

3135

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Nina Davidová

**Studium inhibitorů proteinas samčího  
reprodukčního traktu**

školitelé:

RNDr. Pavla Maňásková, Ph.D.  
Doc. RNDr. Věra Jonáková, DrSc.

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Pavly Maňáskové, Ph.D. a Doc. Věry Jonákové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Praha, 4. května 2007

.....  
místo a datum



.....  
podpis

Na tomto místě bych chtěla ze srdce poděkovat svým školitelkám RNDr. Pavle Maňáskové, Ph.D. a Doc. Věře Jonákové, DrSc. za maximální podporu a cenné rady při řešení diplomové práce i za jejich trpělivost a toleranci.

Také bych ráda poděkovala rodině a všem svým nejbližším za pochopení, podporu, pomoc a péči. Speciální díky patří Lence Ottové a Amadou.

## Obsah

Seznam zkratk .....	4
1. Úvod .....	6
1.1. Samčí pohlavní buňky .....	6
1.1.1. Vývoj .....	6
1.1.2. Stavba spermie .....	6
1.1.3. Zrání spermie .....	8
1.1.4. Ejakulace .....	10
1.1.5. Proteiny semenné plasmy .....	11
1.1.6. Ovidukální rezervoár .....	12
1.1.7. Kapacitace spermií .....	12
1.2. Samičí pohlavní buňky .....	13
1.2.1. Oplodnění .....	13
1.3. Proteinasy a jejich inhibitory v reprodukčním traktu .....	15
1.3.1. Proteinasy akrosomu .....	15
1.3.2. Proteinasy testes .....	16
1.3.3. Proteinasy epididymu .....	16
1.3.4. Proteinasy semenné plasmy .....	16
1.4. Inhibitory proteinas v samčím reprodukčním traktu .....	17
1.4.1. Inhibitory proteinas v testes <sup>55</sup> .....	17
1.4.2. Inhibitory proteinas v epididymis .....	18
1.4.3. Inhibitory proteinas semenné plasmy .....	18
1.5. Významné proteinasy a jejich inhibitory v samčím reprodukčním traktu .....	19
1.6. Cíl práce .....	26
2. Materiál a metody .....	27
2.1. Materiál .....	27
2.1.1. Chemikálie .....	27
2.1.2. Biologický materiál .....	29
2.2. Gelová chromatografie kančí epididymální tekutiny na Sephadexu G-75 M .....	30
2.3. Stanovení aktivity serinových proteinas a inhibitorů proteinas trypsinového typu .....	30
2.4. Afinitní chromatografie na G-protein Sepharose .....	31
2.5. Separace frakcí s inhibiční aktivitou pomocí HPLC .....	31
2.6. Měření koncentrace proteinů ve frakcích po HPLC (Bio-Rad Protein Assay) .....	32
2.7. Elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného SDS-PAGE (diskontinuální elektroforéza dle Laemmliho) .....	32
2.7.1. Vizualizace proteinů v gelu pomocí barvení Coomassie Blue .....	34

2.7.2.	Vizualizace proteinů v gelu pomocí barvení stříbrem .....	34
2.8.	2D-elektroforéza .....	35
2.9.	Přenos proteinů rozdělených SDS-elektroforézou na PVDF-membránu a NC-membránu .....	35
2.10.	Imunodetekce proteinů na membráně pomocí polyklonální protilátky .....	36
2.11.	Zymografická detekce proteinas v kančí epididymální tekutině .....	36
2.12.	Reversní zymografie pro detekci inhibitorů akrosinu a metaloproteinasy MMP-9 .....	37
2.13.	Izolace RNA .....	38
2.14.	Izolace proteinů z tkání .....	38
2.15.	Detekce genové exprese .....	39
2.15.1.	Syntéza cDNA .....	39
2.15.2.	Polymerázová řetězová reakce .....	40
2.15.3.	Agarosová elektroforéza .....	40
2.16.	Imunofluorescence .....	41
2.16.1.	Zpracování kančích spermií .....	41
2.17.	Stanovení N-terminální aminokyselinové sekvence .....	42
3.	Výsledky .....	43
3.1.	Gelová chromatografie kančí epididymální tekutiny .....	43
3.2.	SDS-PAGE frakcí po gelovou chromatografií .....	44
3.3.	Detekce proteolytické aktivity frakcí EF1 a EF2 pomocí substrátové zymografie .....	44
3.4.	Detekce inhibitorů akrosinu a MMP-9 ve frakcích EF3 a EF4 pomocí reversní substrátové zymografie .....	46
3.5.	Přečištění polyklonální protilátky anti-INH na G-protein Sepharose .....	47
3.6.	Imunodetekce inhibitoru akrosinu ve frakcích po gelové chromatografii .....	48
3.7.	Proteinová charakterizace frakcí po gelové chromatografii epididymální tekutiny s inhibiční aktivitou .....	50
3.7.1.	2D-elektroforéza frakcí EF3 a EF4 .....	50
3.7.2.	RP HPLC frakcí EF3 a EF4 a jejich další charakterizace pomocí SDS-PAGE .....	51
3.7.3.	Detekce inhibitorů MMP-9 a akrosinu frakcí EF3 a EF4 rozdělených HPLC pomocí reversní substrátové zymografie .....	54
3.7.4.	Detekce inhibitoru akrosinu v jednotlivých frakcích EF3 a EF4 po HPLC pomocí polyklonální protilátky .....	57
3.8.	Expresse genu pro inhibitor ze semenné plasmy (INH) v kančích reprodukčních orgánech .....	58
3.9.	Imunodetekce inhibitoru akrosinu v proteinových extraktech kančích reprodukčních orgánů .....	58

3.10.	Detekce inhibitoru akrosinu pomocí nepřímé imunofluorescence .....	60
3.10.1.	Imunofluorescence na řezech kančích reprodukčních orgánů .....	60
3.10.2.	Imunolokalizace na kančích spermích .....	61
3.11.	Stanovení N-terminální aminokyselinové sekvence .....	62
4.	Diskuse .....	63
5.	Souhrn výsledků .....	66
6.	Literatura .....	67

## Seznam zkratek

ACN	acetonitril
ADAM	z angl. a disintegrin and metalloproteinase domain
anti-INH	polyklonální protilátka proti inhibitoru (INH) akrosinu izolovanému z kančí semenné plasmy
APS	persíran amonný
AQN	spermadhesin z heparin-vázající frakce (Ala-Glu-Asn)
AWN	spermadhesin z heparin-vázající frakce (Ala-Trp-Asn)
BIS	N,N'-methylen-bisakrylamid
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumine)
CBB	Coomassie Brilliant Blue R 250
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DMF	dimethylformamid
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
DTT	dithiotreitol
EF	z angl. epididymal fluid
FITC	fluorescein isothiokyanát
GPI	glykosylphosphatidyl inositol
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonium]-1-propylsulfonát
Ig	imunoglobulin
INH	inhibitor akrosinu izolovaný z kančí semenné plasmy
MMP	matrix metaloproteinase
Mr	relativní molekulová hmotnost
NC-membrána	nitrocelulósová membrána
PBS	fyzilogický roztok tlumený fosfátem (z angl. Phosphate-Buffered)
PCI	protein C inhibitor
PSA	specifický prostatický antigen
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	z angl. polyacrylamide gel electroforesis, s použitím dodecylsulfátu sodného
SwAR/Px	prasečí imunoglobuliny proti králičím imunoglobulinům značené peroxidázou (Swine Anti-Rabbit IgG with conjugated Peroxidase)
PCR	z angl. polemerase chain reaction
PVDF-membrána	polyvinylidendifluoridová membrána
RP HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie s reversní fází (z angl.

Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography)

TIMP	z angl. tissue inhibitor of metalloproteinase
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenethylendiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminoethan



## 1. Úvod

Rozmnožování je jedním ze základních projevů živých organismů. Při pohlavním rozmnožování se vytvářejí specializované pohlavní buňky s haploidním počtem chromosomů, které splynutím vytvoří diploidní zygotu jako počátek nového jedince. Pohlavní buňky jsou vysoce specializované a procházejí několika vývojovými stádii než jsou schopny dát vznik novému jedinci.

### 1.1. Samčí pohlavní buňky

#### 1.1.1. Vývoj

Samčí pohlavní buňky, spermie, se vyvíjejí z diploidních buněk (spermatogonií) procesem zvaným spermatogenezí<sup>1</sup>. Spermatogenezí je dlouhý, ale systematický proces, během kterého jsou v testes produkovány spermie<sup>2</sup>. Vývoj spermií lze rozdělit do tří období, a to:

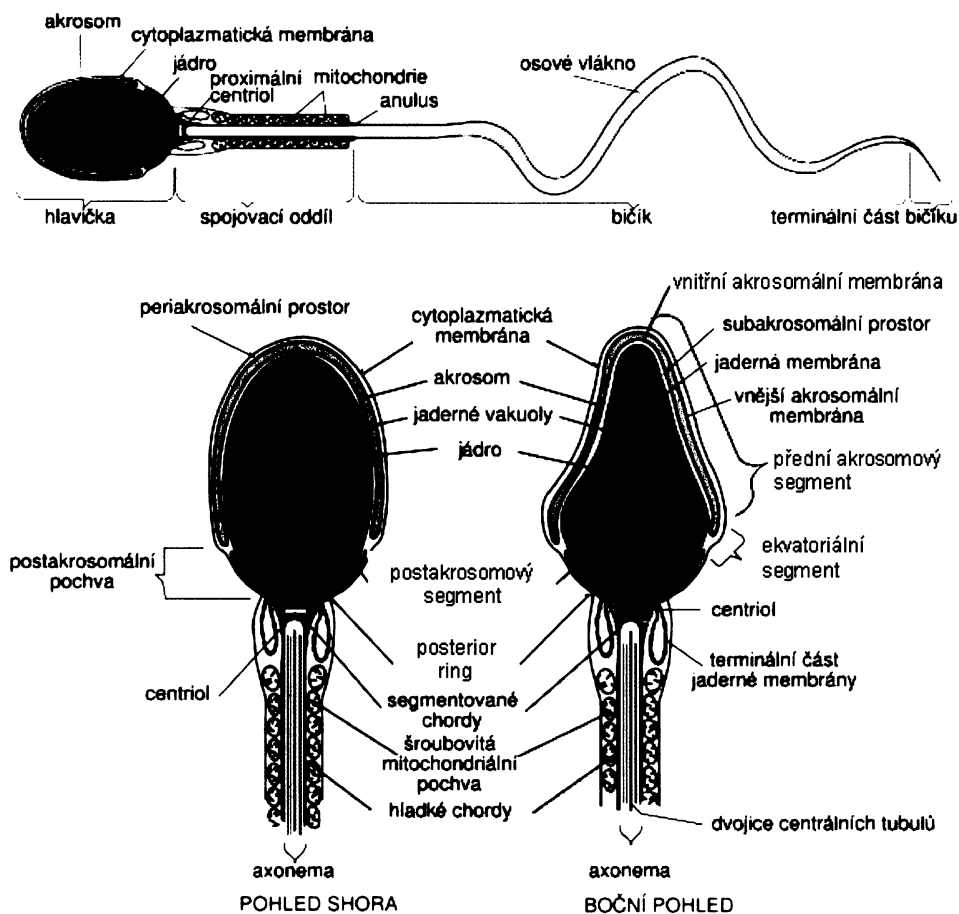
- fáze rozmnožovací
- fáze růstová
- fáze zrání

V rozmnožovací fázi dochází k mitotickému dělení zárodečných buněk (spermatogonií), které jsou uloženy na okraji semenotvorných kanálků. V růstové fázi spermatogonie zvětšují objem cytoplazmy a stávají se primárními spermatocyty. Ve fázi zrání prodělávají primární spermatocyty meiosis (redukční dělení), při kterém dochází k redukci celkového počtu chromosomů a vzniku dvou haploidních sekundárních spermatocytů. Ty se dále mitoticky dělí za vzniku čtyř spermatid. Tyto spermatidy dále procházejí dějem zvaným spermateliosou, při němž prodělávají řadu morfologických změn a získávají definitivní tvar. Tvar spermií se liší dle živočišného druhu. Spermateliosou zahrnuje děje jakými jsou zahušťování jádra, chromosomy se stávají zcela neaktivními, jádro se celkově zmenšuje a mění tvar, cytoplazma je z velké části odvrhována, tvoří se akrosom a bičík<sup>3</sup>.

#### 1.1.2. Stavba spermie

Spermie se dělí na dvě základní části, a to hlavičku a bičík (obr. 1.1, str. 7). Bičík se skládá ze souboru mikrotubulů obalených hustými vlákny, která jsou v střední části bičíku obklopeny souborem spirálovitě stočených mitochondrií<sup>3</sup>. Hlavička je tvořena jádrem se silně kondenzovaným chromatinem, akrosomem, cytoskeletárními strukturami a malým množstvím cytoplazmy.

Akrosom je velká sekreční granule typická pro spermii obalená vnitřní a vnější akrosomální membránou. Tyto dvě membrány hrají během oplodnění odlišné role. Uvnitř akrosomu je velké množství hydrolytických enzymů nezbytných k oplodnění vajíčka *in vivo*. Cytoskeletární struktury v hlavičce savčích spermií jsou složeny z unikátních proteinů nebo isoform cytoskeletárních proteinů specifických pro spermatogonidní buňky. Hrají pravděpodobně důležitou roli pro definitivní formování hlavičky savčích spermií a napomáhají pronikání spermie obalem vajíčka během oplodnění. Na postakrosomálním segmentu hlavičky spermie byly nalezeny  $\beta$ -tubulinové epitopy, jejichž změny během akrosomové reakce naznačují, že tubulin se účastní funkčního uspořádání hlavičky spermie a mohl by hrát určitou roli ve fertilizaci<sup>4</sup>. Unikátním rysem spermií je rozdělení jejich plasmatické membrány do definovaných domén lišících se složením i funkcí. Hlavičku lze rozdělit na dva základní segmenty – akrosomální a postakrosomální. Akrosomální část lze dále dělit na přední (anterior) akrosomový segment (oblast hlavičky nad akrosomem) a ekvatoriální segment<sup>5</sup>. Akrosomová oblast je důležitá při primární vazbě spermie na vajíčko, ekvatoriální a postakrosomální oblast hraje důležitou roli při fúzi membrány spermie s vajíčkem<sup>3</sup>.



obr. 1.1 Stavba savčí spermie<sup>6</sup>

### 1.1.3. Zrání spermie

Savčí spermie po opuštění testes nejsou schopny oplodnit vajíčko. Tuto schopnost získávají až při průchodu epididymem (nadvarletem). Epididymální maturace je proces, při němž spermie získávají schopnost se pohybovat, rozpoznat a vázat *zona pellucida* vajíčka a následně s vajíčkem splynout<sup>7</sup>. Epididymis je párový orgán tvořený dlouhým bohatě stočeným kanálkem, který spojuje rete testis s chámovodem (vas deferens) (obr. 1.2, str. 9). Je tvořen dvěma hlavními kompartmenty, a to epiteliálními buňkami a vlastní dutinou orgánu (lumen)<sup>8</sup>. Epitel vytváří dlouhé mikroklky, které zvětšují povrch pro případnou interakci spermií s komponentami lumen epididymis<sup>9</sup>. Lumen je vyplněn tekutinou, která je sekrečním produktem epiteliálních buněk a jejíž složení se konstantně a dramaticky mění podél celého orgánu. Při průchodu epididymem mohou spermie interagovat s malými membránovými váčky, které se nazývají epididysomy, jež jsou specifickými sekrečními kompartmenty jednotlivých segmentů epididymu. Proteiny z těchto váček se začleňují do plasmatické membrány spermie<sup>10</sup>.

V epididymální tekutině bylo charakterizováno velké množství proteinů z různých regionů. Přítomné proteiny pocházejí jednak z rete testis, které spojuje testes s proximální částí epididymu, dále se jedná o sekreční produkty epiteliálních buněk epididymu, produkty proteolýzy v rámci epididymální tekutiny a také případné produkty metabolismu samotných spermií. Většina proteinů v epididymu je však sekrečním produktem epididymu<sup>11</sup>.

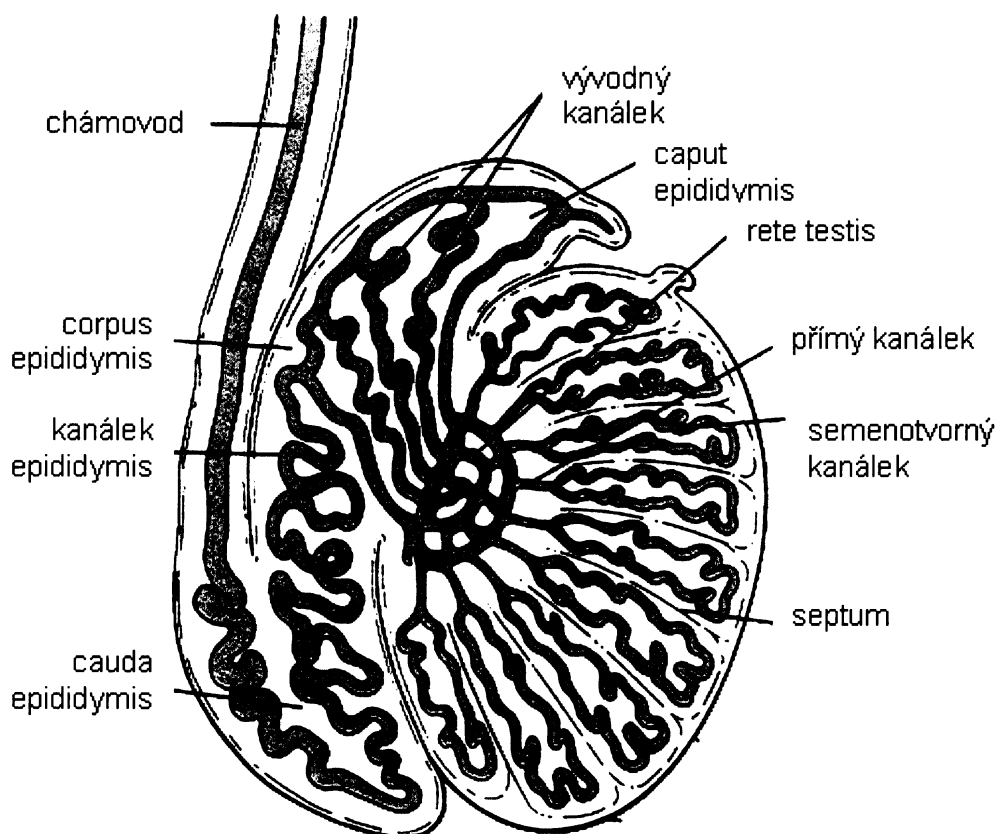
Mezi proteiny přítomné v epididymální tekutině patří např. clusterin, glutathion, peroxidasa, laktoferrin, EP4,  $\alpha$ -manosidasa, prokatepsin L a další<sup>11</sup>. Vyskytují se zde různé enzymy, a to proteiny, glukosidasy, glukosaminidasy a glykosyltransferasy<sup>12</sup>. Další látky obsažené v epididymální tekutině jsou např. L-karnitin, taurin, dihydrosteron, ionty, kyselina sialová, D-fruktosa apod.

Epididymis tak vytváří vysoce specifické prostředí izolované od krevního řečiště. Toto prostředí má svoji specifickou teplotu, pH, tenzi kyslíku, iontové složení a další fyzikálně-chemické vlastnosti nezbytné pro zrání spermií<sup>13</sup>. Epididymis se dělí na několik segmentů. Hlavními jsou caput epididymis (hlava nadvarlete), corpus epididymis (tělo nadvarlete) a cauda epididymis (ocas nadvarlete) (obr. 1.2, str. 9). Spermie zůstávají v epididymu několik dní až týdnů (dle druhu)<sup>3</sup> a prodělávají řadu změn. Postupně se mění proteinové složení jejich plasmatické membrány. V prvním řadě jsou nahrazeny některé proteiny pocházející z testes proteiny nově sekretovanými epiteliálními buňkami epididymu. Některé proteiny jsou vázány GPI kotvou v plasmatické membráně spermie<sup>14,15</sup>, jiné jsou integrálními proteiny membrány nebo jsou zabudovávány do intracelulárních struktur spermií<sup>16</sup>.

Domény plasmatické membrány spermii jsou přetvářeny degradací příp. uvolněním složek testikulárního původu, jiné proteiny jsou adsorbovány, příp. zabudovávány do plasmatické membrány. Dále dochází k enzymatickým úpravám povrchu spermii jako např. glykosylaci a deglykosylaci určitých proteinů<sup>17</sup>. Zvyšuje se negativní náboj membrány spermie a dochází k dramatickým změnám v lektin-vázajících vlastnostech spermie<sup>3</sup>.

Během maturace v epididymu dochází nejen ke změnám na vnější plasmatické membráně, ale i ke změnám jiných komponent spermie. Mění se distribuce antigenů na vnější akrosomové membráně<sup>18</sup>, což naznačuje přípravu akrosomové membrány spermie pro začátek akrosomové reakce. Dále dochází k modifikacím proteinů v akrosomu<sup>19</sup>, postupně jsou zesíťovávány jaderné proteiny (protaminy)<sup>20</sup> a vláknité proteiny bičíku disulfidovými vazbami<sup>21</sup>. Jádro spermie i bičík se tak stávají rigidnější, a tak je pozdější průnik spermie dosti tuhou *zona pellucida* vajíčka mnohem snazší<sup>21</sup>.

Spermie opouštějící nadvarle jsou schopné aktivního pohybu a jsou schopné *in vitro* oplodnit vajíčko. Úplnou fertilizační schopnost *in vivo* však získávají spermie až po ejakulaci a po následném průchodu samičím pohlavním traktem<sup>22</sup>.

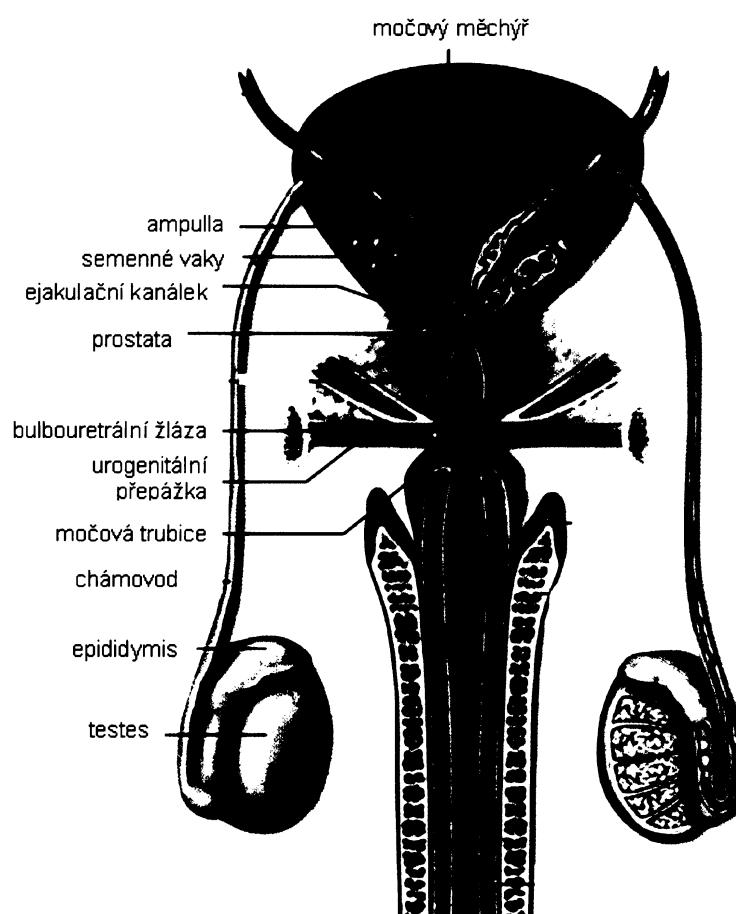


obr. 1.2 Stavba savčího epididymu<sup>23</sup>

#### 1.1.4. Ejakulace

Při ejakulaci spermie opouštějí cauda epididymis a putují chánovodem do močové trubice a vně samčí pohlavní trakt. Před ejakulací se spermie mísí se semennou plasmou, která je produktem přídatných pohlavních orgánů. Semenná plasma je tvořena sekrety semenných vaků, prostaty, Cowperových a Literových žláz a v malé míře i sekrety epididymu a chánovodu (obr. 1.3). Semenná plasma obsahuje vysoké koncentrace důležitých látek jako jsou prostaglandiny, D-fruktosa, kyselina citrónová, fosforylcholin, cholesterol, polyaminy, volné aminokyseliny, ionty draslíku a zinku a vysoké koncentrace proteinů<sup>24</sup>.

