

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Biochemistry**

Ph.D. study program: Biochemistry

Summary of the Ph.D. Thesis



**The study of fluids and secretions from reproductive tracts of pig
(*Sus scrofa f. domestica*) and cattle (*Bos primigenius f. taurus*)**

Mgr. Tomáš Dráb

Supervisor: RNDr. Jiří Liberda, PhD.

Prague, 2014

Abstract

Interactions between proteins and saccharide moieties play an indispensable role in mammalian reproduction as they stand behind of such processes as maturation and mutual recognition of gametes and sperm oviductal reservoir formation. In my dissertation work I focused on activities of glycosidases from bovine and porcine follicular fluids and their changes connected with follicle development. Activities of five glycosidases were detected in tertiary and preovulatory follicles in both species. The most active enzymes were α -L-fucosidase in cow and α -D-mannosidase in sow and both enzymes also demonstrated the most pronounced increase in their activities during follicle maturation. Interestingly, both α -L-fucose in cow and α -D-mannose in sow were described as saccharides responsible for the formation of the sperm oviductal reservoir and we offered a hypothetical mechanism of synchronisation between sperm release from their reservoir with the time of ovulation based on a surge of activities of corresponding follicular glycosidases through the oviduct. Subsequently, it was demonstrated that β -D-galactosidase and α -D-mannosidase affect sperm-zona pellucida binding in pig, as they both decrease interaction between sperm receptors for zona pellucida and zona pellucida. This may explain the observation that maturation changes of zona pellucida induced by follicular fluid lead to lower level of polyspermic fertilisation.

For the sake of better characterisation of studied glycosidases, I developed red native electrophoresis - a novel electrophoretic method suitable for enzyme separation according to their molecular weight and subsequent visualisation of their activities directly in gel. Red native electrophoresis revealed several isoenzymes of detected glycosidases, some of which seemed to be of follicular origin.

In the next part of my dissertation thesis, I analysed antimicrobial properties of follicular, oviductal and uterine fluids and demonstrated that oviductal fluid is the most potent in inhibiting of the growth of *E. coli*. In attempt to identify compounds responsible for observed antimicrobial properties, I first narrowed the search into molecular weight range of 3 500 - 30 000 and subsequently identified histones H2A type 2-C, H2B type 1-K, H3.3, and H4 as the putative antimicrobial agents in bovine oviductal fluid. Their role was further strongly confirmed by inhibition of antimicrobial properties of the fluids by adding antibodies against histones.

And finally, I studied secretions of Cowper's glands. In bull, I concentrated on its role within ejaculate and demonstrated that it increases semen viscosity, decreases the rate of sperm release from ejaculate and enhances binding of seminal proteins to sperm surface. All these observations can be explained by the fact that bovine Cowper's gland secretion positively affects aggregation of seminal protein.

In boar, Cowper's gland secretion forms a seminal plug in the cervix of sow after copulation preventing thus a semen back flow and ensuring its paternity. However, we demonstrated that uterine fluid from the sow in the oestrous phase of the reproductive cycle is capable of rapid proteolytic degradation of the plug in contrast with the fluid from dioestrous sow. We also detected several serine and metalloproteases present in the uterine fluid, which are putative agents responsible for the plug degradation. In the course studies on the porcine seminal plug, we also developed a novel method of dissolving of highly glycosylated mucus matrix under native conditions using a buffered boric acid solution.

1 Introduction

1.1 Oocyte maturation and follicular fluid

An oocyte is a highly specialized cell and undergoes a profound remodelling during its development. With the exception of its last stages, the process of oocyte maturation takes place in an ovarian follicle, which constitutes a specialized microenvironment suited to the needs of an oocyte. Follicular fluid is a complex extracellular fluid, which accumulates in the antrum of follicle during its growing phase. Its components are mainly derived from blood plasma and must cross the blood-ovarian barrier, but it also contains constituents, which are secreted directly by the oocyte or granulosa and thecal cells in an oestrous dependent manner [1]. Enzymes were the most abundant group of protein molecules identified in follicular fluid. Folliculogenesis is a complex and highly coordinated process that involves various metabolic as well as hydrolytic events, mediated by a number of enzymes [2]. Follicular fluid is also a rich source a several glycosaminoglycans, which participate in antrum development due to their high osmotic potential [3] and they were also shown as a potent capacitating factor of bovine spermatozoa [4], which suggests a post-ovulation role of follicular fluid in regulation of sperm-oocyte interaction. Another line of evidence for follicular fluid involvement in post-ovulation processes lies in its ability to serve as a potent chemoattractant for spermatozoa [5].

Besides the obvious changes in the nucleus and cytoplasm, oocyte maturation is also characterised by modification of egg's glycoprotein envelope - *zona pellucida*. The mammalian *zona pellucida* is an acellular translucent sulphated glycoprotein matrix, which is synthesized and secreted by oocyte and by follicle cells during the follicular development [6]. Depending on species, it consist of 3-4 evolutionary conserved glycoproteins, which are designated ZP1-4 [7]. All zona pellucida glycoproteins are highly glycosylated and contain both N- and O-bound oligosaccharides [8, 9], whose glycosylation pattern is modified during the oocyte maturation, as was demonstrated by several lectin studies [10, 11].

Zona pellucida serves as a "gate keeper" by acting as a species-selective substrate during the binding of spermatozoa to an egg [8]. This binding serves as a trigger for the acrosome reaction - a specialised exocytose process, which facilitates sperm penetration through the zona pellucida. Afterwards, constituents of the zona pellucida help in maintaining the binding of acrosome-reacted spermatozoa in order to enable them to penetrate it and to reach the oocyte membrane [12]. The initial recognition of sperm and zona-pellucida is based on protein-saccharide interaction (lectin-like interaction), in which oligosaccharides of the zona pellucida glycoproteins serve as ligands for several proteins on sperm surface. In pig, β -D-galactosyl residues in oligosaccharides linked to ZP3/ZP4 (ZPB/ZPC) probably serve as a ligand for spermadhesin AWN-1 [13]. In cattle, α -mannosyl residues of ZP glycoproteins are probably involved in the sperm-zona binding [14].

Nevertheless, zona pellucida glycoproteins are not the only glycoproteins in the follicle, whose roles is determined by their glycosylation. Differences in glycosylation were shown to have a distinct effect on action of peptide hormones FSH and LH – where it affects their half time and bioactivity [15] or in multifunctional protein glycodelin, whose glycoforms differently modulate sperm sperm-zona pellucida binding and the triggering of acrosome reaction [16].

1.2 Sperm oviductal reservoir

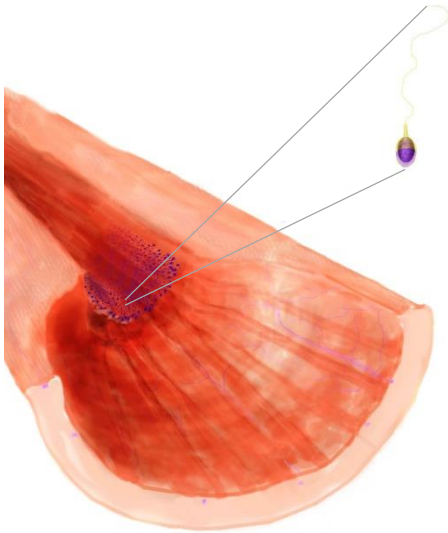


Figure 1.1 Establishing of sperm oviductal reservoir in the isthmic part of the oviduct. Spermatozoa binds certain glycoproteins expressed on the apical part of the epithelial cells lining this part of the oviduct (© T. Dráb).

After ejaculation, sperms have to pass through uterus and oviduct in order to meet an oocyte. Nevertheless, the timing of mating and ovulation is not always the same and therefore several mechanisms have evolved in order to synchronise the meeting of both gametes. A formation of the sperm reservoir in the isthmic part of oviduct is probably the most general strategy in mammals. Apart from synchronisation, its serves to select intact, properly formed and maturated spermatozoa, and to prolong their survival in the female [17]. Molecular mechanism of the sperm oviductal reservoir formation are another example of a protein-saccharide (lectin-like) type of interaction. Epithelial cells lining the cell of the isthmic part of the oviduct expose on the surface of their apical part specific glycoproteins, whose oligosaccharide moieties are readily recognized and bound by proteins on the sperm plasma surface [18]. An important feature of this interaction is that only uncapacitated and, in a broader sense of speaking, intact spermatozoa with properly developed surface protein coat are capable of binding oviductal epithelial cells.

The best characterised example of binding partners are those in cattle, where seminal protein PDC-109 recognizes fucosyl residues in oligosaccharide moieties of the multifunctional glycoproteins annexins-1,-2, -4 and -5 [19], which are expressed by epithelial cells in the isthmic part of the bovine oviduct. In the case of pig, seminal AQN 1 presumably together with DQH, were both identified as the sperm mediator of the reservoir formation by recognising mannosyl (and to a lesser degree galactosyl) residues of the oviduct epithelial glycoproteins [20, 21]. As in cow, their oviductal counterparts seem to annexins, particularly annexin-2 [22].

1.3 Non canonical roles of histones

Even though histones belong to the one of the most studied proteins, all their possible roles in eukaryote organisms are still far from being completely understood and our knowledge about them is continuously expanding. Their principal function is perceived in their interaction with DNA, their participation in chromatin condensation, and the regulation of gene expression. Their occurrence out of nucleus or even out of cell has been often disregarded as a mere artefact of isolation and sample handling, or a more or less insignificant consequence of necrotic processes. However, over time, a growing body of evidence has firmly established histones as a highly multifunctional group of proteins with roles far overreaching the confine of the cell nucleus [23].

A number of studies have revealed their active involvement in a staggering broad spectrum of both intra- and extracellular non canonical biological processes. The histone H1.2 acts as an intracellular signalling molecule and was identified as a cytochrome c releasing factor from mitochondria in the course of apoptosis triggered by double strand DNA breakage [24]. Moreover, the histone H1 also serves as a surface plasma receptor for thyroglobulin in liver macrophages responsible for its clearance from circulation [25] and as the extracellular receptor for polysialic acid in cerebellar neurons, whereby

positively stimulates neuritogenesis [26]. There is also a continuously increasing amount of reports on histones and peptides derived from histones as a part of host defence system across the animal kingdom. Not only were histones and their derivatives ascribed with immunomodulatory properties due to their interactions with several crucial proteins and cells of immune system (e.g. C-reactive protein [27] or TNF- α [28] and macrophages [29]), but also for their ability to serve as a pattern recognition receptor for LPS (histone H2A and H2B in human placenta [30]). But even more importantly, histones and peptides derived from histones were shown to exhibit pronounced antimicrobial activity [23]. Furthermore, the antimicrobial properties of histones are also exploited in a newly described type of a cell death - an intriguing process of ETosis, during which an extracellular net entrapping and killing Gram-positive and Gram-negative bacteria is formed upon the release of granule proteins and chromatin containing histones from several types of cells of the immune system [31].

1.4 Mechanism of antimicrobial activity of histone and histone derived peptide

Despite their long known antimicrobial properties, the exact mechanism of histone action is still not very clear and evidence seems to be conflicting. Histones, with their rather small molecular size and strong positive charge, fit well in our picture of antimicrobial proteins and peptides, otherwise a very diverse group of molecules with regard to their amino acid compositions. Their cationic character enables them to bind negatively charged plasma membrane and they were shown even to penetrate it in an energy independent manner and to enter cytoplasm. Their penetration activities seem to differ and decrease in the order: mixture of histones (containing H1) > H2A > H4 > H3 > H2B [32]. Interestingly, the histones were also able to mediate penetration of much bigger bovine serum albumin (BSA), when they were covalently attached, indicating their future potential as carriers for the delivery of macromolecules into living cells [32]. Their ability to penetrate the cell membrane also raises a question whether it may as well account for their way out of the cell under specific circumstances.

There are certain pieces of evidence, which indicate that the modes of antimicrobial action of arginine rich histones (H3 and H4) and lysine rich histones (H1, H2A, H2B, H5) might be different. Arginine rich histones are believed to act on the cell surface, where they act to disrupt the cell membrane structure with bleb formation in a manner similar to general antimicrobial peptides [33]. On the other hand, lysine rich histones and peptides derived from histone H1 (such as buforin II) seem to kill bacteria without lysing the cell, and they were shown to accumulate in the cytoplasm [34]. Besides their cationic character, there are proofs for a steric factor of antimicrobial action of histones. Experiments using analogous synthetic peptides derived from histone H1 showed a need for a presence of a proline, which provides a hinge in the helical structure of peptide. And even more, the prolyl bonds must be in a cis conformation for these peptides to display their antimicrobial activity [35].

1.5 Native electrophoresis

SDS-PAGE electrophoresis is a commonly used method for a high resolution and separation of complex mixtures of proteins, but its drawback is the inevitable denaturing of most of the proteins in the process. When the nativity of the studied sample is an issue, several types of so called native electrophoresis can be employed. In general, conditions of separation are much milder than in the case of SDS-PAGE, neither heating nor strong detergent or reducing agents can be used and cooling of the during the electrophoretic separation is highly advisable. In principle, there are two ways how to perform native electrophoresis. In the first case, the intrinsic protein charge is used for protein separation, while in the second analogously to SDS-PAGE some other molecule is used to impose more or less uniform charge on proteins. Both approaches have their place in proteomic science.

Colourless native electrophoresis

Colourless native electrophoresis represents a group of methods, which uses intrinsic protein charge for their electrophoretic separation rather. The overall net protein charge is determined by its amino acid composition, posttranslational modifications and by the pH of its surrounding and proteins mobility is determined mostly by their charge to size ratio. It enables detection of enzyme activities after the separation [36], but one of the biggest advantages of this system is its ability to distinguished protein similar in size, but differing in their charge (e.g. glycoforms, isoforms, and phosphorylated proteins), but information about the size of proteins and/or their complexes is not easy to elucidate.

