

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Praha 2007

Hanuš Boháček

Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty
University Karlovy

**Vliv glykosylace na agregaci proteinů býčí semenné
plazmy**

Bakalářská práce

Hanuš Boháček

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Jiří Liberda, Ph.D.

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem během své bakalářské práce pracoval samostatně pod vedením RNDr. Jiřího Liberdy, Ph.D. a že jsem citoval všechny prameny, z nichž jsem čerpal.

.....*Karel Břítek*.....

Na tomto místě bych rád upřímně poděkoval všem, kteří mi byli nápomocni při psaní této bakalářské práce.

Zvláště bych chtěl poděkovat RNDr. Jiřímu Liberdovi, PhD. za cenné rady, trpělivost a ochotu. Dále pak celému kolektivu v naší laboratoři za vytváření příjemných pracovních podmínek a dobré nálady.

Obsah:

1. Úvod.....	1
1.1. Pohlavní ústrojí býka.....	2
1.1.1. Varlata	2
1.1.2. Nadvarle	3
1.1.3. Další přídatné pohlavní žlázy.....	3
1.2. Samčí pohlavní buňka býka.....	4
1.2.1. Spermatogeneze.....	4
1.2.1.1. Spermatocytogeneze.....	5
1.2.1.2. Spermioogeneze.....	5
1.2.2. Stavba spermie.....	6
1.2.2.1. Hlavička.....	6
1.2.2.2. Bičík.....	7
1.2.3. Zrání spermií během epididymálního tranzitu	7
1.2.4. Ejakulace.....	8
1.3. Osud spermie v samčím pohlavním ústrojí.....	9
1.3.1. Tvorba ovidukálního reservoáru.....	9
1.3.2. Kapacitace.....	10
1.3.3. Fertilizace.....	11
1.3.3.1. Komplex vajíčka při ovulaci.....	11
1.3.3.2. Penetrace skrz cumulus oophorus.....	12
1.3.3.3. Penetrace zonou pellucidou a akrosomová reak.....	12
1.3.3.4. Splynutí gamet.....	13
1.4. Býčí semenná plazma.....	14
1.4.1. Biologická funkce býčí semenné plazmy.....	14
1.4.2. Proteiny býčí semenné plazmy.....	14
1.4.2.1. Proteiny, zahrnuté v antioxidantním systému.....	15
1.4.2.2. BSP proteiny.....	15
1.4.2.3. Role proteinů býčí semenné plazmy při fertilizaci.....	16
1.4.2.4. Lipidový exlux.....	16
1.4.2.5. Další úlohy ve fertilizaci.....	17
1.4.2.6. Agregované formy proteinů býčí semenné plazmy.....	18
1.4.3. Nízkomolekulární složky býčí semenné plazmy.....	18
1.5. Cíl práce.....	19
2. Materiál a metody.....	20
2.1. Materiál.....	20
2.1.1. Biologický materiál.....	20
2.1.2. Chemikálie.....	20
2.1.3. Ostatní materiál.....	21
2.2. Metody.....	22
2.2.1. Gelová chromatografie.....	22
2.2.2. Stanovení obsahu neutrálních sacharidů dle Dubois.....	22
2.2.3. Enzymatické deglykosylace glykoproteinů.....	23
2.2.4. Štěpení proteinů BSP pomocí trypsinu pro metodu ELBA.....	25
2.2.5. Biotinylace BSP pro metodu ELBA	25
2.2.6. ELBA	25
2.2.7. Diskontinuální SDS-elektroforéza dle Laemmliho	26
3. Výsledky.....	28
3.1. Enzymatické deglykosylace proteinů BSP.....	28

3.2. Gelová chromatografie.....	30
3.2.1. Kalibrace sloupce sephadexu G-100.....	30
3.2.2. Rozdělení BSP na sephadexu G-100.....	31
3.2.3. Analýza vzorků BSP po deglykosylaci pomocí gelové chromatografie.....	31
3.3. ELBA.....	37
3.4. SDS-elektroforéza dle Laemmliho.....	38
4. Diskuse.....	40
5. Závěr.....	42
Seznam použitých zkratk.....	43
Seznam literatury.....	44

1. Úvod

Jedním ze základních znaků živých soustav je schopnost reprodukce, v průběhu evoluce se vyvinulo několik způsobů jak jí dosáhnout. U složitějších mnohobuněčných organismů se uplatňuje především pohlavní rozmnožování. Avšak jedná se zde o rozmnožování na úrovni celého mnohobuněčného organismu, neboť v jeho rámci dochází rovněž k reprodukci dělením na úrovni buněk, jimiž je tvořen. K tomuto pohlavnímu způsobu reprodukce je zapotřebí splynutí dvou morfologicky a fyziologicky odlišných haploidních pohlavních buněk, neboli gamet, za vzniku geneticky unikátní diploidní zygoty. Každá z gamet je tvořena individuálním rodičovským organismem, je tedy k tomuto splynutí zapotřebí dvou jedinců téhož druhu a opačného pohlaví – samčího a samičího (zvláštní skupinu tvoří hermafrodité, kteří disponují oběma pohlavními systémy zároveň, i zde je však potřeba dvou jedinců téhož druhu) [1].

Důvod vzniku tohoto bisexuálního způsobu reprodukce není zatím zcela jasný, zdá se však, že se tak kombinací genetického kódu zvyšuje schopnost adaptace na měnící se prostředí, narozdíl od jednoduchého dělení, které je odkázáno na mnohem méně účinné náhodné zvýhodňující mutace [1], [2].

U savců, tedy i skotu, vznikají gamety v pohlavních žlázách, neboli gonádách, v procesu gametogeneze. Spermie, která musí nejprve projít několika fázemi vývoje v samčím pohlavním ústrojí, se pak při kopulaci ejakulací dostane do samičího traktu, kde podstupuje další změny, aby mohla nakonec úspěšně proniknout do vajíčka v době ovulace a dát tak vznik novému jedinci. K tomuto úkonu se během svého vývoje spermie intenzivně morfologicky i funkčně diferenciuje (oddíl 1.2.1) [1].

Ačkoliv mezi jednotlivými druhy existují mnohé specifické zvláštnosti, obecně je sled událostí vedoucí od gametogeneze k fertilizaci u savců stejný, tj. (z pohledu spermie) spermatogeneze, epididymální tranzit, ejakulace, kapacitace a fertilizace (podrobněji v oddílech 1.2 – 1.3).

zdvíhačem varlat – reaguje na změnu teploty změnou polohy varlat (přitažením resp. odtážením) vzhledem k tělu (jako zdroji tepla) - má tak termoregulační funkci [3], [4], [5].

Uvnitř je varle členěno do tzv. varletních lalůček, jež jsou protkány semenotvornými točitými kanálky (*tubuli seminiferi contorti*). Ty dále přecházejí v hloubce varlat v kanálky přímé (*tubuli recti*), které se spojují v *rete testis* a odvodními kanálky (*ductuli efferentes*) se v hlavě nadvarlete spojují v jeden kanál (viz obr. 1.1-B na str. 2) [3]. V prostoru mezi semenotvornými kanálky jsou krevní cévy a velké Leydigovy intersticiální buňky, které produkují samčí pohlavní hormon testosteron [3], [4].

Testosteron je z velké části zodpovědný za správný vývoj samčího pohlavního ústrojí, dále za vývoj sekundárních pohlavních znaků a je hlavním faktorem ovlivňujícím normální sexuální chování samce; krom toho je nezbytný pro správnou tvorbu spermií [4]. Jeho produkce je řízena též hormonálně a to gonadotropními hormony z předního laloku hypofýzy. Produkce těchto hormonů je pak zpětnou vazbou regulována hladinou testosteronu v krvi [4].

1.1.2. Nadvarle (*epididymis*)

Je připojeno k varleti téměř po celé jeho délce a je zásobárnou spermií, které v něm dozrávají v procesu epididymální maturace (oddíl 1.2.3.) [3]. Rozlišuje se na něm hlava nadvarlete (*caput epididymis*), tělo nadvarlete (*corpus epididymis*) a ocas nadvarlete (*cauda epididymis*) [3], [4], [5]. *Ductuli efferentes* z hlavy přechází v těle nadvarlete v jeden klikatý kanál (*ductus epididymis*), který se v ocase napřimuje a opouští nadvarle jako chámovod (obr. 1.1-B na str. 2). Kanálky jsou vystlány řasinkovým epitelem, který podporuje pohyb spermií nadvarletem, dále obsahují sekreční buňky, produkující epididymální plazmu, nezbytnou pro zrání spermií v hlavě a jejich uchovávání v ocasu [3].

1.1.3. Další přídavné pohlavní žlázy

Chámovod (*ductus deferens*) začíná v ocasu nadvarlete, prochází tříselným kanálem do břišní dutiny a končí v pánevní části močové trubice [3], [5]. Na vnitřní straně se rozšiřuje v ampuli (*ampulla ductus deferentis* – obr. 1.1-A na str. 2), která obsahuje četné žlázy,

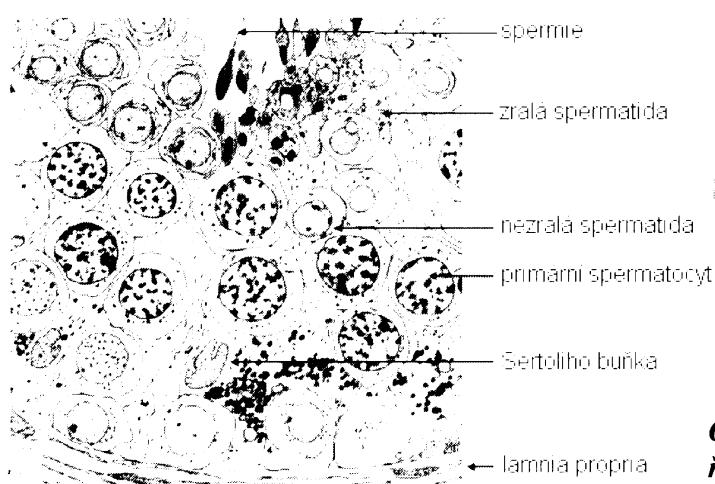
jejichž sekret má výživnou funkci [3]. Činností svalstva chámovodu je při sexuálním podráždění nasáván a vypuzován obsah nadvarlat až do močové trubice [3].

Při ejakulaci (oddíl 1.2.4.) se obsah nadvarlat vypuzovaný chámovodem mísí se sekrety dalších přídatných pohlavních žláz; tyto sekrety mají různé biologické funkce, obecně jsou však již epididymální spermie (z *cauda*) schopny fertilizace *in vitro* [3].

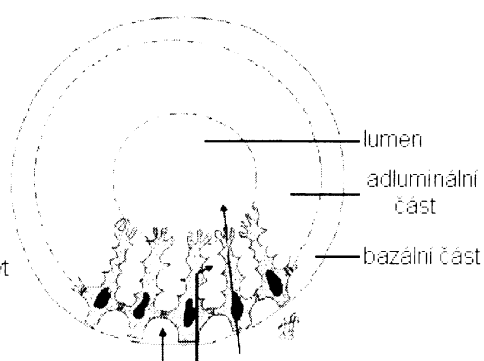
1.2. Samčí pohlavní buňka býka

1.2.1. Spermatogeneze

Proces zahrnuje vznik hotových spermií ze zárodečných buněk zvaných spermatogonie a celý trvá u býka asi 56 – 63 dní [6]. Je možno ho rozdělit na: spermatocytogenezi a spermiogenezi [7]. Spermatogeneze se odehrává uvnitř semenotvorného kanálku, jehož vnitřní uspořádání je znázorněno na obr. 1.2-A a B.



Obr. 1.2-A²: kresba příčného řezu semenotvorného kanálku



Obr. 1.2-B²: schematický příčný řez semenotvorným kanálkem
Vyznačena bariéra tvořená Sertoliho buňkami a cesty možného transportu látek.

Skládá se z lumen, germinálního epitelu, jež je tvořen buňkami ve všech fázích vývoje od spermatogonií ke spermiím a peritubulární tkáni (*lamina propria*), jež je tvořena vrstvou

² Obrázek byl vybrán z [7] a upraven.

několika myofibroblastů, které peristaltickými stahy pomáhají nepohyblivým spermii dostat se z lumen do *rete testis* [7].

Sertoliho buňky, pospojeny pevným spojem kolem dokola, dělí germinální epitel na bazální a adluminální část a tvoří tak selektivně propustnou bariéru (obr. 1.2-B, str. 4) [7]. Na bazální membránu nasedají spermatogonie, které se dělí a diferenciují a putují směrem k lumen, přičemž jsou spojeny úzkým cytoplazmatickým můstkem se Sertoliho buňkami. Ty jednak formující se spermie vyživují, jednak endokrinně a parakrinně regulují spermatogenezi. dále produkují ABP (androgene binding protein) a komunikují s intertubulárními Leydigovými buňkami [7]. Navíc systémem mikrofilament posunují zrající spermie (které v nich dozrávají během spermiogeneze) směrem k lumen, kde se nakonec odpojí (spermiace) [7].

1.2.1.1. Spermatocytogeneze

Během této fáze se zárodečné spermatogonie neustále mitoticky dělí za vzniku několika typů, které se od sebe liší cestou další proliferace. Výsledek tohoto kontinuálního procesu je jednak zachování konstantního stavu zárodečných buněk, jednak vznik tzv. primárního spermatocytu, který je největší, avšak stále sférickou, zárodečnou buňkou. Z primárního spermatocytu pak prvním meiotickým dělením vznikají dva sekundární spermatocyty a druhým dělením nakonec již čtyři haploidní spermatidy [6], [7].

1.2.1.2. Spermiogeneze

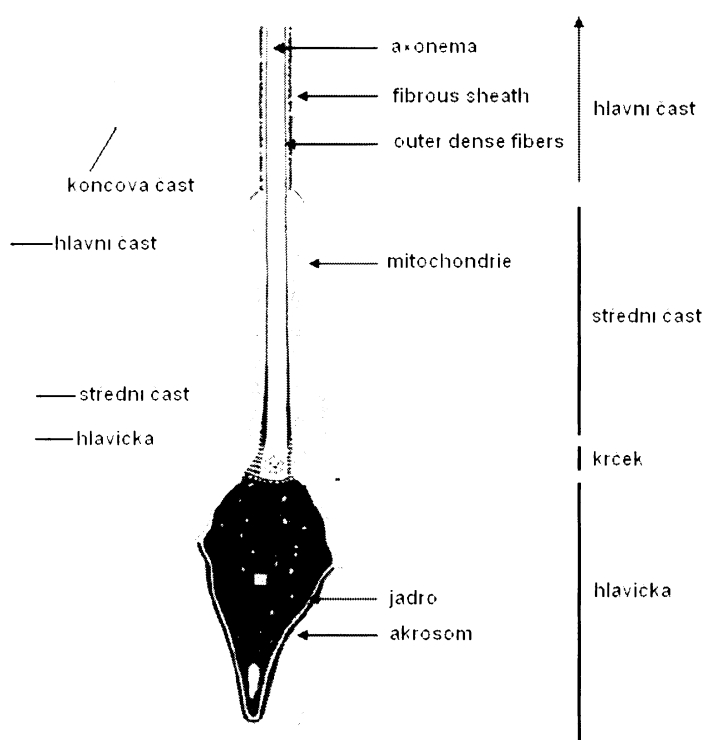
V tomto procesu podstupují dosud sférické spermatidy, vzniklé meiózou, rozsáhlé morfologické změny, obklopeny a spojeny se Sertoliho buňkami. Během nich ztratí většinu své cytoplazmy, již pak Sertoliho buňka stráví [7]. Změny zahrnují především kondenzaci nukleárního chromatinu, vytvoření akrosomové čepičky Golgiho aparátem a její připojení na apikální stranu jádra a tvorbu bičíku [7]. Takto metamorfované buňky se již nazývají spermie a po odpojení od Sertoliho buněk se působením *lamina propria* (viz výše) přesouvají do nadvarlete.

