

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2007

Helena Líbalová

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Helena Líbalová

LOKALIZACE A CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH PROTEINŮ SAVČÍCH SPERMIÍ POMOCÍ MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK NA INTAKTNÍCH A DEMEMBRANIZOVANÝCH SPERMIÍCH

vedoucí diplomové práce:
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Csc.

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky doc. RNDr. Jany Pěkníkové, Csc a že jsem řádně citovala všechny prameny, z nichž jsem čerpala.

.....
.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Janě Pěkníkové, Csc. za odborné vedení mé diplomové práce. Dále chci poděkovat Ing. Pavlu Koubkovi a Mgr. Aleně Králové za poskytnutí cenných rad, za pomoc při seznamování s novými metodami a při sepisování této práce, a také děkuji všem ostatním pracovníkům Laboratoře diagnostiky pro reprodukční medicínu za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

SEZNAM ZKRATEK

AC	adenylátcyklasa
AKAP	protein ukotvující proteinkinasu A
APS	persulfát amonný
AR	akrosomální reakce
BCA	kyselina bicinchoniniová
BSA	hovězí sérový albumin
CaM	kalmodulin
CaM-KII	kalmodulin dependentní proteinkiasa II
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CBB R-250	Coomassie Brilliant Blue R-250
Ca1 a Ca2	katalytické podjednotky PKA
DAG	diacylglycerol
DR	demembranizační roztok
DS	demembranitované spermie
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamin tetraoctová
FCS	fetální telecí sérum
GaM-Px	kozí antisérum proti myšímimunoglobulinů značené peroxidázou
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
Gs-protein	G α podjednotky stimulujícího Gproteinu
G α 13	aktivovaná podjednotka G 13 proteinu
HEPES	Kyselina N-(2-hydroxyetyl)piperazin-N'-2-etansulfonová
HK	hexokinasa
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfát hydrát
IP ₃	inositol trifosfát
IS	intaktní spermie

JAR buňky	choriokarcinomová buněčná linie izolovaná z trofoblastu
MCP	mitochondriální kapsulární protein
MP	mitochondriální část bičíku
MS	hmotnostní spektra
PBS	fosfátem tlumený fyziologický roztok (phosphate buffered saline)
PBS-Tw	PBS obsahující 0,05 % Tween 20
pHs-23	protein specificky značený protilátkou Hs-23
PKA	proteinkinasa A
PKC	proteinkinasa C
PIP ₂	fosfatidylinositol-4',5'-bisfosfát
PLC	fosfolipasa C
PP	hlavní část bičíku
PVDF membrána	polyvinylidifluoridová membrána
RI α a RI β	regulační podjednotky PKA
RPMI 1640	kultivační medium pro buněčné linie
RT	laboratorná teplota
RR	reaktivační roztok
sAC	rozpustná adenylátcyklasa
SDS PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza s obsahem dodecylsulfátu sodného
SWaM-FITC	prasečí antisérum proti myším imunoglobulinům značené fluorescein isothiokyanátem
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenethylendiamin
TBM	kultivační medium s obsahem Trisu (Tris buffered medium)
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
TBS	fyziologický roztok s obsahem Trisu (Tris buffered saline)
2D – SDS PAGE	dvourozměrová SDS PAGE

OBSAH

1.	ÚVOD	1
1.1	OPLOZENÍ.....	1
1.2	STAVBA SPERMIE.....	1
1.2.1	Stavba hlavičky.....	1
1.2.1.1	Akrosomální proteiny.....	2
1.2.2	Struktura bičíku.....	3
1.2.2.1	Axonema.....	4
1.2.2.2	Vnější denzní vlákna.....	5
1.2.2.3	Mitochondriální pochva.....	6
1.2.2.4	Fibrilární pochva.....	6
1.3	POHYB BIČÍKU.....	7
1.3.1	Charakter pohybu spermie během vývoje.....	8
1.3.1.1	Charakter pohybu ve varleti.....	8
1.3.1.2	Charakter pohybu během epididymální maturace.....	8
1.3.1.3	Charakter pohybu během ejakulace.....	8
1.3.1.4	Charakter pohybu v samičím pohlavním traktu.....	9
1.3.1.5	Charakter pohybu během kapacitace.....	9
1.3.2	Molekulární mechanismus pohybu.....	10
1.3.3	Regulace pohybu.....	11
1.3.3.1	cAMP/proteinkinasa A signální dráha.....	12
1.3.3.2	Ca ²⁺ signální dráha.....	13
1.4	ENERGETICKÝ METABOLISMUS POHYBU BIČÍKU. 14	
1.4.1	Glykolytické enzymy.....	15
1.4.1.1	Enolasa 1.....	16
1.5	DEMEMBRANIZACE A REAKTIVACE SPERMIÍ.....	17
1.6	MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY.....	18
1.7	CÍL PRÁCE.....	19

2.	MATERIÁL A METODY	20
2.1	CHEMIKÁLIE	20
2.2	BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	23
2.3	MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY	23
2.4	METODY.....	24
2.4.1	Zpracování spermií.....	24
2.4.1.1	<i>Promývání spermií</i>	24
2.4.1.2	<i>Promývání spermií přes Percollový gradient</i>	24
2.4.2	Zpracování semenné plasmy	25
2.4.3	Extrakce spermií	26
2.4.3.1	<i>SDS extrakce</i>	26
2.4.3.2	<i>Tritonová extrakce</i>	26
2.4.3.3	<i>Ureová extrakce</i>	26
2.4.4	Demembranizace a reaktivace kančích spermií.....	27
2.4.5	Příprava preparátu pro nepřímou imunofluorescenci.....	28
2.4.5.1	<i>Příprava spermií</i>	28
2.4.5.2	<i>Příprava JAR buněk</i>	28
2.4.6	Typy fixace preparátu na skle	28
2.4.6.1	<i>Acetonová fixace</i>	28
2.4.6.2	<i>Formaldehydová fixace</i>	28
2.4.7	Nepřímá imunofluorescence s monoklonálními protilátkami	29
2.4.7.1	<i>Imunofluorescence se spermiemi</i>	29
2.4.7.2	<i>Imunofluorescence s JAR buňkami</i>	29
2.4.8	Jednorozměrová elektroforéza	29
2.4.9	Dvourozměrová elektroforéza	30
2.4.10	Přenos proteinů na membránu	31
2.4.11	Imunodetekce proteinů pomocí monoklonálních protilátek.....	31
2.4.12	Vizualizace proteinů barvením CBB R-250	32
2.4.13	Vizualizace proteinů stříbrem	32
2.4.14	Stanovení koncentrace proteinů BCA metodou.....	32
2.4.15	Afinitní chromatografie na G-protein Sepharose	33

3.	VÝSLEDKY	34
3.1	DEMEMBRANIZACE A REAKTIVACE KANČÍCH SPERMIÍ.....	34
3.1.1	Demembranizace spermií.....	34
3.1.2	Reaktivace spermií.....	35
<i>3.1.2.1</i>	<i>Reaktivace pomocí ATP</i>	<i>35</i>
<i>3.1.2.2</i>	<i>Reaktivace pomocí ADP</i>	<i>35</i>
<i>3.1.2.3</i>	<i>Reaktivace substráty glykolýzy</i>	<i>36</i>
3.2	NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE S MONOKLONÁLNÍMI PROTILÁTKAMI PROTI LIDSKÝM A KANČÍM PROTEINŮM NA KANČÍCH SPERMIÍCH.....	37
3.2.1	Imunofluorescenční značení intra-akrosomálního proteinu pomocí monoklonální protilátky Hs-8.....	38
3.2.2	Imunofluorescenční značení intra-akrosomálního proteinu pomocí monoklonální protilátky Hs-14.....	39
3.2.3	Imunofluorescenční značení akrosinu pomocí monoklonální protilátky ACR.2.....	40
3.2.4	Imunofluorescenční značení pHs-23 pomocí monoklonální protilátky Hs-23	41
3.3	PŘEČIŠTĚNÍ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY Hs-23 NA G-PROTEIN SEPHAROSE.....	43
3.4	BIOLOGICKÁ A BIOCHEMICKÁ CHARAKTERIZACE pHs-23	45
3.4.1	Nepřímá imunofluorescence s protilátkou Hs-23 na lidských spermiích.....	45
3.4.2	Nepřímá imunofluorescence s protilátkou Hs-23 na JAR buňkách... 46	46
3.4.3	SDS elektroforéza a imunodetekce s protilátkou Hs-23	47
3.4.4	Dvourozměrová elektroforéza (2D – SDS PAGE) a imunodetekce s protilátkou Hs-23 na extraktu lidských spermií.....	48
3.4.5	Dvourozměrová elektroforéza a imunodetekce s protilátkou Hs-23 na ureovém extraktu kančích spermií.....	50

3.4.6	Dvourozměrová elektroforéza a imunodetekce s protilátkou Hs-23 na ureovém extraktu JAR buněk.....	52
4.	DISKUSE	54
4.1	DEMEBRANIZACE A REAKTIVACE MOTILITY.....	54
4.2	IMUNOFLUORESCENCE S MONOKLONÁLNÍMI PROTILÁTKAMI NA PREPARÁTECH S KANČÍMI SPERMIEMI.....	56
4.3	MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKA Hs-23; CHARAKTERIZACE A JEJÍ VLIV NA MOTILITU SPERMIÍ.....	58
5.	SOUHRN VÝSLEDKŮ	60
6.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61

1. ÚVOD

1.1 OPLOZENÍ

Oplození je splynutí haploidních gamet opačného pohlaví a vznik diploidní zygoty s genetickou výbavou odlišnou od obou rodičů, která je základem budoucího embrya. Tohoto děje se účastní nejen proteiny, které jsou na membráně obou gamet, ale i proteiny a molekuly přítomné v reprodukčních orgánech (semenná plasma, proteiny oviduktu).

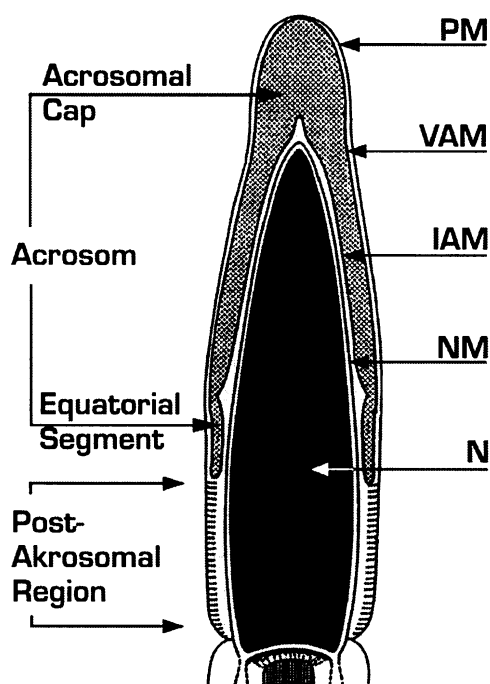
Nezbytným předpokladem pro úspěšné oplození je maturace obou gamet. Spermie savců musí projít maturací v nadvarleti (epididymis) a v reprodukčních orgánech samice (kapacitace), aby byly schopné oplození. Během ejakulace se spermie dostávají do styku se semennou plasmou, která je složena ze sekretu semenných vaků, prostaty, Cowperových žláz a nadvarlete. Semenná plasma obsahuje jak nízkomolekulární látky (Na^+ , K^+ , fruktosa, citrát, volné aminokyseliny), tak i látky o vyšších molekulových hmotnostech, jako jsou různé polypeptidy, glykoproteiny a enzymy [1,2]. Dále musí získat schopnost pohybu, bez kterého oplození není možné. Proteiny na povrchu spermie se účastní primární vazby spermie na vajíčko [1,3]. Po indukci akrosomální reakce dochází k sekundární vazbě spermie na vajíčko a uvolnění intra-akrosomálních proteinů, které umožňují průnik spermie přes zona pellucida vajíčka [4]. Fuse gamet pak spouští kaskádu dějů, které vedou k dělení oplozeného vajíčka a následujícímu embryonálnímu vývoji nového jedince [5].

1.2 STAVBA SPERMIE

1.2.1 Stavba hlavičky

Savčí spermie se skládá z hlavičky a bičíku. Hlavička (Obr. 1.1) obsahuje jádro, akrosom, cytoskeletální struktury (především aktin a tubulin) a malé množství cytoplasmy. Jádro spermie obsahuje haploidní genom. DNA je asociována se silně bazickými proteiny - protaminy, proto je chromatin spermie vysoce kondenzovaný. Akrosom vzniká během spermateliosy z Golgiho komplexu a je umístěn v apikální části hlavičky spermii

(nad jádrem spermie). Cytoskeletální struktury se nachází mezi akrosomem a jádrem a mezi akrosomem a plasmatickou membránou [6].



Obr. 1.1. Struktura hlavičky spermie

Hlavička spermie je složena z akrosomu (acrosom), akrosomální špičky (acrosomal cap), ekvatoriální oblasti (equatorial segment) a postakrosomální oblasti (postacrosomal region). Povrch je pokryt plasmatickou membránou (PM), pod ní se nachází vnější akrosomální membrána (VAM). Jádro (N) je pokryto jadernou membránou (NM), na níž leží vnitřní akrosomální membrána (IAM)[převzato z 5]

1.2.1.1 Akrosomální proteiny

Akrosom spermie je obklopen vnější a vnitřní akrosomální membránou a obsahuje strukturální i nestrukturní komponenty. Vlákničitá cytoskeletální struktura uvnitř akrosomu je spojena s vnější akrosomální membránou.

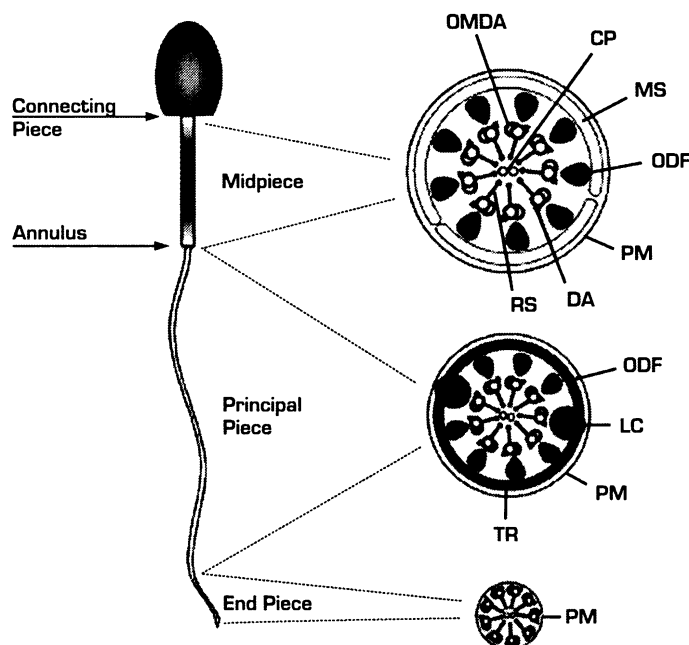
Akrosom obsahuje velké množství hydrolytických enzymů. Některé z těchto kyselých hydrolas se běžně vyskytují v lysozomech, jiné enzymy jsou specifické pro spermatogoidní buňky (akrosin, kyselá fosfatasa, β -galaktosidasa, hyaluronidasa, neuraminidasa, fosfolipasa, atd.). Proakrosin je nejlépe charakterizovaným enzymem akrosomu. Patří do rodiny serinových proteinas trypsinového typu [7]. C-koncová oblast proakrosinu je bohatá na prolin [8] a předpokládá se, že tímto koncem je proakrosin přichycen k membránám akrosomu. Na těžkém řetězci kančího proakrosinu byla

identifikována oblast vázající cukry, která se může účastnit vazby spermie se zona pellucida [9]. Vedle akrosinu je hyaluronidasa druhým nejvíce studovaným enzymem akrosomu. Stejně jako akrosin, i hyaluronidasa je vázána na vnitřní akrosomální membránu. Před splynutím spermie s plasmatickou membránou vajíčka štěpí hyaluronidasa hyaluronovou kyselinu v zona pellucida a v perivitellinním prostoru [5].

1.2.2 Struktura bičíku

Bičík savčích spermií se skládá ze čtyř částí (Obr. 1.2), které se strukturně liší – krček (connecting piece), střední část (midpiece, mitochondrial piece), hlavní část (principal piece) a koncová část (end piece).

Uvnitř bičíku spermie se nachází axonema probíhající po celé jeho délce, stejně jako vnější denzní vlákna těsně přiléhající k párům mikrotubulů. V hlavní části bičíku (principal piece) přechází denzní vlákna 3 a 8 v podélné sloupce fibrilární pochvy. Ve střední části bičíku (midpiece) je axonema s denzními vlákny obklopena mitochondriální pochvou, která v hlavní části přechází do fibrilární pochvy, v níž se mitochondrie již nevyskytují. Koncová část bičíku (end piece) je složena pouze z axonemy a plasmatické membrány [6]. Po celé délce bičíku je jeho povrch pokryt plasmatickou membránou (Obr. 1.2). Vnitřní struktura bičíku není u všech druhů živočichů stejná, některé druhy mají strukturu značně zjednodušenou (u ryb např. absence denzních vláken a fibrilární pochvy) [10].



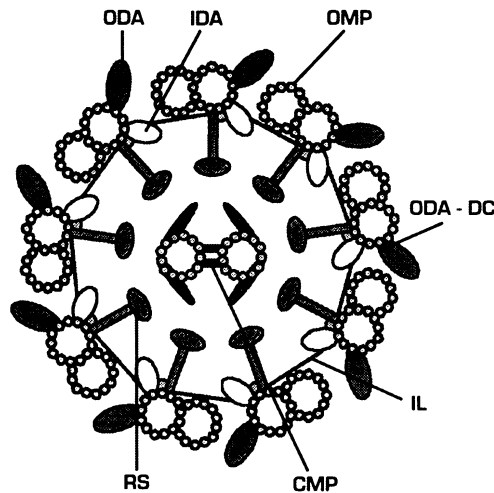
Obr. 1.2. Schéma stavby a struktury bičíku savčí spermie.

Krček (connecting piece) spojuje bičík s hlavičkou spermie; annulus odděluje mitochondriální část (midpiece) od hlavní části (principal piece). Průřez střední částí bičíku znázorňuje plasmatickou membránu (PM), mitochondriální pochvu (MS), devět vnějších denzních vláken (ODF), komponenty axonemy (OMDA) s asociovanými rameny dyneinů (DA), příčné spojky (RS) a centrální pár mikrotubulů (CP). V hlavní části bičíku jsou denzní vlákna 3 a 8 nahrazena podélnými sloupci (LC) tvořící s obvodovými žebry (TR) fibrilární pochvu. V koncové části bičíku je axonema obklopena pouze plasmatickou membránou [převzato z 11].

1.2.3 Axonema

Uspořádání axonemy savčích spermii je obdobné jako u cilií a bičíků různých organismů. Axonema je složeno z 9 párů vnějších mikrotubulů (A a B) uspořádaných do kruhu a 2 centrálních mikrotubulů (Obr. 1.3). Mikrotubuly jsou tvořeny α (56 kDa) a β (54 kDa) tubulinem.

Axonemální komplex tvoří vysoce organizovanou cytoskeletální strukturu uvnitř bičíku složenou z více než 250 proteinů. Prochází celou délkou bičíku a je s ním asociován např. dyneinový proteinový komplex, molekulární chaperony, Ca^{2+} - vazebné proteiny, proteinkinasy a proteinfosfatasy. Některé axonemální komponenty (kinesiny, myosiny, cytoplasmatické dyneiny) jsou zodpovědné za intraflagelární transport prekurzorů proteinů po celé délce bičíku [12].



Obr. 1.3. Průřez axonemou spermie

Centrální pár mikrotubulů (CMP) se nachází uprostřed axonemy, je obklopen 9 páry vnějších mikrotubulů (OMP). S mikrotubuly jsou asociována vnitřní (IDA) a vnější (ODA) ramena dyneinů. Tato ramena jsou ukotvena přes komplex proteinů (ODA-DC). Jednotlivé vnější mikrotubuly jsou propojeny mezi sebou mezitubulárními spojkami (IL) a s centrálním párem mikrotubulů příčnými spojkami (RS) [převzato z 13].

Axonemální dyneiny jsou ATPasy, skládající se ze dvou ramen - vnitřního a vnějšího. Ta jsou asociována s přilehlými mikrotubuly.