Při ejakulaci opět dochází ke změnám na plasmatické membráně spermií. Na povrch spermie se váží komponenty semenné plasmy a membrána se tak stává rigidnější a hůře podléhá akrosomové reakci<sup>3</sup>. Toto může být jeden z důvodů, proč epididymální spermie mají vyšší schopnost oplodnit zralé vajíčko než spermie ejakulované. Mění se také náboj plasmatické membrány, schopnosti vázat lektiny a lipidové složení<sup>8</sup>.



obr. 1.3 Stavba savčího samčího pohlavního traktu<sup>25</sup>

### 1.1.5. Proteiny semenné plasmy

Semenná plasma obsahuje komponenty pocházející z přídatných pohlavních žláz. Vedle nízkomolekulárních látek jsou v ní přítomny i proteiny, které jsou produkovány převážně semennými vaky a prostatou. Některé z těchto proteinů se při ejakulaci vážou na povrch spermie a mohou se účastnit dalších kroků fertilizačního procesu. V semenné plasmě býků, prasat a hřebců byly nalezeny proteiny patřící do rodiny spermadhesinů a proteiny mající ve své molekule fibronektinovou doménu. Tyto proteiny jsou obsaženy v semenné plasmě ve velkém množství a byly již dobře charakterizovány.

Kančí spermadhesiny (AQN, AWN – označené podle prvních tří aminokyselin ve své N-koncové proteinové sekvenci a PSP – z angl. porcine seminal plasma) tvoří hlavní proteinový podíl semenné plasmy (80%). Jsou to bazické (pI~8.0) glykoproteiny a jejich molekulová hmotnost je 12 000 – 16 000<sup>26</sup>. Spermadhesiny strukturně patří do superrodiny vývojově řízených proteinů s CUB doménou. V býčí semenné plasmě byl charakterizován protein aSFP (acidic seminal fluid protein), jehož aminokyselinová sekvence je s kančími spermadhesiny z 50% identická<sup>27</sup>. Dále byl izolován z býčí semenné plasmy spermadhesin Z13 tvořící dimer o molekulové hmotnosti 26 000. Z13 je složen ze 116 aminokyselin a jeho primární struktura je z 53% podobná kyselému aSFP spermadhesinu<sup>28</sup>. Také v hřebčí semenné plasmě byl nalezen protein příbuzný kančím spermadhesinům a byl popsán jako protein HSP-7, jehož primární struktura je z 98% identická s AWN spermadhesinem<sup>29</sup>.

Dominantní proteiny přítomné v býčí a hřebčí semenné plasmě (PDC-109, BSP-A3 a BSP-30K) mají strukturu zcela odlišnou od spermadhesinů a ve své molekule obsahují dvě fibronektinové domény typu II a jsou O-glykosylované v N-koncové oblasti<sup>30</sup>. Z hřebčí semenné plasmy byl pak izolován protein HSP-1, který je složen ze 121 aminokyselin. Má obdobnou strukturu jako býčí proteiny<sup>31,32</sup>. V kančí semenné plasmě byl nalezen DQH (pB1) protein se strukturou příbuznou dominantním proteinům býčí a hřebčí semenné plasmy<sup>33,34,35</sup>.

Proteiny obsažené v semenné plasmě jsou při ejakulaci adherovány na povrch spermií. Tyto proteiny vykazují řadu vazebných schopností s různými ligandy, jakými jsou sacharidy, sulfatované glykosaminoglykany, fosfolipidy a proteinasové inhibitory, což naznačuje, že se tyto proteiny mohou účastnit různých kroků fertilizace. Mohou hrát roli při tvorbě proteinového pokryvu spermie, při kapacitaci a primární vazbě spermie na vajíčko<sup>36</sup>.

### 1.1.6. Oviduktální rezervoár

Při putování samičím reprodukčním traktem jsou spermie zachyceny v isthmické části vejcovodu pomocí interakce se sacharidovými strukturami epitele oviduktu. Takto zachycené spermie tvoří tzv. oviduktální rezervoár, který je umožněn interakcí proteinového povrchu spermií s glykokonjugáty oviduktálního epitele<sup>37</sup>. Schopnost spermie reagovat s oviduktálními glykokonjugáty se během fertilizačního procesu mění, pravděpodobně díky změnám plasmatické membrány spermie, změnám proteinového pláště spermie a přítomnosti inhibičních, resp. aktivačních faktorů nebo enzymů v oviduktální tekutině. Tato interakce se může druhově lišit<sup>38</sup>. Spermie mohou být takto vázány hodiny až dny a jsou tak chráněny před degradací<sup>39</sup>, čímž se zvyšuje jejich fertilizační schopnost. Spermie jsou z rezervoáru uvolňovány při ovulaci. Funkcí rezervoáru je jednak oddálení kapacity a tím synchronizace s ovulací vajíčka, dále zabránění polyspermie<sup>40</sup>, ale také selekce oplození schopných spermií<sup>41</sup>.

### 1.1.7. Kapacitace spermií

Kapacitace je proces, který v sobě zahrnuje veškeré změny, které spermie prodělává při průchodu samičím reprodukčním traktem<sup>42</sup>. Tyto změny jsou reversibilní a zahrnují především odstranění a pozměňování ochranného proteinového pláště spermií případně adsorpci produktů samičího reprodukčního traktu. Při ejakulaci se na povrch spermie váží proteiny (dekapacitační faktory), které jsou v samičím traktu odstraňovány a jsou tak odkrývány receptory pro rozpoznávání a vazbu spermie se *zona pellucida*. Dochází k přeskupení domén plasmatické membrány a je odstraňován cholesterol z povrchu spermií, čímž se sníží rigidita membrány a tím je usnadněna následná akrosomální reakce<sup>43</sup>. Uvolnění cholesterolu může způsobit další reorganizaci a destabilizaci membrány, což by přes dosud neznámou transdukční dráhu mohlo regulovat expresi povrchových receptorů na spermii pro vazbu k *zona pellucida* vajíčka<sup>44</sup>. Dále se mění schopnost vázat lektiny, k čemuž může docházet buď odkrytím nových glykanových motivů, působením glykosyltransferas přítomných v samičím reprodukčním traktu nebo případnou asociací glykoproteinů produkovaných epiteliálními buňkami oviduktu<sup>45</sup>. Ejakulované spermie, které neprošly kapacitací nejsou schopny oplodnit vajíčko.

Kapacitované spermie ztrácejí afinitu k epitelu oviduktu<sup>46</sup>, a jsou tak uvolňovány z oviduktálního rezervoáru. Jejich uvolňování napomáhá i hyperaktivace spermií<sup>47</sup>. Hyperaktivace motility je způsob pohybu bičíku spermie, druhově specifický, který umožňuje snazší průchod glykoproteiny *zona pellucida* oocyty. Hyperaktivované spermie

také snáze a rychleji pronikají viskózním prostředím kumulárních buněk v okolí ovulovaného oocytu.

## 1.2. Samičí pohlavní buňky

Samičí pohlavní buňky, oocyty, se vyvíjejí ve vaječnicích ve váčcích epiteliálních buněk (folikulech). Zralý folikul připravený k ovulaci se nazývá folikul Graafův<sup>1</sup>. Oocyt je chráněn glykoproteinovým obalem zvaným *zona pellucida*. *Zona pellucida* je pružná, 2-25 µm silná extracelulární glykoproteinová síť, syntetizovaná a sekretovaná rostoucím oocytem a u některých druhů také granulosoými buňkami folikulu<sup>48</sup>.

Na povrchu *zona pellucida* je vrstva kumulárních buněk (cumulus oophorus). Během ovulace tyto buňky syntetizují a vylučují velké množství kyseliny hyaluronové do okolního extracelulárního matrix a tvoří tak mukoidní komplex<sup>49</sup>.

Mezi *zona pellucida* a plasmatickou membránou oocytu je periviteliní prostor vyplněný folikulární tekutinou. Pod povrchem plasmatické membrány oocytu jsou rovnoměrně rozmístěny kortikální váčky, které po oplodnění vylijí svůj obsah do periviteliního prostoru. Kortikální váčky obsahují hydrolytické enzymy, které po vylití částečně hydrolyzují glykoproteiny *zona pellucida*. Dochází k zesíťování glykoproteinů a *zona pellucida* se stává nepropustnou pro další spermie. Tento děj se nazývá kortikální reakce<sup>50</sup>.

### 1.2.1. Oplodnění

Při interakci oocytu a spermie daného živočišného druhu ve správný čas a na správné místě dochází k oplodnění (fertilizaci). Fertilizace zahrnuje několik dějů (obr. 1.4, str. 14). Prvním úkolem kapacitované spermie je průnik kumulárním matrix. Poté dochází k primární vazbě spermie na *zona pellucida* oocytu, a to vazbou lektinového typu, kdy interagují povrchové proteiny spermie se sacharidovými zbytky glykoproteinů *zona pellucida*. Tato vazba přes určité signální mechanismy spouští akrosomovou reakci, která uvolní enzymy obsažené v akrosomu, aby usnadnily průchod spermie *zona pellucida*<sup>3</sup>.

Akrosomová reakce zahrnuje mnohonásobnou fúzi vnější akrosomové membrány a plasmatické membrány spermie, následuje vylití obsahu akrosomu přes porušenou membránu. Akrosom je membránová struktura v hlavičce spermie, která obsahuje velké množství hydrolytických enzymů. Některé z těchto enzymů se běžně vyskytují v lysozomech, jiné enzymy jsou specifické pro spermie (akrosin, kyselá fosfatasa, β-galaktosidasa, hyaluronidasa, neuraminidasa, fosfolipasa atd.)<sup>3</sup>.

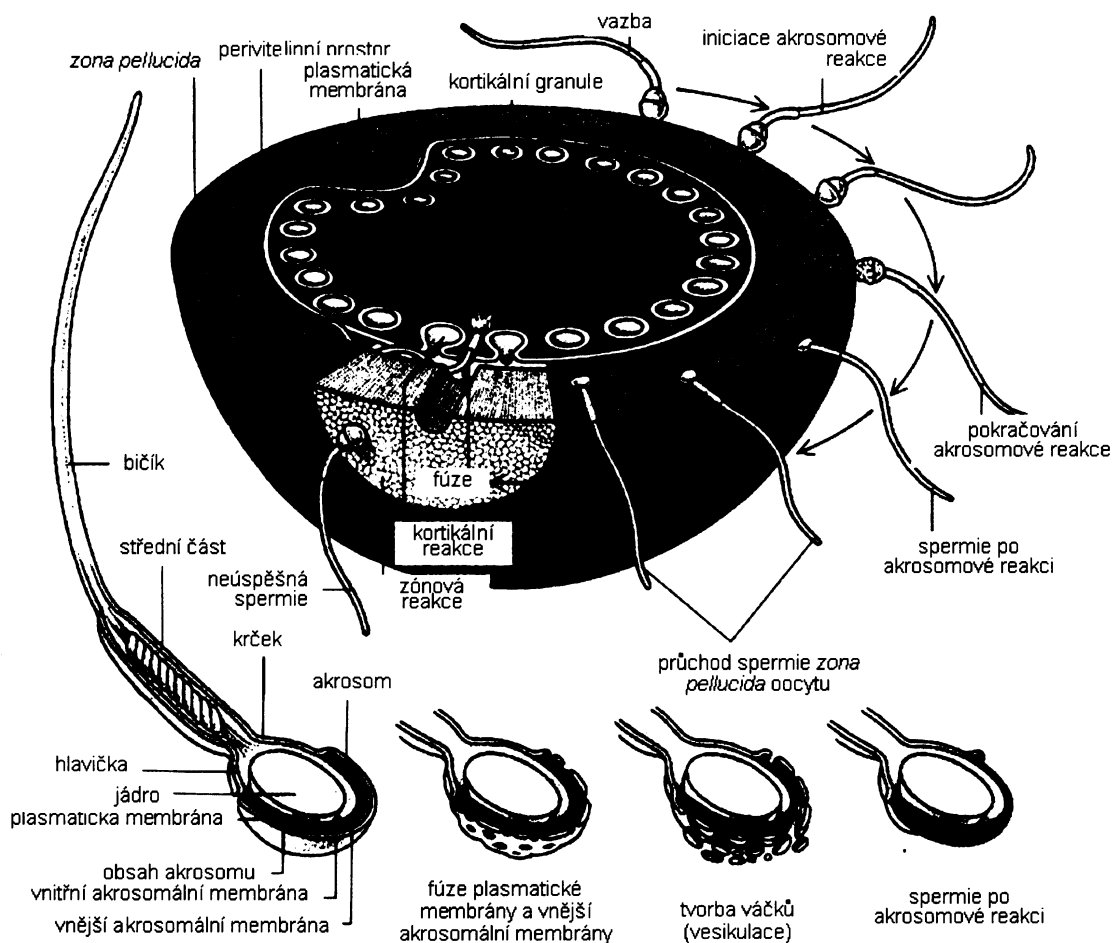
Poté dochází k sekundárnímu kontaktu gamet, který je zprostředkován molekulami na vnitřní akrosomální membráně spermie a *zona pellucida* oocytu. Po průchodu *zona*



*pellucida* plasmatická membrána spermie (konkrétně její ekvatoriální segment) splyne s plasmatickou membránou oocytu. Tím je iniciována kortikální reakce, aby bylo zabráněno vstupu dalších spermií do oocytu<sup>3</sup>.

Kortikální reakce je pravděpodobně zprostředkována signální kaskádou přes fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát. Fúze spermie a oocytu aktivuje tzv. druhé posly inositol trifosfát a diacylglycerol. Dochází k uvolnění  $Ca^{2+}$  iontů z intracelulárních zásob a následně dochází k aktivaci proteinkinasy C. To způsobí fúzi membrány oocytu s membránou kortikálních granulí a vylití jejich obsahu do perivitelinního prostoru. Enzymy obsažené v kortikálních granulích (proteinasy, ovoperoxidasa a N-acetylglokosaminidasa) způsobují změny na *zona pellucida* (zónová reakce). Ta se tak stává rigidnější a brání průniku dalších spermií do oocytu (blok polyspermie). Zbránění polyspermie je způsobeno jednak zónovou reakcí, dále změnami na oolemě a vytvořením nové vrstvy z obsahu kortikálních granulí<sup>51</sup>.

V poslední fázi dojde ke splynutí jader obou gamet a vzniku zygoty – počátku nového jedince.



obr. 1.4 Průběh oplodnění (nahore) a akrosomové reakce (ve spodní části) na myším modelu<sup>52</sup>

### 1.3. Proteiny a jejich inhibitory v reprodukčním traktu

Proteiny a jejich inhibitory hrají klíčovou roli v řadě fyziologických procesů organismu jako je například migrace buněk, mezibuněčné interakce, buněčná signalizace, přeměna tkání a povrchu buněk a řada jiných. Vzájemnou interakcí udržují homeostázi vnitřního prostředí organismu.

V přírodě se vyskytují dva základní regulační mechanismy, a to:

- aktivace prekursorů (zymogenů)
- inaktivace proteiny inhibitory za vzniku komplexu

Proteiny jsou enzymy, které štěpí peptidovou vazbu v proteinech. Obsahují aktivní centrum (s katalytickou funkcí) a místo pro vazbu substrátu. Rozlišujeme serinové proteiny (-OH v aktivním místě), cysteinové (-SH v aktivním místě), aspartátové (-COOH v aktivním místě) a metaloproteiny (iont kovu koordinovaný v aktivním centru enzymu). Proteiny mohou vytvářet neaktivní komplexy se svými inhibitory, aby byly okolní buňky chráněny před nežádoucí proteolytickou degradací.

#### Proteiny v samčím reprodukčním traktu

V samčím reprodukčním traktu u různých druhů se proteiny vyskytují jednak v akrosomu spermie, dále v epididymis a v testes. Proteolytická aktivita nalezena v semenné plasmě je u většiny druhů savců malá. Výjimku představuje semenná plasma lidská, kde byly nalezeny proteiny pocházející z prostaty patřící do rodiny kallikreinů.

##### 1.3.1. Proteiny akrosomu

Spermie obsahují řadu proteiny převážně v akrosomu<sup>53</sup>. Tyto proteiny mohou štěpit glykoproteiny *zona pellucida*, příp. upravovat jiné proteiny akrosomu nebo proteiny přítomné na membránách v průběhu akrosomové reakce. Vstup spermie i průnik *zona pellucida* je umožněn jednak schopností spermie se pohybovat, ale pravděpodobně také enzymatickou degradací glykoproteinů *zona pellucida* pomocí enzymů obsažených v akrosomu spermie<sup>54</sup>.

- proakrosin/akrosin (endoproteinasa trypsinového typu)
- peptidasa kolagenasového typu
- testikulární angiotensin-converting enzym (gACE)
- myši TESP5 (z angl. testicular serine proteinase)
- kyselé proteiny
- katepsin D, L
- kalpain

- kolagenasa
- metaloendoproteinasa<sup>55</sup>

### 1.3.2. Proteinasy testes<sup>56</sup>

Byly popsány enzymy s proteolytickou aktivitou produkované testes, které se mohou účastnit regulace vývoje spermie nebo jsou zabudovávány do jejich plasmatické membrány.

- ADAM (z angl. a disintegrin and metalloprotease domain) u hlodavců a opic
- katepsin L
- angiotensin I converting enzym (gACE)
- MMP-2 u berana, hřebce
- MMP-9 u berana, hřebce a kance

### 1.3.3. Proteinasy epididymu

V epididymis se vyskytuje řada proteinas a jejich inhibitorů<sup>57</sup>. Rovnováha mezi proteinasami a jejich inhibitory se zdá být nezbytná pro zachování krevní bariéry testes<sup>58</sup> i epididymis<sup>56</sup> a tím pro udržení specifického prostředí těchto orgánů a následně pro správný vývoj gamet. Hlavní funkcí proteinas přítomných v epididymální tekutině je modifikace povrchových proteinů spermií během jejich průchodu epididymem. Příkladem proteolyticky upravovaného proteinu v epididymu jsou angiotensin I converting enzym (gACE) pocházející z testes, který je uvolňován z povrchu spermií v caput epididymis a disintegrin-metaloproteinasa 2 (ADAM2), která je na spermiích degradována při průchodu caput epididymis<sup>13</sup>. Proteinasy jsou regulovány svými inhibitory vyskytujícími se ve specifických oblastech epididymu<sup>7</sup>. MMP zde přítomné jsou buď produkovány v testes (MMP-2, MMP-9) a nebo přímo epididymis (pro-MMP-2, MMP-3)<sup>56</sup>.

- MMP-3 u berana, hřebce a kance
- MMP-2 u berana, hřebce
- epiteliální trypsinogen (serinová proteinasa)
- epiteliální tkáňový a urokinasový plasminogen aktivátor (serinová proteinasa)
- katepsiny A, B, D – lysozomální i epiteliální proteinasy, papainová rodina
- prokatepsin L – lysozomální i epiteliální proteinasa, i v epididymální tekutině, papainová rodina

### 1.3.4. Proteinasy semenné plasmy

Proteolytická aktivita lidské semenné plasmy je významná z důvodu obsahu velkého množství serinových proteinas z rodiny kallikreinů<sup>59</sup>:

- tkáňový kallikrein hK1 (trypsin-like)
- žláznový kallikrein hK2 (trypsin-like)
- prostatický specifický antigen PSA (hK3, chymotrypsin-like)

U ostatních živočišných druhů je proteolytická aktivita semenné plasmy výrazně nižší ve srovnání s ostatními částmi reprodukčního traktu.

#### 1.4. Inhibitory proteinas v samčím reprodukčním traktu

Inhibitory hrají důležitou roli v udržování homeostáze vnitřního prostředí. Podílejí se na všech fyziologických procesech tím, že regulují aktivitu enzymů. Extracelulární proteinasové inhibitory hrají důležitou roli při vývoji a zrání spermií, kapacitaci savčích a ochraně spermie a reprodukčních orgánů před proteolytickou degradací.

Existují tři typy domén inhibitorů serinových proteinas, a to:

- Kunitzova doména (intracelulární inhibitor)
- Kazalova doména (sekreční inhibitor)
- WAP doména (z angl. whey acidic protein)

Kunitzova a Kazalova doména se liší způsobem tvorby disulfidových můstků mezi šesti cysteiny přítomnými v molekule inhibitoru. WAP doména obsahující čtyři disulfidové můstky je motiv s konzervovanou aminokyselinovou sekvencí vyskytující se u řady proteinů. Nejvíce prostudované proteiny s WAP doménou jsou inhibitory proteinas, které mohou být složkou přirozené imunitní obrany řady epitelů<sup>60</sup>.

Inhibitory proteinas trypsinového typu mohou inhibovat proteiny zahrnuté v jednotlivých krocích fertilizace, ale jejich funkce není stále zcela objasněna. Přírodní i syntetické inhibitory proteinas trypsinového typu (sojový trypsin inhibitor, příp. benzamidin) například brání vazbě myších spermií k *zona pellucida* nebo průniku lidských spermií *zona pellucida*. U kanců například inhibitor semenné plasmy inaktivuje membránovou proteinasu trypsinového typu na bičíku epididymálních spermií, která reguluje aktivitu adenylát cyklasy a ovlivňuje tak motilitu spermie. Většina savčích inhibitorů proteinas trypsinového typu jsou malé bazické proteiny s relativní molekulovou hmotností 5 000 – 15 000 a pI~8<sup>61</sup>.

Inhibitory akrosinu chrání samčí i samičí reprodukční trakt před proteolytickou degradací buněk akrosinem předčasně uvolněným z poškozených spermií.

##### 1.4.1. Inhibitory proteinas v testes<sup>55</sup>

Většina testikulárních proteinasových inhibitorů je produkována Sertoliho buňkami a mají přímý vliv na vývoj spermií<sup>62</sup>.

- $\alpha_2$ -macroglobulin (syntetizován v testes, reabsorbce v caput epididymis)
- TIMP-1, 2 (z angl. tissue inhibitor of metalloproteinases-1,2)
- cystatin C
- protein C inhibitor (PCI)
- EPPIN

#### 1.4.2. Inhibitory proteinas v epididymis

Při průchodu epididymem dochází k rozsáhlým úpravám povrchových proteinů spermií proteinasami přítomnými v epididymální tekutině. Některé inhibitory proteinas přítomných v epididymální tekutině jsou sekrečními produkty testes<sup>63</sup>.

- TIMP2 (přítomný v caput epididymis, ale pochází z testes)
- protein C inhibitor (PCI)
- HE4
- cystatin 8, 12 (exprese v caput epididymis)
- EPPIN (SPINLW1)
- SPINK1-8 – inhibitory Kazalova typu<sup>57</sup> v myším epididymu
- inhibitor izolovaný z tekutiny cauda epididymis<sup>64</sup>

#### 1.4.3. Inhibitory proteinas semenné plasmy

Inhibitory semenné plasmy jsou přirození antagonisté akrosomové proteiny akrosinu. Inhibitory ze semenné plasmy jsou převážně produktem semenných vaků. Byly izolovány inhibitory z kančí semenné plasmy<sup>65</sup> a inhibitory asociované s kančí spermií<sup>66,67</sup>. Fyziologickou funkcí inhibitorů proteinas v semenné plasmě je pravděpodobně ochrana epiteliálních buněk samčího a samičího reprodukčního traktu a komponent semenné plasmy a spermií před proteolytickou degradací akrosinem předčasně uvolněným z porušených spermií<sup>68</sup>.

- inhibitor izolovaný z kančí semenné plasmy<sup>65, 69</sup>
- inhibitor asociovaný se spermií<sup>66,67</sup>
- protein C inhibitor (PCI)

## 1.5. Významné proteiny a jejich inhibitory v samčím reprodukčním traktu

### Akrosin

Akrosin (EC 3.4.21.10.) patří mezi nejvíce prostudované proteiny akrosomu savčí spermie. Je to bazický glykoprotein s aktivitou serinové proteiny. Akrosinu jsou přisuzovány dvě základní funkce v průběhu fertilizace, a to sekundární vazba spermie na *zona pellucida* a napomáhání při průniku spermie *zona pellucida* oocytu<sup>70</sup>. Mezi další funkce akrosinu patří štěpení histonů při tvorbě samičího pronukleu po fúzi gamet, dále štěpí kininogen na kininy a tím způsobuje stahy hladkého svalstva a tak usnadňuje průchod spermií přes cervikální mukus. Akrosin štěpí želatinu a komponenty extracelulárního matrix. Vyskytuje se v inaktivním stavu jako zymogen proakrosin v akrosomu savčích spermií. Během akrosomové reakce dochází k jeho autoaktivaci<sup>71</sup>. Proakrosin je polypeptidový řetězec s třemi doménami:

- zymogenní
- katalytickou
- C-terminální

Zymogenní doména je tvořena signálním peptidem a lehkým řetězcem. Katalytická i zymogenní doména má vysoký stupeň homologie mezi druhy (71-82%), C-terminální doména je variabilní. Akrosin je produkován ve formě preproenzymu. Katalytická doména obsahuje všechny funkční prvky odpovídající za proteolytickou aktivitu serinových proteinas, jako jsou His-69, Asp-123 a Ser-221. Molekula akrosinu má dvě možná N-glykosylační místa (Asn-3 a Asn-191) a 12 cysteinových zbytků.

