byl separační gel dán přes noc do fixačního roztoku (50% ethanol + 12% kyseliny octové + 0,05% formaldehyd).
- Následovalo promytí 3x 5min v 20% ethanolu.
- Ponoření gelu do senzitivizujícího roztoku (0,02% Na₂ S₂O₃) na 2 min.
- Promytí destilovanou vodou (1 min.).
- 20 min trvalo barvení gelu (0,2% AgNO₃; 0,05% formaldehyd).
- Pak byl gel rychle promyt v destilované vodě.
- Nalit vyvíjecí roztok (6% Na₂CO₃; 0,0004% Na₂S₂O₃; 0,0005% formaldehyd), který byl dvakrát vyměněn.
- Vyvíjení bylo zastaveno 10% roztokem kyseliny octové.

2.6 Modifikace proteinů

2.6.1 Hydrolytické štěpení pomocí 2 M trifluoroctové kyseliny

- Proteiny oviduktálních tekutin byly rozpuštěny v 2 M trifluoroctové kyselině v koncentraci 1,5 mg/ml.
- Směs se vařila 1 hod na vodní lázni.
- Po zchlazení byla směs zneutralizována octanem sodným (výsledná koncentrace byla 2 M).
- Nakonec byla přidána močovina, tak aby její výsledná koncentrace byla 6 M.
- Následovala dialýza proti destilované vodě a poté lyofilizovány.

2.6.2 Hydrolytické štěpení pomocí 0,1 M kyseliny sírové

- Vzorek byl rozpuštěn v 0,1 M kyselině sírové v koncentraci 2 mg/ml.
- Směs byla 1 hod zahřívána na 80 °C.
- Pak byla zneutralizována octanem sodným (do koncentrace 4 M). Nakonec byla přidána

močovina (do koncentrace 6 M).

- Takto upravený vzorek byl dialyzován proti destilované vodě a lyofilizován.

2.6.3 Štěpení pomocí glykosidas

- Pro enzymatické deglykosylace proteinů oviduktálních tekutin byly použity tyto enzymy: emulsin, α -L-fukosidasa, α -galaktosidasa, β -galaktosidasa, β -glukosidasa, neuraminidasa, PNGgasa F.
- Biotinylované proteiny oviduktálních tekutin byly rozpuštěny v reakčním pufru v koncentraci 1 mg/ml (viz tab. 6).
- Pak byl přidán inhibitor serinových proteas (3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid), popř. metaloproteas (EDTA), tak aby výsledná koncentrace každého inhibitoru byla 10 mM.
- K této směsi byl přidán enzym (výsledná koncentrace, popř. aktivita: emulsin 2 μ g/ml, α -L-fukosidasa 1 mU/ml, α -galaktosidasa 10 mU/ml, β -galaktosidasa 0,3 U/ml, β -glukosidasa 2 μ g/ml, neuraminidasa 5 mU/ml, PNGgasa F 1 U/ml)
- Roztok byl inkubován při 37 °C. Byly odebírány vzorky po 100 μ l v časových intervalech po 12, 16, 20, 24 a 36 hod pro α -L-fukosidasu, β - a α -galaktosidasu, neuraminidasu, PNGasu F; 48, 60, 72, a 96 hod pro emulsin a β -glukosidasu).
- Enzymatická reakce byla zastavena povařením po dobu 5 min na 100 °C.
- Odebrané a považené vzorky byly 10x naředěny PBS a použity pro ELBA metodu.

ENZYM	PUFR (všechny 0,05 M)
Emulsin	acetátový, pH = 5,0
α -L-fukosidasa	acetátový, pH = 5,8
α -galaktosidasa	fosfátový, pH = 6,5
β -galaktosidasa	acetátový, pH = 5,8
β -glukosidasa	acetátový, pH = 5,0
neuraminidasa	acetátový, pH = 5,0
PNGasa F	fosfátový, pH = 7,5

2.7 studium proteinových interakcí

2.7.1 Příprava biotinylovaných derivátů [63]

- Proteiny oviduktálních tekutin a jejich desialyzované a deglykosylované deriváty a H+, H- frakce KSP byly rozpuštěny v 0,5 M NaHCO₃ v koncentraci 10 mg/1ml.
- Tento roztok byl smíchán z roztokem NHS-bitinu v DMF (konc. 40 mg/1ml).
- Směs se nechala 30 min jemně třepat na třepačce, pak se dala dialyzovat proti destilované vodě a zlyofilizovat.

2.7.2 Příprava proteinů značených FITC nebo RITC [64]

- Proteiny oviduktálních tekutin, nerozdělená kančí semenná plasma byla rozpuštěna v bikarbonátovém pufru o pH = 8,5 v koncentraci 6 mg/ml pufru.
- Pak byl přidán 200 µl roztoku FITC nebo RITC (FITC: 12,5 mg FITC/RITC + 0,625 ml DMF + 5,00 ml ethylenglykol)
- Směs byla mírně třepána 1 hod na třepačce v v chladnu a temnu.
- Postupně bylo přidáno 3x 200 µl roztoku FITC nebo RITC (celkový objem přidaného roztoku bylo 800 µl)
- Proteiny byly dialyzovány nejdříve proti velkému objemu destilované vody a ½ lžičkou aktivního uhlí, pak proti destilované vodě a lyofilizovány.

2.7.3 ELBA (Enzym Linked Binding Assay)

- ELBA metoda byla provedena na mikrotitračních polystyrenových destičkách (NUNC, Dánsko).
- Nejdříve byla destička aktivována 1% BSA v PBS po dobu 1 hod při laboratorní teplotě (aplikováno 100 µl/jamku). Destička byla jemně třepána. Pak byla promývána PBS (3x 200 µl/jamku).
- Poté se na destičku nanese 1% roztok glutaraldehydu v destilované vodě (100 µl/jamku).

Opět byla jemně třepána při pokojové teplotě.

- Následovalo promývání destilovanou vodou (200 μ l/jamku) po dobu 2 hod (voda 4x vyměněna).
- Po promytí se na destičku nanese nebiotinylovaný roztok proteinu o koncentraci 1 mg/ml (100 μ l/jamku). Destička byla nechána v ledničce přes noc. Promyta 0,1 % TWEENem v PBS (3x 200 μ l/jamku).
- Desaktivace volných míst na destičce 1% BSA v PBS (100 μ l/jamku) po dobu 1 hod. V případě optimalizace metody ELBA byla desaktivace vynechána. Následovalo promytí 0,1 % TWEENem v PBS (3x 200 μ l/jamku).
- Poté byl nanesen roztok biotinylovaného proteinu o koncentraci 0,1 mg/ml (100 μ l/jamku). Destička byla nechána 1 hod na třepačce. Promyta 0,1 % TWEENem v PBS (3x 200 μ l/jamku).
- Po dobu 1 hod byla destička inkubována s roztokem avidin-HPR o koncentraci 0,25 μ g/ml PBS (100 μ l/jamku). Promyta 0,1 % TWEENem v PBS (3x 200 μ l/jamku).
- Nakonec byl na destičku nanesen substrát pro avidin-HPR.
- Výsledek byl naměřen na čtečce SUNRISE (TECAN, Rakousko) při 405 nm.

Použité roztoky:

substrát peroxidasy: 1 mg ABTS v 10 ml 0,1M citrát-fosfátového pufru pH 4,6, do něhož je těsně před použitím přidáno 10 mg perboritanu sodného

PBS: 9 g NaCl + 1,2 g Na₂HPO₄.12H₂O + 0,2 g NaH₂PO₄.2H₂O do 1000 ml H₂O

2.7.4 Far Western blot [65]

Přenos proteinů na NC-membránu

- Byla provedena SDS-elektroforeza dle Laemmliho (viz. kap. 2.5.3) proteinů oviduktálních tekutin a jejich derivátů nebo H⁺ a H⁻ frakce KSP. Zaostřovací gel byl oddělen.
- NC- membrána a polyakrylamidový gel byly na 10 min ekvilibrovány do přenosového pufru (0,025 M Tris; 0,192 M glycin; 20% methanol, pH 8,2).

- Gel byl uložen spolu s jednou NC-membránou do kazety mezi tři vrstvy filtračních papírů Whatman a dvě houby z obou stran. Kazeta byla vložena do přístroje pro elektropřenos firmy Bio-Rad spolu s chladícím blokem (ledová tříšť) a přístroj byl naplněn přenosovým pufrům.
- Elektrody byly připojeny k pólům zdroje Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150 od firmy Pharmacia. Elektropřenos probíhal přes noc při 50 mA.
- Kontrola přenosu proteinů na membránu byla provedena barvením v 0,5% Ponceau v 1% kyselině octové, pozadí bylo odbarveno opakovaným promýváním membrány destilovanou vodou. Membrána použitá k dalším studiím nebo byla vysušena mezi listy filtračního papíru a uskladněna při -20°C .

Vazba separovaných H⁺ nebo H⁻ proteinů na proteiny oviduktálních tekutin a jejich derivátů přenesených na NC-membránu

- Byly připraveny biotinylované proteiny oviduktálních tekutina a jejich derivátů, H⁺ a H⁻ frakce KSP (viz kap. 2.7.1).
- Membrána byla navlhčena v promývacím roztoku (0,1% TWEEN v PBS).
- Volná místa na membráně byla deaktivována 1% roztokem BSA v PBS za stálého třepání po dobu 1 hodin.
- Membrána byla promyta 0,1% TWEENem v PBS, 3×5 minut.
- Membrána byla inkubována s roztoky biotinylovaných dělených proteinů KSP (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), popř. s biotinylovanými proteiny oviduktálních tekutin a jejich derivátů, za stálého míchání po dobu 1 hodiny.
- Membrána byla promyta 0,1% TWEENem v PBS, 3× 5 minut.
- Membrána byla inkubována s avidin-HRP o koncentraci 2,5 $\mu\text{g}/20\text{ml}$ PBS při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny.
- Membrána byla promyta 0,1% TWEENem v PBS, 3× 5 minut.
- Membrána byla inkubována se substrátovým roztokem, dokud se nevyvinulo zbarvení.
- Membrána byla vysušena mezi vrstvami filtračního papíru a oskenována.

roztoky:

přenosový pufr, pH = 8,3: 10% methanol + 192 mM glycin + 25 mM Tris

substrát roztok: • V 10 ml citrát-fosfátového pufru (pH = 4,6) bylo rozpuštěno 10 mg

perboritan sodný + 1 mg CoCl₂.