Vnější dyneinové rameno, které je k mikrotubulu vázáno komplexem proteinů ODA-DC (outer dynein arm docking complex), je tvořeno dvěma těžkými řetězci α a β (~ 500 kDa), třemi až pěti středními řetězci (120 – 60 kDa) a šesti lehkými řetězci (30 – 8 kDa) [13, 14]. Každý těžký řetězec obsahuje AAA domény, které jsou zodpovědné za vazbu ATP. Střední řetězce hrají možnou roli ve vazbě dyneinu na A mikrotubul, lehké řetězce fungují jako spojovací článek. [14].

Na vnitřních ramenech se nacházejí proteiny, které jsou fosforylovány při iniciaci motility a hrají klíčovou úlohu při aktivaci celého vnějšího dyneinového ramene [15], s nímž je asociován např. protein kalmodulin, který je zapojen do Ca^{2+} signální dráhy [16].

1.2.4 Vnější denzní vlákna (outer dense fibers)

Devět vnějších denzních vláken vytváří s axonemou komplex 9 + (9 + 2) procházející mitochondriální a hlavní částí bičíku (Obr. 1.2). Velikost a tvar vnější denzních vláken se liší mezi druhy. Vlákna se rozšiřují na konci mitochondriální části. Vlákna 3 a 8 se na přechodu hlavní části mění v podélné sloupce fibrilární pochvy (Obr. 1.2). Proteiny

vnějších denzních vláken obsahují vysoký podíl cysteinů a prolinů. Během epididymální maturace (viz. 1.3.1.2) dochází k tvorbě disulfidických můstků, které se uplatňují ve stabilizaci proteinů vnějších denzních vláken. Disulfidické můstky dodávají vláknům elastické vlastnosti, vlákna tak tvoří pružnou obálku bičíku spermie, která odolává tlakům během transportu nadvarletem a během ejakulace [6].

Vnější denzní vlákna jsou úzce asociována s axonemou a dyneinovými ATPasami, ale nehrají aktivní roli ve flagelárním pohybu [6].

1.2.5 Mitochondriální pochva (mitochondrial sheath)

Mitochondriální pochva leží nad vnějšími denzními vlákny ve střední části spermie a obsahuje mitochondrie. Velikost a uspořádání mitochondrií je u různých druhů odlišná.

Mitochondriální pochva je asociována s komplexem filament, které udržují uspořádání mitochondrií ve střední části [6].

Další komponentou střední části je mitochondriální kapsulární protein (MCP). Tento fibrilární protein, obsahující velké množství prolinů a cysteinů, váže selen a vytváří nerozpustné pouzdro kolem mitochondrií. Nedostatek selenu způsobuje dezorganizaci mitochondriální části [6].

1.2.6 Fibrilární pochva (fibrous sheath)

Fibrilární pochva pokrývá hlavní část bičíku po celé její délce (Obr. 1.2). Leží pod plasmatickou membránou, ale není s ní přímo spojená. Fibrilární pochva má tvar zužujícího se válce tvořeného dvěma podélnými sloupci (longitudinal columns) propojenými obvodovými žebry (circumferential ribs). Sloupce jsou tvořené podélně orientovanými filamentárními strukturami, které leží podél mikrotubulů 3 a 8 a jsou spojené s vnějšími denzními vlákny 3 a 8. Tvar a velikost se liší mezi různými druhy savců. Obvodová žebra jsou tvořena příčně orientovanými filamenti. Rozšiřují se ke konci bičíku, kde splývají s podélnými sloupci [6].

Funkce fibrilární pochvy je regulovat flagelární pohyb v rovině centrálního páru axonemálních mikrotubulů a zároveň omezují pohyb kolmý na tuto rovinu [6]. Fibrilární

pochva také funguje jako ukotvení některých enzymů energetického metabolismu a molekul signálních kaskád regulujících pohyb. Hlavní proteiny, které souvisí s přenosem signálu, jsou z rodiny AKAP (A kinase anchoring proteins).

Protein AKAP4 (AKAP82) je syntetizován z prekursoru po transportu do vyvíjejících se bičíků. Prekursor, stejně jako fosforylovaná forma proteinu, váže RII regulační podjednotku proteinkinasy A (PKA) [17].

Protein AKAP3 (AKAP110) se nachází v příčných žebrech spermií, má 40 % homologii s AKAP4 a prochází tyrosinovou fosforylací během kapacitace [18]. Byl nalezen také v akrosomu kančích spermií [17]. Bylo zjištěno, že AKAP3 také interaguje s PKA a s dalšími proteiny signálních kaskád [19, 20].

1.3 POHYB BIČÍKU

Pro normální oplození je nezbytná dobrá pohyblivost spermií. Bezprostředně po spermiogenesi však spermie vykazuje nízkou pohyblivost a není schopna oplození. Proto je potřeba, aby došlo ke změnám vedoucím k iniciaci a posléze hyperaktivaci motility.

Většina savčích spermií je schopná vykazovat dva druhy motility: motilita ejakulovaných spermií a hyperaktivovaná motilita kapacitovaných spermií, která nastává v místě fertilizace, tzn. u savců v reprodukčním orgánu samice [5].

1.3.1 Charakter pohybu spermie během vývoje

1.3.1.1 Charakter pohybu ve varleti

Samčí pohlavní buňky vznikají v semenotvorných kanálcích varlete, kde také probíhá jejich počáteční vývoj - spermatogenese a další, převážně morfologické změny - spermateliosa. Výsledkem tohoto složitého procesu jsou plně diferencované samčí haploidní gamety – spermie, které nejsou ve varlatech většiny savců pohyblivé. Pouze spermie několika málo druhů savců vykazují po izolaci z varlat pohyb [5].

1.3.1.2 Charakter pohybu během epididymální maturace

Z varlat jsou spermie transportovány do nadvarlete, kde probíhá jejich zrání (epididymální maturace). Plasmatická membrána spermie je zde vystavena působení epididymální tekutiny. Mění se fyzikální a chemické vlastnosti membránových lipidů, do membrány spermií je zabudován cholesterol a mění se také distribuce intramembránových proteinů a glykoproteinů. Spermie zde získávají schopnost interagovat s vajíčkem.

Během maturace v nadvarleti dochází také k vývoji motility spermie. Nadvarle produkuje mnoho faktorů (biochemických signálů) schopných iniciovat pohyb spermie. V nadvarleti dochází k tvorbě cAMP, aktivaci proteinkinasy A a fosforylaci proteinů na bičíku spermie. Tyto faktory se podílí na vzniku aktivního, avšak tzv. neprogresivního pohybu bičíku. Maturované spermie v nadvarleti tedy ještě nejsou schopny oplození vajíčka [5].

1.3.1.3 Charakter pohybu během ejakulace

Při ejakulaci přicházejí epididymální spermie do styku se semennou plasmou. Některé z proteinů přítomné v semenné plasmě pokrývají povrch spermie a jsou důležité pro primární vazbu spermie na vajíčko [3].

Při ejakulaci spermie vzhledem k „maskování“ důležitých receptorů nejsou schopny přímé interakce s vajíčkem. V důsledku změny koncentrací intracelulárních iontů a pH v prostředí semenné plasmy však dochází k progresivnímu pohybu ejakulovaných spermií.

Vzrůst aktivity adenylátcyklasy, aktivace cAMP-dependentních proteinkinás a následná fosforylace proteinů hrají v iniciaci a udržení motility spermií klíčovou roli [5].

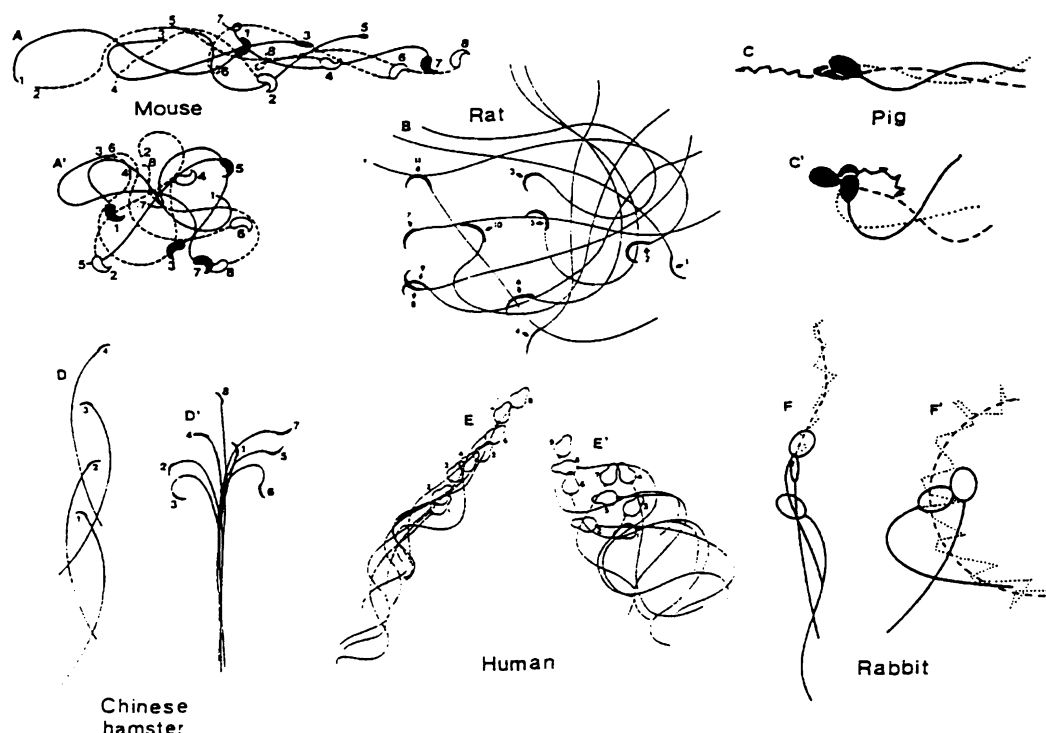
1.3.1.4 Charakter pohybu v samičím pohlavním traktu

Ejakulované spermie prochází samičím reprodukčním traktem, váží se na glykoproteiny na stěně oviduktu a tvoří tak oviduktální rezervoár, v němž jsou spermie udržovány ve fertilním stavu. Spermie v rezervoáru mají sníženou schopnost pohybu, což naznačuje přítomnost inhibitoru motility [21].

1.3.1.5 Charakter pohybu během kapacitace

Spermie savců v oviduktálním rezervoáru prochází další maturací (kapacitací), představující komplex funkčních změn nutných k úspěšnému oplození vajíčka. Kapacitace zahrnuje změny v koncentracích intracelulárních iontů Na^+ , K^+ a Ca^{2+} , metabolismu a především změny v plasmatické membráně spermie. Dochází k odstranění dekapacitačních faktorů a destabilizaci membrány v důsledku uvolnění cholesterolu. Během kapacitace vazebná afinita spermií ke stěně oviduktu klesá a spermie se postupně uvolňují v závislosti na jejich individuálním stupni připravenosti i na stupni maturace a ovulace oocytů [5].

Během kapacitace se kromě plasmatické membrány dramaticky mění i celkový metabolismus spermatické buňky. Zvyšuje se spotřeba energie, stoupá intracelulární pH a výrazně se mění i charakter pohybu spermií - dochází k hyperaktivaci motility. Ta je představována zvýšením motility spermií i změnou jejich pohybu [6, 22, 23]. Lze pozorovat zesílení pohybu bičíku, výraznější přesuny hlavičky do stran a nelineární trajektorii pohybu (Obr. 1.4). Předpokládá se, že změny motility jsou nutné k pohybu spermií v tekutině oviduktu [24] a hlavně k úspěšné penetraci přes vaječné obaly [25]. Hyperaktivace se však může podílet i na uvolňování kapacitovaných spermií z epithelu v isthmu vejcovodu [26].



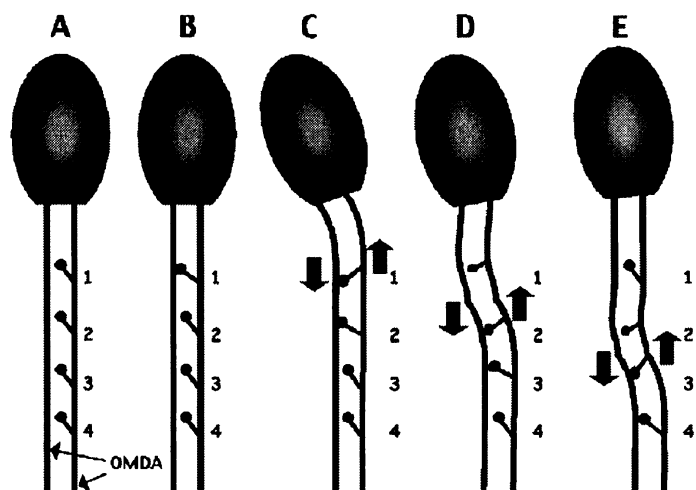
Obr. 1.4. Změny charakteru pohybu při hyperaktiavci

(A-F) Charakter pohybu před hyperaktivací; (A'-F') Charakter pohybu během hyperaktivace [převzato z 5].

Na řízení změn pohybu spermií se podílí mimo jiné zvýšená koncentrace Ca^{2+} , cAMP, ATP, adenylátcyklasa a proteinkinasa A [27]. V této souvislosti byly na bičíku nalezeny také G-proteiny a další proteinkinasy.

1.3.2 Molekulární mechanismus pohybu

Dyneinová ramena (viz. 1.2.2) jsou vázaná na každý z devíti mikrotubulů a směřují obráceně ke směru mikrotubulů. Vzájemné klouzání mikrotubulů je výsledkem ATP-dependentní interakce dyneinového ramene s příslušným párem mikrotubulu (Obr. 1.5). Protože dyneiny vyvolávají pohyb pouze v jednom směru (k zápornému konci mikrotubulu) [28], vlnění bičíku závisí na jejich fosforylaci/defosforylaci (aktivaci/inaktivaci), která se objevuje asynchronně podél celého bičíku [11]. Centrální pár mikrotubulů s příčnou spojkou (radial spoke) zprostředkovává regulaci dyneinů Ca^{2+} signální kaskádou [29].



Obr 1.5. Schéma mechanismu tvorby pohybu pomocí axonemálních dyneinů

Paralelní linie představují pár mikrotubulů (OMDA = outer microtubule doublets of axoneme) a čísla 1-4 jednotlivé páry dyneinových ramen (vnitřní a vnější). (A) Dyneiny jsou inaktivní, negenerují pohyb. (B) První pár dyneinových ramen váže příslušný mikrotubulus. (C) První pár dyneinových ramen mění konformaci a tím generuje pohyb; váže se druhý pár dyneinových ramen. (D) První pár se uvolňuje, druhý pár generuje pohyb, třetí pár se váže: to způsobuje vlnění bičíku směrem dolů. (E) Opakování sekvence - druhý pár se uvolňuje, třetí pár generuje pohyb, čtvrtý pár se váže. Synchronizaci dyneinů u všech devíti mikrotubulů zajišťuje centrální pár s příčnou spojkou [převzato z 11].

1.3.3 Regulace pohybu

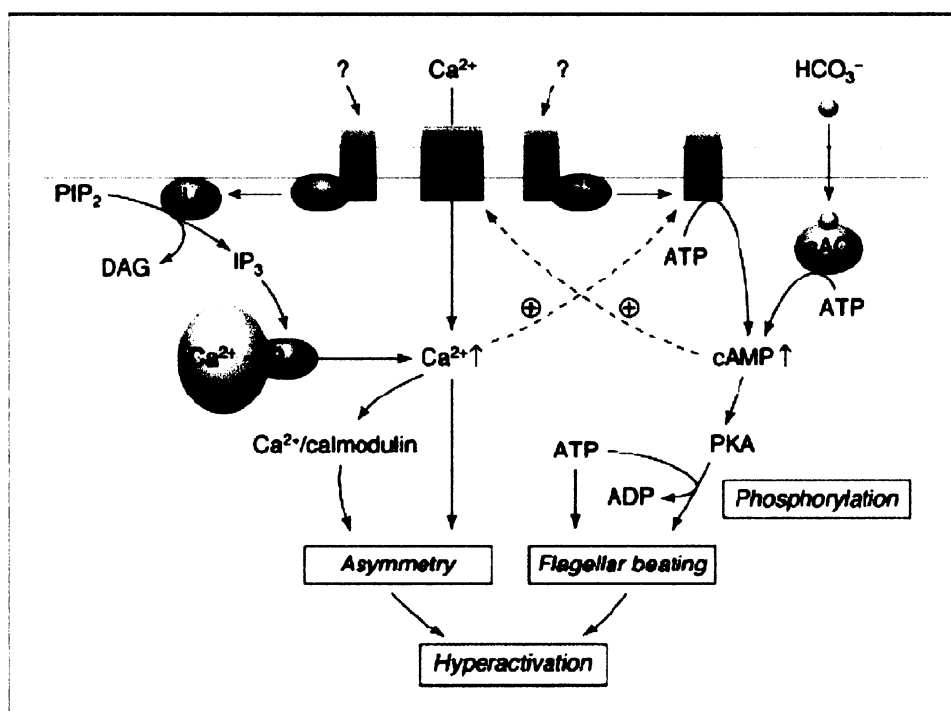
Fosforylace a defosforylace axonemálních dyneinů je nezbytná pro regulaci pohybu bičíku. V jednotlivých fázích zrání spermie (viz. 1.3.1) dochází k její interakci s různými biochemickými signály, které iniciují jednotlivé signální dráhy regulující motilitu spermií. Za nejvýznamnější signální dráhy, které se uplatňují v regulaci motility savčích spermií lze považovat cAMP/PKA signální dráhu a Ca^{2+} signální dráhu [30].

1.3.3.1 cAMP/proteinkinasa A signální dráha

Aktivovaná proteinkinasa A (PKA), která je koncovou kinasou signální dráhy reprezentované druhým poslem cAMP, fosforyluje seriny/threoniny cílových proteinů na bičiku [31].

Cyklický adenosin-3',5'-monofosfát (cAMP) vzniká z ATP působením enzymu adenylátcyklasy (AC). Ta je vázána na vnitřní straně plasmatické membrány (Obr. 1.6) a k její aktivaci dochází prostřednictvím aktivované $G\alpha$ podjednotky stimulujícího G-proteinu (Gs-proteinu). Intracelulární hladinu cAMP reguluje vedle adenylátcyklasy také cAMP fosfodiesterasa, která kontinuálně hydrolyzuje cAMP na AMP [32].

Cyklický AMP realizuje přenos signálu aktivací cAMP-dependentní proteinkinasy A prostřednictvím Gs-cAMP dráhy. Enzym PKA je složen ze dvou katalytických ($C\alpha 1$ a $C\alpha 2$) a dvou regulačních ($R I\alpha$ a $R II\alpha$) podjednotek [33, 34]. Aktivace je zahájena vazbou cAMP k regulační podjednotce PKA. To vede k disociaci a následné aktivaci katalytické podjednotky, která se pak účastní fosforylace různých proteinových substrátů a mění tak jejich funkční vlastnosti [35]. Enzym PKA se nachází např. v blízkosti vnějšího dyneinového ramene, jehož lehké rameno je PKA fosforylováno, čímž dochází k iniciaci motility [15, 36].



Obr. 1.6. Schéma signálních drah zahrnutých v regulaci motility [převzato z 43].

Pro cílenou aktivitu PKA je důležité její ukotvení k bičíku přes AKAP proteiny. Ty jsou vázané ve fibrilární pochvě a jsou PKA fosforylovány. Stejně jako v somatických buňkách, AKAP proteiny ukotvují na stejném místě nejen PKA, ale také fosfatasy, které proteiny naopak defosforylují [37].

Kromě závislosti PKA na cAMP byla popsána její další funkce, tentokrát bez účasti cAMP. Ke stimulaci PKA může dojít také prostřednictvím aktivované podjednotky G 13 proteinu ($G\alpha_{13}$). Tato podjednotka přímo reaguje s proteinem AKAP110 a vytváří se komplex PKA-AKAP110- $G\alpha_{13}$. V tomto komplexu $G\alpha_{13}$ indukuje uvolnění katalytické podjednotky PKA, což vede k aktivaci její kinasové aktivity. Na základě těchto informací lze předpokládat, že s G-proteiny asociované receptory, které nejsou spjaty s Gs-cAMP dráhou, mohou také potenciálně stimulovat PKA a tím regulovat velké množství buněčných funkcí. V důsledku regulace aktinového cytoskeletu prostřednictvím $G\alpha_{13}$ byl navíc popsán možný vliv $G\alpha_{13}$ -AKAP110 na motilitu spermií, která je blokována porušením interakce AKAP110-PKA [38].