Proakrosin (relativní molekulová hmotnost 53 000 a 55 000) je přítomen v intaktní spermii v akrosomu, vázaný C-koncovou částí molekuly k vnitřní akrosomální membráně. Po porušení akrosomu, proakrosin je postupně aktivován a vznikají aktivní formy akrosinu s různou molekulovou hmotností. Proakrosin jako jednořetězcový glykoprotein je aktivován na  $\alpha$ -akrosin (relativní molekulová hmotnost 53 000) štěpením vazby Arg<sup>23</sup>-Val<sup>24</sup>. Lehký řetězec (23 aminokyselinový řetězec) zůstává navázaný na těžký řetězec akrosinu dvěma disulfidovými můstky<sup>72</sup>.  $\alpha$ -akrosin je dále konvertován na  $\beta$ -akrosin (relativní molekulová hmotnost 38 000) odštěpením 80-ti aminokyselinového peptidu z C-konce molekuly. Odštěpený peptid je silně hydrofóbní, obsahuje hodně aminokyselinových zbytků prolinu a předpokládá se, že C-koncovým peptidem je proakrosin i  $\alpha$ -akrosin vázán k akrosomální membráně<sup>73</sup>. Proakrosin/akrosin systém má dvě základní funkce, a to vázat *zona pellucida* po akrosomové reakci a napomáhání průniku spermie do perivitellinního prostoru po aktivaci proakrosinu. Po akrosomové reakci

většina proakrosinu opouští akrosom spermie a je aktivován na  $\beta$ -akrosin. Pouze malá část proakrosinu, která zůstává vázaná na vnitřní akrosomální membráně se C-koncovou částí váže lektinovým typem vazby s glykoproteiny *zona pellucida* (sekundární vazba). Po sekundární vazbě dochází k aktivaci proakrosinu na  $\alpha$ -akrosin, navázaný na vnitřní akrosomální membráně, který umožňuje svou proteolytickou aktivitou průnik spermie glykoproteiny *zona pellucida*<sup>74,70</sup>.

## TESP5

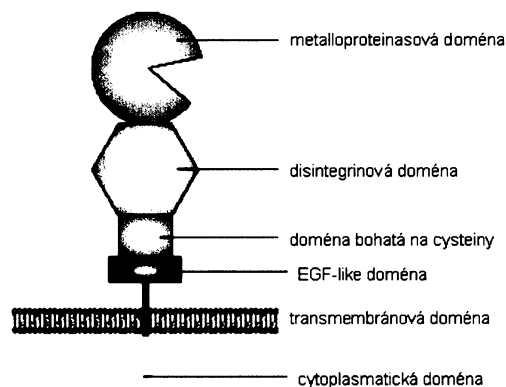
U myší však akrosin není nezbytný pro oplodnění vajíčka, jeho proteolytickou funkci mohou nahradit jiné akrosomální proteiny jako například TESP5<sup>75</sup>. Bylo zjištěno, že akrosin se u myší vyskytuje v menším množství než je tomu u jiných hlodavců a ostatních živočichů. U myší bez akrosinu byl průnik *zona pellucida* oocyty zpomalen, avšak k fertilizaci došlo. Úlohou akrosinu u myší může být proteolýza zymogenu TESP5, příp. urychlování rozptýlení obsahu akrosomu v průběhu akrosomální reakce. TESP5 je jednou z myších proteinů štěpící želatinu s relativní molekulovou hmotností 41 000 a 42 000, nacházející se v membráně epididymálních spermií (pravděpodobně GPI-ukotvenou) a na membráně zárodečných buněk v testes.

## ADAM

ADAM (z angl. a disintegrin and metalloproteinase) proteiny jsou membránově ukotvené metaloproteinasy, které opracovávají, popř. odstraňují vnější domény membránových růstových faktorů, cytokinů a receptorů. Hrají důležitou roli ve fertilizaci, angiogenezi, neurogenezi, vývoji srdce a průběhu rakoviny<sup>76</sup>.

Typické ADAM proteiny se skládají z těchto domén (obr. 1.5):

- N-terminální signální sekvence
- pro-doména
- metaloproteinasová doména
- disintegrinová doména
- doména bohatá na cysteiny (cystein-rich)
- EGF-like doména (z angl. epidermal growth factor)
- transmembránová doména
- cytoplasmatická doména



obr. 1.5 ADAM doménová struktura<sup>76</sup>

### **Angiotensin I converting enzym (gACE)**

Angiotensin I converting enzym (ACE) je monomerní membránová peptidasa s metaloproteinasovou aktivitou závislá na přítomnosti ionů  $Zn^{2+}$  a  $Ca^{2+}$  regulující enzymy udržující tlak krve. Renin-angiotensin systém reguluje krevní tlak a funkce kardiovaskulárního systému. ACE aktivuje dekaeptid angiotensin I za vzniku angiotensinu II a inaktivuje bradykinin. Má však také význam při fertilizaci. Existují dvě formy ACE, a to vysokomolekulární somatická forma (relativní molekulová hmotnost 150 000 – 180 000) a nízkomolekulární forma (relativní molekulová hmotnost 90 000 – 110 000). Nízkomolekulární forma se nachází v testes v samčích zárodečných buňkách a štěpí GPI-ukotvené proteiny podílející se na vazbě spermie s oocytem. Podílí se také na zrání spermií a modifikaci jejich povrchu. U knock-out myši bez genu pro ACE byla pozorována samčí neplodnost. Jeho funkce v souvislosti s fertilizací nebyla dosud objasněna<sup>77</sup>.

### **Matrix metaloproteinasy (MMP)**

MMP jsou strukturně podobné proteiny závislé na přítomnosti iontu kovu v aktivním centru. Štěpí extracelulární matrix a basální membránu tvořenou především fibrilárními proteiny (kolagen, elastin), proteoglykany a multidoménovými glykoproteiny (fibronectin, laminin). MMP jsou produkovány jako proenzymy a sekretovány do extracelulárního matrix, kde jsou aktivovány proteolytickým štěpením. Aktivní místo těchto enzymů je v katalytické doméně a koordinuje iont kovu ( $Zn^{2+}$ ) vazbou třech His a molekuly vody. Metaloproteinasy matrixu a jejich inhibitory byly nalezeny v tkáních reprodukčních orgánů a v semenné plasmě. Tyto enzymy jsou zodpovědné za rozsáhlé změny na úrovni extracelulárního matrix orgánů dospělého reprodukčního traktu. Matrix metaloproteinasy se podílejí na řadě procesů spojených s reprodukcí jako například epididymální maturace, menstruace, ovulace a další. MMP také zajišťují průchodnost všech tubulárních systému reprodukčního traktu. Exprese MMP a jejich inhibitorů je pravděpodobně regulována pohlavními hormony<sup>78</sup>. Metaloproteinasy MMP-2 a MMP-9 jsou syntetizovány převážně Sertoliho buňkami v testes. Proenzym Pro-MMP-2 může být produktem caput epididymis. U řady zvířat jsou reprodukční schopnosti vázané na roční období. Metaloproteinasy tak mohou pozměňovat tkáň testes a epididymu v závislosti na období a reprodukční aktivitě. Zajímavé je, že u knock-out myši bez metaloproteinas nebyla pozorována neplodnost samců. Z toho lze usoudit, že u hlodavců hrají metaloproteinasy malou roli v procesu fertilizace<sup>53</sup>.



### **Proteinasy z rodiny kallikreinů**

Proteinasy hK2 a PSA jsou produkovány epiteliálními buňkami prostaty<sup>58</sup>. PSA je syntetizován jako preproenzym o 261 aminokyselinách s relativní molekulovou hmotností 33 000. hK2 aktivuje zymogen pro-PSA *in vitro* a zdá se být fyziologickým aktivátorem PSA v prostatě. V semenné plasmě se oba vyskytují ve vysoké koncentraci. Jeho funkcí je štěpení dominantních proteinů lidských semenných vaků semenogelinu I a II (Sg I s relativní molekulovou hmotností 52 000, Sg II s relativní molekulovou hmotností 76 000)<sup>79</sup>. Po ejakulaci vytváří semenogelin neaktivní nekovalentní komplex (koagulum) znehýbňující spermie v ejakulátu. Před degradací jsou semenogeliny v semenných vacích chráněny Protein C inhibítorem (PCI). PSA je v sekretu prostaty inhibováno vysokou koncentrací iontů  $Zn^{2+}$ . Po ejakulaci jsou ionty  $Zn^{2+}$  chelátovány semenogeliny a PSA se tak stává aktivním. PSA i hK2 štěpí koagulum a dochází k opětovnému ztekucení a rychlejšímu pohybu spermií. Existuje hypotéza, že fragmenty semenogelinu I a II působí jako aktivátory motility<sup>80,81</sup>. Aktivitu PSA reguluje protein C inhibitor (PCI)<sup>82</sup>

### **TIMP-1, 2 (z angl. tissue inhibitor of matrix metalloproteinase)**

TIMP-1,2 jsou produkovány Sertoliho buňkami v testes a inhibují aktivitu metaloproteinasy. Metaloproteinasy patří do rodiny enzymů, jejichž aktivita závisí na přítomnosti iontu kovu a zajišťují rovnováhu mezi extracelulární matrix, jeho výstavbou a degradací v testes. Tyto inhibitory mají však i jiné funkce jako např. inhibice nádorového růstu, inhibují invazi a metastázování, upravují morfologii buněk, kontrolují dostupnost růstových faktorů a regulují steroidogenesi v testes. Známé funkce TIMP-2 jsou dvě, a to aktivace pro-MMP-2 a inhibice metaloproteinasy za tvorby neaktivního komplexu. TIMP-1,2 jsou také produkovány lidskou prostatou a bulbouretrálními žlázami, semennými vaky a prostatou býků<sup>83</sup>.

### **EPPIN (z angl. epididymal proteinase inhibitor)**

EPPIN (SPINLW1) je inhibitor serinových proteinasy bohatý na cysteiny a obsahuje Kunitzovu doménu tvořenou třemi disulfidovými můstky a WAP doménu (z angl. whey acidic protein) tvořenou čtyřmi disulfidovými můstky. EPPIN se vyskytuje v lumen epididymu a váže se na spermie. Lidský EPPIN1 je produktem testes a epididymu, EPPIN2 je produktem jen epididymu a EPPIN3 produktem jen testes. EPPIN se vyskytuje na povrchu kapacitovaných i nekapacitovaných myších spermií. V lidské semenné plasmě je vázaný na Semenogelin I, jeden z dominantních proteinů lidské semenné plasmy. Komplex Semenogelin-EPPIN se vyskytuje volně v lidské semenné plasmě, ale je také vázán na ejakulované lidské spermie. EPPIN je tak součástí ochranného proteinového

pláště a chrání tak spermie v samičím reprodukčním traktu pomocí své antibakteriální aktivity, případně je chrání před proteolytickou degradací. Podílí se tak na zachování životaschopnosti spermií v samičím reprodukčním traktu, a tak zachování jejich schopnosti oplodnit vajíčko<sup>84</sup>.

#### **HE4**

HE4 je malý sekreční protein produkovaný lidským epididymem, bohatý na cysteinové zbytky a je pravděpodobně novým tkáňově specifickým extracelulárním inhibítozem proteinas samčího reprodukčního traktu. Obsahuje dvě WAP domény s konzervovanou aminokyselinovou sekvencí a patří tak ke složkám přirozené imunitní obrany epitelů<sup>60</sup>. Díky množství cysteinových zbytků v molekule může docházet k vazbě s proteiny integrovanými v plasmatické membráně spermie<sup>85</sup>.

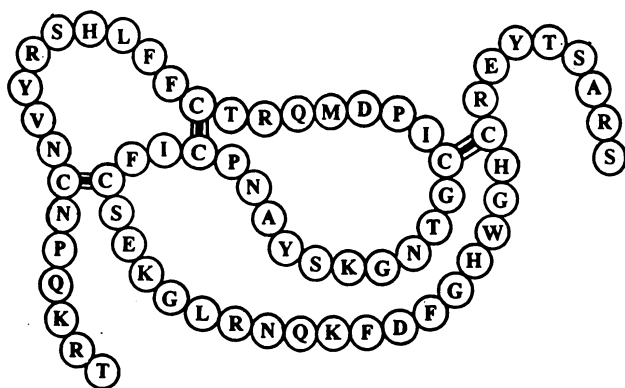
#### **Protein C inhibitor (PCI)**

PCI je nesespecifický inhibitor serinových proteinas (serpin), který inhibuje řadu proteinas koagulačního a fibrinolytického systému, tkáňové kallikreiny a akrosin. V samčím reprodukčním traktu se vyskytuje v semenné plasmě, a to ve vysokých koncentracích. PCI tvoří inhibuje specifický antigen prostaty (PSA) z rodiny kallikreinů vytvořením stabilního komplexu. Tvorba tohoto komplexu je inhibována heparinem. PCI je syntetizován v řadě lidských orgánů jako například játra, srdce, žlučník, vaječníky a testes. PCI je syntetizován i v ováriích a může tak být přítomen v okolí oocyty. U myší byl nalezen výhradně v reprodukčním systému, a to v testes, semenných vacích a vaječnicích. Inhibuje vazbu spermie na vajíčko a u myší snižuje míru schopnosti oplodit vajíčko při *in vitro* fertilizaci<sup>82</sup>.

#### **Inhibitor izolovaný ze semenné plasmy (INH)**

Ze semenné plasmy byly izolovány tři isoinhibitory A<sub>1</sub>, A, B s relativní molekulovou hmotností v rozmezí 11 500 – 12 000. Inhibitory jsou složeny z 65 – 67 aminokyselin a jsou glykosylovány<sup>69</sup>. Molekula isoinhibitoru A<sub>1</sub> (obr. 1.6, str. 24) je tvořena jedním oligopeptidovým řetězcem složeným z 65 aminokyselin a obsahuje šest cysteinů, které vytváří tři disulfidové vazby. Disulfidové vazby (C<sup>1</sup>- C<sup>5</sup>, C<sup>2</sup>- C<sup>4</sup>, C<sup>3</sup>- C<sup>6</sup>) vytváří v molekule inhibitoru tři intramolekulární smyčky A, B, C. Takové uspořádání je typické pro inhibitory serinových proteinas Kazalova typu (sekrečních pankreatických inhibitorů trypsinu)<sup>65</sup>. Isoinhibitor A<sub>1</sub> obsahuje dva postranní polysacharidové řetězce, které jsou vázány O-glykosidickou vazbou na Ser 12 a Ser 62 molekuly inhibitoru. Cukerná složka tvoří přibližně 30% celkové hmotnosti molekuly. Sacharidové řetězce se nacházejí poblíž

reaktivního místa, ale pro funkci inhibitoru nejsou důležité<sup>69</sup>.



obr. 1.6 Molekula isoinhibitoru A<sub>1</sub> izolovaného ze semenné plasmy

### Inhibitor asociovaný se spermií (SAAI – z angl. sperm-associated acrosin inhibitor)

Z extraktů dobře omytých spermií byly izolovány a charakterizovány tři isoinhibitory Kazalova typu – dva z nich jsou majoritně zastoupeny<sup>66</sup>. Inhibitory se tvoří v semenných vacích a při ejakulaci se váží na povrch spermie.

Isoinhibitory asociované se spermií jsou tvořeny jedním polypeptidovým řetězcem složeným z 67-72 aminokyselin, jejich molekulová hmotnost se pohybuje okolo 8000 a na rozdíl od inhibitorů semenné plasmy nejsou glykosylovány. Molekula inhibitoru obsahuje šest cysteinů, které jsou uspořádány do tří disulfidových vazeb stejným způsobem, jako je tomu u inhibitorů semenné plasmy. Aminokyselinové sekvence tří isoform se liší pouze v N- a C-terminální části molekuly. Isoinhibitory mohou vznikat proteolytickým zpracováním produktu jednoho genu<sup>67</sup>.

Sekvence asociovaného inhibitoru je z 90% identická se sekvencí inhibitoru semenné plasmy. I přes malé odlišnosti v sekvenci mají oba typy inhibitorů rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti. Liší se tím, že inhibitory semenné plasmy jsou glykoproteiny s  $pI \sim 9,5$  zatímco inhibitory asociované se spermií jsou jednoduché proteiny s  $pI \sim 8,3$ . Více malých rozdílů v molekule asociovaného inhibitoru má funkční význam týkající se vazby asociovaného inhibitoru na spermií<sup>67</sup>.

Struktura inhibitoru asociovaného se spermií byla plně potvrzena určením nukleotidové sekvence jeho cDNA<sup>66</sup>.

Fyziologická funkce asociovaných inhibitorů proteinas spočívá nejen v ochraně spermie před aktivitou předčasně uvolněného a aktivovaného akrosinu, ale vazbou k akceptorové molekule na povrchu spermie by mohly působit i jako faktor stabilizující a chránící vazebná místa povrchových proteinů spermie, která jsou důležitá pro interakci spermie s vajíčkem<sup>87,88</sup>.

Spermadhesiny a inhibitory jsou sekreční komponenty semenných vaků, které se váží na hlavičku spermie při ejakulaci. Předpokládalo se spermadhesiny AQN1, AWN1 a AWN2 jsou akceptorovými molekulami pro inhibitory. Navázané inhibitory ochraňují spermadhesiny, nezbytné pro interakci spermie s vajíčkem před proteolytickým štěpením a účastní se kapacitace spermie. Ty spermadhesiny, které zůstávají po kapacitaci na povrchu spermie se mohou účastnit primární vazebné interakce spermie se *zona pellucida* vajíčka<sup>88, 89</sup> Byla prokázána přítomnost komplexu (heterodimeru) inhibitoru asociovaného se spermii s relativní molekulovou hmotností 8 000 a AQN1 spermadhesinu, a tak byl potvrzen předpoklad, že spermadhesin AQN1 navázaný na spermii je akceptorovou molekulou pro tento inhibitor.

## 1.6. Cíl práce

Inhibitory proteinas spolu s proteinasami hrají klíčovou roli v regulaci všech fyziologických procesů organismu a jsou nezbytné k zachování homeostáze vnitřního prostředí. V reprodukčním traktu se podílejí na řadě dějů, při vývoji spermie, jejího zrání, při kapacitaci i při samotném oplození. V laboratoři Doc. V. Jonákové byly dříve izolovány inhibitory serinových proteinas z kančí semenné plasmy a z kančích spermií. Cílem předkládané diplomové práce byla separace a charakterizace proteinů kančí epididymální tekutiny a určení výskytu inhibitorů proteinas v kančím reprodukčním traktu.

Zaměřili jsme se na několik problémů:

- separace a elektroforetická charakterizace proteinů kančí epididymální tekutiny
- detekce inhibiční aktivity ve frakcích kančí epididymální tekutiny
- detekce a charakterizace inhibitorů metaloproteinas a inhibitorů akrosinu ve frakcích kančí epididymální tekutiny
- genová exprese inhibitoru akrosinu ze semenné plasmy v kančích reprodukčních orgánech
- imunodetekce inhibitoru akrosinu v kančí epididymální tekutině, v extraktech tkání kančích reprodukčních orgánů, na řezech reprodukčních orgánů kance a lokalizace na kančích spermiích

## 2. Materiál a metody

### 2.1. Materiál

#### 2.1.1. Chemikálie

acetonitril (ACN)	Merck, Darmstadt, Německo
agarosa	Sigma, Chemical Co., St. Luis, USA
akrosin	izolovaný z kyselého extraktu kančích ejakulovaných spermií, v lab. Doc. V. Jonákové, ÚMG AV ČR
akrylamid	Serva, Heidelberg, Německo
BAPA	Sigma, Chemical Co., St. Luis, USA
benzamidin	Serva, Heidelberg, Německo
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, USA
barvička 6x Loading Dye	Fermentas Int. INC, Burlington, Canada
bromfenolová modř	Lachema, Brno, ČR
BSA	Serva, Heidelberg, Německo
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg, Německo
DMF	Sigma, Chemical Co., St. Luis, USA
DNA-polymerase reakčního pufr	Fermentas Int. INC, Burlington, Canada
DTT	Serva, Heidelberg, Německo
dodecylsulfát sodný (SDS)	Serva, Heidelberg, Německo
EDTA	Sigma, Chemical Co., St. Luis, USA
G-protein Sepharose	Amersham Biotechnologies, Vídeň, Rakousko
glycin	Serva, Heidelberg, Německo
guanidin	Serva, Heidelberg, Německo
4-chlor-1-naftol	Serva, Heidelberg, Německo
CHAPS	Sigma, Chemical Co., St. Luis, USA
inhibitor RNasin	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
isopropanol	Sigma, Chemical Co., St. Luis, USA
jodacetamid	Sigma, Chemical Co., St. Luis, USA
kyselina trifluoroctová (TFA)	Merck, Darmstadt, Německo

merkptoethanol	Sigma, Chemical Co., St. Luis, USA
minerální olej (PlusOne, DryStrip cover fluid)	GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Švédsko
nitrocelulóková membrána (NC)	Amersham Biotechnologies, Vídeň, Rakousko
N,N'-metylen-bisakrylamid (BIS)	Serva, Heidelberg, Německo
nukleotidové primery	East Port, Praha, ČR
MgCl <sub>2</sub>	Fermentas Int. INC, Burlington, Canada
MMP-9	Sigma, Chemical Co., St. Luis, USA
močovina	Sigma, Chemical Co., St. Luis, USA
percoll	Sigma, Chemical Co., St. Luis, USA
peroxid vodíku	Lachema, Brno, ČR
persíran amonný (APS)	Serva, Heidelberg, Německo
prasečí imunoglobuliny proti králičím Ig značené peroxidasou (SwAR/Px)	Sevapharma, Praha, ČR
primer oligo(DT)18	East Port, Praha, ČR
protilátka proti králičím Ig značená fluoresceinem isothiokyanátem (FITC)	Sigma Chemical Co., St. Luis, USA
PVDF-membránu	Amersham Biotechnologies, Vídeň, Rakousko
pyruvát sodný	Serva, Heidelberg, Německo
rehydratační pufr PlusOne (DryStrip cover fluid)	GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Švédsko
reversní transkriptasa M-MuLV	
roztok amfolytů	GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Švédsko
Sephadex G-75 M	Pharmacia, Uppsala, Švédsko
směs deoxynukleotidů dNTP	Fermentas Int. INC, Burlington, Canada
standard GeneRuler™ 100 bp	Fermentas Int. INC, Burlington, Canada
DNA Ladder Plus	Fermentas Int. INC, Burlington, Canada

standardy pro elektroforézu Precision Plus Protein Standards All Blue	Bio-Rad, Hercules, USA
<i>Taq</i> DNA Polymerase LC	Fermentas Int. INC, Burlington, Canada
N,N,N',N'-tetramethylenethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg, Německo
tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva, Heidelberg, Německo
Tween 20	Serva, Heidelberg, Německo
Vectashield H-1000 s DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
želatina (kančí)	Sigma Chemical Co., St. Luis, USA
RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Germany

### 2.1.2. Biologický materiál

Kančí epididymální tekutina s epididymálními spermii a reprodukční orgány byly získány z ÚŽFG AV ČR v Liběchově. Ejakulované kančí spermie byly získány z inseminační stanice v Kliměticích.



## **2.2. Gelová chromatografie kančí epididymální tekutiny na Sephadexu G-75 M**

Sloupec Sephadexu G-75 M o rozměrech 2,0 x 115,0 cm byl ekvilibrován pomocí 1,5% roztoku kyseliny octové (pH 3). Poté bylo 5 ml kančí epididymální tekutiny nanášeno na sloupec Sephadexu. Sloupec byl promýván 1,5% roztokem kyseliny octové (pH 3), jednotlivé frakce byly jímány po 15 minutách. Přítomnost proteinu v jednotlivých frakcích byla sledována měřením absorbance při 280 nm na spektrofotometru Helios  $\alpha$  (Thermo Spectronic, Cambridge, VB). Byl sestaven graf závislosti absorbance na elučním objemu. Frakce odpovídající jednotlivým vrcholům byly spojeny do čtyř frakcí označených EF1, EF2, EF3 a EF4. Tyto čtyři frakce byly namrazeny a lyofilizovány.

## **2.3. Stanovení aktivity serinových proteinas a inhibitorů proteinas trypsinového typu**

Aktivita serinových proteinas ve frakcích epididymální tekutiny získaných gelovou chromatografií byla stanovena přímo, a to na základě množství žlutě zbarveného p-nitroanilinu, který vzniká štěpením známého množství syntetického substrátu BAPA. Množství barevného produktu bylo určeno spektrofotometricky při 405 nm na spektrofotometru Helios  $\alpha$  (Thermo Spectronic, Cambridge, VB).

Aktivita inhibitoru v jednotlivých frakcích byla stanovena nepřímo. Byla určena aktivita neinhibovaného trypsinu, kterého bylo přidáno známé množství, po přidání neznámého množství inhibitoru. Trypsin štěpil syntetický substrát BAPA za vzniku žlutě zbarveného p-nitroanilinu, jehož množství bylo určeno spektrofotometricky při 405 nm. Absorbance jednotlivých vzorků byla měřena vůči standardu odpovídajícímu 20  $\mu$ g neinhibovaného trypsinu. Přítomnost inhibitoru byla ve frakcích prokázána úbytkem absorbance při 405 nm.