1.2.2. Stavba spermie

Savčí spermie (obr. 1.3) se skládá z hlavičky a bičíku, které jsou navzájem spojeny přes krátký krček. Plazmatickou membránu obalující celou spermii je v hlavové části možno rozdělit na akrosomální a postakrosomální oblast, membrána bičíku se obvykle dělí na střední, hlavní a koncovou část: v oblasti krčku je část spojovací [8].

Membrána savčí spermie je heterogenní a obsahuje mnoho specifických mikrodomén. Tyto domény, resp. jejich přestavba během epididymální maturace (oddíl 1.2.3) a kapacity (oddíl 1.3) hrají klíčovou roli v dějích, vedoucích k oplodnění [2].

Obr. 1.3: stavba spermie



1.2.2.1. Hlavička

Obsahuje jádro, akrosom a malé množství cytoplazmy s cytoskeletem [8]. Chromatin v jádru je vysoce kondenzován a jádro je značně menší než jádra většiny buněk, přesto však zaujímá velkou část objemu hlavy. Obsahuje poloviční sadu chromosomů a nukleární proteiny, zvané protaminy - malé bazické proteiny, bohaté na arginin a cystein. Vysoká kondenzace chromatinu je udržována pomocí disulfidických můstků mezi protaminy [8].

³ viz pozn. 2 na str. 4

Akrosom je speciální membránová organela, vzniklá z Golgiho komplexu během spermiogeneze. Nachází se mezi jadernou membránou, kterou zčásti obepíná, a plazmatickou membránou, kde v těsné blízkosti kopíruje špičku hlavy [8]. Akrosom obsahuje řadu kyselých hydrolas typických pro lysosomy a rovněž několik specifických enzymů a dalších proteinů [8]. Přítomnost této organely je kritická pro fertilizaci při akrosomové reakci (oddíl 1.3.3.3).

1.2.2.2. Bičik

Základ tvoří axonema, svazek mikrotubulů, protínající bičik po celé jeho délce. V oblasti od krčku až po konec hlavní části je axonema obalena vnějšími hustými vlákny (angl. outer dense fibers), ve střední části ještě vrstvou spirálovitě obtočených mitochondrií, představujících vydatný zdroj ATP pro pohyb bičíku. Vnější hustá vlákna v oblasti hlavní části jsou kryta vláknitým obalem (angl. fibrous sheath). Základ bičíku je připojen k jádru mezi spojovací částí a hlavičkou (obr. 1.3 na str. 6) [8].

1.2.3. Zrání (maturace) spermií během epididymálního tranzitu

Ačkoliv během spermiogeneze projde spermie nejvýraznější proměnou, není v momentě transportu do *caput epididymis* ještě schopna úspěšného oplodnění [9], [10]. Fertilizační potenciál (ovšem pouze částečný – viz oddíl 1.3) získává až během epididymálního tranzitu [9], [10].

V průběhu spermatogeneze je část diferenciací regulována kontrolou genetické exprese gamety, nicméně v okamžiku kondenzace chromatinu během spermiogeneze se stává genetická exprese neaktivní [9]. Další posttestikulární modifikace vedoucí k funkci spermií jsou proto považovány za důsledek interakce spermie s prostředím epididymálního lumen (popř. lumen samičího genitálního traktu), které je v mnohém ohledu unikátní [9] a je izolováno od krevního řečiště [10]. Během epididymálního transportu se luminální prostředí kontinuálně mění zčásti v důsledku sekrece celé řady lokálně specifických proteinů a enzymů, které jsou zase velice účinně reabsorbovány. Drtivá většina proteinů je sekretována v *caput epididymis* [9].

Hlavní aspekty fertilizačního potenciálu jsou motilita (pohyblivost), schopnost rozeznat a navázat se na *zona pellucida* (glykoproteinová obal vajíčka) a schopnost akrosomové reakce [5], [10], [11]. Tyto změny jsou spojeny s přestavbou buněčné membrány [10], [11], zahrnujících odkrytí, modulaci, nebo vytvoření nových mikrodoménových složek, či vyštěpení některých stávajících [10], [11]. K tomu dochází zřejmě za účasti proteas a enzymů, zahrnutých v metabolismu glykoproteinů (glykosidasy, glykosyltransferasy), jež jsou zde hojně sekretovány [9] a dále transportu některých látek (proteiny bez signální sekvence, lipidy) cestou speciálních vezikulárních útvarů, zvaných epididymosomů [11]. Další modifikace, které vedou k plnému fertilizačnímu potenciálu a ke kterým dochází již v samičím pohlavním ústrojí, budou popsány v oddílu 1.3.2.

V nadvarletí je také sekretována celá řada látek, jež mají na spermie ochranný efekt. Dovolují poměrně dlouhou dobu skladovat gamety v *cauda epididymis* v inaktivním stavu (složky antioxidačního a imunitního systému) [5], [11]. Spermie se stávají aktivní při smísení se semennou plazmou při ejakulaci [5].

1.2.4. Ejakulace

Při ejakulaci je stahem svaloviny uzavřeno spojení mezi močovými měchýřem a močovou trubicí [5]. U býka je pak nejdříve sekretován obsah Cowperových žláz, který upravuje prostředí pro semeno a zbavuje močovou trubicí zbytků moči [3]. Pak jsou ejakulovány epididymální spermie spolu se sekretem semenných váčků, prostaty a ampule (chámovodu) a též uretrálních žláz (v močové trubicí) zhruba současně [3]. Sekrety semenných váčků tvoří u býka převážnou část objemu ejakulátu a též semenné plazmy. Jako semenná plazma se označuje výsledná tekutina vzniklá smísením všech sekretů přídatných žláz a jsou v ní rozptýleny ejakulované spermie [3]. Má několik důležitých biologických funkcí (oddíl 1.4).

Objem ejakulátu býka je obvykle asi 4 ml a obsahuje asi 10^9 spermií / ml [3], [5], ovšem tato čísla, stejně jako složení (oddíl 1.4) se mohou lišit v rámci různých plemen i v rámci dvou jedinců téhož druhu, či v závislosti na stavu jedince a jeho okolí [3].

1.3. Osud spermie v samičím pohlavním ústrojí

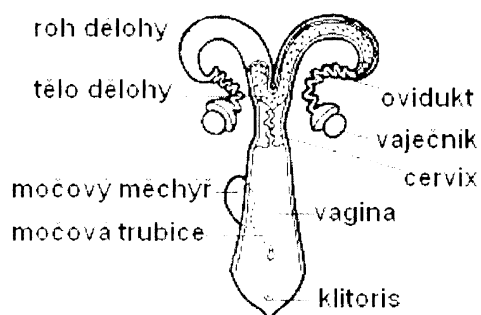
Bezprostředně po kopulaci spermie nejsou ještě schopny oplodnění. Musí prodělat další změny v procesu kapacitace v samičím pohlavním ústrojí. Jelikož akrosomová reakce (1.3.3.3) nutně předchází fertilizaci a (správné) akrosomové reakce jsou schopny pouze kapacitované spermie, jde v procesu kapacitace tedy především o získání schopnosti správné akrosomové reakce [12]. Přesto některé spermie prodělají akrosomovou reakci předčasně (neboť normálně k ní dochází až při styku se zonou pellucidou [2]); tento jev, nazývaný spontánní akrosomová reakce, je však považován za patologický a taková buňka již většinou není schopna fertilizace a je odsouzena k zániku [2].

Jak bylo zmíněno v oddílu 1.2.3, mají epididymální spermie částečný fertilizační potenciál. Jsou *in vitro* schopny kapacitace (a následné akrosomové reakce a fertilizace) bez potřeby semenné plazmy (se kterou se mísí při ejakulaci), ovšem za jistých podmínek [2], [12]. Tyto podmínky jsou většinou vyšší koncentrace HCO_3^- , Ca^{2+} , přítomný energetický substrát (u býka má jinak často používaná glukosa inhibiční efekt na kapacitaci), či nějaký akceptor sterolů (většinou albumin), který usnadňuje cholesterolový eflux (oddíl 1.4.2.4).

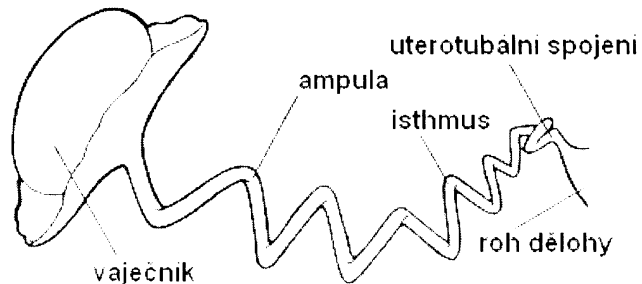
Semenná plazma obsahuje tzv. dekapacitační faktory, které při ejakulaci interagují s povrchem spermie a ke kapacitaci může dojít až po odstranění nebo modifikace těchto faktorů v samičím genitálním traktu [12]. Její efekt spočívá (krom jiného) ve správném načasování kapacitace a následných dějů a též v indukci kapacitace interakcí s faktory v samičím prostředí [12], [13] a bude podrobněji popsán v oddílu 1.4.

1.3.1. Tvorba oviduktálního rezervoáru

V případě skotu dohází k odstranění dekapacitačních faktorů a tím k počátku kapacitace v *cervix* (obr. 1.4-A na str. 10), zřejmě interakcí s faktory, které jsou přítomné v tekutinách samičího ústrojí [12]. Nicméně kapacitovaná je vždy jen malá část populace spermií, což je asi spojeno s věkem jednotlivých buněk [12].



Obr. 1.4-A⁴: schéma kravského pohlavního ústrojí



Obr. 1.4-B⁴: detail oviduktu

Nekapacitované spermie se vážou na oviduktální epitel pomocí lektin-sacharidových interakcí a tvoří zde tzv. rezervoár. Takto pak prodělají kapacitaci, během níž se tyto receptory (zodpovědné za vazbu na ovidukt) ztratí a spermie se uvolní [12]. U kravského oviduktu jsou za vazbu zodpovědné pravděpodobně fukosylové zbytky na povrchu epitelu [14] a zdá se, že k uvolnění dochází interakcí periferního proteinu ze semenné plazmy s fruktosou na povrchu epitelu [15]. K tomu dochází nejpozději v *isthmus* (obr. 1.4-B) [12].

Význam tvorby rezervoáru je zřejmě jednak zabránění polyspermie, jednak prodloužení životnosti spermií a též zpomalení kapacitace v závislosti na ovulaci, při níž je pak patrně samičími faktory kapacitace stimulována [14].

1.3.2. Kapacitace

Hlavně zahrnuje výrazné změny v architektuře buněčné membrány. Po odkrytí dekapacitačních faktorů dochází k tzv. cholesterolovému efluxu [12], [13], [16], neboli ztrátě významného množství tohoto membránového lipidu. Tento děj je u býka indukován faktory samičího traktu - heparinem a heparinu podobnými glykosaminoglykany (GAG) [12], [13] a dále FF-HDL (follicular fluid high density lipoprotein), avšak asi odlišnými mechanismy [13], [15]. Některé proteiny býčí semenné plazmy zřejmě hrají v tomto ději významnou roli jako receptory pro heparin a GAG (viz oddíl 1.4) [13].

Důsledky cholesterolového efluxu jsou pak zvýšená fluidita membrány a následná změna fosfolipidové distribuce a konfigurace důležitých receptorů, především odkrytí

⁴ Obrázek byl vybrán z [39] a upraven.

receptoru liganďů zony pellucidy. Membránové modifikace jsou zřejmě podporovány též inhibicí flipas (které udržují asymetričnost lipidového složení) ionty Ca^{2+} , jejichž influx je spojen s časnými stadiemi kapacitace [12]. Výsledný efekt je destabilizace membrány a usnadnění membránové fúze při akrosomové reakci [12], [16].

Další změny zahrnují zvýšení intracelulárního Ca^{2+} (zřejmě více mechanismy), pH, cAMP a HCO_3^- . Komplexní kooperativní interakcí nakonec indukují rozsáhlou modulaci tyrosinové fosforylace proteinů spermie a indukci tzv. hyperaktivace, což souvisí se zvýšenou rychlostí a sníženou linearitou pohybu.

1.3.3. Fertilizace

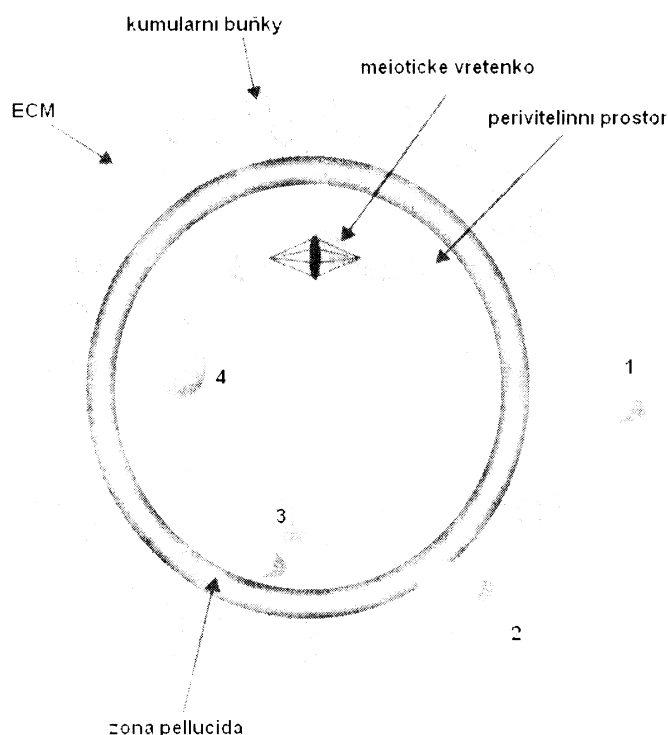
Mechanismus zodpovědný za navigaci spermie k vajíčku po uvolnění z rezervoáru není zcela jasný, ale pravděpodobně není důsledkem velkého počtu spermií nacházejících se ve vagíně po kopulaci, neboť pouze velice málo jich v jednom okamžiku dosáhne oviduktu [17]. Zdá se, že je to zčásti chemotaxe, kde však vzhledem k poměrně velké vzdálenosti od rezervoáru (několik cm) a pohybu luminálních tekutin (peristaltickými stahy oviduktu) není možné udržet konstantní koncentrační gradient případných atraktantů; tento mechanismus se uplatňuje asi spíše v bezprostřední blízkosti vajíčka [12], [16], [17], popř. je vícestupňový [17]. Nedávný objev termotaxe u spermie by vzhledem k poměrně velkému rozdílu teploty mezi místem rezervoáru a místem fertilizace (a citlivosti podobných termosenzorů) mohl přispět k pochopení mechanismu navigace spermie [16].