1.3.3.2 Ca^{2+} signální dráha

Bylo dokázáno, že extracelulární Ca^{2+} je zahrnutý v iniciaci motility (Obr. 1.6), je to také jeden z primárních faktorů hyperaktivace motility [25]. Extracelulární Ca^{2+} se dostává do bičíku přes různé kanály [39, 40, 41]. Některé jsou umístěné specificky pouze na bičíku a mají roli v regulaci motility [39].

Bylo prokázáno, že také intracelulární Ca^{2+} je zahrnut do regulace iniciace a hyperaktivace motility (Obr. 1.6). Uvolnění Ca^{2+} z intracelulárních zásob způsobuje inositol-1,4,5-trifosfát (IP_3), který je zapojen do fosfatidylinositolové dráhy. Fosfatidylinositol v membráně je fosforylován a vzniká fosfatidylinositol-4',5'-bisfosfát (PIP_2). Signálem aktivovaný G-protein (Gp-GTP) přepojuje tento signál z receptoru do intracelulární dráhy, kde aktivuje membránový enzym fosfolipasu C (PLC). Enzym PLC následně štěpí PIP_2 na IP_3 a diacylglycerol (DAG). Protein G pak hydrolyzuje své GTP a tím se inaktivuje [42].

Vznikající IP_3 a DAG působí jako druzí poslové. Do cytoplasmy difundující IP_3 řídí mobilizaci intracelulárních zdrojů Ca^{2+} . Způsobuje otevírání Ca^{2+} kanálů a uvolňování Ca^{2+} z endoplasmatického retikula do cytoplasmy, DAG aktivuje proteinkinasu C (PKC) [42].

Intracelulární zdroj Ca^{2+} v bičíku spermie však není dosud prozkoumán. V bičíku chybí endoplasmatické retikulum, jediný možný zdroj intracelulárního Ca^{2+} by mohl pocházet z jaderného obalu, který zasahuje do oblasti krčku spermie [43].

Ionty Ca^{2+} působí dvěma různými mechanismy. Mohou společně s HCO_3^- aktivovat rozpustnou adenylátcyklasu (sAC), která zvyšuje množství cAMP aktivujícího PKA [44].

Druhý mechanismus (nezávislý na sAC) spočívá ve vazbě Ca^{2+} na protein kalmodulin, který funguje jako intracelulární receptor Ca^{2+} . Kalmodulin se dále váže na kalmodulin-dependentní kinasu II (CaM-KII), která fosforylací cílových proteinů stimuluje iniciaci a hyperaktivaci motility [45]. Bylo prokázáno, že Ca^{2+} reguluje aktivitu dyneinů aktivací signální kaskády zahrnující CaM/CaM-KII [46].

Opačný efekt má vazba Ca^{2+} /CaM na serin/threonin fosfatasu calcineurin. Dochází k defosforylaci proteinů, která vede k inhibici motility [16].

Z těchto informací vyplývá, že CaM/CaM-KII/calcineurin jsou hlavní komponenty Ca^{2+} signální dráhy zapojené v regulaci motility spermií.

1.4 ENERGETICKÝ METABOLISMUS

Axonemální dyneiny potřebují ke své práci velké množství ATP. Předpokládá se, že ATP pro pohyb je dodáváno z mitochondrií, kde je jeho tvorba oxidační fosforylací mnohem efektivnější než tvorba ATP během glykolýzy. Mitochondrie se vyskytují pouze ve střední části bičíku, narozdíl od dyneinů, jež jsou lokalizovány po celé délce axonemy a tedy v relativně velké vzdálenosti od mitochondrií. Bylo popsáno, že difuze není pro pokrytí spotřeby ATP dostačující [47]. Z tohoto důvodu existují i další procesy zajišťující transport ATP do vzdálených částí bičíku. Dále byla zjištěna existence fosfokreatinových člunků (PCr shuttles), které jsou schopné zajistit přenos aktivovaného fosfátu i do vzdálenějších oblastí [48]. Enzymy asociované s fosfokreatinovým člunkem byly detekované u spermií mořského ježka [49], nejsou však přítomné u kančích a býčích spermií [50] a u většiny ostatních savců mají velmi nízkou aktivitu [51, 52].

Spermie různých druhů mají tedy různé požadavky na tvorbu energie glykolýzou nebo oxidační fosforylací. Například savčí spermie pro tvorbu ATP využívají převážně glykolýzu [53]. V pokusech na myších bylo dokázáno, že spermie, které mají defektní mechanismus mitochondriální oxidační fosforylace, jsou i přes to schopné fertilizace.

Takové spermie stále v menším množství produkují ATP a zůstává zachována snížená motilita [54]. Další důkaz významu glykolýzy na bičíku poskytuje studie na knock-outovaných myších. Cílená delece genu specifické formy glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasy lokalizované ve fibrilární pochvě vedla ke sterilitě myších samců v asociaci s některými aberacemi motility [55].

1.4.1 Glykolytické enzymy

Na bičíku spermie velmi dobře funguje propojení energetických drah. Při glykolýze se glukosa odbourává na pyruvát a vznikají 2 molekuly ATP. Pyruvát je pak transportován do mitochondrií, oxidován vzdušným kyslíkem za vzniku oxidu uhličitého a vody. Z každé molekuly glukosy ještě dále vzniká 30 molekul ATP. Glykolýza je nutná pro velkou produkci energie vyžadovanou pro pohyb bičíku, proto se na bičíku nachází velké množství všech glykolytických enzymů [56].

Bylo dokázáno, že některé glykolytické enzymy jsou asociovány s mikrotubuly [56, 57, 58, 59, 60]. Byla objasněna také vazebná místa glykolytických enzymů na mikrotubulech. Karboxy-terminální konec tubulinu na povrchu mikrotubulů má velký záporný náboj [61]. Většina glykolytických enzymů má izoelektrický bod vyšší než 8,0 [aldolasa, glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasa, hexokinasa, pyruvátkinasa] a při fyziologickém pH tedy mají kladný náboj, takže mohou reagovat se záporným nábojem na karboxy-terminálním konci tubulinu iontovou silou [59, 62]. Enzym 1-fosfofruktokinasa, podobně jako enolasa 1, je přímo asociován s tělem mikrotubulu [59, 63].

U některých glykolytických enzymů bylo zjištěno, že vazba na mikrotubulus částečně redukuje jejich aktivitu a tím může docházet k regulaci glykolýzy [64]. Týká se to glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasy [56], aldolasy [62, 65] a 1-fosfofruktokinasy [66]. Pro dva glykolytické enzymy, jejichž izoformy jsou specifické pouze pro spermii slouží jako lešení fibrilární pochva spermie. Jedná se o glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasu (GAPDH-S) a hexokinasu 1 (HK1-S). Enzym GAPDH-S má 71 % homologii s GAPDH ostatních somatických buněk a nachází se již ve stadiu spermatid [67]. Oba enzymy jsou pevně vázané na nerozpustnou strukturu fibrilární pochvy a zůstávají na bičíku i po působení Tritonu X-100 [68].

1.4.1.1 Enolasa 1

Enolasa 1 (EC 4.2.1.11) je glykolytický enzym přítomný na spermii, který při glykolytickém štěpení katalyzuje přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát. V eukaryotických buňkách existují 3 izoformy tohoto enzymu – 1, 2 a 3 (**a**, **b** a **g**), které jsou kódovány různými geny. Izoforma 1 (**a**) se vyskytuje ve všech tkáních, izoforma 2 (**b**) ve svalu a izoforma 3 (**g**) je specifická pro neurony [69].

Studie naznačují, že enolasa 1 není rozptýlená v cytoplasmě, ale je vázaná na strukturní komponenty. Stejně jako některé ostatní glykolytické enzymy je ve spermii enolasa 1 asociovaná s mikrotubuly, byla také nalezena v asociaci s centrosomy [64, 69, 70, 71].

Expres a lokalizace izoform enolasy byla studována během spermatogeneze krysy. Enolasa 1 byla lokalizována pouze na bičíku zralých spermií. Na spermii nebyly nalezeny formy 2 a 3. Ve varlatech krysy bylo nalezena přítomnost izoformy 3. Studium asociace enolasy s mikrotubuly ukázalo, že v peletě s izolovanými mikrotubuly se nachází i určité množství enolázy. V přítomnosti nadbytku ATP však bylo množství enolasy sníženo. Toto zjištění naznačuje, že se jedná pravděpodobně o kontrolu aktivity enolasy pomocí ATP. Aktivita enolasy 1 byla velmi malá nebo žádná v primárních spermatocytech a spermatidách, největší míra aktivity byla nalezena ve zralých epididymálních spermiích [72].

Na lidských spermiích byla měřena aktivita celkové enolasy a jejích jednotlivých forem. Pro tuto studii byly použity spermie s normálními a abnormálními parametry podle kritérií WHO. Celková enolasová aktivita byla naměřena vyšší u abnormálních spermiích, zde bylo také naměřeno větší množství enolasy 1. Po oddělení spermií obsahujících residuální cytoplasmu (Percollový gradient) byla aktivita enolasy 1 srovnatelná s aktivitou normálních spermií. Enolasa 1 je tedy pravděpodobně přítomná v residuální cytoplasmě a její zvýšená aktivita může být markerem nezralosti spermií [73], podobně jako aktivita některých dalších glykolytických enzymů, např. glukosa-6-fosfát dehydrogenasy nebo laktátdehydrogenasy [74, 75].

Vedle enolasy 1 byla na spermiích detekována další forma – enolasa S, izoforma specifická pouze pro spermie [76]. V testikulárních, epididymálních a ejakulovaných lidských spermiích byly nalezeny 3 izoformy enolasy S (S1, S2 a S3) lišící se v molekulové hmotnosti. V testikulárních spermiích byla nalezena izoforma S1 a S3, v epididymálních a ejakulovaných spermiích pouze izoforma S2, což může znamenat,

že během maturace dochází k modifikaci S1 a S3 izoformy na izoformu S2. Izoforma S2 tak může sloužit jako marker pro epididymální maturaci [77].

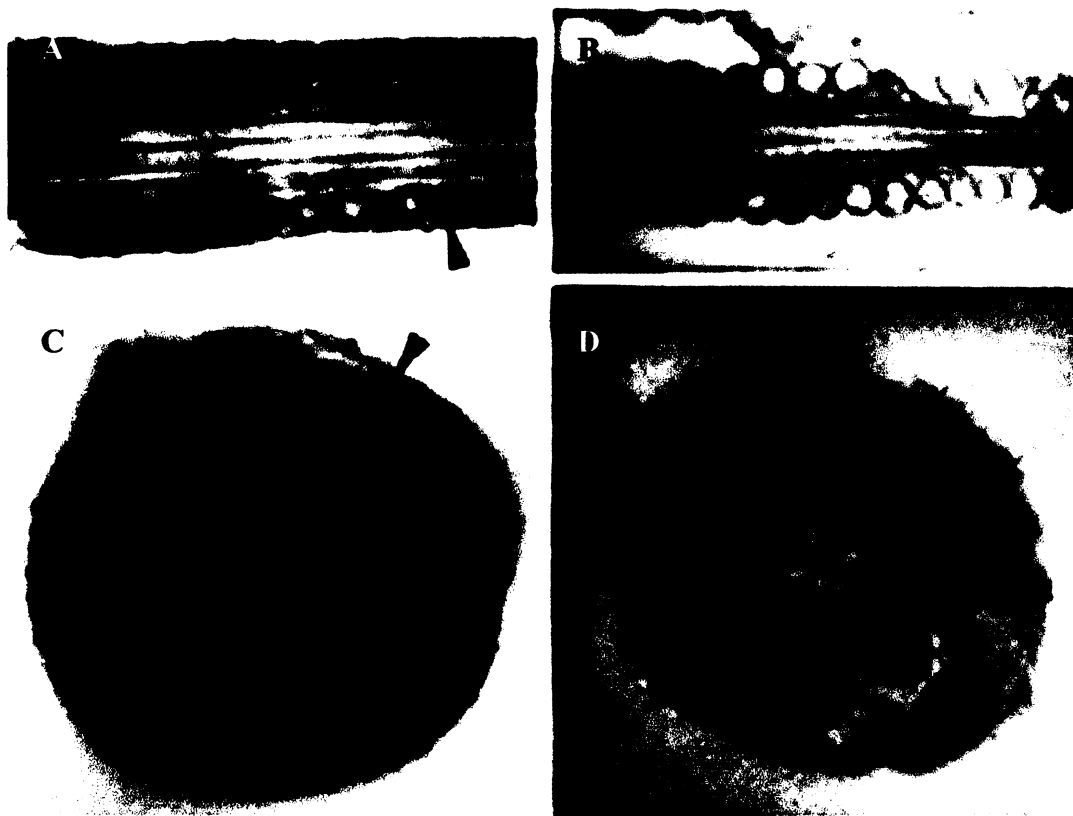
1.5 DEMEMBRANIZACE A REAKTIVACE SAVČÍCH SPERMIÍ

Metoda demembranizace a reaktivace je vhodná pro studium molekulárních mechanismů a struktur bičíku zapojených do motility spermií. Působením detergentu (Triton X-100) je odstraněna plasmatická membrána spermie, důsledkem je ztráta motility spermie. Následuje reaktivace pohybu přidavkem ATP. Model demembranizovaných spermií poskytuje možnost přímého působení různých iontů a substrátů na axonemu, aniž by musely procházet cytoplasmatickou membránou bičíku. Účinek těchto iontů a substrátů může být sledován okamžitě.

Demembranizované a reaktivované spermie byly použity např. pro studium hyperaktivace býčích spermií, při které bylo zjištěno, že Ca^{2+} ionty v koncentraci 50-400 nM a zvýšené množství ATP spouští jejich hyperaktivaci (narozdíl od cAMP, jehož vliv nebyl pozorován). Spermie byly demembranizovány roztokem obsahujícím 0,2 % Triton X-100. Z Obr. 1.7 je patrný rozdíl mezi intaktními a demembranizovanými spermii [78].

V jiných studiích byly demembranizované myší spermie použity k pozorování strukturních komponent zapojených v aktivaci axonemy. Po demembranizaci a reaktivaci byla k suspenzi spermií přidávána redukční činidla DTT nebo 2-merkapthoethanol a bylo pozorováno vyhřeznutí mikrotubulů způsobené degradací disulfidických můstků [79].

Přídavek proteáz k demembranizovaným savčím spermii, např. trypsinu [80] nebo elastáz [23, 81] způsobil také vyhřeznutí mikrotubulů v důsledku degradace příčných spojek.



Obr. 1.7. Elektronmikroskopické snímky býčích intaktní a demembranizovaných spermií

Podélný průřez mitochondriální části býčí spermie intaktní (A) a demembranizované (B). Příčný průřez mitochondriální části bičiku býčí spermie intaktní (C) a demembranizované (D) [převzato z 78].

1.6 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

Monoklonální protilátky jsou dobrým nástrojem k charakterizaci vybraných proteinů. Mohou sloužit jako morfologické, biochemické a fyziologické próby.

Monoklonální protilátky mohou být použity k charakterizaci neznámého proteinu (biologická a biochemická charakterizace) a zjištění jeho pravděpodobné funkce v buňce. Například u spermií mohou monoklonální protilátky napomoci odhalení vazebné funkce cílového proteinu na zona pellucida vajíčka. Pokud se jedná o vazebný protein, navázaná protilátka tuto funkci blokuje [4, 82].

Monoklonální protilátky připravené proti intra-akrosomálním proteinům se využívají pro hodnocení stavu akrosomu, jsou tedy dobrými biomarkery pro testování poškození spermií [83, 84, 85] a mají široké použití v centrech asistované reprodukce. Protilátky mohou být též použity v experimentech, kde je patologický stav navozen (např. podáváním

endokrinních disruptorů) a jejich prostřednictvím je možné testovat míru poškození spermií [86, 87, 88].

1.7 CÍL PRÁCE

Cílem předložené práce bylo zavedení metody demembranizace a reaktivace savčích spermií jako nástroje pro studium motility, která je nezbytným předpokladem úspěšného oplození. Metoda by nejen umožnila podrobné studium proteinů a molekul, které jsou pro tento děj nezbytné, ale mohla by napomoci vysvětlit např. ztrátu motility u patologických spermií.

Dalším cílem práce byla detekce vybraných proteinů savčích spermií pomocí připravených monoklonálních protilátek na intaktních a demembranizovaných spermiích, poskytující novou možnost studia jejich lokalizace.

Posledním cílem bylo využití nové monoklonální protilátky Hs-23 k charakterizaci odpovídajícího detekovaného proteinu na normálních kančích spermiích a ejakulovaných lidských spermiích s normálním spermioqramem.

2. MATERIÁL A METODY

2.1 CHEMIKÁLIE

3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfát hydrát (CHAPS)	Sigma, USA
Aceton	Lachema, ČR
Adenosindifosfát (ADP)	Sigma, USA
Adenosintrifosfát (ATP)	Sigma, USA
Agarosa	Lachema, ČR
Akrylamid	Fluka, Německo
Bromfenolová modř (BFB)	Lachema, ČR
Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB)	Serva, Německo
Dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát)	Lachema, ČR
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Německo
Dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma, USA
Dusičnan stříbrný	Lachema, ČR
Ethanol	Lachema, ČR
Fetální telecí sérum (FCS)	Sevapharma, ČR
Formaldehyd	Lachema, ČR
Fruktosa-6-fosfát	Serva, Německo
Fruktosa-1,6-bisfosfát	Serva, Německo
Glukosa	Lachema, ČR
Glukosa-6-fosfát	Serva, Německo
Glutamát draselný	Sigma, USA
GaM-Px	Bio-rad, USA
Glycin	Lachema, ČR
Hovězí sérový albumin (BSA)	Serva, Německo
Hydroxid sodný	Lachema, ČR
Hydrogenuhlíčitan sodný	Lachema, ČR
Chlorid draselný	Lachema, ČR
Chlorid sodný	Lachema, ČR

Chlorid vápenatý	Sigma, USA
IPG pufr	GE Healthcare, USA
Jodacetamid	Sigma, USA
Kyselina bichinoninová (BCA)	Fluka, Německo
Kyselina ethylendiamin-tetraoctová (EDTA)	Lachema, ČR
Kyselina chlorovodíková	Lachema, ČR
Kyselina N-(2-hydroxyetyl)piperazin-N'-2-etansulfonová (HEPES)	Serva, Německo
Kyselina octová	Lachema, ČR
Kyselina sírová	Lachema, ČR
Merkapthoethanol	Serva, Německo
Methanol	Lachema, ČR
N,N'- methylen-bisakrylamid (BIS)	Serva, Německo
N,N,N',N'-tetramethylenethylendiamin (TEMED)	Serva, Německo
Tris (hydroxymethyl) aminomethan (TRIS)	Serva, Německo
Percoll	Sigma, USA
Peroxid vodíku	Lachema, ČR
Persulfát amonný (APS)	Serva, Německo
Pyruvát sodný	Serva, Německo
RPMI 1640	Sigma, ČR
Sacharosa	Lachema, ČR
Síran amonný	Lachema, ČR
Síran hořečnatý (heptahdrát)	Lachema, ČR
Síran měďnatý	Lachema, ČR
SWaM-Px	Sigma, USA
SWaM-FITC	Sigma, USA
Thiosíran sodný	Lachema, ČR
Triton X-100	Sigma, USA
Tween 20	Sigma, USA
Uhličitan vápenatý	Lachema, ČR
Urea	Serva, Německo
Ustalovací roztok	Sigma, USA
Vectashield H-1000 s DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol dilaktát)	

Vyvíjecí roztok

Vinan sodný

Vector Laboratories, USA

Sigma, USA

Lachema, ČR

2.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Ejakulované lidské spermie byly získány ze Sexuologického ústavu, Praha. Poskytnutí ejakulovaných spermií bylo provedeno na základě písemného souhlasu pacientů, další testování vzorků bylo anonymní. Hodnocení lidských ejakulátů bylo provedeno ve shodě se standardy Světové zdravotnické organizace (WHO, 1999). K pokusu byly použity ejakulované lidské spermie s normálním spermiogramem.