Stanovení obou aktivit bylo provedeno v jednotlivých frakcích získaných gelovou chromatografií kančí epididymální tekutiny na Sephadexu G-75 M. Vzorek o objemu 0,3 ml byl smíchán s 2,0 ml pufru (0,1 M Tris-HCl pH 7,8; 0,02 M  $\text{CaCl}_2$ ). Pro měření inhibiční aktivity bylo přidáno ještě 50  $\mu$ l roztoku trypsinu (0,4 mg/ml). Vše bylo důkladně promícháno a inkubováno 10 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 100  $\mu$ l BAPA a po dalších 15 minutách inkubace přidáno 0,5 ml 30% kyseliny octové pro zastavení reakce. U jednotlivých vzorků byla měřena absorbance při 405 nm oproti slepému vzorku (roztok frakce a příp. trypsinu nahrazeny odpovídajícím množstvím pufru).

#### **2.4. Afinitní chromatografie na G-protein Sepharose**

Polyklonální králičí sérum (připraveno v laboratoři Doc. V. Jonákové ÚMG AV ČR, 1987) s imunoglobuliny proti inhibitoru akrosinu izolovanému z kančí semenné plasmy (anti-INH) byla přečištěna na G-protein Sepharose (1 ml). Sloupec gelu byl promyt 50 ml PBS (8,77 g NaCl a 2,7 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O v litru vody; pH 7,4) rychlostí 0,4 ml/min. Protilátka anti-INH byla naředěna 1:1 roztokem PBS na objem 1 ml a nanesena na promytou kolonu průtokovou rychlostí 0,2 ml/min. Po nanesení vzorku byl sloupec promýván PBS a byly jímány frakce o objemu cca 4 ml po 20 minutách. U jednotlivých frakcí bylo měřeno množství proteinu při vlnové délce 280 nm na spektrofotometru Helios  $\alpha$  (Thermo Spectronic, Cambridge, VB). Po poklesu absorbance pod hodnotu 0,05 byly proteiny navázané na nosič vytěsněny 0,1 M glycinem (pH 2,8) po 10 minutách průtokovou rychlostí 0,4 ml/min. Jednotlivé frakce byly jímány do zkumavek s přidavkem 200  $\mu$ l 1 M Tris-HCl (pH 9). U frakcí bylo opět stanoveno množství proteinu při 280 nm, vytěšňování bylo ukončeno při poklesu absorbance pod hodnotu 0,01. Jednotlivé vytěsněné frakce byly spojeny dle množství proteinu, označeny jako frakce 1 a frakce 2. Frakce 2 obsahující přečištěnou protilátku byla dialyzována (dialyzační střevo Spectra/Por, 6000 – 8000 ) po dobu 24 hodin proti roztoku PBS při 4°C a poté zamražena. Pro kontrolu byla provedena SDS-PAGE v 10%-ním separačním gelu (kapitola 2.7.).

#### **2.5. Separace frakcí s inhibiční aktivitou pomocí HPLC**

Vysokoučinná kapalinová chromatografie s reversní fází RP HPLC byla použita k dělení proteinových frakcí s inhibiční aktivitou získaných gelovou chromatografií. RP HPLC byla prováděna na přístroji WATERS 626 LC (Milford, MA) při použití analytické kolony VYDAC C-18 TP 104 (4,6 x 250 nm, velikost částic 10  $\mu$ m) v 0,05% trifluoroctové kyseliny (TFA) s gradientem acetonitrilu (ACN) a vodné fáze. Na kolonu byl nanášen 1 mg lyofilizovaného vzorku proteinové frakce rozpuštěný v 1 ml 0,05% TFA.

Průběh lineárního gradientu byl následující:

- 0% → 50% ACN 100 minut
- 50% → 70% ACN 5 minut
- 70% ACN 5 minut isokraticky
- 70% → 0% ACN 5 minut

Průtoková rychlost byla nastavena na 1 ml za minutu, jednotlivé frakce byly měřeny při 226 nm UV detektorem. Získané frakce byly označeny EF3<sub>1</sub> – EF3<sub>12</sub> a EF4<sub>1</sub> – EF4<sub>18</sub> namraženy a lyofilizovány.

## **2.6. Měření koncentrace proteinů ve frakcích po HPLC (Bio-Rad Protein Assay)**

Množství proteinů v jednotlivých frakcích po HPLC bylo určeno pomocí Bio-Rad Protein Assay na mikrotitrační destičce pro stanovení koncentrace proteinů v rozmezí 8 – 80 µg/ml. Prvně byla proměřena kalibrační křivka s použitím různých koncentrací roztoku BSA. Do jednotlivých jamek bylo nanášeno 160 µl roztoku vzorku v 1 mM HCl a 40 µl nezředěného činidla. První čtyři pozice na mikrotitrační destičce byly použity jako slepý vzorek, který místo vzorku obsahoval stejné množství 1 mM HCl. Směsi byly promíchány na destičce a inkubovány 15 minut při laboratorní teplotě. Absorbance vzorků byla proměřena na přístroji SLT spectra (Scholler Pharma, Praha). Koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích byla určena odečtením z kalibrační křivky.

## **2.7. Elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného SDS-PAGE (diskontinuální elektroforéza dle Laemmliho<sup>90</sup>)**

Byl použit přístroj pro elektroforézu Mini-Protean 3 od firmy Bio-Rad (Hercules, USA). Pro elektroforézu proteinů kančí epididymální tekutiny byl použit 15% a 18%-ní separační gel, pro dělení přečištěné protilátky byl použit 10%-ní separační gel.

Příprava 15%-ního separačního gelu:

- 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
- 2,5 ml dest. H<sub>2</sub>O
- 5,0 ml roztoku akrylamidu (obsahujícího 29,2% akrylamidu a 0,8% BIS)
- 100 µl 10% SDS

Příprava 18%-ního separačního gelu:

- 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
- 1,5 ml dest. H<sub>2</sub>O
- 6,0 ml roztoku akrylamidu (obsahujícího 29,2% akrylamidu a 0,8% BIS)

- 100  $\mu$ l 10% SDS

Příprava 10%-ního separačního gelu:

- 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
- 4,16 ml dest. H<sub>2</sub>O
- 3,33 ml roztoku akrylamidu (obsahujícího 29,2% akrylamidu a 0,8% BIS)
- 100  $\mu$ l 10% SDS

Vždy těsně před nalitím gelu mezi skla bylo do roztoku přidáno:

- 4,5  $\mu$ l TEMED
- 35  $\mu$ l 10%-ního APS

Po promíchání byla nalita vrstva gelu mezi skleněné desky. Nalitý gel byl převrstven vodou a nechán polymerovat přibližně 60 minut.

Příprava 4%-ního zaostřovacího gelu:

- 625  $\mu$ l 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
- 1,52 ml destilované H<sub>2</sub>O
- 325  $\mu$ l roztoku akrylamidu
- 25  $\mu$ l 10% SDS.

Těsně před použitím bylo přidáno

- 4,5  $\mu$ l TEMED
- 35  $\mu$ l 10%-ního APS

Po odstranění vody z povrchu separačního gelu byla nalita vrstva zaostřovacího gelu a do ní byl zasunut plastový hřeben pro tvorbu jamek. Roztoky proteinových preparátů o různých koncentracích byly připraveny tak, že k suchým vzorkům bylo přidáno odpovídající množství neredukujícího vzorkového pufru (0,063 M Tris-HCl pufr o pH 6,8 s 10% glycerolem, 2% SDS, 0,0013% bromfenolové modři). Takto připravené vzorky byly inkubovány 2 minuty při 100°C.

Po skončení polymerace byla sestavena aparatura pro elektroforézu. Do katodového i anodového prostoru byl nalit stejný elektrodový pufr (0,0025 M Tris pH 8,3, 0,192 M glycin, 0,1% SDS). Po odstranění hřebenu byly nanášeny vzorky do jednotlivých jamek pomocí Hamiltonovy mikrostřičkačky. Vzorky byly nanášeny v koncentracích 2 – 5  $\mu$ g/ $\mu$ l, příp. 10  $\mu$ g/ $\mu$ l.

Do krajních jamek byly nanášeny roztoky standardů firmy Bio-Rad. Byly použity rekombinantně připravené předbarvené standardy Precision Plus Protein Standards All Blue od firmy Bio-Rad s molekulovými hmotnostmi: 250 000, 150 000, 100 000, 75 000, 50 000, 37 000, 25 000, 20 000, 15 000 a 10 000.

Po nanesení vzorků byly elektrody připojeny k pólům zdroje stejnosměrného stabilizovaného proudu. Jako zdroj elektrického proudu byl použit zdroj POWER PAC 1000 (Bio-Rad, Herkules, USA). Vlastní elektroforéza byla prováděna při konstantním napětí 145 V obvykle po dobu 90 minut (na 2 gely).

### **2.7.1. Vizualizace proteinů v gelu pomocí barvení Coomassie Blue**

Po skončení elektroforézy byly gely propláchnuty destilovanou vodou a barveny přes noc v roztoku barviva Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25 g CBB + 45 ml methanolu + 9 ml kyseliny octové + 45 ml dest. H<sub>2</sub>O), poté byly odbarveny odbarvovacím roztokem (250 ml methanolu + 100 ml kyseliny octové + 650 ml dest. H<sub>2</sub>O) po dobu 6 hodin. Nakonec byly gely ponechány 10 minut ve fixačním roztoku (250 ml methanolu + 50 ml glycerolu + 50 ml kyseliny octové + 150 ml dest. H<sub>2</sub>O) a vysušeny v celofánu.

### **2.7.2. Vizualizace proteinů v gelu pomocí barvení stříbrem**

Jako druhý způsob detekce proteinů v gelu bylo použito barvení stříbrem. Po skončení elektroforézy a po propláchnutí destilovanou vodou byly gely vloženy do fixačního roztoku (50 ml methanolu + 12 ml kyseliny octové + 50 µl 37% formaldehydu + 38 ml dest. H<sub>2</sub>O) na 60 minut (případně přes noc do lednice). Další postup byl následující:

- promytí 3 x 20 minut v 50% ethanolu
- na 1 minutu do roztoku Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5 H<sub>2</sub>O (0,2 g/l)
- promytí destilovanou vodou 3 x 20 sekund
- na 20 minut do roztoku AgNO<sub>3</sub> (0,2 g AgNO<sub>3</sub> + 75 µl 37% formaldehydu, doplněno do 100 ml dest. H<sub>2</sub>O)
- opakované promytí destilovanou vodou 2 x 20 sekund
- na 10 minut vloženy do roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 50 µl 37% formaldehydu + 400 µg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5 H<sub>2</sub>O, doplněno vodou do 100 ml)
- promytí gelů destilovanou vodou 2 x 2 minuty

Detekce byla zastavena vložení gelů na 10 minut do roztoku methanolu a kyseliny octové (50 ml methanolu + 12 ml kyseliny octové + 38 ml dest. H<sub>2</sub>O) a před vysušením v celofánu byly ponechány 10 minut ve fixačním roztoku (250 ml methanolu + 50 ml glycerolu + 50 ml kyseliny octové + 150 ml dest. H<sub>2</sub>O).

## **2.8. 2D-elektroforéza**

### **1. Izoelektrická fokusace jako první rozměr 2D-elektroforézy**

Rehydratace stripů:

Na jeden strip s rozmezím pH 3 – 10 (7 cm) bylo použito 120  $\mu\text{g}$  proteinů, v rehydratačním pufru (8 M močovina, 2% CHAPS, 2% roztok amfolytů - IPG pufr pH 3-10, bromfenolová modř, 20 mM DTT) o celkovém objemu 125  $\mu\text{l}$  na strip. Do jamky bylo napipetováno 125  $\mu\text{l}$  roztoku s proteiny (80  $\mu\text{g}$ ) pro fokusaci, do roztoku byl ponořen strip gelem nahoru a celá jamka byla vyplněna minerálním olejem (PlusOne, DryStrip cover fluid). Jamky byly zakryty víkem a stripy byly rehydratovány 17 hodin při laboratorní teplotě.

Rehydratované stripy byly přemístěny do přístroje pro fokusaci Ettan IPGphor II (Amersham Biosciences, Vídeň, Rakousko), opět zality minerálním olejem a za podmínek maximálního proudu 60  $\mu\text{A}$ /strip a postupného zvyšování napětí do hodnoty minimálně 6 kVh. Po dosažení hodnoty 6 kVh, byly stripy vyjmuty a zamraženy při  $-20^{\circ}\text{C}$  před dalším zpracováním.

Před SDS-PAGE byl strip promyt 20 minut v ekvilibračním pufru (6 M močovina, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 20% glycerol, 2% SDS) s 10 mg/ml DTT a poté 20 minut v ekvilibračním pufru s přídavkem jodacetamidu 20 mg/ml na třepačce při laboratorní teplotě.

### **2. SDS-PAGE jako druhý rozměr 2D-elektroforézy**

Separční (15%-ní) i zaostřovací gel byl připraven stejně jako při SDS-elektroforéze (viz kapitola 2.7.). Do zaostřovacího gelu byl vložen plastový hřeben pro tvorbu jamky pro umístění stripu. Další průběh 2D-elektroforézy byl stejný jako u jednorozměrné elektroforézy (kapitola 2.7.). Vizualizace proteinů byla provedena stříbrem (kapitola 2.7.2.)

## **2.9. Přenos proteinů rozdělených SDS-elektroforézou na PVDF-membránu a NC-membránu**

Okamžitě po skončení elektroforézy byl gel ekvilibrován v transferovém pufru (0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 20% methanol, pH 8,2). PVDF-membrána byla propláchnuta 100% methanolem (2-3 sekundy), pak destilovanou vodou a 15 minut inkubována v transferovém pufru spolu s houbami a filtračními papíry Whatman. NC-membrána (nitrocelulózová) byla inkubována přímo v transferovém pufru bez předešlého promytí methanolem. Gel byl vložen spolu s membránou do kazety mezi dvě vrstvy filtračních papírů a dvě houby z obou stran tak, aby mezi gelem a membránou nebyly bubliny.

Kazeta byla vložena do přístroje pro elektropřenos od firmy Bio-Rad (Herkules, USA).

Přístroj byl naplněn transferovým pufrem a byla přidána nádržka s ledem, která sloužila jako chladič. Po obložení ledem byl přístroj připojen ke zdroji stejnosměrného proudu. Proud byl nastaven na konstantní hodnotu 0,5 A, elektropřenos probíhal 1,5 hodiny. Po ukončení elektropřenosu byla NC-membrána byla promyta v destilované vodě. PVDF-membrána byla promyta v redestilované vodě a obarvena Coomassie Brilliant Blue R-250 po dobu 5 minut a odbarvena roztokem 50% methanolu s 10% kyselinou octovou. Poté byla membrána usušena a uchována v mrazáku mezi filtračními papíry.

## **2.10. Imunodetekce proteinů na membráně pomocí polyklonální protilátky**

Po ukončení přenosu proteinů z gelu na membránu, promytí membrány destilovanou vodou a promytí promývacím roztokem (PBS s přidavkem 0,05% Tweenu) byla membrána blokována 90 minut blokačním činidlem (2% BSA v PBS). Poté byla membrána promyta promývacím roztokem po dobu 10 minut.

Membrána byla inkubována 1 hodinu s přečištěnou primární polyklonální protilátkou proti inhibitoru izolovanému z kančí semenné plasmy ředěnou PBS v poměru 1 : 100 při laboratorní teplotě za mírného třepání. Pak byla membrána promývána 4 x 5 minut promývacím roztokem (PBS + 0,05% Tween). Dále byla membrána inkubována se sekundární protilátkou SwAR/Px ředěnou promývacím roztokem 1 : 8 000 po dobu 60 minut. Poté byla membrána opět promývána 5 x 5 minut promývacím roztokem.

Detekce proteinů byla provedena pomocí 4-chlor-1-naftolu. Promytá membrána byla vložena do čerstvě připraveného substrátového roztoku (5 mg pevného 4-chlor-1-naftolu rozpuštěného ve 200  $\mu$ l DMF bylo přidáno do 10 ml 0,01 M Tris-HCl pH 7,4 s 100  $\mu$ l  $\text{CoCl}_2$ ). Těsně před použitím substrátového roztoku bylo přidáno 33  $\mu$ l 33% peroxidu vodíku. Enzymová reakce byla zastavena promytím membrány větším množstvím destilované vody. Membrána byla usušena a skladována v chladu.

## **2.11. Zymografická detekce proteinas v kančí epididymální tekutině**

Byla provedena elektroforéza dle Laemmliho (kapitola 2.7.) s použitím 18%-ního polyakrylamidového gelu s kopolymerovanou želatinou.

Příprava 15%-ního separačního gelu:

- 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pufru o pH 8,8
- 5,0 ml roztoku akrylamidu (obsahujícího 29,2% akrylamidu a 0,8% BIS)

- 2,5 ml dest. H<sub>2</sub>O
- 2,25 mg/ml želatiny

Zaostřovací gel byl připraven dle návodu popsaného v kapitole 2.7. Do jamek byly nanášeny vzorky (frakce po gelové chromatografii EF<sub>1</sub> – EF<sub>4</sub>) v koncentracích 2-10 µg/µl.

Po skončení elektroforézy byly gely promyty v 2,5% Tritonu X-100, a to 3 x 20 minut. Poté promyty destilovanou vodou a inkubovány v pufru (50 mM Tris-HCl pH 8,4, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) při 37°C po dobu 20 hodin. Pro detekci serinových proteinas byla do inkubačního pufru přidána EDTA o koncentraci 5 mM jako inhibitor metaloproteinasy, pro detekci metaloproteinasy byl přidán benzamidin o koncentraci 10 mM inhibitor serinových proteinas. Celkové proteinasy byly stanoveny bez přídavku inhibitoru. Po inkubaci byly gely promyty 2x destilovanou vodou a barveny přes noc v Coomassie Blue R-250 a odbarveny (kapitola 2.7.1.). Jako pozitivní kontrola (není ukázáno ve výsledcích) byla použita serinová proteinasa akrosin izolovaná z kyselého extraktu ejakulovaných kančích spermií v laboratoři Doc. V. Jonákové.

## **2.12. Reversní zymografie pro detekci inhibitorů akrosinu a metaloproteinasy MMP-9<sup>91</sup>**

Byla provedena elektroforéza dle Laemmliho (kapitola 2.7.) s použitím 18%-ního polyakrylamidového gelu s kopolymerovanou želatínou a enzymem.

Příprava 18%-ního separačního gelu:

- 2,5 ml 1,5M Tris-HCl pufru o pH 8,8
- 6,0 ml roztoku akrylamidu (obsahujícího 29,2% akrylamidu a 0,8% BIS)
- 1,5 ml destilované vody
- 2,25 mg/ml želatiny
- 160 ng/ml akrosinu, resp. myší MMP-9<sup>2</sup>

Zaostřovací gel byl připraven dle návodu popsaného v kapitole 2.7. Do jamek byly nanášeny vzorky (frakce po HPLC EF<sub>31</sub> – EF<sub>312</sub>, EF<sub>41</sub> – EF<sub>418</sub>) v koncentracích 2-5 µg/µl.

Po skončení elektroforézy byly gely promyty v 2,5% Tritonu X-100 3 x 20 minut. Poté promyty destilovanou vodou a inkubovány v pufru (50 mM Tris-HCl; pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) při 37°C po dobu 15 hodin. Pak byly gely promyty 2x destilovanou vodou a barveny v Coomassie Blue R-250 přes noc a odbarveny (kapitola 2.7.1.). Jako pozitivní kontrola pro detekci inhibitorů akrosinu byl použit inhibitor izolovaný ze semenné plasmy (není ukázáno ve výsledcích).



### 2.13. Izolace RNA

Izolace RNA byla provedena pomocí kitu RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (50) od firmy QIAGEN dle přiloženého návodu.

Z každého reprodukčního orgánu bylo skalpelem odříznuto 50 – 120 mg tkáně a ihned přidán 1 ml lyzačního činidla (QIAzol Lysis Reagent). Takto bylo ponecháno po dobu 5 minut při laboratorní teplotě a homogenizováno teflonovým homogenizátorem po dobu 20-40 sekund (prováděno v digestoři) a ponecháno 5 minut při laboratorní teplotě. Poté byl přidán ke každému vzorku 200  $\mu$ l chloroformu a směs byla promíchávána při laboratorní teplotě a ponechána 3 minuty stát. Poté byla směs centrifugována 14000 rpm 15 minut při 4°C.

Směs se rozdělila na tři fáze:

- horní bezbarvá vodná fáze obsahující RNA
- interfáze bílé barvy obsahující denaturované proteiny a DNA
- spodní fenolová fáze obsahující proteiny (byla dále použita pro proteinové extrakty z tkání kančích reprodukčních orgánů)

Bylo odděleno 600  $\mu$ l vodné fáze obsahující RNA, smícháno se stejným objemem 70% ethanolu a promícháváno. Ihned poté odebráno 700  $\mu$ l směsi do kolonky se sběrnou nádobkou (RNasy Mini Spin Column) a centrifugováno při 8000 x g po dobu 15 sekund při laboratorní teplotě. Po vyprázdnění sběrné kolonky byla centrifugace opakována se zbylým množstvím směsi. RNA zachycena na kolonce byla dále promývána. Bylo přidáno 700  $\mu$ l pufru RW1 a centrifugováno při 8000 x g po dobu 15 sekund při laboratorní teplotě. Poté byla kolonka přemístěna do nové sběrné nádoby a bylo přidáno 500  $\mu$ l pufru RPE a znovu centrifugováno při 8000 x g po dobu 15 sekund při laboratorní teplotě. Znovu bylo přidáno 500  $\mu$ l pufru RPE a znovu centrifugováno při 8000 x g po dobu 2 minut při laboratorní teplotě. Poté byla kolonka přemístěna opět do nové sběrné nádoby a bylo přidáno 55  $\mu$ l vody (RNasy Free Water) a centrifugováno 1 minutu při 8000 x g, aby byla vytěsněná RNA zachycená na kolonce. Vytěsňování bylo ještě jednou zopakováno a byla získána celková RNA.

### 2.14. Izolace proteinů z tkání

Po izolaci RNA fenol-chloroformovou extrakcí byla získána fenolová frakce obsahující proteiny a interfáze obsahující DNA. K těmto dvěma fázím bylo přidáno 0,6 ml 95%-ního ethanolu pro vysrážení přítomné DNA, zamícháno a centrifugováno při 2000 x g po dobu 5 minut při 4°C. Supernatant byl rozdělen do dvou zkumavek a ke každé zkumavce byl přidán 1 ml isopropanolu, promícháno a inkubováno 10 minut při laboratorní

teplotě. Poté centrifugováno při 12000 x g po dobu 10 minut při 4°C. Získaná peleta byla omyta 1,35 ml 0,3 M roztokem guanidinu v 95% ethanolu, a to celkem 3x. Vždy po přidání promývacího roztoku byla peleta inkubována po dobu 20 minut při laboratorní teplotě a poté centrifugována při 7500 x g po dobu 5 minut při 4°C. Nakonec bylo k peletě přidáno 1,35 ml 100%-ního ethanolu, inkubováno 20 minut při laboratorní teplotě a naposledy centrifugováno při 7500 x g po dobu 5 minut při 4°C. Peleta byla dále vysušena a nakonec rozpuštěna v neredukujícím vzorkovém pufru.

## 2.15. Detekce genové exprese

RT PCR je metoda určená pro získávání cDNA reversní transkripcí z mRNA, která je následována amplifikací DNA pomocí PCR. Reversní transkripce je zprostředkována reversní transkriptasou, která je aktivní při nižší teplotě než *Taq* DNA polymerasa (obvykle při 42°C). Zahřátím RT PCR směsi po reversní transkripci na vysokou teplotu (95°C) se před DNA amplifikací inaktivuje reversní transkriptasa a zároveň dojde k disociaci cDNA od mRNA.

Základem PCR metody je opakování třech po sobě jdoucích kroků s řízenými teplotními a časovými podmínkami. Jeden cyklus je složen z těchto kroků:

- denaturace templátu
- nasedání primerů k templátu
- prodlužování DNA řetězce směrem od primerů (elongace)

Obvykle bývá tento cyklus opakován alespoň 30x.

### 2.15.1. Syntéza cDNA

Manipulace s RNA byla prováděna sterilně ve flow-boxu. Celková RNA z kančích reprodukčních orgánů izolovaná pomocí RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (50) od firmy QIAGEN byla dále použita k přepisu na cDNA. Množství celkové RNA bylo určeno spektrofotometricky při 260 nm (optimální hodnota  $A_{260}$  mezi 0,15 – 1,5). Čistota RNA byla určena poměrem  $A_{260}/A_{280}$ , tento poměr by neměl být pod hodnotou 1,7. Vždy k 1 µg dané RNA byl přidán 1 µl roztoku DNasy s přídavkem  $MgCl_2$  a doplněn vodou (RNasy Free Water) do objemu 10 µl. Směs byla inkubována 30 minut při 37°C. Poté byl ke směsi přidán 1 µl inhibitoru EDTA (25 mM) a směs inkubována 10 minut při 65°C. Pak bylo k směsi přidáno:

- 8 µl 5x reakčního pufru
- 20 µl 10 mM 4 dNTP Mix
- 0,3 µl inhibitoru RNasin (40 U/µl)
- 1 µl oligo(DT)18

- 100 U reversní transkriptasy M-MuLV
- 0,2 µl vody (RNasy-free Water)

Tato směs byla inkubována 60 minut při 42°C a reakce byla ukončena zahřátím na 70°C po dobu 10 minut. Poté byla směs zchlazena a získaná cDNA byla uchována při -20°C.