Blue native electrophoresis

Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) is one the most used native electrophoretic system. It was developed by Schägger and Jagow [37, 38] as method for native separation of membrane proteins. BN-PAGE uses a dye Coomassie Brilliant Blue G-250, which binds to protein, and imposes on it a negative charge. Function and structure of protein or proteins complexes are usually not affected by the dye binding and their electrophoretic mobilities are approximately a linear function of the logarithms of their molecular weights. However, the strong interaction between the dye and protein renders this method inept for a subsequent detection of enzymatic activities directly in gel.

2 Aims of the study

The aim of the presented dissertation thesis was to increase our knowledge about fluids and secretions from the female and male reproductive tracts, their compositions, roles, and participation in reproduction of pig and cattle. The overall focus was on protein-saccharide interactions, which are known to stand behind its several crucial steps, and antimicrobial properties, which underpin its successful outcome.

Four partial goals were defined:

- 1. Assessment of glycosidase activities in follicular fluid, their partial characterisation and proposing of their roles in reproduction**
- 2. Development of an electroseparation method suitable for detection of glycosidases and other enzymes in complex samples such as fluids and secretion involved in reproduction.**
- 3. Comparison of antimicrobial properties of fluids from follicle, oviduct and uterus, and identifying the compounds, which are responsible for them**
- 4. Comparison of Cowper's gland secretion from bull and boar, their roles in reproduction and interaction with female reproductive tract.**

3 Material and methods

- isolation of fluids from follicle, oviduct and uterus, isolation of zona pellucida, isolation and solubilisation of Cowper's gland secretions
- screenings of glycosidase and antimicrobial activities
- SDS-electrophoresis, blue-native electrophoresis, red native electrophoresis, enzyme detection directly in gel
- protein labelling (biotin, FITC)
- ELISA-like binding assay

4 Results and discussion

4.1 Detection and characterisation of glycosidases in follicular fluid of cow and sow

Comparison of glycosidase activities in porcine follicular fluid from tertiary and preovulatory follicles.

Tomáš Dráb, Štěpán Ren, Marie Tichá, Pavla Maňásková-Postlerová, Jiří Liberda

Biochemical comparison of fluids from early and late stage follicles in pigs and cows

Štěpán Ren, Tomáš Dráb, Jiří Liberda, Pavla Maňásková-Postlerová

Follicular fluid constitutes an ideal environment for cumulus-oocyte complex development and remains indispensable for *in vitro* fertilisation experiments. Proper oocyte maturation also involves the establishment of oligosaccharide moieties that participate in latter stages of fertilisation. For this reason, we studied the activities of five glycosidases in fluids from porcine and bovine tertiary and preovulatory follicles and blood plasma and compared their activities at two different pH – 5.0 and 7.2. All studied glycosidase activities were found in follicular fluids at both pH. Increase in activities connected with follicle development were observed in the case of α -D-mannosidase in sow (

Figure 4.1) and α -L-fucosidase in cow. α -D-galactosidase showed changes – decrease in sow and increase in cow. Interestingly, both α -L-fucose and α -D-mannose have a strong and altogether similar link to reproduction in respective species as they were described as saccharides responsible for the formation of the sperm oviductal reservoir [19, 22] and increase in their activities may be responsible for synchronisation of release of spermatozoa from their reservoir and ovulation of an oocyte. The effect of glycosidase in reproduction was further tested on the sperm-zona pellucida binding in pig and confirmed pronounced effect of α -D-mannosidase and α -D-galactosidase (**Figure 4.2**). Red native electrophoresis detected two or more isoenzymes of each glycosidase with the exception of α -L-fucosidase. Several of these isoenzymes were detected only in follicular fluid and not in blood plasma, which suggests their follicular origin (**Figure 4.3**).

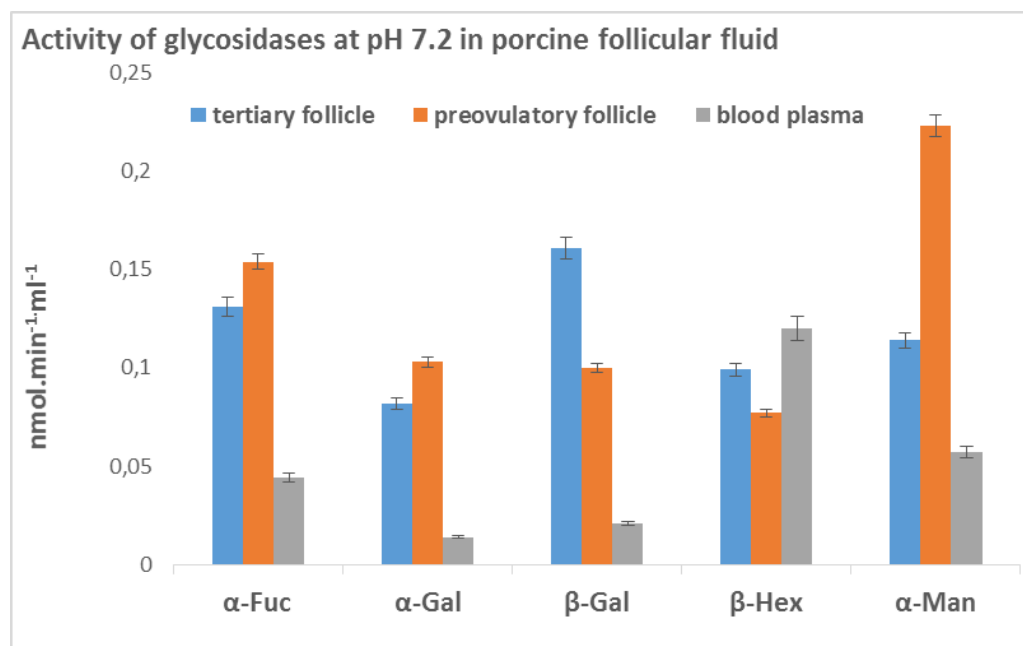


Figure 4.1. Comparison of glycosidase activity in porcine tertiary follicular fluid, preovulatory follicular fluid and blood plasma determined at pH 7.2. α -Fuc: α -L-fucosidase, α -Gal: α -D-galactosidase, β -Gal: β -D-galactosidase, β -Hex: β -D-N-acetylhexosaminidase, α -Man: α -D-mannosidase.

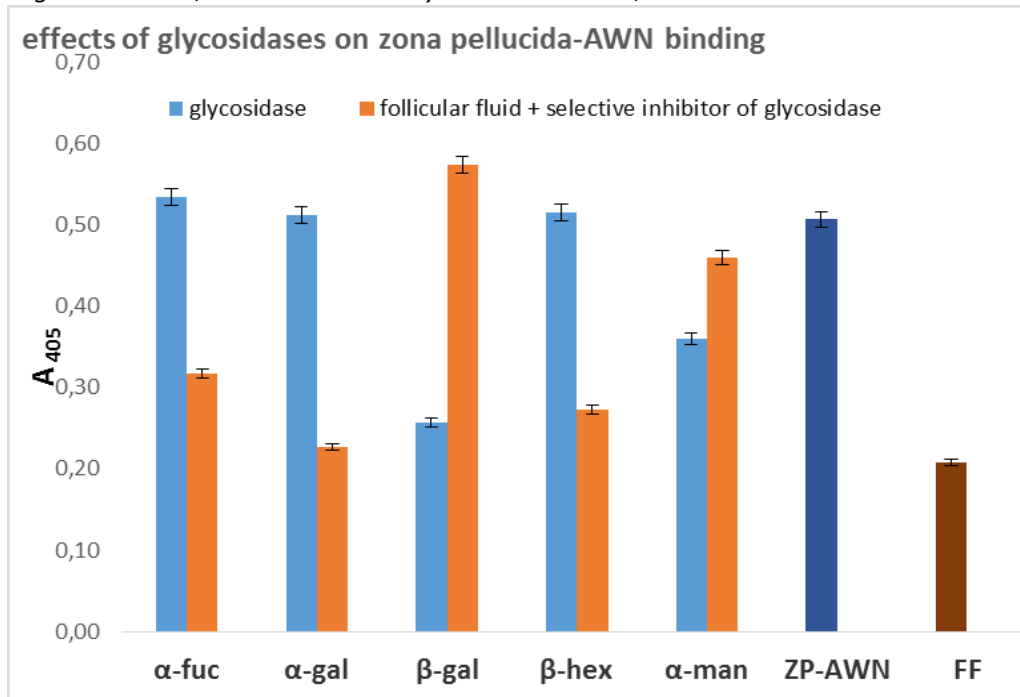


Figure 4.2 Treatment of porcine zona pellucida glycoproteins with glycosidases (blue bars) or with preovulatory follicular fluid together with selective inhibitors of glycosidases (orange bars) and subsequent interaction of zona pellucida with spermadhesin AWN, which is a sperm protein responsible for zona pellucida binding. α -Fuc: α -L-fucosidase/deoxyfuconojirinmycin; α -Gal: α -D-galactosidase/N(N-Nonyl)deoxygalactojirinmycin; β -Hex: β -D-N-acetylhexosaminidase/N-acetylglucosaminothiazolin; β -Gal: β -D-galactosidase/N(N-Nonyl)deoxygalactojirinmycin; α -Man: α -D-mannosidase/deoxymanojirinmycin; ZP-AWN – interaction between untreated zona pellucida and AWN; FF – treatment of zona pellucida with preovulatory fluid with no inhibitor of glycosidase and subsequent interaction between zona pellucida and AWN.

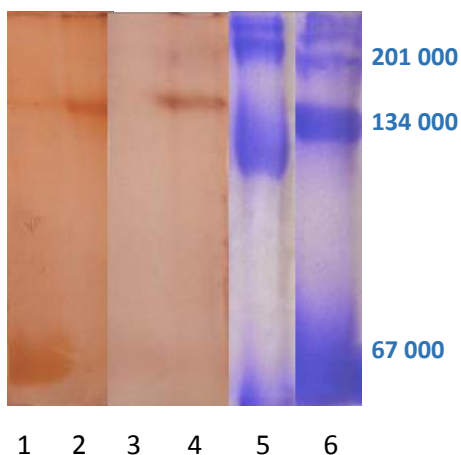


Figure 4.3 Red native electrophoresis of porcine preovulatory follicular fluid and blood plasma – detection of glycosidase activities; only results for α -D-mannosidase are shown: 1. follicular fluid, pH 7.2; 2. blood plasma, pH 7.2; 3. follicular fluid, pH 5.0; 4. blood plasma, pH 5.0; 5. protein detection in follicular fluid; 6. molecular weight standard BSA

4.2 Development of native red electrophoresis

Native Red Electrophoresis – A new method suitable for separation of native proteins

Tomáš Dráb, Jana Kračmerová, Ivana Tichá, Eva Hanzlíková, Marie Tichá, Helena Ryšlavá, Veronika Doubnerová, Pavla Maňásková-Postlerová, Jiří Liberda; *Electrophoresis* 32 (2011) 3597-3599

Native polyacrylamide electrophoresis in the presence of Ponceau Red to study oligomeric states of protein complexes.

Tomáš Dráb, Jana Kračmerová, Ivana Tichá, Eva Hanzlíková, Marie Tichá, Jiří Liberda
J Sep Sci. 2011 Jul; 34(14):1692-5

A new type of native electrophoresis was developed to separate and characterize proteins termed “Red native electrophoresis”. In this modification of the native blue electrophoresis, the dye Ponceau Red S is used instead of Coomassie Brilliant Blue to impose uniform negative charge on proteins to enable their electrophoretic separation according to their relative molecular masses (Figure 4.5). As Ponceau Red S binds less tightly to proteins, in comparison with Coomassie Blue, it can be easily removed after the electrophoretic separation and a further investigation of protein properties is made possible (e.g. an enzyme detection – Figure 4.3 and 4.4). All tested proteins also kept their native properties (enzyme activity or aggregation state).

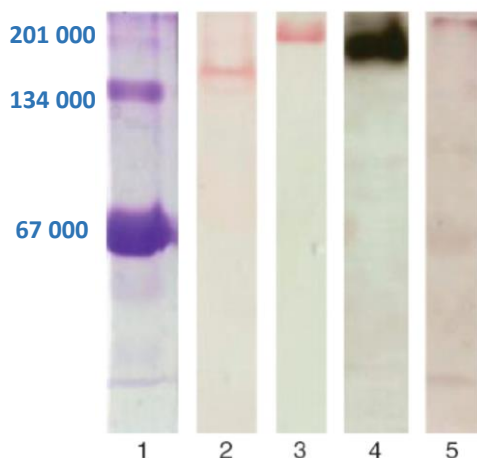
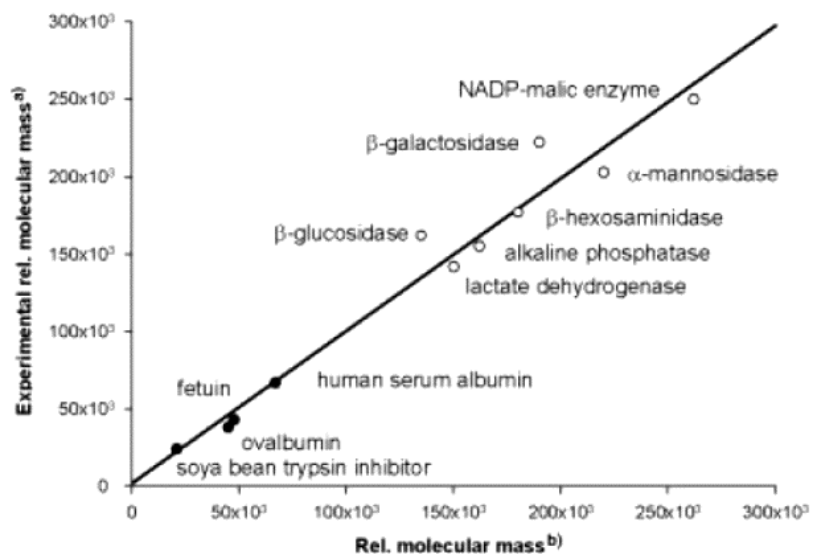


Figure 4.5 Comparison of relative molecular masses of some proteins with those determined using red native polyacrylamide gel electrophoresis. a) Values of experimental relative molecular mass were determined after red native electrophoretic separation using oligomers of bovine serum albumin as standards run simultaneously. b) Relative molecular masses were obtained from Swiss-Prot (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Switzerland) as a database.