Kančí spermie byly získány z inseminační stanice Klimětice, k pokusu byly použity spermie dobré kvality (motilní, bez morfologických defektů).

Buňky JAR (cytotrofoblastová linie) byly získány z Ústavu péče o matku a dítě v Podolí, Praha.

2.3 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

V pokusech byly použity monoklonální protilátky připravené na Oddělení biologie a biochemie fertilitace (nyní Laboratoř diagnostiky pro reprodukční medicínu) Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Praha. Jednalo se o protilátky připravené proti proteinům lidských spermií, a to protilátka Hs-8 [9] a Hs-14 [84, 85, 89] proti intra-akrosomálním proteinům a protilátka Hs-23 proti doposud neidentifikovanému proteinu lidských spermií. Dále byla použita monoklonální protilátka ACR.2 proti kančímu akrosinu [83, 90].

2.4 METODY

2.4.1 Zpracování spermií

2.4.1.1 Promývání spermií

Ejakulované spermie (lidské, kančí) byly centrifugovány (200g; 15 – 20 min; RT), aby byly odděleny od semenné plasmy. Semenná plasma (supernatant) byla odebrána a dále zpracována (viz. 2.4.2). Peleta se spermiemi byla 3 x promyta v PBS (200g; 15 - 20 min; RT; Tab. 2.1) a nakonec resuspendována ve známém objemu PBS (0,5 - 5 ml).

Koncentrace spermií byla následně stanovena počítáním v Maklerově komůrce (plocha čtverce - 0,01 mm², hloubka - 10 μm). Opakovaně bylo spočítáno množství spermií v 10-ti čtverečcích mřížky a určen průměr, jehož hodnota vyjadřovala počet buněk x 10⁶ v 1 ml objemu suspenze. Ta byla následně naředěna na koncentraci vhodnou na roztěry (5 x 10⁷ spermií/ml).

Tab.2.1. Složení PBS (pH 7,4).

Složky	Množství (doplněno do 2 l dH ₂ O)
Chlorid sodný	17,54 g
Dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát)	5,52 g

2.4.1.2 Promývání spermií přes Percollový gradient

Pro selekci kvalitních spermií bylo použito promývání přes temperovaný Percollový gradient (80% - 70% - 55% - 40%; 37°C; Tab. 2.2). Ejakulované kančí spermie byly centrifugací odděleny od semenné plasmy (200g; 15 – 20 min; RT) a 3 x promyty v TBS (130 mM chlorid sodný; 20mM TRIS; pH 7,4). Suspenze promytých spermií v TBS byla opatrně navrstvena na Percollový gradient a centrifugována (200g; 1 h; RT). Po ukončení centrifugace byly odstraněny spermie, které neprošly do 80% Percollu, tzn. byly odstraněny 70%, 55%, 40% Percollové vrstvy se spermiemi. Spermie z 80% Percollu byly

2 x promyty v TBM (200g; 15 – 20 min; RT; Tab. 2.3). Peleta byla resuspendována ve známém objemu a v Maklerově komůrce byla určena koncentrace spermií. Spermie byly naředěny na koncentraci vhodnou na roztěry (5×10^7 spermií/ml).

Tab. 2.2. Složení Percollového gradientu.

Percoll výsledná konc. (%)	Přídavek Percollu		Přídavek TBM (ml)
	(ml)	(%)	
90	16,20	100	1,80*
80	8,88	90	1,20
70	3,88	90	1,20
55	3,06	90	1,94
40	2,50	80	2,50

* Pozn. K přípravě 90% Percollu byl použit 10x koncentrovaný roztok TBM, k přípravě ostatních koncentrací Percollu byl použit 1x koncentrovaný roztok TBM.

Tab. 2.3. Složení TBM pufru (pH 7,7).

Složky	Množství (mM)
Chlorid sodný	113,1
Chlorid draselný	3,0
Chlorid vápenatý	10,0
TRIS	20,0
glukosa	11,0
pyruvát	5,0

2.4.2 Zpracování semenné plasmy

Semenná plasma získaná odebráním supernatantu z centrifugovaného ejakulátu lidských spermií (200g; 15 – 20 min; RT) byla dále postupně centrifugována (3 x 200g; 400g; 900g; 10 min; RT), dokud nebyla zcela odstraněna peleta se spermii. Takto zpracovaná semenná plasma byla poté uschována do druhého dne při 4°C, druhý den byla opět centrifugována (23 100g; 10 min; 4°C) a následně zamražena (-20°C).

2.4.3 Extrakce spermií

Spermie byly promyty (viz. 2.4.1.1). Suspenze byla rozdělena do alikvotů se známým množstvím spermií podle plánované extrakce. Dále byly alikvoty spermií centrifugovány (400g; 10 min; RT). Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována ve vychlazeném PBS a opět centrifugována (23 100g; 1 min; 4°C). Po přenesení na led byl supernatant odstraněn a k peletám byl přidán příslušný extrakční pufr v takovém množství, aby konečná koncentrace byla 100×10^6 spermií/100 μ l extrakčního pufru.

2.4.3.1 SDS extrakce

SDS extrakce byla provedena 2 x koncentrovaným vzorkovým SDS pufrům (10 ml glycerol; 20 ml 10% SDS; 8 ml 1M TRIS-HCl; pH 6,8; 2,5 mg bromfenolová modř; dH₂O do 50 ml). Peleta spermií byla resuspendována v příslušném množství extrakčního pufru (100 μ l/100 $\times 10^6$ spermií) a suspenze byla krátce povařena (3 min), následně zchlazena na ledu a centrifugována (23 100g; 5 min; 4°C). Extrakt byl odebrán, opakovaně centrifugován (23 100g; 5 min; 4°C) a zamražen v -70°C.

2.4.3.2 Tritonová extrakce

K peletě spermií byl přidán roztok 1% Triton X - 100 v PBS v příslušném množství (100 μ l/100 $\times 10^6$ spermií). Peleta byla resuspendována a ponechána 1 h při laboratorní teplotě a občasném třepání na rotační třepačce. Poté byl vzorek centrifugován (23 100g; 5 min; RT), odebraný supernatant (extrakt) byl opakovaně centrifugován (23 100g; 5 min; RT) a zamražen v -70°C.

2.4.3.3 Ureová extrakce

Peleta spermií nebo JAR buněk byla resuspendována v extrakčním pufru (9,5 M urea; 1% Triton X - 100; 100 μ l/100 $\times 10^6$ spermií; 400 μ l/100 mg JAR buněk). Suspenze byla ponechána 1 h při laboratorní teplotě a občasném třepání na rotační třepačce, poté byla centrifugována (23 100g; 5 min; RT). Odebraný extrakt byl opakovaně centrifugován (23 100g; 5 min; RT) a zamražen v -70°C.

2.4.4 Demembranizace a reaktivace kančích spermií

Kančí spermie centrifugované přes Percollový gradient byly demembranizovány demembranizačním roztokem (DR; Tab. 2.4). Suspenze spermií byla smíchána s DR v poměru 1:1 a ke směsi byl ihned přidán reaktivační roztok (RR) v poměru 1:2 s přidavkem jednotlivých reaktivačních látek (Tab. 2.5). Suspenze byla ihned nanášena na sklo a pozorována pod mikroskopem. Charakter pohybu byl hodnocen při zvětšení 200 x.

Tab. 2.4. Složení demembranizačního roztoku (DR; pH 7,4).

Složka	Množství (M)
HEPES	0,040
Sacharosa	0,200
Glutamát draselný	0,025
DTT	0,001
Triton X-100	0,023

Tab. 2.5. Složení reaktivačního roztoku (RR; pH 7,4).

Složka	Množství (M)
HEPES	0,040
Sacharosa	0,200
Glutamát draselný	0,025
DTT	0,001
Síran hořečnatý (heptahydrát)	0,002
EDTA	0,0005
Reaktivační složka*	
ATP	
ADP	
Glukosa-6-fosfát	
Glukosa-1,6-bisfosfát	
Fruktosa-1,6-bisfosfát	
Pyruvát	

* Výsledné koncentrace reaktivačních složek jsou uvedeny ve výsledcích (viz. 3.1.2.1, 3.1.2.2., 3.1.2.3)

2.4.5 Příprava preparátu pro nepřímou imunofluorescenci

2.4.5.1 Příprava spermií

Pro imunofluorescenci byly zhotoveny preparáty spermií (intaktních nebo demembranizovaných) na podložním skle tak, že 10 μ l suspenze promytých spermií bylo roztaženo po podložním skle a po zaschnutí (RT) byla skla uchována při 4°C.

2.4.5.2 Příprava JAR buněk

Kultivace JAR buněk probíhala na krycích sklech v Petriho misce v RPMI médiu (SEVAC, a.s., ČR) s 10% FCS. Po kultivaci (24 h; 37°C; 5% CO₂; 95% vlhkost) byly buňky opláchnuty v PBS a fixovány.

2.4.6 Typy fixace preparátů na skle

2.4.6.1 Acetonová fixace

Spermie (intaktní nebo demembranizované) byly inkubovány v acetonu (10 min; RT), po zaschnutí (30 min; RT) byl preparát opláchnut PBS.

2.4.6.2 Formaldehydová fixace

Spermie (intaktní nebo demembranizované) nebo JAR buňky byly fixovány v 3,6% formaldehydu (30 min; RT). Fixované preparáty byly po zaschnutí (30 min; RT) opláchnuty v PBS.

2.4.7 Nepřímá imunofluorescence s monoklonálními protilátkami

2.4.7.1 *Imunofluorescence se spermiemi*

Před použitím byla skla s fixovanými spermiemi (lidskými, kančími) opláchnuta PBS. Poté bylo na skla naneseno 30 μ l blokačního roztoku (1 h; 37°C). Po opláchnutí blokace byla nanesena primární protilátka (neředěný supernatant obsahující specifické imunoglobuliny). Inkubace (1 h; 37°C) probíhala ve vlhké komůrce. Současně byla prováděna negativní kontrola bez primární protilátky, preparát byl inkubován s neředěným supernatantem myelonových buněk Sp 2/0. Po odmytí protilátky pomocí PBS byla na skla nanesena sekundární protilátka (SWaM-FITC; anti-IgM ředěna 1:128 v PBS; anti-IgG ředěna 1:64 v PBS; 1 h; 37°C). Po inkubaci a promytí (PBS; dH₂O) byl preparát zafixován ve Vectashieldu s DAPI.

Preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu (NIKON Labophot-2, Japonsko) při zvětšení 400x a 1000x. K hodnocení a ukládání obrázků byla použita CCD kamera (CCD-1300, VDS Vosskühler GmbH, Německo) a systém pro obrazovou analýzu LUCIA (Laboratory Imaging, Ltd., ČR).

2.4.7.2 *Imunofluorescence s JAR buňkami*

Skla s buňkami byla hned po fixaci opláchnuta PBS a byla blokována (1% BSA v PBS; 1 h; 37°C). Po blokaci byly preparáty promývány v PBS (3 x 5 min) a byla nanesena primární protilátka Hs-23 nebo neředěný supernatant Sp 2/0 (1,5 h; 37°C). Po promytí preparátů v PBS (3 x 5 min) na ně byla nanesena sekundární protilátka (SWaM-FITC anti-IgM; ředěno 1:128; 1 h, 37°C). Po inkubaci se sekundární protilátkou byly preparáty promývány v PBS (3 x 5 min) a v dH₂O (1 x 5 min), poté byly zafixovány ve Vectashieldu s DAPI a skladovány při 4°C.

2.4.8 Jednorozměrová elektroforéza (SDS PAGE)

Pro separaci proteinů podle jejich molekulové hmotnosti byla provedena metoda SDS PAGE. Byl použit 3% zaostřovací gel a 12% separační gel. K extraktům byl

v poměru 1:1 přidán 2 x koncentrovaný vzorkový SDS pufr (viz. 2.4.3.1) obsahující 5% merkapthoethanol. Vzorky byly krátce povařeny (3 min), centrifugovány (23 100g; 5 min; 4°C) a naneseny na gel společně se srovnávacími standardy molekulových hmotností (Wide molecular weight range, Sigma, USA; Precision Plus Protein Standard Dual color, Bio-rad, USA).

Elektroforéza probíhala v elektrodovém pufru (60,6 g TRIS; 288 g glycin; 20 g SDS; dH₂O do 2 l) za konstantního proudu 16 mA/gel při napětí 80 – 200 V [91].

2.4.9 Dvourozměrová elektroforéza (2D – SDS PAGE)

Pro rozdělení proteinů podle molekulové hmotnosti a hodnoty izoelektrického bodu byla použita izoelektrická fokusace v prvním rozměru a SDS PAGE ve druhém, kolmém rozměru.

Ureové extrakty spermií nebo semenné plasmy byly odsoleny na odsolovací koloně (Protein Desalting Spin Columns, Pierce, USA). Vzorky byly smíchány s rehydratačním pufrům (Tab. 2.6) do celkového objemu 125 µl roztoku tak, aby celková koncentrace proteinu odpovídala 60 – 100 µg (na strip pH 3-10; 7 cm), resp. 150 µg (na strip pH 4-7; 7 cm). Stripy s lineárním pH gradientem v rozmezí 3-10, resp. 4-7 (Immobilon DryStrip, GE Healthcare, USA) byly pasivně rehydratovány (přes noc; RT) se směsí testovaného vzorku s rehydratačním pufrům v příslušném poměru. Během rehydratace byly stripy převrstveny minerálním olejem (PlusOne, DryStrip cover fluid; GE Healthcare, USA), aby nedocházelo k nežádoucímu odpařování vzorku. Izoelektrická fokusace probíhala na přístroji Ettan IPGphor III (GE Healthcare, USA; max. 60 µA/strip; 25°C) za postupného zvyšování napětí tak, aby bylo dosaženo doporučených hodnot kVh (pro stripy 3-10 doporučené rozmezí 5 - 6,5 kVh; pro stripy 4-7 doporučené rozmezí 6 - 8 kVh). Stripy byly po ukončení fokusace zamrazeny při -20°C.

Před SDS PAGE byly stripy inkubovány (15 min; RT) v ekvilibračním pufru (50 mM Tris – HCl pufr; pH 6,8; 6 M urea; 30% glycerol; 2% SDS) s přidavkem DTT (50 mg na 5 ml pufru) a poté v ekvilibračním pufru (15 min; RT) s přidavkem jodacetamidu (100 mg na 5 ml pufru).

Tab. 2.6. Složení rehydratačního pufru.

Složka	Množství
Urea	8 M
CHAPS	2%
Roztok amfolytů (IPG pufr)	2%
Bromfenolová modř	0,5%
DTT	20 mM

2.4.10 Přenos proteinů na membránu (Western blotting)

Gely byly po SDS PAGE ekvilibrovány v transferovém pufru (72 g glycin; 15 g Tris; 1 l methanol; dH₂O do 5 l), přiloženy na PVDF membránu (Millipore, USA) a vloženy mezi chromatografický papír (Whatmann 17 Chr; Whatmann, USA) navlhčený v transferovém pufru. Elektroforetický přenos proteinů probíhal v transferovém pufru na systému LKB Transpher při počátečním proudu 0,5 mA/cm² (2 h; RT) [92].

2.4.11 Imunodetekce proteinů pomocí monoklonálních protilátek

Membrány s přenesenými proteiny byly promyty v roztoku PBS s 0,05% Tween 20 (PBS-Tw) a inkubovány v blokačním pufru (PBS-Tw; 5% želatina) pro vyblokování nescifických vazebných míst (přes noc; 4°C). Po vyjmutí z blokačního pufru byly membrány opakovaně promývány v PBS-Tw (5 x 5 min).

Následovala inkubace s přečištěnou protilátkou Hs-23 (IgM; 100 x ředěná v PBS-Tw s 1% BSA; 0,16 mg/ml; 1 h, RT). Současně také probíhala inkubace s kontrolní protilátkou. Po ukončení inkubace byly membrány promyty v PBS-Tw (5 x 5 min).

Poté probíhala inkubace se sekundární protilátkou GaM-Px (3000 x ředěná v PBS-Tw s 0,5% BSA) a promývání v PBS-Tw (5 x 5 min).

Detekce navázaných protilátek byla provedena použitím kitu SuperSignal (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate; Pierce; USA) obsahujícího substrát pro peroxidázu. Chemiluminiscenční signál byl vizualizován na RTG filmech X/OMAT LS (Eastman Kodak Company; USA).

2.4.12 Vizualizace proteinů barvením CBB R-250

Gel po elektroforéze byl ponořen na 1 h do roztoku barvy CBB R-250 (45% methanol; 10% kyselina octová; 0,08% Coomassie Brilliant Blue R-250) a poté odbarvován (35% ethanol; 10% kyselina octová), dokud nedošlo k odmytí pozadí a zviditelnění proteinů. Gely byly uchovány v 1% roztoku kyseliny octové při 4°C nebo byly ekvilibrovány v sušicím roztoku (5 ml glycerol; 40 ml ethanol; dH₂O do 100 ml; 15 min) a poté vysušeny mezi dvěma vrstvami celofánu.

2.4.13 Vizualizace proteinů stříbrem

Gel po elektroforéze byl stabilizován ve fixačním roztoku (50 ml methanol; 12 ml kyselina octová; 50 µl 37% formaldehyd; dH₂O do 100 ml; 1 h; RT). Následovalo promytí v 50% ethanolu (3 x 20 min). Poté byl gel inkubován 1 min v 0,02% roztoku thiosíranu sodného a promyt v dH₂O (2 x 20 s). Následovalo barvení v roztoku obsahujícím stříbro (0,2 g dusičnan stříbrný; 75 µl 37% formaldehyd; dH₂O do 100ml; 30 min; RT) v tmavé uzavřené nádobě. Po promytí v dH₂O (2 x 20 s) byly proteiny vizualizovány ve vyvolávacím roztoku (1,2 g uhličitan sodný; 10 µl 37% formaldehyd; 1 mg thiosíran sodný; dH₂O do 20 ml; 1 - 10 min; RT). Reakce byla zastavena promytím v dH₂O (2 x 2 min; RT). Gely byly stabilizovány v ustalovacím roztoku (50 ml methanol; 12 ml kyselina octová; dH₂O do 100 ml; 10 min; RT) a následně promývány v 50% methanolu (20 min). Inkubace probíhaly při laboratorní teplotě na třepačce.

Gely byly uchovány v 1% roztoku kyseliny octové při 4°C nebo byly ekvilibrovány v sušicím roztoku (5 ml glycerol; 40 ml ethanol; dH₂O do 100 ml; 15 min) a poté vysušeny mezi dvěma vrstvami celofánu.

2.4.14 Stanovení koncentrace proteinů BCA metodou

Koncentrace proteinů byla stanovena modifikovanou metodou podle Smithe [93] založenou na fotometrickém měření barevného komplexu, který vzniká reakcí bicinchoninové kyseliny (BCA) s kationty Cu⁺. Množství zredukovaných iontů Cu⁺

je přímo úměrné koncentraci proteinů, která odpovídá množství vzniklého barevného komplexu.

Pro sestrojení kalibrační křivky byly připraveny referenční standardy o známé koncentraci BSA v PBS (0, 5, 10, 20, 30 μg BSA; 15 μl). Dále byla připravena tři různá ředění měřených vzorků v PBS (10 x, 20 x, 30 x; 15 μl). K roztokům standardů a vzorků bylo přidáno 300 μl směsi roztoku A (26 mM BCA; 0,16 M monohydrát uhličitanu vápenatého; 7 mM vinan sodný; 0,1 M hydroxid sodný; 0,11 M hydrogenuhličitan sodný; pH 11,25) a roztoku B (16 mM síran měďnatý) smíchaných v poměru 50:1. Po inkubaci s touto směsí (30 min; 37°C) byly vzorky naneseny na 96 jamkovou destičku v tripletech po 100 μl . Absorbance byla měřena při 570 nm na přístroji Tecan Sunrise (Tecan; USA). Z hodnot absorbance standardů byla sestrojena kalibrační křivka, na jejímž základě byly vypočítány hodnoty koncentrace proteinů jednotlivých vzorků.