### 2.15.2. Polymerázová řetězová reakce

Ke 3 µl templátové cDNA získané přepisem RNA izolované z reprodukčních orgánů kance bylo přidáno:

- 2,5 µl reakčního pufru 10x koncentrovaného
- 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 2,5 µl dNTP's (2 mM)
- 0,5 µl ,forward' primeru pro INH (5 pmol)
- 0,5 µl ,reverse' primeru pro INH (5 pmol)
- 1 µl enzymu *Taq* DNA Polymerase LC (1 U/µl)
- 14 µl H<sub>2</sub>O (Water Nuclease-free)

Specifický primery o nukleotidové sekvenci 5' TACGCCAATCCCTGCATATT 3' a 3' AAGGCGCTGTCAGTTCATCT 5' byly navrženy dle známé cDNA inhibitoru akrosinu kančí semenné plasmy (INH)<sup>86</sup>. Teplota tání (T<sub>M</sub>) byla u obou 64,3°C a fragment syntetizovaný pomocí těchto dvou primerů měl velikost 201 bp. Tato směs byla dobře promíchána, vložena do PCR cycleru Techne Touchgene Gradient (Techne, Cambrige, VB) a reakce probíhala dle programu:

<u>92°C</u>	<u>5 min</u>	1x
92°C	30 s	
60°C	30 s	30x
<u>72°C</u>	<u>3 min</u>	
72°C	5 min	1x

Získaný úsek DNA byl analyzován pomocí agarosové elektroforézy.

### 2.15.3. Agarosová elektroforéza

Bylo připraveno 150 ml 2%-ního roztoku agarosy v pufru TAE (40 mM Tris; pH 8,0; 20 mM kyselina octová; 1 mM EDTA). Roztok byl povařen dokud se agarosa zcela nerozpustila, zchlazen a nalit ve vrstvě asi 1 cm silné do horizontální elektroforetické komůrky. Agarosa se nalévá do prostoru ohraničeného postranními plastovými deskami.

Byly zasunuty plastové hřebeny pro tvorbu jamek. Po ztuhnutí byl gel přenesen do nádoby pro elektropřenos a ponořen do TAE pufru. Poté bylo nanášeno 5  $\mu$ l získané DNA smíchané s barvičkou 6x Loading Dye a 8  $\mu$ l standardu GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 80 V po dobu 40 minut. Poté byl gel obarven v roztoku 0,5  $\mu$ g/ml ethidium bromidu po dobu 20 minut. Gely byly prohlíženy na UV transluminátoru (Herolab GmbH, Wiesloch, Německo) při vlnové délce 320 nm a vyfocen přístrojem Polaroid DS34 (Polaroid, Bílina, ČR).

## **2.16. Imunofluorescence**

Připravené řezy 3  $\mu$ m z kančích reprodukčních orgánů (ÚŽFG AV ČR, Liběchov) na podložních sklech byly fixovány po dobu 10 minut ve vymraženém acetonu. Před použitím byla skla s tkáňovými řezy a se spermii opláchnuta PBS. Přečištěná primární polyklonální protilátka anti-INH byla naředěna 1:10 roztokem PBS a nanášena na preparáty. Inkubace probíhala ve vlhké komůrce 60 minut při 37°C v termostatu. Současně byla prováděna negativní kontrola bez primární protilátky, preparát byl inkubován s roztokem PBS. Po odmytí protilátky pomocí PBS byla na preparáty nanášena sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům značená fluoresceinem isothiokyanátem (FITC) ředěná 1:160 roztokem PBS. Skla byla inkubována 45 minut při 37°C ve vlhčené komůrce. Po inkubaci byla promyta roztokem PBS a destilovanou vodou. Dále byly preparáty inkubovány 15 minut s Vectashield H-1000 s DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate) a pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem Nikon (Nikon, Tokyo, Japan) při zvětšení 200x a 1000x (s použitím imerzního oleje). K hodnocení a ukládání obrázků byla použita COHU4 CCD kamera (Inc. Electronics Division, San Diego, USA) a obrazová analýza LUCIA (Laboratory Imaging, Ltd., Praha, ČR).

### **2.16.1. Zpracování kančích spermií**

Ejakulát o objemu cca 100 ml v pětidenním médiu (14,3 mM hydrogenuhličitan sodný, 12,25 mM, citrát sodný, 364 mM glukosa, 12,3 mM EDTA, pH 7,5) byl rozdělen do dvou plastových zkumavek a centrifugován 15 minut při 200 x g. Peleta obsahující spermie byla 2 x promyta roztokem TBS (130 mM NaCl, 20 mM Tris; pH 7,4) centrifugací při 200 x g vždy 10 minut. Promyté spermie byly velice opatrně resuspendovány ve 2 – 4 ml roztoku TBM (113 M NaCl, 3 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris, 11 mM D-glukóza, 5 mM pyruvát). Spermie v roztoku TBM byly nanášeny na Percollový gradient (od spodu 2 ml 80% Percollu v TBM, pak opatrně převrstveny 1,5 ml 70% Percollu, 1,5 ml 55% Percollu a nakonec 2 ml 40% Percollu). Gradient se spermii byl centrifugován 60 minut

při 200 x g. Spermie z 80% Percollu (nejpohyblivější) byly 2x promyty v TBM při 200 x g vždy 10 minut.

Koncentrace spermií byla následně stanovena počítáním v Maklerově komůrce (plocha čtverce - 0,01 mm<sup>2</sup>, hloubka - 10 μm) pod světelným mikroskopem (Meopta, Praha, ČR). Opakovaně bylo spočítáno množství spermií v 10-ti čtverečcích mřížky, z jednotlivých počtů byl spočítán průměr. Výsledné číslo vyjadřovalo počet buněk x 10<sup>6</sup> v 1 ml objemu.

Spermie naředěny tak, aby koncentrace spermií byla cca 2 x 10<sup>8</sup> v 1 ml. Na sklo byly v tenké vrstvě nanесeny dvě kapky roztoku spermií o objemu 15 μl. Po zaschnutí bylo sklo se spermiemi použito k nepřímé imunofluorescenci.

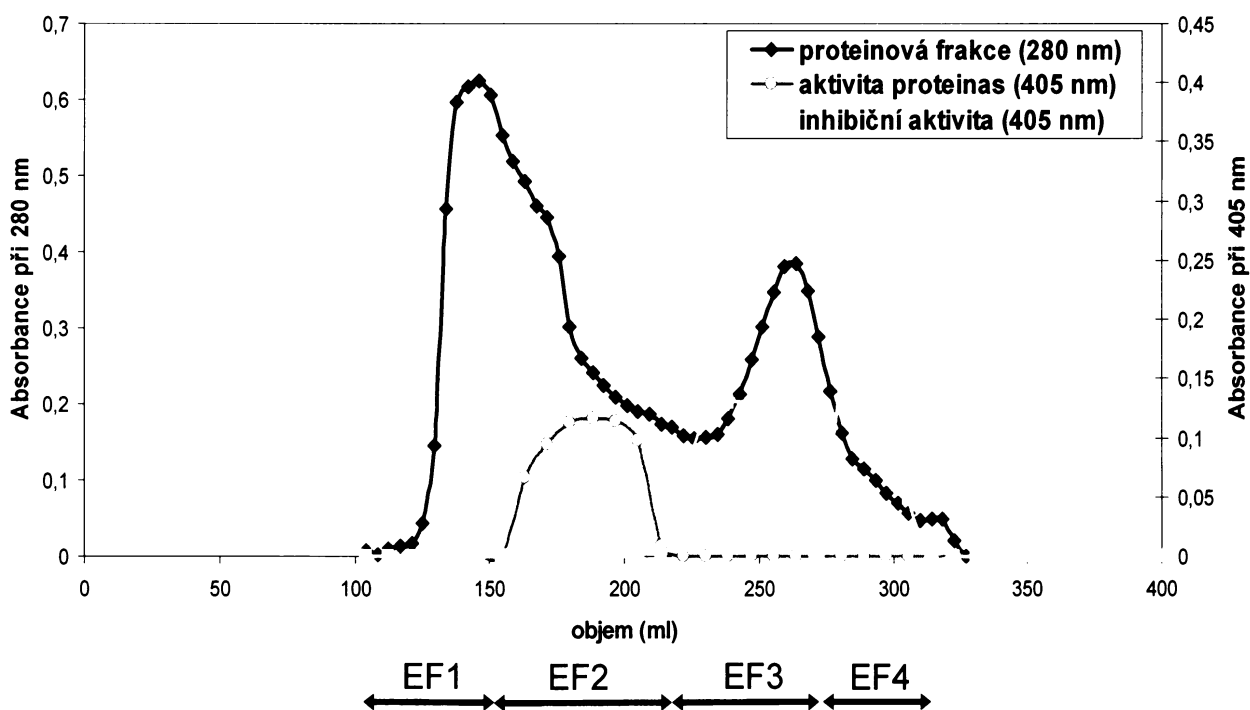
### **2.17. Stanovení N-terminální aminokyselinové sekvence**

N-terminální aminokyselinová sekvence proteinových vzorků byla prováděna Edmanovým odbouráváním v laboratoři Ing. Voburky ÚOCHB AV ČR na automatickém sekvenátoru Procise. Vzniklé fenylothiohydantoinové deriváty byly sekvenátorem analyzovány pomocí HPLC. Analyzované proteinové vzorky byly vyříznuty z PVDF-membrány (kapitola 2.9.).

### 3. Výsledky

#### 3.1. Gelová chromatografie kančí epididymální tekutiny

Pomocí gelové chromatografie na koloně Sephadexu G-75 M (kapitola 2.2.) byla epididymální tekutina kance rozdělena do čtyř frakcí dle molekulové hmotnosti. Frakce byly označeny EF1, EF2, EF3 a EF4. Dělení bylo provedeno Dr. P. Maňáskovou v laboratoři Doc. V. Jonákové, ÚMG AV ČR. Průběh dělení (obr. 3.1) byl sledován měřením absorbance při 280 nm, tzn. stanovením proteinové frakce. V jednotlivých frakcích byla stanovena inhibiční aktivita pro serinové proteiny trypsinového typu a aktivita serinových proteinas tohoto typu měřením absorbance při 405 nm (kapitola 2.3.). Jednotlivé frakce byly lyofilizovány a uchovány při 4°C pro další použití. Ve frakcích EF1 a EF2 byla nalezena aktivita serinových proteinas, zatímco inhibiční aktivita byla stanovena ve frakcích EF3 a EF4 (obr. 3.1).

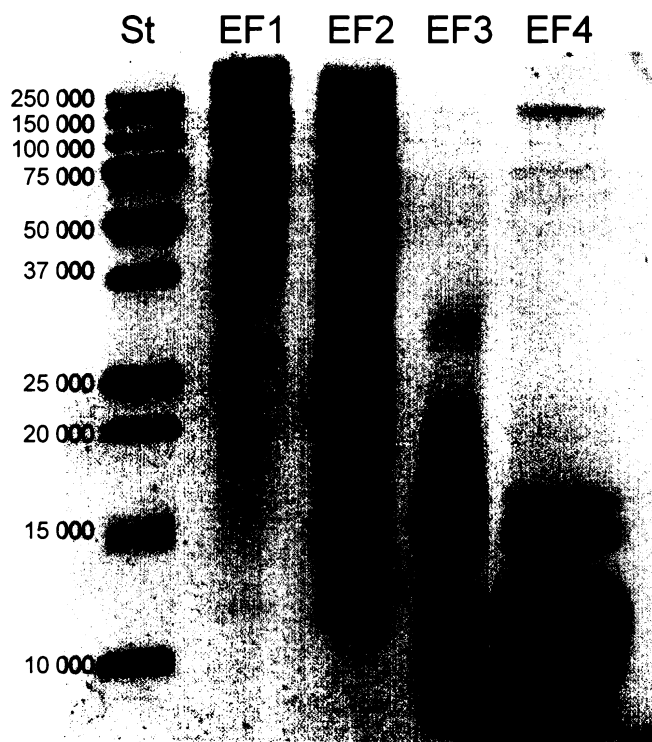


obr. 3.1 Gelová chromatografie kančí epididymální tekutiny na Sephadexu G-75 M

červená křivka ukazuje průběh chromatografie vyjádřené hodnotami  $A_{280}$  (proteinová frakce); oranžová křivka odpovídá aktivitě serinových proteinas frakcí měřené při 405 nm; žlutá křivka odpovídá inhibiční aktivitě frakcí vyjádřené hodnotami  $A_{450}$  (získanými odečtením standardu  $A_{450} = 0,4$ ); šipkami je naznačeno spojení jednotlivých frakcí EF1, EF2, EF3 a EF4; dělení bylo prováděno v prostředí 1,5%-ní kyseliny octové (pH 3)

### 3.2. SDS-PAGE frakcí po gelovou chromatografií

Byla provedena SDS-elektroforéza (kapitola 2.7.) frakcí získaných gelovou chromatografií kančí epididymální tekutiny. Výsledek elektroforézy je znázorněn na obrázku 3.2. Ve frakci EF1 jsou převážně vysokomolekulární proteiny s relativní molekulovou hmotností 50 000 – 100 000, ve frakci EF2 proteiny s relativní molekulovou hmotností v rozmezí 10 000 – 100 000, ve frakci EF3 10 000 – 25 000 a ve frakci EF4 pak převážně nízkomolekulární proteiny s molekulovou hmotností kolem 10 000.



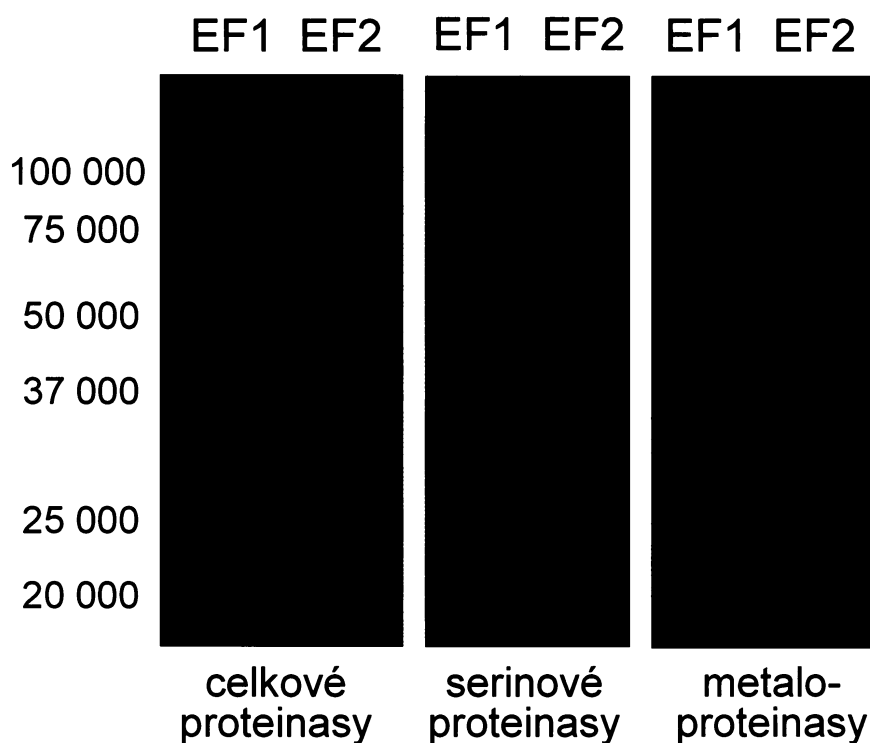
obr. 3.2 SDS-elektroforéza frakcí kančí epididymální tekutiny získaných gelovou chromatografií

15%-ní polyakrylamidový separační gel; nanášené množství vzorků rozpuštěných v neredukujícím pufru obsahovalo 2-5  $\mu\text{g}$  proteinu; nanášené množství roztoku standardů (St) bylo 5  $\mu\text{l}$

### 3.3. Detekce proteolytické aktivity frakcí EF1 a EF2 pomocí substrátové zymografie

Po gelové chromatografii epididymální tekutiny byla v jednotlivých frakcích stanovena proteolytická aktivita. Aktivita proteinas byla nalezena ve frakci EF2 a částečně také ve frakci EF1 (kapitola 2.2., obr. 3.1, str. 43). Na základě těchto výsledků byla provedena substrátová zymografie (kapitola 2.11.) vysokomolekulárních frakcí kančí epididymální pro další charakterizaci proteinas a jejich aktivity. Metoda je založena na

principu barvení nerozštěpeného substrátu (želatiny) po inkubaci gelu s elektroforeticky rozdělenými proteiny v inkubačním pufru. Takto byla určena celková aktivita proteinas ve frakcích EF1 a EF2 (obr. 3.3). Pro zjištění aktivity metaloproteinas byla k inkubačnímu pufru přidána EDTA (inhibitor metaloproteinas); pro zjištění aktivity serinových proteinas byl k inkubačnímu pufru přidán benzamidin (inhibitor serinových proteinas). Z obrázku 3.3 je patrné, že frakce EF1 a EF2 epididymální tekutiny kance obsahují serinové proteiny (Mr~30 000 a Mr~40 000) i metaloproteiny (Mr~60 000). Jako pozitivní kontrola byla použita serinová proteinasa akrosin izolovaná z kyselého extraktu ejakulovaných kančích spermií (není ukázáno).



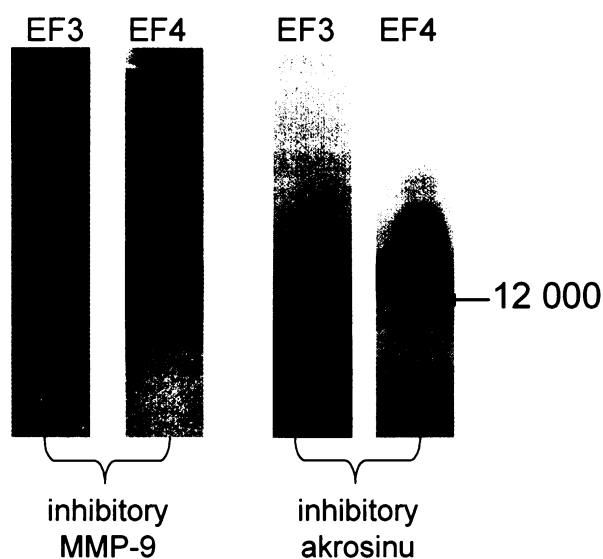
**obr. 3.3 Substrátová zymografie frakcí EF1 a EF2**

*světlé pruhy ukazují na přítomnost proteolytických enzymů; celkové proteiny ukazují aktivitu proteolytických enzymů bez přidání inhibitoru do inkubačního média; serinové proteiny vykazují aktivitu i po přidání inhibitoru EDTA (inhibitor metaloproteinas); metaloproteiny vykazují aktivitu i po přidání benzamidinu (inhibitoru serinových proteinas); nanášené množství proteinů 10 µg v neredukujícím vzorkovém pufru; barveno Coomassie Blue*



### 3.4. Detekce inhibitorů akrosinu a MMP-9 ve frakcích EF3 a EF4 pomocí reversní substrátové zymografie

Inhibiční aktivita pro proteínasy byla nalezena ve frakcích EF3 a EF4 po gelové chromatografii epididymální tekutiny kance (kapitola 2.2., obr. 3.1, str. 43). Byla provedena reversní substrátová zymografie těchto dvou frakcí pro další charakterizaci inhibitorů akrosinu a MMP-9 (kapitola 2.12.). Metoda je založena na principu štěpení substrátu (želatiny) enzymem, kdy enzym i substrát jsou zapolymerovány v polyakrylamidovém gelu s elektroforeticky rozdělenými proteiny. Přítomnost inhibitorů zapolymerovaného enzymu brání štěpení substrátu a na gelu jsou po obarvení viditelné modré pruhy. Aktivita inhibitorů metaloproteinás byla sledována na základě publikovaných informací o výskytu MMP-9 v kančím epididymu<sup>56</sup>. Pro aktivitu inhibitorů akrosinu byl použit akrosin izolovaný z kyselého extraktu ejakulovaných kančích spermií. Z obrázku 3.4 je vidět, že inhibitory akrosinu i MMP-9 se v epididymální tekutině kance vyskytují, a to v obou jejích nízkomolekulárních frakcích EF3 a EF4. Oba tyto inhibitory mají relativní molekulovou hmotnost kolem 12 000. Jako pozitivní kontrola pro detekci inhibitorů akrosinu byl použit inhibitor izolovaný ze semenné plasmy (není ukázáno).

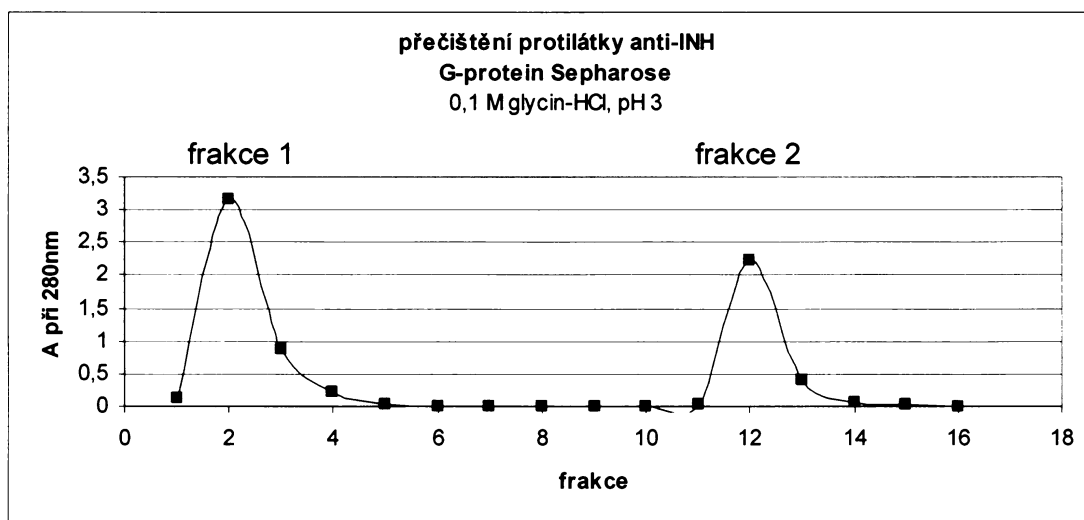


obr. 3.4 **Reversní substrátová zymografie frakcí EF3 a EF4 získaných gelovou chromatografií**

*tmavé pruhy ukazují na přítomnost inhibitorů proteolytických enzymů; pro detekci inhibitorů MMP-9 byly použity gely se zapolymerovanou želatinou a enzymem; pro detekci inhibitorů akrosinu byly použity gely se zapolymerovanou želatinou a kančím; nanášené množství vzorků bylo 5  $\mu$ g*

### 3.5. Přečištění polyklonální protilátky anti-INH na G-protein Sepharose

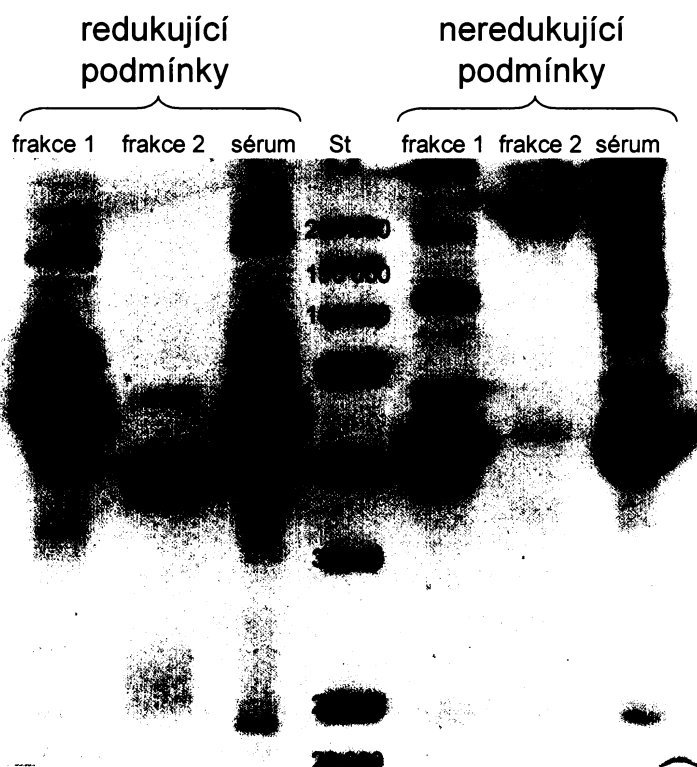
Pro další experimenty byla použita polyklonální protilátka proti inhibitoru akrosinu izolovanému z kančí semenné plasmy (INH). Tato polyklonální protilátka (anti-INH) byla přečištěna na G-protein Sepharose (kapitola 2.4.). Průběh afinitní chromatografie je znázorněn na obrázku 3.5. Frakce 2 vytěsněná 0,1 M glycinem obsahující přečištěnou protilátku byla dialyzována po dobu 24 hodin proti roztoku PBS při 4°C.



obr. 3.5 Afinitní chromatografie polyklonální protilátky anti-INH na G-protein Sepharose

1 ml G-protein Sepharose, frakce 2 obsahující přečištěnou protilátku byla vytěsněna 0,1 M roztokem glycin-HCl (pH 3)

Pro potvrzení čistoty byly obě frakce elektroforeticky rozděleny (SDS-PAGE, kapitola 2.7.), a to v redukujících i neredukujících podmínkách (obr. 3.6, str. 48). Frakce 2 obsahuje imunoglobulin, který je v redukujících podmínkách štěpen na fragment o relativní molekulové hmotnosti přibližně 50 000 (těžký řetězec) a fragment o relativní molekulové hmotnosti přibližně 25 000 (lehký řetězec). Nerozštěpený imunoglobulin má relativní molekulovou hmotnosti kolem 250 000, jak je vidět v neredukujících podmínkách. Takto přečištěná protilátka byla dále používána pro imunodetekci a nepřímé imunofluorescenci na kančích spermích a na řezech kančích reprodukčních orgánů.