● – monomers,
○ – oligomeric proteins.

Figure 4.4 Red native polyacrylamide gel electrophoresis of enzymes and their subsequent detection directly in gel. 1 – molecular weight standard (BSA), 2 – lactate dehydrogenase, isoenzyme M4, 3 – α -D-mannosidase, 4 – β -D-N-acetylhexosaminidase, 5 – NADP-malic enzyme.



4.3 Antimicrobial action of fluids from reproductive tract of cow and sow

The antimicrobial action of histones in the reproductive tract of cow

Tomáš Dráb, Jana Kračmerová, Eva Hanzlíková, Tereza Černá, Rozálie Litváková, Alžběta Pohlová, Marie Tichá, Petr Prikryl, Jiří Liberda

An infection of any part of female reproductive tract can severely interfere with fertility and reproduction. The fluids and epithelium from the lumen of the female reproductive tract (uterus, oviduct and ovarian follicle) are a known source of antimicrobial action in several species. In this study, we compared the antimicrobial properties of fluids from the reproductive tract of a cow. After removal of small molecules, we demonstrated that there is an antimicrobial activity connected with a fraction of compounds with a molecular mass range between 3500 - 30 000. The most probable candidates responsible for the observed antimicrobial effect were subsequently identified by mass spectroscopy as histones H2A type 2-C, H2B type 1-K, H3.3, and H4. The antimicrobial role of histone H2B was further confirmed by using an antibody against this histone (Figure 4.6).

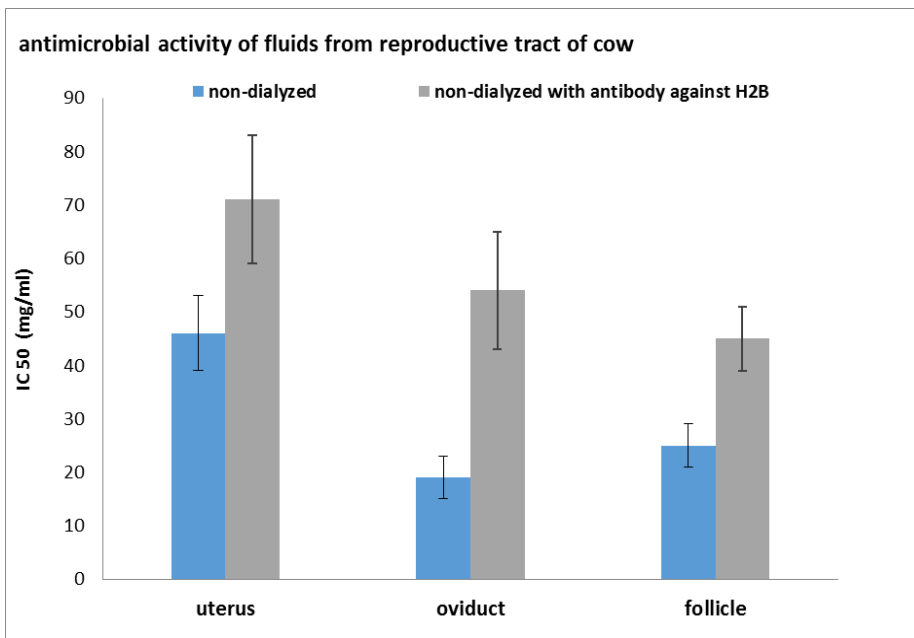


Figure 4.6 Comparison of antimicrobial properties of fluids from reproductive tract of cow. The blue bars represents the half of maximal inhibitory concentration values (IC_{50}), the grey bars represents IC_{50} values of fluids, to which antibody against N-terminal part of histone H2B was added at a concentration of 1.0 mg/ml

4.4 Comparison of Cowper's gland secretion of bull and boar

Role of Cowper's gland secretion in bovine ejaculate

Tomáš Dráb, Ivana Tichá, Pavla Maňásková-Postlerová, Marie Tichá, Petra Přinosilová, Zdeněk Věžník, Jiří Liberda

Artificially prepared ejaculates from lyophilised bull accessory sex gland secretions, epididymal fluid and epididymal spermatozoa were used to show effects of the Cowper's gland secretion on the modulation of bull ejaculate properties. Bovine Cowper's gland secretion was identified as a factor that significantly increases a viscosity of ejaculates and reduces the rate of release of spermatozoa. Furthermore, Cowper's gland secretion considerably enhances aggregation of seminal proteins and simultaneously increases binding of seminal vesicles components on the sperm surface (Figure 4.7).

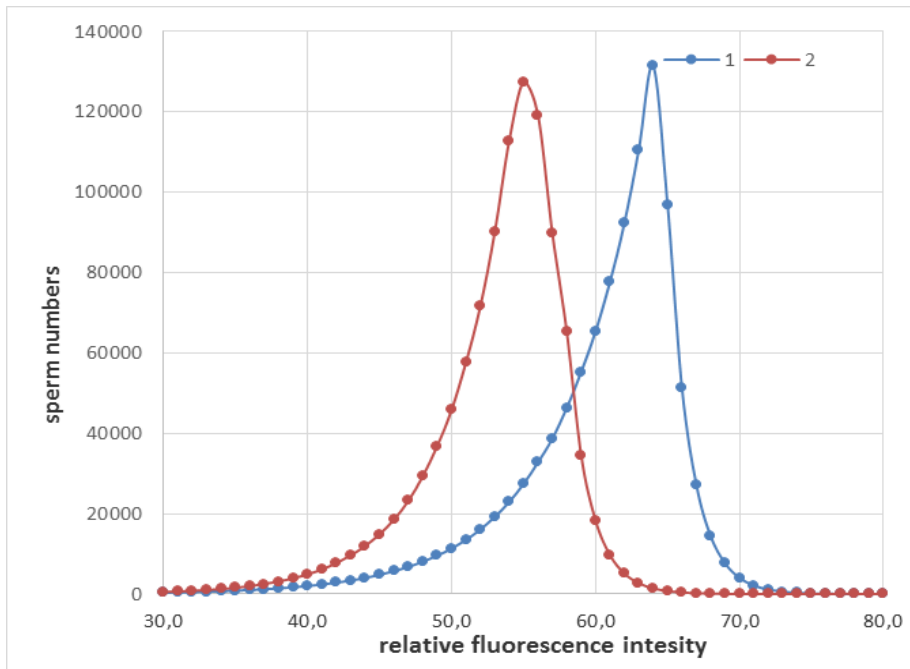


Figure 4.7. Effect of bovine Cowper's gland secretion on adhesion of secretion from seminal vesicles on a sperm surface measured by flow cytometry

1 - in the presence of Cowper's gland secretion;

2 - in the absence of Cowper's gland secretion.

Degradation of seminal cervical plug in sow (*Sus scrofa f. domestica*)

Ivana Tichá, **Tomáš Dráb**, Eva Hanzlíková, Pavla Maňásková-Postlerová, Marie Tichá, Jiří Liberda

Uterine fluid is a source of many enzyme activities among which proteases have a prominent role. They participate in remodelling of uterine surface and matrix and thus regulate its function in an oestrous dependent manner. We have detected several metalloproteases and serine proteases in oestrous uterine fluid of sow by substrate zymography. Further, in our study we demonstrate that uterine fluid also participates in proteolytic degradation of a seminal cervical plug derived from Cowper's gland secretion and moreover that the rate of its degradation is profoundly increased around the time of ovulation (Figure 4.8).

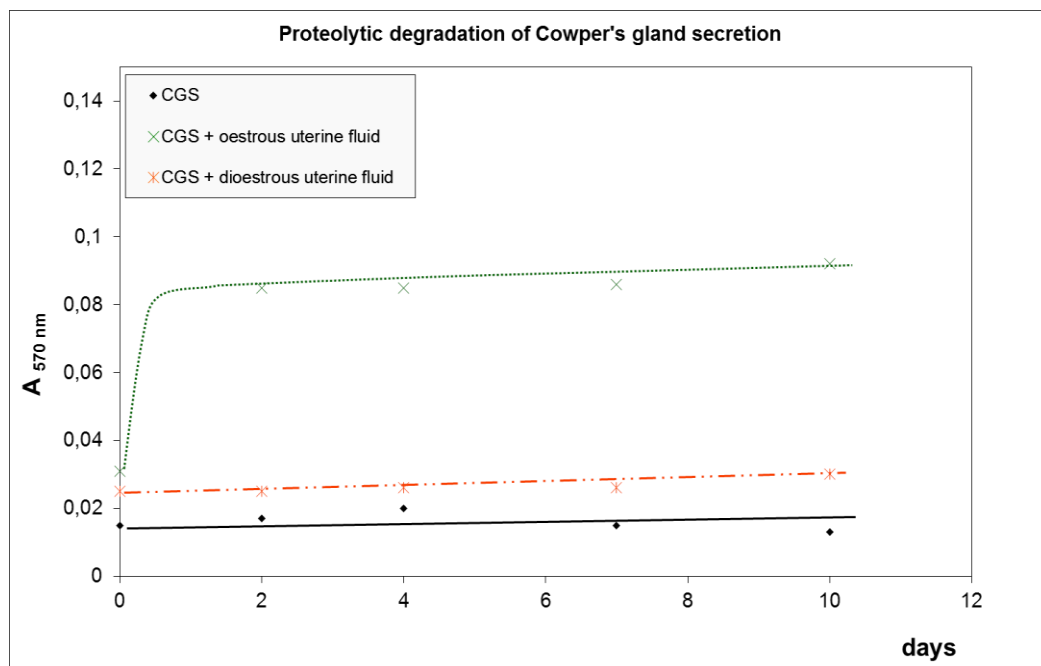


Figure 4.8 Comparison of rates of proteolytic degradation of porcine Cowper's gland secretion by uterine fluid from oestrous and dioestrous sows; CGS – Cowper's gland secretion.

5 Conclusions

Presented dissertation focused on follicular, oviductal and uterine fluid, and secretion of Cowper's glands both in pig (*Sus scrofa f. domestica*) and cattle (*Bos primigenius f. taurus*).

- **Characterisation of activities of five glycosidases** in fluids from tertiary and preovulatory follicle and blood plasma of sow and cow revealed interspecies and maturation-dependent differences. At neutral pH, **α -L-fucosidase** was the most active glycosidase in the bovine follicular, whereas **α -D-mannosidase** was the most active glycosidase in porcine follicular fluid. Both enzymes also demonstrated the most pronounced increase in their activities during follicle maturation. The second most active glycosidase was **β -D-galactosidase**, which also demonstrated oestrus-dependent changes in both species. Further studies showed that simulation of porcine zona pellucida maturation with glycosidase treatment had a negative effect on binding of zona pellucida by sperm surface proteins AQN and AWN especially in case of **α -D-mannosidase** and **β -D-galactosidase** and these enzymes might therefore participate in regulation of proper sperm binding.
- Comparison of glycosidase activities in follicular fluid and blood plasma showed that without any regard to developmental stage of follicle, **activities of studied glycosidases were much higher in follicular fluid than in blood plasma**, with the general exception of β -N-acetylhexosaminidase in both species and α -D-mannosidase in cow, whose activities were comparable or even higher in blood plasma. This finding suggested at least partial follicular origin of detected glycosidases, which for further confirmed by red native electrophoresis.
- A novel native electrophoresis termed "**red native electrophoresis**" was developed and **optimised**. It combines advantages of blue native and colourless native electrophoresis as it enables separation of proteins and their complexes according to their molecular weights and subsequent visualisation of enzymatic activities directly in gel. It revealed **the presence of several isoforms of each glycosidase** in porcine follicular fluid and blood plasma with the exception of α -L-fucosidase, which is present only in one form. **Some of these isoforms were shown to be follicle specific**. This is especially true for bands of rather low molecular weight of around 70-80 kDa found in follicular fluid at neutral pH for β -N-acetylhexosaminidase, β -D-galactosidase and α -D-mannosidase.
- Comparison of **antimicrobial activities of follicular, oviductal and uterine fluid** demonstrated that oviductal fluid in both species is the most potent. Further studies on the bovine reproductive fluids identified important source of antimicrobial activity in the range of molecular weights of 3500 - 30 000 SDS-PAGE followed by MALDI-TOF identified four protein molecules from this range as **histones H2A type 2-C, H2B type 1-K, H3.3, and H4**. The role of histones as antimicrobial agents was further confirmed by **polyclonal antibodies against H2B, which distinctly diminished antimicrobial activities** of all three fluids - its effect was most pronounced in the case of bovine oviductal fluid, which demonstrated about threefold decrease in its antimicrobial potency.
- Studies on the **role of Cowper's gland secretion in bull** demonstrated it **increases semen viscosity** and **positively affects aggregation** state of seminal proteins and simultaneously enhances **adhesion of seminal proteins on the sperm surface**.
- **Porcine Cowper's gland secretion**, which forms a gelatinous plug in the female's cervix after mating. We **developed a method for its dissolving under native conditions using a boric acid** and further studied its degradation by uterine fluid. While fluid from dioestrous sows was very slow in its digestion, **uterine fluid from the oestrous sows rapidly degraded it**.

6 References

- [1] Fahiminiya, S., Gérard, N., *Gynecol Obstet Fertil* 2010, 38, 402-404.
- [2] Ambekar, A. S., Nirujogi, R. S., Srikanth, S. M., Chavan, S., Kelkar, D. S., Hinduja, I., Zaveri, K., Prasad, T. S. K., Harsha, H. C., Pandey, A., Mukherjee, S., *Journal of Proteomics* 2013, 87, 68-77.
- [3] Clarke, H. G., Hope, S. A., Byers, S., Rodgers, R. J., *Reproduction* 2006, 132, 119-131.
- [4] Thérien, I., Bergeron, A., Bousquet, D., Manjunath, P., *Mol Reprod Dev* 2005, 71, 97-106.
- [5] Sun, F., Giojalas, L. C., Rovasio, R. A., Tur-Kaspa, I., Sanchez, R., Eisenbach, M., *Dev Biol* 2003, 255, 423-427.
- [6] Sinowatz, F., Kolle, S., Topfer-Petersen, E., *Cells Tissues Organs* 2001, 168, 24-35.
- [7] Yurewicz, E. C., Sacco, A. G., Subramanian, M. G., *J Biol Chem* 1987, 262, 564-571.
- [8] Yonezawa, N., Kanai, S., Nakano, M., *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007, 63, 217-228.
- [9] Dell, A., Chalabi, S., Easton, R. L., Haslam, S. M., Sutton-Smith, M., Patankar, M. S., Lattanzio, F., Panico, M., Morris, H. R., Clark, G. F., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100, 15631-15636.
- [10] Parillo, F., Diverio, S., Todini, L., Fagioli, O., *Veterinary Research* 2001, 32, 581-590.
- [11] Desantis, S., Ventriglia, G., Zizza, S., De Santis, T., Di Summa, A., De Metrio, G., Dell'aquila, M. E., *Theriogenology* 2009, 72, 300-309.
- [12] Wassarman, P. M., *Cell* 1999, 96, 175-183.
- [13] Dostalova, Z., Calvete, J. J., Sanz, L., Topferpetersen, E., *European Journal of Biochemistry* 1995, 230, 329-336.
- [14] Amari, S., Yonezawa, N., Mitsui, S., Katsumata, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Takeda, Y., Nakano, M., *Molecular Reproduction and Development* 2001, 59, 221-226.
- [15] Wide, L., Eriksson, K., Sluss, P. M., Hall, J. E., *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009, 94, 958-964.
- [16] Yeung, W. S. B., Lee, K. F., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., Chiu, P. C. N., *Journal of Reproductive Immunology* 2009, 83, 26-30.
- [17] Talevi, R., Gualtieri, R., *Theriogenology* 2010, 73, 796-801.
- [18] Suarez, S. S., *International Journal of Developmental Biology* 2008, 52, 455-462.
- [19] Ignatz, G. G., Cho, M. Y., Suarez, S. S., *Biology of Reproduction* 2007, 77, 906-913.
- [20] Jelínková, P., Liberda, J., Manásková, P., Ryslavá, H., Jonáková, V., Tichá, M., *J Reprod Immunol* 2004, 62, 167-182.
- [21] Liberda, J., Manaskova, P., Prelovska, L., Ticha, M., Jonakova, V., *Journal of Reproductive Immunology* 2006, 71, 112-125.
- [22] Teijeiro, J. M., Ignatz, G. G., Marini, P. E., *Molecular Reproduction and Development* 2009, 76, 334-341.
- [23] Parseghian, M. H., Luhrs, K. A., *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire* 2006, 84, 589-604.
- [24] Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., Takao, T., Fan, Y. H., Matsuoka, Y., Zhang, L. L., Yoneda, Y., Fujii, Y., Skouitchi, A. I., Tsujimoto, Y., *Cell* 2003, 114, 673-688.
- [25] Brix, K., Summa, W., Lottspeich, F., Herzog, V., *Journal of Clinical Investigation* 1998, 102, 283-293.
- [26] Mishra, B., von der Ohe, M., Schulze, C., Bian, S., Makhina, T., Loers, G., Kleene, R., Schachner, M., *Journal of Neuroscience* 2010, 30, 12400-12413.
- [27] Duclos, T. W., Zlock, L. T., Marnell, L., *Journal of Biological Chemistry* 1991, 266, 2167-2171.
- [28] Witkin, S. S., Linhares, I. M., Bongiovanni, A. M., Herway, C., Skupski, D., *Bjog-an International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2011, 118, 145-153.
- [29] Friggeri, A., Banerjee, S., Xie, N., Cui, H. C., de Freitas, A., Zerfaoui, M., Dupont, H., Abraham, E., Liu, G., *Molecular Medicine* 2012, 18, 825-833.
- [30] Kim, H. S., Cho, J. H., Park, H. W., Yoon, H., Kim, M. S., Kim, S. C., *Journal of Immunology* 2002, 168, 2356-2364.
- [31] von Kockritz-Blickwede, M., Goldmann, O., Thulin, P., Heinemann, K., Norrby-Teglund, A., Rohde, M., Medina, E., *Blood* 2008, 111, 3070-3080.
- [32] Hariton-Gazal, E., Rosenbluh, J., Graessmann, A., Gilon, C., Loyter, A., *Journal of Cell Science* 2003, 116, 4577-4586.
- [33] Tagai, C., Morita, S., Shiraishi, T., Miyaji, K., Iwamuro, S., *Peptides* 2011, 32, 2003-2009.
- [34] Park, C. B., Kim, H. S., Kim, S. C., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998, 244, 253-257.
- [35] Luders, T., Birkemo, G. A., Nissen-Meyer, J., Andersen, O., Nes, I. F., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005, 49, 2399-2406.
- [36] Wittig, I., Schagger, H., *Proteomics* 2008, 8, 3974-3990.
- [37] Schägger, H., von Jagow, G., *Anal Biochem* 1991, 199, 223-231.
- [38] Schägger, H., Cramer, W. A., von Jagow, G., *Anal Biochem* 1994, 217, 220-230.

7 Curriculum vitae

Personal information

name:	Tomáš Dráb	phone	604 156 519
date of birth:	19.11.1981	e-mail:	A-tom@seznam.cz

Education

2006 - 2014	PhD degree in Biochemistry at the Charles University, Faculty of Science <i>(The study of fluids and secretions from reproductive tracts of pig (<i>Sus scrofa f. domestica</i>) and cattle (<i>Bos primigenius f. taurus</i>))</i>
2001 - 2006	Master degree in Biochemistry at the Charles University, Faculty of Science

Certificates and exams

2009	State Doctoral Examination
2008	Certificate of Advanced English (CAE)
2006	Semen Analysis Certificate (Veterinary Research Institute, Brno)

Experience

Researcher positions

2012 - 2014	Crop Research Institute (Detection of viruses of <i>Poaceae</i> ; interaction of plant and viruses; development of new methods for virus detection)
2011 - 2012	Charles University, Department of Cell Biology (Optimizing chromatin immunoprecipitation method and studying of the role of the transcription factors Cbf11 and Cbf12 in <i>S. pombe</i> and the role of the protein Prp45 in <i>S. cerevisiae</i>)

Teaching practice

2006 - 2009	Collaboration on the course "Biology for Biochemists" (Charles University, Department of Biochemistry)
2006 - 2009	Organisation of voluntary seminar accompanying the course "Biology for Biochemists" (Charles University, Department of Biochemistry)

Short Internships

2008	Veterinary Research Institute, Brno
2005	Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR <i>(Production and purification of mouse serine racemase)</i>
2002	Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR

Languages

English	advanced (CAE certificate)
German	intermediate
French	basic

Conferences

2011	Fertility 2011, Dublin <i>Oviductal histones, new properties of well-known proteins in reproduction</i>
2010	25th International Symposium on Microscale Bioseparation <i>Novel Method of Protein Separation – Native Red Electrophoresis</i>

- 2006 **XX. Biochemical Congress of Czech Society for Biochemistry and Molecular Biology**
The Role of Cowper Glands in Bull
Formation of Sperm Reservoir in Reproductive Tract
- 2006 **XIII. Symposium of Czech Reproduction Immunologist**
The Role of Cowper Glands Secretion in Bull
- 2005 **XII. Symposium of Czech Reproduction Immunologist**
Formation of sperm reservoir in reproductive tract
The Role of Cowper Glands Secretion in Bull

8 List of publications

Accepted

1. The antimicrobial action of histones in the reproductive tract of cow.

Dráb T, Kračmerová J, Hanzlíková E, Černá T, Litváková R, Pohlová A, Tichá M, Příklad P, Liberda J.
Biochem Biophys Res Commun. 2014 Jan 17;443(3):987-90. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.077. Epub 2013 Dec 19.

2. Native red electrophoresis - a new method suitable for separation of native proteins.

Dráb T, Kračmerová J, Tichá I, Hanzlíková E, Tichá M, Ryšlavá H, Doubnerová V, Maňásková-Postlerová P, Liberda J.
Electrophoresis. 2011 Dec;32(24):3597-9. doi: 10.1002/elps.201100310.

3. Native polyacrylamide electrophoresis in the presence of Ponceau Red to study oligomeric states of protein complexes.

Dráb T, Kračmerová J, Tichá I, Hanzlíková E, Tichá M, Liberda J.
J Sep Sci. 2011 Jul;34(14):1692-5. doi: 10.1002/jssc.201000869. Epub 2011 Jun 16.

In preparation

Comparison of glycosidase activities in porcine follicular fluid from tertiary and preovulatory follicles.

Dráb T, Ren Š, Hanzlíková E, Tichá M, Maňásková-Postlerová P, Liberda J

Biochemical comparison of fluids from early and late stage follicles in pigs and cows

Ren Š, Dráb T, Liberda J, Maňásková-Postlerová P

Degradation of seminal cervical plug in sow (*Sus scrofa f. domestica*)

Tichá I, Dráb T, Liberda J, Maňásková-Postlerová P, Liberda J

Role of Cowper's gland secretion in bovine ejaculate

Dráb T, Tichá I, Hanzlíková E, Maňásková-Postlerová P, Tichá M, Věžník Z, Liberda J

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra Biochemie**

Doktorský studijní program: Biochemie

Autoreferát disertační práce



**Studie tekutin a sekretů z reprodukčních traktů prasete
(*Sus scrofa f. domestica*) a skotu (*Bos primigenius f. taurus*)**

Mgr. Tomáš Dráb

Školitel: RNDr. Jiří Liberda, PhD.

Praha, 2014

Abstrakt

Protein-sacharidové interakce hrají významnou roli v reprodukci savců, jsou podstatou takových dějů, jako je maturace a vzájemné rozpoznání gamet nebo formování oviduktálního rezervoáru spermií. V mé dizertační práci jsem se zabýval aktivitami glykosidas v folikulární tekutině krávy a prasnice jejich změnami spojenými se zrání folikulu. Detekoval jsem aktivity pěti různých glykosidas v terciálním a preovulačním folikulu u obou druhů. Nejaktivnějšími enzymy byly α -L-fukosidasa v kravské folikulární tekutině a α -D-manosidasa v prasečí. Zároveň aktivita obou těchto enzymů vykazovala největší nárůst během zrání folikulu. Je zajímavé, že právě α -L-fukosa v případě krávy a α -D-manosa v případě prasnice jsou sacharidy, které se důležitě pro vznik oviduktálního rezervoáru spermií a aktivita výše zmíněných enzymů se tak nabízí jako hypotetický mechanismus synchronizace uvolňování spermií z jejich oviduktálního rezervoáru s dobou ovulace. Dále jsem ukázal, že aktivita β -D-galaktosidasy a α -D-manosidasy ovlivňují interakci mezi receptory spermií pro zonu pellucida a zonou pellucidou, což může vysvětlit, jak změny zony pellucida spojené s její maturací mohou vést ke snížení polyspermického oplodnění.

Abych lépe charakterizoval studované glykosidas, vyvinul jsem červenou nativní elektroforézu – což je nová elektroforetická metoda vhodná k separaci enzymů podle jejich molekulové hmotnosti a následné vizualizace jejich aktivity přímo v gelu. Červená nativní elektroforesa odhalila přítomnost několika isoformů studovaných glykosidas, z nichž některé se zdají být folikulárního původu.

V další části své dizertační práce jsem analyzoval antimikrobiální vlastnosti folikulární, oviduktální a děložní tekutiny a ukázal, že oviduktální tekutina je nejsilnějším inhibítozem růstu *E. coli*. Při pokusu o identifikaci látek zodpovědných za pozorované antimikrobiální vlastnosti, jsem nejprve zúžil pátrací pole na rozsah molekulových hmotností 3 500 -30 000 a předběžně identifikoval histony H2A typ 2-C, H2B typ 1-K, H3.3 a H4 jako proteiny zodpovědné za antimikrobiální aktivitu tekutin reprodukčního traktu krávy. Jejich roli jsem následně potvrdil inhibicí jejich antimikrobiální aktivity přidáním protilátek proti histonům.

V poslední části svojí dizertační práce jsem se zabýval sekrety Cowperových žláz u býka i kance. U býka jsem studoval jejich roli v rámci ejakulátu a ukázal jsem, že tyto sekrety výrazně přispívají ke zvýšení jeho viskozity, zpomalují uvolňování spermií z ejakulátu a zesilují vazbu proteinů se semenných váčků na povrch spermií. Všechna tato pozorování mohou být vysvětlena tím, že sekrety býčích Cowperových žláz také výrazně zvyšují agregační stav semenných proteinů.

U kance, sekrety Cowperových žláz tvoří kopulační zátku v děložním hrdle prasnice na konci páření, která zabraňuje výtoku semene a také slouží k zajištění otcovství. My jsme však ukázali, že děložní tekutina prasnice v estrální fázi reprodukčního cyklu je schopna tuto zátku rychle proteolyticky degradovat na rozdíl od děložní tekutiny z prasnice v diestrální fázi cyklu. Také jsme detekovali několik serinových proteas a metaloproteas v děložní tekutině, které mohou být zodpovědné za degradaci kopulační zátky. Navíc v průběhu této studie jsme také vyvinuli novou metodu rozpouštění vysoce glykosylovaných sekretů za nativních podmínek s využitím pufovaných roztoků kyseliny borité.

1. Úvod

1.1 Maturace oocyta a folikulární tekutina

Oocyt představuje vysoce specializovanou buňku, která během svého vývoje podstupuje výraznou remodelaci. S výjimkou posledních stádií, celý proces dozrávání oocyta probíhá ve speciálním mikroprostředí folikulu, který je vyplněn komplexní extracelulární tekutinou hromadící se v jeho nitru. Její jednotlivé složky jsou převážně původem z krevní plazmy a musí nejprve překonat bariéru mezi krví a folikulem. Nicméně obsahuje také látky, které jsou sekretovány přímo oocytem či granulosačními nebo thekalními buňkami v závislosti na fázi estrálního cyklu [1]. Mezi nejčastější proteiny identifikované ve folikulární tekutině patří enzymy. Folikulogeneze je komplexní a vysoce koordinovaný proces, který zahrnuje celou řadu metabolických stejně jako hydrolytických dějů, které jsou jimi zprostředkovány [2]. Folikulární tekutina je také bohatým zdrojem glykosaminoglykanů, které se podílí na zvětšování dutiny folikulu díky svému vysokému osmotickému potenciálu [3] a zároveň se ukázalo, že mají výrazné prokapacitační účinky na spermie býka [4], což naznačuje určitou roli folikulární tekutiny také v dějích následujících po ovulaci. Dalším důkazem pro tuto domněnku je skutečnost, že folikulární tekutina má výrazné chemoatraktivní účinky na spermie [5].

Kromě ovidních změn v jádře a cytoplazmě, dozrávání vajíčka je také charakterizováno úpravou jeho glykoproteinové obálky - zóny pellucidy. Savčí zóna pellucida je bezbuněčná, průhledná a sulfatovaná glykoproteinová hmota, která je syntetizována a sekretována oocytem a folikulárními buňkami během vývoje folikulu [6]. V závislosti na druhu se sestává z 3-4 evolučně konzervovaných glykoproteinů, které se označují jako ZP1-4 [7]. Všechny glykoproteiny zóny pellucidy jsou vysoce glykosylovány a obsahují jak N- tak O-glykosidicky vázané oligosacharidy [8, 9], jejichž struktura je také podrobena maturačním změnám, jak ukázaly některé lektinové studie [10, 11].

Zóna pellucida slouží k druhově specifickému rozpoznávání mezi vajíčkem a spermii [8]. Jejich vzájemná vazba pak slouží jako spouštěč tzv. akrosomové reakce, což je speciální případ exocytosis, který usnadňuje spermie při pronikání skrze zónu pellucidu. Následně pak komponenty zóny pellucidy pomáhají přidržovat spermii během jejího pronikání a umožňují jí tak, aby se nakonec dostala až k membráně oocyta [12]. Počáteční vazba spermie na zónu pellucidu je příkladem interakce založené na vazbě mezi proteinem a sacharidem (tzv. lektinový typ vazby), ve kterém oligosacharidy glykoproteinů zóny pellucidy slouží jako ligand pro některé proteiny na povrchu spermie. V případě prasete, je to pravděpodobně β -D-galaktosa, v komplexech oligosacharidů navázaných na ZP3/ZP4 (ZPB/ZPC), která je rozpoznávána spermadhesinem AWN-1 [13]. U skotu jsou to zase α -manosylové struktury obsažené v glykoproteinech zóny pellucidy, které se podílejí na vazbě spermie [14].

Nicméně, glykoproteiny zóny pellucidy nejsou těmi jedinými ve folikulární tekutině, jejichž role je určována glykosylací. Jsou to právě rozdíly ve strukturách a složení navázaných oligosacharidů, které do určité míry modulují funkci např. peptidových hormonů FSH a LH, u kterých bylo ukázáno, že hrají svojí úlohu v jejich bioaktivitě a rychlosti jejich odbourávání [15]. Dalším příkladem může být multifunkční protein glycodelin, jehož jednotlivé glykoformy výrazně ovlivňují vazbu spermie na zónu pellucidu nebo vyvolání akrosomové reakce [16].

1.2 Oviduktální rezervoár spermíí

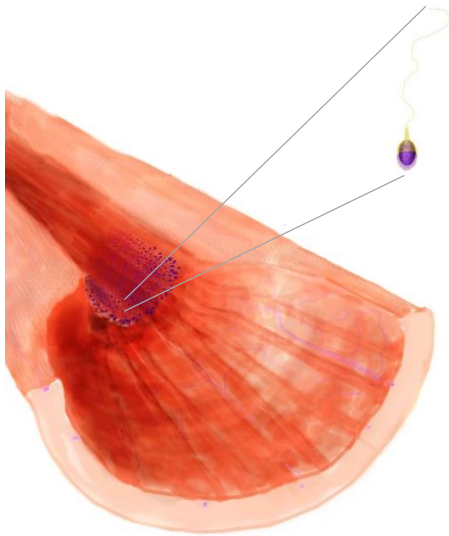


Figure 1.1 Oviduktální rezervoár spermíí se zakládá v isthmické části oviduktu. Spermie jsou schopné rozpoznat a navázat se na specifické glykoproteiny, které jsou exprimované na apikálních površích epitheliálních buněk právě v této části oviduktu (© T. Dráb).

Po ejakulaci, spermie musí projít celou dělohou a dostat se do oviduktu, který je místem jejich setkání s vajíčkem. Avšak doba ovulace a doba páření se nemusí vždy překrývat a proto se vyvinulo několik mechanismů, které napomáhají lepší synchronizaci setkání gamet. Jedním z obecných přístupů se u savců jeví formování tzv. oviduktálního rezervoáru spermíí, který se kromě synchronizace ovulace s přítomnosti spermíí také podílí na selekci neporušených a plně vyzrálých spermíí a prodloužení jejich doby života v samici [17]. Molekulární mechanismus zodpovědný za tvorbu oviduktálního rezervoáru je dalším příkladem protein-sacharidové interakce v reprodukci. Epitheliální buňky vystýlající isthmickou část oviduktu vystavují na svých apikálních površích specifické glykoproteiny, jejichž oligosacharidové části jsou rozpoznávány proteiny na povrchu spermíí [18]. Důležitým rysem této interakce je, že pouze nekapacitované a v širším slova smyslu neporušené spermie se správně vyvinutým proteinovým obalem jsou schopné vazby na oviduktální epithel

Molekulární mechanismy vzniku oviduktálního rezervoáru jsou nejlépe charakterizovány u skotu, kde protein ze semenné plasmy PDC-109 přichycený na povrch spermie rozpoznává α -L-fukosu v oligosacharidech, které jsou součástí multifunkčních glykoproteinů anexinů-1, -2, -4 a -5 exprimovaných epitheliálními buňkami v isthmické části oviduktu [19]. V případě prasete, protein ze semenné plasmy vázající se na povrch spermie AQN-1 pravděpodobně spolu s proteinem DQH, se oba podílí na vzniku rezervoáru svojí schopností vázat α -D-manosu (a do menší míry i D-galaktosu), která je součástí glykoproteinů exprimovaných oviduktálním epithelem [20, 21]. Stejně jako v případě skotu, i u prasete byly anexiny identifikovány jako pravděpodobné ligandy proteinů povrchu spermíí, obzvláště pak annexin-2 [22].

1.3 Nezvyklé role histonů

Přestože histony patří k jedním z nejvíce studovaných proteinů, všechny jejich možné úlohy v eukaryotních organismech zdaleka nejsou ještě známy a histony dovedou stále překvapit svojí všestranností. Za jejich hlavní funkci se považuje jejich interakce s DNA, kondenzace chromatinu a regulace genové exprese. Jejich výskyt mimo jádro, nebo dokonce mimo buňku býval často považovaný za pouhý artefakt izolace nebo manipulace se vzorkem, popřípadě více či méně bezvýznamný následek nekrotických procesů. Avšak během doby narůstající množství důkazů postupně ukázalo, jak multifunkční skupinou proteinů histony ve skutečnosti jsou a jak jejich přímé funkce zdaleka přesahují hranice eukaryotického jádra [23].

Velké množství studií odhalilo aktivní účast histonů na širokém spektru dějů odehrávajících se v cytoplazmě nebo dokonce mimo buňku. Například histon H1.2 slouží jako signální molekula, která je zodpovědná za uvolnění cytochromu c z mitochondrie během apoptosy vyvolané dvouvláknými zlomy v DNA [24]. Dále histon H1 slouží jaterním makrofágům také jako povrchový receptor pro thyreoglobulin a podílí se tak na jeho odstraňování z krevního oběhu [25], nebo jako receptor polysialové kyseliny pro cerebelární neurony, kde pozitivně reguluje růst neuritů [26]. Stále také narůstá množství studií, které popisují zapojení histonů nebo peptidů odvozených z histonů do imunitní obrany

napříč celou živočišnou říší. Nejen že ukázaly, že histony mají imunomodulační vlastnosti díky své schopnosti interagovat s některými významnými proteiny nebo buňkami imunitního systému (např. C-reaktivním proteinem [27] nebo TNF- α [28] a makrofágy [29]), nebo protože mohou sloužit jako receptory pro některé molekulární struktury asociované s patogeny (PAMPs) jako například LPS (histon H2A a H2B v lidské placentě [30]). Nicméně ještě významnější je přímá antimikrobiální aktivita histonů a některých z nich odvozených peptidů [23]. Této jejich vlastnosti je využito také v nově popsaném typu buněčné smrti - procesu nazvaném ETosa, během kterého je několik typů buněk imunitního systému schopno vytvořit extracelulární síť z granulárních proteinů a chromatinu i histony. Tato síť slouží k zachycení a usmrcení jak Gram-positivních tak Gram-negativních bakterií [31].

1.4 Mechanismy antimikrobiální aktivity histonů a peptidů odvozených od histonů

Přestože antimikrobiální vlastnosti histonů jsou známy již dlouhou dobu, přesný mechanismus jejich působení není zcela jasný. Histony se svojí relativně malou molekulovou velikostí a silným pozitivním nábojem dobře zapadají do naší představy antimikrobiálních proteinů a peptidů, což je jinak z hlediska aminokyselinového složení velmi různorodá skupina molekul. Jejich kladný náboj jim umožňuje vázat se na záporně nabitě plasmatické membrány a některé studie dokonce ukázaly, že jsou schopné přes membránu procházet bez dodání energie a dostat se do cytoplasmy. Schopnosti penetrace jednotlivých histonů se od sebe liší a klesají v tomto pořadí: směs histonů (obsahující také H1) > H2A > H4 > H3 > H2B [32]. Zajímavým zjištěním bylo i to, že histony jsou schopné zprostředkovat penetraci i mnohem větších proteinů jako třeba BSA, pokud k nim bylo kovalentně připojeno, což naznačuje jejich možné využití do budoucna jako potenciálních nosičů schopných doručovat makromolekuly do cytoplasmy živých buněk [32]. Jejich schopnost pronikat buněčnými membránami zároveň vznáší i otázku, zda-li nemůže být také zodpovědná za mechanismus jejich uvolňování z buněk za určitých situací.

Některé důkazy naznačují, že antimikrobiální mechanismy histonů se mohou od sebe lišit v závislosti na tom, zda se jedná o histony bohaté na arginin (H3 a H4) nebo histony bohaté na lysin (H1, H2A, H2B, H5). Místem působení histonů bohatých na arginin je pravděpodobně plasmatická membrána. Tyto histony způsobují její narušení a formování tzv. blebů - záhybů na membráně, podobně jako celá řada dalších antimikrobiálních peptidů [33]. Na druhou stranu, histony bohaté na lysin a peptidy z nich odvozené (jako např. buforin II) pravděpodobně účinkují v cytoplasmě, kde se hromadí a zabíjejí buňky bez nutnosti jejich lyse [34]. Navíc v mechanismu antimikrobiálního působení histonů se kromě jejich kladného náboje také projevuje sterický faktor. Experimenty používající syntetické analogy odvozené z histonu H1 prokázaly nutnou přítomnost prolinu a to v jeho cis konformaci, aby se projevily jejich antimikrobiální účinky [35].

1.5 Nativní elektroforesy

SDS elektroforesa patří k běžně používaným metodám separace komplexních směsí proteinů, nicméně její nevýhodnou bývá nevyhnutelná denaturace většiny proteinů. Je-li důležité nativní strukturu proteinů zachovat, lze použít některou z tzv. nativních elektrofores. Obecně podmínky během nativní elektroforesy jsou mírnější než v případě SDS elektroforesy; vyhýbá se použití vysokých teplot nebo silných detergentů, či redukčních činidel a většinou je vhodné chladit elektroforetickou aparaturu během separace. V principu existují dva rozdílné přístupy, jak lze nativní elektroforesy provést. V prvním případě je využito vlastní elektrický náboj molekul proteinů, zatímco v druhém případě se analogicky k SDS elektroforesy použije nějaké další molekuly, která interaguje s proteiny a přebije jejich vlastní náboj. Oba dva přístupy mají své opodstatnění a nalézají využití ve studiu proteinů.

Bezbarvé nativní elektroforesy

Bezbarvé nativní elektroforesy představují skupiny metod, které s využívají vlastního náboje proteinů k jejich elektroseparaci. Náboj proteinu je určen jeho aminokyselinovým složením, posttranslačními modifikacemi a zároveň pH prostředí. Jeho elektroforetická mobilita je pak dána hlavně poměrem velikosti proteinu ku jeho náboji. Bezbarvé nativní elektroforesy umožňují např. detekci enzymatických aktivit v gelu hned po separaci [36] nebo umožňují rozdělení proteinů o podobných velikostí ale lišící se svým nábojem (jako např. různé glykoformy, nebo isoformy, popř. různě fosforylované proteiny). Nicméně získání informace o velikosti proteinu není jednoduché.

Modrá nativní elektroforesa

Modrá nativní elektroforesa je jednou z nejpoužívanějších nativních elektrofores. Byla vyvinuta Schäggerem a Jagowem [37, 38] jako metoda vhodná pro elektroseparaci membránových proteinů. Modrá nativní elektroforesa využívá barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250, které se váže na proteiny a uděluje jim silný negativní náboj. Funkce ani struktura proteinů s navázanou barvou nebývá touto vazbou většinou ovlivněna a elektroforetické mobility proteinů se stávají přibližně funkcí logaritmu jejich molekulových hmotností. Díky velmi silné vazbě barviva není tato metoda vhodná k následné detekci enzymatických aktivit přímo v gelu.

2 Cíle práce

Cílem předkládané dizertační práce bylo rozšířit naše znalosti o tekutinách a sekretech ze samičích a samčích reprodukčních traktů, jejich složení, role a účasti v reprodukci prasat a skotu. Hlavní zaměření bylo na protein-sacharidové interakce, o kterých je známo, že jsou podstatou několika klíčových kroků v reprodukci. Další oblastí výzkumu byly antimikrobiální vlastnosti, které výrazně přispívají k úspěšné reprodukci.

Byly definovány čtyři dílčí cíle:

- 1. Vyhodnocení aktivit glykosidas ve folikulární tekutině, jejich částečná charakterizace a navržení jejich případných rolí v reprodukci**
- 2. Vyvinutí elektroseparační metody vhodné pro detekci glykosidas a dalších enzymů v komplexních vzorcích jakou biologické tekutiny a sekrety účastníci se reprodukce**
- 3. Porovnání antimikrobiálních vlastností tekutin z folikulu, oviduktu a dělohy spojené s identifikací látek, které jsou za ně zodpovědně**
- 4. Porovnání vlastností sekretů Cowperových žláz u býka a kance, jejich role v reprodukci a interakci se samičím reprodukčním traktem**

3 Materiál a metody

- izolace tekutin z folikulu, oviduktu a dělohy, izolace zóny pellucidy, izolace a solubilizace sekretů Cowperových žláz
- vyhodnocování glykosidasových a antimikrobiálních aktivit
- SDS elektroforesa, modrá nativní elektroforesa, červená nativní elektroforesa
- ELISA-like binding assay
- značení proteinů (biotin, FITC)

4 Výsledky a diskuze

4.1 Detekce a charakterizace glykosidas ve folikulární tekutině krávy a prasnice

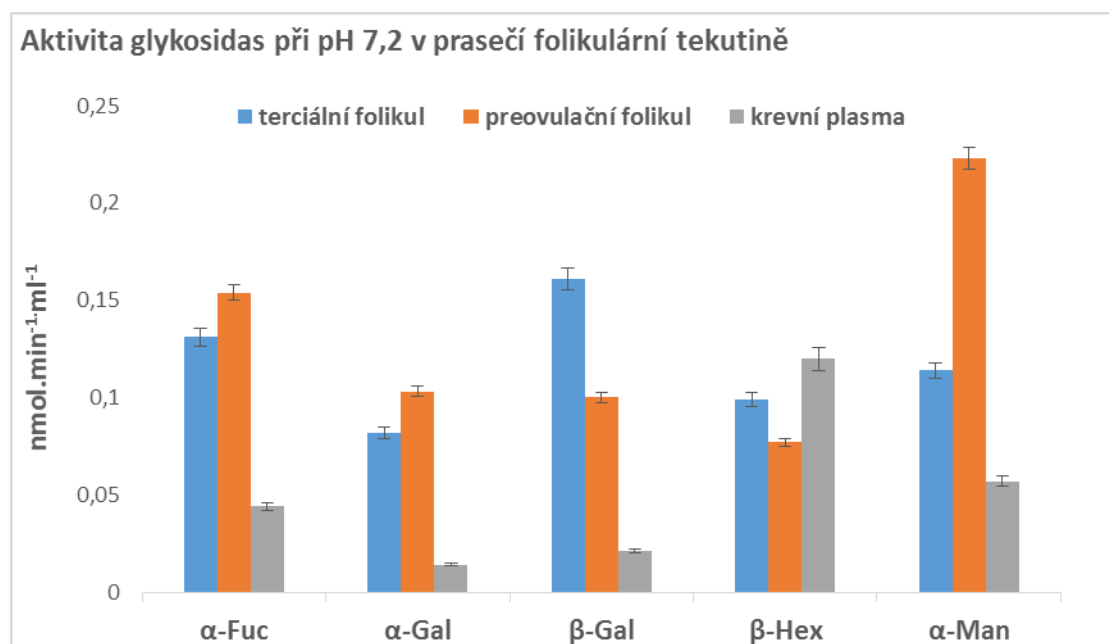
Srovnání aktivit glykosidas v prase folikulární tekutině z terciálních a preovulačních folikulů

Tomáš Dráb, Štěpán Ren, Marie Tichá, Pavla Maňásková-Postlerová, Jiří Liberda

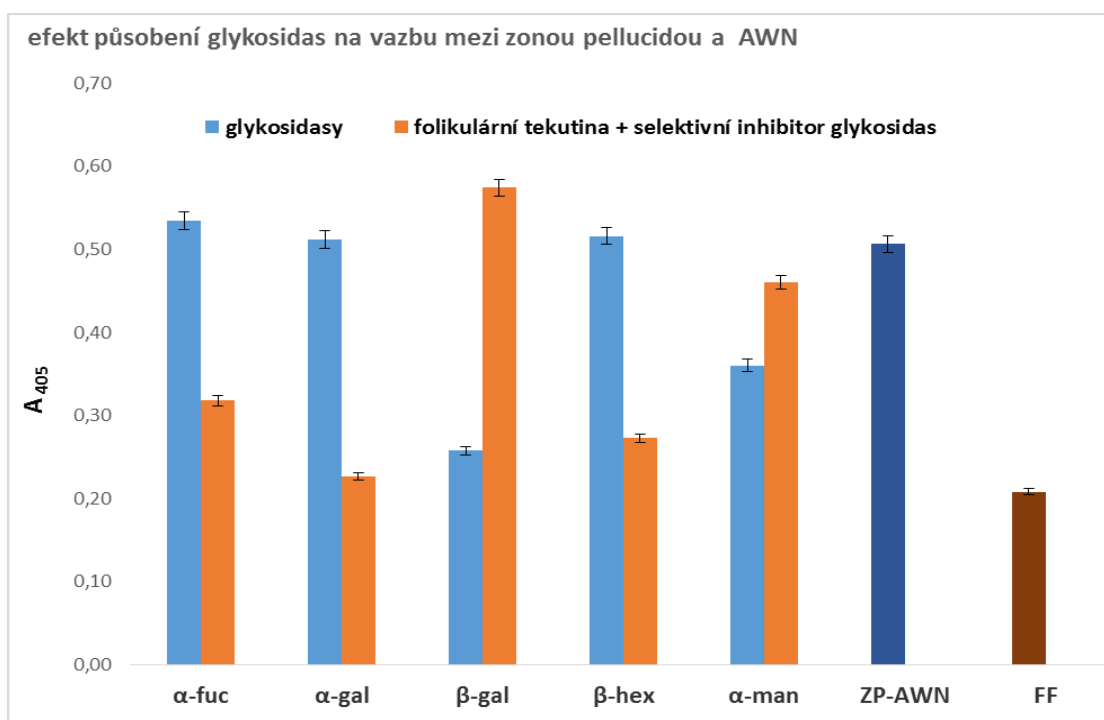
Biochemické srovnání tekutin z nezralých a zralých folikulů u prasnice a krávy

Štěpán Ren, Tomáš Dráb, Jiří Liberda, Pavla Maňásková-Postlerová

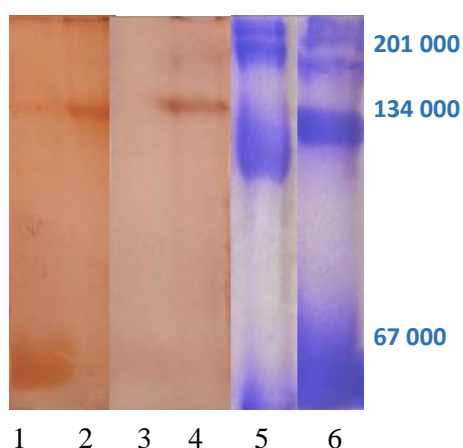
Folikulární tekutina představuje ideální prostředí pro vývoj oocyty a kumulárních buněk a stále je nepostradatelná pro studie zabývající se *in vitro* fertilizací. Správný vývoj oocyty zahrnuje mimo jiné i ustanovení správných oligosacharidových struktur, které se významně podílejí na dalších fázích reprodukce. Z tohoto důvodu jsme studovali aktivitu pěti glykosidas v tekutinách z prasečích a kravských terciálních a preovulačních folikulů a v krevní plazmě při dvou různých hodnotách pH – 5,0 a 7,2. Detekovali jsme aktivity všech studovaných glykosidas ve všech vzorcích a při obou pH. Pozorovali jsme výrazný nárůst aktivity spojený se zráním folikulu v případě α -D-manosidasy u prasnice (Obrázek 4.1) a α -L-fukosidasy u krávy. Kromě toho se také měnila aktivita α -D-galaktosidasy – došlo k jejímu snížení u prasnice a zvýšení u krávy. Je zajímavé, že jak α -L-fukosa tak α -D-manosa mají silnou a velmi podobnou vazbu k reprodukci příslušných druhů, kde oba sacharidy jsou zodpovědné za vznik ovidukálního rezervoáru spermií [19, 22] a nárůst jejich aktivit tak může být zodpovědný za synchronizaci mezi uvolněním spermií z jejich rezervoáru a ovulací vajíčka. Efekt glykosidas v reprodukci byl dále testován na vazbě mezi prasečí zónou pellucidou a proteinem spermie zodpovědným za její rozpoznání a ukázali jsme výrazný vliv α -D-manosidasy a hlavně α -D-galaktosidasy na tuto vazbu (Obrázek 4.2). Červená nativní elektroforesa pak detekovala přítomnost dvou anebo i více isoenzymů pro každou glykosidasu s výjimkou α -L-fukosidasy. Některé z těchto isoenzymů byly nalezeny pouze ve folikulární tekutině a ne v krevní plazmě, což naznačuje jejich folikulární původ (Obrázek 4.3).



Obrázek 4.1 Porovnání glykosidasových aktivit v prasečí terciální nebo preovulační folikulární tekutině a krevní plazmě při pH 7,2. α -Fuc: α -L-fukosidasa; α -Gal: α -D-galaktosidasa; β -Gal: β -D-galaktosidasa; β -Hex: β -D-N-acetylhexosaminidasa; α -Man: α -D-manosidasa.



Obrázek 4.2 Inkubace prasečí zony pellucidy s glykosidasami (modré sloupce) nebo s preovulační folikulární tekutinou se selektivními inhibitory glykosidas (oranžové sloupce) a následná interakce se spermadhesinem AWN, který je zodpovědný za vazbu spermine na zonu pellucida. α-Fuc: α-L-fukosidasa/deoxyfuconojirinmycin; α-Gal: α-D-galaktosidasa/ N(N-Nonyl)deoxygalactojirinmycin; β-Gal: β-D-galaktosidasa/ N(N-Nonyl)deoxygalactojirinmycin; β-Hex: β-D-N-acetylhexosaminidasa/ N-acetylglucosaminthiazolin; α-Man: α-D-manosidasa/ deoxymanojirinmycin, ZP-AWN – interakce nemodifikované zony pellucidy s AWN; FF – inkubace zony pellucidy s folikulární tekutinou bez žádného inhibitoru glykosidas a její následná interakce s AWN.



Obrázek 4.3 Červená nativní elektroforesa prasečí preovulační folikulární tekutiny a krevní plasmu, detekce glykosidasových aktivit – jsou uvedeny pouze výsledky pro α-D-manosidasu
 1. folikulární tekutina, pH 7,2; 2. krevní plasma pH 7,2;
 3. folikulární tekutina, pH 5,0; 4. krevní plasma, pH 5,0;
 5. folikulární tekutina – detekce proteinů; 6. standard molekulových hmotností - BSA

4.2 Vyvinutí červené nativní elektroforesy

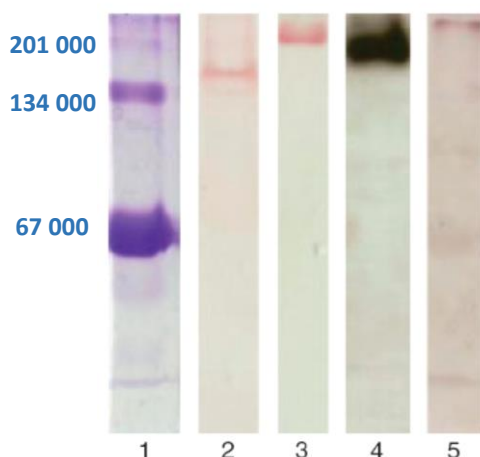
Nativní červená elektroforesa – nova metoda vhodná k separaci nativních proteinů

Tomáš Dráb, Jana Kračmerová, Ivana Tichá, Eva Hanzlíková, Marie Tichá, Helena Ryšlavá, Veronika Doubnerová, Pavla Maňásková-Postlerová, Jiří Liberda; *Electrophoresis* 32 (2011) 3597-3599

Nativní polyakrylamidová elektroforesa v přítomnosti Ponceau Red ke studiu oligomerních stavů proteinových komplexů

Tomáš Dráb, Jana Kračmerová, Ivana Tichá, Eva Hanzlíková, Marie Tichá, Jiří Liberda
J Sep Sci. 2011 Jul; 34(14):1692-5

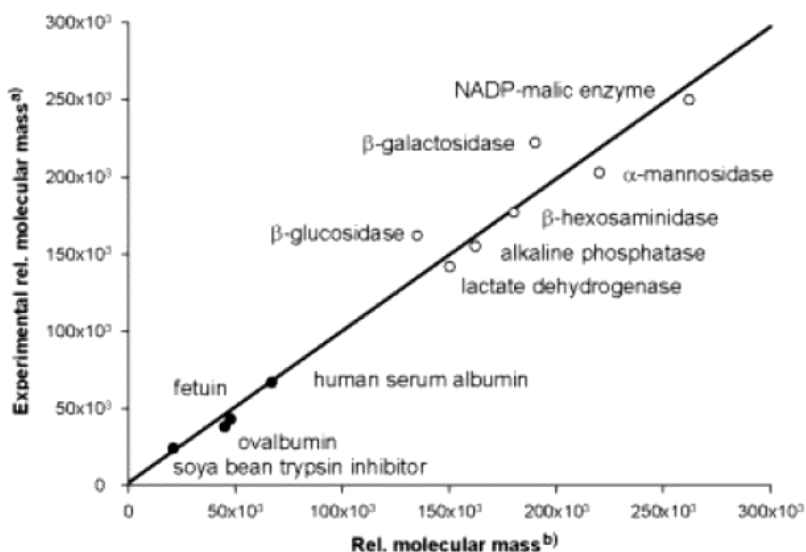
Vyvinuli jsme nový typ nativní elektroforesy k separaci a charakterizaci proteinů, který jsme nazvali „červená nativní elektroforesa“. V této modifikaci modré nativní elektroforesy je použito barvivo Ponceau Red S na místo Coomassie Brilliant Blue, které se naváže na proteiny a udělí jim uniformní negativní náboj a umožní tak jejich elektroforetickou separaci podle relativních molekulových hmotností (Obrázek 4.5). Poněvadž Ponceau Red S se váže k proteinům slaběji než Coomassie Blue, může být po elektroforetické separaci snadno odstraněno, což umožňuje další charakterizace proteinových vlastností (jako např. detekce enzymatických aktivit přímo v gelu – Obrázek 4.3 a 4.4). Všechny testované proteiny si udržely svůj nativní stav během této separace (např. enzymatickou aktivitu nebo agregační stavy)



Obrázek 4.4 Červená nativní elektroforesa enzymů a jejich následná detekce přímo v gelu. 1 - standard molekulové hmotnosti (BSA), 2 - laktát dehydrogenasa, isoenzym M4, 3 - α -D-manosidas, 4 - β -D-N-acetylhexosaminidasa, 5 - NADP-malic enzym.

Obrázek 4.5 Srovnání relativních molekulových hmotností testovaných proteinů s jejich hmotnostmi určených pomocí červené nativní elektroforesy. Při určování molekulových hmotností pomocí červené elektroforesy sloužilo BSA a jeho oligomery jako marker molekulových hmotností, ideální molekulové hmotnosti byly získány z databáze Swiss-Prot (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Switzerland).

● – monomery,
○ – oligomerní proteiny

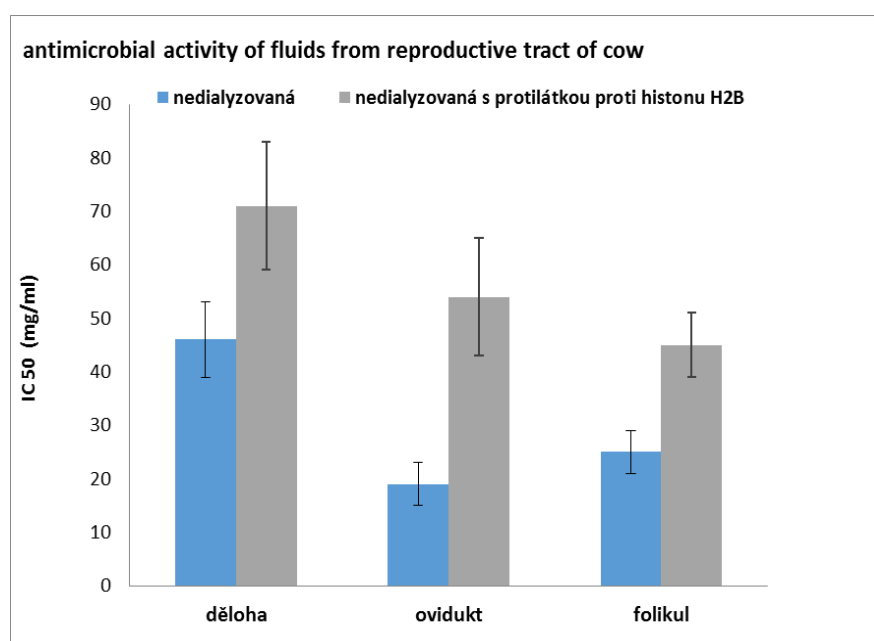


4.3 Antimikrobiální aktivita tekutin z reprodukčního traktu krávy a prasnice

Antimikrobiální aktivita histonů v reprodukčním traktu krávy

Tomáš Dráb, Jana Kračmerová, Eva Hanzlíková, Tereza Černá, Rozálie Litvácová, Alžběta Pohlová, Marie Tichá, Petr Píkrýl, Jiří Liberda

Infekce jakékoliv části samičího reprodukčního traktu může výrazně poškodit plodnost a schopnost reprodukce. Tekutiny a epitel z nitra samičího traktu (dělohy, oviduktu a folikulů) jsou známým zdrojem antimikrobiální aktivity. V této práci jsme porovnali antimikrobiální vlastnosti tekutin z reprodukčních traktů prasnice a krávy. Dále, ukázali jsme, že obsahují frakci v rozsahu molekulových hmotností mezi 3 500 – 30 000, která se podílí na jejich antimikrobiálních vlastnostech. Nejpravděpodobnější kandidáti zodpovědní za pozorované antimikrobiální efekty byly následně identifikovány pomocí hmotnostní spektroskopie jako histony H2A typ 2-C, H2B typ 1-K, H3.3 a H4. Antimikrobiální role histonu H2B byla dále potvrzena pomocí protilátky proti tomuto histonu (Obrázek 4.6)



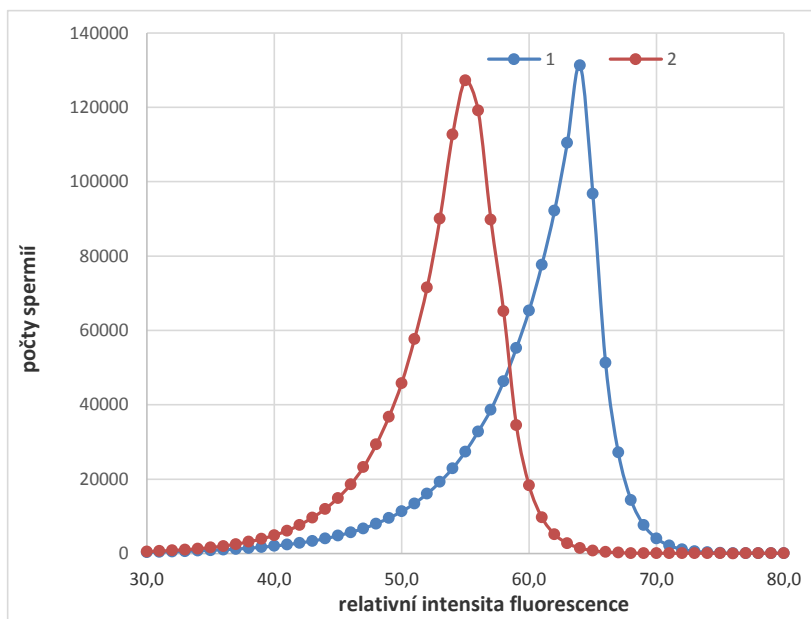
Obrázek 4.6 Srovnání antimikrobiálních vlastností tekutin z reprodukčního traktu krávy. Modré sloupce reprezentují polovinu maximální inhibiční koncentrace (IC_{50}), šedé sloupce ukazují IC_{50} pro stejné vzorky, ke kterým byla přidána polyklonální protilátka proti N-koncové části histonu H2B o koncentraci 1 mg/ml

4.4 Porovnání sekretů Cowperových žláz býka a kance

Role sekretů Cowperových žláz v býčím ejakulátu

Tomáš Dráb, Ivana Tichá, Pavla Maňásková-Postlerová, Marie Tichá, Petra Přinosilová, Zdeněk Věžník, Jiří Liberda

Uměle připravené ejakuláty z lyofilizovaných sekretů přídatných pohlavních žláz, epidydimální tekutiny a epidydimálních spermií byly použity ke sledování efektů sekretů Cowperových žláz na modulaci vlastností býčího ejakulátu. Tyto sekrety byly identifikovány jako významný faktor, který zvyšuje viskozitu ejakulátu a zpomaluje rychlost uvolňování spermií z ejakulátu. Dále pak sekrety Cowperových žláz zvyšují agregaci semenných proteinů a zároveň také zvyšují vazbu sekretů semenných váčků na povrch spermií (Obrázek 4.7)



Obrázek 4.7 Cytofluorometrická studie vazby sekretů semenných váčků značených FITC na povrch spermií a vliv sekretů býčích Cowperových žláz na tuto vazbu.

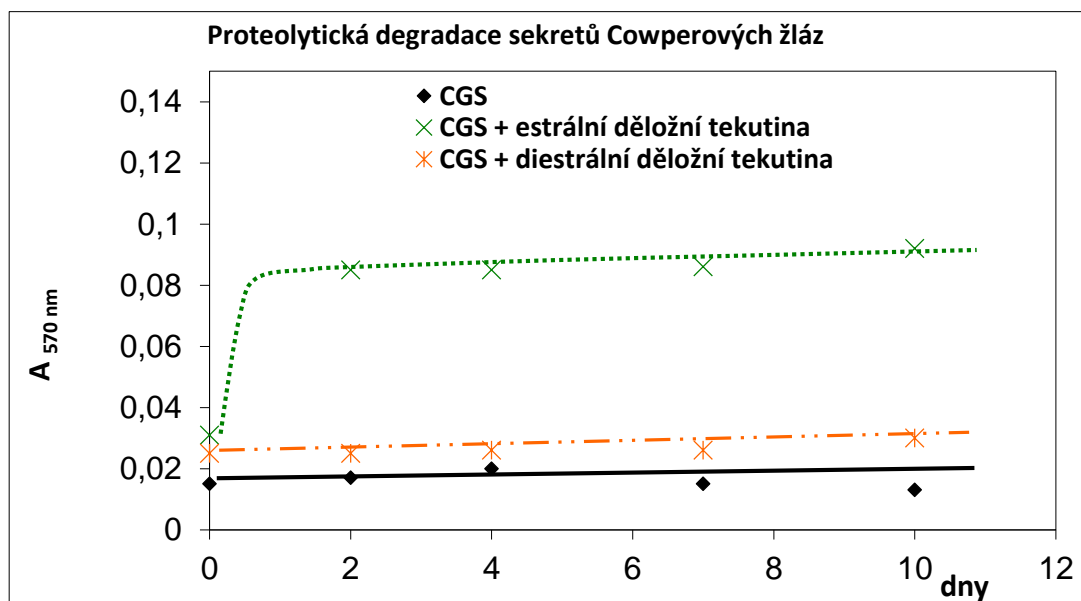
1 – vazba sekretu semenných váčků v přítomnosti sekretů Cowperových žláz

2 - vazba sekretu semenných váčků v případě, kdy sekrety Cowperových žláz nejsou přítomny

Degradace semenné zátky v děložním hrdle prasnice (*Sus scrofa f. domestica*)

Ivana Tichá, **Tomáš Dráb**, Eva Hanzlíková, Pavla Maňásková-Postlerová, Marie Tichá, Jiří Liberda

Děložní tekutina je zdrojem mnoha enzymových aktivit, v nichž proteasy hrají prominentní roli. Účastní se remodelace povrchu dělohy a tímto způsobem ovlivňují její funkce v závislosti na fázi estrálního cyklu. Detekovali jsme několik metaloproteas a serionových proteas v děložní tekutině ovulující prasnice pomocí substrátové zymografie. Dále jsme také ukázali, že děložní tekutina se podílí na proteolytické degradaci semenné zátky v děložním hrdle samice, která je odvozená ze sekretů Cowperových žláz. Nicméně rychlost její degradace je výrazně ovlivněna estrální fází cyklu, kdy tekutina z ovulující prasnice degraduje zátku velmi rapidně, zatímco děložní tekutina z prasnice v diestrální fázi cyklu nevykazuje prakticky žádné proteolytické vlastnosti (Obrázek 4.8)



Obrázek 4.8 Srovnání rychlosti proteolytické degradace sekretů kančích Cowperových žláz pomocí děložní tekutiny z prasnice v estrální a diestrální fázi reprodukčního cyklu. CGS – sekrety Cowperových žláz (Cowper's gland secretion)

5 Závěr

Předkládaná dizertační práce se zabývá folikulární, oviduktální a děložní tekutinou, a dále také sekrety Cowperových žláz u prasat (*Sus scrofa f. domestica*) a skotu (*Bos primigenius f. taurus*).