2.4.15 Afinitní chromatografie na G-protein Sepharose

Monoklonální protilátka Hs-23 byla přečištěna na G-protein Sepharose (1 ml; GE Healthcare, USA). Sloupec gelu byl promyt 50 ml PBS rychlostí 0,4 ml/min. Alikvot protilátky Hs-23 o objemu 1 ml byl vysrážen 60% síranem amonným, rozpuštěn v 1 ml PBS a nanesen na promytou kolonu s rychlostí 0,2 ml/min. Po nanesení vzorku byl sloupec promýván PBS a po 20 min byly jímány jednotlivé frakce (objem cca 4 ml), u nichž bylo měřeno množství proteinu při vlnové délce 280 nm. Po poklesu absorbance pod 0,05 byly imunoglobuliny navázané na nosič eluovány 0,1 M glycinem (pH 2,8) při průtokové rychlosti 0,4 ml/min. Tyto frakce po eluci byly po 10 min jímány do zkumavek s přidávkem 200 μl TRIS-HCl (1 M; pH 9). U frakcí bylo opět stanoveno množství proteinu při 280 nm, eluce byla ukončena při poklesu absorbance pod 0,01. Frakce obsahující přečištěnou protilátku Hs-23 byla lyofilizována (LYOVAC GT 2 E; Finn-aqua; USA; 15 h) a pak zamražena (-20°C). Pro kontrolu byla provedena SDS PAGE s 12% separačním gelem.

3. VÝSLEDKY

3.1 DEMEMBRANIZACE A REAKTIVACE KANČÍCH SPERMIÍ

Kančí spermie byly promyty v TBS médiu a pak centrifugovány přes Percollový gradient pro selekci nejpohyblivějších spermií. Suspenze byla naředěna na koncentraci 10^7 spermií/ml.

3.1.1 Demembranizace spermií

K suspenzi promytých spermií bylo přidáváno různé množství demembranizačního roztoku (DR; Tab. 2.4) tak, aby bylo dosaženo různých výsledných koncentrací Tritonu X-100 (Tab. 3.1). Spermie byly ihned po přidavku DR pozorovány pod mikroskopem (zvětšení 100x). U všech výsledných koncentrací Tritonu X-100 použitých v experimentech bylo pozorováno zastavení pohybu spermií. Vzhledem k tomu, že následná reaktivace měla u všech testovaných DR stejný průběh, byl dále používán jen DR s nejvyšší koncentrací Tritonu X-100 (0,05%).

Byla optimalizována také doba působení DR na spermie. Suspenze byla vystavena působení DR po dobu 0, 1 a 5 min. Následná reaktivace pohybu byla pozorována v čase 0, tzn. ihned po přidání reaktivačního roztoku (RR). Pomalejší nástup reaktivace motility a snížení množství reaktivovaných spermií bylo pozorováno v případech, kdy mezi demembranizací a reaktivací proběhla časová prodleva (1 min). Po delším působení DR (3 - 5 min) reaktivace spermií nenastala. Obdobný trend byl pozorován i u nižších testovaných koncentrací Tritonu X-100.

Tab. 3.1. Koncentrace Tritonu X-100 v demembrizačním roztoku (DR).

Množství spermií (μl)	Přidané množství DR (μl)	Výsledná koncentrace Tritonu X-100 (%)
30	30	0,050
30	90	0,025
30	270	0,010

3.1.2 Reaktivace spermií

3.1.2.1 Reaktivace pomocí ATP

Demembrizované spermie byly rozděleny na dvě části, jedna skupina sloužila ke kontrole demembrizace a druhá byla použita k reaktivaci. K demembrizovaným spermím bylo přidáváno různé množství reaktivačního roztoku (RR; Tab. 2.5) s různými výslednými koncentracemi ATP (Tab. 3.2). Reaktivace pohybu spermií byla pozorována pod mikroskopem (zvětšení 100x).

Během experimentu byla optimalizována koncentrace ATP. Při výsledné koncentraci ATP 1,33 mM došlo k nejrychlejší reaktivaci (1–2 s po smíchání suspenze s RR). Také počet pohyblivých spermií byl při této koncentraci ATP nejvyšší. Ostatní koncentrace ATP vedly k pomalejšímu nástupu reaktivace pohybu (5 – 10 s) a ke sníženému množství pohyblivých spermií.

Tab. 3.2. Koncentrace ATP v reaktivačním roztoku (RR).

Množství spermií (μl)	Přidané množství RR (μl)	Výsledné koncentrace ATP (mM)
30	60	1,33
30	30	1,00
30	10	0,50

3.1.2.2 *Reaktivace pomocí ADP*

K suspenzi demembranizovaných spermií byl v poměru 1:2 přidán RR s přidavkem ADP (Tab. 3.3). U žádné testované koncentrace ADP nebyla pozorována reaktivace motility.

Tab. 3.3. Koncentrace ADP v reaktivačním roztoku (RR).

Množství spermií (μl)	Přidané množství RR (μl)	Výsledné koncentrace ADP (mM)
30	60	13,30
30	60	1,33
30	60	0,13

3.1.2.3 *Reaktivace pomocí substrátů glykolýzy*

K suspenzi demembranizovaných kančích spermií byl přidán RR v poměru 1:2 s přidavkem vybraných substrátů glykolýzy v různých koncentracích (Tab. 3.4). U žádného z testovaných substrátů, nezávisle na jejich koncentraci, nebyl pozorován efekt na reaktivaci motility.

Tab. 3.4. Koncentrace substrátů glykolýzy v RR.

Substrát	Výsledná koncentrace (mM)				
Glukosa-6-fosfát	133	13,33	1,33	0,13	0,013
Glukosa-1,6-bisfosfát	133	13,33	1,33	0,13	0,013
Fruktosa-1,6-bisfosfát	133	13,33	1,33	0,13	0,013
Pyruvát	133	13,33	1,33	0,13	0,013

3.2 NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE S MONOKLONÁLNÍMI PROTILÁTKAMI PROTI LIDSKÝM A KANČÍM PROTEINŮM NA KANČÍCH SPERMIÍCH

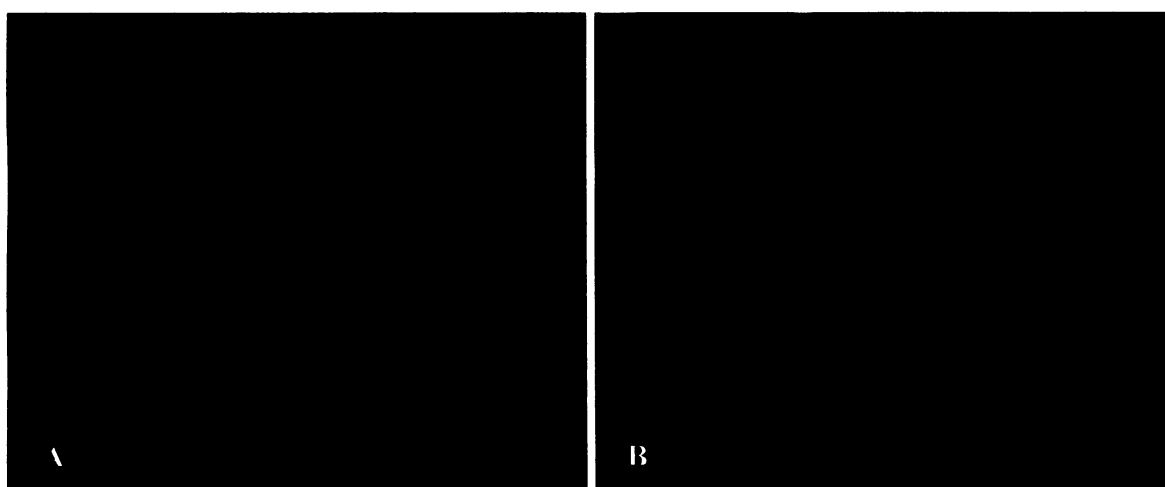
Na preparáty s kančími spermiemi byly použity dva typy fixací (acetonová a formaldehydová; viz. 2.4.6). Z důvodu lepšího značení protilátkami byly dále hodnoceny preparáty po acetonové fixaci.

Pro účely sledování změn probíhajících během demembranizace byly spermie vystaveny působení DR po dobu 20 s. U všech protilátek byl sledován rozdíl v lokalizaci značení proteinů v intaktních a demembranizovaných spermiích. Ze souborů 200 buněk byla spočítána procenta jejich značení (Tab. 3.5; Graf 3.1).

3.2.1 Imunofluorescenční značení intra-akrosomálního proteinu pomocí monoklonální protilátky Hs-8

Protilátka Hs-8 značila na intaktních kančích spermích akrosom (98%), slabé značení bylo pozorováno také v oblasti hlavní části bičíku (31%; Obr. 3.1.A).

U demembranizovaných spermií značila také akrosom (96,5%), ale slaběji a neohraničeně z důvodu odstranění membrán akrosomu (plasmatická a vnější akrosomální membrána). Značení v oblasti bičíku bylo velmi snižené (4%; Obr. 3.1.B). Výsledky jsou shrnuty v Tab. 3.5 a Grafu 3.5.A.

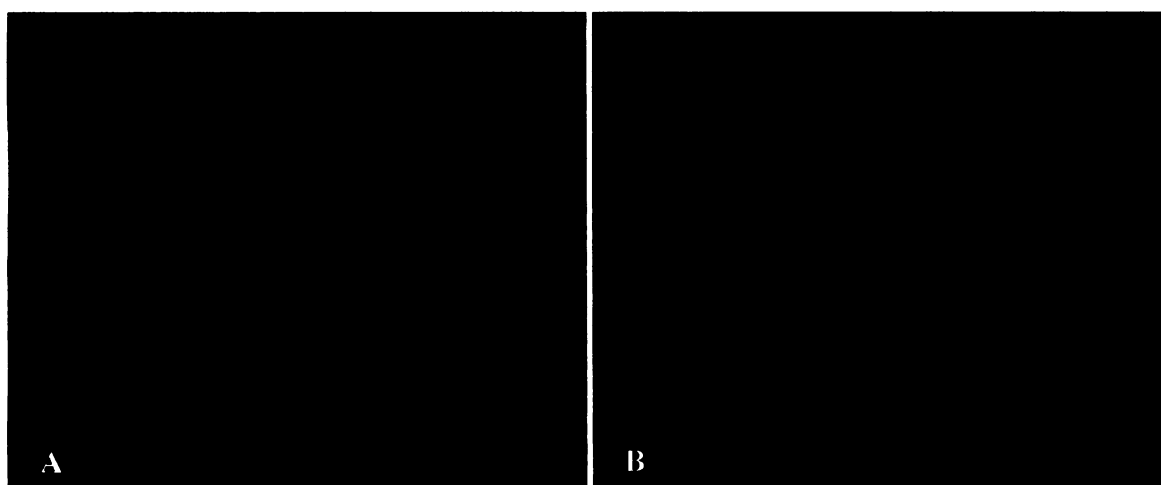


Obr. 3.1. Imunofluorescenční značení intaktních (A) a demembranizovaných (B) kančích spermií pomocí protilátky Hs-8 (zvětšení 400 x).

3.2.2 Imunofluorescenční značení intra-akrosomálního proteinu pomocí monoklonální protilátky Hs-14

Protilátka Hs-14, podobně jako Hs-8, značila na intaktních kančích spermích akrosom (99 %), značení na bičíku však nebylo pozorováno (Obr. 3.2.A).

Demembranizované spermie byly značeny podobně jako intaktní, ale procento značených spermií bylo nižší (80,5%). Fluorescenční signál značené oblasti na demembranizovaných spermích byl méně výrazný (Obr. 3.2.B). Výsledky jsou shrnuty v Tab. 3.5 a Grafu 3.1.B.

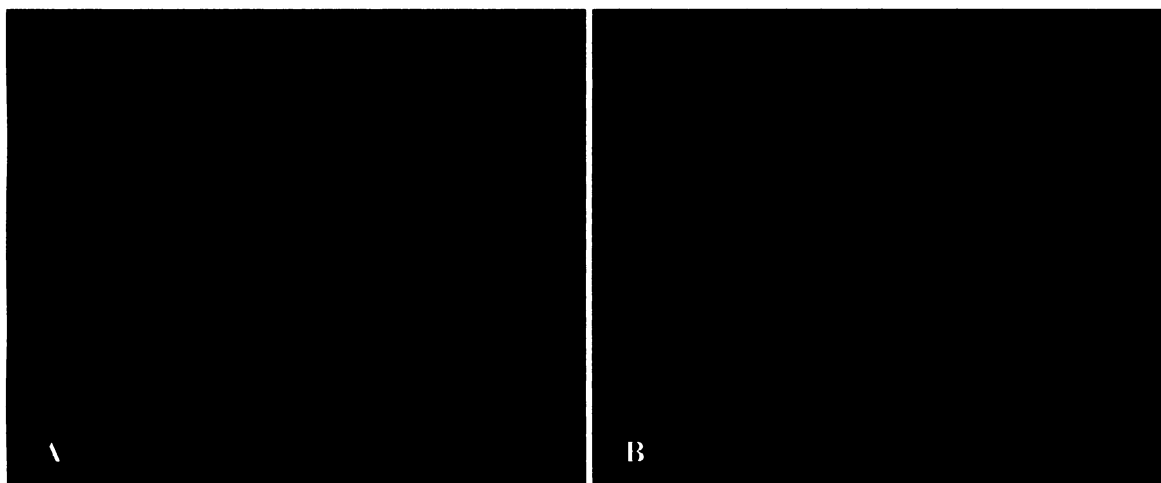


Obr. 3.2. Imunofluorescenční značení intaktních (A) a demembranizovaných (B) kančích spermií pomocí protilátky Hs-14 (zvětšení 400 x).

3.2.3 Imunofluorescenční značení akrosinu pomocí monoklonální protilátky ACR.2

Protilátka ACR.2 značila akrosin v akrosomu intaktních kančích spermii (Obr. 3.3.A). Demembranizované spermie měly odlišné značení; protilátka ACR.2 značila silně molekuly volného akrosinu, které se vylily z akrosomu po odstranění plasmatické a vnější akrosomální membrány (Obr. 3.3.B).

Počet značených spermii po demembranizaci (97,5%) se významně nelišil od počtu značených intaktních spermii (98,5%). Značení však neodpovídá charakteru značení u protilátek Hs-8 a Hs-14, neboť detekované proteiny již nejsou přímou součástí akrosomu. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 3.5 a Grafu 3.1.C.

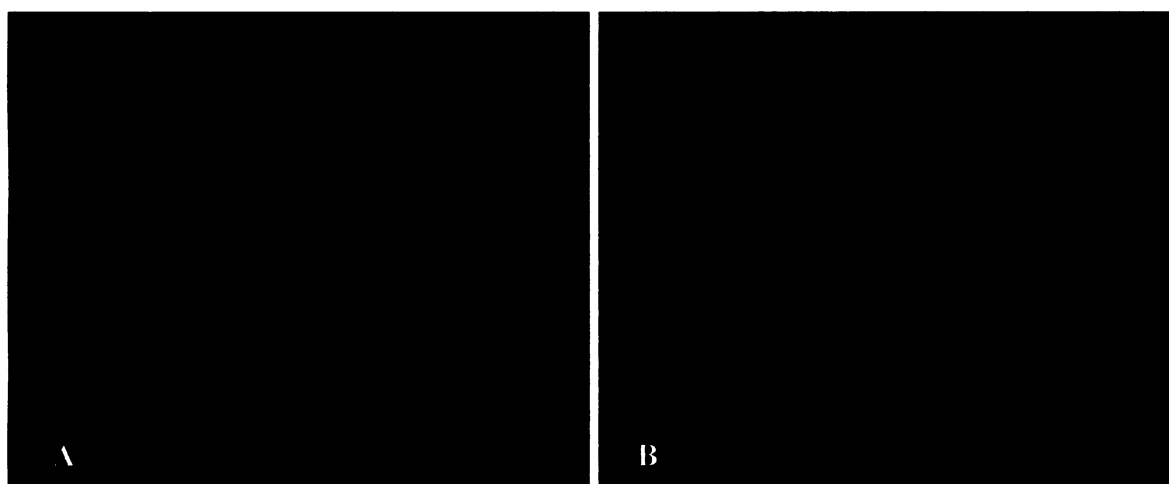


Obr. 3.3. Imunofluorescenční značení intaktních (A) a demembranizovaných (B) kančích spermii pomocí protilátky ACR.2 (zvětšení 400 x).

3.2.4 Imunofluorescenční značení pHs-23 pomocí monoklonální protilátky Hs-23

Protein specificky rozpoznávaný protilátkou Hs-23 (pHs-23) je lokalizován na bičíku kančích spermii. Intaktní spermie byly silně značené v oblasti mitochondriální části bičíku, slaběji pak v oblasti hlavní části bičíku (Obr. 3.4.A). Značená byla většina buněk (99%).

Demembranizované spermie byly značeny zejména na střední části bičíku, v mitochondriální oblasti se značení neobjevilo (Obr. 3.4.B). Počet značených buněk (98%) se významně nelišil od počtu značených buněk intaktních spermii. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 3.5 a Grafu 3.1.D.

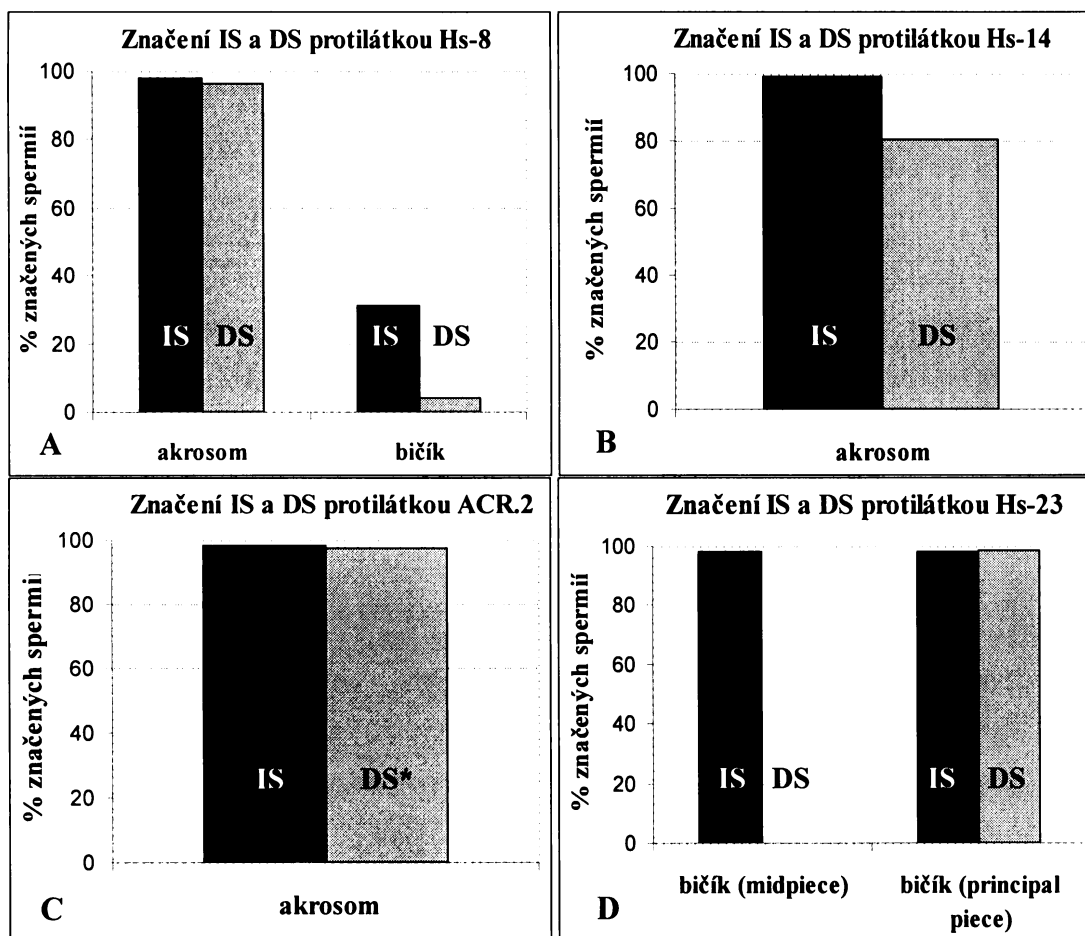


Obr. 3.4. Imunofluorescenční značení intaktních (A) a demembranizovaných (B) kančích spermii pomocí protilátky Hs-23 (zvětšení 1000 x).

Tab. 3.5. Lokalizace proteinů kančích spermií a procento značených buněk v nepřímé imunofluorescenci pomocí vybraných monoklonálních protilátek (Hs-8, Hs-14, Hs-23 a ACR.2).