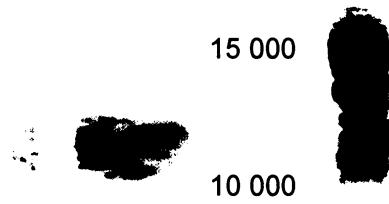
obr. 3.6 SDS-PAGE frakcí po G-protein Sepharose

10%-ní separační gel, nanášené množství vzorků rozpuštěných v neredukujícím i redukujícím vzorkovém pufru obsahovalo 5  $\mu$ g proteinů a nanášené množství roztoku standardů (St) bylo 5  $\mu$ l

### 3.6. Imunodetekce inhibitoru akrosinu ve frakcích po gelové chromatografii

Zaměřili jsme se na detekci inhibitoru akrosinu původně izolovaného z kančí semenné plasmy<sup>67</sup> ve frakcích získaných gelovou chromatografií epididymální tekutiny kance. Imunodetekce byla provedena na nitrocelulóзовé membráně (kapitola 2.10.) pomocí přečištěné polyklonální protilátky anti-INH (obr. 3.7, str. 49). Pozitivní reakce s polyklonální protilátkou byla nalezena v obou nízkomolekulárních frakcích epididymální tekutiny EF3 a EF4 s proteinem v oblasti o relativní molekulové hmotnosti 12 000. Jako pozitivní kontrola byl použit inhibitor akrosinu izolovaný z kančí semenné plasmy.

EF3 EF4 St INH



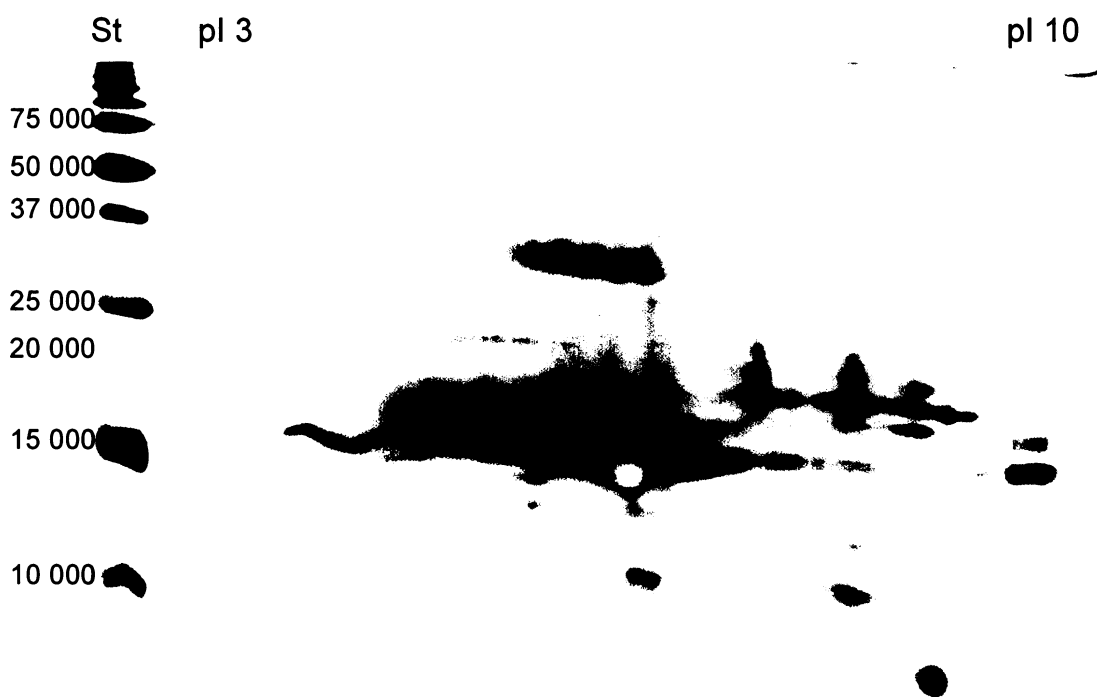
**obr. 3.7** *Imunodetekce frakcí epididymální tekutiny po gelové chromatografii přečištěná polyklonální protilátka anti-INH ředěná 1:1000; INH jako pozitivní kontrola; nanášené množství vzorků EF3 a EF4 bylo 5  $\mu$ g; nanášené množství standardu (St) 5  $\mu$ l*

### 3.7. Proteinová charakterizace frakcí po gelové chromatografii epididymální tekutiny s inhibiční aktivitou

Pro přesnější charakterizaci a případnou identifikaci inhibitorů proteinas ve frakcích EF3 a EF4 získaných gelovou chromatografií epididymální tekutiny kance byly tyto frakce dále rozděleny 2D-elektroforézou, popřípadě pomocí HPLC na reversní fázi a v takto získaných frakcích byly hledány inhibitory akrosinu a MMP-9 pomocí reversní substrátové zymografie a inhibitor semenné plasmy pomocí imunodetekce se specifickou polyklonální protilátkou.

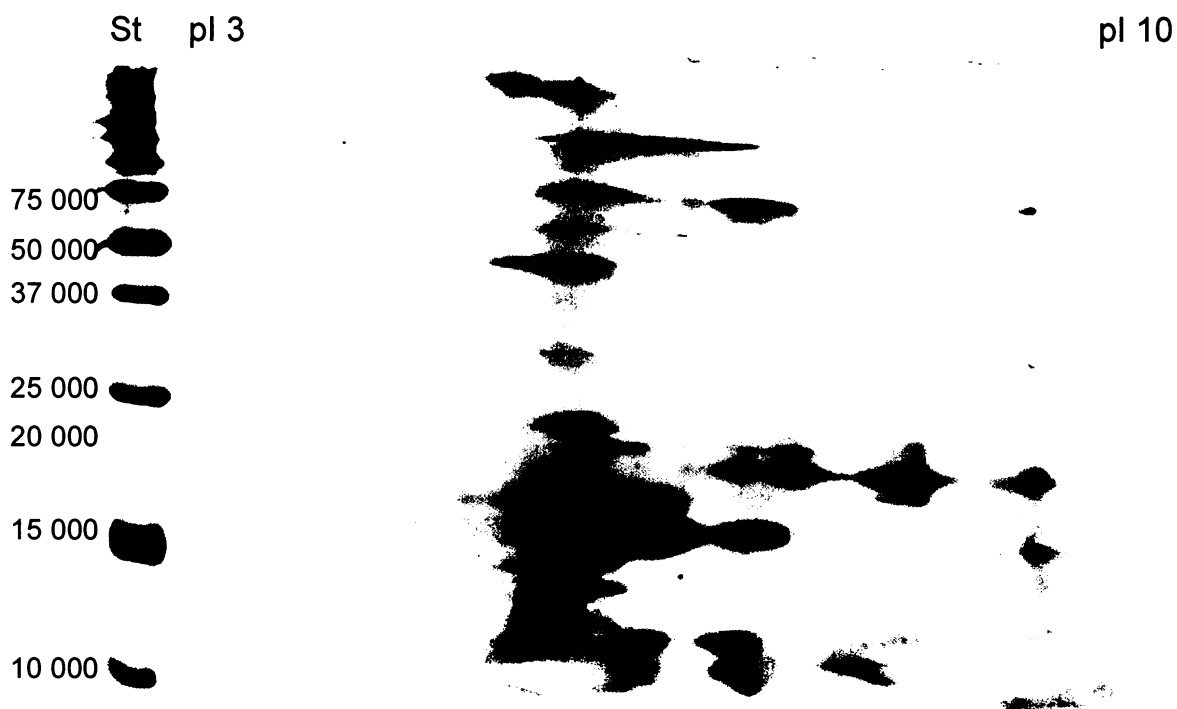
#### 3.7.1. 2D-elektroforéza frakcí EF3 a EF4

Byla provedena 2D-elektroforéza frakcí EF3 a EF4 z epididymální tekutiny kance (kapitola 2.8.). V prvním rozměru byly proteiny rozděleny podle svých izoelektrických bodů. Ve frakci EF3 mají proteiny pI v rozsahu 3-10 (obr. 3.8), ve frakci EF4 v rozsahu pI 5-10 (obr. 3.9, str. 51). Jako druhý rozměr bylo použito dělení pomocí SDS-PAGE v 15%-ním separačním gelu. Vizualizace proteinů byla provedena barvením stříbrem (kapitola 2.7.2.)



**obr. 3.8 2D-elektroforéza frakce EF3 po gelové chromatografii**

*první rozměr dělení dle pI; druhý rozměr SDS-PAGE 15% separační gel; nanášené množství vzorku na první rozměr 120  $\mu$ g; nanášené množství standardu 5  $\mu$ l*

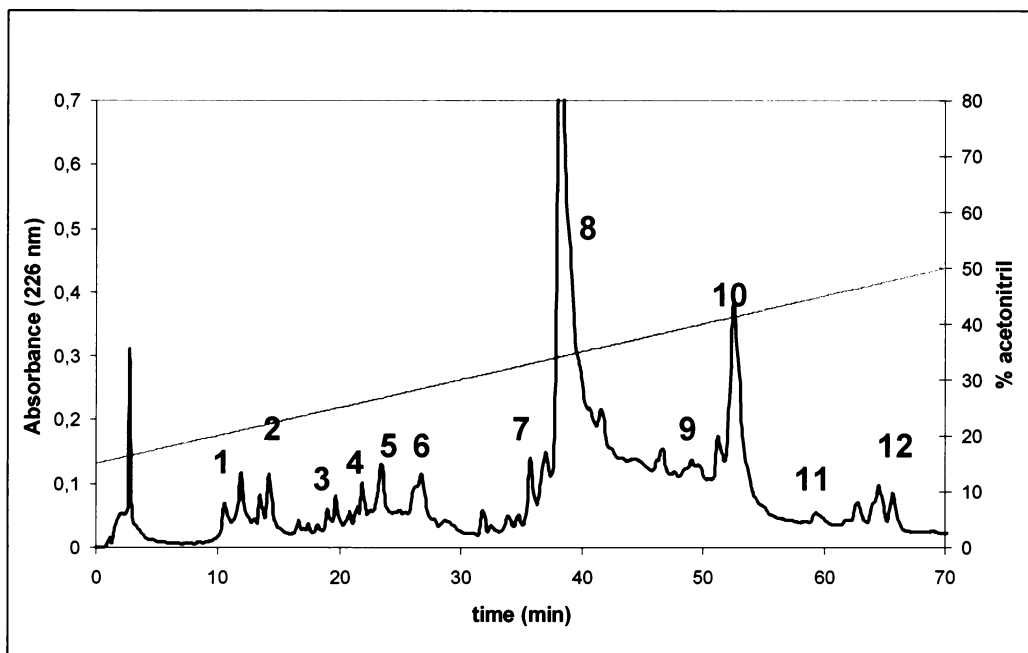


**obr 3.9 2D-elektroforéza frakce EF4 po gelové chromatografii**

*první rozměr dělení dle pI; druhý rozměr SDS-PAGE 15% separační gel; nanášené množství vzorku na první rozměr 120  $\mu$ g; nanášené množství standardu 5  $\mu$ g*

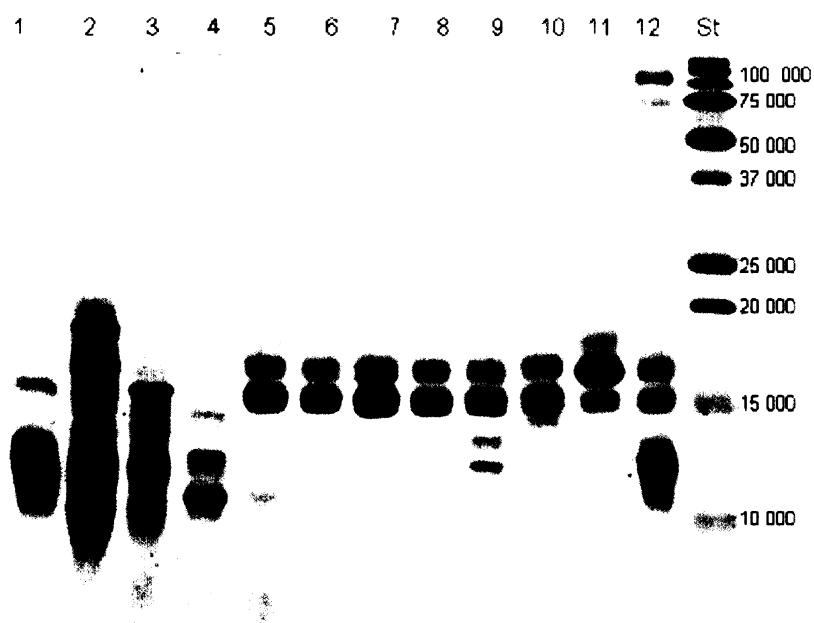
### **3.7.2. RP HPLC frakcí EF3 a EF4 a jejich další charakterizace pomocí SDS-PAGE**

Proteiny frakce EF3 a EF4 získané gelovou chromatografií byly rozděleny pomocí HPLC na reversní fázi s využitím analytické kolony VYDAC C-18 za podmínek uvedených v kapitole 2.5. Průběh chromatografického dělení frakce EF3 je znázorněn na obrázku 3.10 (str. 52) a dělení frakce EF4 je na obrázku 3.12 (str. 53). Frakce EF3 byla rozdělena na 12 frakcí EF3<sub>1</sub> – EF3<sub>12</sub>. Jednotlivé frakce rozdělené pomocí HPLC byly charakterizovány SDS-PAGE (kapitola 2.7.). Relativní molekulová hmotnost proteinů této frakce byla v rozmezí 10 000 – 25 000 (obr. 3.11, str. 52). Frakce EF4 byla rozdělena na 18 frakcí EF4<sub>1</sub> – EF4<sub>18</sub>. Jednotlivé frakce byly dále charakterizovány SDS-PAGE (kapitola 2.7.). Relativní molekulová hmotnost proteinů této frakce byla převážně v rozmezí 10 000 – 20 000 (obr. 3.13, str. 53).



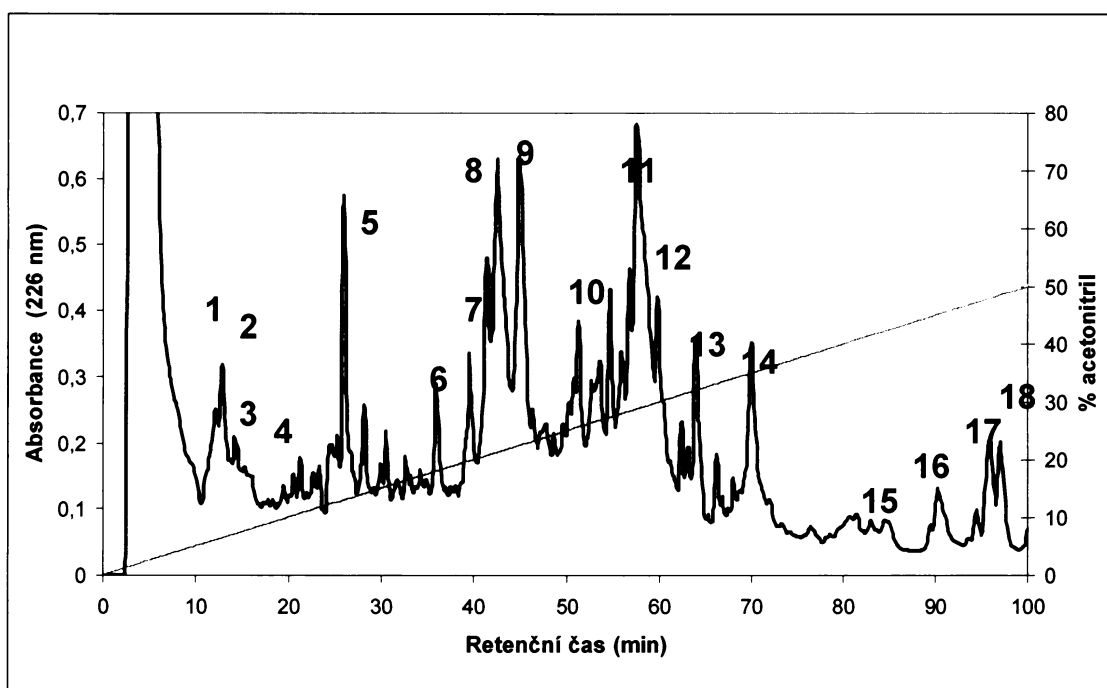
**obr. 3.10 Dělení proteinů frakce EF3 získané gelovou chromatografií pomocí RP HPLC**

lineární gradient acetonitrilu a vodné fáze (0%→50% ACN po dobu 100 minut; 50%→70% ACN po dobu 5 minut; 70% ACN po dobu 5 minut isokraticky; 70%→0% ACN po dobu 5 minut)



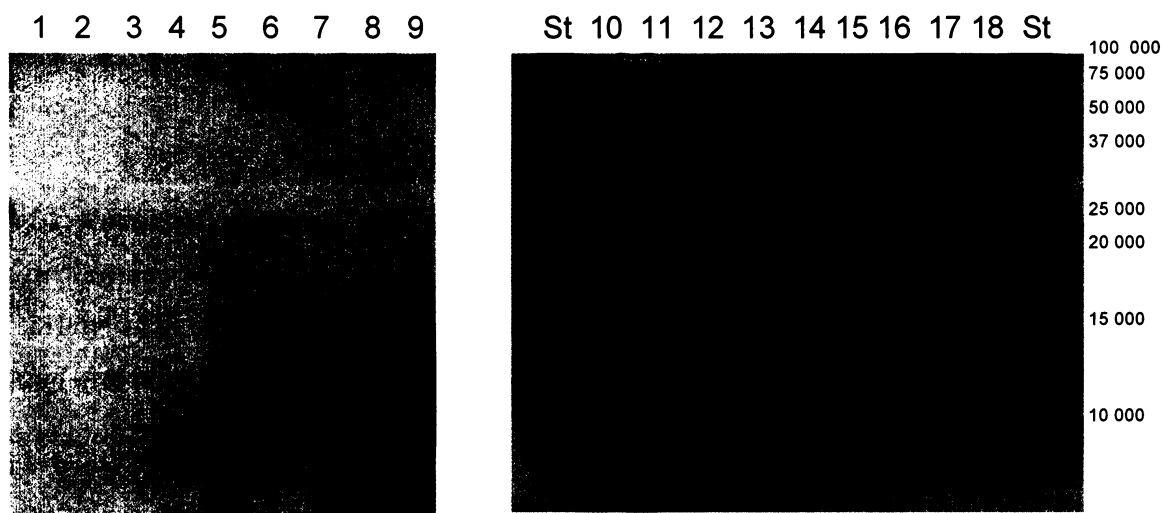
**obr. 3.11 SDS-PAGE frakcí EF3<sub>1</sub> – EF3<sub>12</sub> frakcí epididymální tekutiny získané z RP HPLC**

15%-ní polyakrylamidový separační gel; nanášené množství vzorků rozpuštěných v neredukujícím pufru obsahovalo 2-5  $\mu$ g proteinu; nanášené množství roztoku standardů (St) 5  $\mu$ l; dráhy 1-12 odpovídají frakcím EF3<sub>1</sub>- EF3<sub>12</sub>.



obr. 3.12 Dělení proteinů frakce EF4 získané gelovou chromatografií pomocí HPLC s reverzní fází

lineární gradient acetonitrilu a vodné fáze (0%→50% ACN po dobu 100 minut; 50%→70% ACN po dobu 5 minut; 70% ACN po dobu 5 minut isokraticky; 70%→0% ACN po dobu 5 minut)



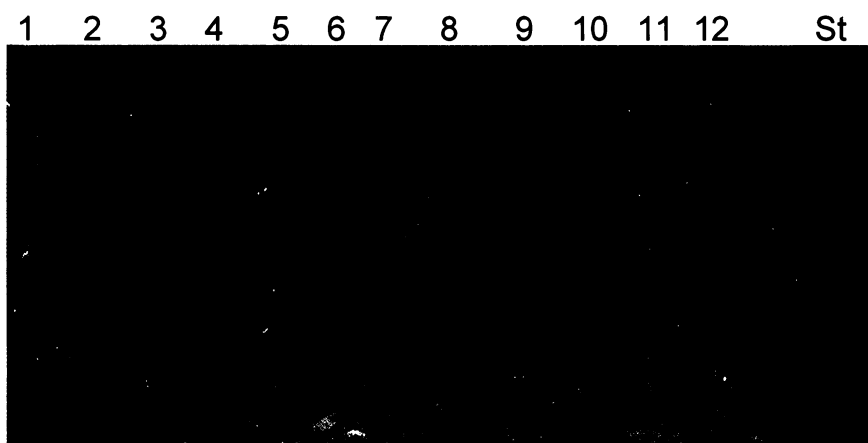
obr. 3.13 SDS-PAGE frakcí EF<sub>1</sub> – EF<sub>18</sub> epididymální tekutiny získané z RP HPLC 15%-ní polyakrylamidový separační gel; nanášené množství vzorků rozpuštěných v neredukujícím pufru obsahovalo 2-5 μg protein; nanášené množství roztoku standardů (St) 5 μl; dráhy 1-18 odpovídají frakcím po HPLC EF<sub>1</sub> – EF<sub>18</sub>.



### 3.7.3. Detekce inhibitorů MMP-9 a akrosinu frakcí EF3 a EF4 rozdělených HPLC pomocí reversní substrátové zymografie

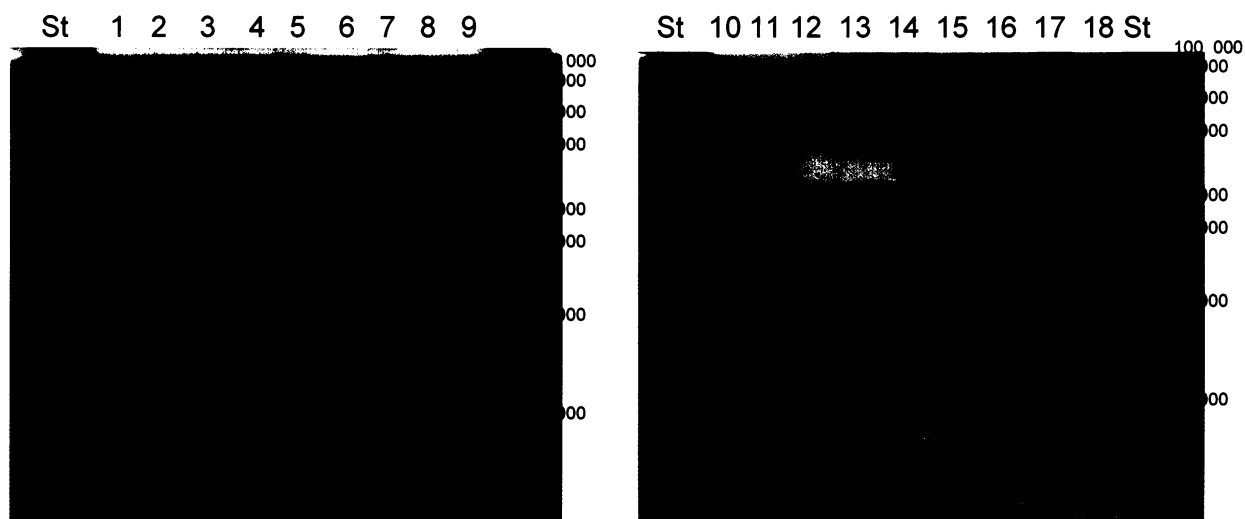
Byla provedena reversní substrátová zymografie (kapitola 2.12.) za přítomnosti metaloproteinasy MMP-9 a akrosinu izolovaného z extraktu kančích spermií. Metoda je založena na principu štěpení substrátu (želatiny) enzymem, kdy enzym i substrát jsou zapolymerovány v polyakrylamidovém gelu s elektroforeticky rozdělenými proteiny. Přítomnost inhibitorů zapolymerovaného enzymu brání štěpení substrátu a na gelu jsou po obarvení Coomassie Blue viditelné modré pruhy.