1.3.3.1. Komplex vajíčka při ovulaci

Celý komplex s vajíčkem, který vstupuje při ovulaci do ampuly oviduktu (obr. 1.4-B), je tvořen haploidním vajíčkem, glykoproteinovou vrstvou, která se nazývá *zona pellucida* a je tvořena třemi glykoproteiny označovanými (u krávy) bZP1, bZP3 α , bZP3 β a produkovanými vajíčkem; a dále obalem zvaným *cumulus oophorus*, který je složen z několika vrstev kumulárních buněk (vzniklých z buněk folikulárních) a extracelulárního matrixu z polymerní hyaluronové kyseliny (obr. 1.5 na str. 12) [2], [18].

Obr. 1.5⁵: schéma vajíčka při ovulaci a průběh fertilizace

- 1 spermie proniká cumulus oophorus
- 2 akrosomová reakce a pronik zónou pellucidou
- 3, 4 adheze a pronik plazmatickou membránou vajíčka



1.3.3.2. Penetrace skrz cumulus oophorus

Pouze kapacitované spermie mohou proniknout *cumulus oophorus*, což je zřejmě (alespoň zčásti) důsledek interakce, jejíž schopnost je během kapacitace ztracena [2]. Zdá se, že hyaluronidasa, jedna z hydrolas spermie, a některé další hydrolasy zde hrají spíše podřadnou úlohu, a že spermie pronikne *cumulus oophorus* raději přes kanálky, které vyplývají z jeho radiálního uspořádání [2]. Je možné, že zde hraje roli chemotaxe, která se objevuje až po kapacitaci [12], [17]. Navíc *cumulus oophorus* je u některých savců, včetně skotu, spontánně degradován krátce po ovulaci a penetraci spermie pak v okamžiku fertilizace nijak nebrání [2].

1.3.3.3. Penetrace zónou pellucidou a akrosomová reakce

Jakmile spermie dosáhne zóny pellucidy, dochází k interakci receptoru na povrchu spermie s glykoproteiny zóny, což zahájí akrosomovou reakci [2], [18]. Mechanismus iniciace zatím není zcela jasný [2], ale jedna z možností je, že polyvalentní ZP3 způsobí agregaci receptorů spermie, což vyústí v signalizační kaskádu, která způsobí rapidní influx Ca^{2+} a fúzi akrosomové a plazmatické membrány spermie a následné vylití obsahu akrosomu do

⁵ Obrázek byl vybrán z [18] a upraven.

extracelulárního prostoru zony pellucidy [2], [18]. Zdá se, že v těchto procesech významně figuruje PLA_2 (fosfolipáza A_2), která štěpí *sn-2* vazbu diacylfosfolipidů a alkyl- nebo alkenyl-acylfosfolipidů za vzniku volných mastných kyselin a lysofosfolipidů; tyto látky podporují fúzi membrán [2], [19].

Akrosomální obsah se skládá z množství hydrolas, nejvýznamnější z nich je pravděpodobně akrosin, který je zčásti ve formě proakrosinu. Ten se nachází též na povrchu spermie a jako receptor se váže na zonu pellucidu [2]. Akrosin štěpí autokatalyticky proakrosin na enzymaticky aktivní α -akrosin a dále na β -akrosin, který se již neváže, je však stále enzymaticky aktivní [2]. Akrosin (v obou formách) je serinová proteasa podobná trypsinu: narozdíl od trypsinu však způsobí pouze lokální degradaci zony pellucidy [2]. Působením (nejen) akrosinu nakonec spermie vytvoří díru, kterou propluje dovnitř. K penetraci zřejmě též přispívá vrtulovitý pohyb spermie po hyperaktivaci [2].

1.3.3.4. Splynutí gamet

Další události pak zahrnují adhezi spermie na membránu vajíčka (pomocí integrinové interakce) a fúzi membrán obou gamet, pravděpodobně podobným mechanismem jako při vycestování leukocyty [20]. Poté následuje aktivace vajíčka, která je spojena se zvýšením intracelulární hladiny Ca^{2+} během několika sekund až minut po fúzi [18] a v pravidelných oscilacích trvá několik hodin, dokud nedojde k první mitóze [18]. Tyto vlny jsou generovány cestou IP_3 uvolňujícím endoplazmatické Ca^{2+} a spouštěcí mechanismus je zřejmě interakce obou gamet [18]. V tomto okamžiku je úkol spermie – tedy dopravení genetického materiálu – splněn a zbylé spermie (podobně jako v případě, kdy spermie dosáhne ampuly jindy než okolo ovulace [12]) jsou pak fagocytovány [14].

1.4. Býčí semenná plazma

Je to tekutina, ve které se nachází spermie při ejakulaci a její obsah pochází především ze sekretů přídatných pohlavních žláz (u býka hlavně semenných váčků), ale též z dalších buněk (krom spermií) – např. leukocytů – a jejich produktů; přítomny jsou zde též nejrůznější mikroorganismy [21].

Obsahuje mnoho nízkomolekulárních látek, jako jsou ionty kovů, organické kyseliny, cukry, lipidy a aminokyseliny; z vysokomolekulárních látek jsou přítomny pouze proteiny [22].

1.4.1. Biologická funkce býčí semenné plazmy

Semenná plazma zastává u býka několik významných úloh. Především představuje nosič [3, 23, 24], jehož prostřednictvím jsou spermie dopraveny do samičího traktu, neboť je zdrojem většiny objemu ejakulátu, který výrazně zředuje a snižuje tak jeho viskozitu [3].

Dále obsahuje četné nízkomolekulární látky, které představují jednak důležité metabolity a zdroj energie, potřebný pro velmi aktivní pohyb spermií, jednak látky, udržující osmotickou a pH rovnováhu [3].

Je také ochranným médiem, jednak díky antioxidačnímu systému, jednak obsahuje některé látky, potlačující nepříznivé faktory v samičím ústrojí [21]. Rovněž efekt zředění přispívá k zkvalitnění podmínek snížením koncentrace některých odpadních toxických produktů spermií (hlavně produkty oxidace).

V neposlední řadě také přímo moduluje procesy jako kapacitace nebo akrosomová reakce: je zároveň dekapacitační faktor (participuje na tvorbě rezervoáru, zabraňuje předčasné akrosomové reakci) a zároveň ve správnou chvíli kapacitaci indukuje [22].

1.4.2. Proteiny býčí semenné plazmy

Devadesátdevět proteinů semenné plazmy býka bylo identifikováno kombinací 2D-LC (2d liquid chromatography) a údajů z proteomických databází [25]; přičemž v jiné studii bylo pomocí 2D-F (2d elektroforéza) nalezeno okolo 250 proteinových stop [25]. Z dosavadních

výzkumu jsou dostupné detailnější informace pouze o malé části z nich, třebaže majoritně zastoupené [25].

1.4.2.1. Proteiny, zahrnuté v antioxidačním systému

Nebezpečné oxidační látky, tzv. ROS (reactive oxygen species), jako jsou O_2^- , OH^\cdot , H_2O_2 , NO^\cdot , které normálně vznikají v buňce (např. v dýchacím řetězci), je třeba účinně odstraňovat, protože tyto látky snadno oxidují buněčné konstituenty (tj. proteiny, lipidy, nukleové kyseliny atd.) a způsobují její vážné poškození, což může vést až k apoptóze [26].

Jelikož spermie během svého pohybu produkuje ROS ve značné míře (mitochondriemi při aerobní fosforylaci) a rovněž v kravském genitálním traktu jsou produkovány [21], jsou spermie i semenná plazma vybaveny několika enzymy s antioxidační aktivitou, jako SOD (superoxid dismutasa – podle [25] Cu/Zn dep.), katalasa a GPx (glutathion peroxidasa; v semenné plazme býka typu 5 podle [25]) [27].

1.4.2.2. BSP proteiny

Takto jsou kolektivně označovány čtyři kyselé proteiny býčí semené plazmy: BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 a BSP-30-kDa a byly detailně studovány a charakterizovány. Tvoří okolo 65 % celkových proteinů [28] (30 - 40 mg/ml [19]). První tři jmenované mají molekulovou hmotnost okolo 13 kDa (ze strukturní analýzy: 12774 – 13403 Da [29]).

BSP-A1 a BSP-A2 mají stejnou sekvenci o 109 AK a liší se pouze ve stupni glykosylace [29], [23]. Jejich směs se označuje jako PDC-109 [23]. Jejich obsah v semenné plazmě je asi 15 - 25 mg/ml [22]. PDC-109 se skládá ze dvou 43 AK fibronectinových domén typu II (Fn2) a 23 AK N-terminální domény [23]. Na threoninu v pozici 11 je O-glykosidickou vazbou připojen oligosacharid [23], [30]:



(NeuNAc = kyselina *N*-acetylneuraminová, Gal = galaktosa, GalNAc = *N*-acetyl-2-galaktosamin)

BSP-A3 je ze 70% homologní s PDC-109 a rovněž obsahuje 2 Fn2 domény [23].

1.4.2.3. Role proteinů býčí semenné plazmy při fertilizaci

Proteiny semenné plazmy, především BSP, hrají zřejmě důležitou roli v procesu reprodukce, a to na úrovni kapacity, tvorby ovidukálního rezervoáru a akrosomové reakce. Při ejakulaci se váží na povrch spermie, kterou pokryjí. Ačkoliv jich většina pochází ze semenné plazmy, některé (např. BSP) jsou v malé míře i na povrchu epididymálních spermií [13].

1.4.2.4. Lipidový eflux

BSP se váží přes fosfocholinové lipidy, jako PC (fosfatidylcholin), SM (sfingomyelin), lyso-PC, PC plasmalogen, PAF (platelet activating factor) [23]; tyto lipidy tvoří asi 60 – 70% lipidů buněčné membrány býčí spermie a vazba zřejmě závisí na jejich lokální hustotě [23]. S jistotou, avšak daleko menší afinitou interagují též s jinými fosfolipidy (hlavně BSP-30-kDa) [23]. Mechanismus interakce byl detailně studován hlavně u PDC-109 [22], [23] – jde o interakci mezi $-N(CH_3)_3^+$ skupinou cholinu a tryptofanovým kruhem proteinu. Ta je navíc podporována vodíkovou vazbou mezi $-OH$ skupinou tyrosinu a kyslíkem fosfátové skupiny. K interakci dochází na obou doménách, navíc PDC-109 je při této interakci ve formě dimeru a všechna vazebná místa jsou orientována na stejnou stranu, což odpovídá vazbě na povrch membrány.

Touto vazbou participují na cholesterolovému a fosfolipidovému efluxu v časných stádiích kapacity. Tyto děje jsou indukovány heparinem a heparinu podobnými glykosaminoglykany (GAG), které jsou přítomny v ovidukálních a folikulárních tekutinách. BSP vazbou na lipidovou membránu zřejmě umožňují heparinu a GAG zahájit eflux, neboť se zároveň na tyto kyselé polysacharidy vážou [13], [21], [31], [32]. K efluxu dochází z vnější strany lipidové dvojvrstvy [33], nicméně přesný mechanismus zatím není objasněn [23].

Podle toho, zda proteiny býčí semenné plazmy (tedy všechny) vážou heparin či ne, dají se rozdělit na H^+ , resp. H^- frakci [28], [31].

1.4.2.5. Další úlohy ve fertilizaci

Rovněž bylo zjištěno, že PDC 109 je zodpovědný za vazbu na fukosylové zbytky glykokonjugátů ovidukálního epitelu [34], [35] a též ostatní BSP s tímto epitelem interagují a zřejmě participují na tvorbě rezervoáru [36]. Místa, kterými s fukosylovými zbytky BSP

interagují, musí být během kapacitace ztracena či modifikována [28]. Zároveň musí být odkryty či aktivovány receptory pro manosylové zbytky, jako hlavní sacharidové komponenty *zona pellucida* glykoproteinů [28], [37]. Většina proteinů, vážících tyto glykoproteiny jsou zároveň z H⁺ frakce a jako manan vázající frakce byly identifikovány PDC-109, dimer RNAasy a protein, homologní k BSP-30-kDa (ovšem měl okolo poloviny jeho molekulového hmotnosti, nicméně se zdá, že není produktem proteolýzy; může to být další člen rodiny BSP proteinů) [37].

Další studie ukazují, že na povrchu střední části bičíku se také váže PDC-109 a kooperativně interaguje s Ca²⁺-ATPasou, s čímž je spojena zvýšená motilita [38].

Jiné studie zase deklarují inhibiční vliv BSP proteinů na aktivitu PLA₂ (viz oddíl 1.3.3.3). Inhibice zde může spočívat buď ve vazbě BSP na lipidy a tím jejich blokadí pro PLA₂, nebo v přímé interakci BSP s PLA₂, neboť se zjistilo, že PLA₂ s BSP jsou na povrchu ejakulované spermie kolokalizovány [19].

Další protein, kterému byly věnovány zajímavé studie ve spojení s fertilitou, je kaltrin (nebo též seminalplasmin) [24]. Tento malý bazický protein se váže na akrosomovou oblast a přední část bičíku. Zdá se, že prostřednictvím vazby na kalmodulin (transport Ca²⁺) inhibuje influx Ca²⁺; funkce se pak interakcí s nějakým samičím faktorem změni v opačnou. Přisun Ca²⁺ je spojen s akrosomovou reakcí a též s hyperaktivací a mohl by tak přispět k načasování správné akrosomové reakce. Kaltrin má také antimikrobiální účinky.

V semenné plazmě býky byly identifikovány také některé glykosidasy: β-manosidasa; β-galaktosidasa, protein podobný α-manosidase, protein podobný epididymis-specifické α-manosidase, protein podobný lidské N-acetyl-β-glukosaminidase, tkáňová α-L-fukosidasa [25].

1.4.2.6. Agregované formy proteinů býčí semenné plazmy

Proteiny semenné plazmy býka, především PDC-109, se za fyziologických podmínek nacházejí v agregovaných formách v rozmezí molekulových hmotností 60 – 120 kDa [29]. Schopnost vázat heparin, jak se zjistilo, je závislá právě na agregačním stavu [28]. Zatímco proteiny H⁺ frakce vykazovaly širokou polydisperzitu v rozmezí 10 – 60 kDa, H⁺ frakce byla v agregátech > 100 kDa, přičemž v obou frakcích se nacházely některé proteiny stejné [28]. Tato polydisperzita v rámci stejného proteinu se původně vysvětlovala rozdílnou glykosylací, nicméně nebyla potvrzena studií, kde se enzymatickou deglykosylací PDC-109 polydisperzita

nezměnila [28]. Další studie ukazují, že některé nízkomolekulární látky (některé sacharidy, vč. fruktosy, která je majoritním sacharidem semenné plazmy býka) inhibují heparin vazebnou aktivitu proteinů semenné plazmy, a to zřejmě modulací agregačních stavů, neméně v přítomnosti dalších látek semenné plazmy (tj. např. v ejakulátu) tuto inhibici neprojevují [31]. Rovněž při vazbě na membránové fosfocholinové lipidy se PDC-109 „rozpadá“ na dimer [23], což je konzistentní s pozorováním, že heparin vázající (H^+) frakce se nachází v agregovaných formách mnohem menších než heparin nevážící frakce (H^-). Ačkoliv se o agregovaných formách proteinů býčí semenné plazmy ví zatím jen velice málo, výše popsané studie naznačují, že hrají důležitou roli při fertilizaci, jelikož souvisí se schopností vázat heparin a heparinu podobné GAG a tato interakce se zdá být zásadní v indukci kapacity.