- V 50 µl DMF byl rozpuštěn 1,0 mg 4-chlor-1-naftol.

Těsně před přidáním substrátového roztoku k NC membráně byly oba roztoky smíchány.

2.7.5 Fluorescenční mikroskopie

- Pro tento pokus byly použity v PBS omyté ejakulované kančí spermie, které byly zakoncentrovány pomocí centrifugace (dar z VÚVel Brno).
- 50 µl zakoncentrovaných ejakulovaných kančích spermií bylo inkubováno po dobu 10 min s 200 µl proteiny oviduktální tekutiny značené FITC, popř. s KSP značenou RITC (viz kap. 2.7.2).
- Poté byly scentrifugovány při 500 x g po dobu 20 min a při teplotě 15 °C.
- Supernatan byl slit a peleta byla rozpuštěna ve 100 µl PBS.
- Následovalo opakovaná centrifugace 20 min při 500 x g a 15 °C.
- Peleta byla rozesuspendována ve 100 µl PBS.
- 10 µl vzorku bylo napipetováno na mikroskopické sklíčko a fluorescence byla pozorována pomocí mikroskopu Nikon ellipse TE2000-U (kamera Mutech, PixeLINK).

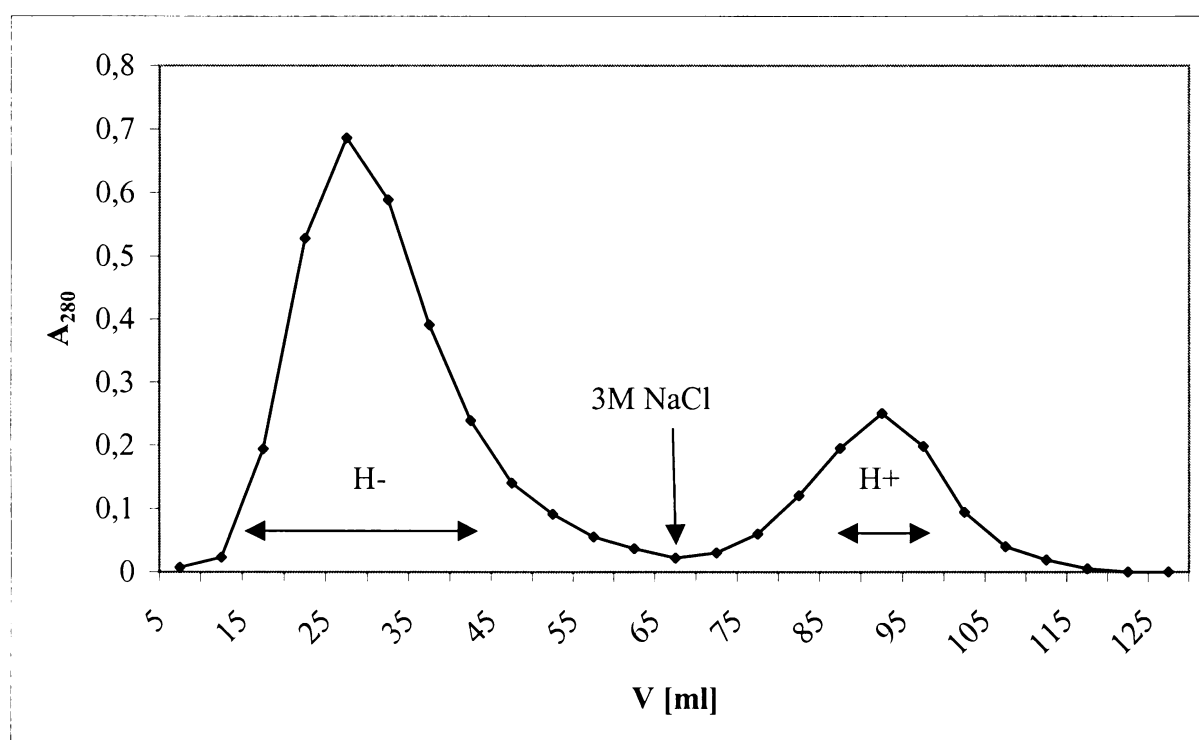
2.7.6 Sledování vlivu autoproteolysy oviduktální tekutiny na vazbu s kančí semennou plasmou

- Proteiny oviduktální tekutiny byly rozpuštěny v 0,05 M acetátovém pufru o pH = 5,0 v koncentraci 1 mg/ml.
- K POT byl přidán inhibitor serinových proteas (10 mM 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid) nebo inhibitor metaloproteas (10 mM EDTA) nebo oba inhibitory nebo žádný inhibitor.
- POT byly inkubovány při 37 °C a postupně bylo odebíráno 100 µl vzorku v časovém rozmezí 2, 3, 5, 12, 24 a 48 hod.
- Interakce s KSP byla sledována pomocí metody ELBA (měřeno na čtečce SUNRISE TECAN, Rakousko při 405 nm).

3. VÝSLEDKY

3.1 Afinitní chromatografie kančí semenné plasmy na heparinu imobilizovaném na polyakrylamidovém gelu

Afinitní chromatografií (viz kap. 2.4.2) kančí semenné plasmy (koncentrace proteinů byla 20-60 mg/ml) na imobilizovaném heparinu byly připraveny dvě frakce: H⁺ (heparin vázající) a H⁻ (heparin nevážící) (viz obr. 6). Heparin nevážící frakce byla eluována 0,2 M NH₄HCO₃; pH 7,2. Heparin vázající frakce byla eluována roztokem 3 M NaCl. Při opakovaných pokusech byl podíl H⁺ frakce od 8 % do 24 %. H⁻ frakce se podílí z 76-92%. Ukázalo se, že množství a podíl jednotlivých frakcí proteinů v kančí semenné plasmě je vysoce individuální a variabilní.



Obr 6: Afinitní chromatografie kančí semenné plasmy na heparinu imobilizovaném na polyakrylamidovém gelu.

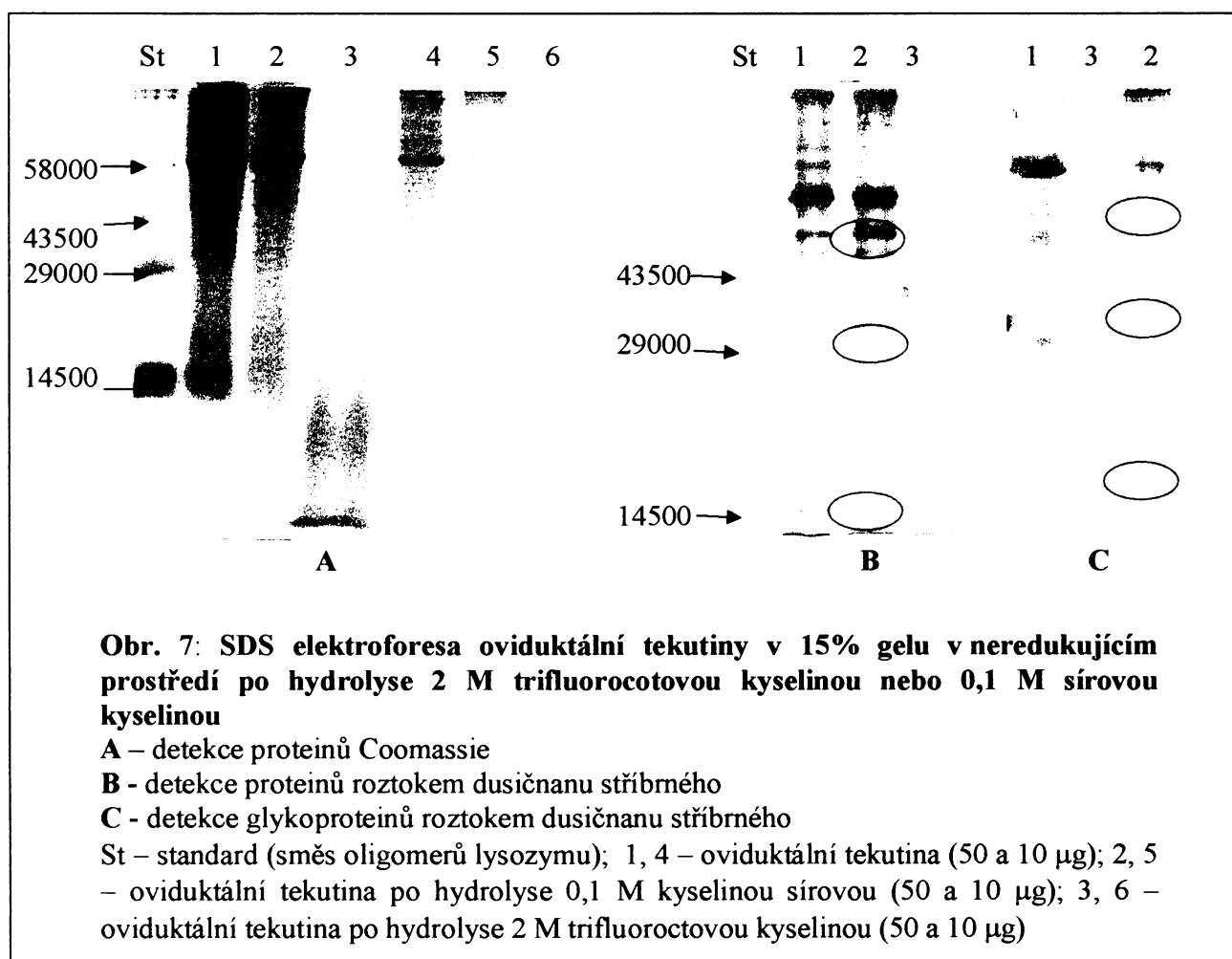
A₂₈₀ - absorbance při 280 nm; H⁺ - heparin vázající frakce KSP; H⁻ - heparin nevážící frakce semenné plasmy.