Inhibitory metaloproteinasy MMP-9 byly nalezeny ve frakcích EF3<sub>9</sub> – EF3<sub>12</sub> (obr. 3.14) s relativní molekulovou hmotností kolem 12 000, 14 000 a 17 000 a ve frakcích EF4<sub>13</sub> – EF4<sub>17</sub> (obr. 3.15, str. 55) s relativní molekulovou hmotností kolem 12 000. Ve frakcích EF4<sub>12</sub> a EF4<sub>13</sub> můžeme pozorovat zvýšenou aktivitu metaloproteinasy (světlé pruhy s relativní molekulovou hmotností v oblasti kolem 30 000 a 40 000).



**obr. 3.14 Reversní substrátová zymografie frakcí EF3<sub>1</sub> – EF3<sub>12</sub> za přítomnosti metaloproteinasy MMP-9.**

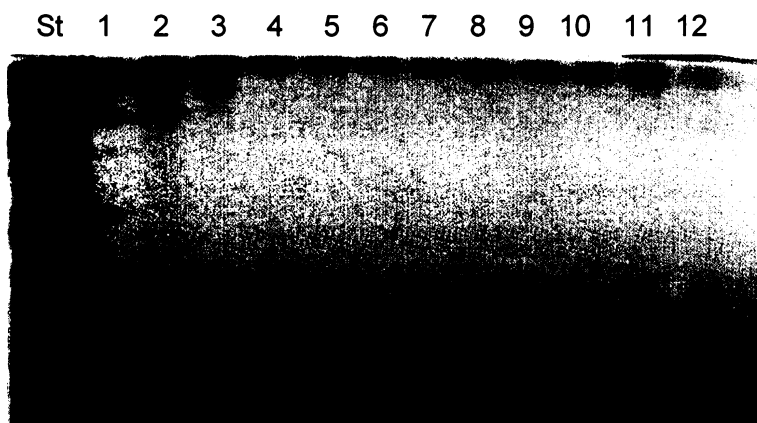
*tmavé pruhy ukazují na přítomnost inhibitorů metaloproteinasy MMP-9; dráhy 1-12 odpovídají frakcím po HPLC EF3<sub>1</sub> – EF3<sub>12</sub>; nanášené množství proteinů bylo 5 µg, nanášené množství standardu (St) 5 µl*



**obr. 3.15 Reversní substrátová zymografie frakcí EF<sub>4,1</sub> – EF<sub>4,18</sub> za přítomnosti metaloproteinasy MMP-9.**

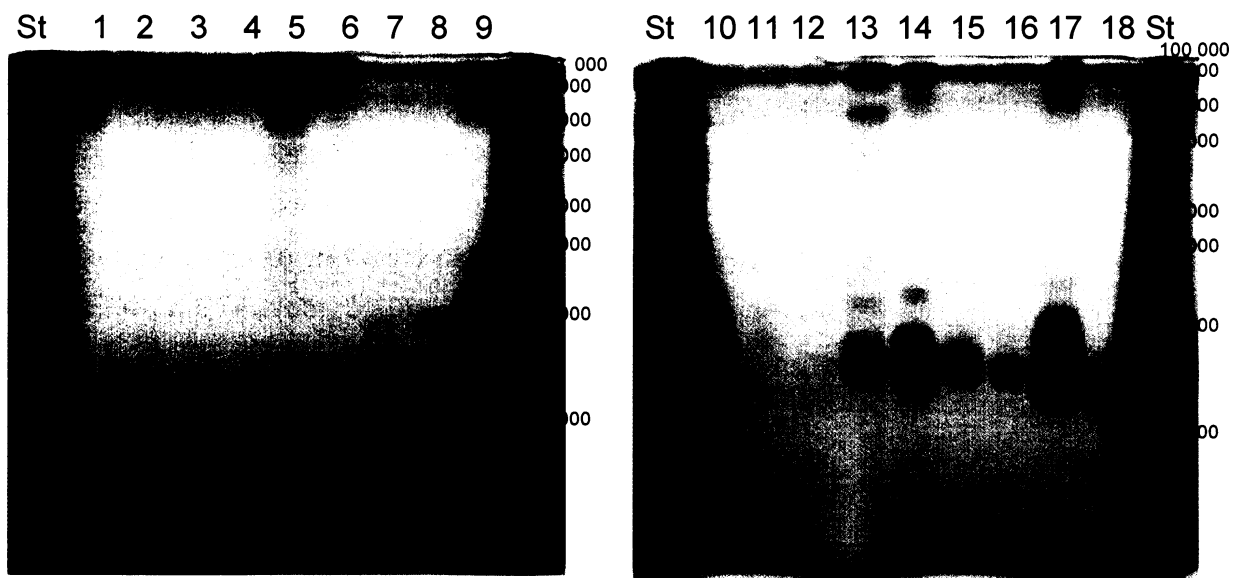
tmavé pruhy ukazují na přítomnost inhibitorů metaloproteinasy MMP-9; dráhy 1-18 odpovídají frakcím po HPLC EF<sub>4,1</sub> – EF<sub>4,18</sub>; nanášené množství proteinů bylo 5 µg, nanášené množství standardu (St) 5 µl

Inhibitory akrosinu s relativní molekulovou hmotností kolem 12 000 byly nalezeny ve frakci EF<sub>3,12</sub> a slabě i ve frakcích EF<sub>3,2</sub> a EF<sub>3,9</sub> (obr. 3.16) a ve frakcích EF<sub>4,9</sub> a EF<sub>4,13</sub> – EF<sub>4,17</sub> (obr. 3.17, str. 56) s relativní molekulovou hmotností kolem 12 000 – 15 000. Jako pozitivní kontrola pro detekci inhibitorů akrosinu byl použit inhibitor izolovaný ze semenné plasmy (není ukázáno).



**obr. 3.16 Reversní substrátová zymografie frakcí EF<sub>3,1</sub> – EF<sub>3,12</sub> za přítomnosti akrosinu**

tmavé pruhy ukazují na přítomnost inhibitorů akrosinu; dráhy 1-12 odpovídají frakcím po HPLC EF<sub>3,1</sub> – EF<sub>3,12</sub>; nanášené množství proteinů bylo 5 µg, nanášené množství standardu (St) 5 µl



**obr. 3.17 Reversní substrátová zymografie frakcí EF4<sub>1</sub> – EF4<sub>18</sub> za přítomnosti akrosinu**

*tmavé pruhy ukazují na přítomnost inhibitorů akrosinu; dráhy 1-18 odpovídají frakcím po HPLC EF4<sub>1</sub> – EF4<sub>18</sub>; nanášené množství proteinů bylo 5 μg, nanášené množství standardu (St) 5 μl*

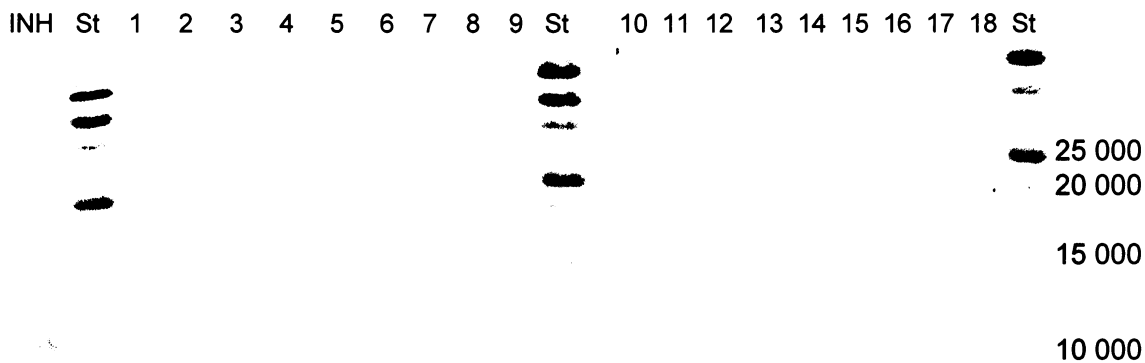
### 3.7.4. Detekce inhibitoru akrosinu v jednotlivých frakcích EF3 a EF4 po HPLC pomocí polyklonální protilátky

Byla provedena imunodetekce na nitrocelulóзовé membráně (kapitola 2.10.) pomocí přečištěné polyklonální protilátky anti-INH. Imunodetekcí byla určena přítomnost inhibitoru akrosinu ze semenné plasmy ve frakcích EF3<sub>2</sub> a EF3<sub>12</sub> (obr. 3.18) a ve frakcích EF4<sub>9</sub>, EF4<sub>14</sub> a EF4<sub>17</sub> (obr. 3.19).



obr. 3.18 Imunodetekce v jednotlivých frakcích EF3 po HPLC

polyklonální protilátka anti-INH ředěná 1:1000, INH jako pozitivní kontrola, dráhy 1-12 odpovídají frakcím po HPLC EF3<sub>1</sub> – EF3<sub>12</sub> nanášené množství proteinů bylo 5 µg, nanášené množství standardu (St) 5 µl

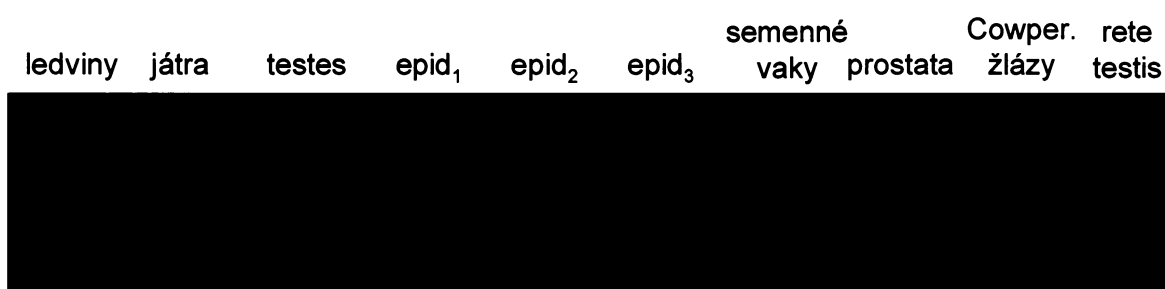


obr. 3.19 Imunodetekce v jednotlivých frakcích EF4 po HPLC

polyklonální protilátka anti-INH ředěná 1:1000; INH jako pozitivní kontrola; dráhy 1-18 odpovídají frakcím po HPLC EF4<sub>1</sub> – EF4<sub>18</sub>; nanášené množství proteinů bylo 5 µg, nanášené množství standardu (St) 5 µl

### 3.8. Expresa genu pro inhibitor ze semenné plasmy (INH) v kančích reprodukčních orgánech

Byla sledována exprese genu pro inhibitor akrosinu izolovaný z kančí semenné plasmy (INH) v kančích reprodukčních orgánech. Z tkání byla izolována celková RNA (kapitola 2.13.), přepsána pomocí reversní transkriptasy do DNA (kapitola 2.15.1.) a pomocí specifických primerů navržených dle známé sekvence inhibitoru (INH) byla určena exprese genu v jednotlivých orgánech (kapitola 2.15.2.). Produkt genu o velikosti 201 bp byl detekován agarosovou elektroforézou (kapitola 2.15.3) po vizualizaci ethidium bromidem v testes, caput, corpus i cauda epididymis, v semenných vacích a prostatě. Slabá exprese je vidět i v Cowperových žlázách (obr. 3.20).



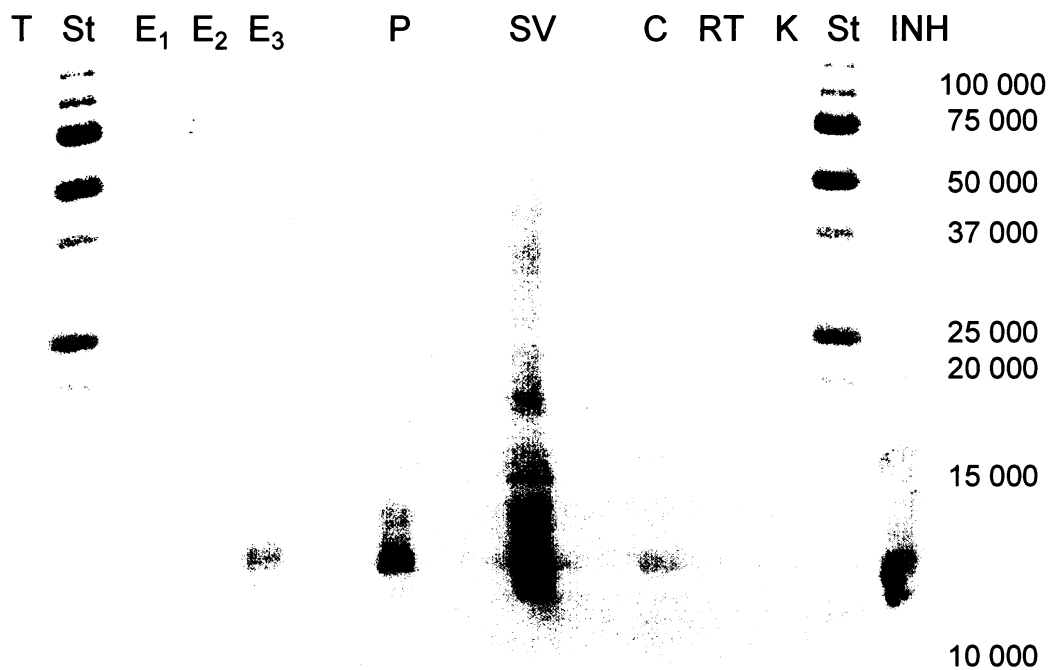
**obr. 3.20 Expresa genu pro inhibitor izolovaný z kančí semenné plasmy (INH), agarosová elektroforéza**

*v kančích reprodukčních orgánech – testes, cauda epididymis (epid<sub>1</sub>), corpus epididymis (epid<sub>2</sub>), cauda epididymis (epid<sub>3</sub>), semenných vacích, prostatě, rete testis, Cowperových žlázách; ledviny a játra byly použity jako negativní kontrola*

### 3.9. Imunodetekce inhibitoru akrosinu v proteinových extraktech kančích reprodukčních orgánů

Při izolaci RNA byla získána také proteinová frakce z kančích reprodukčních orgánů (kapitola 2.14.). Proteinové extrakty byly elektroforeticky rozděleny a přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (kapitola 2.9.). Pomocí přečištěné polyklonální protilátky anti-INH byla zjišťována přítomnost inhibitoru akrosinu izolovaného z kančí semenné plasmy (INH).

Přítomnost INH určená imunodetekcí byla zjištěna v cauda epididymis, prostatě, semenných vacích a Cowperových žlázách (obr. 3.21, str. 59). Přestože genová exprese byla v testes zjištěna, tak protilátka nedetekovala antigen v extraktu, což bylo pravděpodobně způsobeno malým množstvím proteinu.



**obr. 3.21 Imunodetekce proteinových extraktů z tkání kančích reprodukčních orgánů, polyklonální protilátka anti-INH**

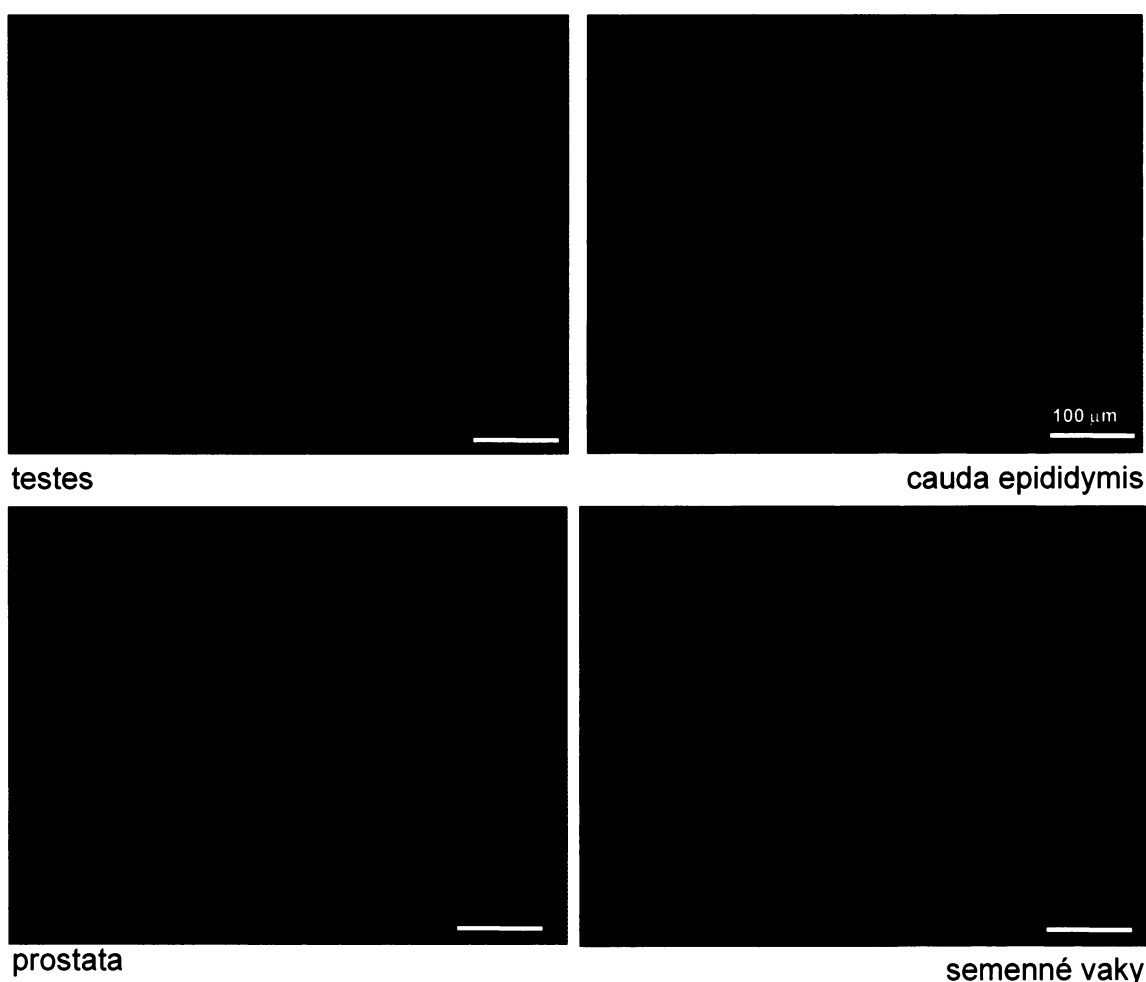
*polyklonální protilátka anti-INH ředěná 1:1000; vzorky – testes (T), caput epididymis (E<sub>1</sub>) corpus epididymis (E<sub>2</sub>), cauda epididymis (E<sub>3</sub>), prostata (P), semenné vaky (SV), Cowperovy žlázy (C), rete testes (RT); jako negativní kontrola ledviny (K), jako pozitivní kontrola INH; nanášené množství vzorků 2-5 μg; nanášené množství standardů 5 μl*

### 3.10. Detekce inhibitoru akrosinu pomocí nepřímé imunofluorescence

Pomocí přečištěné polyklonální protilátky anti-INH, byla určena přítomnost inhibitoru akrosinu ze semenné plasmy (INH) na řezech kančích reprodukčních orgánů a na povrchu epididymálních a ejakulovaných spermií (kapitola 2.16.).

#### 3.10.1. Imunofluorescence na řezech kančích reprodukčních orgánů

Řezy orgánů byly inkubovány s primární protilátkou (anti-INH) a následně se značenou sekundární protilátkou (FITC). Imunofluorescence na řezech orgánů byla pozorována pod fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 200x. Přítomnost inhibitoru akrosinu (INH) byla určena v sekreční tkáni na řezech cauda epididymis, prostaty a semenných vaků. U testes byla pozorována slabá imunofluorescence (obr. 3.22).

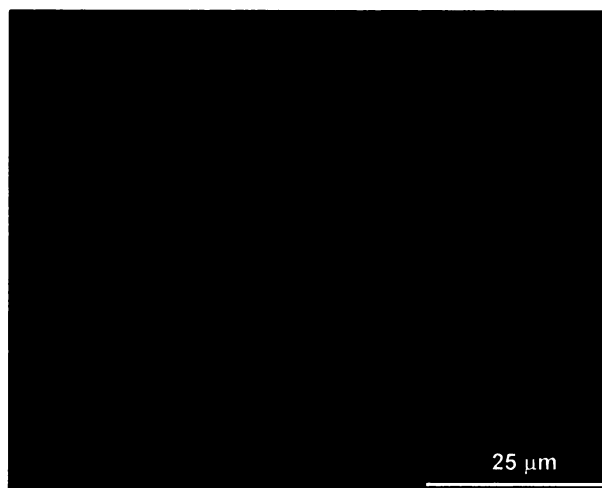


obr. 3.22 **Imunofluorescence na řezech kančích reprodukčních orgánů**

*polyklonální protilátka anti-INH ředěná 1:100, modrá barva DAPI (jádra buněk), zelená barva FITC (imunofluorescence sekundární protilátky proti králičím Ig konjugovaná s FITC), fluorescenční mikroskop zvětšení 200x*

### 3.10.2. Imunolokalizace na kančích spermích

Na epididymálních i ejakulovaných kančích spermích byla pozorována imunofluorescence pomocí protilátky proti inhibitoru akrosinu (kapitola 2.16.) a spermie byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 1000x. Lokalizace inhibitoru akrosinu (INH) byla nalezena v akrosomální oblasti epididymálních (obr. 3.23) i ejakulovaných (obr. 3.24) kančích spermíí.



*obr. 3.23 Imunofluorescence anti-INH na povrchu kančích epididymálních spermíí polyklonální protilátka anti-INH ředěná 1:100, modrá barva DAPI (jádra buněk), zelená barva FITC (imunofluorescence sekundární protilátky proti králičím Ig konjugovaná s FITC), fluorescenční mikroskop zvětšení 1000x*



*obr. 3.24 Imunofluorescence anti-INH na povrchu kančích ejakulovaných spermíí polyklonální protilátka anti-INH ředěná 1:100, modrá barva DAPI (jádra buněk), zelená barva FITC (imunofluorescence sekundární protilátky proti králičím Ig konjugovaná s FITC), fluorescenční mikroskop zvětšení 1000x*



### **3.11. Stanovení N-terminální aminokyselinové sekvence**

Vybrané proteinové frakce po HPLC s inhibiční aktivitou pro proteinasy (frakce EF3<sub>10</sub>, EF3<sub>14</sub> a EF4<sub>17</sub>) byly elektroforeticky rozděleny SDS-PAGE (kapitola 2.7.) a přeneseny na PVDF-membránu (kapitola 2.9.) a předány na určení N-terminální aminokyselinové sekvence ing. Z. Voburka, ÚOCHB AV ČR. Dosud není výsledek známý.

#### 4. Diskuse

Epididymis je velmi důležitý reprodukční orgán, ve kterém spermie získávají schopnost oplození a pohybu. Při průchodu epididymem jsou spermie vystaveny přímo vlivu epididymální tekutiny obsahující především různé proteinové komponenty (adhezni molekuly, enzymy a jejich inhibitory), které mohou mít vliv na posttestikulární zrání spermií.

Proteiny přítomné v epididymální tekutině byly popsány u různých druhů savců včetně člověka. Některé z nich se vážou na spermie a mohou se účastnit následných kroků reprodukčního procesu, jiné mohou působit jako prostředí pro zrání spermie.

Byly identifikovány epididymální proteiny vážající se na spermie a účastnící se rozpoznání gamet s vazbou spermie na glykoproteiny *zona pellucida* vajíčka nebo fúze gamet u lidí, býků, křečků, králíků, myší a kryš<sup>55</sup>. U lidí byla nalezena skupina genů produkovaná epididymem označených HE1-12. U jejich proteinových produktů byly popsány různé funkce, např. schopnost vázat cholesterol (HE1), účastnit se fúze gamet (HE2) a inhibovat proteinasy (HE4)<sup>85</sup>. V epididymální tekutině různých druhů byly také popsány různé enzymy, ať už proteinasy, glykosidasy, či glykosyltransferasy (člověk, myš, krysa, prase, kůň, beran)<sup>92</sup>.

Proteinasy a jejich inhibitory hrají klíčovou roli v řadě fyziologických procesů organismu jako je například migrace buněk, mezibuněčné interakce, buněčná signalizace, přeměna tkání a povrchu buněk a udržují tak homeostáze vnitřního prostředí. Proteinasy a jejich přirozené inhibitory hrají určitou roli i ve fertilizaci. Vyskytují ve spermiích, v testes, epididymu, v prostatě a v menší míře také v semenné plasmě savců.

V epididymální tekutině kance byla nalezena proteolytická aktivita pomocí substrátové zymografie, ale nebyla přesně určena proteinasová specifikace a identifikace jednotlivých proteinů<sup>56</sup>. Pomocí protilátek byly v epididymální tekutině kance detekovány MMP-2, MMP-3 a MMP-9. MMP-2 a MMP-9 jsou produkovány v testes a jsou přinášeny do epididymu tekutinou rete testis, MMP-3 je produktem epididymis<sup>56</sup>.