1.4.3. Nízkomolekulární složky býčí semenné plazmy

Jsou zde přítomny četné nízkomolekulární látky (tj. aminokyseliny, nukleotidy, sacharidy, lipidy, anorganické ionty, organické kyseliny, vitaminy, peptidy atd.). Velmi výrazný je vysoký obsah fruktosy a citrátu. O případné participaci fruktosy na fertilizaci již byla zmínka, je však především zdrojem energie pro spermie (frukolýza). Na výživě se dále podílejí další cukry, aminokyseliny, lipidy atd. Citrát společně s HCO_3^- (a dalšími látkami) udržují pH rovnováhu (pH ejakulátu býka – 6,2 - 7,8 [3]). Z aminokyselin převládá glutamát. Je zde též v hojné míře inositol a glycerylfosforylecholin [3].

Některé nízkomolekulární složky jsou důležité články antioxidačního systému: GSH, askorbová kys. a α -tokoferol (tj. vitaminy C a E), taurin a hypotaurin [27], [40].

1.5. Cíl práce

Tvorba ovidukálního rezervoáru, kapacitace a rozpoznání a navázání zony pellucidy spermií jsou klíčové události k dosažení úspěšné fertilizace. Jak se zdá, semenná plazma a zejména její proteiny se na těchto událostech významně podílí. Proteiny semenné plazmy býka tvoří agregáty v širokém rozmezí hodnot molekulových hmotností a zdá se, že tyto agregační stavy souvisí s jejich funkcí, která je jimi modulována (viz oddíly 1.3 – 1.4).

Studium agregovaných forem proteinů býčí semenné plazmy a jejich vlastností ve spojení s různými faktory, tyto vlastnosti ovlivňujícími, může proto přinést zajímavé objevy na poli biologie a chemie reprodukce, a to nejen teoretické, ale i praktické hodnoty (v rámci chovu hospodářských zvířat). Tím spíše, že tento fenomén je zatím velice málo probádán.

Cílem předkládané práce je zhodnotit vliv glykosylace proteinů býčí semenné plazmy na jejich agregační stavy a pokusit se určit míru vlivu specifických cukerných zbytků.

2. Materiál a metody

2.1. Materiál

2.1.1. Biologický materiál

Býčí ejakuláty byly získány darem (Výzkumný ústav veterinárního lékařství (VUVel), Brno). BSP byly získány centrifugací ejakulátů a následnou lyofilizací supernatantu.

2.1.2. Chemikálie

Akrylamid	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
ABTS	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Avidin-HPR	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Blue Dextran	- Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden
Bromfenolová modř	- Lachema, Brno, ČR
BSA	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	- Serva, Heidelberg, Německo
Cytochrom c	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
3,3'-diaminobenzidín tetrahydrochlorid	- ICN Biochemicals, Cleveland, Ohio
Dihydrogenfosforečnan sodný	- Lachema, Brno, ČR
N,N-dimethylformamid	- Lachema, Brno, ČR
Dodecylsulfát sodný	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Emulsin	- dar (Prof. RNDr. G. Entlicher, CSc.)
Fenol	- Biedel-De Haën AG, Seezle-Hannover, Německo
α -L-fukosidasa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
α -galaktosidasa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
β -galaktosidasa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
D-glukosa	- Lachema, Brno, ČR

β -glukosidasa	- Koch-light laboratories Ltd., Colnbrook, Eng
Glutaraldehyd	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Glycerol	- Lachema, Brno, ČR
Glycin	- Reanal, Budapešť, Maďarsko
Hydrogenfosforečnan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Hydrogenuhlíčan amonný	- Lachema, Brno, ČR
Chlorid hořečnatý	- Lachema, Brno, ČR
Chlorid sodný	- Lachema, Brno, ČR
Chlorid vápenatý	- Fluka, Buchs, Švýcarsko
Kyselina octová	- Lachema, Brno, ČR
Kyselina sírová	- Penta, Chrudim, ČR
Lysozym (kopolymer)	- dar (praktika biochemie PřF UK)
α -manosidasa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Methanol	- Lachema, Brno, ČR
N,N'-metylen-bisakrylamid	- Serva, Heidelberg, Německo
Neuraminidasa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
N-hydroxysukeinimidobiotin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Octan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Ovalbumin	- dar (praktika biochemie PřF UK)
Perboritan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Persíran amonný	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
PNGasa F	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Sephadex G-100	- Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden
N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin	- Serva, Heidelberg, Německo
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	- Serva, Heidelberg, Německo
Trypsin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Tween 20	- Serva, Heidelberg, Německo

2.1.3. Ostatní materiál

Mikrotitrační polystyrénové destičky pro ELBA testy (F16 MAXISORP LOOSE)	- NUNC, Dánsko
---	----------------

2.2. Metody

2.2.1. Gelová chromatografie

Pro účely analýzy velikosti agregátů proteinů býčí semenné plazmy byla použita gelová chromatografie na sloupci sephadexu G-100 o rozměrech 1 x 58 cm (Pharmacia, Švédsko). Sloupec sephadexu byl ekvilibrován 0,2 M NH_4HCO_3 o pH 7,9. Frakce byly jímány do zkumavek po 40 kapkách (zhruba 1,8 ml) kolektorem zn. BioRad. Souběžně s tím byla automaticky měřena okamžitá absorbance eluátu při 280 nm spektrofotometrem ECONO UV MONITOR (BioRad), která byla simultánně zapisována do grafu. Poté byly absorbance jednotlivých frakcí proměřeny na spektrofotometru Helios (Thermo Electron Corporation) při 280 nm a byly změřeny přesné objemy frakcí. Ze získaných údajů byl sestrojen graf závislosti absorbance na elučním objemu.

Kalibrace pro určení relativních molekulových hmotností z elučních grafů byla provedena za pomoci standardů o známých Mr, a to BSA (Mr 67 000), ovalbumin (Mr 45 000), cytochrom c (Mr 13 000). Kalibrační graf byl sestrojen vynesemím lineární závislosti dekadického logaritmu Mr na elučním objemu daných standardů. Pro zjištění zádržného objemu byl použit Blue Dextran.

Vzorky po dialýze proti PBS byly nanášeny na sloupec v koncentraci +/- 5 mg/ml⁶ v objemu 0,5 ml. Kontrolní vzorek byl vytvořen rozpuštěním 5 mg BSP v PBS a nanášen v objemu 0,5 ml.

2.2.2. Stanovení obsahu neutrálních sacharidů dle Dubois [41]

Byl stanoven obsah neutrálních sacharidů u vzorků BSP po inkubaci a dialýze, u vzorku BSP bez inkubace, ale po dialýze a rovněž u vzorku BSP bez inkubace i bez dialýzy. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny v hmotnostních procentech celkových proteinů.

Jelikož u vzorků, které byly dialyzovány, se koncentrace proteinů mohla změnit od původního naváženého množství, byly přesné koncentrace ve všech vzorcích změřeny: bylo odebráno vždy 100 μl vzorku, 10 x zředěno PBS a poté změřena absorbance při 280 nm proti

⁶ Původní navážená koncentrace kolísala vzorek od vzorku v důsledku dialýzy, přesné koncentrace po dialýze byly ovšem změřeny a brány v úvahu při vyhodnocení.

samotnému PBS. Vycházelo se z předpokladu, že absorbance 1,000 odpovídá 1 mg proteinů (což platí pro takto nízké koncentrace a experimentálně to bylo ověřeno v případě nedialyzovaných vzorků, jejichž množství bylo přesně naváženo (nepublikované výsledky)).

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

Postup:

- 1) K 0,5 ml vzorku glykoproteinu o koncentraci 2,5 mg/ml v 0,1 M PBS byl z dávkovací lahve přidán 1 ml 5 % roztoku fenolu a dále 5 ml koncentrované kyseliny sírové.
- 2) Totéž bylo přidáno k 0,5 ml 0,1 M PBS (jako blank).
- 3) Po okamžitém protřepání byly směsi ponechány stát při laboratorní teplotě cca 30 min.
- 4) Poté byla u každé změřena absorbance proti blanku při 490 nm.
- 5) Ke kalibraci byla rozpuštěna D-glukóza v 2x ředěném PBS v sadě koncentrací.
- 6) Kalibrační křivka byly sestrojena jako závislost absorbance (měřené při 490 nm proti blanku) na příslušné koncentraci.

2.2.3. Enzymatické deglykosylace glykoproteinů [42]

Enzymatické deglykosylace byly provedeny pomocí následujících glykosidas:

- neuraminidasa (*C. perfringens*)
- α -galaktosidasa (zelené kávové zrno)
- β -galaktosidasa (*E. coli*)
- α -manosidasa (zrno *Jack*)
- PNGasa F (= *peptide N-glykosidase*; *F. meningosepticum*)
- α -L-fukosidasa (býčí ledvina)
- emulsin
- β -glukosidasa

Postup:

- 1) Pro každý vzorek bylo rozpuštěno 10 mg BSP ve 2 ml reakčního pufru (výsledná koncentrace – 5 mg / ml); reakční pufrů jsou uvedeny v tab. 2.1.
- 2) Poté byl přidán enzym v množství uvedeném v tab. 2.1.
- 3) V případě β -galaktosidasy byl přidán navíc $MgCl_2$ do výsledné koncentrace 0,01 mol/dm³ (Mg^{2+} jako kofaktor enzymu).
- 4) Jako kontroly byly připraveny vzorky BSP o stejné koncentraci v jednotlivých pufrch (3 kontroly) + 1 kontrola v acetátovém pufru pH 5,8 pro vzorky s přidáním emulsinem a β -glukosidasou, neboť jejich inkubace trvá značně déle.
- 5) Do všech vzorků a kontrol bylo přidáno malé množství NaN_3 (inhibice množení bakterií).
- 6) Vzorky byly inkubovány 24 hod při 37 °C, v případě emulsinu a β -glukosidasy přibližně 100 hod.
- 7) Po inkubaci následovala dilýza přes noc proti PBS a jejich skladování v mrazáku.

glykosidasa:	reakční pufr:	iontová síla reakčního pufru (mol/dm ³)	pH reakčního pufru	aktivita, popř. množství přidaného enzymu / ml
neuraminidasa	acetátový	0,10	5,8	0,025 U
α -galaktozidasa	fosfátový	0,10	6,5	0,025 U
β -galaktosidasa	acetátový	0,10	5,8	0,700 U
α -manosidasa	acetátový	0,10	5,8	
PNGaza F	fosfátový	0,05	7,5	3,500 U
α -L-fukosidasa	acetátový	0,10	5,8	0,010 U
emulsin	acetátový	0,10	5,8	0,020 g
β -glukosidasa	acetátový	0,10	5,8	0,020 g

Tab. 2.1: reakční podmínky pro enzymatické deglykosylace

2.2.4. Štěpení proteinů BSP pomocí trypsinu pro metodu ELBA

Postup:

- 1) Pro tryptické štěpení proteinů BSP bylo odebráno 250 μ l z každého vzorku po inkubaci a dialýze (viz oddíl 2.2).
- 2) Dále byl připraven roztok trypsinu v PBS o koncentraci 0,05 mg/ml a byl přidán CaCl_2 do výsledné koncentrace 0,02 M (proti autolýze).
- 3) 250 μ l roztoku trypsinu bylo přidáno k 250 μ l vzorku a poté byly vzorky inkubovány při 37 $^\circ\text{C}$ po dobu 24 hod a poté skladovány v mrazáku.

2.2.5. Biotinylace BSP pro metodu ELBA [43]

Postup:

- 1) 100 mg BSP bylo rozpuštěno v 10 ml 0,5 M NaHCO_3 a smícháno s roztokem 2 mg NHS-biotinu v 50 μ l DMF.
- 2) Poté byla směs jemně třepána na třepačce po dobu 30 min.
- 3) Nakonec byl produkt dialyzován proti destilované vodě, zamrazen a lyofilizován.

2.2.6. ELBA (Enzyme Linked Binding Assay)

Metoda ELBA byla použita pro sledování síly interakce BSP (nemodifikované či modifikované deglykosylací nebo trypsinem) vs BSP-biotin a byla provedena s použitím mikrotitračních polystyrenových destiček (NUNC, dánsko). Pokud není uvedeno jinak, všechny kroky probíhaly při laboratorní teplotě.

Pro sledování této interakce bylo nalezena optimální reakční koncentrace pro BSP a BSP-biotin 2,5 mg / ml (nepublikované výsledky).

Postup:

- 1) Destička byla nejprve aktivována 100 μ l 1% BSA v PBS/jamka po dobu 1 hod za jemného třepání.

- 2) Pak byla několikrát promyta pomocí 200 μ l PBS/jamka během asi 10 min.
- 3) Poté byl přidán 1% glutaraldehyd v destilované vodě v množství 100 μ l/jamka a reakce probýhala za jemného třepání 1 hod.
- 4) Destička pak byla promývána destilovanou vodou po dobu 2 hod, přičemž byla voda několikrát vyměněna (vždy 200 μ l/jamka).
- 5) Po promytí byl aplikován nebiotinylovaný vzorek (tj. po inkubaci + kontrola) v koncentraci 2,5 mg/ml (100 μ l/jamka); každý vzorek byl nanášen 3x. Bezprostředně po aplikaci byla destička ponechána přes noc při 4 °C.
- 6) Následovalo několik promytí pomocí 0,1 % TWEEN v PBS (200 μ l/jamka; 10 min)
- 7) Dále deaktivace zbylých –CHO skupin GA pomocí 1 % BSA v PBS (100 μ l/jamka; 1 hod).
- 8) viz krok 6
- 9) Byl aplikován roztok biotinylovaného proteinu v koncentraci 2,5 mg/ml (100 μ l/jamka; 1 hod).
- 10) viz krok 6
- 11) Byl nanesen roztok avidin křenové peroxidázy (avidin-HPR) o koncentraci 0,25 mg/ml PBS (100 μ l/jamka; 1 hod).
- 12) viz krok 6
- 13) Nakonec byl aplikován substrát pro avidin-HPR (0,1 mg/ml ABTS + 1 mg/ml perboritan sodný v 0,1 M citrát-fosfátovém pufru pH 4,6; je nutné ho připravit těsně před nanesením).
- 14) Průběh reakce byl detekován na spektrofotometru SUNRISE (TECAN) měřením absorbance při 405 nm (zelená barva produktu).
- 15) Výsledky byly pak zprůměrovány a zaneseny do sloupcového diagramu.

2.2.7. Diskontinuální SDS-elektroforéza dle Laemmliho [44]

Pro analýzu frakcí BSP rozdělených gelovou chromatografií byla použita elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS.