Protilátka	Lokalizace proteinů (IS)	Počet značených buněk (%)	Lokalizace proteinů (DS)	Počet značených buněk (%)
Hs-8	akrosom	98,0	akrosom	96,5
	bičík	31,0	bičík	4,0
Hs-14	akrosom	99,0	akrosom	80,5
Hs-23	bičík (MP)	98,0	bičík (MP)	0,0
	bičík (PP)	98,0	bičík (PP)	98,5
ACR.2	akrosom	98,5	značení molekul volného akrosinu	97,5

IS – intaktní spermie, DS – demembranizované spermie, MP – mitochondriální část bičíku, PP – hlavní část bičíku



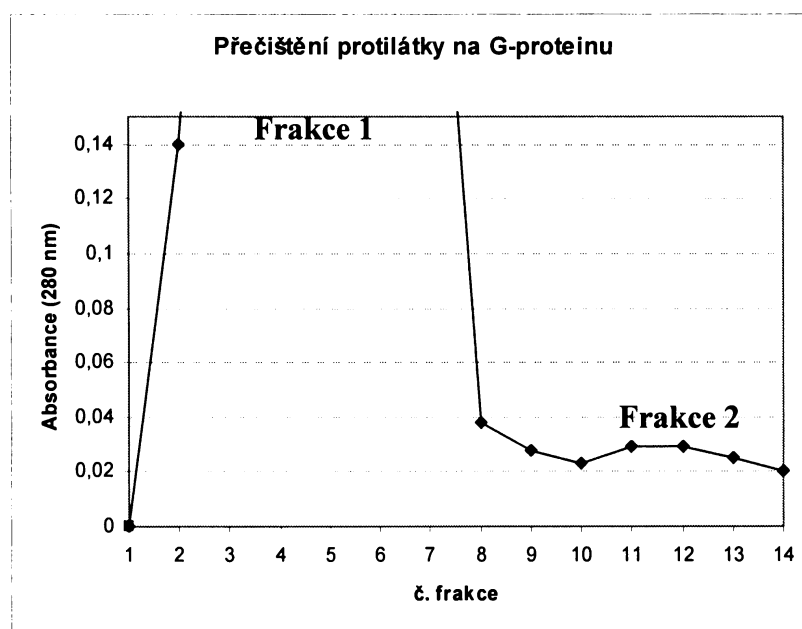
Graf 3.1. Srovnání procenta intaktních (IS) a demembranizovaných (DS) spermií značených protilátkami Hs-14 (A), Hs-8 (B), Hs-23 (C) a ACR.2 (D).

* jiný charakter značení

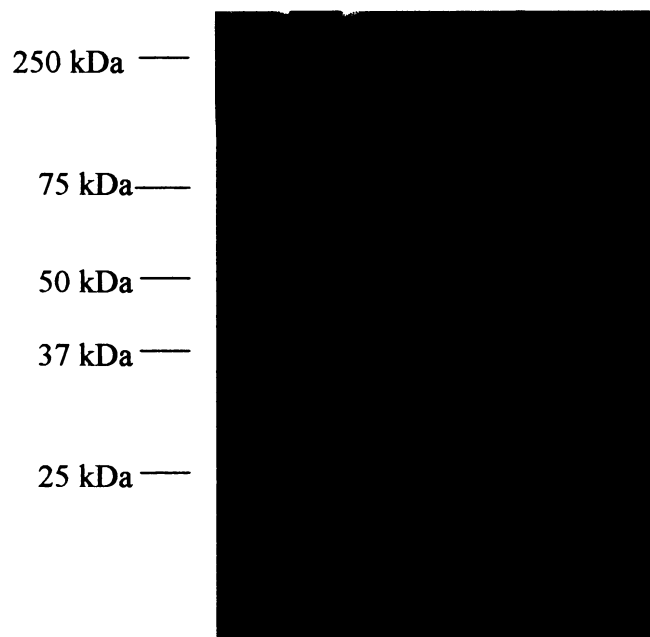
3.3 PŘEČIŠTĚNÍ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY Hs-23 NA G-PROTEIN SEPHAROSE

K další biochemické charakterizaci a k charakterizaci proteinu, který je protilátkou specificky rozpoznáván, byla vybrána Hs-23. Z důvodu vazby protilátky na bičík byl v další práci předpokládán také možný vztah proteinu značeného Hs-23 k motilitě spermií.

Monoklonální protilátka Hs-23 byla přečištěna na G-protein Sepharose (viz. 2.4.15). Průběh afinitní chromatografie je znázorněn na Grafu. 3.2. Frakce 2 obsahující přečištěnou protilátku byla dialyzována po dobu 15 h proti roztoku PBS při 4°C a byla stanovena její koncentrace (0,16 mg/ml). Tato frakce obsahující imunoglobuliny byla poté elektroforeticky rozdělena (SDS PAGE), a to v neredukujících i redukujících podmínkách (Obr. 3.5). Imunoglobuliny jsou v redukujících podmínkách štěpeny na fragment o relativní molekulové váze přibližně 50 000 (těžký řetězec) a fragment o relativní molekulové váze přibližně 25 000 (lehký řetězec). Nerozštěpený imunoglobulin má relativní molekulovou váhu přibližně 250 000. Takto přečištěná protilátka byla dále používána pro imunodetekci.



Graf 3.2. Afinitní chromatografie monoklonální protilátky Hs-23 na G-protein Sepharose.



Obr. 3.5. SDS elektroforéza frakce 2 afinitní chromatografie obsahující imunoglobuliny přečištěné monoklonální protilátky Hs-23.

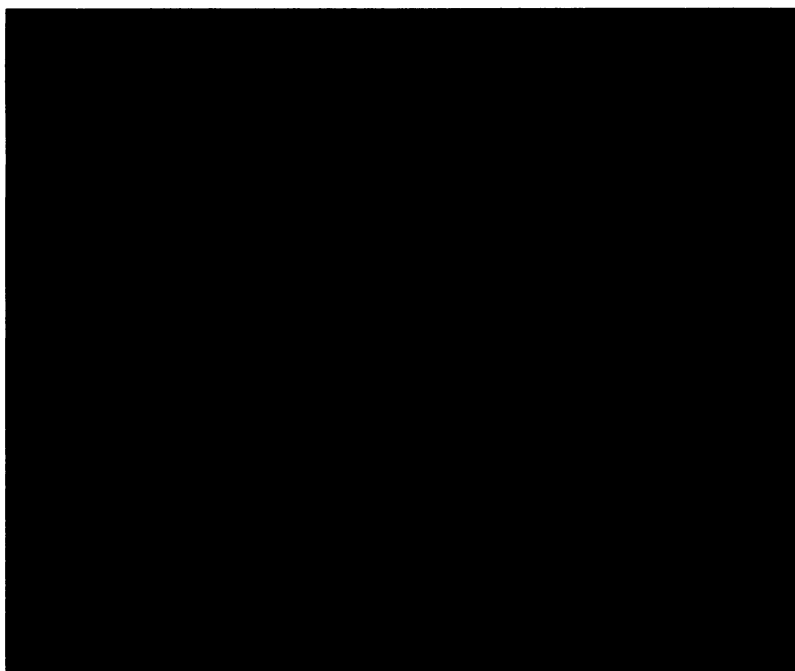
1- standard molekulových hmotností (Dual color, Bio-rad), 2- frakce 2 v neredukujícím prostředí, 3- frakce 2 v redukujícím prostředí

3.4 BIOLOGICKÁ A BIOCHEMICKÁ CHARAKTERIZACE pHs-23

3.4.1 Imunofluorescenční značení pHs-23 na lidských spermích pomocí monoklonální protilátky Hs-23

Protilátka Hs-23 byla dále testovaná na lidských spermích. Zkoušeny byly dva typy fixace (acetonová a formaldehydová). Na základě lepšího značení byly hodnoceny preparáty po acetonové fixaci.

Značení na lidských spermích bylo shodné jako značení na kančích intaktních spermích, bičík byl značen po celé délce, zejména pak v mitochondriální oblasti (Obr. 3.5)

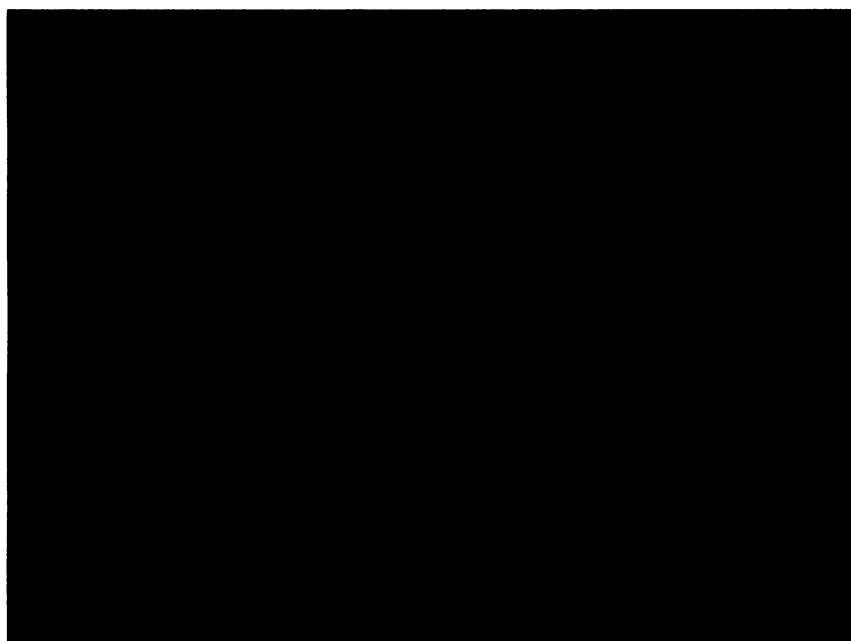


Obr. 3.5. Imunofluorescenční značení lidských intaktních spermií pomocí protilátky Hs-23 (zvětšení 1000 x).

3.4.2 Imunofluorescenční značení pHs-23 na JAR buňkách pomocí monoklonální protilátky Hs-23

Protilátka Hs-23 byla pro kontrolu reaktivity s jiným typem buněk testovaná také s JAR buňkami. Zkoušeny byly dva typy fixace (acetonová a formaldehydová). Na základě lepšího značení byly hodnoceny preparáty po formaldehydové fixaci.

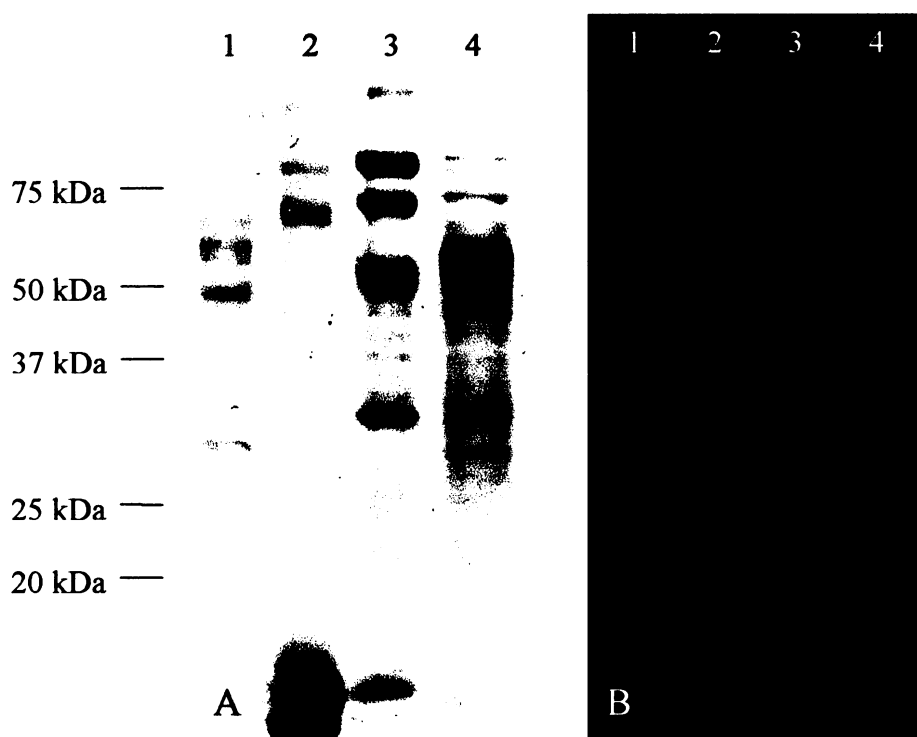
Na JAR buňkách bylo nalezeno specifické značení (Obr. 3.6).



Obr. 3.6. Imunofluorescenční značení JAR buněk pomocí protilátky Hs-23 (zvětšení 400 x).

3.4.3 SDS elektroforéza a imunodetekce s protilátkou Hs-23

Byla provedena elektroforéza s ureovými extrakty lidských a kančích spermií a s lidskou a kančí semennou plasmou (Obr. 3.7.A.). Všechny vzorky byly v redukujícím prostředí. Po rozdělení proteinů proběhla imunodetekce s protilátkou Hs-23 (Obr. 3.7.B). Specificky značená oblast (přibližně 50 kDa) se objevila na extraktu lidských a kančích spermií a na lidské semenné plasmě.



Obr. 3.7. SDS elektroforéza (A) a imunodetekce (B) s protilátkou Hs-23 extraktů lidských a kančích spermií a lidské a kančí semenné plasmy (ředění 100 x).

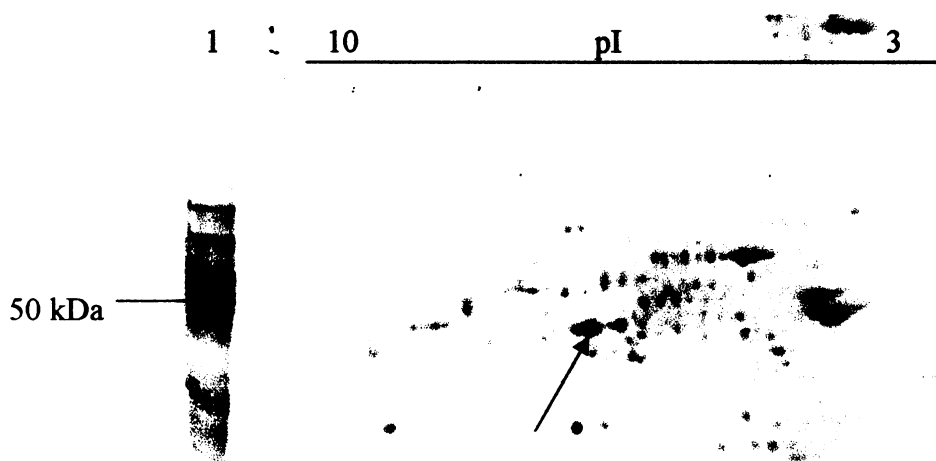
1 - ureoví extract kančích spermií, 2 - kančí semenná plasma, 3 - lidská semenná plasma, 4 - ureoví extract lidských spermií

3.4.4 Dvourozměrová elektroforéza (2D – SDS PAGE) a imunodetekce s protilátkou Hs-23 na ureovém extraktu lidských spermií

Pro charakterizaci proteinu Hs-23 byla provedena dvourozměrová elektroforéza s ureovými extrakty lidských spermií. Po izoelektrické fokusaci v prvním rozměru na stripech o délce 7 cm a pH rozmezí 4-7 a 3-10 byl vzorek rozdělen ve druhém rozměru na SDS elektroforéze (Obr. 3.8). Následoval přenos na membránu a imunodetekce s protilátkou Hs-23.

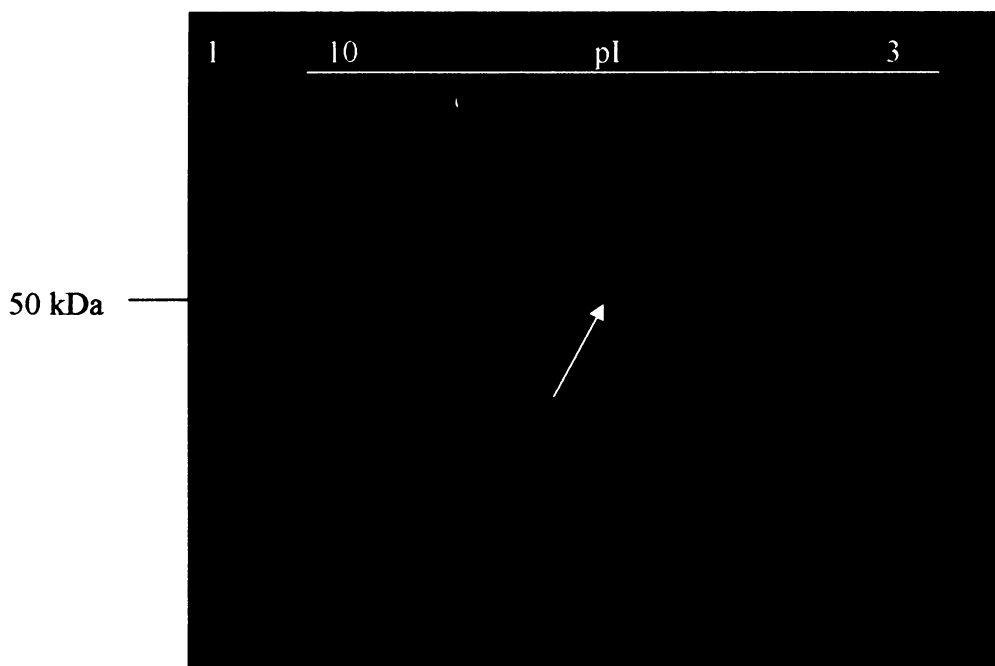
Po vyhodnocení značení byl pro charakterizaci metodou MALDI – TOF vybrán protein specificky detekovaný v oblasti 50 kDa a pI přibližně 7 (Obr. 3.9, znázorněno šipkou).

MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) hmotnostní spektra (MS) byla měřena za použití Bruker BIFLEX spektrometru (Bruker-Franzen, Bremen, Germany) s detektorem TOF (time-of-flight). Měření bylo prováděno na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, Praha ve spolupráci s RNDr. M. Šulcem. Výsledkem měření bylo určení detekovaného proteinu jako enolasy 1 (47, 49 kDa; pI 7,0; Příloha 1).



Obr. 3.8. 2D-elektroforéza ureového extraktu lidských spermií, pH 3-10 (membrána barvena CBB R-250).

šipka - protein vybraný pro charakterizaci MALDI-TOF, 1 - ureový extrakt lidských spermií



Obr. 3.9. Imunodetekce s protilátkou Hs-23 (100 x ředěná) na 2D-elektroforéze ureového extraktu lidské spermií.

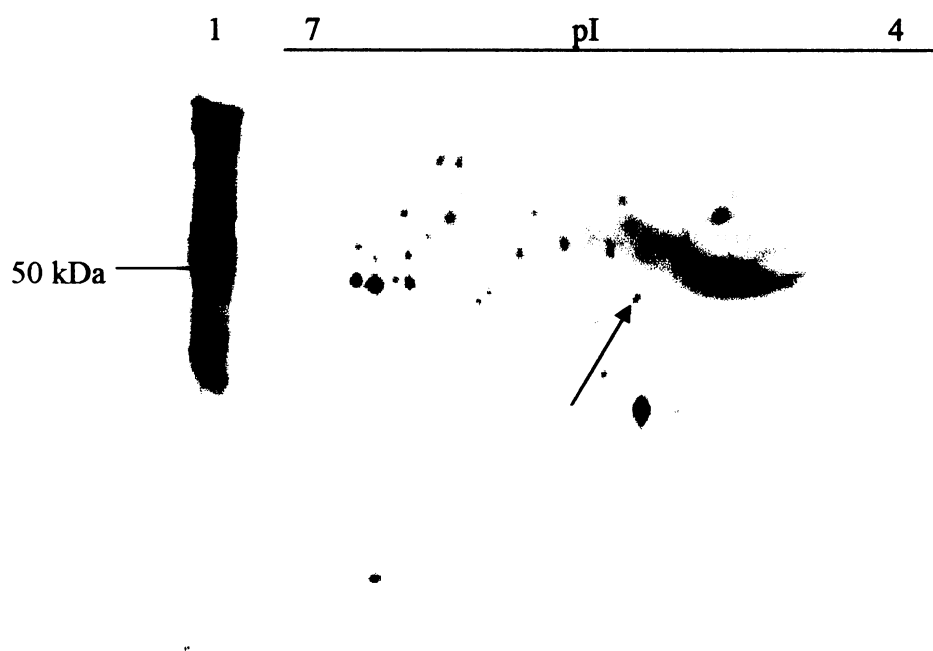
šipka - protein vybraný pro charakterizaci MALDI-TOF, 1 - ureový extrakt lidských spermií

U ostatních značených proteinů se jedná o nespecifickou reakci protilátky pozorovanou i na negativní kontrole.