3.2 Izolace a charakterizace složek oviduktální tekutiny

Separace oviduktální tekutiny byla provedena podle kap 2.4.1. Získané tekutiny byly lyofilizovány a z 6 párů oviduktů bylo získáno přibližně 150 mg lyofilizovaného preparátu.

3.3.1 SDS elektroforesa oviduktální tekutiny

SDS elektroforesa (viz kap. 2.5.3) a následné barvení roztokem dusičnanu stříbrného pro detekci glykoproteinů (viz kap. 2.5.4) byly použity ke studiu složek oviduktální tekutiny prasnice. Zároveň byla těmito metodami kontrolována úspěšnost modifikace sacharidových řetězců (viz. kap 2.3.2 a 2.3.1), (viz. obr. 7).



Oviduktální tekutina obsahuje proteiny detegovatelné Coomassie brilliant Blue (obr. 6, A1) a nebo roztokem dusičnanu stříbrného (obr. 6, B1) v oblasti relativní molekulové hmotností: 14 000, 28 000-55 000, 58 000. Při detekci na glykoproteiny (obr. 6, C1) byly nalezeny komponenty s relativní molekulovou hmotností 15 000 a 42 000 až 50 000 a hlavní glykoprotein s relativní molekulovou hmotností 58 000.

Hydrolysa oviduktální tekutiny pomocí 1 M kyseliny sírové, která vede k odstranění sialových kyselin [71] má za následek změnu relativní molekulové hmotnosti komponent v oblasti 14 000, 28 000-45000 (obr. 6, C2). Po působení 2 M trifluoroctové kyseliny, která má vést k odstranění sacharidové složky glykoproteinů, byly detekovány komponenty v oblasti nízkých relativních molekulových hmotností.

3.3.2 Obsah sacharidů a sialových kyselin

Obsah neutrálních sacharidů byl stanoven podle Dubois a spol. [60] (viz. kap. 2.5.1) u proteinů H+ a H- frakce kančí semenné plasmy a u oviduktální tekutiny. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7. Bylo zjištěno, že H- frakce kančí semenné plasmy vykazovala vyšší obsah neutrálních sacharidů než H+ frakce. Obsah neutrálních sacharidů v oviduktální tekutině je mezi hodnotami pro H+ a H- frakci.

Obsah sialových kyselin v oviduktální tekutině byl stanoven orcinolovou metodou (viz kap. 2.5.2) [61] a bylo zjištěno, že lyofilizovaný preparát obsahuje 2% sialových kyselin.

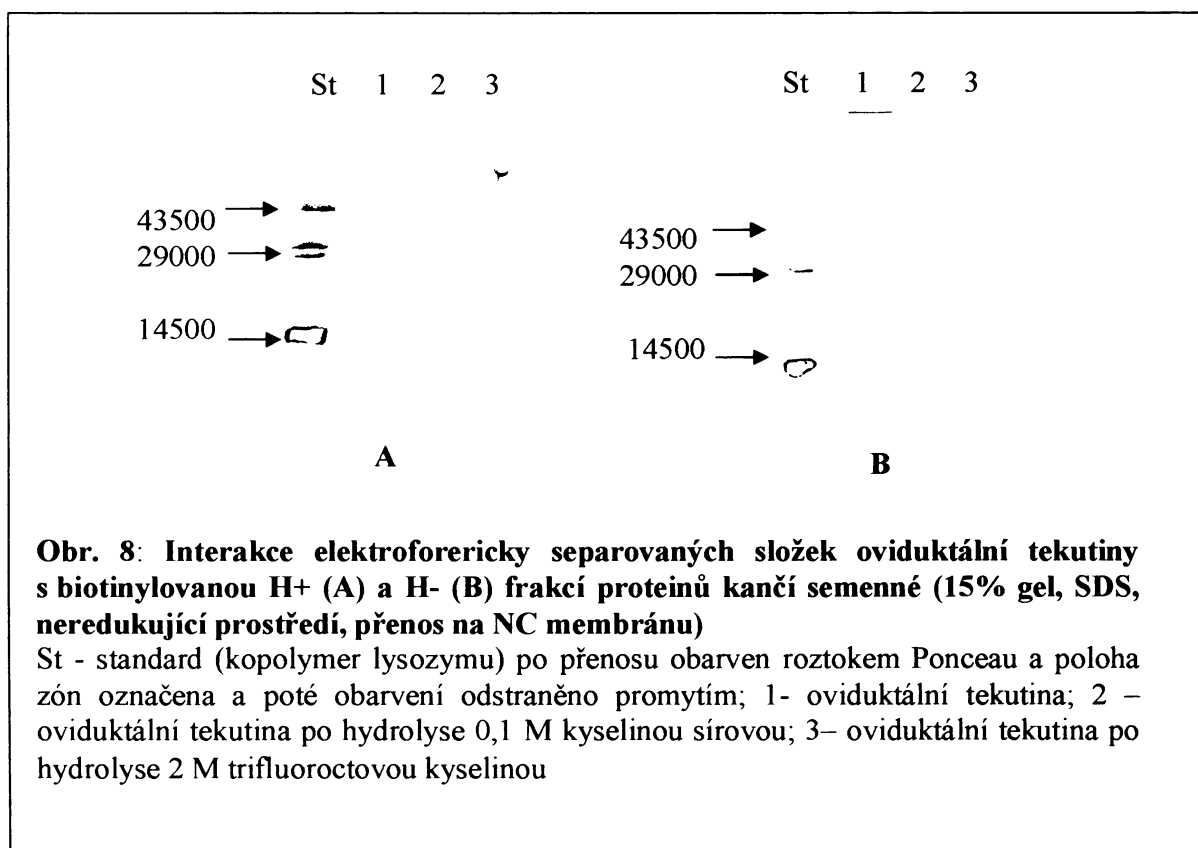
Tab. č. 7 Obsahu neutrálních sacharidů v oviduktální tekutině dle Dubois [60]

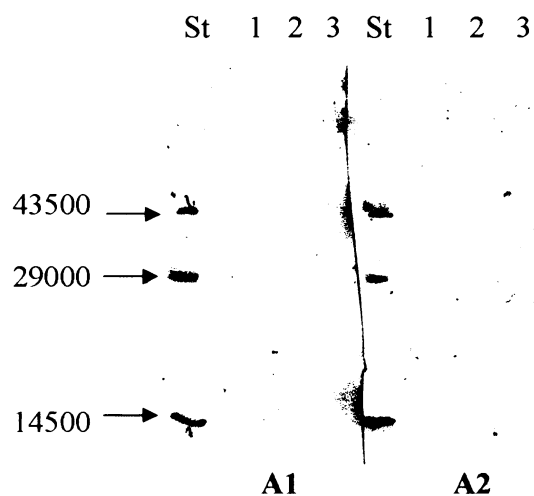
vzorek	mg sacharidu/mg proteinu	% zastoupení sacharidové složky
oviduktální tekutina	0,0078	0,8 %
H+	0,0062	0,6 %
H-	0,0108	1 %

3.3 Studium interakce oviduktální tekutiny s kančí semennou plasmou

3.3.1 Interakce elektroforeticky rozdělených složek oviduktální tekutiny se značenou semennou plasmou

Na obrázku 8 jsou znázorněny výsledky studia interakce lyofilizované H⁺ a H⁻ frakce kančí semenné plasmy s elektroforeticky (za přítomnosti SDS) separovanými složkami oviduktální tekutiny a jejích hydrolysovaných derivátů. Jak vyplývá z uvedeného obrázku velmi slabé interakce byly detekovány pouze u nemodifikované oviduktální tekutiny a to v oblasti relativních molekulových hmotností 43 000 a 55 000 až 60 000. Interakce H⁺ a H⁻ přenesených frakcí se v podstatě nelišily.



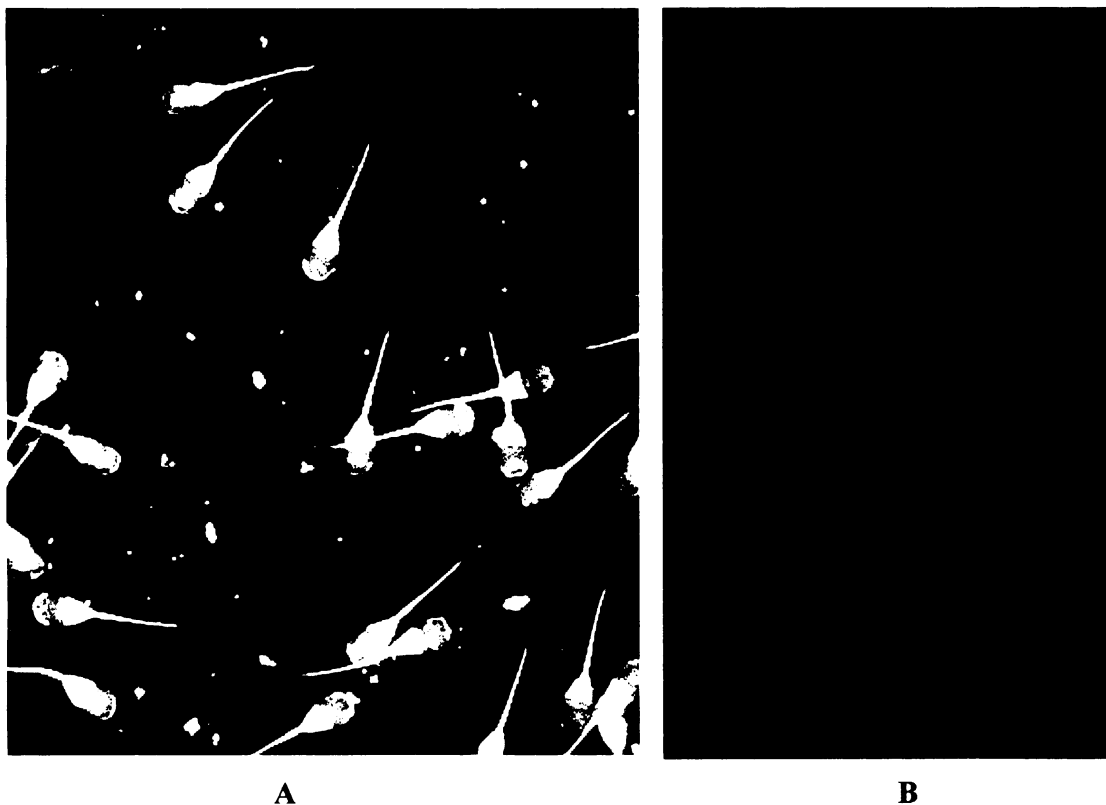


Obr. 9: Interakce elektroforeticky separovaných komponent kančí semenné plasmy a její H⁺ a H⁻ frakce s biotinylovanou oviduktální tekutinou (A1) a s biotinylovanou oviduktální tekutinou hydrolysovanou 0,1 M kyselinou sírovou (A2) (SDS, 15% gel, neredukující prostředí, přeneseno na NC membránu)