Složení roztoků:

- A.** Roztok akrylamidu: 29,2 g AA + 0,8 g bis(AA) do 100 ml H₂O

- B.** 1,5 M Tris.HCl, pH 8,3: 18,5 g Tris do 100 ml H₂O; pH upraveno pomocí HCl
- C.** 0,5 M Tris.HCl, pH 6,8: 6 g Tris do 100 ml H₂O; pH upraveno pomocí HCl
- D.** Elektrodotový pufr (pH 8,3, 4x konc.): 15 g Tris + 72 g glycinu + 5 g SDS do 1000 ml
- E.** Zaostřovací gel (4%; zhruba na 2 gely): 1500 µl H₂O + 625 µl **C** + 325 µl **A** + 25 µl 10% SDS + 40 µl 0,1% bromfenolové modři; těsně před aplikací přidáno 3,8 µl TEMEDu + 35 µl 10 % APS
- F.** Separační gel (15 %; zhruba na 2 gely): 5 ml **A** + 2,5 ml **B** + 2,5 ml H₂O + 0,1 ml 10% SDS; těsně před aplikací přidáno 4,5 µl TEMEDu + 40 µl 10% APS
- G.** Vzorkový pufr neredukující (16 ml): 7 ml H₂O + 2 ml **C** + 3,4 ml glycerolu + 3 ml 10% SDS + 0,4 ml 0,1% bromfenolové modři
- H.** Barvicí roztok (1000 ml): 0,5 g CBB + 450 ml methanolu + 100 ml CH₃COOH + 450 ml H₂O
- I.** Odbarvovací roztok (1000 ml): 250 ml methanolu + 100 ml CH₃COOH + 650 ml H₂O

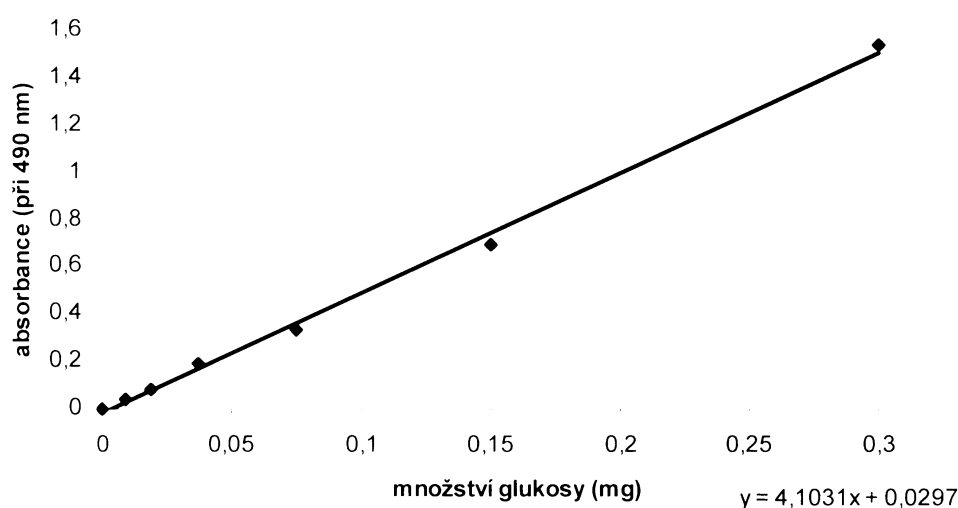
Postup:

- 1) S pomocí aparatury zn. BioRad byl připraven gel: roztok **F** byl nalyt mezi skla a zalit vodou ponechán zpolymerovat (asi 0,5 hod).
- 2) Poté byl aplikován roztok **E**, přičemž byl zasunut hřeben na tvorbu jamek.
- 3) Po polymeraci (asi 10 min) byla vložena aparatura do vany a do katodového i anodového (zde po okraj) prostoru byl nalit roztok **D**.
- 4) Poté byl hřeben opatrně vysunut a aplikovány vzorky standardem (oligomerní směs lysozymu) v konc. 3 mg/ml v 10 µl roztoku **G**.
- 5) Elektrody byly připojeny ke zdroji napětí (přístroj Electrophoresis Constant Power Supply 3000/150, Pharmacia) a nastaveno počáteční napětí 70 V.
- 6) Po dosažení proteinů separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 130 V a ponecháno až do konce elektroforézy.
- 7) Aparatura byla odpojena, gel vyjmut (odříznuta zaostřovací část) a vložen do roztoku **H**, kde byl ponechán asi 3 hod a následně odbarven roztokem **I**. Nakonec byl gel oskenován a zataven do celofánu.

3. Výsledky

3.1. Enzymatické deglykosylace proteinů BSP

Stupeň deglykosylace byl ověřen pomocí stanovení obsahu neutrálních cukrů dle Dubois a spol. [41]. Kalibrace byla provedena pomocí sady koncentrací glukosy ve stejném pufru a kalibrační křivka je znázorněna na obr. 3.1.



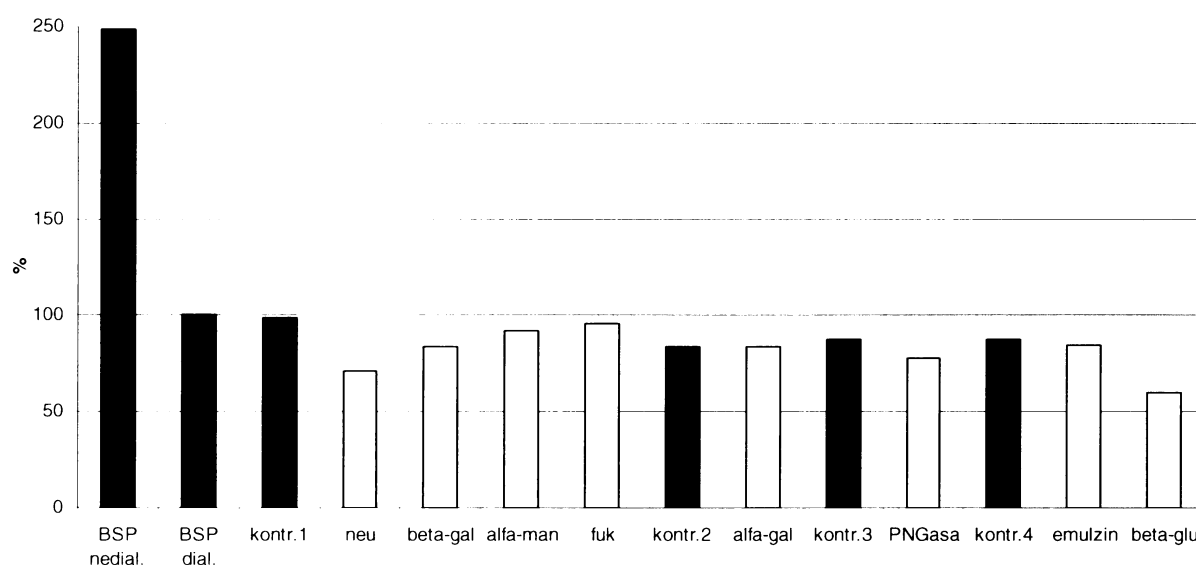
Obr. 3.1: kalibrační křivka k Dubois (závislost absorpance při 490 nm) na množství glukosy v reakční směsi

Zjištěný obsah neutrálních cukrů ve vzorcích byl přepočítán na hmotnostní procenta příslušného množství glykoproteinu. Přepočet byl proveden na základě naměřených hodnot absorpance po dialýze vzorků. Tyto údaje jsou uvedeny v tab. 3.1 na následující straně.

Jako 100% byl zvolen vzorek BSP bez inkubace, ale po dialýze proti PBS. Grafické znázornění je na obr. 3.2 na následující straně.

přidaný enzym	A (280 nm) 10x zředěno	přepočtená konc. proteinů	přidaný enzym	A (280 nm) 10x zředěno	přepočtená konc. proteinů
neuraminidasa	0,515	5,15 mg/ml	emulsin	0,420	4,20 mg/ml
α -galaktosidasa	0,400	4,00 mg/ml	β -glukosidasa	0,370	3,70 mg/ml
β -galaktosidasa	0,536	5,36 mg/ml	kontrola 1	0,467	4,67 mg/ml
α -manosidasa	0,501	5,01 mg/ml	kontrola 2	0,450	4,50 mg/ml
PNGasa F	0,437	4,37 mg/ml	kontrola 3	0,417	4,17 mg/ml
α -L-fukosidasa	0,447	4,47 mg/ml	kontrola 4	0,457	4,57 mg/ml
BSP po dialýze	0,337	3,37 mg/ml			

tab. 3.1: výsledky měření koncentrace proteinů ve vzorcích po dialýze



Obr. 3.2: Obsah neutrálních cukrů dle Dubois

Světle je znázorněn obsah neutrálních cukrů v jednotlivých vzorcích po deglykosylaci oproti jejich kontrolám (červeně) ve stejném pufru bez přidané glykosidasy.

BSP nedial. = obsah neutrálních cukrů v BSP, rozp. v PBS (vztaženo k BSP dial.); **BSP dial.** = obsah neutrálních cukrů v BSP, rozp. v PBS a po následné dialýze proti PBS; **kontr.1** = BSP v 0,10 M acetátovém pufru pH 5,8 po 24 hod; **kontr.2** = BSP v 0,10 M fosfátovém pufru pH 6,5 po 24 hod; **kontr.3** = BSP v 0,05 M fosfátovém pufru pH 7,5 po 24 hod; **kontr.4** = BSP v 0,10 M acetátovém pufru pH 5,8 po 100 hod

Zkratky glykosidas značí BSP v příslušných pufrech (ve stejném pufru jako nejbližší kontrola zleva) s přidávkem příslušné glykosidasy po 24 hod, resp. 100 hod v případě emulsinu a β -glukosidasy.

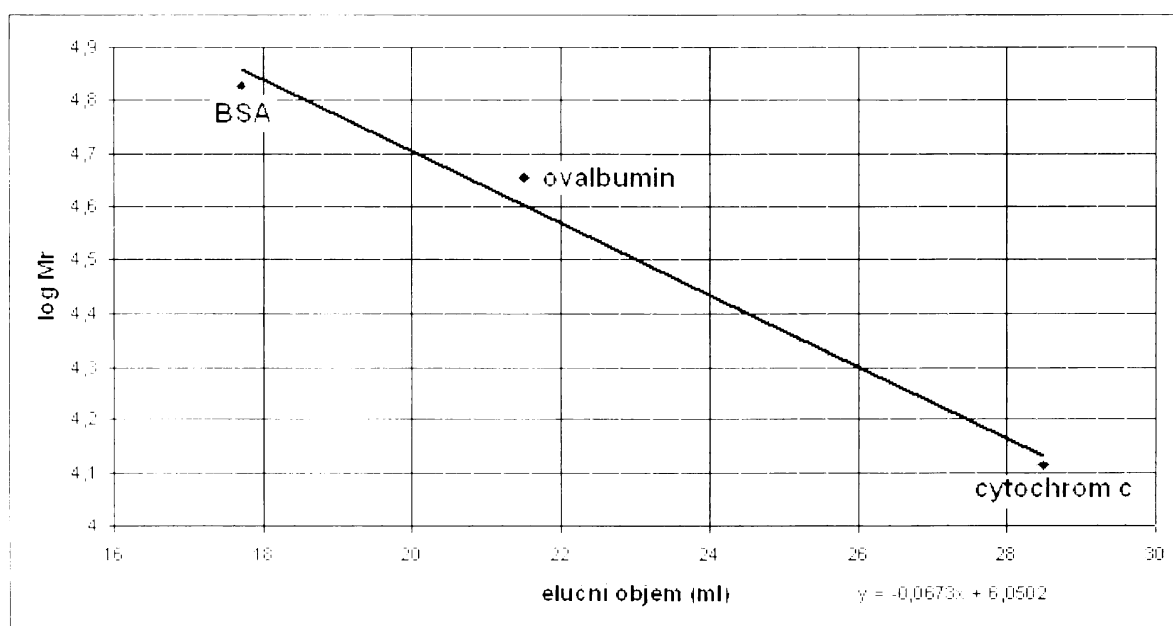
Všechny vzorky, které byly inkubovány, byly dialyzovány proti PBS.

Je zajímavé si povšimnout: **1)** BSP před dialysou obsahuje značné množství neutrálních cukrů (může ovlivnit některé výsledky) **2)** kromě konroly 1 (acetát pH 5,8; 24 hod) jeví všechny ostatní kontroly během své inkubace pokles obsahu neutrálních cukrů (bez přidavku glykosidas) **3)** některé vzorky po deglykosylaci obsahují více cukrů než některé kontroly (ovšem po inkubaci v rozdílných pufrch) **4)** kontrola 4 vykazuje pokles oproti kontrole 1 (stejně pufr, liší se dobou inkubace: kontrola 1 – 24 hod, kontrola 4 – 100 hod) **5)** výraznější pokles u neuraminidasy a β -glukosidas, též u PNGasy (ne však proti své kontrole)

3.2. Gelová chromatografie

3.2.1. Kalibrace sloupce sephadexu G-100

Kalibrační křivka je znázorněna na obr. 3.3. Na grafu jsou znázorněny pozice jednotlivých standardů, v pravém dolním rohu je zaznamenán tvar rovnice regrese.

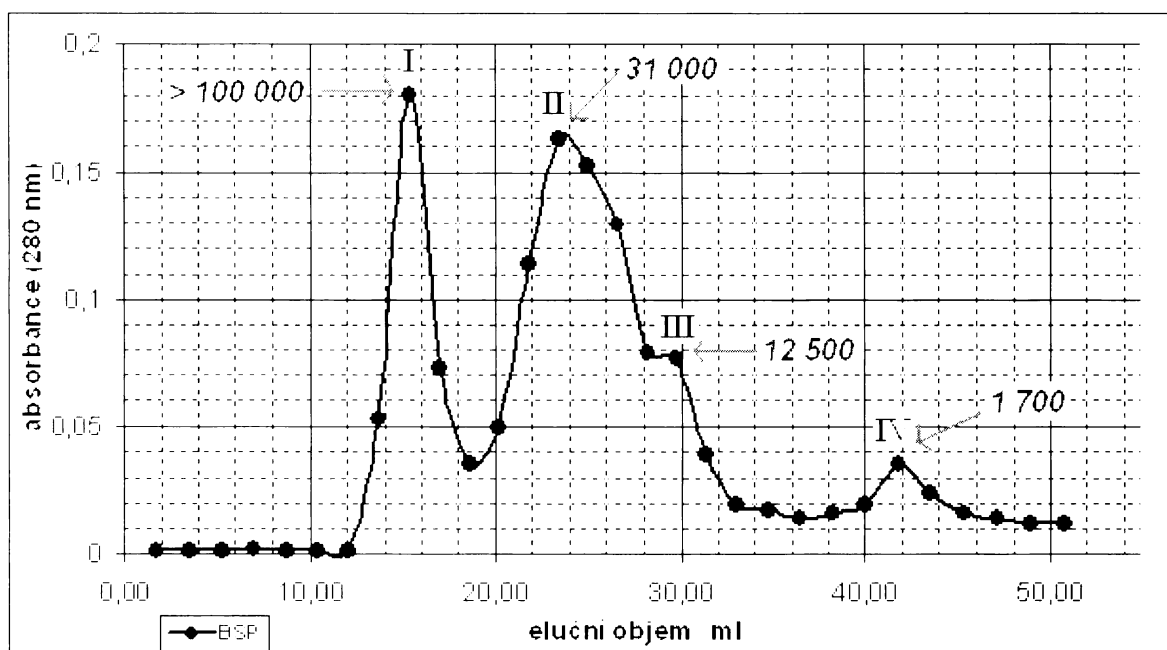


Obr. 3.3: kalibrační křivka sloupce sephadexu G-100 pro určení Mr, sestavená pomocí standardů o známé relativní molekulové hmotnosti