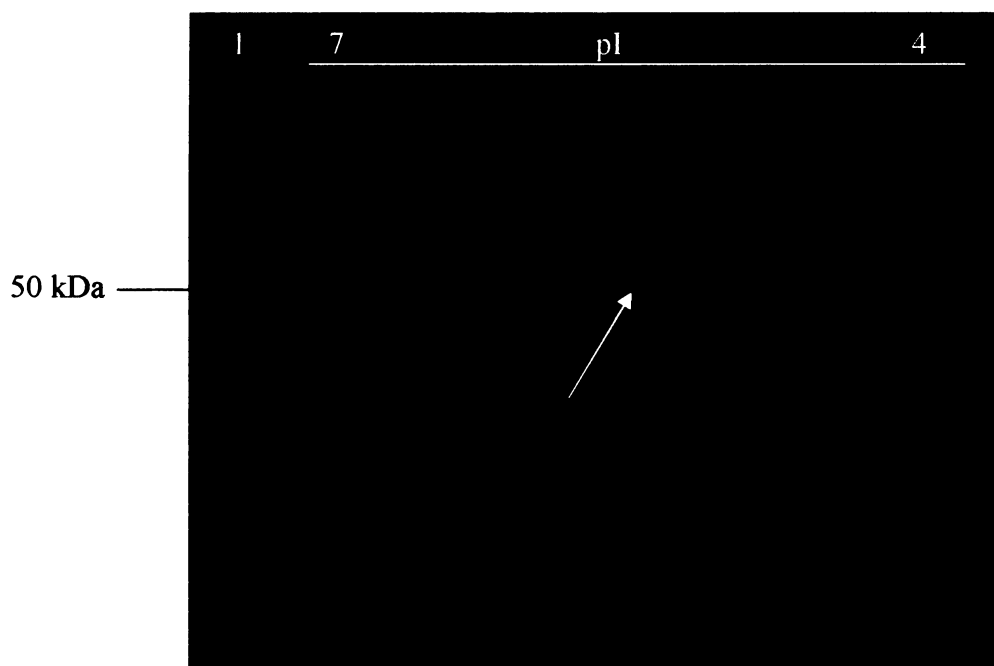
3.4.5 Dvourozměrová elektroforéza a imunodetekce s protilátkou Hs-23 na ureovém extraktu kančích spermii

Biochemická charakterizace proteinu Hs-23 (enolasy 1) byla také provedena za použití dvourozměrové elektroforézy na ureovém extraktu kančích spermii. Izoelektrická fokusace proběhla na stripech o délce 7 cm s pH rozmezím 4-7. Poté byla provedena SDS elektroforéza v druhém rozměru (Obr. 3.10), přenos proteinů na membránu a imunodetekce s protilátkou Hs-23.

Výsledkem imunodetekce byl protein značený specificky v oblasti 50 kDa a s pI přibližně 5,5 (Obr. 3.11, znázorněn šipkou).



**Obr. 3.10. 2D-elektroforéza ureového extraktu kančích spermii, pH 3-10 (membrána barvena CBB R-250).
šipka - protein značený protilátkou Hs-23, 1 - ureový extrakt kančích spermii**

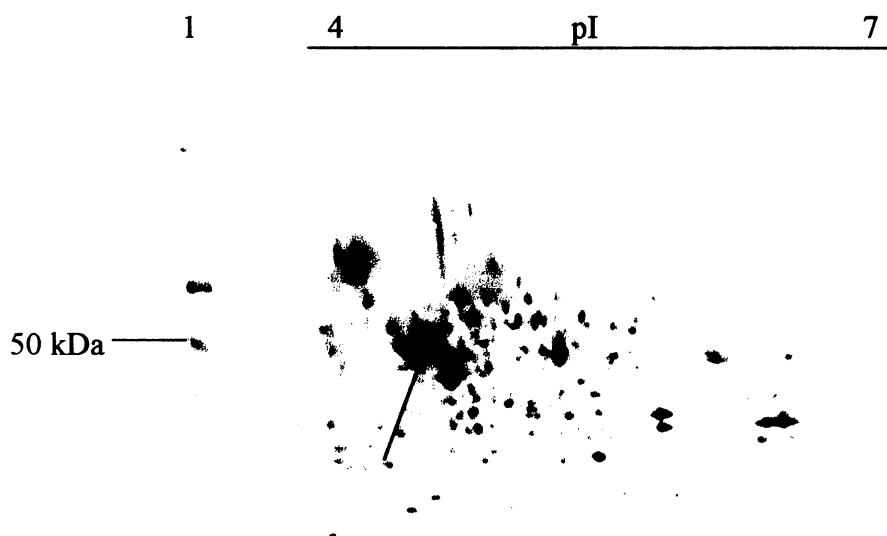


**Obr. 3.11. Imunodetekce s protilátkou Hs-23 (100 x ředěná) na 2D-elektroforéze ureového extraktu kančích spermii.
šipka - protein značený protilátkou Hs-23, 1 - ureový extrakt lidských spermii
U ostatních značených proteinů se jedná o nespecifickou reakci protilátky pozorovanou i na negativní kontrole.**

3.4.6 Dvourozměrová elektroforéza a imunodetekce s protilátkou Hs-23 na ureovém extraktu JAR buněk

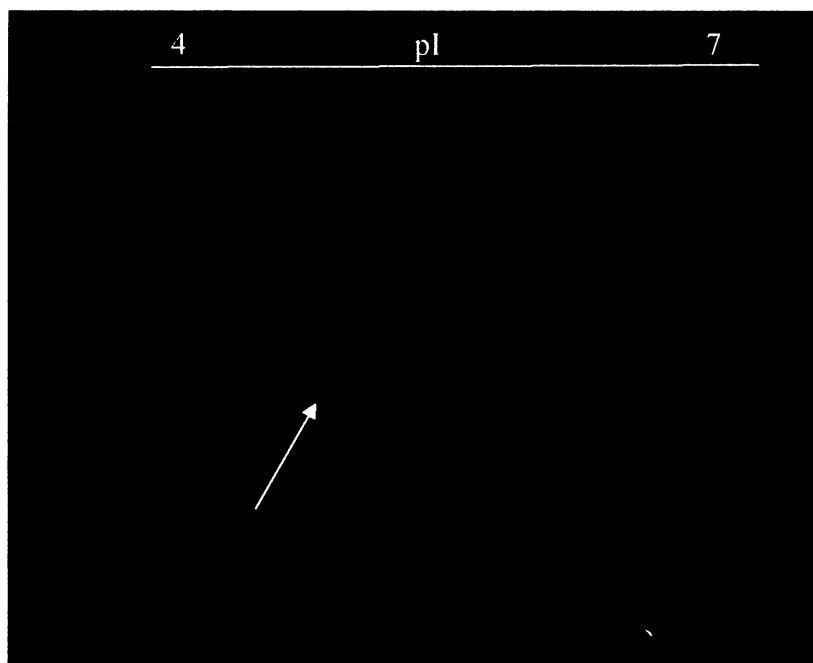
Pro detekci proteinu Hs-23 (enolasy 1) na jiném typu buněk byla provedena dvourozměrová elektroforéza s ureovým extraktem JAR buněk. Izoelektrická fokusace proběhla na stripech o délce 7 cm s pH rozmezím 4-7. Po SDS elektroforéze v druhém rozměru (Obr. 3.12) a přenosu proteinů na membránu proběhla imunodetekce s protilátkou Hs-23.

Specificky byl značen protein v oblasti 50 kDa, hodnota pI byla přibližně 5 (Obr. 3.13, znázorněno šipkou).



Obr. 3.12. 2D-elektroforéza s ureovým extraktem JAR buněk, pH 4-7 (membrána barvena CBB R-250).

šipka - protein značený protilátkou Hs-23, 1 - standard molekulových hmotností (Dual color, Bio-rad)



Obr. 3.13. Imunodetekce s Hs-23 (100 x ředěná) na 2D-elektroforéze ureového extraktu JAR buněk.

šipka - protein značený protilátkou Hs-23

U ostatních značených proteinů se jedná o nespecifickou reakci protilátky pozorovanou i na negativní kontrole.

4. DISKUSE

4.1 DEMEMBRANIZACE A REAKTIVACE MOTILITY

Demembranizované spermie představují vhodný model pro studium pohybových komponent bičíku. Po přidavku různých substrátů, které působí přímo na axonemu, lze okamžitě pozorovat jejich vliv na iniciaci nebo hyperaktivaci motility. Metoda byla popsána např. na býčích [94], křeččích [95], rybích [10], beraních [96] a jiných spermiích.

Spermie byly před demembranizací promyty, aby došlo k odstranění semenné plasmu. Bylo popsáno, že semenná plasma kančích spermií obsahuje faktory inhibující reaktivaci motility, stejně jako králičí a lidská semenná plasma [97, 98]. U beraních spermií nebyly zjištěny inhibitory reaktivace motility [96].

Při zavádění metody demembranizace bylo nezbytné otestovat a optimalizovat složení demembranizačního roztoku (DR) a dobu jeho působení na buňky.

Ukázalo se, že konkrétní koncentrace Tritonu X-100 není determinující pro průběh demembranizace kančích spermií. Všechny námi testované koncentrace (Tab. 3.1) byly dostatečné pro demembranizaci a zároveň umožnily následnou reaktivaci. Toto zjištění je v souladu s výsledky experimentů s beraními spermiemi [96]. Na křeččích spermiích byl kromě toho popsán inhibiční efekt vysoké koncentrace Tritonu X-100 (> 0,05%) na reaktivaci motility [95].

Byla optimalizovaná doba působení DR na kančí spermie. Po přidavku DR k suspenzi spermií byl pozorován okamžitý inhibiční vliv Tritonu X-100 na jejich motilitu. Tento detergent způsobuje uvolňování různých povrchových proteinů, degradaci plasmatické membrány a tím ztrátu endogenního ATP, což je primární důvod ztráty motility spermií. K následné reaktivaci nedošlo pokud byly spermie vystaveny působení DR dobu delší než 3 – 5 min.

Demembranizované spermie jsou velmi citlivé na běžnou manipulaci, proto nebylo možné DR od spermií odmyt. Reaktivační roztok (RR) byl tedy přidáván ke spermiím bez předchozího odstranění DR. Z důvodu stálého působení Tritonu X-100 nebyly spermie schopné opakované reaktivace. Detergent Triton X-100 působící delší dobu

pravděpodobně degraduje vnitřní cytoskeletální struktury a způsobuje taková poškození axonemy, která nejsou slučitelná se schopností pohybu [98]. Odstranění DR by pravděpodobně vedlo k prodloužení doby, po kterou jsou spermie schopné i opakované reaktivace.

Kromě koncentrace DM a doby jeho působení bylo třeba optimalizovat koncentrace dalších látek nezbytných k reaktivaci.

Po rychlém přidání RR k demembranizovaným spermii došlo k reaktivaci pohybu, která trvala přibližně 5 - 10 min. Nejlepší výsledek reaktivace nastal při koncentraci ATP 1,33 mM. Pomalejší nástup motility a nižší počet motilních spermii byl pozorován po reaktivaci s nižšími koncentracemi ATP. V experimentu s beranými spermii bylo popsáno potlačení reaktivace při koncentracích ATP nižších než 0,1 mM [96], což je v souladu s našimi výsledky. Opačný trend nastal při koncentracích ATP vyšších než 1 mM, kdy došlo také k potlačení reaktivace beraných spermii [96]. Příčinou různých požadavků na množství ATP potřebné k reaktivaci motility mohou být mezidruhové rozdíly ve stavbě a metabolismu spermii.

Bylo dokázáno, že přidavek cAMP do RR způsobuje lepší pohyblivost býčích spermii [94], narozdíl od beraných spermii, jejichž motilita byla dostatečná i bez přítomnosti cAMP [96]. V našem pokuse probíhala reaktivace demembranizovaných kančích spermii v nepřítomnosti cAMP, motilita takto reaktivovaných spermii byla srovnatelná s motilitou intaktních spermii, proto nebyl důvod měnit reakční podmínky.

Bylo také popsáno, že v RR musí být zachován poměr $[Mg^{2+}] : [ATP]$ (1 : 1). V případě nadbytku Mg^{2+} nebo ATP docházelo k inhibici ATPasové aktivity [96]. V souladu s těmito výsledky byla v našem experimentu prováděna reaktivace motility kančích spermii s RR obsahujícím stejný poměr koncentrací Mg^{2+} a ATP (1,33 mM).

Místo ATP byly v RR testovány i další energetické substráty. Ke kančím spermii byl ihned po demembranizaci přidáván RR s přidavkem různých meziproduktů glykolýzy nebo ADP o různých koncentracích. U žádného uvedeného substrátu nebyla pozorována reaktivace pohybu. Z výsledků tohoto experimentu lze usuzovat, že detergent Triton X-100 zřejmě způsobuje poškození glykolytické dráhy a pravděpodobně také dalších drah energetického metabolismu.

4.1 NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE S MONOKLONÁLNÍMI PROTILÁTKAMI NA PREPARÁTECH S KANČÍMI SPERMIEMI

Pro hodnocení kvality spermií se v praxi využívají různé metody (morfologie, motilita, imunologická detekce využívající monoklonální protilátky a jiné). Monoklonální protilátky jsou specifickým nástrojem pro studium úlohy daných proteinů během procesu fertilizace. Jednoduchou detekcí vybraného antigenu umožňuje tato metoda zjistit fyziologický stav buněk a funkci vybraného antigenu v buňce např. během kapacitace nebo akrosomální reakce. Monoklonální protilátky proti intra-akrosomálním proteinům mohou být použity pro studium stavu akrosomu např. během kapacitace a akrosomální reakce [83, 90], jsou také vhodným nástrojem k testování kvality spermií [84, 85].

Vzhledem ke známé lokalizaci vybraných proteinů na intaktních spermiích bylo cílem otestovat případné změny v lokalizaci po demembranizaci. Pro nepřímou imunofluorescenci byla použita protilátka proti kančímu akrosinu ACR.2 a dále protilátky připravené proti proteinům lidských spermií (Hs-8, Hs-14), které křížově reagují také s kančími spermiemi.

Protilátka ACR.2 detekuje volnou formu akrosinu [90], která se může z akrosomu uvolňovat akrosomální reakce. Vazba protilátky ACR.2 na kančí spermie během koinkubace s prasečími vajíčky, tedy během akrosomální reakce, inhibovala ve vazebném *in vitro* testu vazbu spermie na vajíčko. Toto zjištění naznačuje, že akrosin je proteinem, který se účastní sekundární vazby spermie na vajíčko [4]. U kančích intaktních spermií značila tato protilátka jasně akrosom (98,5%), ale na demembranizovaných spermiích (97,5%) se charakter značení výrazně lišil. DR indukoval akrosomální reakci, došlo k uvolnění akrosinu a byla značena oblast v okolí hlavičky.

Protilátka Hs-8 rovněž značí protein uvnitř akrosomu (částečně značí i bičík spermií). Byly provedeny funkční vazebné testy, (podobně jako s protilátkou proti akrosinu) a bylo zjištěno, že protilátka Hs-8 inhibuje též sekundární vazbu spermie na vajíčko. Tento experiment prokázal vazebnou úlohu tohoto proteinu v sekundární vazbě na vajíčko [4], jeho úloha v bičíku je zatím neznámá.

Protilátka Hs-8 značila akrosom kančích spermií. Počet značených buněk se po permeabilizaci acetonem (98%) a demembranizací (96,5%) významně nelišil. Protein

specificky značený protilátkou Hs-8 je tedy pravděpodobně vázán na vnitřní akrosomální membránu.

Další testovanou protilátkou byla protilátka Hs-14. Tato protilátka byla použita k hodnocení stavu akrosomu savčích spermií před a po indukované akrosomální reakci. Protilátka Hs-14 značila akrosomální oblast u lidských spermií (78%); po indukované akrosomální reakci (ionofor A23187; 60 min) počet značených buněk rapidně klesl (44%). [84].

Při porovnání rozdílu ve značení kančích spermií intaktních a spermií demembranizovaných byl pozorován podobný trend. Byl zaznamenán pokles v počtu značených demembranizovaných spermií (80,5%) oproti počtu intaktních spermií (99%). Tento trend je pravděpodobně způsoben tím, že protein specificky značený protilátkou Hs-14 může být vázán na akrosomální membrány. Množství detekovaného proteinu ve spermií po demembranizaci nejspíš závisí na době působení DR a po delší době demembranizace může docházet k dalšímu uvolňování proteinů z vnitřní akrosomální membrány a tím ke snižování počtu značených buněk.

Z výsledků je zřejmé, že lokalizace testovaných proteinů (akrosin, pHs-8, pHs-14) se na demembranizovaných spermiích může lišit. Akrosin je volně lokalizován v akrosomu a po akrosomální reakci indukované DR se vylévá z akrosomu, zatímco proteiny testované protilátkami Hs-8, Hs-14 vykazovaly podobnou lokalizaci jako u intaktních spermií v důsledku jejich pravděpodobného ukotvení na akrosomální membráně.

4.2 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKA Hs-23; CHARAKTERIZACE A JEJÍ VLIV NA MOTILITU SPERMIÍ

Protilátka Hs-23, byla připravená imunizací myší lidskými spermii. V prvních imunofluorescenčních testech byla detekována pozitivní reakce na bičíku lidských a v křížové reakci i na bičíku kančích spermii. Proto charakterizace této protilátky a pHs-23 pokračovala na obou modelech. Vždy se jednalo o spermie dobré kvality (kančí spermie určené pro inseminaci, lidské spermie s normálním spermioqramem).

Monoklonální protilátka Hs-23 značila specificky protein na bičíku kančích spermii. Bičík intaktních spermii byl značen po celé délce (98%), silnější značení bylo pozorováno v mitochondriální oblasti. Z tohoto důvodu jsme předpokládali, že by pHs-23 mohl být zapojen do procesů souvisejících s motilitou. Imunofluorescence na intaktních lidských buňkách byla srovnatelná.

Po demembranizaci kančích spermii se charakter značení pHs-23 změnil. Bičík v hlavní části byl značen silněji (97,5%), v mitochondriální oblasti značení naopak vymizelo.

Pro testování křížové reaktivity s jiným typem buněk, byly vybrány buňky choriokarcinomové linie (JAR). Imunofluorescence prokázala přítomnost pHs-23 i na těchto buňkách. Z toho plyne, že se nejedná o protein specifický pouze pro spermie.

Po zjištění lokalizace pHs-23 proteinu následovala jeho biochemická charakterizace. V jednorozměrné elektroforéze byly porovnávány vzorky lidských a kančích spermii a lidské a kančí semenné plasmě. Imunodetekce prokázala značení na lidských a kančích spermii a v lidské semenné plasmě, nikoliv však v kančí. Předpokládáme, že tento rozdíl může být způsoben přítomností poškozených buněk v lidském ejakulátu. Kančí spermie jsou vysoké kvality (určené na inseminaci), narozdíl od lidských spermii, které jsou i v případě normozoospermie spojeny s určitou patologií.

Na základě dvourozměrové SDS elektroforézy a imunodetekce s protilátkou Hs-23 byl vybrán vhodný (specificky značený) protein z extraktu lidských spermii k charakterizaci metodou MALDI-TOF. Výsledkem analýzy bylo určení daného proteinu jako enolasy 1, formy nespecifické pro spermie. Výsledek potvrzují i imunofluorescenční testy, včetně značení na JAR buňkách.

Pozorované značení na 2D-SDS PAGE s dalšími extrakty (kančí spermie, JAR buňky) odhalilo rozdílné hodnoty pI detekovaného proteinu, což může být v důsledkem různých modifikací specifických pro jednotlivé buňky a organismy.

Použitím protilátky Hs-23 proti proteinu lokalizovanému na bičíku spermie jsme za předpokladu jeho účasti v procesu motility chtěli inhibovat jeho funkci. Z principu metody však nebylo možné zjistit, jestli má protilátka Hs-23 vliv na funkci detekovaného antigenu, tedy enolasy 1. Reaktivace motility byla totiž prováděna přidavkem ATP, které v normální glykolytické dráze vzniká součinností právě enolasy 1. Přídavek ATP jsme tedy chtěli nahradit použitím různých meziproductů glykolýzy, jejich účinek při reaktivaci motility jsme však nepozorovali, a to ani bez inhibice enolasy protilátkou Hs-23.