St - standard (kopolymer lysozemu) po přenosu obarven roztokem Ponceau a poloha zón označena a poté obarvení odstraněno promytím; 1- lyofilizovaná kančí semenná plasma; 2- H⁺ frakce kančí semenné plasmy; 3- H⁻ frakce kančí semenné plasmy

3.3.2 Interakce značených komponent oviduktální tekutiny s kančí spermii

Techniky fluorescenční mikroskopie byly použity pro sledování topologické lokalizace vazby oviduktální tekutiny na povrch kančích spermii. Preparát oviduktální tekutiny je značen pomocí fluorescein isothiokyanátu (FITC) a preparát kančí semenné plasmy pomocí rhodamin isothiokyanátu (RITC). Získané výsledky ukazují, že se oviduktální tekutina váže preferenčně na střední část bičíku, postakrosomální oblasti hlavičky a apikální části hlavičky spermie. Komponenty kančí semenné plasmy se váží na střední část bičíku (stejně jako oviduktální tekutina) a na akrosomální segment hlavičky spermie (viz obr. 10).

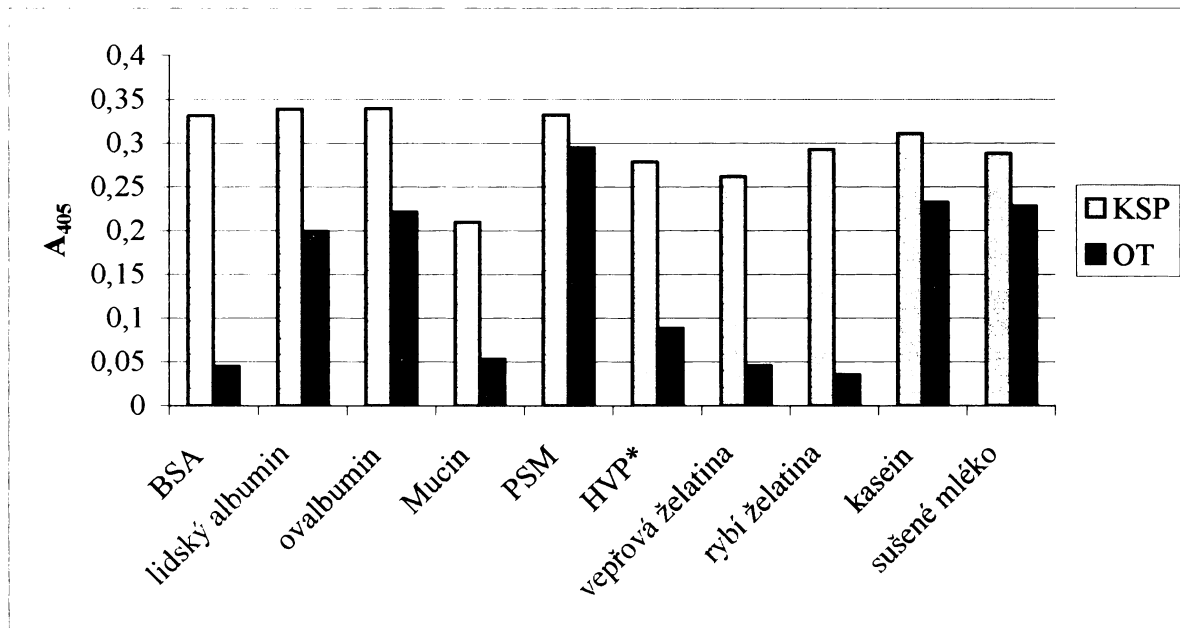


Obr. 10: Interakce komponent oviduktální tekutiny (A) a kančí semenné plasmy (B) s kančími spermii. Mikroskop Nikon ellipse TE2000-U; kamera Mutech (A) PixelINK (B). Zvětšení 600x.

3.3.3 ELBA (Enzyme Linked Binding Assay) – metoda pro studium vazebných interakcí

Metoda ELBA byla použita pro studium vzájemných interakcí komponent oviduktální tekutiny a komponent kančí semenné plasmy. Testovaný protein je imobilisován pomocí glutaraldehydu na polystyrenovou mikrotitrační destičku, volná místa jsou desaktivována pomocí inertního proteinu. Poté testovaná substance interaguje se značeným ligandem a množství navázaného ligandu se stanoví spektrofotometricky za použití avidin-peroxidasy.

V první fázi experimentů byly hledány nejvhodnější podmínky pro sledování vazebných interakcí proteinů semenné plasmy a oviduktální tekutiny. Byly použity dvě varianty: jednak biotinylované komponenty oviduktální tekutiny a jednak biotinylované komponenty semenné plasmy. Výběr vhodného proteinu pro desaktivaci je důležitý pro úspěšnost celého stanovení. Na obrázku 11 (str. 40) jsou znázorněny výsledky testování různých proteinů, či proteinových směsí, které by neinteragovaly ani s testovaným proteinem, ani s ligandem. Jak je vidět z uvedeného obrázku, všechny použité desaktivující proteiny adsorbují biotinylované komponenty kančí semenné plasmy, a proto tato varianta není vhodná pro studium vazebných interakcí proteinů semenné plasmy a komponent oviduktální tekutiny. Biotinylované komponenty oviduktální tekutiny se však na použité desaktivující proteiny adsorbují mnohem méně, tudíž druhá varianta byla využita v následujících pokusech.



Obr. 11: Adsorpce biotinylovaných komponent oviduktální tekutiny a biotinylovaných komponent kančí semenné plasmy na různé proteiny nebo proteinové směsi užívané pro deaktivaci při metodě ELBA

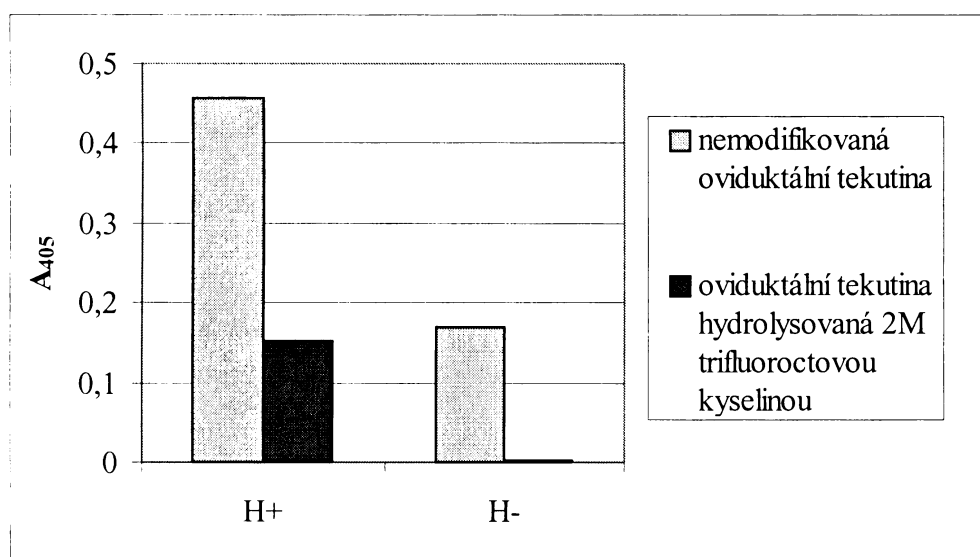
Použité roztoky: deaktivující proteiny (1 mg/ml) v PBS, biotinylované ligandy (0,1 mg/ml) v PBS, A₄₀₅ – absorbance při 405 nm, HVP – hydrolysovaný vepřový protein, PSM – mucin z prasečích podčelistních žláz, BSA – hovězí sérum albumin, mucin - mucin z prasečí žaludeční sliznice; KSP – kančí semenná plasma, OT – oviduktální tekutina

3.3.4 Vliv modifikace komponent oviduktální tekutiny na jejich interakci s proteiny kančí semenné plasmy

3.3.4.1 Vliv kyselé hydrolysy složek oviduktální tekutiny

Pro modifikaci komponent oviduktální tekutiny byla zvolena hydrolysa 2 M kyselinou trifluoroctovou [71], která byla použita k deglykosylaci glykoproteinů (viz kapitola 2.6.1).

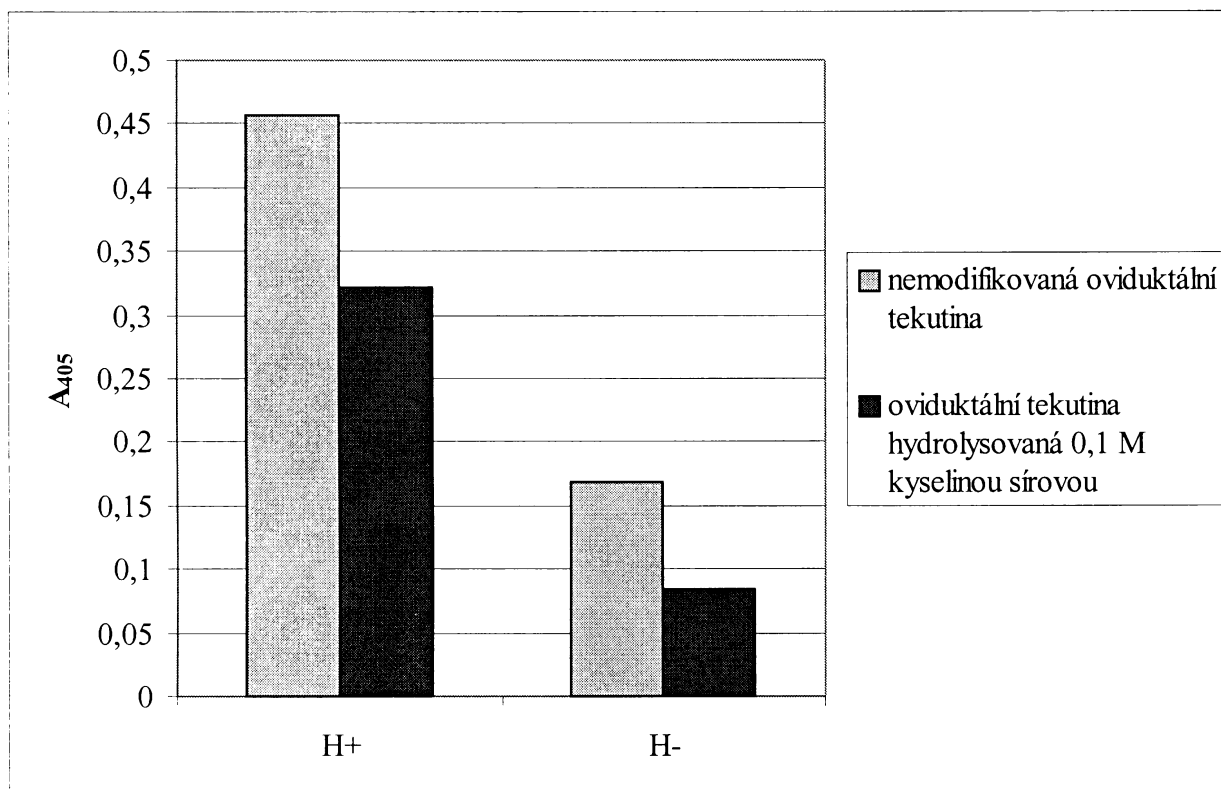
Interakce takto modifikovaných komponent oviduktální tekutiny s proteiny kančí semenné plasmy byla studována pomocí metody ELBA a výsledky jsou znázorněny na obr. 12. Z výsledků vyplývá, že H⁺ proteiny interagují s nemodifikovanými složkami oviduktální tekutiny silněji než proteiny H⁻ frakce. Kyselá hydrolysa však tyto vazebné schopnosti velmi silně snižuje.



Obr. 12: Vliv kyselé hydrolysy komponent oviduktální tekutiny 2 M kyselinou trifluoroctovou na jejich interakci s proteiny kančí semenné plasmy.

Použité roztoky: H⁺ a H⁻ frakce (0,1 mg/ml) v PBS, biotinylované složky oviduktální tekutiny (0,1 mg/ml) v PBS, A₄₀₅ –absorbance při 405 nm,

Pro další modifikaci komponent oviduktální tekutiny byla dále zvolena hydrolysa pomocí 0,1 M kyseliny sírové, která bývá používána k odstranění zbytků kyseliny sialové z glykoproteinů [71]. Vliv tohoto způsobu modifikace oviduktální tekutiny na jejich vazebné interakce s proteiny kančí semenné plasmy jsou ukázány na obr 13. I v tomto případě modifikace dochází ke snížení vazebné aktivity po hydrolyse komponent oviduktální tekutiny.

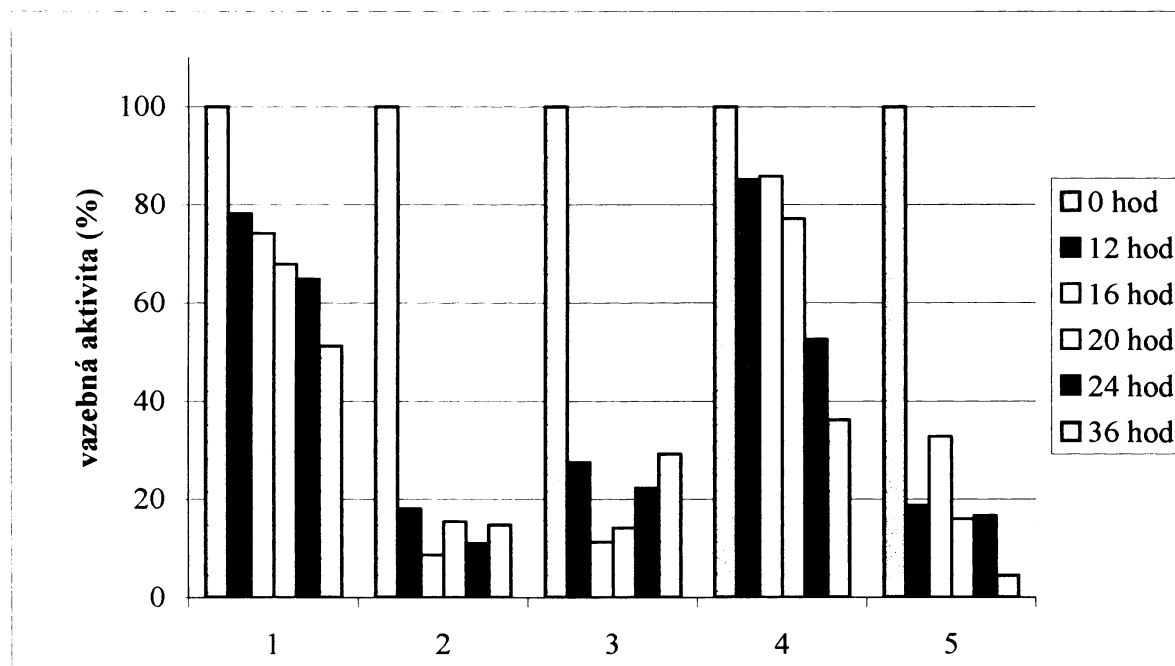


Obr. 13: Vliv kyselé hydrolysy komponent oviduktální tekutiny 0,1 M kyselinou sírovou na jejich interakci s proteiny kančí semenné plasmy. Použité roztoky: H+ a H- frakce (0,1 mg/ml) v PBS, biotinylované složky oviduktální tekutiny (0,1 mg/ml) v PBS, A_{405} –absorbance při 405 nm.

3.3.4.2 Vliv štěpení komponent oviduktální tekutiny glykosidasami

Jako další typ modifikace složek oviduktální tekutiny bylo zvoleno štěpení exoglykosidasami různého typu. Štěpení těmito hydrolasami probíhalo 0 – 36 hod., v případě β -glukosidasy až 156 hod. Byl sledován vliv jejich působení na interakci modifikovaných komponent oviduktální tekutiny s proteinovými frakcemi kančí semenné plasmy (H^+ a H^-). Získané výsledky jsou znázorněny na obrázcích 14 -17.

Z testovaných glykosidas snížení vazebné aktivity komponent oviduktální tekutiny bylo pozorováno v případě štěpení neuraminidasou, β -galaktosidasou, α -L-fukosidasou a β -glukosidasou. Po inkubaci s PNGasou F a α -galaktosidasou nedocházelo k podstatným změnám ve vazebných aktivitách. Velmi podobné výsledky byly získány při sledování interakce modifikovaných komponent oviduktální tekutiny s proteiny kančí semenné plasmy jak H^+ tak H^- frakce.

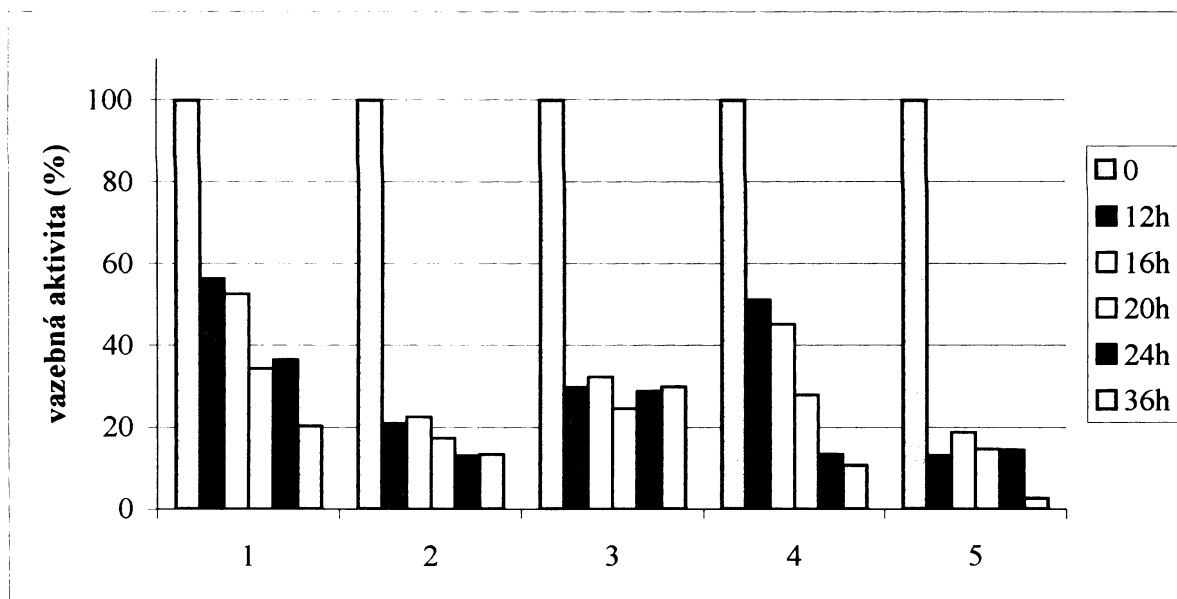


Obr. 14: Vliv štěpení komponent oviduktální tekutiny glykosidasami na jejich interakci s H^+ proteiny kančí semenné plasmy.

Oviduktální tekutina po štěpení: 1- PNGasou F, 2- α -L-fukosidasou, 3- neuraminidasou, 4- α -galaktosidasou, 5- β -galaktosidasou,

100% aktivity - vazebná aktivita nemodifikovaných složek oviduktální tekutiny v čase 0.

Použité roztoky: H^+ (0,1 mg/ml) v PBS, biotinylované složky oviduktální tekutiny (0,1 mg/ml) v PBS. Měřeno při 405 nm.

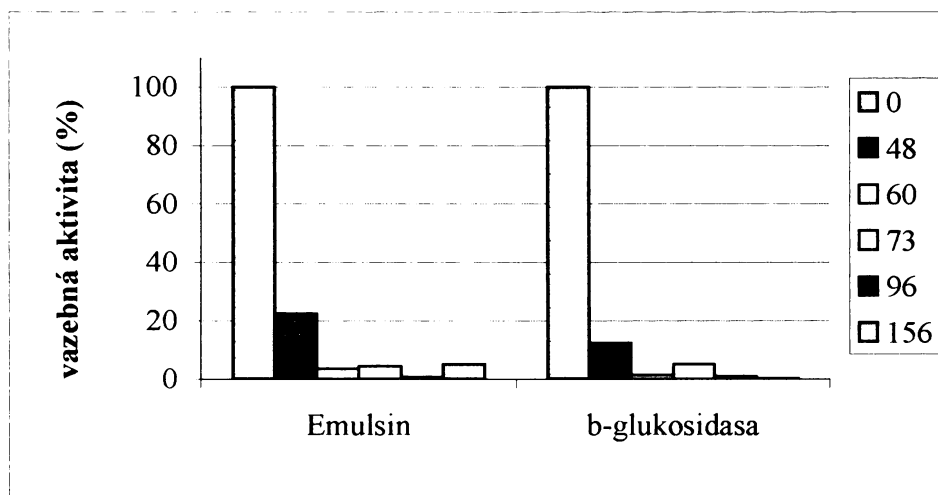


Obr. 15: Vliv štěpení komponent oviduktální tekutiny glykosidasami na jejich interakci s H-proteiny kančí semenné plasmy.

100% aktivity - vazebná aktivita nemodifikovaných složek oviduktální tekutiny v čase 0.

Oviduktální tekutina po štěpení: 1- PNGasou F, 2- α -L-fukosidasou, 3- neuraminidasou, 4- α -galaktosidasou, 5- β -galaktosidasou.

Použité roztoky: H- (0,1 mg/ml) v PBS, biotinylované složky oviduktální tekutiny (0,1 mg/ml) v PBS. Měřeno při 405 nm.

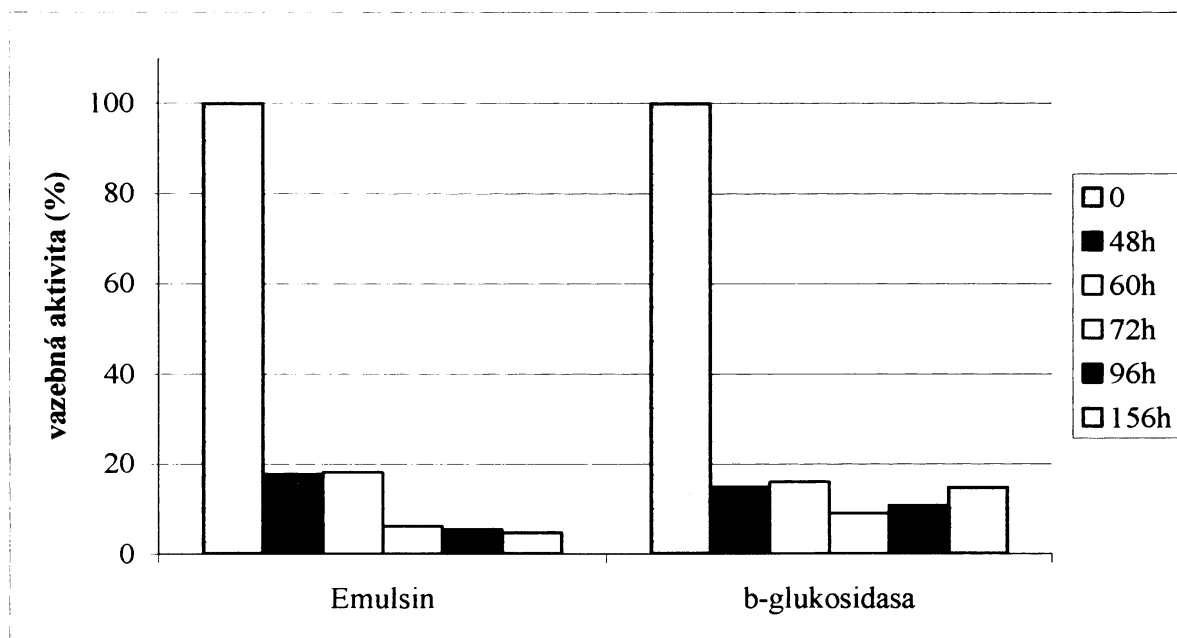


Obr. 16: Vliv štěpení komponent oviduktální tekutiny glykosidasami na jejich interakci s H+ proteiny kančí semenné plasmy.

100% aktivity - vazebná aktivita nemodifikovaných složek oviduktální tekutiny v čase 0

Emulsin - preparát získaný z extraktu mandlí, obsahuje směs glykosidas, s převládající β -glukosidasovou aktivitou.

Použité roztoky: H+ (0,1 mg/ml) v PBS, biotinylované složky oviduktální tekutiny (0,1 mg/ml) v PBS. Měřeno při 405 nm.



Obr. 17: Vliv štěpení komponent oviduktální tekutiny glykosidasami na jejich interakci s H-proteiny kančí semenné plasmy.

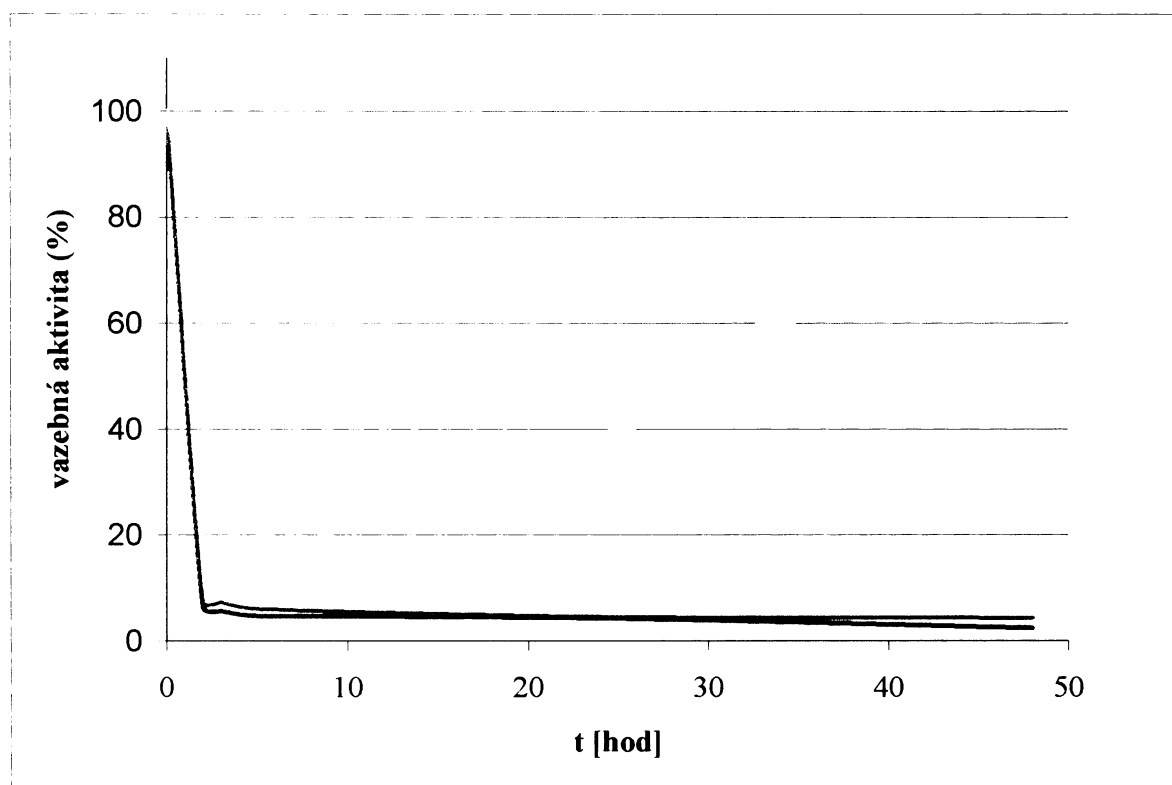
100% aktivity - vazebná aktivita nemodifikovaných složek oviduktální tekutiny v čase 0.

Emulsin- preparát získaný z extraktu mandlí, obsahuje směs glykosidas, s převládající β -glukosidasovou aktivitou.

Použité roztoky: H- (0,1 mg/ml) v PBS, biotinylované složky oviduktální tekutiny (0,1 mg/ml) v PBS. Měřeno při 405 nm.

3.3.4.3 Vliv proteolytického štěpení složek oviduktální tekutiny

Metodou ELBA byl sledován vliv proteolytické aktivity v oviduktální tekutině na interakci komponent oviduktální tekutiny s kančí semennou plasmou. Bez přítomnosti inhibitorů proteas došlo k významnému snížení schopnosti oviduktální tekutiny interagovat s kančí semennou plasmou. Prakticky stejný výsledek byl naměřen v přítomnosti inhibitorů metaloproteas. Inhibice serinových proteas a metaloproteas nezabránila snižování schopnosti komponent oviduktální tekutiny interagovat s kančí semennou plasmou (viz obr. 18).



Obr. 18: Vliv proteolytického štěpení složek oviduktální tekutiny.

Zelená křivka – inhibice metaloproteas a serinových proteas; žlutá křivka – inhibice serinových proteas; růžová křivka – inhibice metaloproteas; modrá křivka – bez inhibice

100% aktivita - vazebná aktivita nemodifikovaných složek oviduktální tekutiny v čase 0.