Mr (BSA) = 67 000; Mr (ovalbumin) = 45 000; Mr (cytochrom c) = 13 000

3.2.2. Rozdělení BSP na sephadexu G-100

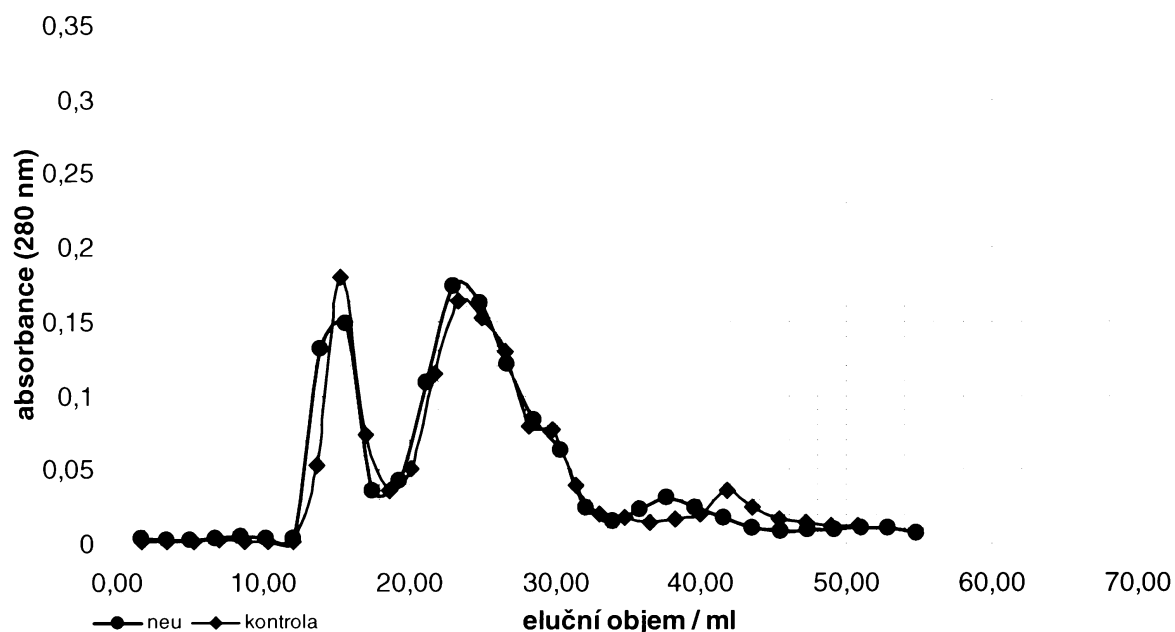
Na obr. 3.4 je eluční graf proteinů BSP, které byly nanášeny v koncentraci 5 mg/ml v PBS. Dají se na něm rozlišit 4 píky, označené římskými číslicemi. Jsou vyznačeny jejich jednotlivé M_r vypočtené z kalibrace.



Obr. 3.4: eluční graf BSP na sephadexu G-100 s vyznačenými píky a jejich M_r vypočtené z kalibrační křivky

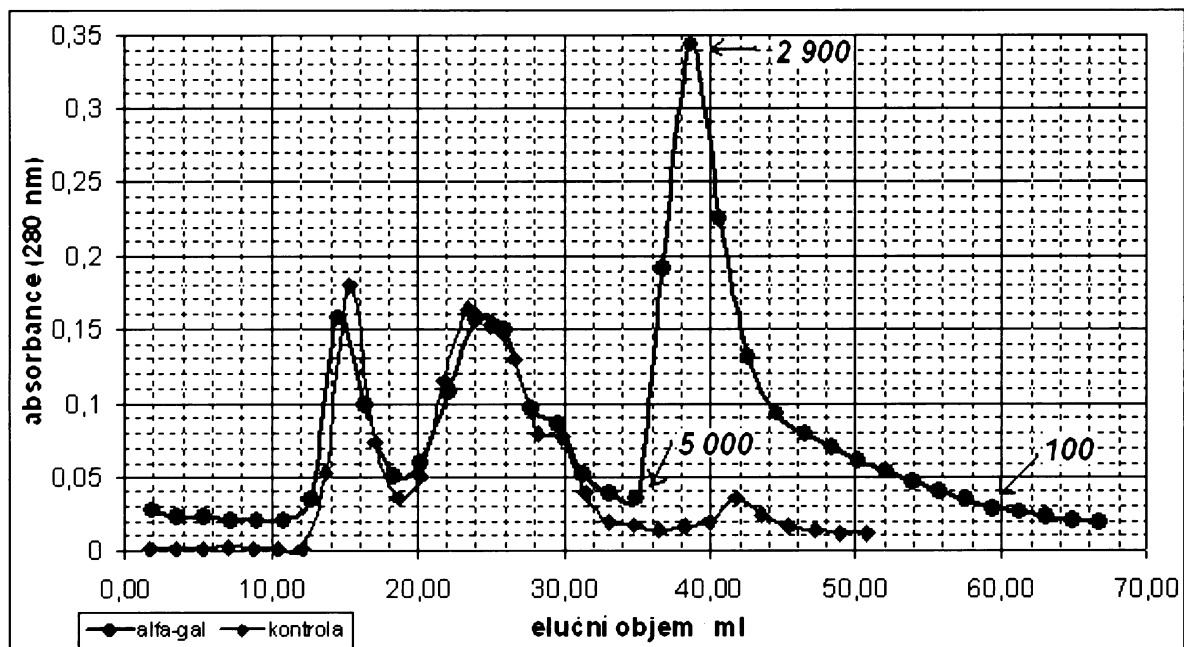
3.2.3. Analýza vzorků BSP po deglykosylaci pomocí gelové chromatografie

Na obrázcích 3.5 - 3.12 na následujících stránkách jsou eluční grafy jednotlivých vzorků po deglykosylaci společně s kontrolou, na obr. 3.13 potom všech vzorků současně. Je z nich patrné, že se oproti kontrole (obr. 3.4) jen nepatrně liší (to je dobře patrné zejména na obr. 3.13). V některých případech (neuraminidasa, PNGasa) se mění poměr píků I a II. U vzorku po inkubaci s α -galaktosidasou se píky I a II navzájem lehce oddělili. Pík v nízkomolekulární oblasti bude diskutován v kap. 5. U PNGasy navíc dochází k posunu píku směrem k nižším hodnotám M_r . Všechny vzorky jeví víceméně odklon od kontroly v oblasti píku IV.



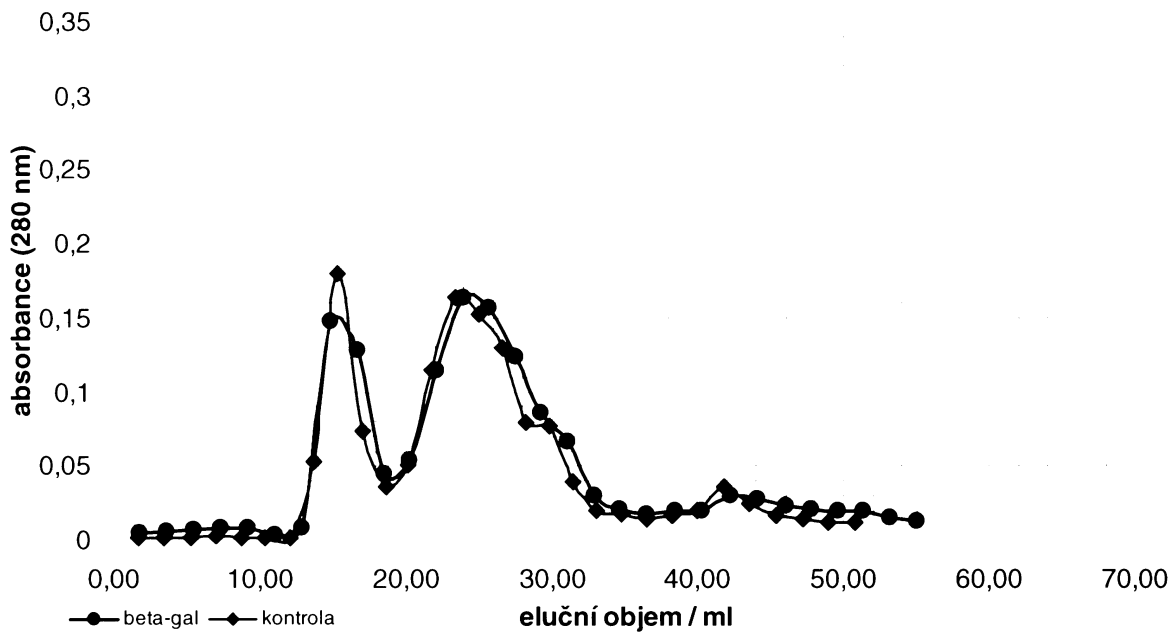
Obr. 3.5: graf závislosti absorbance na elučním objemu BSP po inkubaci s neuraminidasou a kontrolního vzorku (5 mg BSP v 0,5 ml PBS)

Z grafu vyplývá, že pík I je nepatrně širší a nižší. Výraznější posun je u píku IV, který se objevil v oblasti vyšších M_r (okolo 3100)



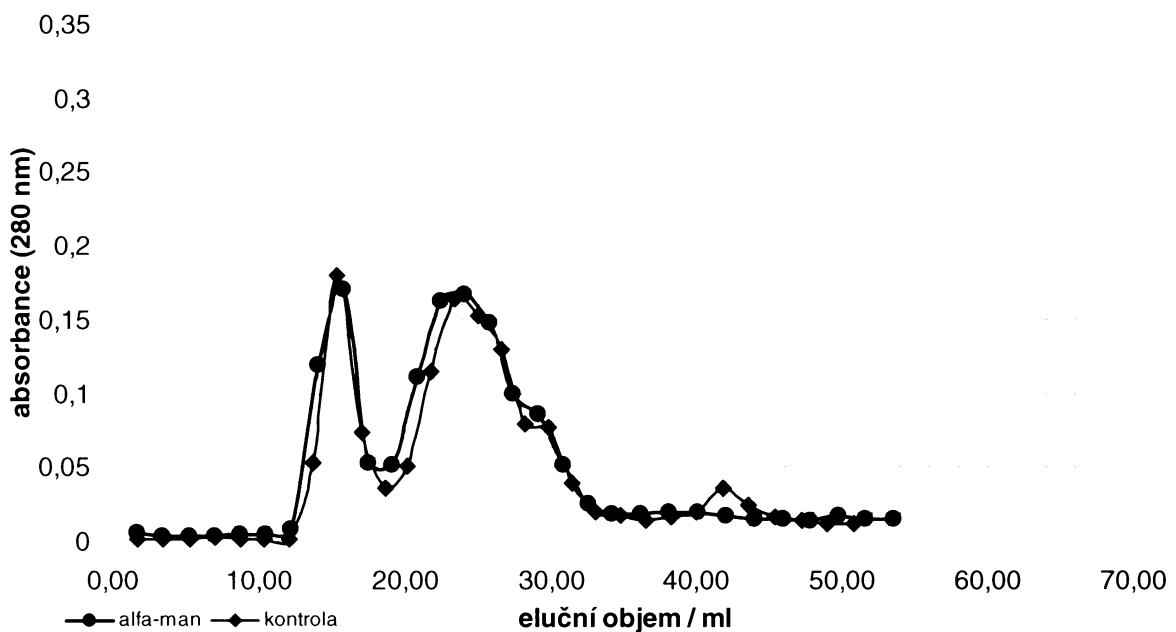
Obr. 3.6: graf závislosti absorbance na elučním objemu BSP po inkubaci s α -galaktosidasou a kontrolního vzorku (5 mg BSP v 0,5 ml PBS)

Na první pohled je patrný pík v rozmezí od \pm 5000 až do nízkomolekulární oblasti.



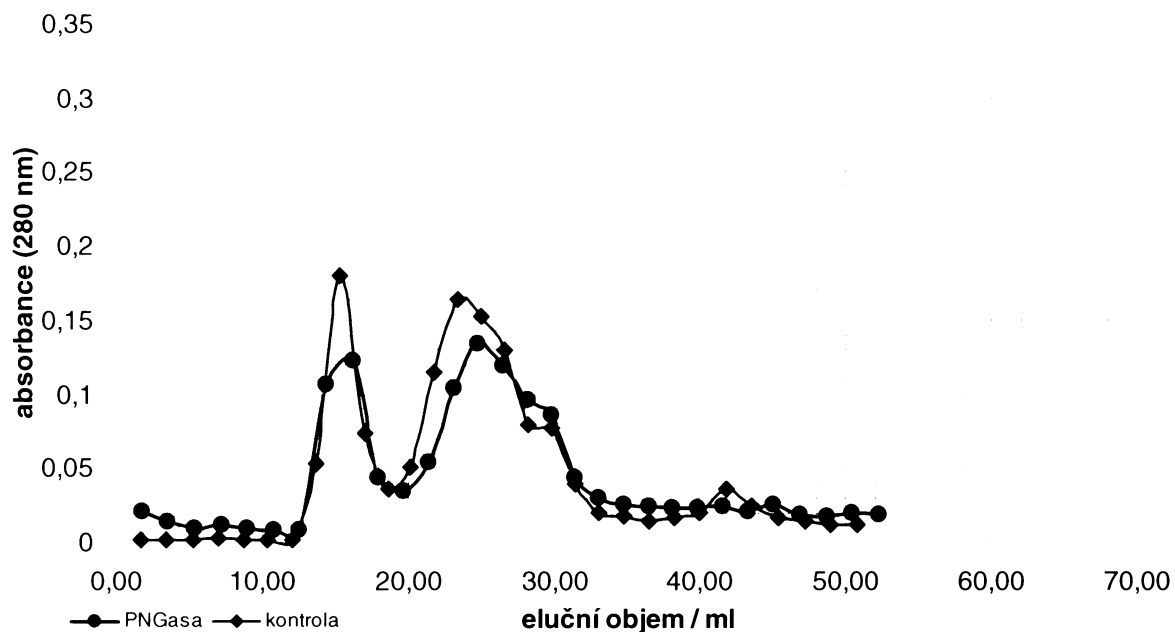
Obr. 3.7: graf závislosti absorbance na elučním objemu BSP po inkubaci s β -galaktosidasou a kontrolního vzorku (5 mg BSP v 0,5 ml PBS)

Zde není patrná žádná signifikantní odchylka od kontroly, pouze pík I se zmenšuje a rozšiřuje podobně jako u neuraminidasy (obr. 3.4). Pík IV je lehce rozmytý.