Nám se podařilo rozdělit kančí epididymální tekutinu získanou z ocasu nadvarlete pomocí gelové chromatografie do 4 frakcí o různých molekulových hmotnostech. V prvních dvou frakcích (EF1 a EF2) jsme určili proteolytickou aktivitu. V těchto dvou frakcích jsme pomocí substrátové zymografie našli aktivitu serinových proteinas v oblasti molekulových hmotností 30 000 a 40 000 a aktivitu metaloproteinasy kolem 60 000.

Inhibitory serinových proteinas byly u kance popsány hlavně v semenné plasmě. Byl izolován a identifikován protein s inhibiční aktivitou pro trypsin a akrosin o molekulové

hmotnosti 11 500 – 12 000<sup>65</sup>. V epididymální tekutině různých druhů byly popsány inhibitory serinových proteinas a metaloproteinasy. Z kančí epididymální tekutiny byl izolován kyselý inhibitor<sup>64</sup>. Metayer et al (2002)<sup>56</sup> detekovali pomocí protilátky inhibitor metaloproteinasy TIMP-2.

Inhibiční aktivitu vykazovaly frakce EF3 a EF4 po gelové chromatografii epididymální tekutiny kance. Reversní substrátovou zymografií se nám podařilo detekovat inhibiční aktivita v oblasti kolem 12 000 pro serinovou proteinasu akrosin a metaloproteinasu MMP-9. Pravděpodobně se jedná o 2 proteiny o stejné molekulové hmotnosti, jednoho z inhibiční aktivitou pro metaloproteinasy a druhého pro akrosin. Po rozdělení frakcí EF3 a EF4 epididymální tekutiny pomocí HPLC na reversní fázi se inhibiční aktivita pro MMP-9 objevila navíc také v oblasti kolem 14 000 a 17 000 a pro akrosin v rozmezí 12 000 – 15 000. Navíc v některých z těchto frakcí byl detekován pomocí specifické polyklonální protilátky inhibitor akrosinu dříve izolovaný ze semenné plasmy. Pro identifikaci inhibitorů byla předána Coomassie blue obarvená PVDF-membrána na N-koncovou aminokyselinovou sekvenaci. Výsledek není dosud známý a pravděpodobně bude nutné pro přesnější identifikaci pomocí sekvenace použít proteiny rozdělené nejdříve 2D-elektroforézou pro lepší oddělení proteinů v oblasti molekulové hmotnosti 12 000. Předpokládáme, že jeden z proteinů s inhibiční aktivitou pro MMP-9 by mohl být určen jako již popsáný TIMP-2. Pokud by se podařilo také některý z těchto proteinů určit jako inhibitor akrosinu s aminokyselinovou homologickou již dříve popsáným inhibitorům izolovaným buď z kančí semenné plasmy<sup>65</sup> nebo z kyselého extraktu kančích ejakulovaných spermií<sup>66,67</sup>, znamenalo by to potvrzení exprese těchto inhibitorů akrosinu v kančím epididymu.

Pro inhibitor akrosinu ze semenné plasmy<sup>65</sup> byla konstruována cDNA tohoto proteinu z mRNA získané ze semenných vaků kance<sup>66</sup>. Pomocí specifických primerů jsme určili genovou expresi tohoto proteinu nejen v semenných vacích, ale i v testes, ve všech částech epididymu, prostatě a také v Cowperových žlázách. Proteinový produkt se nám podařilo detekovat pomocí specifické polyklonální protilátky připravené proti inhibitoru akrosinu a přečištěné na G-protein Sepharose v proteinových extraktech z tkání kančích reprodukčních orgánů rozdělených SDS-PAGE a přenesených na NC-membránu. Reakce z protilátkou byla nalezena v tkáňovém extraktu z cauda epididymis, semenných vaků, prostaty a Cowperových žláz. Přestože genová exprese tohoto inhibitoru byla nalezena také v testes a dalších částech epididymální tkáně, specifická protilátka s proteinovými extrakty z těchto orgánů nevykazovala žádnou reakci. Patrně z důvodu velmi malého množství akrosinového inhibitoru produkovaného v těchto tkáních. Nepřímou imunofluorescenční technikou byl inhibitor akrosinu nalezen v sekreční tkáni cauda

epididymis, prostaty i semenných vaků na řezech. Slabou imunofluorescenci jsme také zaznamenali v testes.

Specifická polyklonální protilátka potvrdila také přítomnost inhibitoru akrosinu na povrchu nefixovaných epididymálních a ejakulovaných kančích spermií v oblasti akrosomální čepičky. Toto zjištění znamená, že by tento inhibitor mohl být zabudováván do plasmatické membrány už během vývoje spermie v testes, což naznačuje genový produkt inhibitoru nalezený v testikulární tkáni a reakce s protilátkou v sekreční tkáni testes. Popřípadě může být inhibitor akrosinu navazován na povrch spermií během jejich zrání v epididymu z epididymální tekutiny. Přítomnost tohoto inhibitoru v semenné plasmě (cit) a na povrchu ejakulovaných spermií značí jeho sekreci přídatnými pohlavními žlázami – semennými vaky, prostatou a Cowperovými žlázami, což potvrzuje i genová exprese v těchto tkáních. Vazba inhibitoru akrosinu na povrch spermií v akrosomální oblasti při ejakulaci byla již popsána v práci Sanz et al. (1992)<sup>87</sup>. Inhibitor akrosinu se pravděpodobně váže na akceptorové molekuly přítomné na povrchu kančích spermií a pocházející ze semenné plasmy, které byly identifikovány jako spermadhesiny AQN a AWN rodiny<sup>87,93</sup>. Inhibitor akrosinu navázaný na povrchu ejakulovaných spermií by mohl chránit proteinové receptory důležité pro rozpoznání a vazbu spermie se *zona pellucida* vajíčka před proteolytickým štěpením akrosinu, který by mohl být předčasně uvolněn z poškozených spermií.

Pro regulaci proteolytické aktivity a udržení homeostáze v samčím i samičím reprodukčním traktu savců je velmi důležitá přítomnost inhibitorů proteinas. Výskyt inhibitorů proteinas v epididymální tekutině, kde probíhá jedna z klíčových událostí savčí reprodukce, zrání a uchovávání spermií, je nezbytná. Proto biochemická charakterizace proteinů epididymální tekutiny a přítomnost a lokalizace inhibitorů proteinas v tekutinách a tkáních orgánů samčího reprodukčního traktu by mohla přispět k objasnění podstaty molekulárního mechanismu reprodukce savců včetně člověka.

## **5. Souhrn výsledků**

**5.1.** Kančí epididymální tekutina byla rozdělena pomocí gelové chromatografie do čtyř frakcí (EF1 – EF4). Ve frakci EF1 a EF2 byla určena proteolytická aktivita, ve frakcích EF3 a EF4 naopak inhibiční aktivita pro serinové proteiny trypsinového typu. Další charakteristika těchto frakcí byla provedena pomocí SDS-PAGE. Ve frakcích EF1 a EF2 byla nalezena aktivita serinových ( $M_r \sim 30\ 000$  a  $M_r \sim 40\ 000$ ) a metaloproteinás ( $M_r \sim 60\ 000$ ) substrátovou zymografií po SDS-PAGE.

**5.2.** Byla přečištěna polyklonální protilátka proti inhibitoru izolovanému z kančí semenné plasmy na G-protein Sepharose a využita pro imunochemickou detekci tohoto inhibitoru v epididymální tekutině, v proteinových frakcích kančích reprodukčních orgánů, na řezech reprodukčních orgánů a imunolokalizaci na spermích. Ve frakcích EF3 a EF4 byla určena aktivita inhibitorů serinových proteinás a inhibitorů metaloproteinás (proteiny s  $M_r \sim 12\ 000$ ) reversní substrátovou zymografií a přítomnost inhibitoru akrosinu pomocí polyklonální protilátky.

**5.3.** Pro přesnější charakterizaci frakcí epididymální tekutiny s inhibiční aktivitou bylo provedeno dělení frakcí EF3 a EF4 2D-elektroforézou a RP HPLC. Frakce po HPLC byly dále rozděleny SDS-PAGE a byla u nich provedena reversní substrátová zymografie pro inhibitory akrosinu a MMP-9. Protilátka proti inhibitoru akrosinu izolovanému z kančí semenné plasmy reagovala s proteiny s  $M_r \sim 12\ 000$  v některých frakcích EF3 a EF4.

**5.4.** Byla sledována exprese genu pro inhibitor izolovaný z kančí semenné plasmy pomocí specifických primerů v kančích reprodukčních orgánech. Produkt genu byl určen v testes, caput, corpus i cauda epididymis, v semenných vacích, prostatě a slabě i v Cowperových žlázách.

**5.5.** Přítomnost inhibitoru akrosinu (INH) byla určena v proteinových extraktech testes, všech částí epididymu, prostaty, semenných vaků a Cowperových žláz a také v sekreční tkáni na řezech cauda epididymis, prostaty a semenných vaků. Lokalizace inhibitoru akrosinu (INH) byla nalezena v akrosomální oblasti epididymálních i ejakulovaných kančích spermíí.

## 6. Literatura

---

- <sup>1</sup> Romanovský, A. a kol.: v knize *Obecná biologie*, SPN, Praha 1985, 519
- <sup>2</sup> Johnson, L., Varner, D.D., Roberts, M.E., Smith, T.L., Keillor, G.E., Scrutchfield W.L., *Anim. Reprod. Sci.* 60–61, 471-480 (2000)
- <sup>3</sup> Yanagimachi, R.: v knize *The Physiology of Reproduction*, vol. 1, 2<sup>nd</sup> edition (Knobil, E. and Neil, J.D., eds), Raven Press, Ltd. New York (1994)
- <sup>4</sup> Peknicova, J., Kubatova A., Sulimenko, V., Draberova, E., Viklicky, V., Hozak, P., Draber, P.: *Biol. Reprod.* 65, 672-679 (2001)
- <sup>5</sup> Toshimori K., Chizuru I.: *Arch. Histor. Cytol.* 66-5, 383-396 (2003)
- <sup>6</sup> webové stránky: [http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Complete\\_diagram\\_of\\_a\\_human\\_spermatozoa\\_cs.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Complete_diagram_of_a_human_spermatozoa_cs.svg) , autor kresby: Mariana Ruiz, *Gray's anatomy*" 36th edition, Williams & Warwick, 1980, popisky: Toshimori K., Chizuru I.: *Arch. Histor. Cytol.* 66-5, 383-396 (2003)
- <sup>7</sup> Gatti, J.L., Castella, S., Dacheux, F., Ecroyd, H., Metayer, S., Dacheux, J.L.: *Animal. Reprod. Sci.* 82–83, 321–339 (2004)
- <sup>8</sup> Robaire, B., Viger, R.S.: *Biol. Reprod.* 52, 226-236 (1995)
- <sup>9</sup> Primiani, N., Gregory, M., Dufresne, J., Smith, C., Liu, Y.L., Bartles, J.R., Daniel G. Cyr, D.G., Hermo, I.: *J. Androl.*, v tisku (2007)
- <sup>10</sup> Frenette, G., Girouard, J., Sullivan, R.: *Biol. Reprod.* 75, 885–890 (2006)
- <sup>11</sup> Syntin, P., Dacheux, F., Druart, X., Gatti, J.L., Okamura, N., Dacheux, J.L.: *Biol. Reprod.* 55, 956-974 (1996)
- <sup>12</sup> Dacheux J. L., Dacheaux, F., Paquignon, M.: *Biol. Reprod.* 40, 635-651 (1989)
- <sup>13</sup> Dacheux, J. L., Castella, S., Gatti, J.L., Dacheux, F.: *Theriogenology* 63, 319–341 (2005)
- <sup>14</sup> Kirchhoff, C., Hale, G.: *Mol. Hum. Reprod.* 2, 177–184 (1996)
- <sup>15</sup> Zhang, H., Martin-Deleon, P.A.: *J. Androl.* 24, 51–58 (2003)
- <sup>16</sup> Frenette, G., Girouard, J., Sullivan, R.: *Biol. Reprod.* 75, 885–890 (2006)
- <sup>17</sup> Dacheux, J.L., Gatti, J.L., Dacheux, F.: *Microsc. Res. Tech.* 61, 7-17 (2003)
- <sup>18</sup> Phillips, D.M., Jones, R., Shalgi, R.: *Mol. Reprod. Dev.* 29(4), 347-356 (1991)
- <sup>19</sup> Tulsiani, D.R., NagDas, S.K., Skudlarek, M.D.: *Dev. Biol.* 167(2), 584-595 (1995)

- 
- <sup>20</sup> Krzanowska, H.: J. Reprod. Fertil. 64(1), 97-101 (1982)
- <sup>21</sup> Bedford, J.M., Calvin, H.I.: J. Exp. Zool. 187(2), 181-204 (1974)
- <sup>22</sup> Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Moore, G.D., Bailey, J.L., Ning, X., Fornes, M., Kopf, G.S.: J. Androl. 19(2), 242-248 1998a
- <sup>23</sup> Tortora and Anagnostakos: Principles of Anatomy and Physiology 4<sup>th</sup> Edition, Harper & Row, New York, [http://e-rham.com/atcls\\_04.asp](http://e-rham.com/atcls_04.asp)
- <sup>24</sup> Markham, C.L., Coffey, D.S., v knize: The Physiology of Reproduction, 2<sup>nd</sup> edition, E. Knobil, J.D. Neill (eds). Raven Press, Ltd., New York, kapitola The Male Sex Accessory Tissues, str. 1435-1487, (1994)
- <sup>25</sup> obrázek z webové stránky: [http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201\\_McKinley/Reproductive %20%20System.htm](http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_McKinley/Reproductive%20%20System.htm)
- <sup>26</sup> Töpfer-Petersen, E., Calvete, J.J., Sanz, L., Sinowatz, F.: Andrologia 27, 303-324 (1995)
- <sup>27</sup> Wempe, F., Einspanier, R., Scheit, K.H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 183, 232-237 (1992)
- <sup>28</sup> Tedeschi, G., Oungre, E., Mortarino, M., Negri, A., Maffeo, G., Ronchi, S.: Eur. J..Biochem. 267(20), 6175-6179 (2000)
- <sup>29</sup> Reinert, M., Calvete, J.J., Sanz, L., Mann, K., Töpfer-Petersen, E.: Eur. J. Biochem. 242, 636-640 (1996)
- <sup>30</sup> Chandonnet, L., Roberts, K.D., Chapdelaine, A., Manjunath, P.: Mol. Reprod. Dev. 26, 313-318 (1990)
- <sup>31</sup> Calvete, J.J., Mann, K., Schäfer, W., Raida, M., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E.: FEBS Lett. 365, 179-182 (1995)
- <sup>32</sup> Calvete, J.J., Mann, K., Schäfer, W., Sanz, L., Reinert, M., Nassau, S., Raid, M., Töpfer-Petersen, E.: Biochem. J. 310(2), 615-622 (1995)
- <sup>33</sup> Calvete, J.J., Raida, M., Gentzel, M., Urbanke, C., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E.: FEBS Lett. 407, 201-206 (1997)
- <sup>34</sup> Jonakova, V., Kraus, M., Veselsky, L., Cechova, D., Bezouska, K., Ticha, M.: J. Reprod. Fertil. 114, 25-34 (1998)
- <sup>35</sup> Bezouska, K., Sklenár, J., Novak, P., Halada, P., Havlicek, V., Kraus, M., Ticha, M., Jonakova, V.: Protein Science 8, 1551-1556 (1999)

- 
- <sup>36</sup> Jonakova, V., Ticha, M.: Coll. Czech Chem. Commun (review) 69(3), 461-475 (2004)
- <sup>37</sup> Töpfer-Petersen, E., Wagner, A., Friedrich, I., Petrunkina, A., Ekhlesi-Hundrieser, M., Waberski, M., Drommer, W.: J. Exp. Zool. 292, 210–215 (2002)
- <sup>38</sup> Liberda, J., Manaskova, P., Prelovska, L., Ticha, M., Jonakova, V.: J. Reprod. Immunol. 71(2), 112-125 (2006)
- <sup>39</sup> Suarez, S.S.: Cells Tissues Organs 168(1-2), 105-112 (2001)
- <sup>40</sup> Smith, T.T., Yanagimachi, R.: J. Reprod. Fertil. 91, 567–573 (1991)
- <sup>41</sup> Petrunkina, A.M., Friedrich, J., Drommer, W., Bicker, G., Waberski, D., Töpfer-Petersen, E.: Reproduction 122(3), 469-480 (2001)
- <sup>42</sup> Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Moore, G.D., Bailey, J.L., Ning, X., Fornes, M., Kopf, G.S.: J. Androl. 19(2), 242-248 (1998)
- <sup>43</sup> Cross, N.L.: Biol. Reprod. 59(1), 7-11 (1998)
- <sup>44</sup> Manjunath, P., Therien, I.: J. Reprod. Immunol. 53, 109-119 (2002)
- <sup>45</sup> Tulsiani, D.R.P., Abou-Haila, A.: Zygote 9, 51-69 (2001)
- <sup>46</sup> Fazeli, A., Duncan, A.E., Watson, P.F., Holt, W.V.: Biol. Reprod. 60(4), 879-886 (1999)
- <sup>47</sup> Suarez, S.S., Ho, H.C.: Reprod. Dom. Anim. 38, 119–124 (2003)
- <sup>48</sup> Wassarman, P.M.: Ann. Rev. Biochem. 57, 415-442 (1988)
- <sup>49</sup> Chen, L., Wert, S.E., Hendrix, E.M., Russell, P.T., Cannon, M., Larsen, W.J.: Mol. Reprod. Dev. 26, 236-247 (1990)
- <sup>50</sup> Wassarman, P.M., Albertini, D.F., v knize: The Physiology of Reproduction, 2<sup>nd</sup> edition. E. Knobil, J.D. Neill (eds). Raven Press, Ltd., New York, kapitola The Mammalian Ovum, str. 79-122 (1994)
- <sup>51</sup> Sun, Q.Y.: Microsc. Res. Tech. 61, 342–348 (2003)
- <sup>52</sup> Wassarman, P.M.: Develop. 108, 1-17 (1990)
- <sup>53</sup> Honda, A., Siruntawineti, J., Baba, T.: Hum. Reprod. Update 8(5), 405-412 (2002)
- <sup>54</sup> Bedford, J.M.: Biol. Reprod. 59, 1275-1287 (1998)
- <sup>55</sup> Manaskova, P.: osobní sdělení v rámci přednášek Biochemie reprodukce živočichů
- <sup>56</sup> Metayer, S., Dacheux, F., Dacheux, J.L., Gatti, J.L.: Biol. Reprod. 66, 1219–1229 (2002)



- 
- <sup>57</sup> Jalkanen, J., Kotimäki, M., Huhtaniemi, I., Poutanen, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 245-254 (2006)
- <sup>58</sup> Michelle, K.Y., Cheng, S., Cheng, C.Y.: *Biol. Reprod.* 70, 945–964 (2004)
- <sup>59</sup> McCormack R.T., Rittenhouse, H.G., Finlay, J.A., Sokoloff, R.L., Wang, T.J., Wolfert, R.L., Lilja, H., Oesterling, J.E.: *Urology* 45(5), 729-744 (1995)
- <sup>60</sup> Bingle, L., Cross, S.S., High, A.S., Wallace, W.A., Rassl, D., Yuan, G., Hellstrom, I., Campos, M.A., Bingle, C.D.: *Respir. Res.* 7, 61 (2006)
- <sup>61</sup> Winnica, D.E., Novella, M.L., Dematteis, A., Coronel, C.E.: *Biol. Reprod.* 63(1), 42-8 (2000)
- <sup>62</sup> Mruk, D.D., Siu, M.K.Y., Conway, A.M., Lee, N.P.Y., Lau, A.S.N., Cheng, C.Y.: *J. Androl.* 24(4), 510-23 (2003)
- <sup>63</sup> Kirchhoff, C.: *Rev. Reprod.* 3(2), 86-95 (1998)
- <sup>64</sup> Jonakova, V., Cechova, D.: *Andrologia* 17(5), 466-471 (1985)
- <sup>65</sup> Tschesche, H., Kupfer, S., Klausner, R., Fink, E., Fritz, H., v knize *Protides of the Biological Fluids*. Peeters H. (ed). Pergamon Press, Oxford, str. 255-266 (1976)
- <sup>66</sup> Jonakova, V., Cechova, D., Töpfer-Petersen, E., Calvete, J.J., Veselsky, L.: *Biomed. Biochim. Acta* 50(4-6), 691-695 (1991)
- <sup>67</sup> Jonakova, V., Calvete, J.J., Mann, K., Schafer, W., Schmid, E.R., Töpfer-Petersen, E.: *FEBS Lett.* 297(1-2), 147-150 (1992)
- <sup>68</sup> Fritz, H., Schiessler, H., Schill, W.B., Tschesche, H., Heimbürger, N., Wallner, O., v knize: *Proteases and Biological Control*, Reich E., Rifkin D., Shaw E. (eds). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, str. 737-766 (1975)
- <sup>69</sup> Tschesche, H., v knize *Reproductive Biology and Medicine*, Holstein A.F., Voigt K.D., Grässlin D. (eds), Diesbach Verlag, Berlin, str..193-202 (1989)
- <sup>70</sup> Barros, C., Crosby, J.A., Moreno R.D.: *Cell Biol. Int.* 20(1), 33–39 (1996)
- <sup>71</sup> Baba, T., Watanabe, K., Kashiwabara, S.I., Aray, Y.: *FEBS Lett.* 244, 296–300 (1989)
- <sup>72</sup> Cechova, D., Topfer-Petersen, E., Henschen, A.: *FEBS Lett.* 241(1-2), 136-40 (1988)
- <sup>73</sup> Zelezna, B., Cechova, D., Heuschen, A.: *Biol. Chem. Hoppe, Seyler* 370(4), 323-327 (1989)
- <sup>74</sup> Tesarik, J., Drahorad, J., Peknicova, J.: *J. Fertil. Steril.* 50, 133-141 (1988)

- 
- <sup>75</sup> Baba, T., Azuma, S., Kashiwabara S., Toyoda, Y.: J. Biol. Chem. 269, 31845-31849 (1994)
- <sup>76</sup> Blobel, C.P.: Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6(1), 32-43 (2005)
- <sup>77</sup> Riordan, J.F.: Genome Biol. 4(8), 225 (2003)
- <sup>78</sup> Hulboy, D.L., Rudolph, L.A., Matrisian, L.M.: Mol. Hum. Reprod. 3(1), 27-45 (1997)
- <sup>79</sup> Malm, J., Hellman, J., Magnusson, H., Laurell C.B., Lilja, H.: Eur. J. Biochem. 238, 48-53 (1996)
- <sup>80</sup> Lilja, H.: World J. Urol. 11(4), 188-191 (1993)
- <sup>81</sup> Robert, M., Cannon, C.: Cell. Mol. Life Sci. 55, 944-960 (1999)
- <sup>82</sup> Geiger, M., Zechmeister-Machhart, M., Uhrin, P., Hufnagl, P., Ecke, S., Priglinger, U., Xu, J., Zheng, X., Binder, B.R.: Immunopharmacology 32(1-3), 53-6 (1996)
- <sup>83</sup> Baumgart, E., Lenk, S.V., Loening, S.A., Jung, K.: Int. J. Androl. 25(6), 369-71 (2002)
- <sup>84</sup> Wang, Z., Widgren, E.E., Sivashanmugam, P., O'Rand, M.G., Richardson, R.T.: Biol. Reprod. 72(5), 1064-70 (2005)
- <sup>85</sup> Kirchhoff, C., Habben, I., Ivell, R., Krull, N.: Biol. Reprod. 45(2), 350-7 (1991)
- <sup>86</sup> Kwok, S.C., Dai, G., McMurtry, J.P.: DNA Cell Biol. 13(4), 389-394 (1994)
- <sup>87</sup> Sanz, L., Calvete, J.J., Jonakova, V., Töpfer-Petersen, E.: FEBS Lett. 300(1), 63-66 (1992)
- <sup>88</sup> Jonakova, V., Ticha, M., Kraus, M., Cechova, D.: Fertilität 11, 115-118 (1995)
- <sup>89</sup> Veselsky, L., Peknicova, J., Cechova, D., Kraus, M., Geussova, G., Jonakova, V.: Am J Reprod. Immunol. 42(3), 187-197 (1999)
- <sup>90</sup> Laemmli, U.K.: Nature 227, 680 (1970)
- <sup>91</sup> Oliver, G.W., Leferson, J.D., Stetler-Stevenson, W.G., Kleiner D.E.: Anal. Biochem. 244, 161-166 (1997)
- <sup>92</sup> Dacheux, J.L., Gatti, J.L., Calstella, S., Metayer, S., Touchecourt, S., Dacheux, F., v knize: The Third International Conference on the Epididymis, Hinton, B.T., Turner, T.T. (eds), Charlottesville, USA, str. 115-122 (2002)
- <sup>93</sup> Jelinkova, P., Manaskova, P., Ticha, M., Jonakova, V.: Int. J. Biol. Macromol. 32, 99-107 (2003)