Použité roztoky: 10 mM 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid (inhibitor serinových proteas), 10 mM EDTA (inhibitor metaloproteas), H+/H- frakce (0,1 mg/ml) v PBS, biotinylované složky oviduktální tekutiny (0,1 mg/ml) v PBS. Měřeno při 405 nm.

4. DISKUSE

Úspěšná fertilizace je závislá na dostatečném množství spermií přítomných ve správný čas na správném místě. Místo setkání je určeno, spermie se musí setkat s vajíčkem při jeho sestupu oviduktem. Čas je omezen dobou životnosti vajíčka, tedy přibližně třemi dny [6]. Po tuto dobu je nutné zabezpečit dostatečné množství spermií v oviduktu (u prasat okolo 3 miliard [6]), aby setkání gamet bylo úspěšné a bylo zdárně dokončeno. Savci (včetně prasat) vyvinuli několik mechanismů zabezpečujících dostatečné množství životaschopných, pohyblivých a membránově intaktních spermií v oviduktu okolo doby ovulace. Jedním z mechanismů je vytvoření oviduktálního reservoáru spermií. Nutnou podmínkou pro uchycení spermie do reservoáru je interakce spermie a epitelu oviduktu.

Z jiných prací [58, 59] provedených v naší laboratoři vyplývá, že oviduktální tekutina a oviduktální epitel obsahují velmi obdobné sacharidové struktury. Oviduktální tekutina tedy může efektivně inhibovat interakci spermií s epitelem [59]. Z literatury je známo, že se na vazbě spermie do oviduktálního reservoáru podílejí galaktosové struktury Gal β (1-3)GalNAc přítomné na povrchu oviduktálního epitelu [23]. Z proteinů spermie se na tvorbě reservoáru pravděpodobně podílí spermadhesin AQN 1, který je schopen rozeznat α - i β -vázanou galaktosu a také strukturu Man α (1-3)Man α (1-6)Man, a spermadhesin AWN, který je schopen rozeznávat pouze galaktosu [66].

Oviduktální tekutina je glykosylována a její sacharidové komponenty jsou rozeznávány proteiny kančí semenné plasmy navázanými na povrch spermie. Význam glykosylace jsme prokázali deglykosylačními studii, kdy se oviduktální tekutina po kyselé hydrolyse nebyla schopná vázat na komponenty kančí semenné plasmy, což bylo ukázáno metodou ELBA. Po štěpení glykosidasou PNGasa F (odštěpuje N-glykosidicky vázané oligosacharidové řetězce) nedocházelo k ovlivnění vazby s kančí semennou plasmou. Tento výsledek mohl být zapříčiněn několika faktory:

1. – Odlišné reakční podmínky při štěpení PNGasou F (fosfátový pufr, pH = 7,5) a pro kontrolu (acetátový pufr, pH = 5,0; společná pro všechny glykosidická štěpení) mohly způsobit větší autoproteolytické štěpení kontroly (blíže pH optimu proteas) a tudíž se mohl objevit větší vliv na vazbu oviduktální tekutiny s kančí semennou plasmou než jaký by měla autoproteolýsa oviduktální tekutiny při pH 7,5.

2. – V oviduktální tekutině se nacházejí komponenty obsahující převážně O-glykosidicky vázané oligosacharidové řetězce,

3. – Přítomnost L-fukosy navázané vazbou $\alpha(1-3)$ na GlcNAc, který se váže na asparaginový zbytek proteinu. Toto uspořádání nedokáže PNGasa F štěpit [67]. Pro vyřešení tohoto problému je zapotřebí provést několik experimentů. Proměřit míru autoproteolysy oviduktální tekutiny i pro jiná pH a pufrů než jen pro acetátový pufr o pH = 5,0. Podrobit oviduktální tekutinu enzymatickému štěpení nejdříve α -L-fukosidasou a poté PNGasou F, čímž by se vyloučila nebo potvrdila přítomnost Fuk- $\alpha(1-3)$ GlcNAc a zároveň přítomnost N-vázaných oligosacharidových struktur v oviduktální tekutině.

Štěpení komponent oviduktální tekutiny α -L-fukosidasou a β -galaktosidasou a následné detekce vazebných aktivit naznačily zásadní vliv α vázané L-fukosy a β vázané D-galaktosy v interakci oviduktální tekutiny s kančí semennou plasmou. Vliv L-fukosy (přítomné na povrchu epitelálních buněk) na vznik reservoáru spermií byl popsán u skotu [68, 69].

Dále jsme zjistili vliv sialových kyselin na rozpoznání oviduktální tekutiny a proteinů kančí semenné plasmy. Jak ELISA metoda, tak Far Western blot analýza vazby oviduktální tekutiny s kančí semennou plasmou ukázaly, že štěpení oviduktální tekutiny glykosidasami výrazně snižuje schopnost vázat obě frakce kančí semenné plasmy. Tento vliv byl zatím popsán pouze v souvislosti interakce spermie s epitelem oviduktu u křečka zlatého (*Mesocricetus auratus*) [70]. Sacharidové komponenty oviduktální tekutiny tedy zprostředkovávají specifickou vazbu s kančí semennou plasmou. Sialové kyseliny jsou důležité pro vazebnou funkci komponent oviduktální tekutiny.

V naší práci jsme se zaměřili hlavně na interakce oviduktální tekutiny s kančí semennou plasmou jakožto inhibičního principu pro tvorbu oviduktálního reservoáru spermií. Oviduktální tekutina se ochotně váže na povrch spermií, jak jsme prokázali topologickou lokalizací této vazby. Oviduktální tekutina se váže převážně na postakrosomální části hlavičky spermie, střední část bičíku a apikální část akrosomálního segmentu. Z literatury je známo, že spermie se do oviduktálního reservoáru váží přes akrosomovou doménu na hlavičce [21]. Částečně se tedy kryjí místa, na která se váží komponenty oviduktální tekutiny a epitelální buňky. Vazba oviduktální tekutiny na povrch spermie pravděpodobně zablokuje vazebná místa pro navázání epitelu oviduktu

V průběhu našich experimentů jsme se potýkali s problémem přítomnosti proteas v oviduktální tekutině prasnice. Už L. Prelovská upozornila na výskyt proteas, které štěpí oviduktální tekutinu. Proteasy byly nalezeny v celém pohlavním traktu samice [59]. Po štěpení proteasami ztrácí oviduktální tekutina schopnost interagovat s kančí semennou plasmou, jak jsme prokázali metodou ELBA. Aktivita proteas tak může zprostředkovávat regulaci vazby spermií na ovidukt v důsledku nízké inhibiční aktivity fragmentovaných komponent oviduktální tekutiny. Tedy, že v přítomnosti fragmentovaných komponent oviduktální tekutiny dojde k navázání spermií na ovidukt.

5. SOUHRN VÝSLEDKŮ

Z prasečích oviduktů byla separována oviduktální tekutina a byla částečně charakterizována.

Pomocí elektroforesy byly stanoveny relativní molekulové hmotnosti oviduktální tekutiny; následnou detekcí glykoproteinů v gelu bylo zjištěno, že proteiny s M_r 15 000, 42 000 až 50 000 a 58 000 (majoritní glykoprotein) jsou glykosylovány.

Byl stanoven obsah neutrálních sacharidů a obsah sialových kyselin v preparátu oviduktální tekutiny. Obsah neutrálních sacharidů činí 0,8% a 2% sialových kyselin.

Proteiny kančí semenné plasmy separované pomocí SDS elektroforosy a přenesené na NC membránu se složkami oviduktální tekutiny nereagovaly, zatímco vazebné studie provedené pomocí metody ELBA interagovaly.

Fluorescenčně mikroskopickými technikami byla lokalizována vazebná místa oviduktální tekutiny a komponent kančí semenné plasmy na povrchu spermie. Oviduktální tekutina se preferenčně váže na apikální část akrosomálního segmentu, postakrosomovou oblast spermie a střední část bičíku. Komponenty kančí semenné plasmy se váží na celý povrch hlavičky s preferencí akrosomální části a střední části bičíku.

Pomocí štěpení složek oviduktální tekutiny exoglykosidasami byla prokázána participace glykokonjugátů oviduktální tekutiny v interakci s proteiny kančí semenné plasmy. Sledovanou interakci nejvíce ovlivnilo působením α -L-fukosidasy, neuraminidasy, β -glukosidasy a β -galaktosidasy.

V preparátu oviduktální tekutiny byla potvrzena přítomnost proteas serinového typu a metoloproteas, které autoproteolyticky ovlivňují složení oviduktální tekutiny a její schopnost interagovat s proteiny kančí semenné plasmy.

6. SEZNAM ZKRATEK

AA	- akrylamid
ABTS	- 2,2'-azino-bis(2-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
APS	- persíran amonný
Avidin-HRP	- avidin značený křenovou peroxidasou
Bis AA	- N, N'-methylen-bisakrylamid
BSA	- hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumin)
BSM	- mucin z hovězích podčelistních žláz (z angl. Bovine Submaxillary Mucin)
CBB	- Coomassie Brilliant Blue R-250
DMF	- N, N-dimethylformamid
EDTA	- kyselina ethylendiamintetraoctová
ELBA	- z angl. <u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>B</u> inding <u>A</u> ssay
FITC	- fluoresceinisothiokyanát
L-Fuc	- L-fukosa
D-Gal	- D-galaktosa
D-GalNAc	- N-acetyl-D-galaktosamin
D-GlcNAc	- N-acetyl-D-glukosamin
D-Glc	- D-glukosa
H+	- heparin-vázající frakce proteinů kančí semenné plasmy
H-	- heparin-nevázající frakce proteinů kančí semenné plasmy
Hya	- hyaluronová kyselina
Lys	- lysozym
D-Man	- D-mannosa
NC-membrána	- nitrocelulosová membrána
NeuAc	- acetylneuraminová kyselina
NHS-biotin	- N-hydroxysukcinimidobiotin
PBS	- fosfátem tlumený fyziologický roztok (z angl. Phosphate-Buffered Saline)
RITC	- rhodamin B isothiokyanát

SDS	- dodecylsulfát sodný
TCA	- trichloroctová kyselina
TEMED	- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
Tris	- tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

7. SEZNAM LITERATURY

- [1] Holub A. a kol.: Fyziologie hospodářských zvířat, SZN, Praha, 1969
- [2] Setchell, B.P., Maddocks, S., Brooks, D.E.: Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract, *The Physiology of Reproduction*,
- [3] Popesko P.: Atlas topografickej anatomie hospodárskych zvierat, Diel III – Panva a končatiny, Príroda vydavateľstvo kníh a časopisov, n.p. Bratislava, 1977
- [4] Yanagimachi R.: Mammalian Fertilization, *The Physiology of Reproduction* vol. 1, 2nd edition (Knobil, E., Neill, J.D.), Raven Press, Ltd., New York, 1994
- [5] Šmerha a kol.: Biologie rozmnožování hospodářských zvířat, SZN, Praha, 1964
- [6] Kudláč E.: Veterinární porodnictví a gynekologie, VŠV, Brno, 1977
- [7] Rosypal S.: Nový přehled biologie, Scientia s.r.o. Pedagogické nakladatelství, Brno, 2003
- [8] Evans, J.P., Florman, H.M.: *Nature Cell Biology & Nature Medicine*,
<http://www.nature.com/fertility/index.html#reviews>
- [9] Romanovský A. a kol.: *Obecná biologie*, nakladatelství SPN, Praha, 1985
- [10] Saxena NK, Russell LD, Saxena N, Peterson RN: *Anat Rec.* 1986, 214:238-52
- [11] Nikolopoulou M, Soucek DA, Vary JC: *Lipids.* 1986;21:566-70
- [12] Stoffel MH, Busato A, Friess AE.: *Histochem. Cell Biol.* 2002;117:441-445.
- [13] Dacheux JL, Dacheux F, Paquignon M.: *Biol Reprod.* 1989;40:635-651
- [14] Vierula M, Rajaniemi H: *Med Biol.* 1982;60:323-7
- [15] Saxena NK, Saxena N, Hunt W, Peterson RN, Henry L, Russell LD: *J Cell Sci.* 1986;82:295-308
- [16] James PS, Wolfe CA, Ladha S, Jones R: *Mol Reprod Dev.* 1999;52:207-215
- [17] Mann T., Lutwak-Mann C.: *Male Reproductive Function and Semen*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, NY, 1981
- [18] Magargee S.F., Kunze E., Hammerstedt R.H.: *Biol Reprod.* 1988;38:667-685
- [19] Nicolson G.L., Usui N., Yanagimachi R., Yanagimachi H., Smith J.R.: *J Cell Bio* 1977;74(3):950-962.
- [20] Ekhlesi-Hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsoleva M, Petrunkina A, Topfer-Petersen E.: *Biol Reprod.* 2005;73:536-545

- [21] Suarez S, Redfern K, Raynor P, Martin F, Phillips DM: *Biol Reprod.* 1991;44:998-1004
- [22] Wagner A, Ekhlasi-Hundrieser M, Hettel C, Petrunkina A, Waberski D, Nimtz M, Topfer-Petersen E.: *Mol Reprod Dev.* 2002;61:249-257
- [23] Marini PE, Cabada MO: *Mol repris Dev.* 2003;66:383-390
- [24] Perez FA, Romana SM, Cabada MO, Marini PE: *Anat Embryol (Berl.)* 2006;211:619-624.
- [25] Topfer-Petersen E, Wagner A, Friedrich J, Petrunkina A, Ekhlasi-Hundrieser M, Waberski , Drommer W: *J Exp Zool.* 2002;292:210-215
- [26] Petrunkina AM, Friedrich J, Drommer W, Bicker G, Waberski D, Topfer-Petersen E: *Reproduction.* 2001;122:469-480
- [27] Tienthai P, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H: *Anim Reprod Sci.* 2004;80:131-146
- [28] Shadan S, James PS, Howes EA, Jones R: *Biol Reprod.* 2004;71:253-265.
- [29] van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Helms JB, Brouwers JF, Gadella BM: *Mol Hum Reprod.* 2005;11:583-590
- [30] Spinaci M, Volpe S, Bernardini C, De Ambrogi M, Tamanini C, Seren E, Galeati G: *Mol Reprod Dev.* 2005;72:534-541
- [31]Piehler E, Petrunkina AM, Ekhlasi-Hundrieser M, Topfer-Petersen E: *Cytometry A.* 2006;69:1062-1070.
- [32] Bravo MM, Aparicio IM, Garcia-Herreros M, Gil MC, Pena FJ, Garcia-Marin LJ: *Mol Reprod Dev.* 2005;71:88-96
- [33] Garcia Herreros M, Aparicio IM, Nunez I, Garcia-Marin LJ, Gil MC, Pena Vega FJ: *Theriogenology.* 2005;63:795-805
- [34] Mann T, Lutwak-Man C.: *Biochemistry of seminal plasma and male accesory fluids: application to andrological problems.* In *Male Reproductive Function and Semen.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1981
- [35] Topfer-Petersen E., Romero A., Varela P.F., Ekhlasi-Hundrieser M., Dostalova Z., Sanz L., Calvete J.J.: *Andrologia* 1998; 30: 217-224.
- [36] Manaskova P., Ryslava H., Ticha M., Jonakova V.: *Am J Reprod Immunol.* 2002; 48: 283-290
- [37] Manaskova P., Liberda J., Tichá M., Jonakova V.: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 137-143

- [38] Mabnaskova P., Meszarosova A., Liberda J., Vokurka Z., Ticha M., Jonakova V.: *Folia Biol (Praha)* 1999; 45:193-201
- [39] Jonakova V, Kraus M, Veselsky L, Cechova D, Bezouska K, Ticha M: *J Repris Fertil.* 1998; 114:25-34
- [40] Parry R.V., Barker P.J., Jones R.: *Mol Reprod Dev.* 1992;33:108-115.
- [41] Jeng H., Liu .M., Chang W.C.: *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;191:435-440.
- [42] Chao C.F., Chiou S.T., Jeng H., Chang W.C.: *Biolchem Biophys Res Commun* 1996 17;218:623-628
- [43] Jeng H., Chu W.T., Chang W.C., Su S.J.: *Mol Reprod Dev.* 2001;58:63-68
- [44] Gadella B.M, Colenbrader B., Van Golde L.M., Lopes-Cardozo M.: *Biol Reprod* 1993;48:483-489
- [45] Manaskova P., Liberda J., Ticha M., Jonakova V.: *Folia Biol (Praha)* 2000: 46:143–151
- [46] Manaskova P, Balinova P, Kraus M, Ticha M, Jonakova V.: *Am J Reprod Immunol.* 2003 50:399-410
- [47] Ticha M, Kraus M, Cechova D, Jonakova V: *Folia Biol (Praha).* 1998;44:15-21
- [48] Calvete JJ, Carrera E, Sanz L, Topfer-Petersen E.; *Biol Chem.* 1996;377:521-527
- [49] Dostalova Z, Calvete JJ, Sanz L, Topfer-Petersen E.: *Eur J Biochem.* 1995 5;230:329-336
- [50] Jonakova V., Manaskova P., Kraus M., Liberda J., Ticha M.: *Mol Reprod Dev.* 2000 56:275-277
- [51] Georgiou AS, Sostaric E, Wong CH, Snijders AP, Wright PC, Moore HD, Fazeli A: *Mol Cell Proteomics.* 2005;4:1785-1796
- [52] Nichol R., Hunter R.H., Gardner D.K., Leese H.J., Cooke G.M: *J Reprod Fertil.* 1992;96:699-707
- [53] Nichol R., Hunter R.H., Gardner D.K., Partridge R., Leese H.J., Cooke G.M.: *Res Vet Sci.* 1998;65:263-264
- [54] Wiseman DL, Henricks DM, Eberhardt DM, Bridges WC: *Biol Reprod.* 1992;47:126-132
- [55] Gimeno MF, Franchi AM, Sterin-Speziale NB, Gonzalez ET, Speziale EH, Gimeno AL: *Prostaglandins.* 1985;29:831-846
- [56] Swanchara KW, Henricks DM, Birrenkott GP, Bodine AB, Richardson ME: *Biol Reprod.* 1995;53:911-922

- [57] Tienthai P, Yokoo M, Kimura N, Heldin P, Sato E, Rodriguez-Martinez H: *Reproduction*. 2003;125:119-132
- [58] Prelovská L.: Protein-sacharidové interakce podílející se na tvorbě ovidukálního reservoáru spermií u prasnice, diplomová práce, PřF UK, Praha, 2006
- [59] Liberda J, Manaskova P, Prelovská L, Tichá M, Jonakova V: *J Reprod Immunol*. 2006;71:112-125.
- [60] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.: *Anal. Chem.* 1956;18, 350-356
- [61] Schauer R.: *Methods Enzymol.* 1978;50:64-89
- [62] Laemmli, U.K.: *Nature* 227, 1970;680-685
- [63] Liberda, J., Jonáková, V., Tichá, M.: *Biotechnol. Techn.* 1997,11, 265-267
- [64] Jobbagy A, Kiraly K: *Biochim Biophys Act* 1966, 124:166-175
- [65] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: *Proc. Nat Acad. Sci. US*, 1979,76,4350-4354
- [66] Ekhlasi-Hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsołova M, Petrunkina A, Topfer-Petersen E.: *Biol Reprod.* 2005;73:536-545
- [67] Tarentino AL, Plummer TH Jr: *Methods Enzymol.* 1994;230:44-57
- [68] Gwathmey TM, Ignatz GG, Suarez SS: *Biol Reprod.* 2003;69:809-815
- [69] Lefebvre R, Lo MC, Suarez SS: *Biol Reprod.* 1997;56:1198-1204
- [70] DeMott RP, Lefebvre R, Suarez SS.: *Biol Reprod.* 1995;52:1395-1403
- [71] Biermann, C.H.: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1988;46:251-271