- **Charakterizace aktivit pěti glykosidas** v tekutinách z terciálního a preovulačního folikulu a krevní plazmy u prasnice a krávy ukázala rozdíly jak mezidruhové, tak i rozdíly dané maturačním stádiem folikulu. **α -L-fukosidasa** byla neaktivnější glykosidasou v kravské folikulární tekutině při neutrálním pH, zatímco **α -D-manosidasa** zase v prasečí. Oba enzymy navíc vykazovali nejvýraznější nárůst aktivit během zrání folikulu. Druhou neaktivnější glykosidasou byla β -D-galaktosidasa, která také vykazovala změny v závislosti na estrálním cyklu u obou druhů. Další studie, která napodobovala maturaci prasečí zóny pellucidy pomocí její inkubace s glykosidasami ukázala jejich negativní vliv na vazbu proteinů z povrchu spermie AQN a AWN, což bylo patrné obzvláště v případech **α -D-manosidasy** a **β -D-galaktosidasy**.
- Srovnání aktivit glykosidas ve folikulární tekutině a v krevní plasmě ukázaly, že bez ohledu na maturační stav folikulu aktivity **studovaných glykosidas jsou výrazně vyšší ve folikulární tekutině než v krevní plasmě** s obecnou výjimkou β -N-acetylhexosaminidasy u obou druhů a α -D-manosidasy u krávy, jejichž aktivity byly srovnatelné nebo dokonce vyšší v krevní plasmě. Tyto výsledky naznačují alespoň částečný folikulární původ detekovaných glykosidas, což bylo dále potvrzeno pomocí červené nativní elektroforesy.
- **Vyvinuli jsme a optimalizovali jsme nový typ nativní elektroforesy** nazvaný "červená nativní elektroforesa", která kombinuje výhody modré nativní a bezbarvé nativní elektroforesy, jelikož umožňuje separaci proteinů a jejich komplexů podle jejich molekulových hmotností a zároveň pak následnou vizualizaci enzymatických aktivit přímo v gelu. Tuto metodu jsme použili pro porovnání glykosidasových aktivit v prasečí folikulární tekutině a krevní plasmě a ukázali jsme, že **každá z detekovaných glykosidas je přítomna v několika isoformách** s výjimkou α -L-fukosidasy, **některé z těchto isoform byly nalezeny pouze ve folikulární tekutině**. To je obzvláště pravda pro bandy odpovídající celkem malé molekulové hmotnosti kolem 70-80 kDa nalezených ve folikulární tekutině při neutrálním pH pro β -N-acetylhexosaminidasu, β -D-galaktosidasu a α -D-manosidasu.
- Porovnání **antimikrobiálních aktivit folikulární, oviduktální a děložní tekutiny** ukázalo, že oviduktální tekutina u obou druhů je neefektivnější. Další studie tekutin z kravských reprodukčních traktů ukázaly, že důležitý zdroj antimikrobiální aktivity se nachází v rozsahu molekulových hmotností 3 500 - 30 000, které SDS elektroforesa následovaná MALDI-TOF pak identifikovala jako histony **H2A type 2-C, H2B type 1-K, H3.3 a H4**. Role histonů jakožto antimikrobiálních látek byla dále potvrzena pomocí polyklonální protilátky proti H2B, která výrazně redukovala antimikrobiální vlastnosti všech tří tekutin. Tento efekt byl nejvíc zřetelný v případě kravské oviduktální tekutiny, jejíž antimikrobiální aktivita se po přidání protilátky snížila třikrát.
- Studie **role sekretů Cowperových žláz u býka** ukázala jejich **positivní vliv na viskozitu semene a agregaci semenných proteinů** a zároveň pak také **podpoření adheze semenných proteinů na povrch spermie**.
- **Sekrety prasečích Cowperových žláz** tvoří želatinosní zátku v děložním hrdle samice na konci páření. **Vyvinuli jsme metodu jejich rozpouštění** za nativních podmínek **používající kyselinu boritou**. Dále jsme ukázali, že děložní tekutina z prasnice **v období říje velmi efektivně tuto zátku proteolyticky degraduje**, na rozdíl od tekutin z diestrální fáze reprodukčního cyklu.

6 Použitá literatura

- [1] Fahiminiya, S., Gérard, N., *Gynecol Obstet Fertil* 2010, 38, 402-404.
- [2] Ambekar, A. S., Nirujogi, R. S., Srikanth, S. M., Chavan, S., Kelkar, D. S., Hinduja, I., Zaveri, K., Prasad, T. S. K., Harsha, H. C., Pandey, A., Mukherjee, S., *Journal of Proteomics* 2013, 87, 68-77.
- [3] Clarke, H. G., Hope, S. A., Byers, S., Rodgers, R. J., *Reproduction* 2006, 132, 119-131.
- [4] Thérien, I., Bergeron, A., Bousquet, D., Manjunath, P., *Mol Reprod Dev* 2005, 71, 97-106.
- [5] Sun, F., Giojalas, L. C., Rovasio, R. A., Tur-Kaspa, I., Sanchez, R., Eisenbach, M., *Dev Biol* 2003, 255, 423-427.
- [6] Sinowatz, F., Kollé, S., Topfer-Petersen, E., *Cells Tissues Organs* 2001, 168, 24-35.
- [7] Yurewicz, E. C., Sacco, A. G., Subramanian, M. G., *J Biol Chem* 1987, 262, 564-571.
- [8] Yonezawa, N., Kanai, S., Nakano, M., *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007, 63, 217-228.
- [9] Dell, A., Chalabi, S., Easton, R. L., Haslam, S. M., Sutton-Smith, M., Patankar, M. S., Lattanzio, F., Panico, M., Morris, H. R., Clark, G. F., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100, 15631-15636.
- [10] Parillo, F., Diverio, S., Todini, L., Fagioli, O., *Veterinary Research* 2001, 32, 581-590.
- [11] Desantis, S., Ventriglia, G., Zizza, S., De Santis, T., Di Summa, A., De Metrio, G., Dell'aquila, M. E., *Theriogenology* 2009, 72, 300-309.
- [12] Wassarman, P. M., *Cell* 1999, 96, 175-183.
- [13] Dostalova, Z., Calvete, J. J., Sanz, L., Topferpetersen, E., *European Journal of Biochemistry* 1995, 230, 329-336.
- [14] Amari, S., Yonezawa, N., Mitsui, S., Katsumata, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Takeda, Y., Nakano, M., *Molecular Reproduction and Development* 2001, 59, 221-226.
- [15] Wide, L., Eriksson, K., Sluss, P. M., Hall, J. E., *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009, 94, 958-964.
- [16] Yeung, W. S. B., Lee, K. F., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., Chiu, P. C. N., *Journal of Reproductive Immunology* 2009, 83, 26-30.
- [17] Talevi, R., Gualtieri, R., *Theriogenology* 2010, 73, 796-801.
- [18] Suarez, S. S., *International Journal of Developmental Biology* 2008, 52, 455-462.
- [19] Ignatz, G. G., Cho, M. Y., Suarez, S. S., *Biology of Reproduction* 2007, 77, 906-913.
- [20] Jelínková, P., Liberda, J., Manásková, P., Ryslavá, H., Jonáková, V., Tichá, M., *J Reprod Immunol* 2004, 62, 167-182.
- [21] Liberda, J., Manaskova, P., Prelovska, L., Ticha, M., Jonakova, V., *Journal of Reproductive Immunology* 2006, 71, 112-125.
- [22] Teijeiro, J. M., Ignatz, G. G., Marini, P. E., *Molecular Reproduction and Development* 2009, 76, 334-341.
- [23] Parseghian, M. H., Luhrs, K. A., *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire* 2006, 84, 589-604.
- [24] Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., Takao, T., Fan, Y. H., Matsuoka, Y., Zhang, L. L., Yoneda, Y., Fujii, Y., Skouitchi, A. I., Tsujimoto, Y., *Cell* 2003, 114, 673-688.
- [25] Brix, K., Summa, W., Lottspeich, F., Herzog, V., *Journal of Clinical Investigation* 1998, 102, 283-293.
- [26] Mishra, B., von der Ohe, M., Schulze, C., Bian, S., Makhina, T., Loers, G., Kleene, R., Schachner, M., *Journal of Neuroscience* 2010, 30, 12400-12413.
- [27] Duclos, T. W., Zlock, L. T., Marnell, L., *Journal of Biological Chemistry* 1991, 266, 2167-2171.
- [28] Witkin, S. S., Linhares, I. M., Bongiovanni, A. M., Herway, C., Skupski, D., *Bjog-an International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2011, 118, 145-153.
- [29] Friggeri, A., Banerjee, S., Xie, N., Cui, H. C., de Freitas, A., Zerfaoui, M., Dupont, H., Abraham, E., Liu, G., *Molecular Medicine* 2012, 18, 825-833.
- [30] Kim, H. S., Cho, J. H., Park, H. W., Yoon, H., Kim, M. S., Kim, S. C., *Journal of Immunology* 2002, 168, 2356-2364.
- [31] von Kockritz-Blickwede, M., Goldmann, O., Thulin, P., Heinemann, K., Norrby-Teglund, A., Rohde, M., Medina, E., *Blood* 2008, 111, 3070-3080.
- [32] Hariton-Gazal, E., Rosenbluh, J., Graessmann, A., Gilon, C., Loyter, A., *Journal of Cell Science* 2003, 116, 4577-4586.
- [33] Tagai, C., Morita, S., Shiraishi, T., Miyaji, K., Iwamuro, S., *Peptides* 2011, 32, 2003-2009.
- [34] Park, C. B., Kim, H. S., Kim, S. C., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998, 244, 253-257.
- [35] Luders, T., Birkemo, G. A., Nissen-Meyer, J., Andersen, O., Nes, I. F., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005, 49, 2399-2406.
- [36] Wittig, I., Schagger, H., *Proteomics* 2008, 8, 3974-3990.
- [37] Schagger, H., von Jagow, G., *Anal Biochem* 1991, 199, 223-231.
- [38] Schagger, H., Cramer, W. A., von Jagow, G., *Anal Biochem* 1994, 217, 220-230.

7 Životopis

Osobní údaje

jméno:	Tomáš Dráb	telefon:	604 156 519
datum narození:	19.11.1981	e-mail:	A-tom@seznam.cz

Vzdělání

2006 - 2014	PhD studium , Universita Karlova, Katedra Biochemie <i>(Studie tekutin a sekretů z reprodukčních traktů prasete (<i>Sus scrofa f. domestica</i>) a skotu (<i>Bos primigenius f. taurus</i>))</i>
2001 - 2006	Magisterské studium , Universita Karlova, Katedra Biochemie

Certifikáty a zkoušky

2009	státní doktorská zkouška
2008	certifikát pokročilé angličtiny (CAE)
2006	spermatoanalytický kurz (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno)

Odborné zkušenosti

Výzkumné pozice

2012 - 2014	Výzkumný ústav rostlinné výroby (VÚRV) <i>(detekce virů lipnicovitých, interakce mezi rostlinami a jejich viry, vývin nových metod pro detekci virů)</i>
2011 - 2012	Universita Karlova, Katedra buněčné biologie <i>(Optimalizace chromatinové imunoprecipitace (CHIP) a studium role transkripčních faktorů Cbf11 a Cbf 12 u <i>S. pombe</i> a role proteinu Prp45 u <i>S. cerevisiae</i>)</i>

výuka

2006 - 2009	Spolupráce na přednášce "Biologie pro biochemiky" (Karlova Universita, Katedra biochemie)
2006 - 2009	Organizace dobrovolného semináře k přednášce "Biologie pro biochemiky" (Karlova Universita, Katedra biochemie)

krátké stáže

2008	Výzkumný ústav veterinárního lékařství
2005	Ústav organické chemie a biochemie (UOCHAB), Praha <i>(Produkce a purifikace myší serin racemasy)</i>
2002	Ústav organické chemie a biochemie (UOCHAB), Praha

jazyky

English	pokročilý (CAE certifikát)
German	středně pokročilý
French	záčátečník

Konference

2011	Fertility 2011, Dublin <i>Oviductal histones, new properties of well-known proteins in reproduction</i>
------	---

- 2010 **25th International Symposium on Microscale Bioseparation**
Novel Method of Protein Separation – Native Red Electrophoresis
- 2006 **XX. Biochemical Congress of Czech Society for Biochemistry and Molecular Biology**
The Role of Cowper Glands in Bull
Formation of Sperm Reservoir in Reproductive Tract
- 2006 **XIII. Symposium of Czech Reproduction Immunologist**
The Role of Cowper Glands Secretion in Bull
- 2005 **XII. Symposium of Czech Reproduction Immunologist**
Formation of sperm reservoir in reproductive tract
The Role of Cowper Glands Secretion in Bull

8 Seznam publikací

přijaté

1. The antimicrobial action of histones in the reproductive tract of cow.

Dráb T, Kračmerová J, Hanzlíková E, Černá T, Litváková R, Pohlová A, Tichá M, Příklad P, Liberda J.
Biochem Biophys Res Commun. 2014 Jan 17;443(3):987-90. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.077. Epub 2013 Dec 19.

2. Native red electrophoresis-a new method suitable for separation of native proteins.

Dráb T, Kračmerová J, Tichá I, Hanzlíková E, Tichá M, Ryšlavá H, Doubnerová V, Maňásková-Postlerová P, Liberda J.
J. Electrophoresis. 2011 Dec;32(24):3597-9. doi: 10.1002/elps.201100310.

3. Native polyacrylamide electrophoresis in the presence of Ponceau Red to study oligomeric states of protein complexes.

Dráb T, Kračmerová J, Tichá I, Hanzlíková E, Tichá M, Liberda J.
J Sep Sci. 2011 Jul;34(14):1692-5. doi: 10.1002/jssc.201000869. Epub 2011 Jun 16.

připravené k publikování

Comparison of glycosidase activities in porcine follicular fluid from tertiary and preovulatory follicles.

Dráb T, Ren Š, Hanzlíková E, Tichá M, Maňásková-Postlerová P, Liberda J

Biochemical comparison of fluids from early and late stage follicles in pigs and cows

Ren Š, Dráb T, Liberda J, Maňásková-Postlerová P

Degradation of seminal cervical plug in sow (*Sus scrofa f. domestica*)

Tichá I, Dráb T, Liberda J, Maňásková-Postlerová P, Liberda J

Role of Cowper's gland secretion in bovine ejaculate

Dráb T, Tichá I, Hanzlíková E, Maňásková-Postlerová P, Tichá M, Věžník Z, Liberda J