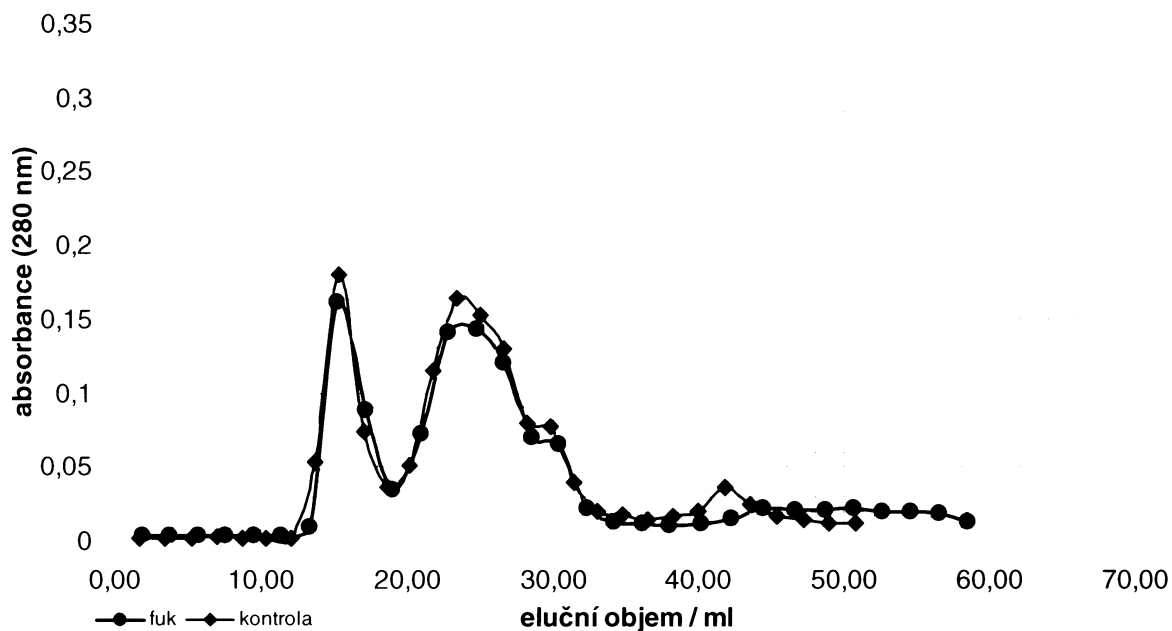
Obr. 3.8: graf závislosti absorbance na elučním objemu BSP po inkubaci s α -manosidasou a kontrolního vzorku (5 mg BSP v 0,5 ml PBS)

Na grafu je vidět, že zmizel pík IV.



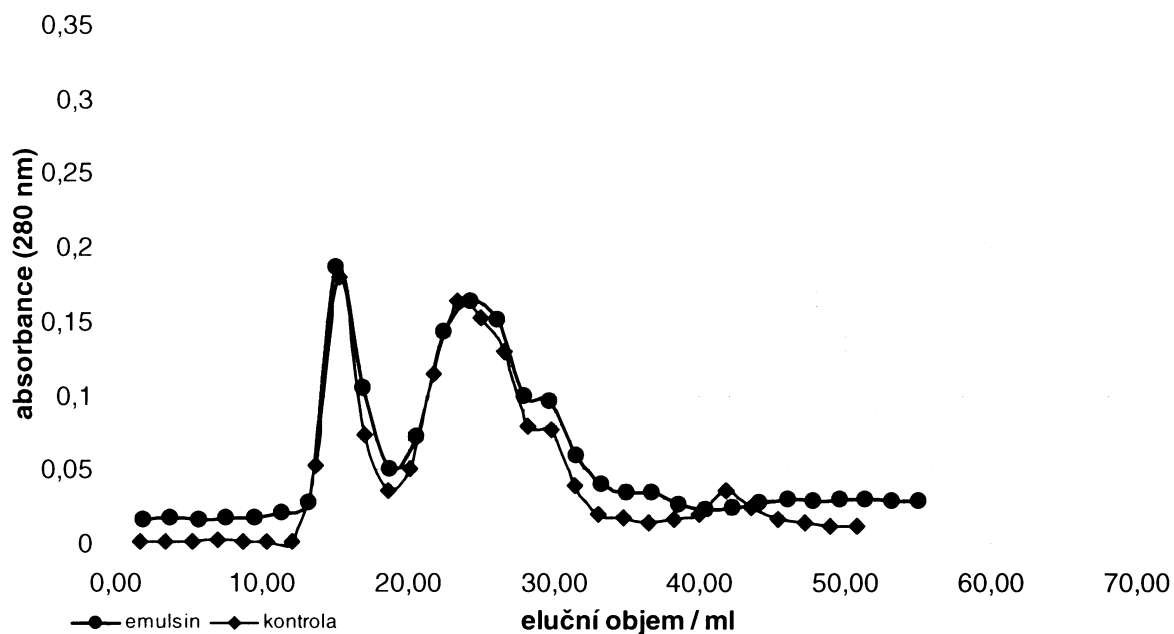
Obr. 3.9: graf závislosti absorbance na elučním objemu BSP po inkubaci s PNGasou F a kontrolního vzorku (5 mg BSP v 0,5 ml PBS)

Opět je možno pozorovat zmenšení píku I. Dále je patrný lehký posun píku II směrem k nižším hodnotám M_r a taktéž pík IV je poněkud rozmytý.



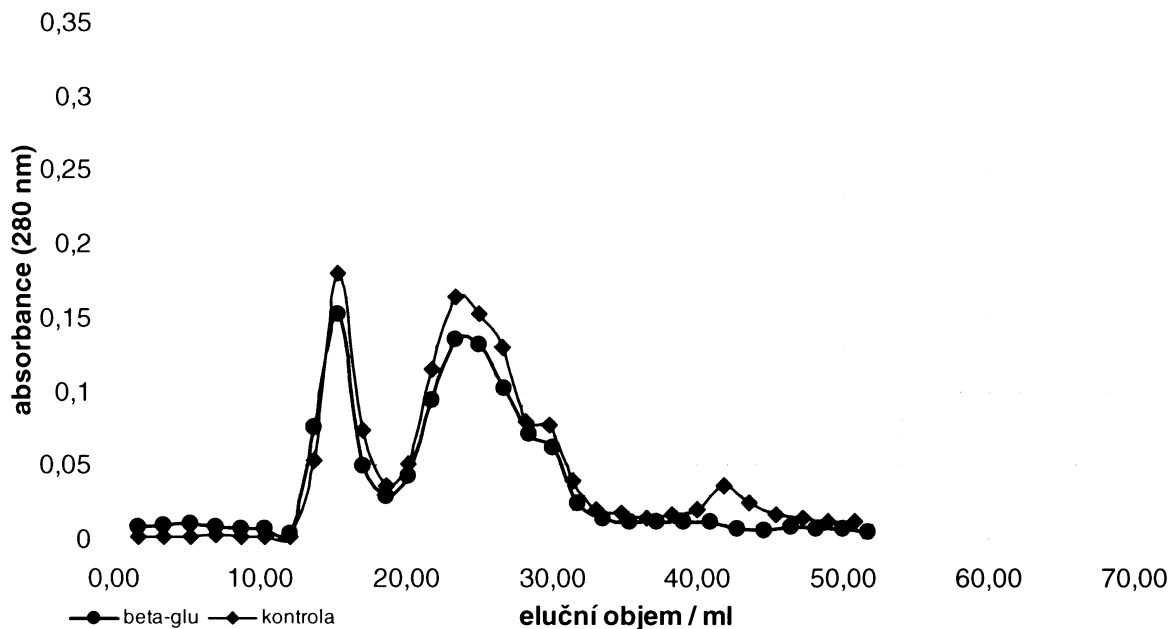
Obr. 3.10: graf závislosti absorbance na elučním objemu BSP po inkubaci s α -L-fukosidasou a kontrolního vzorku (5 mg BSP v 0,5 ml PBS)

Kromě poněkud rozmytého a posunutého píku IV se oba eluční grafy shodují.



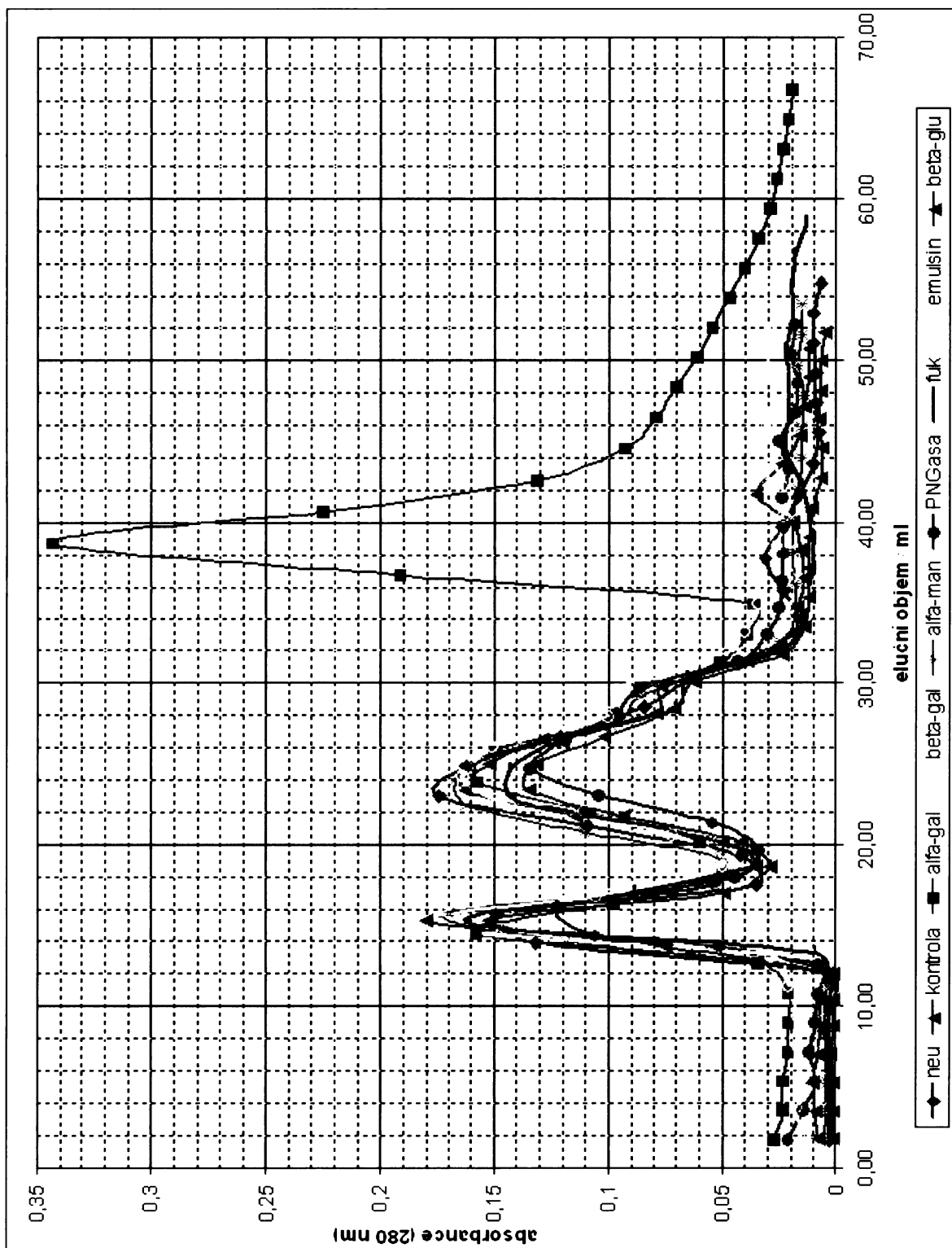
Obr. 3.11: graf závislosti absorbance na elučním objemu BSP po inkubaci s emulsinem a kontrolního vzorku (5 mg BSP v 0,5 ml PBS)

Je patrné rozmytí oblasti okolo píku IV.



Obr. 3.12: graf závislosti absorbance na elučním objemu BSP po inkubaci s β -glukosidasou a kontrolního vzorku (5 mg BSP v 0,5 ml PBS)

Na grafu můžeme pozorovat zmiizení píku IV.



Obr. 3.13: grafy vzorků BSP po inkubaci s glykosidasami + kontrolního vzorku (5 mg BSP v 0,5 ml PBS)

Z tohoto srovnání je patrné, že se eluční grafy jednotlivých vzorků podobají.

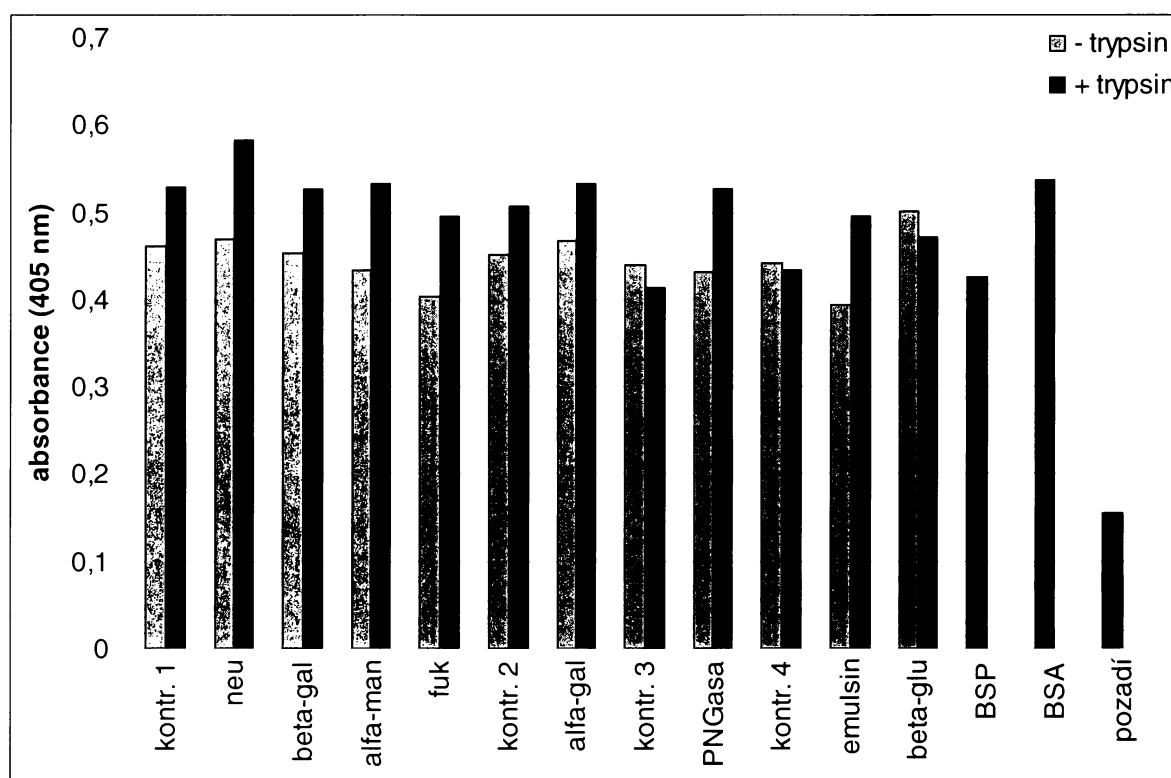
3.3. ELBA

Touto metodou byly zkoumány interakce BSP – BSP-biotin. Uspořádání metody bylo následující:

destička-BSA-GA-vzorek BSP-biotin-avidin-HPR

Tečky znázorňují interakci, uplatňující se při tvorbě agregátů (neboli BSP BSP). Na obr. 3.13 jsou ve sloupcovém diagramu zaznamenány průměrné hodnoty absorbancí jednotlivých vzorků, vyjadřující sílu interakce vzorku s biotinylovaným BSP.

Z diagramu je patrné, že tryptické štěpení proteinů BSP většinou posílí vazebné interakce, minimálně jsou však zhruba stejně silné. Nemodifikované BSP vykazuje spíše slabší interakci, zato BSA se zřejmě dobře váže na BSP.



Obr. 3.14: vzájemná interakce proteinů BSP v závislosti na jejich modifikaci

Modře jsou vyznačeny vzorky po inkubaci s glykosidasami, popř. jejich kontroly. Fialově jsou vyznačeny tytéž vzorky, štěpené trypsinem. BSA bylo navázáno místo modifikovaných proteinů, pozadí představuje interakci avidin-HPR s destičkou (do těchto jamek byla přidána pouze avidin-HPR a po promytí její substrát)

3.4. SDS-elektroforéza dle Laemmliho [44]

Frakce okolo píků I – III z gelové chromatografie byly odebírány a spojeny z několika elucí BSP. Poté byly zamrazeny a lyofilisovány. Takto lyofilisované frakce píků I – IV byly analyzovány pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS. Pík IV nebyl odebírán vzhledem k malému množství v eluci ($A < 0,05$) a vzhledem k nízkomolekulární oblasti, která by na elektroforeogramu nebyla příliš analyzovatelná. Vzorky byly nanášeny v množství 3 mg/ml po 10 μ l do každé jamky. Rozpuštěny byly v neredukujícím pufru. Spolu se těmito vzorky byl nanesen též vzorek BSP (tedy všech frakcí) a standardu lyozymu. Elektroforeogram je na obr. 3.15.



Obr. 3.15: rozdělení BSP pomocí SDS elektroforézy

I, II, III = frakce takto označených píků (viz obr. 3.3), pík IV nebyl analyzován vzhledem k malému množství této frakce v eluátu a nízkomolekulární oblasti, ve které je eluován;

St = standard (lyozym)

Šípkami jsou vyznačeny relativní molekulové hmotnosti standardu (mono, di, tri a tetrameru).

Všechny vzorky byly nanášeny v konc. 3 mg/ml v 10 μ l neredukujícího pufru.

Elektroforeogram na obr. 3.15 byl složen z kopií gelu – bylo tak provedeno za účelem názornosti a to pomocí srovnání standardů.

Po srovnání proteinových stop jednotlivých píků na elektroforeogramu s elučním grafem s vyznačenými Mr píků na obr. 3.4 (str. 31) je patrná shoda ve výsledcích.

V píku I ($> 100\ 000$) se objevují vysokomolekulární proteinové stopy, stejně tak jako výrazná koncentrace v okolí těsně nad monomerním lysozymem ($M_r = 14\ 500$). Zde se vyskytuje pravděpodobně převážná část proteinů BSP-A1-A3 (které tvoří majoritní část celkových proteinů semenné plazmy býka – viz oddíl 1.4.2.2) v agregovaných formách. Na elektroforeogramu proteinů býčí semené plazmy ve studii [29] se BSP-A1-A3 projevují právě v oblasti 15 – 16 kDa ($= M_r 15\ 000 - 16\ 000$), ačkoliv z jejich strukturní analýzy vyplývá M_r okolo 13 000, je tomu tak pravděpodobně v důsledku glykosylace, jež může ovlivnit pohyblivost v prostředí SDS [29]. Porovnáním dráhy píku III s elučním grafem na obr. 3.4 (z kterého vyplývá, že pík je eluován při $M_r 12\ 500$) je znát stejný posun jako ve studii [29] (neboť s na elektroforeogramu je zdánlivá M_r proteinů píku III okolo 14 500, taktéž je patrné, že je to jediná proteinová frakce v tomto píku přítomná).

V proteinové frakci píku III se zřejmě nachází monomery BSP A2, popř. A3, které jsou mnohem méně, resp. nejsou vůbec glykosylovány [29] a z tohoto důvodu mají nižší M_r (z výsledků stanovení obsahu neutrálních cukrů dle Dubois v glykoproteinech BSP vyplývá obsah asi 4,5 % hmot. – viz oddíl 3.1).

V proteinové frakci píku II se zřejmě nacházejí dimery PDC 109, a to asi spíše glykosylovaný BSP-A1. V dráze tohoto píku se rovněž nachází stopa $> 30\ 000$, která se neobjevuje nikde jinde. Z toho plyne, že se jedná o monomer (pík II na obr. 3.15 odpovídá $M_r \geq 30\ 000$), který netvoří agregáty (jinak by byl též v dráze píku I) a pravděpodobně se jedná o BSP-30 kDa.

4. Diskuse

Reprodukce, potažmo fertilizace je proces, složený z mnoha konsekvencních kroků, v řadě z nichž důležitou roli hrají proteiny semenné plazmy.

Proteiny býčí semenné plazmy se nativně vyskytují v ejakulátu ve svých agregovaných formách [29]. Studium těchto agregátů a mechanismu jejich tvorby je věnována předkládaná bakalářská práce. Literární rešerše nás vede k hypotéze, že mechanismy podílející se na tvorbě agregátů jsou možná založeny na rozpoznávání a vazbě sacharidových komponent jednotlivých agregátů. Tuto hypotézu jsme se pokusili potvrdit v naší práci deglykosylací komponent proteinové frakce býčí semenné plazmy a srovnáním takto modifikovaných preparátů s nativní semennou plazmou metodou gelové chromatografie.

Stupeň agregace proteinů býčí semenné plazmy byl při všech deglykosylačních experimentech (pomocí neuraminidasy, α -galaktosidasy, β -galaktosidasy, α -manosidasy, PNGasy F, α -L-fukosidasy, emulsinu a β -glukosidasy) srovnatelný s kontrolním vzorkem nativní semenné plazmy, některé deglykosylace (zvláště PNGasa) způsobují malé změny v distribuci mezi frakcemi agregátů získaných z gelové chromatografie (V rozmezí molekulových hmotností od 30 kDa do > 100 kDa). Zdálo by se tedy, že agregace proteinů býčí semenné plazmy je na jejich glykosylaci v podstatě nezávislá.

Naše další experimenty měly podpořit tuto myšlenku. Důkazem měla být ztráta schopnosti tvořit agregáty při rozrušení proteinové kostry komponent agregátů. Bylo provedeno tryptické štěpení a sledována schopnost tryptických štěpů vázat proteiny býčí semenné plazmy metodou ELISA. Získané výsledky ukázaly, že i trypticky upravený preparát neztrácí v žádném případě schopnost vazby ba naopak a tedy mechanismus vazby komponent do agregátu není závislý zcela na proteinové kostře.

Dovolujeme si tedy navrhnout možný mechanismus, který je částečně závislý na rozpoznání sacharidových komponent (a to pravděpodobně až od úrovně disacharidů a vyšší, protože žádná z (parciálních) enzymatických deglykosylací nevykazovala podstatné snížení schopnosti tvořit agregáty), a částečně také pravděpodobně na interakci hydrofobních struktur proteinové kostry.

Překvapivým výsledkem bylo, že účinkem α -galaktosidasy došlo k uvolnění nízkomolekulárních látek (M_r 2900) ze sloupce, do kterého jejich (patrně) agregované formy nebyly zřejmě schopny vstoupit a nahromadily se v průběhu řady předchozích chromatografií s preparáty semenné plazmy. O identitě těchto uvolněných nízkomolekulárních látek se

prozatím neopovazujeme spekulovat.

Studium agregátů a mechanismu jejich tvorby se ukazuje být důležitou součástí komplexního pohledu na problematiku fertilizace. Tato práce dále prohloubila naše poznání studované problematiky a ukázala další možné směry výzkumu.

Závěr:

- Byly provedeny gelové chromatografie býčí semenné plazmy a parciálně specificky deglykosylovaných preparátů býčí semenné plazmy. Jednotlivé chromatogramy byly vzájemně porovnány.
- Byla provedena SDS elektroforéza frakcí, získaných gelovou chromatografií. Bylo prokázáno, že vysokomolekulární frakce ($M_r > 50\,000$) jsou tvořeny agregáty.
- Bylo provedeno tryptické štěpení preparátů býčí semenné plazmy.
- Byla provedena metoda ELBA, kterou jsme sledovali význam terminálních sacharidových zbytků pro míru interakce s proteiny nativní semenné plazmy.

Seznam použitých zkratek

AA	- akrylamid
ABTS	- 2,2'-azino-bis(2-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
APS	- persíran amonný
Avidin-HRP	- avidin značený křenovou peroxidasou
Bis AA	- N, N'-metylen-bisakrylamid
BSP	- proteiny býčí semenné plazmy ⁷
BSA	- hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumin)
CBB	- Coomassie Brilliant Blue R-250
DMF	- N, N-dimethylformamid
ELBA	- z angl. Enzyme-Linked Binding Assay
GAG	- glykosaminoglykany
H ⁺ , H ⁻	- frakce proteinů býčí semenné plazmy vázající, resp. nevazající heparin
NHS-biotin	- N-hydroxysukcinimidobiotin
PBS	- fosfátem tlumený fyziologický roztok (z angl. Phosphate-Buffered Solution)
PLA ₂	- fosfolipasa A ₂
SDS	- dodecylsulfát sodný
TEMED	- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
Tris	- tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

⁷ Krom proteinů je v této směsi přítomna řada nízkomolekulárních látek (původem ze semenné plazmy); touto zkratkou bývají též v literatuře kolektivně označovány 4 majoritní kyselé proteiny býčí semenné plazmy (BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3, BSP-30 kDa) [29].

Seznam literatury

- [1] Romanovský A. a kol.: Obecná biologie, nakladatelství SPN, Praha, 1985
- [2] Yanagimachi R.: Mammalian Fertilization, Thy Physiology of Reproduction, 2nd edition (Knobil E., Neill J.D., eds), Raven Press, Ltd., New York , 1994
- [3] Šmerha a kol.: Biologie rozmnožování hospodářských zvířat, SZN, Praha, 1964
- [4] Turman E. J., Rich T. D., Cow-Calf Management Guide, 2nd edition, Western Beef Resource Committee, 2002
- [5] Verbeckmoes S., Van Soom A., Dewulf J., De Pauw I., De Kruif A.: *Reprod. Domest. Anim.* 2004; 39, 410-416
- [6] <http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/chap6.html> (aktuální ke dni 1. 8. 2007)
- [7] Holstein A. F., Schulze W., Davidoff M.: *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003; 1, 107
- [8] Yanagimachi R.: The Spermatozoon, Thy Physiology of Reproduction, 2nd edition (Knobil E., Neill J.D., eds), Raven Press, Ltd., New York , 1994
- [9] Dacheux J.L., Gatti J.L., Dacheux F.: *Microsc. Res. Tech.* 2003; 61, 7-17
- [10] Toshimori K.: *Microsc. Res. Tech.* 2004; 61, 1-6
- [11] Saez F., Frenette G., Sullivan R.: *J. Androl.* 2003; 24, 149-154
- [12] Jaiswal B. S., Eisenbach M.: *Capacitation, Fertilization* (Hardy D. M. ed), Academic Press Inc., San Diego, 2002
- [13] Lane M.-E., Thérien I., Moreau R., Manjunath P.: *Biol. Reprod.* 1999; 60, 169-175
- [14] Suarez S.S.: *Regulation of Sperm Transport in the Mammalian Oviduct. In the Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications*, 1st edition (Gagnon G., ed), Cache River Press, Vienna, 1999
- [15] Serrano, H., Garcia-Suarez D.: *Asian J. Androl.* 2001; 3, 243-249
- [16] Bahat A., Eisenbach M.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 2006; 252, 115-119
- [17] Eisenbach M.: *Dev. Genet.* 1999; 25, 87-94
- [18] Evans J. P., Florman H. M.: *Nature Cell Biol.* 2002; 4, 557-563
- [19] Manjunath P., Soubeyrand S., Chandonnet L., Kenneth D. Roberts K. D.: *Biochem. J.* 1994; 303, 121-128
- [20] Evans J. P.: *Hum. Reprod. Update* 2002; 8, 297-311
- [21] Poiani A.: *Behav. Ecol. Sociobiol.* 2006; 60, 289-310
- [22] Thomas J. C., Anbazhagan V., Ramakrishnan M., Sultan N., Surolia I., Swamy M. J.: *Biophys. J.* 2003; 84, 3037-3044
- [23] Swamy M. J.: *Curr. Sci.* 2004; 87, 203-211

- [24] San Agustín J. T., Hughes P., Lardy H. A.: FASEB J. 1987; 1, 60-66
- [25] Kelly V. C., Kuy S., Palmer D. J., Xu Z., Davis S. R., Cooper G. J.: Proteomics 2006, 6, 5826–5833
- [26] Ford W. C. L.: Hum. Reprod. Update 2004; 10, 387-399
- [27] Stefanov R., Krumova E., Angelova M., Dolashka P., Voelter W., Zachariev Z.: World J. Zool. 2006; 1, 36-39
- [28] Jeliíková P., Ryšlavá H., Liberda J., Jonáková V., Tichá M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 2004; 69, 616-630
- [29] Manjunath P., Sairam M. R.: Biochem. J. 1987; 241, 685-692
- [30] Gerwig G. J., Calvete J. J., Töpfer-Petersen E., Vliegthart J. F. G.: FEBS Lett. 1996; 387, 99-100
- [31] Liberda J., Kraus M., Ryšlavá H., Vlasáková M., Jonáková V., Tichá M.: Folia Biol. (Praha) 2001; 47, 113-119
- [32] Liberda J., Tichá M., Zralý Z., Švecová D., Věžník Z.: Folia Biol. (Praha) 1998; 44, 177-183
- [33] Tannert A., Kurz A., Erlemann K. R., Müller K., Herrmann A., Schiller J., Töpfer-Petersen E., Manjunath P., Müller P.: Eur. Biophys. J. 2006; 36, 461-475
- [34] Ignatz G. G., Lo M. C., Perez C. L., Gwathmey T. M., Suarez S. S.: Biol. Reprod. 2001; 64, 1806-1811
- [35] Gwathmey T. M., Ignatz G. G., Suarez S. S.: Biol. Reprod. 2003; 69, 809-815
- [36] Gwathmey T. M., Ignatz G. G., Mueller J. L., Manjunath P., Suarez S. S.: Biol. Reprod. 2006; 75, 501-507
- [37] Liberda J., Ryšlavá H., Jelínková P., Jonáková V., Tichá M.: J. Chromatogr. B. 2002; 780, 231-239
- [38] Sánchez-Luengo S., Aumüller G., Albrecht M., Sen P. C., Röhm K. H., Wilhelm B.: J. Androl. 2004; 25, 234-244
- [39] <http://nongae.gsnu.ac.kr/~spark/teaching/chap2.html> (aktuální ke dni 1. 8. 2007)
- [40] Eskiocak S., Gozen A. S., Yapar S. B., Tavas F., Kilic A. S., Eskiocak M.: Hum. Reprod. 2005; 20, 2595-2600
- [41] Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F.: Anal. Chem. 1956; 18, 350-356
- [42] Šebánková S., Karpenko V., Entlicher G.: Gen. Physiol. Biophys. 1999; 18, 371-386
- [43] Liberda J., Jonáková V., Tichá M.: Biotechnol. Techn. 1997; 11, 265-267
- [44] Laemmli, U.K.: Nature 1970; 227, 680-685