5. SOUHRN VÝSLEDKŮ

Ve shodě se zadanými cíly práce jsem získala tyto výsledky:

Podářilo se mi zavést a optimalizovat metodu demembranizace a reaktivace motility na modelu kančích spermii.

Metodou nepřímé imunofluorescence s protilátkami proti akrosinu (ACR.2) a dalším akrosomálním proteinům (Hs-8, Hs-14) a také s novou protilátkou (Hs-23) jsem porovnala rozdíly ve značení na kančích intaktních a demembranizovaných spermii. Zjištěné rozdíly v detekci všech vybraných proteinů podávají cenné informace o jejich lokalizaci v intaktní buňce.

Velká část mé práce byla věnovaná charakterizaci nové protilátky (Hs-23) a proteinu specificky značeného touto protilátkou (pHs-23). Nepřímou imunofluorescencí jsem prokázala lokalizaci daného proteinu na bičíku kančích i lidských spermii a změnu v lokalizaci po demembranizaci spermii. Lokalizace v bičíku spermie naznačovala možnost účasti daného proteinu v motilitě spermii. Pomocí biochemických metod a následné analýzy hmotnostního spektra (MALDI-TOF) byl pHs-23 charakterizován jako enolasa 1. Pro studium pohybu spermii prostřednictvím metody demembranizace a reaktivace motility však není vhodný.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Jonáková, V., Tichá, M.: Collect. Czech. Chem. Commun.; **69**, 461-475 (2004)
2. Jonáková, V., Maňásková, P., Tichá, M.: J. Chromatogr. B. Analys. Technol. Biomed. Life Sci.; **849**, 307-14 (2007).
3. Maňásková, P., Pěkníková, J., Elzeinová, F., Tichá, M., Jonáková, V.: J. Reprod. Immunol. [v tisku] (2007)
4. Pěkníková, J., Čapková, J., Geussová, G., Ivanova, M., Mollova, M.: Theriogenology; **56**, 211-223 (2001).
5. Yanagimachi, R.: Mammalian Fertilization, v knize The Physiology of Reproduction. Knobil ENJ. New York, Raven Press; 189-317 (1994).
6. Eddy, E.M., and O'Brien, D.A.: The spermatozoon, v knize The Physiology of Reproduction. Knobil ENJD. New York, Raven Press; 29-78 (1994).
7. Hendrich, J.L., Urch, U.A., Hardy, D.M.: Structure-function properties of the sperm enzyme acrosin, v knize Enzymes in Agricultural Biotechnology. Washington. ACS Books; 1-10 (1998).
8. Železná, B., Čechová, D., Henschen, A.: Biol. Chem. Hoppe. Seyler.; **370**, 323-327 (1989).
9. Moos, J., Tesařík, J., Leca, G., Pěkníková, J.: FEBS Lett.; **294**, 27-30 (1991).
10. Linhart, O., Cosso, J., Mims, S.D., Rodina, M., Gela, D., Shelton, W.D.: Fish Physiol. Biochem.; **28**, 203-205 (2003)
11. Turner, M.R.: J. Androl.; **24**, 790-803 (2003).
12. Marshall, W.F., Rosenbaum, J.L.: Cur. Opin. Cell Biol.; **12**, 119-125 (2000).
13. Inaba, K.: Zool. Sci.; **20**, 1043-1056 (2003)
14. Inaba, K.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **1101**, 506-526 (2007).
15. Inaba, K., Kagami, O., Ogawa, K.: Biochem. Biophys. Res. Commun.; **297**, 800-805 (1999).
16. Tash, J.S., Krinks, M., Patel, J., Means, R.L., Klee, C.B., Means A.R.: J. Cell Biol.; **106**, 1625-1633 (1988).
17. Moss, S.B., Gerton, G.L.: Trends Endocrinol. Metab.; **12**, 434-440 (2001).

18. Mandal, A., Naaby-Hansen, S., Wolkowicz, M.J., Klotz, K., Shetty, J.: *Human. Reprod.*; **61**, 1184-1197 (1999).
19. Carr, D.W., Fujita, A., Stentz, C.L., Liberty, G.A., Olson, G.E., Narumya, S.: *J. Biol. Chem.*; **276**: 17 332-17 338 (2001)
20. Fujita, A., Nakanuta, K., Kato, T., Watanabe, N., Ishizaki, T., Komára, K., Mizoguchi, A., Narumiya, S.: *J. Cell. Sci.*; **113**, 103-112 (2000).
21. Katz, D.F., Morales, P., Samuels, S.J., Overstreet, J.W.: *Fertil Steril.*; **54**, 513-6 (1990).
22. Yanagimachi, R. *J. Reprod. Fertil.*; **23**, 193-196 (1970).
23. Ishijima, S., Baba, S. A., Mohri, H., Suarez, S. S. *Mol. Repris. Dev.*; **61**, 376-384 (2002).
24. Suarez, S.S., Katz, D.F., Owen, D.H., Andrew, J.B., Powell R.L.: *Biol. Reprod.*; **44**, 375-381 (1991).
25. Ho, H.C., Suarez, S.S.: *Reproduction*; **122**, 519-526 (2001).
26. Mortimer, S.T.: *Hum. Reprod. Update*; **3**, 403-439 (1997).
27. Turner R.M., Eriksson R.L.M., Gerton G.L., Moss S.B.: *Mol. Human Reprod.*; **5**, 816-24 (1999).
28. Sale, W.S, Satir, P.: *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **74**, 2045-2049 (1977).
29. Wargo, M.J., Smith, E.F.: *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **100**, 137-142 (2003).
30. Turner, R.M.: *Reprod. Fertil. Dev.*; **18**, 25-38 (2006).
31. Si, Y., Olds-Clarke, P.: *Biol. Reprod.*; **62**, 1231-1239 (2000).
32. Kovář J.: Přenos signálu uvnitř buňky, v knize *Buněčná proliferace a mechanismy její regulace. II*, Nakladatelství Karolinum, Praha; 21-28 (2000).
33. Kaláb, P., Pěkníková, J., Geussová, G., Moos, J.: *Mol. Repris. Dev.*; **51**, 304-14 (1998).
34. Moos, J., Pěkníková, J., Geussová, G., Philimonenko, V., Hozák, P.: *Mol. Repris. Dev.*; **50**, 79-85 (1998).
35. Pavlok, A., Kubelka, M., Pěkníková, J.: *Zygote*; **9**, 25-38 (2001).
36. Itoh, A., Inaba. K., Ohraje, H., Fujinoki, M., Morisawa, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **305**, 855-861 (2003).
37. Klauck, T.M., Faux, M.C., Labudda, K., Lagenberg, L.K., Jaken, S., Scott, J.D.: *Science*; **27**, 1589-1591 (1996).
38. Niu J., Vaiskunaite R., Suzuki N., Kozasa T., Carr D.W., Dulin N., Voyno-Yasenetskaya, T.A.: *Curr.t Biol.*; **11**, 1686-1690 (2001)

39. Ren, D., Navaro, B., Perez, G., Jackson, A.C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J.L., Clapham, D.E.: *Nature*; **413**, 603-609 (2001).
40. Sakata, Y., Saegusa, H., Zong, S., Osanai, M., Murakoshi, T., Shimizu, Y., Noda, T., Aso, T., Tanabe, T.: *FEBS Lett.*; **516**, 229-233 (2002).
41. Quill, T.A., Sudgen, S.A., Rossi, K.L., Doolittle, L.K., Hammer, R.E., Garbers, D.L.: *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **100**, 14 869-14 874 (2003).
42. Elliott, W.H. & Elliott, D.C.: *Chemical signalling in the body, v knize Biochemistry and molecular biology*, Oxford University Press Inc., New York; 349-365 (1997).
43. Ho, H.C., Suarez, S.S.: *Biol. Reprod.*; **68**, 1590-1596 (2003).
44. Hess, K.C., Jones, B.H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T.S.: *Dev. Cell*; **9**: 249-259 (2005).
45. Ignatz, G.G., Suarez, S.S.: *Biol. Reprod.*; **73**, 519-526 (2005).
46. Smith, E.F.: *Mol. Biol. Cell* **13**, 3303-3313 (2002).
47. Nevo, A.C., Polge C., Frederick, G.: *J. Reprod. Fertil.*; **22**, 109-118 (1970).
48. Tombes, R.M., Shapiro, B.M.: *Cell*; **41**, 325-334 (1985).
49. Tombes, R.M., Brokaw, C.J., Shapiro, B.M.: *Biophys. J.*; **52**, 75-86 (1987).
50. Kamp, G., Busselmann, G., Lauterwein, J.: *Experientia.*; **52**, 487-494 (1996).
51. Steeghs, K., Oerlemans, F., Wieringa, B.: *Biochim. Biophys. Acta.*; **1230**, 130-138 (1995).
52. Yeung, C.H., Majumder, G.C., Rolf, C., Behre, H.M., Cooper, T.G.: *Mol. Hum. Reprod.*; **2**, 591-596 (1996).
53. Rees, J.M., Ford, W.C., Hull, M.G.: *J. Reprod. Fertil.*; **90**, 147-156 (1990).
54. Narisawa, S., Hecht, N.B., Goldberg, E., Boatright, K.M., Reed, J.C., Milan, J.L.: *Mol. Cell Biol.* **22**; 5554-5562 (2002)
55. Miki, K., Qu, W., Goulding, E.H., Willis, W.D., Bunch, D.O., Strader, L.F., Perreault, S.D., Eddy, E.M., O'Brien, D.A.: *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **101**, 16 501-16 506 (2004)
56. Durrieu, C., Bernier-Valentin, F., Rousset, B.: *Mol. Cell.Biochem.*; **74**, 55-65 (1987).
57. Huitorel, P., Pantaloni, D.: *Eur. J. Biochem.*; **150**, 265-269 (1985).
58. Kumagai, H., Sakai, H.: *J. Biochem.*; **93**, 1259-1269 (1983).
59. VeÂrtessy, B. G., Orosz, F., Kovacs J., Ovadi, J.: *J. Biol. Chem.*; **272**, 25542-25546 (1997).
60. Walsh, J. L., Keith, T. J., Knnull, H. R.: *Biochim. Biophys. Acta*; **999**, 64-70 (1989).

61. Sackett, D. L., Wolff, J.: *J. Biol. Chem.*; **261**, 9070-9076 (1986).
62. Volker, K. W., Knull, H. R.: *Arch. Biochem. Biophys.*; **338**, 237-243 (1997).
63. VeÁrtessy, B. G., Kovacs, J., Ovadi, J.: *FEBS Lett.*; **379**, 191-195 (1996).
64. Srere, P. A., Knull, H. R.: *Trends Biochem. Sci.*; **23**, 319-320 (1998).
65. Ovadi, J., Orosz, F.: *Curr. Top. Cell Regul.*; **33**, 105-126 (1992).
66. Lehotzky, A., Telegdi, M., Liliom, K., Ovadi, J.: *J. Biol. Chem.*; **268**, 10888-10894 (1993).
67. Eddy, E.M., Toshimori, K. O'Brien, D.A.: *Micros. Res. Tech.*; **61**: 103-115 (2003).
68. Welch, J.E., Brown, P.L., O'Brien, D.A., Magyar, P.L., Bunch, D.O., Eddy, E.M.: *J. Androl.*; **21**, 328-338 (2000)
69. Johnstone, S.A., Waisman, D.M., Rattner, J.B.: *Exp. Cell Res.*; **202**, 458-463 (1992)
70. Rattner, J.B.: *Exp. Cell Res.*; **195**, 110-113 (1991).
71. Knull, H. R., Walsh, J. L.: *Curr. Top. Cell. Regul.* **33**, 15-29 (1992).
72. Gitlits, V.M., Toh, B.H., Loveland, K.L., Sentry, J.W.: *Eur. J. Cell Biol.*; **79**, 104-11 (2000)
73. Force, A., Viallard, J.L., Grizard, G., Boucher D.: *J. Adrol.*; **23**, 202-210 (2002)
74. Casano, R., Orgando, C., Serio, M., Forti, G.: *Int. J. Androl.*; **14**, 257-263 (1991).
75. Aitken, R.J., Krausz, C., Buckingham, D.: *Mol. Reprod. Dev.*; **39**, 268-279 (1994).
76. Edwards, Y.H., Grootegoed, J.A.: *J Reprod Fertil.*; **68**, 305-310 (1983)
77. Force, A., Viallard, J.L., Saez, F., Grizard, G., Boucher, D.: *Androl.*; **25**, 824-829 (2004).
78. Ho, H.C., Granish, K.A., Suarez, S.S.: *Dev. Biol.*; **250**, 208-217 (2002).
79. Kinukawa, M., Nagata, M., Aoki, F.: *Reproduction.*; **128**, 813-818 (2004).
80. Si, Y., Okuno, M.: *Exp Cell Res.* 1993 Sep; **208**, 170-174 (1993).
81. Nakano, I., Kobayashi, T., Yoshimura, M., Shingyoji, C.: *J. Cell Sci.*; **116**, 1627-1636 (2003).
82. Čapková, J., Pěkníková, J.: *Molec. Reprod. Develop .*; **46**, 168-175 (1997)
83. Pěkníková, J., Moos, J.: *Andrologia*; **22**, 427-435 (1990).
84. Pěkníková, J., Chládek, D., Hozák, P.: *Amer. J. Immunol. Reprod.*; **53**, 1-8 (2005).
85. Teplá, O., Pěkníková, J., Kočí, K., Mika, J., Mrázek, M., Elzeinová, F.: *Fertil. Steril.*; **86**, 113-120 (2006).
86. Pěkníková, J., Kyselová, V., Buckiová, D., Boubelík, M.: *Amer. J. Reprod. Immunol.*; **47**, 311-318 (2002).

87. Kyselová, V., Pěknicová, J., Buckiová, D., Boubelík, M.: *Reprod. Biol. Endocrinol.*; **1**, 30 (2003).
88. Kyselová, V., Pěknicová, J., Boubelík, M., Buckiová, D.: *Theriogenology*; **61**, 1307-1325 (2004).
89. Pěknicová, J., Pexidrová, M., Kubátová, A., Koubek, P., Teplá, O., Sulimenko, T., Dráber, P.: *Fertil. Steril.*; [v tisku] (2007).
90. Pěknicová, J, Moos, J., Mollova, M., Sršeň, V., Čapková, J.: *Anim. Reprod. Sci.*; **35**, 255-271 (1994).
91. Laemmli, U.K.: *Nature*; **227**, 495-497(1970).
92. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: *Biotechnology*; **24**, 145-9 (1992).
93. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Pallia, A.K., Partner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Gorké, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C.: *Anal. Biochem.*; **150**, 76-85 (1985).
94. Lindemann, C.B.: *Cell*; **13**, 9-18 (1978).
95. Mohri, H., Yangimachi, R.: *Exp. Cell Res.*; **127**, 191-196 (1980).
96. White, I.G., Voglmayr, J.K.: *Biol. Reprod.*; **34**, 183-193 (1986).
97. De Lamirande, E., Gagnon, C.: *Submicrosc. Cytol.*; **15**, 83-87 (1983).
98. De Lamirande, E., Bardin, C.W., Gagnon, C.: *Biol. Reprod.*; **28**, 788-796 (1983).

MS analysis report

Miroslav Šulc
Mass Spectrometry Lab
Videňská 1083
CZ-142 20 Prague 4
Czech Republic

Phone: +420-2-4106 2644
Fax: +420-2-4106 2749
E-mail: msulc@biomed.cas.cz

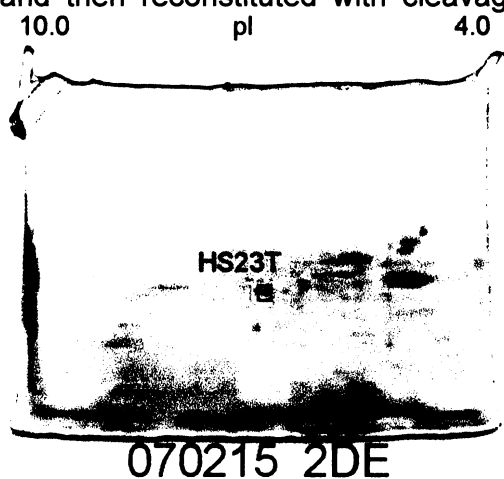
Experimental:

Proteolytic digestion and sample preparation

CBB R-250 stained protein spot was cut from the 2DE gel (picture 1 from 051204, and), chopped into small cubes (approx. 1mm^3) and washed several times with 10 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 M 4-ethylmorpholine acetate (pH 8.1) in 50% acetonitrile (MeCN). After complete destaining, the gel was washed with water, shrunk by dehydration with MeCN and reswollen again in water. Next, the gel was partly dried using a SpeedVac concentrator and then reconstituted with cleavage buffer containing 0.01 % 2-mercaptoethanol, 0.1 M 4-ethylmorpholine acetate, 10 % MeCN, 1 mM CaCl_2 and sequencing grade trypsin (Promega, 50 ng/ μl). Digestion was carried out overnight at 37°C. The resulting peptides were extracted with 40% MeCN/1% acetic acid and peptides were directly subjected to mass spectrometric analysis.

For MS analysis were used six spots from 2DE gel 070215.

Picture: 2DE gel 070215



Mass spectrometry analysis

Mass spectra were measured on a matrix-assisted laser desorption/ionisation reflectron time-of-flight MALDI-TOF mass spectrometer BIFLEX (Bruker-Franzen, Bremen, Germany) equipped with a nitrogen laser (337 nm) and gridless delayed extraction ion source. Ion acceleration voltage was 19 kV and the reflectron voltage was set to 20 kV. Spectra were calibrated externally using the monoisotopic $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion of peptide standards angiotensin I (Sigma). A saturated solution of α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid in 50% MeCN/0.3% acetic acid was used as a MALDI matrix. A 1 μl of matrix solution was mixed with a 1 μl of the sample on the target and the droplet was allowed to dry at ambient temperature. The MALDI-TOF spectra were collected in reflectron mode.

MALDI-MS spectrum was interpreted with the ProFound database searching program (<http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe>) or MASCOT program (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) with paying attention to preparation of electrophoretic gel.

Results:

The positive ion mass spectrum was measured in the reflection mode for analysed protein. The received values of m/z were used for protein identification after removing of matrix peaks and trypsin autoproteolytic peptides.

The identified values of m/z were (bold masses are from identified proteins):

HS23T					
35SRef					
m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z
748.4	802.7	1072.4	1316.4	1540.6	1960.9
766.6	806.7	1088.4	1335.5	1633.6	2033.1
772.4	810.6	1090.4	1406.4	1638.7	2176.2
773.5	899.5	1118.4	1425.5	1804.9	2510.1
776.4	904.4	1143.4	1434.5	1908	2743.5
800.5	1007.4	1280.3	1525.6	1924	3011.7
801.7					

The MS data of analysed spot resulted in positive protein identification. The identified protein based on MS fingerprinting method is shown in table below.

Protein number	MS data file	Protein Name [Organisms]	Protein Number	MW (kDa)	pI	MASCOT score	ProFound Est'd Z	Sequence coverage (%)	matched/searched peptides
HS23T	35SRef	enolase 1 [Homo sapiens]	gij4503571	47.49	7.0	319		71	30/37
HS23T	35SRef	enolase 1 [Homo sapiens]	NP_001419.1	47.49	7.0		2.36	71	30/37

Note about Z-score:

ProFound calculates the probability that a candidate in a database search is the protein being analyzed. However, it is not easy to cast the calculated probability into the common language of traditional statistics. Here, as an indicator of the quality of the search result, a Z score is estimated when the search result is compared against an estimated random match population. Z score is the distance to the population mean in unit of standard deviation. It also corresponds to the percentile of the search in the random match population. For instance, a Z score of 1.65 for a search means that the search is in the 95th percentile. In other words, there are about 5% of random matches that could yield higher Z scores than this search. Conceptually, this "95th percentile" is different from "95% confidence" that the search is a correct identification.

The shown table is a list for Z score and its corresponding percentile in an estimated random match population.

Z-score	percentile
1.282	90.0
1.645	95.0
2.326	99.0
3.090	99.9

22nd February, 2007

Miroslav Šulc, PhD.

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka