

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



STUDIUM MECHANISMŮ VAZBY

SPERMIE V OVIDUKTU

(bos taurus)

Aneta Mádlová

Diplomová práce

Praha 2007

Prohlášení

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

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

V Praze dne 3 9 2017

Uličková A.

Podpis

Velmi ráda bych zde poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Liberdovi, Ph.D. za to, že mi ukázal, že „problém“ je vlastně pozitivním jevem. Také bych ráda velmi poděkovala Mgr. Tomášovi Drábovi za cenné rady a Mgr. Evě Hanzlíkové za pomocnou ruku a oběma za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji mé rodině, která to se mnou myslela vždy dobře a podporovala mě v každém snažení.

Tuto práci věnuji mé mamince a tatínkovi.

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Praha 2007

Aneta Mádlová

Obsah

OBSAH	4
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	6
1 ÚVOD	8
1.1 Samičí pohlavní ústrojí	8
1.1.1 Vaječníky	9
1.1.2 Vývodné pohlavní cesty	9
1.2 Samičí pohlavní buňky, oogeneze	11
1.2.1 <i>Zona pellucida</i>	12
1.3 Pohlavní cyklus samic	12
1.4 Samčí pohlavní orgány	13
1.4.1 Varle (<i>testis</i>)	13
1.4.2 Nadvarle (<i>epididymus</i>)	14
1.4.3 Chámovod (<i>ductus deferens</i>)	15
1.4.4 Přidatné pohlavní žlázy (<i>glandulae genitales accessoriae</i>)	15
1.5 Samčí pohlavní buňky, spermatogeneze	16
1.6 Fertilizace	17
1.7 Proteiny semenné plazmy	19
1.8 Proteiny oviduktální a děložní tekutiny	20
1.9 Tvorba a úloha rezervoáru spermíí v samičím pohlavním traktu	22
1.10 Cíl práce	24
2 MATERIÁL A METODY	25
2.1 Použitý materiál	25

2.1.1	Chemikálie	25
2.1.2	Biologický materiál	27
2.1.3	Další materiál	27
2.2	Metody	28
2.2.1	Izolace oviduktálních a děložních tekutin	28
2.2.2	Izolace epitelálních buněk povrchu sliznice oviduktu a děložního rohu	28
2.2.3	Biotinylace proteinů býčí semenné plazmy	28
2.2.4	Značení získaných proteinů fluorescein isothiocyanatem (FITC)	28
2.2.5	Diskontinuální SDS - elektroforéza dle Laemmliho [61]	29
2.2.6	Přenos proteinů na PVDF-membránu a následná sekvenace	31
2.2.7	Charakterizace izolovaných proteinů gelovou chromatografií	32
2.2.8	Afinitní chromatografie	32
2.2.9	Stanovení cukrů dle Dubios	33
2.2.10	Stanovení sialových kyselin v izolovaných směsích proteinů	33
2.2.11	Želatinová zymografie	34
2.2.12	Stanovení kyselé fosfatázy	35
2.2.13	ELBA metoda – studium inhibice vazby tekutin oviduktu a býčí semenné plazmy	35
2.2.14	Příprava vzorků pro průtokovou cytofluorimetrii a fluorescenční mikroskopii	37
2.2.15	Průtoková cytofluorimetrie	38
2.2.16	Fluorescenční mikroskopie	38
3	VÝSLEDKY	40
3.1	SDS - elektroforéza proteinů oviduktálních tekutin a tekutin dělohy	40
3.1.1	SDS - elektroforéza lyofilizátů z urogenitálního traktu krávy	40
3.2	Gelová chromatografie	41
3.2.1	SDS - elektroforéza proteinů tekutin oviduktu a dělohy rozdělených gelovou chromatografií	42
3.3	Afinitní chromatografie	43
3.3.1	SDS - elektroforeogramy proteinů tekutin dělohy a oviduktu rozdělených afinitní chromatografií	45
3.4	Přenos proteinů na PVDF-membránu a následná sekvenace	46

3.5	Stanovení sacharidů podle Dubois	46
3.6	Stanovení sialových kyselin	47
3.7	Želatinová zymografie	48
3.8	Stanovení kyselých fosfatázy	49
3.9	ELBA metoda	50
3.10	Průtoková cytofluorimetrie	51
3.10.1	Ověření vazby tekutin oviduktu na býčí spermie	51
3.10.2	Stanovení změny schopnosti vázat tekutin oviduktu, dělohy a epitelů oviduktu na spermii po inkubaci s glykosidázami	51
3.10.3	Studie změny schopnosti tekutin oviduktu vázat se na spermii v závislosti na autoprotolýze tekutin oviduktu	55
3.10.4	Studie inhibičních účinků býčí semenné plazmy na vazbu tekutin oviduktu na spermii	55
3.11	Fluorescenční mikroskopie	56
3.11.1	Mikroskopické pozorování změny vaznosti tekutin oviduktu, tekutin dělohy a epitelu oviduktu na spermii po inkubaci s enzymy	56
3.11.2	Mikroskopická studie změny schopnosti vázat tekutiny oviduktu na spermii v závislosti na autoprotolýze tekutinami oviduktu	58
3.11.3	Studie účinků býčí semenné plazmy na vazbu tekutin oviduktu na spermii	59
3.11.4	Fluorescenční mikroskopie na tkáních	60
4	DISKUZE	61
5	ZÁVĚR	64
6	LITERATURA	66

Seznam použitých zkratek

AA	- akrylamid
ABTS	- 2,2'-azino-bis(2-ethylbenzthiazoline-6-sulfonová kyselina)
APS	- persíran amonný
Avidin-HRP	- avidin značený křenovou peroxidasou
BM	- bromfenolová modř
Bis AA	- N, N'-metylen-bisakrylamid
BSA	- hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumin)
CBB	- Coomassie Brilliant Blue R-250
D-Gal	- D-galaktóza
D-Gal/NAc	- N-acetyl-D-galaktosamin
D-Glu/NAc	- N-acetyl-D-glukosamin
D-Man	- D-mannóza
DMF	- N,N-dimethylformamid
ELBA	- z angl. Enzyme-Linked Binding Assay
EO	- epitely oviduktu
ED	- epitely dělohy
FITC	- fluorescein isothiocyanat
Fet	- fetuin
Hep	- heparin
Hya	- hyaluronová kyselina
Chs	- chondroitin sulfát
L-Fuc	- L-fukóza
Lys	- lysozym

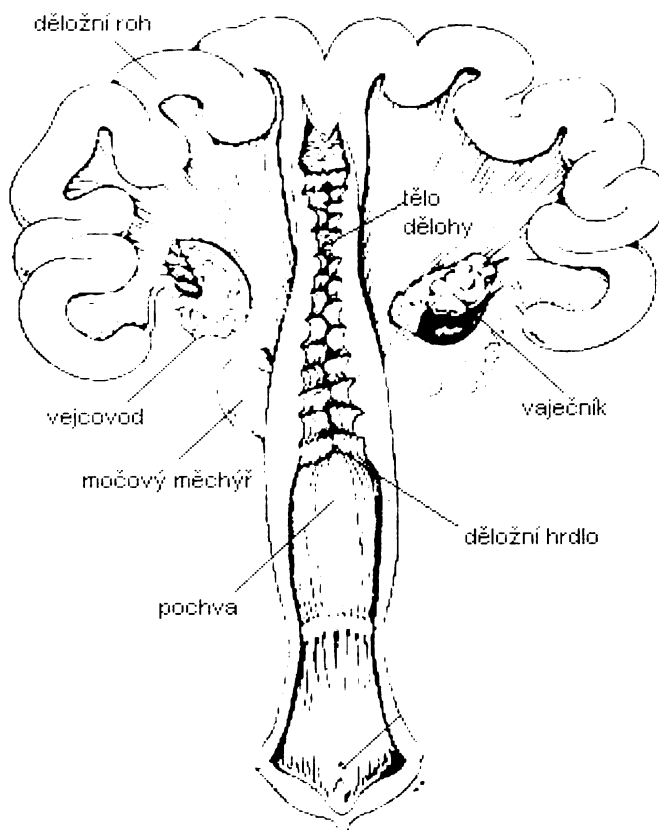
PNGáza F	- PNGase F z Elizabethkingia meningoseptica
PVDF- membrána	- poly(vinylidendifluoridová) membrána
NHS-biotin	- N-hydroxysukcinimidobiotin
OVA	- ovalbumin
PBS	- fosfátem tlumený fyziologický roztok (z angl. Phosphate-Buffered Saline)
SDS	- dodecylsulfát sodný
TCA	- trichloroctová kyselina
TO	- proteiny tekutin oviduktu
TD	- proteiny tekutin dělohy
TEMED	- N,N,N',N' - tetramethylethylendiamin
Tris	- tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Úvod

Rozmnožování je jedním z charakteristických znaků živých soustav, nezbytné pro zachování života na planetě Zemi. Účastní se ho dva jedinci stejného nebo velmi blízké příbuzného druhu a opačného pohlaví, nebo stejného pohlaví v případě hermafoditismu. Tato práce se zabývá pohlavním rozmnožováním, kdy se vytvářejí specializované pohlavní buňky (haploidní gamety) - samičí vajíčko a samčí spermie, které splývají v diploidní zygotu. Aby mohl proběhnout tento proces, je nutné setkání buněk ve vhodném čase, prostředí a buňky musí mít vlastnosti umožňující jejich splynutí (viz dále) [1]. Vzájemného kontaktu a spojení jsou schopny pouze zralé pohlavní buňky [2].

1.1 Samičí pohlavní ústrojí

Základní proces oplodnění se u savců odehrává v samičím pohlavním ústrojí. Anatomii vidíme na (Obr. 1). Pohlavní ústrojí krávy se skládá z pochvy, děložního hrdla, dělohy a děložních rohů, vejcovodů a vaječníků [2].



Obr. 1 - Pohlavní ústrojí samice

1.1.1 Vaječníky

Vaječníky (*ovaria*) jsou uloženy dutině břišní a jejich poloha, velikost a tvar záleží na druhové příslušnosti, věku zvířete a funkčním stavu. Zastávají jednak funkci generativní, tzn. produkují samičí pohlavní buňky (*oocyty*), a funkci humorální, vytvářejí samičí pohlavní hormony [2].

Vaječníky se skládají z kůry a dřeně. Během fetálního období života je na povrchu ovarii zárodečný epitel. V průběhu vývoje tyto prvotní ovariální buňky diferencují, zanořují se a migrují do kůry ovarii. Primární vaječné buňky se ve fetálním ovariu mitoticky dělí [3]. V dalším vývoji projdou oocyty profází prvního meiotického dělení a zde se zastaví. Proces, ve kterém se vytváří vajíčka, je znám jako oogeneze [3].

1.1.2 Vývodné pohlavní cesty

Vývodné pohlavní cesty umožňují kopulaci, transport vajíčka a spermií, jejich setkání a splynutí. Jsou tvořeny dvěma vejcovody, dělohou, děložním hrdlem, pochvou, poševní předsíní a ochodem (Obr. 1, str. 8)[2].

1.1.2.1 Vejcovody (*tuba uterina, oviductus*)

Vejcovody představují spojení mezi vaječníky a dělohou. Tyto párové tenké klikatě probíhající trubicovité útvary jsou tvořené převážně vnitřní vrstvou kruhových a v menší míře zevní vrstvou podélných svalových vláken. Uvnitř jsou vystlány sliznicí z řasinkového epitelu s četnými glandulárními buňkami, na vnějším povrchu jsou kryty serózou. Její povrchové struktury napomáhají migraci vajíčka z vaječníku do rohu děložního [3]. Ovariální konec vejcovodu je nálevkovitě rozšířen a roztřepen ve *fimbriae*, pomocí nichž je zachycováno vajíčko při ovulaci. Střední část vejcovodu se směrem k děložnímu rohu zužuje v *isthmus*.

V době říje směřují kontrakční vlny na vejcovodu od dělohy k vaječnickům, v době ovulace se jejich směr mění v opačný. V době ovulace epiteliální buňky ztrácejí řasinky, získávají charakter sekrečních buněk a sliznice vejcovodů vykazuje maximální enzymatickou činnost (viz kap. 1.8, str. 20). Uvedené děje mají velký význam pro transport spermií a vajíčka, pro jejich vzájemné spojení a později pro sestup rýhující se zygoty do dělohy [2].

1.1.2.2 Děloha (*uterus*)

Do dělohy sestupují oplozená vajíčka a zabezpečuje jejich další vývoj. Je to dutý svalový orgán, uložený z části v dutině břišní a z části v dutině pánevní [2]. Kopytníci (kráva, ovce, koza,

prasnice, klisna atd.) a většina šelem (tygřice, ale i fena) mají dělohu dvourohou. Je to typická děloha s jedním krčkem, jedním tělem a dvěma rohy (Obr. 1, str. 8) [3]. Proporce mezi tělem, rohy a krčkem se různí podle jednotlivých druhů.

Stěny dělohy tvoří hladká svalovina a vnitřek dělohy vystýlá sliznice, nazývaná *endometrium*. Má značné množství žláz, jejichž sekrety slouží k výživě nidujícího vajíčka před vývojem placenty [3].

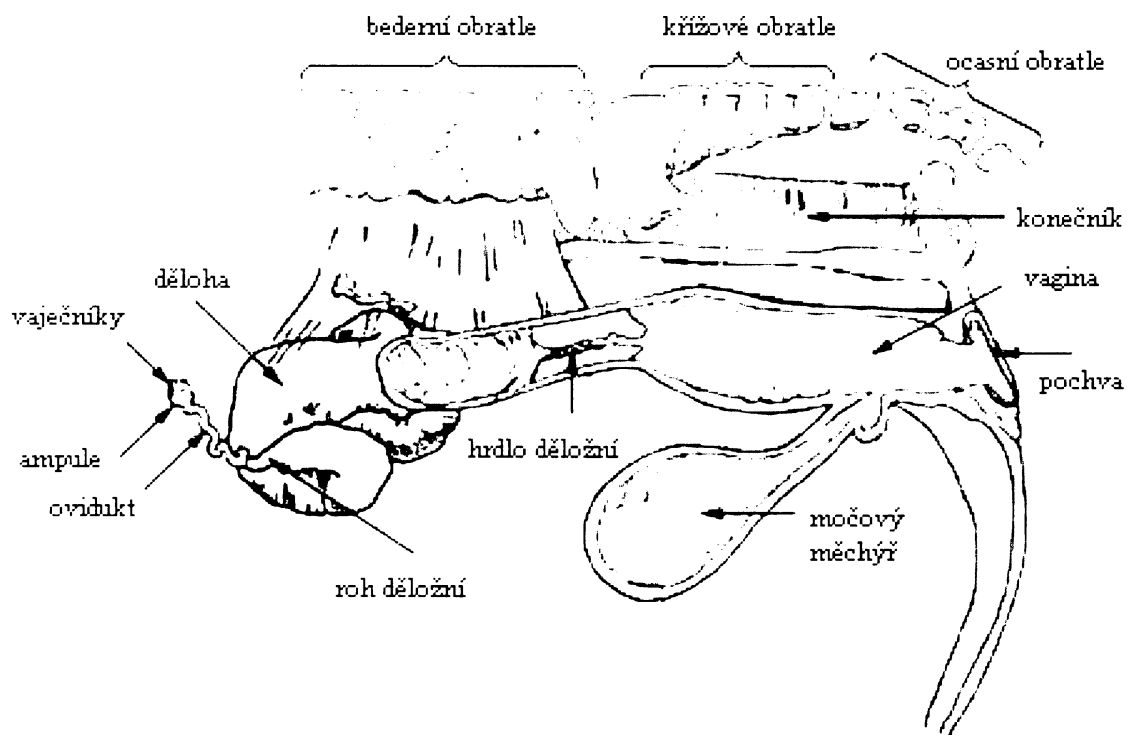
1.1.2.3 Pochva (*vagina*)

Pochva (Obr. 2) je silnostěnný trubicovitý orgán začínající jako límec na krčku děložním a přecházející v předsíň poševní (*vestibulum vaginae*). Pochva, poševní předsíň a ochod (*vulva*) jsou ústrojí kopulační [2].

1.1.2.4 Poševní předsíň (*vestibulum vaginalis*)

Poševní předsíň je kaudální pokračování pochvy. Na rozhraní mezi pochvou a poševní předsíní ústí krátká močová trubice samic. Poševní předsíň je tedy orgán nejen pohlavní, ale slouží i jako vývodná močová cesta (Obr. 2). Hranice mezi pochvou a předsíní je tvořena u mladých samic, které se ještě nepářily, kruhovou slizniční řasou – panenskou blánou [3].

Pohlavní dospělost, resp. vhodný věk pro první páření u samic skotu, nastává ve 12 – 14 měsíci života [4].



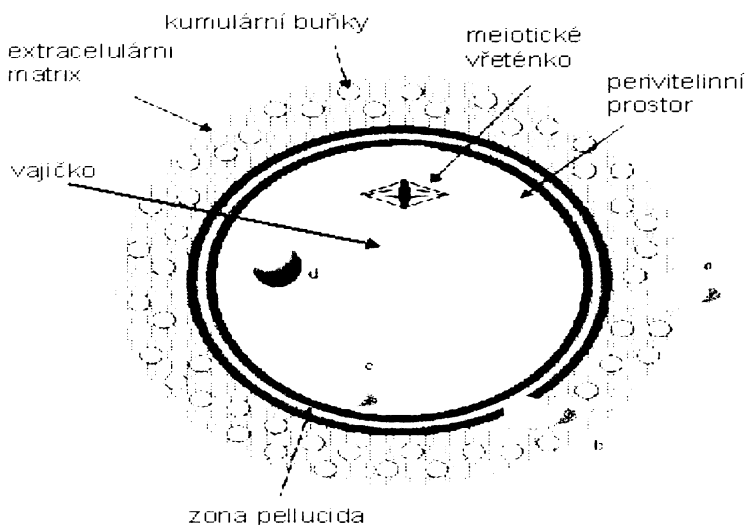
Obr. 2 - Reprodukční orgány krávy a jejich umístění v těle

1.2 Samičí pohlavní buňky, oogeneze

Samičí gamety se od samčích liší morfologickými i fyziologickými vlastnostmi. Vajíčka vznikají ve folikulu vaječníku a spermie v semenotvorných kanálcích varlat. Vznik obou pohlavních buněk se obecně nazývá gametogeneze [1, 5]. Pohlavní buňky savců se tvoří z prapohlavních buněk, které se diferencují ze somatických buněk již při rýhování vajíčka a putují do gonád během zárodečného vývoje jedince. Vývoj pohlavních buněk a tvorba pohlavních hormonů je řízena gonadotropními hormony z adenohipofýzy [2].

Samičí pohlavní buňky - vajíčka (*oocyty*) vznikají a vyvíjejí se ve vaječnicích. U savců hovoříme o tzv. folikulárním typu vývoje, kdy úlohu zásobování oocyty přebírají buňky vaječníku a vytvářejí kolem něj epitelový váček – folikul. S vývojem vajíčka prodělává změny i folikul. Zralý folikul s vajíčkem připraveným k ovulaci se nazývá Graafův folikul [1]. Po jeho prasknutí jsou vajíčka spolu s kumulárními buňkami uchycenými k vajíčku vysokomolekulární kyselinou hyaluronovou zachycena ampulemi vejcovodu [6, 7].

Vajíčko se zastaveným vývojem v metafázi II. meiotického dělení sekretuje glykoproteinový obal zvaný *zona pellucida*. Ovulované vajíčko vstupující do oviduktu je obklopeno zonou pellucidou a kumulárními buňkami (Obr. 3). Vnější buněčný obal, *cumulus oophorus*, je tvořen folikulárními (kumulárními) buňkami obklopenými extracelulární matrix složené převážně z kyseliny hyaluronové. Mezi plazmatickou membránou vajíčka a zonou pellucidou je periviteliní prostor, vyplněný folikulární tekutinou, obsahující proteiny, sacharidy, volné aminokyseliny, glykosaminoglykany, steroidy a enzymy (hyaluronidázu, kolagenázu, transaminázu, kyselou fosfatázu) [8, 9].



Obr. 3 – Vajíčko (*oocyt*)

1.2.1 Zona pellucida

Zona pellucida (Obr. 3, str. 11) hraje důležitou roli v procesu rozmnožování [10, 11, 12]. Například prasečí zona pellucida obsahuje několik typů glykoproteinů: ZP1, ZP2, ZP3, ZP4. Obdobně je zona pellucida krávy složena z proteinů bZP1, bZP3 α , bZP3 β . Kapacitovaná spermie je schopná rozeznat bZP3 α , bZP3 β a využít k vazbě na vajíčko [13].

Tyto glykoproteiny jsou složeny z O- i N-glykosidicky vázaných oligosacharidů. Cukerné složky nesou záporně nabitě sulfátové a karboxylové skupiny, které jsou důležité pro vzájemné rozpoznávání gamet (viz kap. 1.6, str. 17) [13].

Cytoplazmatické organely vajíčka jsou uloženy nepravidelně až na kortikální granule, které jsou rovnoměrně rozmístěny pod cytoplazmatickou membránou. Kortikální granule obsahují hydrolytické enzymy, jež se vyplaví do perivitelinního prostoru po splnutí spermie s plazmatickou membránou vajíčka, tím způsobí modifikaci glykoproteinů zony pellucidy a jejich zesílení. Tato tzv. kortikální reakce způsobí nepropustnost zony pellucidy pro další spermie (viz kap. 1.6, str. 17) [8, 9].

1.3 Pohlavní cyklus samic

Vnější projevem ovulace je říje (*estrus*), projevující se navenek neklidem samice a ochotou přijmout samce. Vlivem estrogenů dochází k prokrvení a otoku patrném na vulvě, otevírá se děložní krček a vytéká hlen zpočátku čirý, později zakrvavený. Kromě změn na pohlavním ústrojí je možno pozorovat řadu dalších – mění se složení krve, množství i kvalita mléka (u dojných krav) [4].

Období mezi říjemi je říjový cyklus (pohlavní cyklus). Skot patří mezi polyestrický druh zvířat, tzn. výskyt říje u jedince vícekrát za rok.

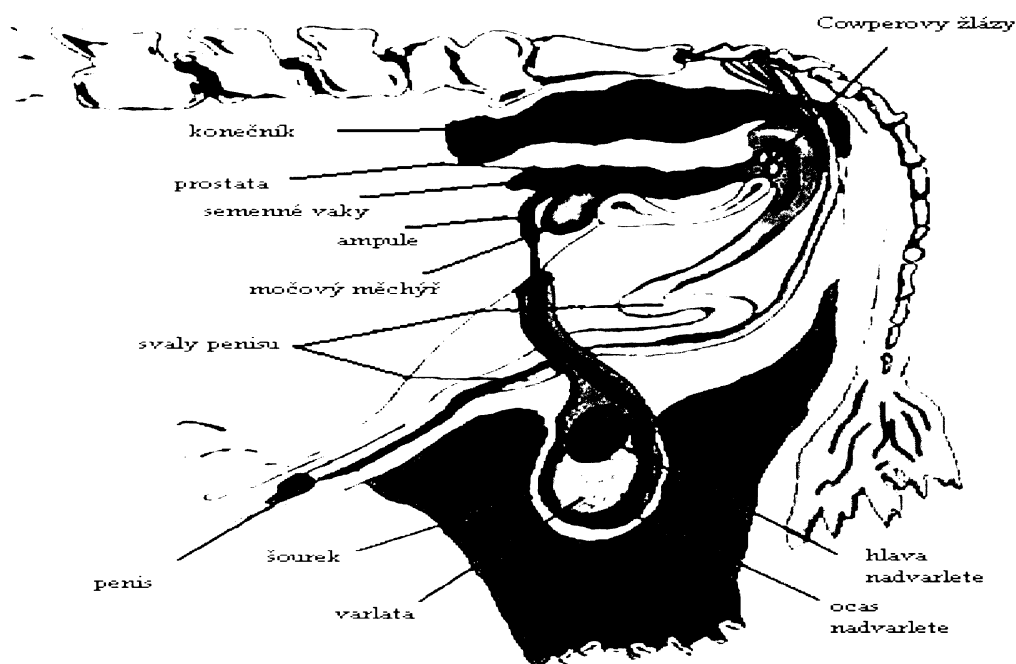
Fáze pohlavního cyklu samic je možné shrnout následujícím způsobem:

- a) Proestrus – období přípravy k říji trvající asi 3 dny;
- b) Estrus (říje) – období vlastní říje trvající 1 – 2 dny charakterizované typickými změnami na vývodních cestách pohlavních orgánů a projevem říjového chování (otevření děložního krčku, uvolňování a výtok hlenu z pochvy, ovulace, v chování samice se projevuje výrazné pohlavní vzrušení a ochota k páření);
- c) Metestrus – poříjová období zklidňovací trvající asi 4 dny, vznik žlutého tělíska;
- d) Diestrus – meziříjová období klidu. Pokud došlo k oplození, přetrvává žluté tělísko, což u polyestrických zvířat způsobí růst nového folikulu a začíná nový cyklus [4].

1.4 Samčí pohlavní orgány

Reprodukční funkce samců zahrnuje tvorbu spermií, jejich dozrávání a dopravu do samiččích pohlavních orgánů. Množství produkovaných spermií je druhově odlišné a mění se například v závislosti na fotoperioditě nebo na stáří. Proces samčí reprodukce je řízen hormony a autonomním nervovým systémem [4].

Anatomické uspořádání samčích pohlavních orgánů je znázorněno (Obr. 4)



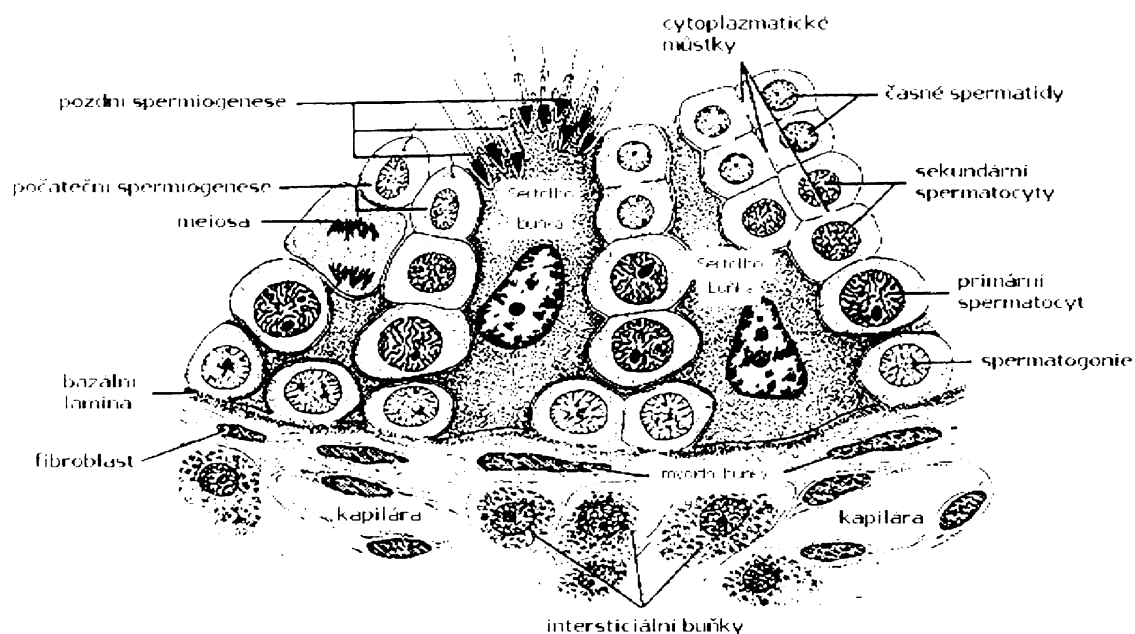
Obr. 4 - Vnitřní uspořádání pohlavních orgánů býka

1.4.1 Varle (*testis*)

Varlata jsou párový orgán většinou vejčitého tvaru a jsou uložena ve vakovitém útvaru – šourku (*scrotum*). Zevní obal šourku vzniká vychlípěním břišní kůže, která je tenká a elastická. Pod kůží je hladká svalovina propletená podobně pružnými vlákny (*tunica dartos*), ta přechází v přepážku, která rozděluje šourek na dvě poloviny. Každá část obsahuje jedno varle. *Tunica dartos* je propojena se zevním obalem varlat (*tunica vaginalis*) a zajišťuje spolu se zdvihačem varlat (*musculus cremaster*) termoregulační funkci šourku, která je důležitá pro správné zrání spermií. Základním principem regulace teploty uvnitř šourku je smršťování *tunica dartos*, čímž se mění velikost plochy, na které dochází k výměně tepla s okolím a přitahování varlat k tělu (*musculus cremaster*), což pomáhá udržovat varlata v teple [14].

Varle je bohatě zásobeno krví. Krevní cévy jsou propleteny mezi semenotvornými kanálky. Také se zde nachází Leydigovy buňky, ve kterých je syntetizován samčí pohlavní hormon – testosteron [14].

Varle se převážně skládá z lalůčků vyplněných semenotvornými točitými kanálky (*tubuli seminiferi contorti*). Právě zde dochází k vývoji spermií ze spermatogonií. Zárodečné buňky – *spermatogonie* – nasedají na bazální membránu točitých kanálků spolu se Sertoliho buňkami, ve kterých se koncentrují vytvořené spermatidy, vyživují se a prodělávají zde morfologické změny (Obr. 5). Točité kanálky přecházejí v přímé kanálky (*tubuli recti*), ty se dále spojují ve větší kanálky (*rete testis*), až vzniká jeden velký kanál, který vyplňuje celý *epididymus* [14, 15].



Obr. 5 - Semenotvorný kanálek ve varleti

1.4.2 Nadvarle (*epididymus*)

Nadvarle je párový orgán o délce několik metrů (např. 20 m u člověka, 40 m u býka a 60 m u kance). Nadvarle je připojeno k povrchu varlete téměř po celé jeho délce. Dělí se na tři hlavní části: hlavu, tělo a ocas nadvarlete (*caput epididymis*, *corpus epididymis* a *cauda epididymis*).

Je tvořeno mnohonásobně stočenými kanálky (v hlavě nadvarlete), které se postupně spojují a tvoří širší odvodní kanálky (v těle nadvarlete), až se spojí v jeden klikatý kanál, který se v ocasu nadvarlete napřimuje a přechází v chámovod [4].

Epididymus skladuje po dobu jednoho až dvou měsíců spermie, které sem postupují z *tubuli recti* varlat. Hlava a tělo nadvarlete jsou vystlány řasinkatým epitelem, který je důležitý pro posun spermií. Během migrace spermií z *caput epididymis* do *cauda epididymis* spermie dozrávají v plodné pohlavní buňky procesem epididymální maturace. Poté jsou již schopny pohybu [14].

1.4.3 Chámovod (*ductus deferens*)

Chámovod je pokračováním vývodného systému z konce nadvarlete do močové trubice. Chámovod vychází z nadvarlete a směřuje do dutiny břišní. Zde je spolu s tepnou, žílou, nervem, lymfatickými cévami a hladkou svalovinou obalen blankou, nazývanou seróza - tvoří semenný provazec [3].

1.4.4 Přidatné pohlavní žlázy (*glandulae genitales accessoriae*)

Přidatné pohlavní žlázy jsou samostatné orgány, které produkují sekrety vylučované do močové trubice. Proteiny obsažené v těchto sekretech se podílí na tvorbě proteinového obalu spermií, poskytují spermiím výživné látky a upravují jim prostředí během průchodu močovou trubicí (viz kap. 1.7, str. 19). K těmto pohlavním žlázám patří párové ampule chámovodu, semenné vajíčky, předstojná žláza neboli prostata a bulbouretrální žlázy [14].

1.4.4.1 Semenné vajíčky

Semenné vajíčky jsou drobný párový orgán složený z lalůček. Produkují u býků asi 60 % objemu ejakulátu, u člověka asi 30 %, u hřebce asi 45 % (literatura zde není jednotná). Tento sekret poskytuje výživu spermiím. Bývá různě zbarven (druhoví variabilita), což je způsobeno přítomností flavinů [14]. Semenné vajíčky tedy určují složení semenné plazmy (viz 1.7, str. 19).

1.4.4.2 Prostata

Prostata je žláznatý orgán uložený na přechodu močového měchýře v močovou trubicí a částečně močovou trubicí obklopuje. Je tvořena lalůčky. Prostata vylučuje sekret důležitý pro úpravu pH v močové trubicí, je tedy důležitá pro udržení životnosti spermií [14].

1.4.4.3 Cowperovy žlázy

Cowperovy žlázy jsou přidatné pohlavní žlázy uložené podél močové trubice. Jejich vývoj, velikost, složení sekretu a zastoupení v ejakulátu se značně liší druh od druhu [14, 17]. Cowperovy žlázy jsou u býků, na rozdíl od kanců, poměrně malý párový orgán válcového tvaru. Strukturou se podobají prostatě, neboť jsou také složeny z lalůček, z nichž ústí trubičky do sběrných prostorů, které pak ústí do močové trubice za semennými vajíčky a prostatou směrem od testes [14, 18]. Sekret je čirý, hlenovitý a zásaditý. Obsahuje aminosacharidy a sialoproteiny. Zásadité prostředí vytvářené Cowperovou žlázou neutralizuje kyselé prostředí pochvy samice a má příznivý vliv na pohyblivost spermií.

Cowperovy žlázy kanců jsou studovány mnohem více [18, 19].

U býků přispívají Cowperovy žlázy pouze asi 6 % k celkovému objemu ejakulátu. Jejich funkce není stále plně objasněna. Nemají pravděpodobně klíčovou roli při fertilizaci, avšak jejich vlastnosti mohou ovlivnit plodnost sameců.

1.5 Samčí pohlavní buňky, spermatogeneze

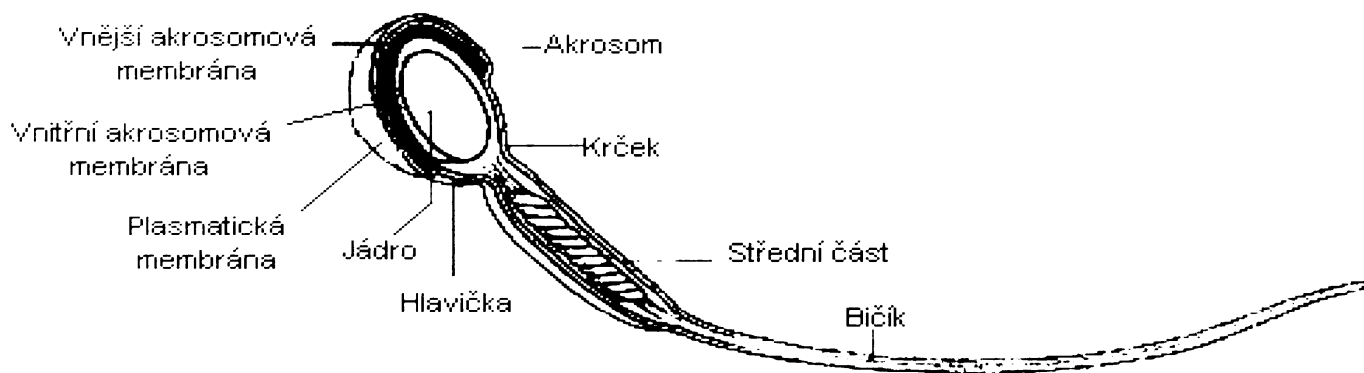
Spermatogeneze je proces, jehož výsledným produktem jsou haploidní samčí pohlavní buňky (spermie). Probíhá v semenotvorných kanálcích varlete a zahrnuje sérii mitotických dělení diploidních spermatogoniálních kmenových buněk za vzniku spermatocytů, dvě meiotická dělení spermatocytu za vzniku haploidních spermatid a rozsáhlé morfologické změny spermatid během spermateliózy. Následuje uvolnění hotových spermií do lumen semenotvorného kanálku (Obr. 5, str. 15) [20].

Spermatelióza je přeměna spermatidy na spermii. Spermie ztrácejí většinu cytoplazmy a tvoří se struktury důležité pro fertilizaci (oplození). Z Golgiho komplexu spermatidy se v apikálním regionu hlavičky tvoří akrosom a obklopuje jádro. Dochází ke kondenzaci chromosomů a k tvorbě bičíku [5].

Hotová spermie je tedy složena z hlavičky, krčku, střední části a bičíku (Obr. 6, str. 17).

Hlavička spermie je z větší části tvořena jádrem, které je obklopeno malým množstvím cytoplazmy. Přední část hlavičky obsahuje akrosom. Je to unikátní organela spermatogonidních buněk, která obsahuje hydrolytické enzymy (kyselé hydrolázy, akrosin, α -N-acetyl-D-glukosaminidázu, kyselou fosfatázu, hyaluronidázu, neuraminidázu a další), nezbytné pro penetraci spermie zónou pellucidou. Cytoskeletární struktury v hlavičce spermií hrají pravděpodobně důležitou strukturní roli, formují tvar hlavičky. Zároveň napomáhají pronikání spermie obalem vajíčka během procesu fertilizace [21].

Bičík spermií zprostředkovává pohyb a je složen ze čtyř částí: krčku a z části střední, hlavní a koncové (Obr. 6, str. 17). Cytoskelet bičíku tvoří axonema, vnější hustá vlákna a jemná vlákna tvořící pouzdro. Axonema vede středem celého bičíku a tvoří ji centrální pár mikrotubulů obklopený devíti dublety mikrotubulů. Axonemu obklopují vnější hustá vlákna a jemná vlákna tvořící pouzdro. Ve střední části bičíku je kolem vnějších hustých fibril obtočena šroubovice z mitochondrií [1, 20].



Obr. 6 – Samčí pohlavní buňka

Při ejakulaci putují spermie chánovodem přes prostatu do močové trubice a při tom jsou vystaveny působení semenné plazmy. Jako semenná plazma je označována směs sekretů epiteliálních buněk přídatných pohlavních žláz – prostaty, semenných váčků a bulbouretrálních žláz (viz 1.7, str. 19) [22, 23, 24].

Býk vyprodukuje 2 – 5 ml ejakulátu s 300 – 2 000 milióny spermií v mililitru, kanec naopak velké množství 100 – 150 ml ejakulátu s pouhými 25 – 300 milióny spermií v mililitru [3].

Semenná plazma má na spermie dekapacitační účinek. Dekapacitované ejakulované spermie nejsou schopny oplodnit vajíčko [25].

Kapacitace je soubor změn, které se odehrávají na spermii během jejího transportu k místu fertilizace, tedy v samičím pohlavním traktu [25]. Jedná se o pochody probíhající v membráně spermie, zejména v akrosomální oblasti. Odkrývají se nebo se vytvářejí receptory pro interakci s vajíčkem (viz kap. 1.9, str. 22) [26]. Kapacitované spermie jsou schopny se vázat na kumulární buňky pomocí povrchového proteinu PH-20 (hyaluronidáza na povrchu spermie) a penetrovat jimi k zoně pellucidě [27]. Životaschopnost spermie po ejakulaci mimo tělo samice obvykle bývá 24 – 48 hod [3].

1.6 Fertilizace

Oplodnění (*fertilizace*) je pojem zahrnující nejen splynutí pohlavních buněk, ale i předcházející děje, které jsou k tomuto splynutí nutné. Její průběh (Obr. 7, str. 18) lze rozdělit na následující kroky [28, 16]:

- penetrace spermie kumulárními buňkami
- primární vazebný kontakt gamet
- akrosomová reakce
- sekundární vazebný kontakt gamet

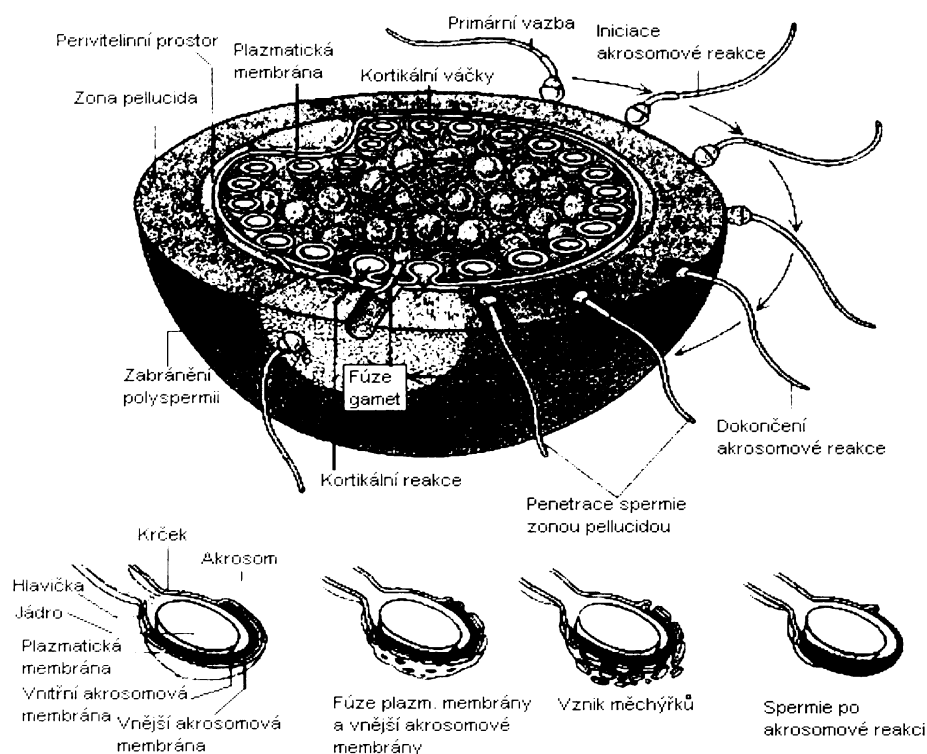
- penetrace zónou pellucidou splynutí gamet a následné děje

Aby došlo k primárnímu kontaktu gamet, musí spermie projít vrstvou kumulárních buněk. Toho je schopná pouze intaktní spermie, tedy taková, u které neproběhla akrosomová reakce [30].

Dalším krokem je vzájemné rozpoznání a primární kontakt gamet na základě komplementárních molekul na povrchu spermie a vajíčka. U savců tuto vazbu zprostředkovávají proteiny na povrchu spermie a glykoproteiny zóny pellucidy (viz kap. 1.2.1, str. 12) [31, 32].

Primární vazbou spermie na vajíčko je dán impuls k zahájení akrosomové reakce, kdy dochází k zániku vnější akrosomové membrány a plazmatické membrány spermie a jejich fúzy. Obsah akrosomu se vylíje a na povrch se dostává vnitřní akrosomová membrána. Proteiny na ní navázané opět interagují s glykoproteiny zóny pellucidy. Tato interakce představuje sekundární vazebný kontakt gamet [25].

Následuje penetrace spermie zónou pellucidou, na níž se podílí jednak mechanický pohyb bičíku a jednak hydrolytické enzymy akrosomu, které rozkládají zónu pellucidu (Obr. 7, str. 18). Nejdůležitějším a nejprozkoumanějším z nich je akrosin, který vzniká z neaktivního proakrosinu po proběhnutí akrosomové reakce [33]. Dalšími významnými enzymy akrosomu jsou hyaluronidáza, β -N-acetyl-D-glukosaminidáza, β -galaktosidáza, arylsulfatáza, neuraminidáza, endo- a exopeptidázy [25].



Obr. 7 - Fertilizace a detail akrosomové reakce

Po proniknutí spermie zónou pellucidou dochází ke splynutí gamet. U savců splyne pouze jedno jádro spermie s jedním jádrem vajíčka, jde o monospermní oplození. Proniknutí dalších spermií do vajíčka (tzv. polyspermii) je zabráněno depolarizací plazmatické membrány. (viz kap. 1.2.1, str. 12) Zona pellucida je těmito enzymy částečně hydrolyzována a zesíťována, čímž ztrácí schopnost iniciovat akrosomovou reakci a i tímto se stává nepropustnou pro další spermie [25].

1.7 Proteiny semenné plazmy

Semenná plazma obsahuje jak nízkomolekulární látky (draselné a zinečnaté ionty, kyselinu citronovou, fruktózu, fosforylcholin, cholesterol, polyaminy, volné aminokyseliny, prostaglandiny), tak i látky s vyššími molekulovými hmotnostmi, jako jsou různé polypeptidy, glykoproteiny a enzymy [23].

Z vysokomolekulárních látek představují proteiny pravděpodobně nejdůležitější složku. Jsou produkovány převážně semennými vajíčky a prostatou. Některé proteiny obsažené v semenné plazmě jsou při ejakulaci adherovány na povrch spermií. Tyto proteiny, spermadheziny, vykazují řadu vazebných schopností s různými ligandy: sacharidy, sulfátovanými glykosaminoglykany, fosfolipidy a proteinázovými inhibitory. Spermadhesiny mají afinitu i vůči sobě, tyto vzájemné interakce byly studovány u různých druhů [29, 35, 36, 37]. Mohou se účastnit jednotlivých kroků fertilizačního procesu (formování oviduktálního rezervoáru, kapacitaci spermií, rozpoznání a na vazbě spermie na oocyt).

Proteiny se mohou přichytit na povrch spermie dvěma způsoby. Prvním je interakce proteinů s fosfolipidy plazmatické membrány a tím druhým způsobem jsou vzájemné interakce mezi monomerními formami proteinů [35].

Proteiny na povrchu spermie mohou také interagovat s glykosaminoglykanovými řetězci proteoglykanů, produkovány buňkami epitelu samičího urogenitálního traktu. Interakce proteinů semenné plazmy se sulfátovanými polysacharidy (jako heparin, chondroitin sulfát, dextranulfát, fukoidan) byla předmětem více studií [41, 42, 43, 44].

Býčí semenná plazma obsahuje čtyři majoritní proteiny: BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 a BSP-30 kDa [45].

Jsou sekretovány ze semenných vajíček a vážou se na plazmatickou membránu spermie při ejakulaci. Všichni členové této rodiny jsou glykoproteiny s výjimkou BSP-A3 [46]. Relativní molekulová hmotnost proteinů BSP-A1, A2, A3 se pohybuje v rozmezí 15 000 – 16 000, zatímco velikost BSP-30 kDa je přibližně 28 000 – 30 000. BSP-A1 a BSP-A2 mají identickou

aminokyselinovou sekvencí, ale liší ve stupni glykosylace. BSP-A1 je navíc oproti BSP-A2 O- glykosylován na threoninu [47].

U býčích a kančích proteinů obsahujících ve své molekule fibronektinovou doménu byla popsána schopnost vázat fosforylcholin [39, 40]. Všechny tyto proteiny jsou schopny interagovat s fosfolipidy plazmatické membrány spermie, která obsahuje fosforylcholinové skupiny. Předpokládáme, že interakce BSP proteinů s fosfolipidy s podílem fosforylcholinu hraje důležitou roli při modifikaci plazmatické membrány spermií během kapacitace nebo akrosomové reakce [46].

Proteiny z býčí semenné plazmy BSP-A1 a BSP-A2 se společně označují PDC-109 [47]. PDC-109 se vyskytuje v agregované formě. Skládá se z 109 aminokyselin, obsahuje čtyři intramolekulární disulfidické vazby. Některé z nich jsou uspořádány do klastrů, což umožňuje jejich vzájemné spojování [47].

Z popsaných vazebných schopností BSP proteinů předpokládáme, že se podílejí na transportu lipidů (cholesterolu, fosfolipidů) a hrají důležitou roli v modifikaci plazmatické membrány spermie během kapacitace, kdy dochází ke změnám ve složení membrány (zmenšení poměru cholesterol/fosfolipidy, zvyšuje se propustnost pro vápenaté kationty, prostorová redistribuce membránových proteinů a lipidů) [46].

Také bylo zjištěno, že za fyziologických podmínek se pokrytí povrchu spermie, procesu kapacitace a primární vazby spermie se zónou pellucidou účastní spíše agregované formy proteinů semenné plazmy než jednotlivé proteiny [48, 49].

Výše uvedené proteiny býčí semenné plazmy se značí jako heparin vázající. Byly zde však identifikovány i heparin nevážající proteiny – aSFP, BUSI-I a BUSI-II.

aSFP (Mr 12 900) je protein patřící do rodiny spermadhesinů. V býčí semenné plazmě je v koncentraci 2 – 7 mg/ml. Na povrch ejakulované spermie se váže jen omezeně, na povrchu kapacitované se už nenachází vůbec. Také nemá schopnost se vázat na zónu pellucidu [47]. aSFP tedy vystupuje spíše jako dekapacitační faktor. Předpokládá se, že chrání spermie před oxidativním poškozením. Zároveň má stimulační efekt na ovulaci po inseminaci [47].

BUSI-I a BUSI-II jsou nízkomolekulární látky, působí jako inhibitory akrosinu [37].

1.8 Proteiny oviduktální a děložní tekutiny

Složení tekutin v děloze a oviduktech je velmi podobné, liší se hlavně koncentrací přítomných proteinů. Jejich sekrece do prostorů dělohy a oviduktů je velmi proměnlivá u různých druhů. I v rámci jednotlivého druhu se složení liší dle fáze cyklu, kterou samice

prochází (zvýšená koncentrace při ovulaci, období páření apod.) Řízení těchto změn mají na starosti steroidní hormony estrogen a progesteron [4].

Díky množství proteinů a glykoproteinů je tato tekutina viskozitou podobná krvi. Má také obdobnou osmolaritu, ale výrazněji odlišnou koncentraci iontů CO_3^{2-} a K^+ . Alkalické pH je rovněž mírně proměnlivé dle cyklu. Ve srovnání s krví ještě můžeme uvést přítomnost sacharidů glukózy a laktátu, není však shodné co do koncentrace [2].

V tekutinách oviduktu a dělohy byly v malém množství identifikovány i fosfolipidy, triglyceridy a cholesterol. Ve větším množství se zde nacházejí volné aminokyseliny (Met, Leu, Phe, Lys, Asp, taurin, hypotaurin atd.). Některé z nich mají vliv na regulaci intracelulárního pH, jiné ochraňují embryo před osmotickým stresem. Taurin se účastní dějů, které jsou základem akrosomové reakce a hypotaurin vychytává volné radikály, oba také chrání gamety a embrya a podporují jejich životaschopnost [50].

Důležitou složkou oviduktálních tekutin jsou proteiny. Největší podíl (60 - 80 %) tvoří sérové proteiny - hovězí albumin.

Majoritní zastoupení mají glykoproteiny. Jejich koncentrace se výrazně zvyšuje před ovulací, poté opět klesá. Syntézu většiny glykoproteinů kontroluje hormon estrogen a hormon progesteron řídí jejich uvolňování. Glykoproteiny mají mnoho funkcí. Důležité je, že zvyšují viskozitu oviduktální tekutiny a stabilizují prostředí v bezprostřední blízkosti gamet nebo embrya tím, že se váží na *oocyt* (zonu pellucidu), nebo *embryo*. Těmi nejdůležitějšími a zatím popsány glykoproteiny jsou OGP (oviductal glykoprotein), OSGP (oestrus – associated oviduct – specific glykoprotein) a proteiny mucinového typu [52].

První uvedený – OGP – je cca 120 kDa veliký a jeho syntéza i sekrece jsou závislé na estradiolu. Tento glykoprotein má mnoho koncových sialových kyselin, některé publikace o něm mluví přímo jako o sialomucinu. OGP je exprimován po celé oblasti oviduktu. Byl nalezen nejen u krav, ale i u primátů, ovcí, prasat, koz, křečků, krys a u lidí. Jeho úlohou patrně je zabránit polyspermii tím, že inhibuje vazbu spermie na zonu pellucidu. Také ale urychluje kapacitaci a napomáhá tak oplození. Spekuluje se, že může hrát roli v druhové specifitě interakcí oocytu a spermie [52].

OSGP je protein, který asociuje s oviduktem hlavně v období estru. Je to homologický glykoprotein u různých druhů, z toho lze soudit, že je evolučně stálý. OSGP se podílí na vazbě spermii v *isthmu* a tím na tvorbě oviduktálního rezervoáru (viz kap. 1.9, str. 22) U křečka například OSGP asociuje se spermii i oocytem a napomáhá tak penetraci a samotné fertilizaci.

Obecně se uvádí, že tento glykoprotein svou vazbou na zonu pellucidu oocytu zvyšuje pravděpodobnost a schopnost oplodnění.

Pokud mluvíme o glykoproteinech tekutin oviduktu nelze opomenout proteiny mucinového typu. Obsahují více oligosacharidových řetězců O- glykosidicky vázaných na proteinovém jádře a opakujících se doménách. Primární funkcí těchto proteinů je tkáňová hydratace, lubrikace buněčných povrchů. Tím ochraňují epiteliální buňky před bakteriálním, mikrobiálním napadením; poskytují celkovou imunosupresi [53]. Mucinové glykoproteiny jsou vysoce hydratované struktury odolné proti proteolýze. Nacházejí se asi ve vzdálenosti 50 – 200 nm od povrchu buňky.

Konkrétní proteiny mucinového typu jsou MUC1 a MUC9 takzvaný oviductin. MUC1 se skládá ze 20 aminokyselin, které se opakují 20 – 125x. Vyskytuje se ve dvou formách. První má proteinové jádro 120 – 225 kDa, druhá glykosylovaná 250 – 500 kDa velká, obsahuje 60 - 80 % sacharidů. MUC9 je složen z 15 aminokyselin, čtyřikrát opakovaných. Znám je také pod názvem oviductin (oviduct – specifický glykoprotein). Víme, že interaguje s ovulovaným oocytem a spermii, ale důvod ještě není zcela znám. Pravděpodobně ochraňuje oocyt a později embryo. Oviductin byl nalezen u lidí, křečků, králíků, prasat a krav [54].

1.9 Tvorba a úloha rezervoáru spermií v samičím pohlavním traktu

Mnoho dějů v organismu živočichů funguje na základě interakcí protein – sacharid. Tento typ interakce slouží jako důležitý mechanismus pro rozpoznání vlastních a cizích struktur. Jedná se o fylogeneticky starý princip, kterého se využívá například při imunitní odpovědi organismu (např. selektiny zprostředkovávají vazbu leukocytů na *endothelium*).

Vazba protein - sacharid se však účastní i dějů při maturaci spermií a putování gamet v samičím reprodukčním traktu. Je to například vazba spermie na Sertoliho buňky ve varleti a v urogenitálním traktu samice na epitel oviduktu [50]. Protein - sacharidové interakce využívají gamety při vzájemném rozpoznávání.

Z orgánů a tkání, které spermie mívají na cestě k fertilizaci, má zvláštní význam isthmická část vejcovodu. Po proniknutí do vejcovodu jsou spermie zachyceny v dolním isthmu vazbou na řasnaté epiteliální buňky, jimiž je lemován. Touto vazbou se vytváří rezervoár spermií. Zde jsou spermie uloženy po dobu několika hodin až dní - dokud nenastane ovulace, za podmínek, které udržují spermie životaschopné a zároveň potlačují jejich pohyblivost a šetří tak energii [31, 55, 56].

Kontaktu s potenciálními vazebnými místy na epitelu vejcovodu, tedy i tvorbě rezervoáru, napomáhá jeho mukózní (hlenovitý) povrch, který nutí spermie k pomalému proplouvání (viz kap. 1.8, str. 20) [53]. Rezervoár má mnoho funkcí:

- předchází polyspermnímu oplození díky pomalému uvolňování spermií z rezervoáru
- udržuje motilitu a fertilitu spermií
- reguluje kapacitaci a hyperaktivaci motility spermií

Vejcovod je důležitý pro koordinaci procesu kapacitace spermie a později pro setkání s ovulovaným vajíčkem. Zdá se, že vejcovod má schopnost vybírat si zralé, životaschopné spermie s nízkou intracelulární koncentrací Ca^{2+} iontů a bez fosforylovaných povrchových proteinů [57]. Epididymální spermie se slabě váží na ovidukt, což podporuje předpoklad, že proteiny odpovídající za specifickou vazbu na ovidukt se dostávají na povrch spermie až při kontaktu spermie se semennou plazmou [58]. Zároveň se na epitelální buňky oviduktu přednostně váží nekapacitované spermie [59].

V době ovulace se ve vejcovodu mění podmínky a spermie odpovídají na zatím neznámé signály folikulu nebo uvolněného vajíčka zahájením kapacitace. Spermie ztrácejí asociované proteiny ze svého povrchu, které se podílí na tvorbě rezervoáru, což jim umožňuje uvolnit se z epitelu, dokončit kapacitaci a interagovat s vajíčkem vhodným způsobem (viz kap. 1.6, str. 17) [60]. Sílu nutnou k překonání atrakce mezi spermií a oviduktálním epitelem může poskytnout hyperaktivace. Tento jev představuje změnu v charakteru tepání bičíku spermie pozorovaném in vivo před fertilizací, která zahrnuje značné zvětšení rozsahu ohybu bičíku, obvykle také nesouměrnosti a frekvence tepání [53].

Je zřejmé, že důležitou úlohou oviduktálního rezervoáru spermií je koordinovat schopnost spermie oplodnit vajíčko s příchodem ovulovaného vajíčka tak, aby bylo zajištěno, že se dvě funkční způsobilé gamety setkají v pravý čas na pravém místě [31, 56].

Zdá se, že tvorba rezervoáru spermií je zprostředkována interakcí protein – sacharid. Glykokonjugáty epitelu poskytují definované oligosacharidy, které jsou rozpoznány proteiny asociovanými s povrchem spermie. U krávy tvorba rezervoáru patrně zahrnuje interakci mannosyl - oligosacharidových vysokoafinitních a galaktosových nízkoafinitních ligandů oviduktálního epitelu, které jsou rozpoznány molekulami syntetizovanými v semenných váčcích a prostatě nasedajícími na povrch spermie během ejakulace [56].

1.10 Cíl práce

Zdá se, že tvorba vazby spermií se v prostředí urogenitálního traktu krávy realizuje interakcí sacharid – protein. Například v istmické části, glykokonjugáty epitelu poskytují definované oligosacharidy, které jsou rozpoznány proteiny asociovanými s povrchem spermií.

V návaznosti na předchozí bakalářskou práci bych ráda prohloubila poznatky v oblasti reprodukce skotu. Tato práce se bude podrobněji zabývat ději v ovidukální části urogenitálního traktu krav s cílem definovat proteiny a sacharidy, které se zde vyskytují, a porovnat je s proteiny v děloze a na epitelech oviduktu.

Cíle diplomové práce jsou:

- charakterizovat proteiny urogenitálního traktu krávy biochemickými metodami – SDS – elektroforézou, gelovou a afinitní chromatografií, stanovit kvantitativní množství sacharidů, sialových kyselin a základních enzymů, které se zde vyskytují;
- kvantitativní stanovení inhibice vazby proteinů ovidukálních tekutin s proteiny býčí semenné plazmy ELBA metodou
- studium změny schopnosti vázat proteinů tekutin oviduktu, dělohy a epitelů oviduktu na živé býčí spermií v závislosti na ochuzení tekutin a epitelů o konkrétní sacharidové komponenty použitím specifických deglykosylačních enzymů - tuto studii provedeme na průtokovém cytofluorimetru a ověříme analýzou vzorků fluorescenčním mikroskopem;
- závěrem budeme zkoumat tuto afinitu přímo na tkáních, opět enzymaticky upravovaných; využijeme fluorescenční mikroskopii a stanovení porovnáme s dříve dosaženými výsledky.

2 Materiál a metody

2.1 Použitý materiál

2.1.1 Chemikálie

Akrylamid	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Avidin značený křenovou peroxidasou	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
2,2'-azino-bis(2-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina)	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
α - galaktosidáza	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
β - galaktosidáza	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Benzamidin-hydrochlorid	- Fluka, Buchs, Švýcarsko
Bromfenolová modř	- Lachema, Brno, ČR
Bovine Serum Albumin	- Imuna, Šarišské Michaľany, SR
Coomassie Brilliant Blue R-250	- Serva, Heidelberg, Německo
Dihydrogenfosforečnan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Divinylsulfon	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Dodecylsulfát sodný	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Dusičnan stříbrný	- Lachema, Brno, ČR
Fetuin	- Sevac, Praha, ČR
Fluorescein isothiocyanat (FITC)	- Serva, Heidelberg, Německo
Formaldehyd	- Lachema, Brno, ČR
L-fukóza	- Serva, Heidelberg, Německo
Fukosidáza	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
D-galaktóza	- Lachema, Brno, ČR
Gelatine from Porcine Skin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
D-glukóza	- Lachema, Brno, ČR
D-glukuronát	- Serva, Heidelberg, Německo
Glutaraldehyd	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Glycerol	- Lachema, Brno, ČR
Glycin	- Reanal, Budapešť, Maďarsko
Heparin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Hexosaminidáza	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Hydrogenfosforečnan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Hydrogenuhlíčan amonný	- Lachema, Brno, ČR
Hydrogenuhlíčan sodný	- Lachema, Brno, ČR
4-chlor-1-naftol	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Chlorid kobaltnatý	- Lachema, Brno, ČR
Chlorid sodný	- Lachema, Brno, ČR
Chlorid vápenatý	- Fluka, Buchs, Švýcarsko
Chondroitin sulfát	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Karbodiimid	- Fluka, Buchs, Švýcarsko
Kyselina ethylendiamintetraoctová	- Serva, Heidelberg, Německo
Kyselina hyaluronová	- Contipro, Ústí nad Orlicí, ČR
Kyselina jodistá	- Feinchemie, Sebnitz, Německo
Kyselina octová	- Lachema, Brno, ČR
Lysozym	- dar (katedra biochemie PřF UK)
Mannan	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
D-mannóza	- Fluka, Buchs, Švýcarsko
Merkaptoethanol	- Loba Chemie, Fishamend, Rakousko
Methanol	- Lachema, Brno, ČR
N-acetyl-D-galaktosamin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
N-acetyl-D-glukosamin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
N-acetylneuraminová kyselina	- Lachema, Brno, ČR
N-hydroxysukcinimidobiotin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
N,N-dimethylformamid	- Lachema, Brno, ČR
N,N'-metylen-bisakrylamid	- Serva, Heidelberg, Německo
N,N,N', N'-tetramethylethylendiamin	- Serva, Heidelberg, Německo
Neuraminidáza	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Ovalbumin	- dar (katedra biochemie PřF UK)
Perboritan sodný	- Lachema, Brno, ČR
PNGáza F z Elizabethkingia meningoseptica	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Ponceau RR	- Loba Feinchemie, Fishamend, Rakousko
Sephadex G-25 Medium	- Pharmacia Fine Chemicals AB, Švédsko
Sephadex G-100 Superfine	- Pharmacia Fine Chemicals AB, Švédsko
Trichloroactová kyselina	- Lachema, Brno, ČR

Thiosíran sodný	- Lachema, Brno, ČR
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	- Serva, Heidelberg, Německo
Triton X-100	- Serva, Heidelberg, Německo
Tween 20	- Serva, Heidelberg, Německo
Uhličitan sodný	- Lachema, Brno, ČR

Čistota uvedených komerčně dodaných chemikálií byla P.A. nebo vyšší.

2.1.2 Biologický materiál

Urogenitální trakty	- jatka Český Brod, Kouřim
Býčí semenná plazma	- Výzkumný ústav veterinárních léčiv Brno
Býčí spermie	- Výzkumný ústav veterinárních léčiv Brno

Biologický materiál byl zpracován do 2hodin po preparaci, uchováván v chladnu (4°C).

2.1.3 Další materiál

Mikrotitrační polystyrénové destičky pro ELBA testy	- NUNC, Dánsko
Podložní sklíčka	- Knittel Gläser, Německo
Krycí sklíčka	- Hirschmann Laborgeräte, Německo
Kolona pro afinitní chromatografii	- Bio-Rad Laboratories, Velká Británie
Kolona pro gelovou chromatografii	- Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Švédsko

2.2 Metody

2.2.1 Izolace oviduktálních a děložních tekutin

Z urogenitálního traktu krávy byly nůžkami odděleny ovidukty a rohy dělohy. Každá z oddělených částí byla dvakrát propláchnuta 0,2 M NH_4HCO_3 pomocí injekční stříkačky a tekutina byla jímána do kádinky. Získané tekutiny z oviduktů a dělohy byly zamrazeny a lyofilizovány.

2.2.2 Izolace epitelálních buněk povrchu sliznice oviduktu a děložního rohu

Ovidukt nebo děložní roh byl podélně rozstříhnut nůžkami. Epiteliální buňky byly z povrchu sliznice abradovány naostřenou lžící, popř. špachtlí longitudálním pohybem a přeneseny do 0,2 M NH_4HCO_3 . Buňky získané z epitelů oviduktu a epitelů děložních rohů byly zamrazeny a lyofilizovány.

2.2.3 Biotinylace proteinů býčí semenné plazmy

Byl připraven 1 % roztok býčí semenné plazmy v 0,5 M NaHCO_3 . K roztoku o objemu 5 ml byl přidán roztok biotinu připravený rozpuštěním 1 mg NHS-biotinu ve 100 μl DMF. Roztok byl inkubován 1 hod za stálého třepání. Následovala dialýza 12 hod proti vodě. Voda byla dvakrát vyměněna. Po dialýze byl roztok zamrazen a lyofilizován.

2.2.4 Značení získaných proteinů fluorescein isothiocyanatem (FITC)

Použité roztoky:

FITC roztok: 12,5 mg barviva FITC v 0,625 ml DFM a 5 ml ethylenglykolu

Postup:

Pro značení FITC barvivem 25 mg proteinů byly použity 4 ml bikarbonátového pufru pH 8,5. Tento roztok byl neustále udržován v temnu a chladnu (4 °C). Po rozpuštění bylo přidáno 200 μl roztoku FITC.

Výsledný roztok se mírně třepal 4 hod v lednici, přičemž každou hodinu bylo přidáno dalších 200 μl roztoku FITC.

Hodinu po posledním přidání roztoku FITC byl protein od nadbytečného, nenavázaného barviva přečištěn dialýzou – proti vodovodní vodě, za použití velkého objemu (cca 1,5 l)

s ½ lžičky aktivního uhlí, dále třikrát proti menšímu objemu (cca 300 ml) destilované vody a poté byl nechán přes noc v 1 l destilované vody s přidavkem aktivního uhlí.

Získané proteiny s navázaným FITCem byly zamrazeny a lyofilizovány. Uchovávány byly v lednici při 4 °C v tmavých zásobních lahvičkách.

2.2.5 Diskontinuální SDS - elektroforéza dle Laemmliho [61]

Použité roztoky:

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

B. 1.5 M Tris.HCl o pH 8,3: 18,5 g Tris do 100 ml H₂O, pH upraveno pomocí HCl

C. 0,5 M Tris.HCl o pH 6,8: 6 g Tris do 100 ml H₂O, pH upraveno pomocí HCl

D. 10 % SDS: 10 g SDS do 100 ml H₂O

E. Vzorkový pufr – neredukující: 4,4 ml H₂O + 1,0 ml roztoku C + 0,8 ml glycerol + 1,6 ml roztoku D + 0,2 ml 0,1 % BM

F. Elektrodotový pufr: 9 g Tris + 43,2 g glycinu + 3 g SDS do 600 ml H₂O,
před použitím ředěno 80 ml zásobního roztoku 320 ml H₂O

G. 10 % APS: 1 g APS do 10 ml H₂O

Zaostřovací gel 4 %: 1,52 ml H₂O + 0,625 ml roztoku C + 0,025 ml roztoku D + 0,325 ml roztoku A;

těsně před aplikací bylo přidáno 3,8 µl TEMEDu a 40 µl roztoku G

Separáční gel 12 %: 2,5 ml roztoku B + 4,0 ml roztoku A + 3,5 ml H₂O + 100 µl rozt. D;
těsně před aplikací bylo přidáno 4,5 µl TEMEDu a 50 µl roztoku G

Separáční gel 15 %: 2,5 ml roztoku B + 5,0 ml roztoku A + 2,5 ml H₂O + 100 µl rozt. D;
těsně před aplikací bylo přidáno 4,5 µl TEMEDu a 50 µl roztoku G

Barvení gelů: 0,5 g CBB + 450 ml methanol + 100 ml kyselina octová + 450 ml H₂O

Odbarvení gelů: 250 ml methanolu + 100 ml kyseliny octové + 650 ml H₂O

Standard: směs oligomerů lysozymu (monomer - 14 500)

Postup:

Pro elektroforézu byl použit přístroj firmy Bio-Rad. 12 % nebo 15 % separáční gel byl nalit mezi dvě vertikální skla upevněná do stojanu pro nalévání gelů, převrstven destilovanou vodou a ponechán polymerovat.

Po zpolymerování gelu byla H₂O nad gelem vysušena filtračním papírem a byla nalita vrstva 4 % zaostřovacího gelu, do níž byl zasunut hřeben pro tvorbu jamek.

Vzorky v neredukujícím pufru byly před nanesením inkubovány 10 min v horké vodní lázni. Pokud není u výsledků uvedeno jinak, byla použita koncentrace vzorků 1 mg proteinů na 100 μ l vzorkového neredukujícího pufru.

Po ukončení polymerace horního gelu byla sestavena aparatura pro provedení elektroforézy. Do katodového i anodového prostoru byl nalit elektrodový pufr. Po odstranění hřebenů byly do jamek nanášeny vzorky pomocí mikropipety. Elektroforetická vana byla doplněna elektrodovým pufrem.

Elektrody byly připojeny ke zdroji napětí. Jako zdroj napětí byl použit přístroj Electrophoresis Constant Power Supply 3000/150 firmy Pharmacia. Elektroforéza probíhala zpočátku při napětí 70 V, po překročení rozhraní gelů bylo nastaveno napětí 120 V. Trvala cca 90 min.

Po skončení elektroforézy byly gely opláchnuty destilovanou vodou a barveny na detekci proteinů či glykoproteinů. Barvení CBB pro detekci proteinů v gelech probíhalo přes noc, poté bylo odbarveno pozadí v odbarvovacím roztoku, gely byly opláchnuty destilovanou vodou a usušeny v celofánu a naskenovány.

2.2.5.1 Barvení gelu po SDS - elektroforéze stříbrem pro detekci glykoproteinů

Použité roztoky:

Fixační roztok: 20 % TCA

Oxidační roztok: 1 % HIO₄

Promývací roztok: 20 % etanol

Senzitivující roztok: 0,02 % Na₂S₂O₃

Barvicí roztok: 0,2 % (w/v) AgNO₃ + 0,076 % formaldehyd

Vyvolávací roztok: 6 % (w/v) Na₂CO₃ + 0,0004 % (w/v) Na₂ S₂O₃ + 0,05 % formaldehyd

Terminační roztok: 10 % kyselina octová

Postup:

Proteiny v gelu byly 30 min inkubovány ve fixačním roztoku. Dále byl gel oxidován 30 min oxidačním roztokem a 20 min čištěn promývacím roztokem. Následovala preinkubace v senzitivujícím roztoku po dobu 2 min a promytí 3x 40 s destilovanou vodou. Dále byl gel 30 min ponechán v barvicím roztoku a promýván 3x 20 s destilovanou vodou. Následovala redukce vyvolávacím roztokem, dokud se gel dostatečně nevybarvil a ukončení barvení terminačním roztokem. Gel byl opláchnut destilovanou vodou, usušen v celofánu a naskenován.

2.2.5.2 Barvení gelu po SDS - elektroforéze stříbrem pro detekci proteinů

Použité roztoky:

Fixační roztok: 50 % (v/v) ethanol + 12 % (v/v) kyselina octová + 0,05 % formaldehyd

Promývací roztok: 20 % etanol

Senzitivující roztok: 0,02 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Barvicí roztok: 0,2 % (w/v) AgNO_3 + 0,076 % formaldehyd

Vyvolávací roztok: 6 % (w/v) Na_2CO_3 + 0,0004 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ + 0,05 % formaldehyd

Terminační roztok: 12 % kyselina octová

Postup:

Proteiny v gelu byly 2 hod inkubovány ve fixačním roztoku a 20 min čištěn promývacím roztokem. Následovala preinkubace v senzitivujícím roztoku po dobu 2 min a promytí 3x 1 min destilovanou vodou. Dále byl gel barven 30 min ponechán v barvicím roztoku a promyt 3x 20 s destilovanou vodou. Následovala redukce vyvolávacím roztokem, dokud se gel dostatečně nevybarvil a ukončení barvení terminačním roztokem. Gel byl opláchnut destilovanou vodou, usušen v celofánu a naskenován.

2.2.6 Přenos proteinů na PVDF-membránu a následná sekvenace

Použité roztoky:

Přenosový pufr: 3,03 g Tris + 14,4 g glycinu bylo rozpuštěno v 200 ml H_2O , bylo přidáno 200 ml methanolu a doplněno H_2O do 1000 ml

Barvicí roztok: 0,5 g CBB, 450 ml metanolu, 100 ml acetonu, 450 ml destilovaná H_2O

Odbarvovací roztok: 50 % metanol, 10 % kyselina octová, 40 % destilovaná voda

Postup:

Byla provedena SDS - elektroforéza proteinů a okamžitě po proběhnutí byly gely položeny na vrstvu jednoho tamponu a dvou filtračních papírů namočených v přenosovém pufru.

PVDF-membrána o velikosti gelu byla před použitím máčena 1 min v 100 % metanolu, 2 min v destilované vodě a nakonec 10 min v přenosovém pufru. Takto připravená PVDF-membrána byla položena na gel a upevněna do kazety mezi vrstvy filtračních papírů a tampony. Zajištěná kazeta byla vložena do blotovacího rámečku a ten pak do vany s přenosovým pufrům společně s chlazením. Byl připojen zdroj napětí a nastaveny hodnoty napětí 30 V a proudu 100 mA. Po 16 hod byl zdroj odpojen.

Následovala příprava membrány s přenesenými proteiny na terminální sekvenci. Membrána byla promyta 3x 5 min redestilovanou vodou a poté barvena barvicím roztokem CBB po dobu cca 5 min. Pro dobré rozlišení proteinů, které budou sekvenovány byla dále odbarvena v odbarvovacím roztoku. PVDF-membrána byla poté omyta redestilovanou vodou, vysušena a předána příslušné laboratoři na katedře biochemie PŘF UK na sekvenaci proteinů.

2.2.7 Charakterizace izolovaných proteinů gelovou chromatografií

Pro rozdělení proteinů, získaných izolací z urogenitálního traktu krávy, byla použita metoda gelové chromatografie. Byl použit Sephadex G-100 Superfine, kolona firmy Pharmacia Fine Chemicals AB dlouhá 60 cm s průměrem 1 cm. Dělení proteinů probíhalo v 0,2 M NH_4HCO_3 .

Bylo rozpuštěno 10 mg proteinu v minimálním objemu 0,2 M NH_4HCO_3 a pomocí pipety byl nanášen vzorek na kolonu tak, aby se gel nerozvířil. Po zasáknutí vzorku, převrstvení pufrem a nasazení hlavy kolony, byla zahájena eluce a sbírání frakcí o objemu 2 ml. Proteiny v nich byly detekovány měřením absorbance při vlnové délce 280 nm.

Po porovnání získaných dat byly separovány tři hlavní frakce proteinů, rozdělených podle velikosti. Frakce byly vysráženy v pětinasobném objemu ledového acetonu přes noc. Proteinová složka byla získána centrifugací, pelet byl rozpuštěn v minimálním objemu destilované vody, zamrazen, lyofilizován a rozdělen na SDS – elektroforéze (kap. 3.1, str. 40).

Ke kalibraci kolony byly použity: hovězí sérový albumin Mr 66 000, ovalbumin Mr 45 000, cytochrom P450 Mr 13 000, bromfenolová modř Mr 669,99.

2.2.8 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie na imobilizované býčí semenné plazmě byla použita pro studium interakce býčí semenné plazmy s proteiny tekutin dělohy a tekutin oviduktu krávy.

2.2.8.1 Příprava afinitního nosiče BSP-Sephadex

Pro provedení afinitní chromatografie 10 g Sephadexu G-25 bobtnalo 1 hod ve 200 ml 0,3 M NaHCO_3 za velmi opatrného míchání. Poté byl přidán 1 ml divinylsulfonu a mírně mícháno dalších 90 min. Směs byla promyta na fritě 2 l destilované vody. Dále bylo přidáno 5 ml dialyzované býčí semenné plazmy, mícháno přes noc za laboratorní teploty. Suspenze byla druhý den 3x dekantována 250 ml 20 % vodného roztoku etanolu, poté promyta 2 l destilované vody. Nepoužitý nosič byl uchován ve 20 % vodného roztoku etanolu pro možné pozdější využití.

2.2.8.2 Provedení afinitní chromatografie

Získaná suspenze byla převedena do separační kolony firmy Bio-Rad Laboratories o objemu 20 ml a promyta 0,05 M NH_4HCO_3 , trojnásobkem objemu kolony. Vzorek (25 mg) byl rozpuštěn v 5 ml 0,05 M NH_4HCO_3 a nanesen na kolonu. Po zasáknutí vzorku byla kolona promývána postupně roztoky: 0,05 M NH_4HCO_3 , 0,1 M NH_4HCO_3 a 3 M NaCl vždy po 100 ml (resp. byly proměřovány absorbance a promýváno takovým množstvím, kdy už nebyly detekovány žádné proteiny – optimalizováno na množství 100 ml každého roztoku). Při prvním stanovení byla použita navíc 8 M močovina, díky které došlo k ujištění, že v koloně již žádné proteiny nezbyly. Frakce byly jímány po 2 ml, byla zaznamenávána absorbance při vlnové délce 280 nm.

Proteiny tekutin dělohy a tekutin oviduktů byly takto rozděleny podle své afinity k býčí semenné plazmě. Získali jsme tedy zvlášť frakci proteinů, které se na plazmu vázaly a ty, které se nevázaly. Tyto frakce byly vysráženy v pětinašobném objemu ledového acetonu přes noc, poté centrifugovány. Pelet byl rozpuštěn v minimálním objemu destilované vody, zamrazen a lyofilizován pro následné dělení SDS – elektroforézou.

2.2.9 Stanovení cukrů dle Dubios

K 1 ml proteinů o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěných ve vodě byl přidán z dávkovací láhve 1 ml 5 % roztoku fenolu a 5 ml koncentrované H_2SO_4 . Směs byla ihned protřepána a ponechána stát 30 min při laboratorní teplotě. Na spektrofotometru Healos γ (Thermo, Electron Corporation, UK) byla změřena absorbance při vlnové délce 490 nm proti kontrole (destilovaná voda s reakčními činidly).

Ke kalibraci byl použit vodný roztok glukózy o koncentracích 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,781; 0,39 a 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

2.2.10 Stanovení sialových kyselin v izolovaných směsích proteinů

Použité roztoky:

Bial reagens: 0,2 g 5-methylresorcinol + 81,4 ml koncentrované HCl + 2 ml 1 % (w/v) FeCl_3 ; doplněno destilovanou H_2O do 100 ml

Postup:

Oxidace sialových kyselin v koncentrované kyselině za přítomnosti orcinolu se projeví modrofialovým zbarvením. Toto zbarvení je měřitelné na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm.

Koncentrace vzorků byla 5 mg proteinů v 1 ml destilované vody. Jako kalibrace byly použity roztoky o koncentraci 5, 10, 20, 30 a 40 nmol sialových kyselin.

Bylo napipetováno 150 μ l vzorku do skleněné zkumavky a přidáno 50 μ l destilované vody. Dále bylo přidáno 200 μ l Bial reagens a ihned zamícháno na vortexu.

Zkumavky s tekutinou byly zahřány ve vodní lázni na 100 °C po dobu 15 min, poté ochlazeny na pokojovou teplotu proudem vody. Dále byl přidán 1 ml 3-methylpropanolu (isoamylalkohol), všechny byly zamíchány na vortexu a ponořeny 5 min do ledové lázně (směs ledu a vody, přibližně 0 °C). Zkumavky byly centrifugovány 3 min při 1 000 otáček/min, aby se rozdělila fáze vodná od organické. Horní fáze byla odebrána (3-methylpropanová), převedena do skleněné kyvety a proměřena absorbance.

2.2.11 Želatinová zymografie

Použité roztoky:

A. Inkubační roztok pro zjištění celkových proteáz:

50 mM Tris.HCl, pH 8,4 s obsahem 5 mM CaCl_2 (6,055 g Tris + 5,55 g CaCl_2 doplnit do 1000 ml, upravit pH pomocí HCl)

B. Inkubační roztok s inhibitorem serinových proteáz:

50 mM Tris.HCl, pH 8,4 s obsahem 5 mM CaCl_2 + 10 mM benzamidin

C. Inkubační roztok s inhibitorem metaloproteáz:

50 mM Tris.HCl, pH 8,4 s obsahem 5 mM CaCl_2 + 5 mM EDTA

Fixační roztok: 250 ml methanol + 50 ml glycerol + 50 ml kyselina octová + 150 ml H_2O

Postup:

Metoda byla provedena pro zjištění přítomnosti a identifikace proteáz ve vzorcích.

Byl připraven 12 % separační gel (kap. 2.2.5) s 0,15 % želatinou (Gelatine from Porcine Skin) a 4 % zaostřovací gel bez přídavku želatiny. Byly připraveny vzorky proteinů o koncentraci 5 mg/ml neredukujícího vzorkového pufru. Nanášené vzorky byly 10 min inkubovány ve vroucí vodní lázni. Molekulové hmotnosti byly určeny srovnáním s proteinovým standardem – směs kopolymerů lysozymu.

Podmínky elektroforézy byly stejné jako v kap. 2.2.5, str. 29. Po proběhnutí elektroforézy byly gely promyty 3x 20s destilovanou vodou. Vymytí SDS z gelu bylo provedeno pomocí 2,5 % Tritonu X-100, roztok byl měněn 4x během jedné hodiny. Následovalo znovu promytí 3x 20s destilovanou vodou.

Gely byly inkubovány 18 hod při 37 °C v pufru A, B nebo C (během inkubace byl pufr 1x vyměněn).

Po vyjmutí z inkubačního roztoku byly gely promyty 3x 20s destilovanou vodou a barveny v roztoku CBB po dobu 2 hod, následovalo odbarvování v odbarvovacím roztoku (kap.2.2.5, str. 29). Nakonec byly gely ponechány 15 min ve fixačním roztoku a naskenovány.

2.2.12 Stanovení kyselé fosfatázy

Kyselá fosfatáza reaguje s fosfátovými skupinami substrátu ve formě p-nitrofenolfosfátu. Celá reakce je zastavena denaturací enzymu NaOH.

Do mikrotitrační destičky zn. NUNC bylo nanášeno 100 µl vzorku – čtyři jamky pro koncentraci 0,5 mg/ml proteinů tekutin dělohy a čtyři jamky pro koncentraci 0,5 mg/ml proteinů tekutin oviduktu. Vzorky byly připraveny v fosfát-citrátovém pufru o pH 4,8 z důvodu optimalizace prostředí sledovaného enzymu (inhibice přílišné aktivity volným fosfátem). Dále bylo nanášeno 100 µl p-nitrofenolfosfátu a přesně po 1 min zastaveno přidávkem 100 µl 0,1 M NaOH. Destička byla měřena na přístroji TECAN – Sunrise při vlnové délce 405 nm.

2.2.13 ELBA metoda – studium inhibice vazby tekutin oviduktu a býčí semenné plazmy

Použité roztoky:

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

Promývací roztok: 0,005 % Tween 20 v PBS

Substrátový roztok: 1 mg ABTS v 10 ml 0,1 M citrát-fosfátového pufru pH 4,6; těsně před použitím přidat 10 mg perboritanu sodného

Testované inhibitory: L-fukóza (L-fuc), Ovalbumin (OA), D-galaktóza (D-gal), D-manóza (D-man), Heparin (Hep), N-acetyl-D-glukosamin (D-Glu/NAc), N-acetyl-D-galaktosamin (D-Gal/NAc), Chondroitin sulfát (Chs), Kyselina hyaluronová (Hya), Fetuin (Fet), Mucin z podčelistních žláz (BSM)

Postup:

Studium interakcí izolovaných proteinů oviduktálních tekutin s býčí semennou plazmou metodou ELBA probíhalo podle následujícího postupu. Pokusy byly prováděny v mikrotitračních polystyrénových destičkách zn. NUNC.

1. Byl připraven 1 % roztok BSA v PBS, 100 μ l tohoto roztoku bylo aplikováno do každé jamky a inkubováno po dobu 1 hod při laboratorní teplotě.

2. Obsah jamek byl vytřepnut a jamky byly opakovaně alespoň 3x promývány 200 μ l PBS po dobu 10 min celkem. Pak byl jejich obsah opět vytřepnut.

3. Byl připraven 1 % roztok glutaraldehydu a do každé jamky bylo aplikováno 100 μ l tohoto roztoku a inkubováno 1 hod při laboratorní teplotě.

4. Obsah jamek byl vytřepnut a jamky byly opakovaně promývány 200 μ l destilované vody po dobu 2 hod.

Po dokončení promývání byla mikrotitrační destička připravena pro vlastní provedení ELBA testu. Následně aplikovaná látka se vážala na glutaraldehydem aktivovaný BSA pokrývající povrch destičky (vazba přes glutaraldehydový můstek).

5. Vazba izolovaných proteinů: Byly připraveny roztoky proteinů oviduktálních tekutin o koncentraci 0,1 mg/ml PBS. Do jamek bylo aplikováno 100 μ l připraveného roztoku a inkubováno přes noc při 4 °C.

6. Obsah jamek byl vytřepnut a jamky byly promývány 3x 200 μ l promývacího roztoku po dobu 15 min. Směr promývání byl pravidelně střídán.

7. Desaktivace –CHO skupin glutaraldehydu pomocí BSA: Do každé jamky bylo aplikováno 100 μ l 1 % BSA v PBS a inkubováno 1 hod při laboratorní teplotě.

8. Opakování bodu 6.

9. Aplikace potencionálního inhibitoru a biotinylovaných proteinů: Byl připraven roztok potencionálního inhibitoru v PBS (2,5 mg/ml) a roztok biotinylovaných proteinů býčí semenné plazmy (bBSP) v PBS (2 mg/ml). Do jamek s nejvyšší požadovanou koncentrací inhibitoru bylo aplikováno 100 μ l připraveného roztoku inhibitoru a do ostatních jamek po 50 μ l PBS. Původní koncentrace byla postupným dvojnásobným ředěním a přidavkem 50 μ l roztoku bBSP převedena na koncentrační řadu 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16, 0,08 a 0 mg/ml sledovaného inhibitoru. Výsledná koncentrace bBSP byla 1 mg/ml v PBS v každé jamce. Destička byla inkubována 2 hod při 37 °C.

10. Opakování bodu 6.

11. Byl připraven roztok avidin-HRP (0,25 μ g/ml PBS). Do jamek bylo aplikováno 100 μ l tohoto roztoku a inkubováno 1 hod při 37 °C.

12. Opakování bodu 6.

13. Do každé jamky bylo aplikováno 100 μ l substrátového roztoku, inkubováno 30 min.

14. Byla změřena absorbance roztoků v jamkách při 405 nm na přístroji TECAN-Sunrise.

2.2.14 Příprava vzorků pro průtokovou cytofluorimetrií a fluorescenční mikroskopii

Pro tyto dva experimenty byly připraveny vzorky proteinů izolovaných z urogenitálního traktu krávy identickým způsobem. Enzymatická úprava izolovaných směsí proteinů byla poté hodnocena průtokovou cytofluorimetrií pro získání kvantitativních dat a fluorescenční mikroskopii pro získání kvalitativních dat.

2.2.14.1 Vzorky pro studium sacharidové specifity vazby proteinů z urogenitálního traktu krávy a býčích spermií

Proteiny tekutin dělohy, tekutin oviduktu a epitelů oviduktu byly po izolaci z urogenitálního traktu krávy označeny FITC barvivem (kap. 2.2.4, str. 28). Takto připravené lyofilizované proteiny byly rozpuštěny v minimálním objemu fyziologického roztoku a naředěny pufrů pro ideální funkci enzymu do koncentrace 1 mg/ml. Vzorky byly 24 hod inkubovány se zvolenými enzymy (Tab. 1), které specificky modifikovaly tekutiny dělohy, tekutiny oviduktu a epitelů oviduktu: odstranily konkrétní sacharidové struktury navázané na proteinech.

Enzym	Použitý pufr	pH	Inkubační doba (hod)	Činnost enzymu
PNGáza	0,05 M fosfátový pufr	7,5	24	odštěpí libovolný sacharid z polypeptidového řetězce
α - galaktosidáza	0,1 M fosfátový pufr	6,5	24	hydrolyzuje terminální α -D-galaktózu
β - galaktosidáza	0,1 M acetátový pufr	5,8	24	hydrolyzuje terminální β -D-galaktózu
Fukosidáza	0,1 M acetátový pufr	5,8	24	hydrolyzuje terminální α -L-fukózu
Neuraminidáza	0,1 M acetátový pufr	5	24	odštěpí terminální N-acetylneuraminovou kyselinu
Hexosaminidáza	0,1 M acetátový pufr	5	24	odštěpí terminální N-acetyl-D-glukosaminové a N-acetyl-D-galaktosaminové sacharidy

Tab. 1 – Přehled enzymů použitých pro modifikaci proteinů tekutin oviduktu (TO), proteinů tekutin dělohy (TD) a proteinů z epitelů oviduktu (EO), nastavených parametrů jejich působení a specifická aktivita každého z nich

Před analýzou bylo 6x 3 vzorků s enzymy a 1x 3 kontrolní bez enzymatického působení inkubováno s živými býčími spermii. Centrifugací a opakovaným promýváním fyziologickým roztokem o pH 6,8 byly spermie zbaveny býčí semenné plazmy. K enzymaticky upraveným vzorkům tekutin dělohy, tekutin oviduktu a epitelů oviduktu pak byl přidán 1 ml o hustotě $4 \cdot 10^7$ spermií/ml a směs byla inkubována cca 20 min. Na takto připraveném vzorku byla

detekována různá vaznost proteinů z urogenitálního traktu krávy na býčí spermie v závislosti na modifikaci proteinů použitým enzymem.

2.2.14.2 Vzorek pro ověření autoprotolýzy tekutin oviduktu a změny vaznosti na spermii

Dále byl 1 mg tekutin oviduktu značených FITC barvivem byl smíšen s 9 mg tekutin oviduktu bez značení a rozpuštěny ve fyziologickém roztoku pH 6,8 a ponechány 24 hod při laboratorní teplotě. Po inkubaci s živými spermii, zbavenými promytím a centrifugací býčí semenné plazmy, byl vzorek a kontrola (rozpuštěna těsně před stanovením) analyzovány průtokovým cytofluorimetrem.

2.2.14.3 Vzorky pro studium vazby proteinů tekutin oviduktu na spermii s přídavkem býčí semenné plazmy

K 1 ml tekutin oviduktu značených FITC barvivem o koncentraci 2 mg/ml byl přidán 1 ml býčí semenné plazmy o koncentraci 2 mg/ml a po inkubaci se spermii byl vzorek analyzován průtokovým cytofluorimetrem. Jako kontrola posloužil slepý vzorek ze stanovení sacharidové specifity vazby proteinů z urogenitálního traktu krávy a býčích spermii (kap. 2.2.14.1, str. 37)

2.2.15 Průtoková cytofluorimetrie

Metoda průtokové cytofluorimetrie byla provedena na přístroji FACSCalibur firmy Becton Dickinson. Analyzátor měří jak intenzitu odrazu laserového paprsku od buňky značené FITC proteiny (tedy velikost buňky) tak i fluorescenci FITCem značených proteinů, tedy vazbu těchto proteinů na buňku.

Průtoková rychlost přístroje byla 100 000 spermii/s, data byla získávána fluorescenčním detektorem při vlnové délce 350 nm. Analýza jednoho vzorku trvala cca 1 min.

2.2.16 Fluorescenční mikroskopie

2.2.16.1 Fluorescenční mikroskopie enzymaticky upravených tekutin dělohy, tekutin oviduktu a epitelů oviduktu

Vzorky připravené způsobem popsáním v kap. 2.2.14, str. 37 byly použity také pro fluorescenční mikroskopii. Pro analýzu byly vytvořeny preparáty technikou nátěru. Každý byl popsán identifikační zkratkou pro přítomný proteinový základ (tekutiny dělohy, tekutiny oviduktu a epitelů oviduktu) a použitý enzym či zkratkou značící autoprotolýzu nebo inhibici sledované vazby býčí semennou vazbu.

Mikroskopie byla provedena na katedře biochemie PřF UK pomocí mikroskopu Nikon elipse TE2000-U (kamera Mutech, PixelINK).

2.2.16.2 Fluorescenční mikroskopie na tkáních

Pro tento pokus byly použity čerstvé části tkání urogenitálního traktu krávy a býčí spermie z nadvarlete získané na jatkách v Českém Brodě a Kouřimi v den analýzy.

Z dělohy byl oddělen vejcovod a děložní roh. Vejcovod byl vypláchnut 0,2 M NH_4HCO_3 pomocí injekční stříkačky, skalpelem nařezán na 2 cm dlouhé úseky, do kterých byl injekční stříkačkou vpraven enzym rozpuštěný v pufru (Tab. 1, str. 37). Inkubace s enzymem trvala 5 hod. Poté byla tkáň longitudinálně rozříznuta a umístěna na podložní sklíčko. Také byla připravena kontrolní tkáň, která nebyla vystavena enzymatické činnosti.

Spermie byly promytím fyziologickým roztokem pH 6,8 a centrifugací odděleny od původní semenné plazmy a inkubovány s proteiny býčí semenné plazmy značenými FITC barvivem (kap. 2.2.4, str. 28) po dobu cca 10 min. Došlo tedy k navázání FITC značených proteinů býčí semenné plazmy na spermii.

Vnitřní epitel vejcovodu nebo děložního rohu na mikroskopickém sklíčku byl inkubován s 20 μl značených spermií 5 min. Poté byla tkáň od nenavázaných spermií opláchnuta fyziologickým roztokem pH 6,8. Vzorky byly připravovány vždy tři pro každý enzym, tři kontrolní bez enzymatického vlivu a tři vzorky byly použity pro studium inhibice vazby spermie na tkáň tekutinami oviduktu. Fluorescence byla pozorována pomocí mikroskopu Nikon elipse TE2000-U (kamera Mutech, PixelINK) na katedře biochemie PřF UK.

3 Výsledky

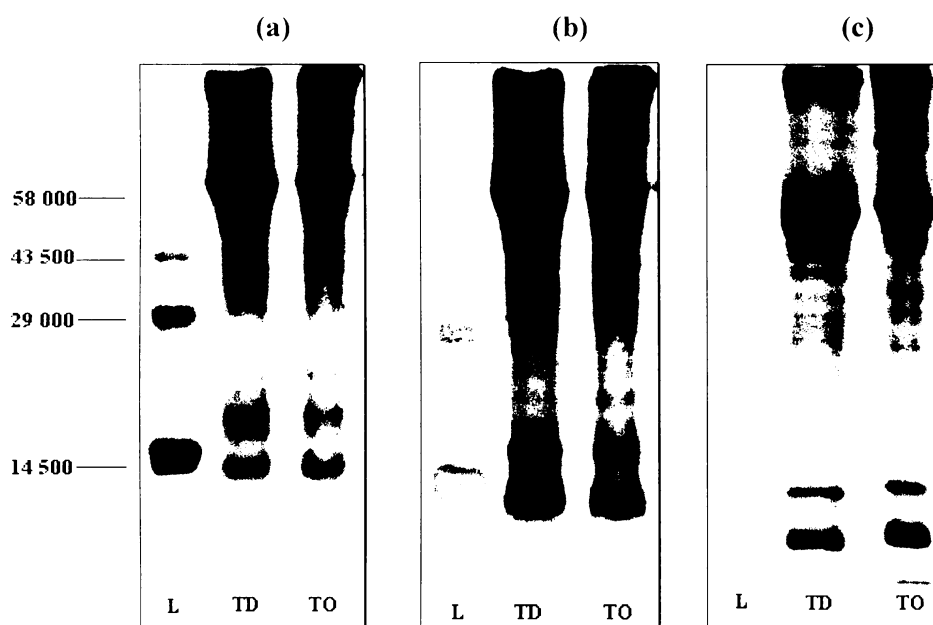
3.1 SDS - elektroforéza proteinů oviduktálních tekutin a tekutin dělohy

Po úspěšné izolaci směsi proteinů z tekutin dělohy (TD) a oviduktu (TO), bylo možné připravit z lyofilizátů proteinů vzorky pro provedení SDS - elektroforézy a následné barvení gelů na proteiny (CBB viz kap. 2.2.5, str. 29 a barvení stříbrem kap. 2.2.5.2, str. 30) a glykoproteiny (stříbrem viz kap. 2.2.5.1, str. 30). Tato metoda byla použita ke studiu přítomnosti a glykosylace proteinů nacházejících se v urogenitálním traktu krávy a následně pro studie těchto proteinů rozdělených gelovou a afinitní chromatografií.

3.1.1 SDS - elektroforéza lyofilizátů z urogenitálního traktu krávy

Z 15 % polyakrylamidového gelu vyplývá, že největší podíl proteinového obsahu oviduktálních i děložních tekutin připadá na protein s Mr cca 60 000, s největší pravděpodobností se jedná o hovězí sérumalbumin (BSA). Na gelech vidíme zleva vždy směs oligomerů lyozymu (L), proteiny tekutin dělohy (TD) a proteiny tekutin oviduktu (TO).

Výsledky z gelu obarveného na glykoproteiny (Obr. 8) ukazují, že tento protein (BSA) je glykosylován. Další majoritní glykoproteiny se nalézají ve frakci s Mr cca 14 000 a 16 000.



Obr. 8 – SDS - elektroforeogramy izolovaných proteinů v neredukujícím prostředí v 15 % gelu; zleva lysozym (L), tekutiny dělohy (TD), tekutiny oviduktu (TO)

(a) po barvení na proteiny CBB, (b) po barvení stříbrem pro detekci proteinů, (c) po barvení stříbrem pro detekci glykoproteinů

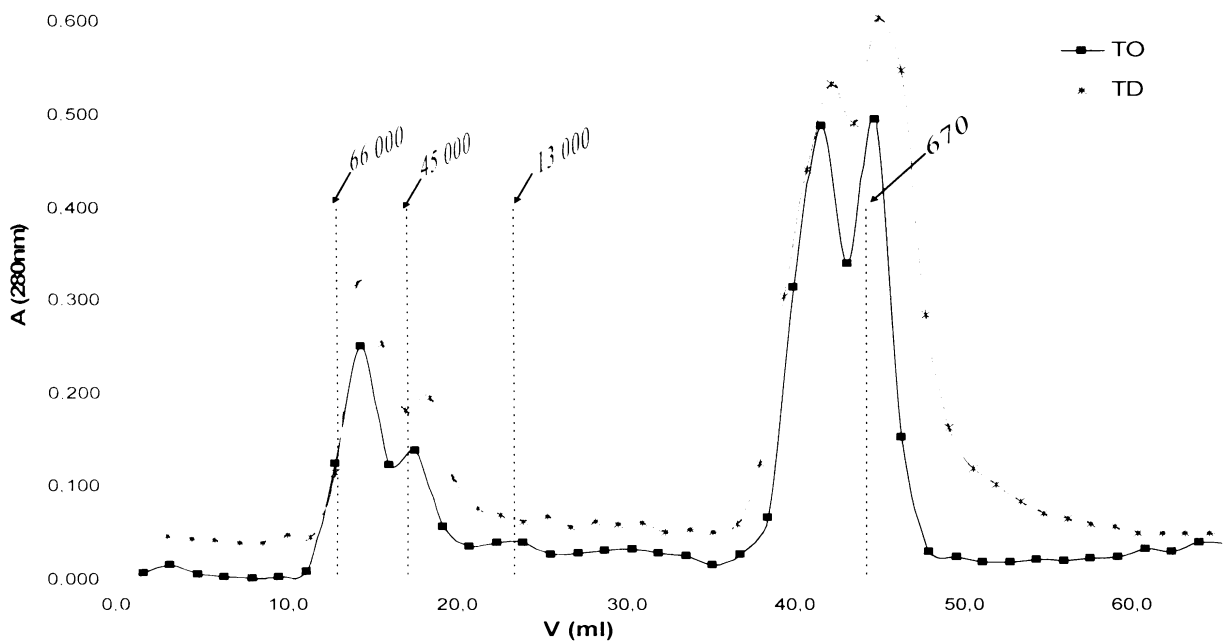
SDS elektroforetické srovnání proteinů proběhlo i s frakcemi získanými po gelové a afinitní chromatografii izolovaných proteinových směsí. SDS – elektroforeogramy uvedeny pro přehlednost v kap. 3.2.1, str. 42 a kap. 3.3.1, str. 45.

3.2 Gelová chromatografie

Pro další charakterizaci proteinů byla použita metoda gelové chromatografie popsaná v kap. 2.2.7, str. 32.

U získaných frakcí byla proměřena absorbance a z dat sestaven graf závislosti absorbance na elučním objemu.

Na grafu vidíme poměrné složení tekutin dělohy (TD) a oviduktu (TO), obsahují jak proteinovou složku viditelnou na SDS – elektroforeogramech (kap. 3.2.1, str. 42), tak složku nízkomolekulární, která putuje na SDS – elektroforéze s čelem a není barvením na proteiny detekovatelná.



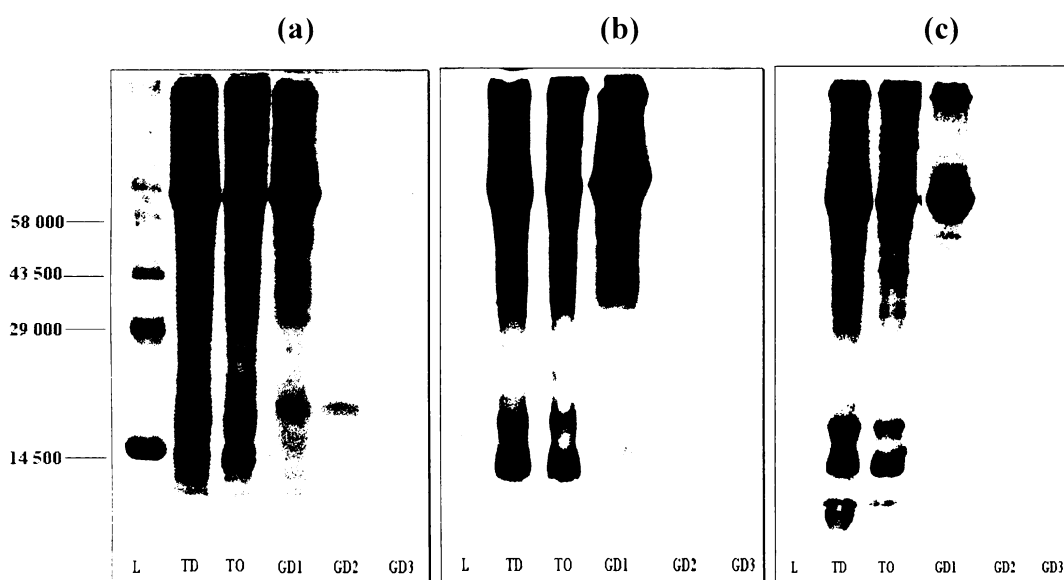
Graf 1 - Porovnání Mr složek tekutin dělohy (TD) a tekutin oviduktu (TO) získaných z urogenitálního traktu krávy. Absorbance měřena při vlnové délce 280 nm

Separováno bylo šest frakcí: GD1, GO1 obsahující majoritně proteinové složky o Mr 70 000 až 45 000; GD2, GO2 obsahující proteiny o Mr 45 000 až 20 000 a GD3, GO3 obsahující nízkomolekulární složky s Mr cca 1 000. Symboly GDx patří proteinům tekutin dělohy a GOx proteinům tekutin oviduktu zpracovaných gelovou chromatografií

3.2.1 SDS - elektroforéza proteinů tekutin oviduktu a dělohy rozdělených gelovou chromatografií

Frakce po gelové chromatografii byly vysráženy v pětinasobku ledového acetonu (kap. 2.2.7, str. 32), abychom zabránili přirozené proteolytické aktivitě při dialýze, centrifugovány, lyofilizovány a standardním způsobem (kap. 2.2.6) připraveny pro identifikování SDS – elektroforézou. Byly použity 15 % polyakrylamidové gely, bylo nanášeno 5 μ l standardu (L), 10 μ l proteinů TD a TO a 20 μ l proteinových frakcí označených GD1, GD2, GD3 (složení frakcí podrobně vysvětleno v kap. 3.2). Byl sledován stupeň glykosylace u jednotlivých frakcí.

Získané výsledky (Obr 9) nám ukazují, že proteiny se gelovou chromatografií nerozdělily zcela podle velikosti. SDS - elektroforéza (Obr. 9, gel (a), (b) i (c), dráha GD1) ukazuje na možnost, že velké molekuly s malými tvoří pevné agregáty, které putují Sephadexem dohromady, rozdělí se až při provedení SDS – elektroforézy.



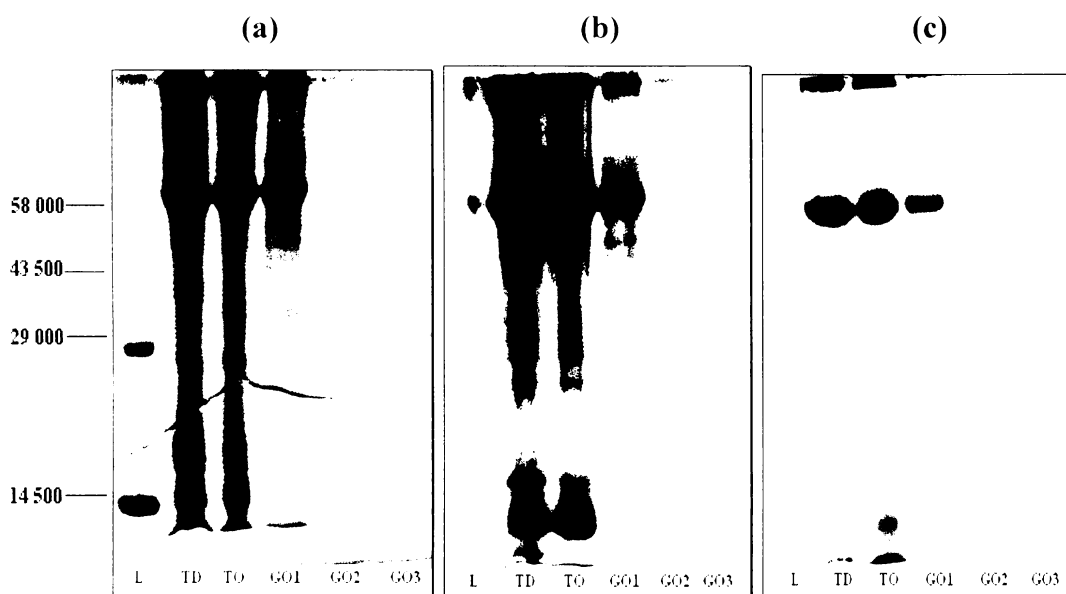
Obr. 9 – Porovnání SDS - elektroforeogramů proteinů tekutin dělohy v 15 % polyakrylamidovém gelu po gelové chromatografii; zleva lysozym (L), tekutiny dělohy (TD), tekutiny oviduktu (TO), frakce GD1, GD2, GD3

(a) po barvení na proteiny CBB, (b) po barvení stříbrem pro detekci proteinů, (c) po barvení stříbrem pro detekci glykoproteinů

Analogickým způsobem byly zpracovány proteiny TO. Byly použity 15 % polyakrylamidové gely, bylo nanášeno 5 μ l standardu (L), 10 μ l proteinů TO a TD a 20 μ l proteinových frakcí označených GO1, GO2, GO3 (složení frakcí vysvětleno v kap. 3.2). Byl sledován stupeň glykosylace u jednotlivých frakcí.

Studium gelů nám ukazuje, že proteiny se gelovou chromatografií opět nerozdělili plně podle velikosti. SDS - elektroforéza (Obr. 10, str. 43, gel (a), (b) i (c), dráha GO1) ukazuje na možnost,

že velké molekuly s malými tvoří agregáty obdobné, jako je tomu u TD a putují gelem dohromady, rozdělí se až v prostředí SDS – elektroforézy.



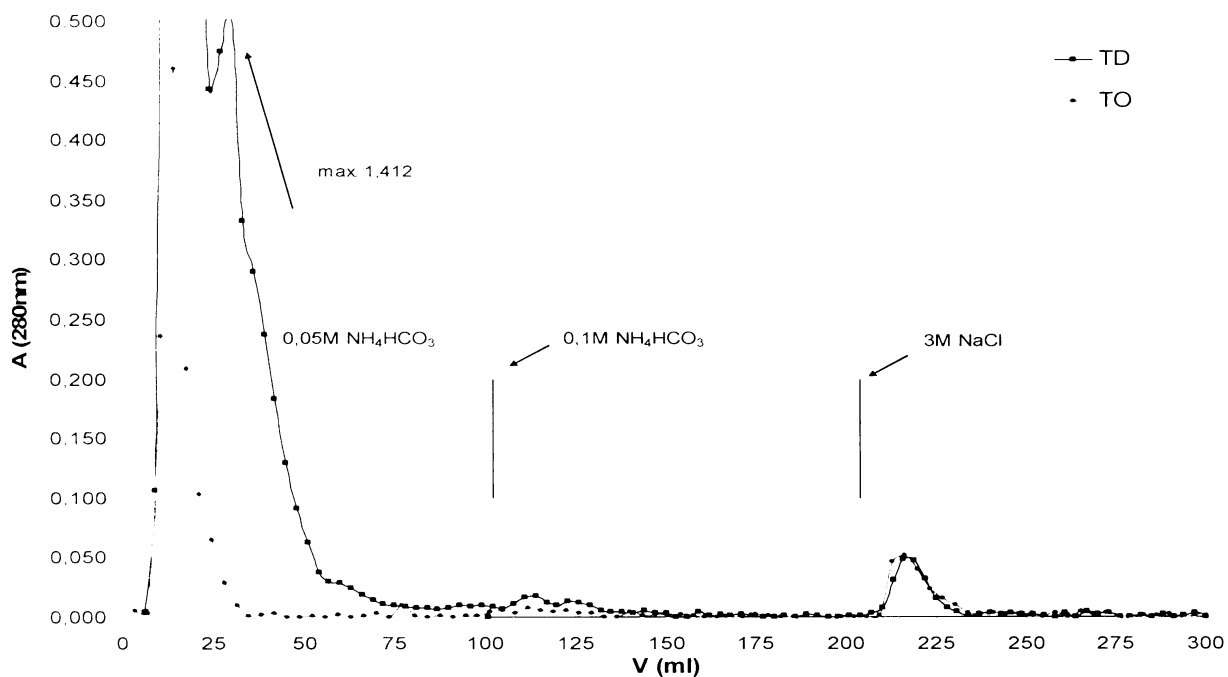
Obr. 10 - Porovnání SDS - elektroforeogramů proteinů tekutin oviduktu v 15 % akrylamidovém gelu po gelové chromatografii; zleva lysozym (L), tekutiny dělohy (TD), tekutiny oviduktu (TO), frakce GO1, GO2, GO3

(a) po barvení na proteiny CBB, (b) po barvení stříbrem pro detekci proteinů, (c) po barvení stříbrem pro detekci glykoproteinů

3.3 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie (kap. 2.2.8, str. 32) na nosičích s imobilizovanými proteiny býčí semenné plazmy (BSP) byla použita k separaci proteinů TO a TD podle afinity k BSP. Průběh chromatografie je znázorněn v Graf 2, str. 44. Výtěžky proteinů získaných afinitní chromatografií jsou uvedeny v Tab. 2, str. 44.

Tekutiny oviduktu bylo nutné před analýzou afinitní chromatografií dialyzovat, neboť obsahovaly velké množství volných cukrů, které při průchodu kolonou rychle znemožnily proteinům TO vazbu k proteinům BSP (kap. 3.5, str. 46). U proteinů TD tento problém nenastal.



Graf 2 – Porovnání afinity složek tekutin dělohy (TD) a tekutin oviduktu (TO) získaných z urogenitálního traktu krávy k imobilizované býčí semenné plazmě. Absorbance měřena při vlnové délce 280 nm

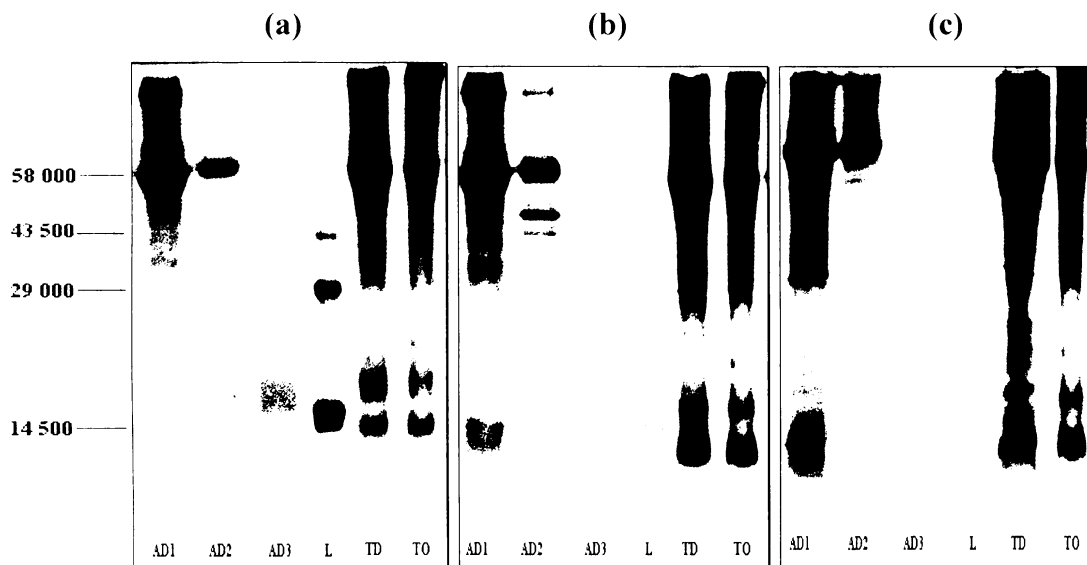
Vzorek	Nános (mg)	Výtěžek nevázející frakce %	Výtěžek vázející frakce %	Ztráty %
TD	25	95	1,6	3,4
TO	25	90	3,9	6,1

Tab. 2 – Výtěžky BSP - vázejících a BSP - nevázejících frakcí z proteinů tekutin dělohy (TD) a oviduktu (TO)

Separováno bylo šest frakcí: AD1, AO1 obsahující nevázející proteinovou složku, eluovanou 0,05 M NH₄HCO₃; AD2, AO2 obsahující také nevázející proteiny, eluované 0,1 M NH₄HCO₃ a AD3, AO3 obsahující frakci proteinů s afinitou k BSP, eluovanou 3 M NaCl. Označení ADx patří proteinům tekutin dělohy a AOx proteinům tekutin oviduktu zpracovaných afinitní chromatografií. Tyto proteinové frakce byly dále charakterizovány SDS - elektroforézou (Obr. 11, str. 45).

3.3.1 SDS - elektroforeogramy proteinů tekutin dělohy a oviduktu rozdělených afinitní chromatografií

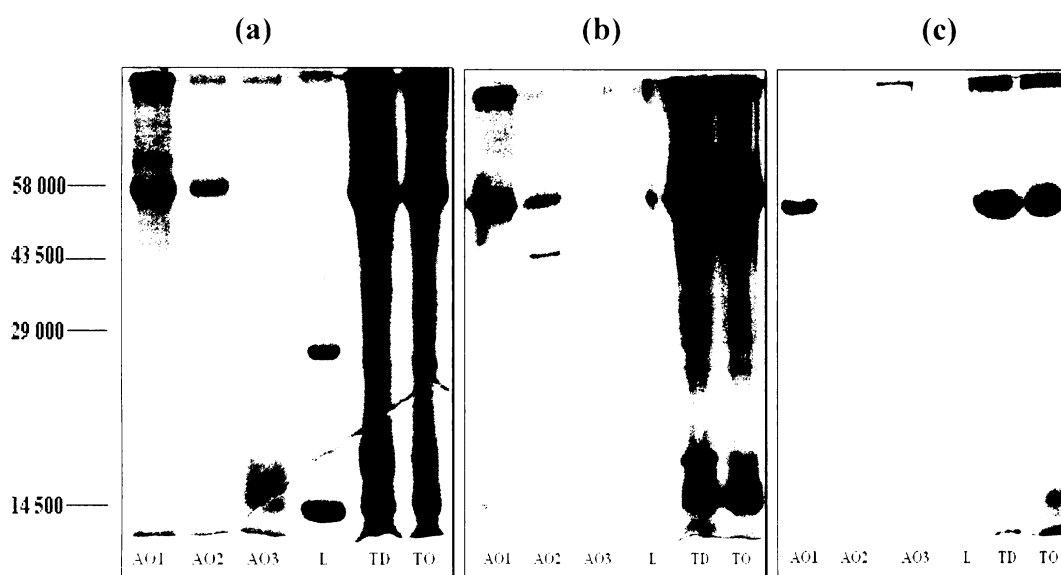
Afinitní chromatografie byla provedena způsobem popsáním v kap. 2.2.8. Po získání frakcí eluovaných postupně 0.05 M NH_4HCO_3 ; 0.1 M NH_4HCO_3 , 3 M NaCl byly proteiny z roztoků získány vysrážením ledovým acetonem (kap. 2.2.8, str. 32). Vzorky byly připraveny standardním způsobem (kap. 2.2.6) pro identifikování SDS – elektroforézou. Byly použity 15 % polyakrylamidové gely, bylo nanášeno 5 μl standardu (L), 10 μl proteinů TO a TD a 20 μl proteinových frakcí označených AD1, AD2, AD3 (složení frakcí podrobně vysvětleno v kap. 3.3, str. 43). Gely nám ukazují, že majoritní podíl nevázejících proteinů se nachází ve frakcích 43 500 – 60 000. Proteiny s afinitou k BSP se nacházejí mezi 14 000 a 16 000 a na gelu obarveném stříbrem na proteiny je vidět, že jsou částečně glykosylované.



Obr. 11 - Porovnání SDS - elektroforeogramů proteinů tekutin oviduktu (TO) v 15 % polyakrylamidovém gelu po afinitní chromatografii; zleva frakce AD1, AD2, AD3, lysozym (L), tekutiny dělohy (TD), tekutiny oviduktu (TO)

(a) po barvení na proteiny CBB, (b) po barvení stříbrem pro detekci proteinů, (c) po barvení stříbrem pro detekci glykoproteinů

Analogickým způsobem byly zpracovány proteiny TO. Byly použity 15 % polyakrylamidové gely, bylo nanášeno 5 μl standardu (L), 10 μl TO, TD a 20 μl proteinových frakcí označených AO1, AO2, AO3 (složení frakcí podrobně vysvětleno v kap. 3.2, str. 41). Byl opět sledován stupeň glykosylace u jednotlivých frakcí. Gely ukazují majoritní podíl nevázejících proteinů ve frakcích 43 500 – 60 000, obdobně jako u tekutin dělohy. Proteiny s afinitou k BSP se nacházejí mezi 14 000 a 16 000 a na gelu obarveném stříbrem na proteiny je vidět, že jsou glykosylované.



Obr. 12 - Porovnání SDS - elektroforeogramů proteinů tekutin oviduktu v 15 % akrylamidovém gelu po afinitní chromatografii; zleva frakce AO1, AO2, AO3, lysozym (L), tekutiny dělohy (TD), tekutiny oviduktu (TO)

(a) po barvení na proteiny CBB, (b) po barvení stříbrem pro detekci proteinů, (c) po barvení stříbrem pro detekci glykoproteinů

Porovnáním gelů po afinitní chromatografii TD a TO můžeme pozorovat nápadnou podobnost. Vyšší afinitu TO k BSP ukazuje pouze tabulka výtěžku (Tab. 2, str. 46)

3.4 Přenos proteinů na PVDF-membránu a následná sekvenace

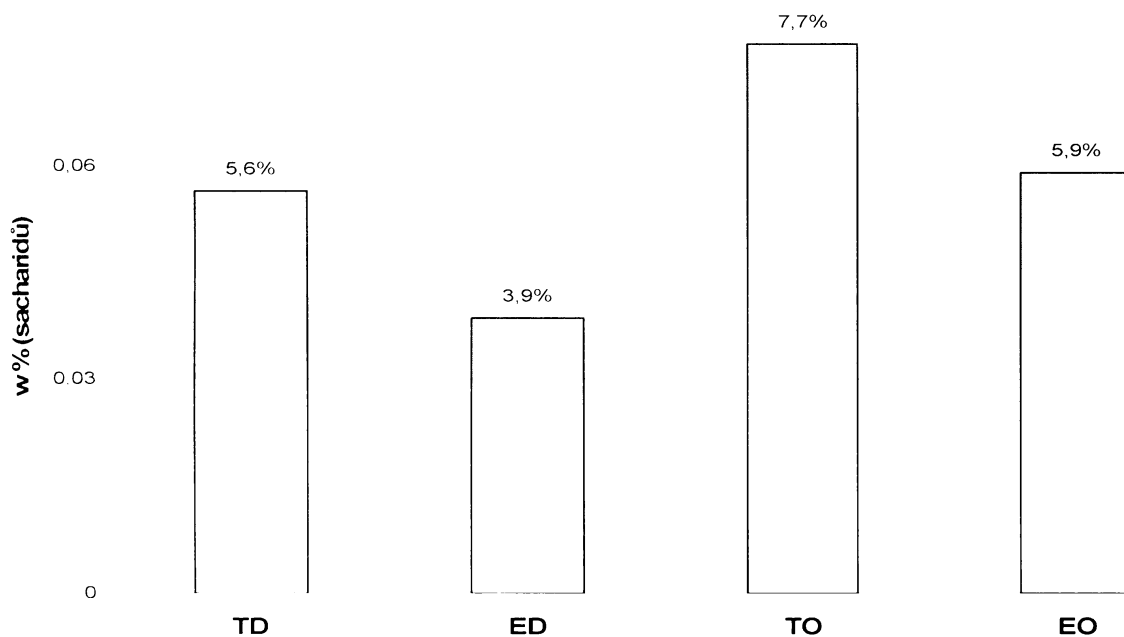
Proteiny TO a TD byly afinitní chromatografií rozděleny na frakci BSP - vázající a BSP - nevážící. SDS - elektroforézou rozdělená BSP - vázající frakce byla přenesena technikou western blot na PVDF-membránu. Metoda byla provedena dle návodu v kap. 2.2.6, str. 31.

Takto připravená membrána byla podrobena Edmanovu odbourávání za účelem získání N-terminální sekvence aminokyselin. Výsledkem bohužel nebyly očekávané sekvence BSP - vázajícího proteinu TD či TO, ale zjištění, že tyto proteiny byly na své N-terminální aminokyselině blokovány a nebylo tedy možno sekvenaci provést.

3.5 Stanovení sacharidů podle Dubois

Pro odhad množství přítomných sacharidů v tekutinách dělohy (TD), oviduktu (TO), epitelech dělohy (ED) a epitelech oviduktu (EO) byla použita metoda popsaná v kap. 2.2.9, str. 33. Na přístroji Helios γ byly při vlnové délce 490 nm proměřeny vždy tři vzorky připravené

z lyofilizátu TD, TO, ED a EO. Z kalibrační křivky byly odečteny hodnoty koncentrací sacharidů přítomných ve vzorcích, zprůměrovány a vyneseny pro přehlednost do Graf 3.



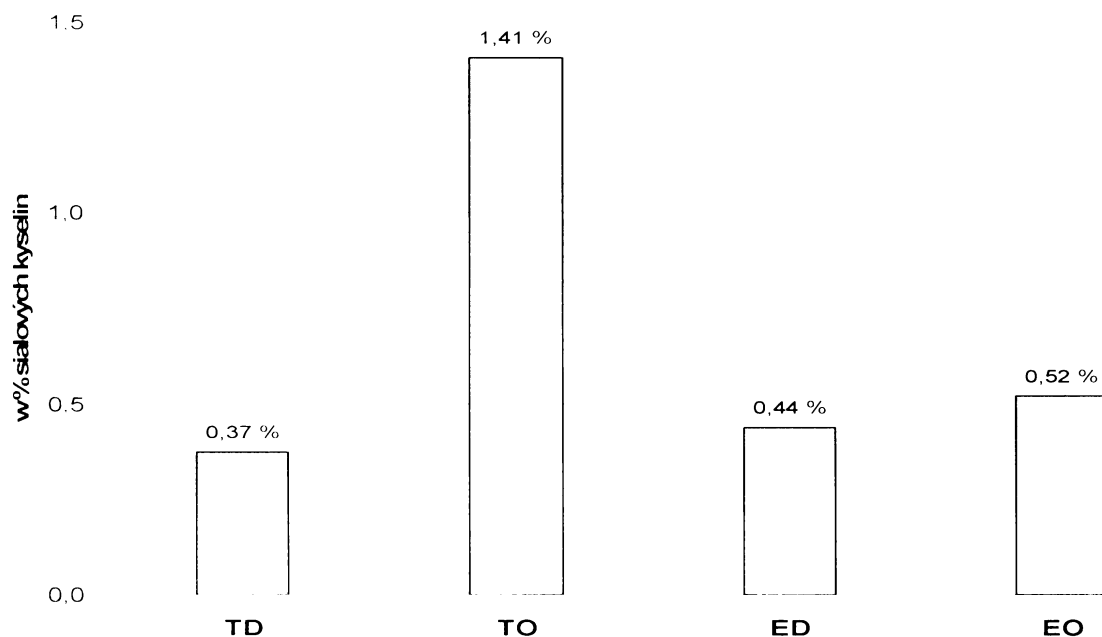
Graf 3 – Procentuální zastoupení sacharidů ve vzorcích proteinů urogenitálního traktu krávy detekovaných metodou dle Dubois;

proteiny tekutin dělohy (TD), epitely dělohy (ED), proteiny tekutin oviduktu (TO) a epitely oviduktu (EO)

Při porovnávání množství sacharidů přítomných v jednotlivých vzorcích je patrný rozdíl. Epitely dělohy či oviduktu, vždy obsahují méně sacharidů než tekutiny, které je omývají. Také je patrný rozdíl mezi dělohou a ovidukty, ať už na epitelech nebo tekutinách. V oviduktech se celkově nachází větší množství sacharidů než v děloze.

3.6 Stanovení sialových kyselin

Při stanovení sialových kyselin byly použity tekutiny dělohy (TD), tekutiny oviduktu (TO) i epitely dělohy (ED) a epitely oviduktu (EO). Postup je popsán v kap. 2.2.10, str. 33. Na přístroji HeLIos γ byly při vlnové délce 570 nm proměřeny vždy tři vzorky připravené z lyofilizátů TD, TO, ED a EO. Z kalibrační křivky byly odečteny hodnoty koncentrací sialových kyselin ve vzorcích, zprůměrovány a vyneseny pro přehlednost do Graf 4, str. 48.



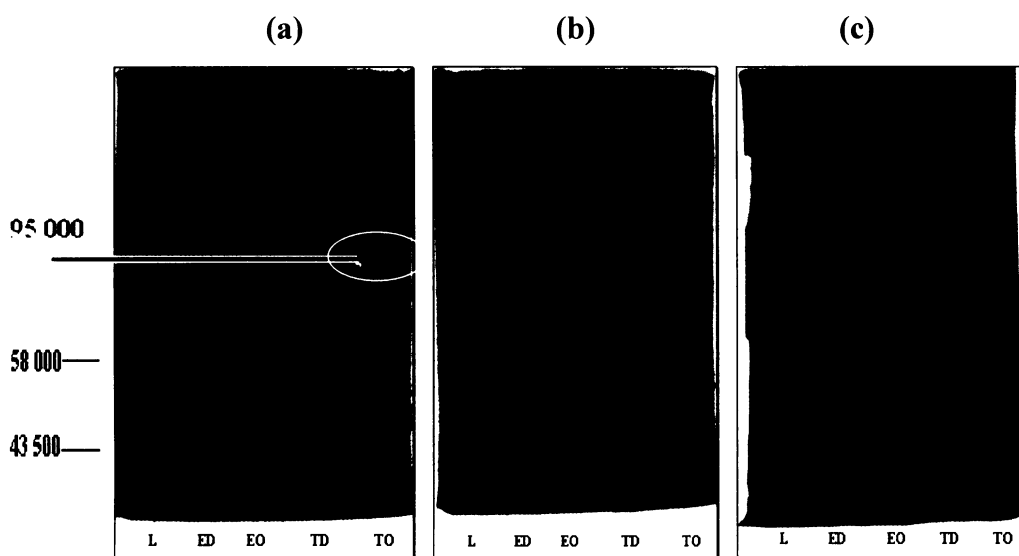
Graf 4 – Procentuální zastoupení sialových kyselin ve vzorcích proteinů urogenitálního traktu krávy;

zleva: proteiny tekutin dělohy (TD), tekutin oviduktu (TO), epitelů dělohy (ED) a epitelů oviduktu (EO)

Byla prokázána přítomnost sialových kyselin ve všech vzorcích. Výrazně se odlišovaly hodnoty vzorků TO, kde je koncentrace sialových kyselin o téměř 70 % vyšší než průměr ostatních hodnot.

3.7 Želatinová zymografie

Metodou želatinové zymografie byla sledována proteolytická aktivita přítomná na epitelech dělohy (ED), epitelech oviduktu (EO), a dále v tekutinách dělohy (TD) a v tekutinách oviduktu (TO). K určení typu proteáz byly použity inhibitory serinových proteáz a metaloproteáz. Výsledky potvrdily přítomnost proteáz o Mr 95 000 v oviduktálních tekutinách (Obr. 13, str. 49 – (A)). Vzhledem ke skutečnosti, že inhibice serinových (Obr. 13, str. 49 – (B)) i metaloproteáz (Obr. 13, str. 49 – (C)) byla úspěšná, nemůžeme s jistotou říci, který typ proteáz je ve vzorcích přítomen.

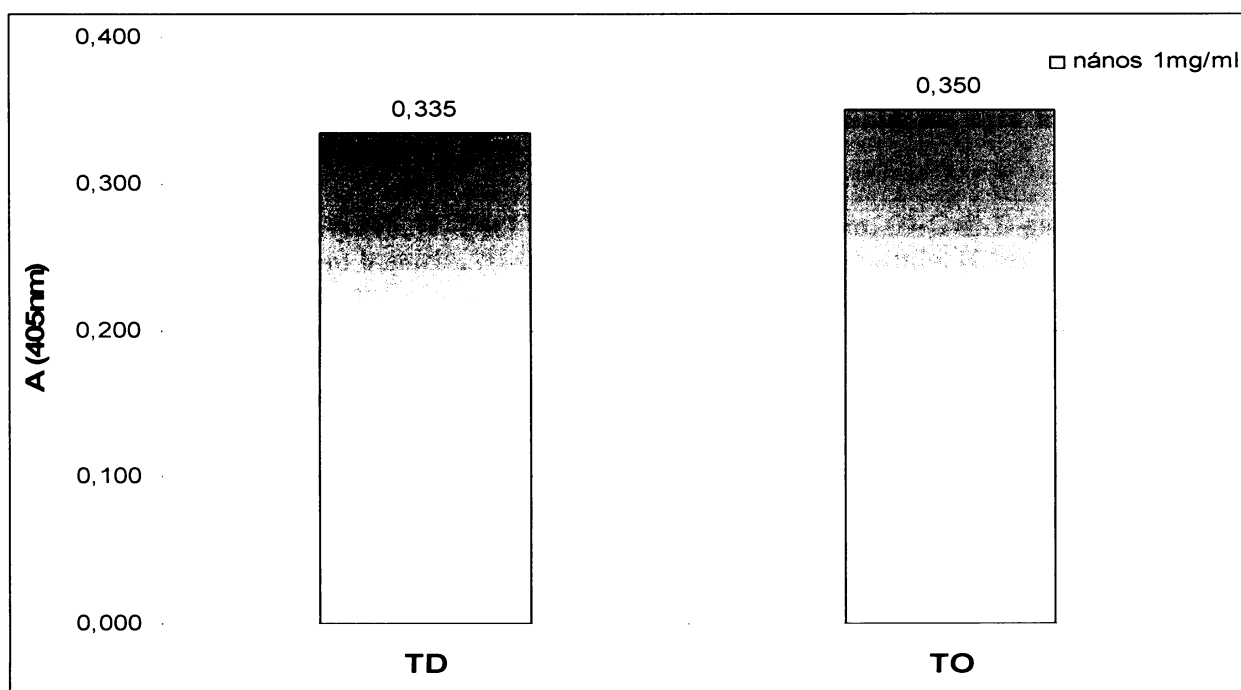


Obr. 13 - Sledování aktivity proteáz želatinovou zymografií v 12 % gelu; zleva lysozym (L), epitely dělohy (ED), epitely oviduktu (EO), tekutiny dělohy (TD) a tekutiny oviduktu (TO)

(a) bez inhibitoru – zjištění celkových proteáz, (b) inhibice serinových proteáz, (c) inhibice metaloproteáz

3.8 Stanovení kyselé fosfatázy

Metoda stanovení aktivity kyselé fosfatázy v TD a TO je popsána v kap. 2.2.12, str. 35. Aktivity kyselé fosfatázy je přibližně stejná v obou vzorcích viz Graf 5, str. 49.

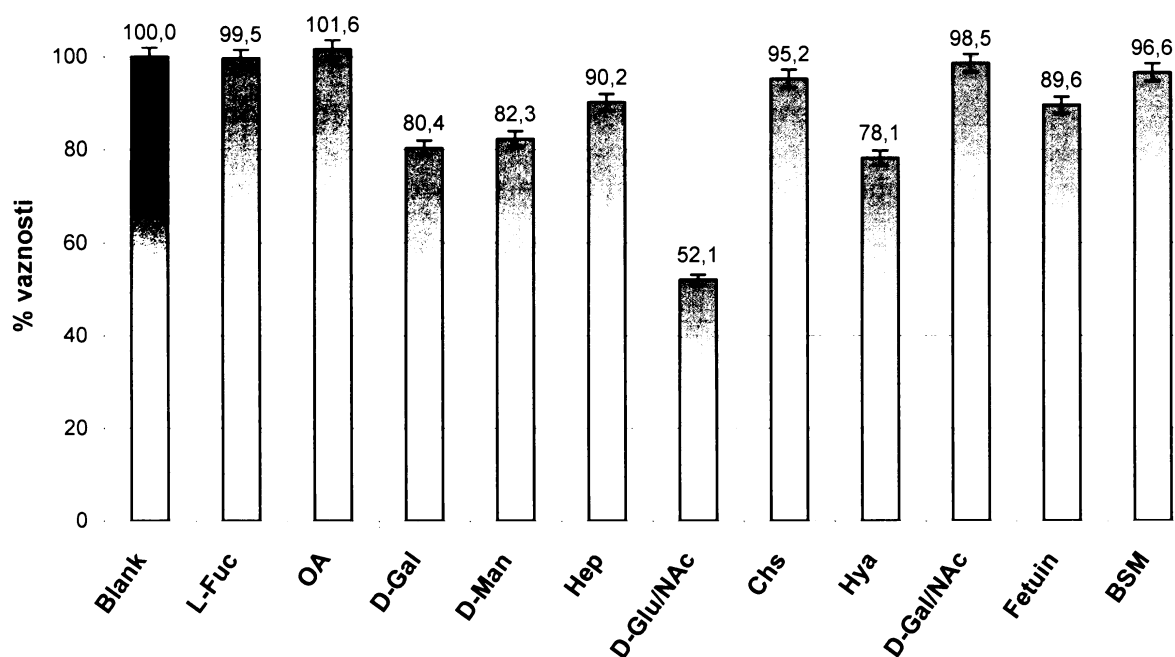


Graf 5 – Stanovení aktivity kyselé fosfatázy ve vzorcích tekutin dělohy (TD) a tekutin oviduktu (TO); 1 mg/ml lyofilizovaného vzorku, absorbance měřena při vlnové délce 405 nm

3.9 ELBA metoda

ELBA metodou (viz 2.2.13, str. 35) byl pozorován vliv testovaných sacharidových inhibitorů na vazbu tekutin oviduktu (TO) a býčí semenné plazmy (BSP).

Výstupy této metody jsou pro přehlednost zpracovány do grafu (Graf 6). Inhibiční experimenty byly provedeny třikrát, výsledky před vnesením do grafu byly statisticky zpracovány.



Graf 6 – Procentuální úspěšnosti inhibice vazby tekutin oviduktu na býčí semennou plazmu (koncentrace inhibitoru 2,5 mg/ml)

Blank – slepý vzorek, (L-Fuc) L-fukóza, (OA) ovalbumin, (D-Gal) D-galaktóza, (D-Man) D-manóza, (Hep) heparin, (D-Glu/NAC) N-acetyl-D-glukosamin, (Chs) chondroitin sulfát, Hya – kyselina hyaluronová, D-Gal/NAC – N-acetyl-D-galaktosamin, Fetuin – Fetuin, BSM – mucin z podčelistních žláz

Vzájemným porovnáním dat se slepým vzorkem vidíme vliv testovaných inhibitorů na studovanou vazbu.

Látkami, které vazbu téměř neovlivnily nebo jen velmi málo, jsou L-fukóza, ovalbumin, heparin, chondroitin sulfát, N-acetyl-D-galaktosamin, fetuin a mucin z podčelistních žláz. Snížení schopnosti BSP se vázat na TO asi o 20 % způsobily D-galaktóza, D-manóza a kyselina hyaluronová. Nejvýraznější snížení schopnosti vázat ze všech použitých potencionálních inhibitorů způsobil N-acetyl-D-glukosamin. Jeho přítomnost způsobil snížení schopnosti BSP navázat se na TO téměř o celých 50 %.

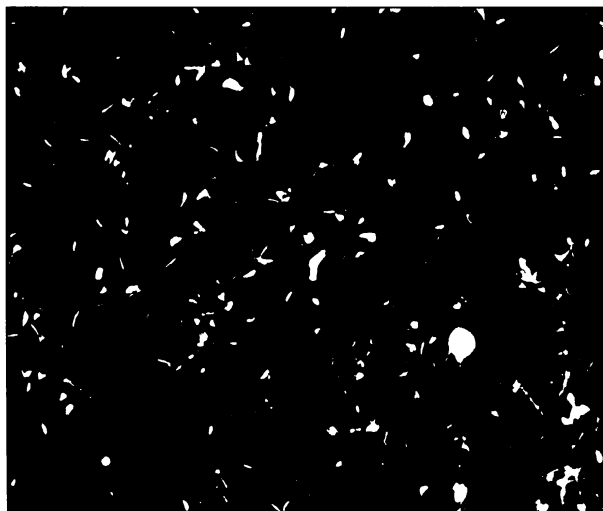
3.10 Průtoková cytofluorimetrie

Metoda průtokové cytofluorimetrie byla použita v experimentech zahrnujících parciální enzymatické deglykosylace proteinů tekutin oviduktu, epitelů oviduktu a tekutin dělohy, také pro autoproteolytické degradace oviduktálních tekutin a jejich schopnosti vázat spermie a dále ovlivnění vazby tekutin oviduktu na spermii po přidavku býčí semenné plazmy.

Metoda je popsána v kap. 2.2.14, str. 37. Přístroj měří jak intenzitu odrazu laserového paprsku od buňky značené FITC proteiny (tedy velikost buňky), tak i fluorescenci FITCem značených proteinů, tedy vazbu těchto proteinů na buňku.

3.10.1 Ověření vazby tekutin oviduktu na býčí spermie

Před použitím metody byla ověřena vazba proteinů tekutin oviduktu (TO) značených FITC barvivem na býčí spermie zbavené býčí semenné plazmy (Obr. 14).



Obr. 14 – Vazba tekutin oviduktu označených FITC na býčí spermie. Žluté spermie váží proteiny tekutin oviduktu. Bílé spermie proteiny tekutin oviduktu neváží.

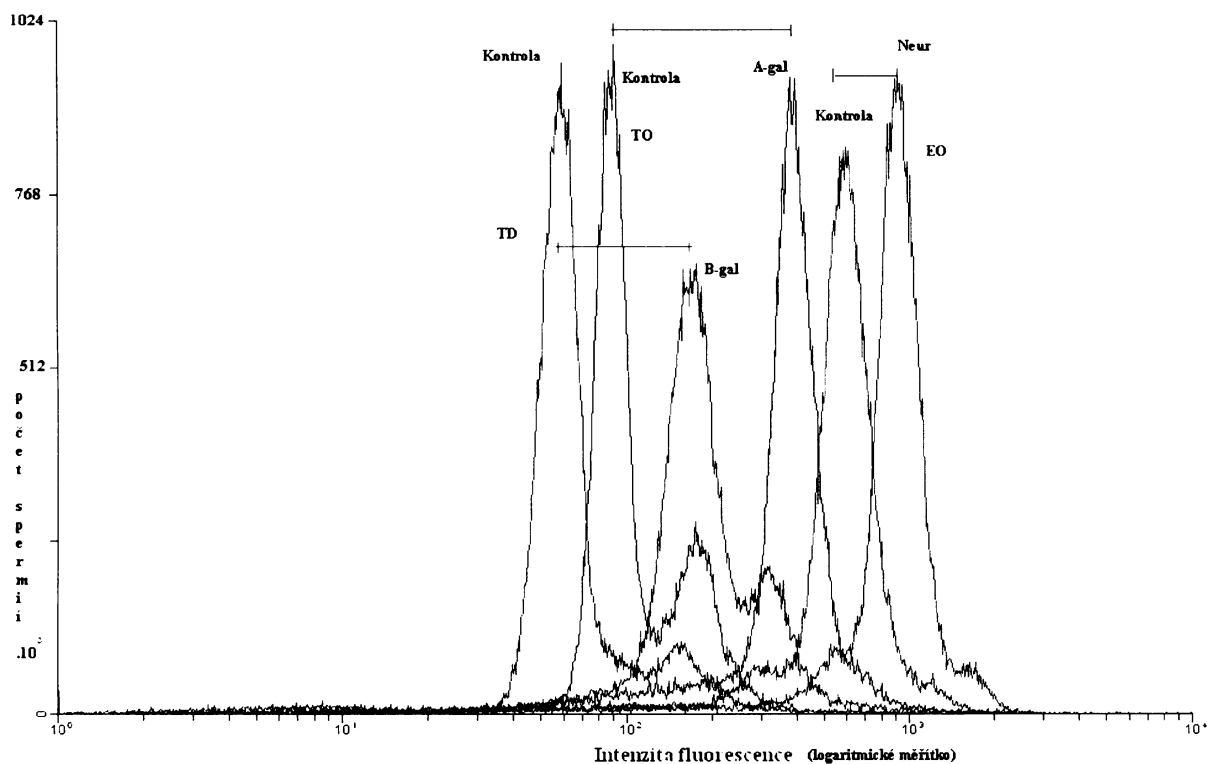
3.10.2 Stanovení změny schopnosti vázat tekutin oviduktu, dělohy a epitelů oviduktu na spermii po inkubaci s glykosidázami

Touto metodou byla ověřována sacharidová specifita vazby izolovaných proteinů z urogenitálního traktu krávy a býčích spermií. Metoda byla provedena postupem uvedeným v kap. 2.2.14, str. 37. Výstupem metody je sada histogramů (všechny uvedeny na příloženém CD, složka Histogramy), z nichž jsou zde uvedeny jen vybrané důležité výsledky. Data ze všech histogramů byla pro přehlednost zpracována do schémat (Obr. 16, str. 53, Obr. 17, str. 54, Obr. 18, str. 54) Díky nim je možné snadno srovnat a analyzovat vliv jednotlivých specificky

enzymaticky odštěpených sacharidů na vazbu tekutin oviduktu (TO), dělohy (TD) a epitelů oviduktu (EO).

Protože cytofluorimetr měří intenzitu fluorescence buňky značené FITC barvivem, resp. v našem případě FITCem značené proteiny TO, TD, EO navázané na povrchu spermie, můžeme říci, že čím větší naměřená hodnota intenzity fluorescence spermie, tím více navázaných FITCem značených proteinů. Neboli čím vyšší naměřená hodnota intenzity fluorescence, tím vyšší afinita enzymaticky upravených vzorků TO, TD či EO k živé býčí spermii.

Nejvýraznější změna vaznosti u jednotlivých frakcí z urogenitálního traktu krávy je vidět na souhrnném histogramu Obr. 15. Píky kontrol v kontrastu s píky vzorků, které měli největší vliv na změnu vazby, ukazují zajímavý jev. Totiž tuto změnu u různých frakcí (TO, TD, EO) nezpůsobil jeden a ten samý enzym. Lépe je tento fakt viditelný na grafech (Obr. 16, str. 53, Obr. 17, str. 54, Obr. 18, str. 54).



Obr. 15 – Histogram znázorňující závislost intenzity fluorescence (v logaritmickém měřítku) na počtu spermii s danou fluorescencí; porovnání kontrol se vzorky po působení enzymů, kteří měli největší vliv na změnu vazby

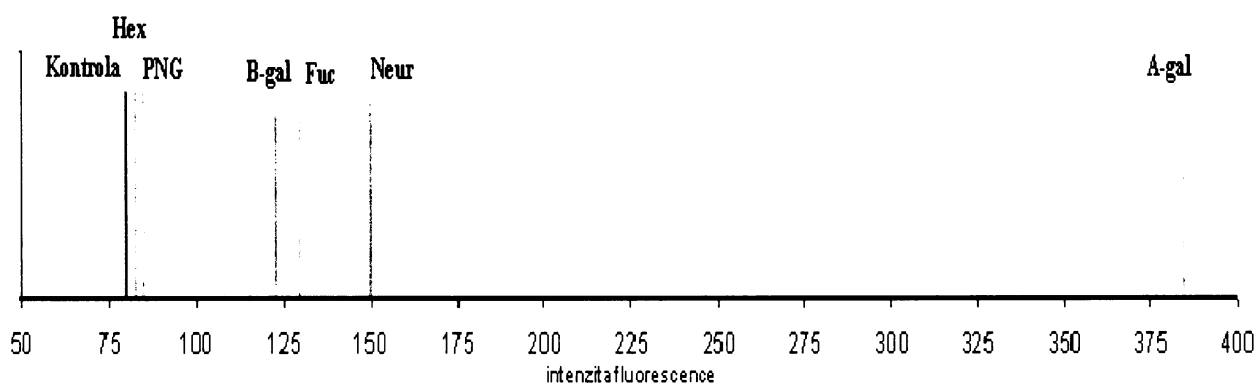
červeně – tekutiny dělohy (TD) na spermii, pík kontroly (TD bez enzymatické modifikace) v porovnání s píkem vzorku po inkubaci s β -galaktosidázou (B-gal)

černě – tekutiny oviduktu (TO) na spermii, pík kontroly (TO bez enzymatické modifikace) v porovnání s píkem vzorku po inkubaci s α -galaktosidázou (A-gal)

fialově – epitely oviduktu (EO) na spermii, pík kontroly (EO bez enzymatické modifikace) v porovnání s píkem vzorku po inkubaci s neuraminidázou (Neur)

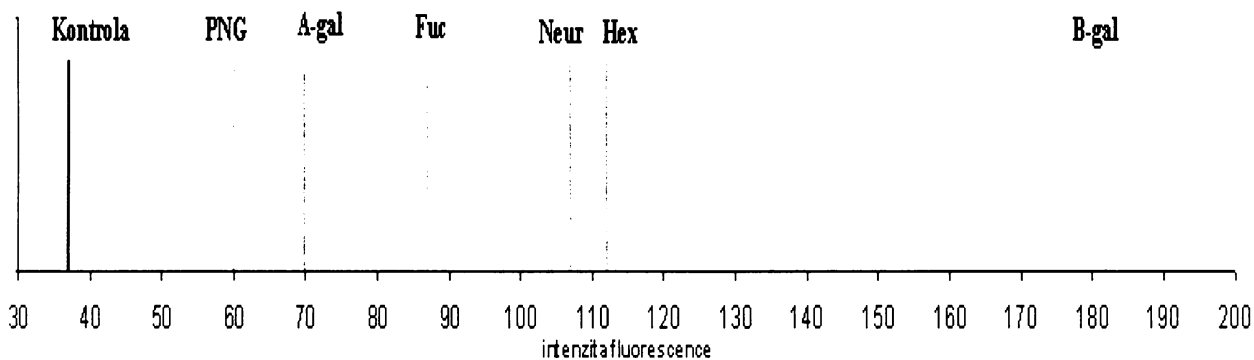
Na histogramu (Obr. 15, str. 52) je možné vidět glykosidázy, které nejvíce modifikovaly vazbu tekutin či epitelů na povrch živé býčí spermie. U tekutin dělohy (TD) největší změnu způsobila β -galaktosidáza, u tekutin oviduktu (TO) α -galaktosidáza a u epitelů oviduktu neuraminidáza.

Je nutné připomenout, že horizontální osa je v logaritmickém měřítku. Zdálnivě největší rozdíl mezi intenzitou fluorescence píku kontroly a píku α -galaktosidázy u TO je o něco menší než rozdíl intenzity fluorescence píku kontroly a píku neuraminidázy u EO. Odečtením hodnot z histogramů a vynesením na jednu osu (Obr. 16, str. 53, Obr. 17, str. 54, Obr. 18, str. 54) je tento fakt lépe viditelný. Naopak rozdíl mezi intenzitou fluorescence píku kontroly a píku β -galaktosidázy u TD je oproti oběma dříve uvedeným dvojicím méně než poloviční.



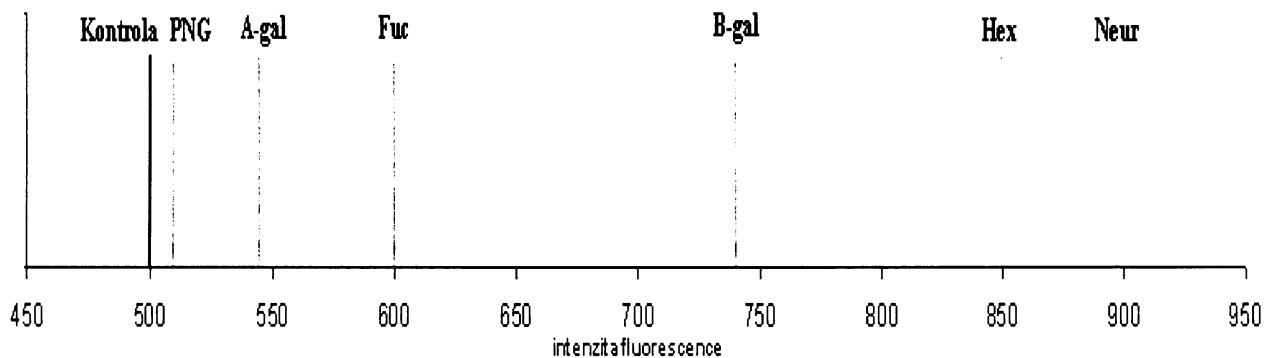
Obr. 16 – Tekutiny oviduktu (TO) - posuny maxim píků, odečtených z histogramů a zpracovaných do přehledného schéma; Kontrola – bez enzymatické modifikace, A-gal - α -galaktosidáza, B-gal - β -galaktosidáza, Fuc – fukosidáza, Hex – hexosaminidáza, Neur – neuraminidáza, PNG – PNGáza F

Hodnoty maxim píků jednotlivých vzorků – proteinů tekutin oviduktu (TO) s navázaným FITC barvivem inkubovaných s jednotlivými enzymy navázaných na býčí spermie a analyzovaných průtokovým cytofluorimetrem. Největší vliv na TO měla α -galaktosidáza. Dále můžeme na schématu vidět skupinku tvořenou neuraminidázou, fukosidázou a β -galaktosidázou, které vazbu TO k býčí spermii ovlivnily asi o 60 % méně než α -galaktosidáza. Naopak PNGáza F a hexosaminidáza na vazbu vliv neměly téměř žádný.



Obr. 17 – Tekutiny dělohy (TD) - posuny maxim píků, odečtených z histogramů a zpracovaných do přehledného schéma; Kontrola – bez enzymatické modifikace, A-gal - α -galaktosidáza, B-gal - β -galaktosidáza, Fuc – fukosidáza, Hex – hexosaminidáza, Neur – neuraminidáza, PNG – PNGáza F

Hodnoty maxim píků jednotlivých vzorků – proteinů tekutin dělohy (TD) s navázaným FITC barvivem inkubovaných s jednotlivými enzymy navázaných na býčí spermie a analyzovaných průtokovým cytofluorimetrem. Enzymy, které modifikovaly TD, ovlivnili jejich vaznost na spermie jen velmi málo. Afinity kontroly ke spermii, sama o sobě nízká, byla nejvíce ovlivněna β -galaktosidázou. Asi o 50 % méně než β -galaktosidáza modifikovaly TD hexosaminidáza a neuraminidáza. Fukosidáza, α -galaktosidáza a PNGáza F neměli téměř žádný vliv.



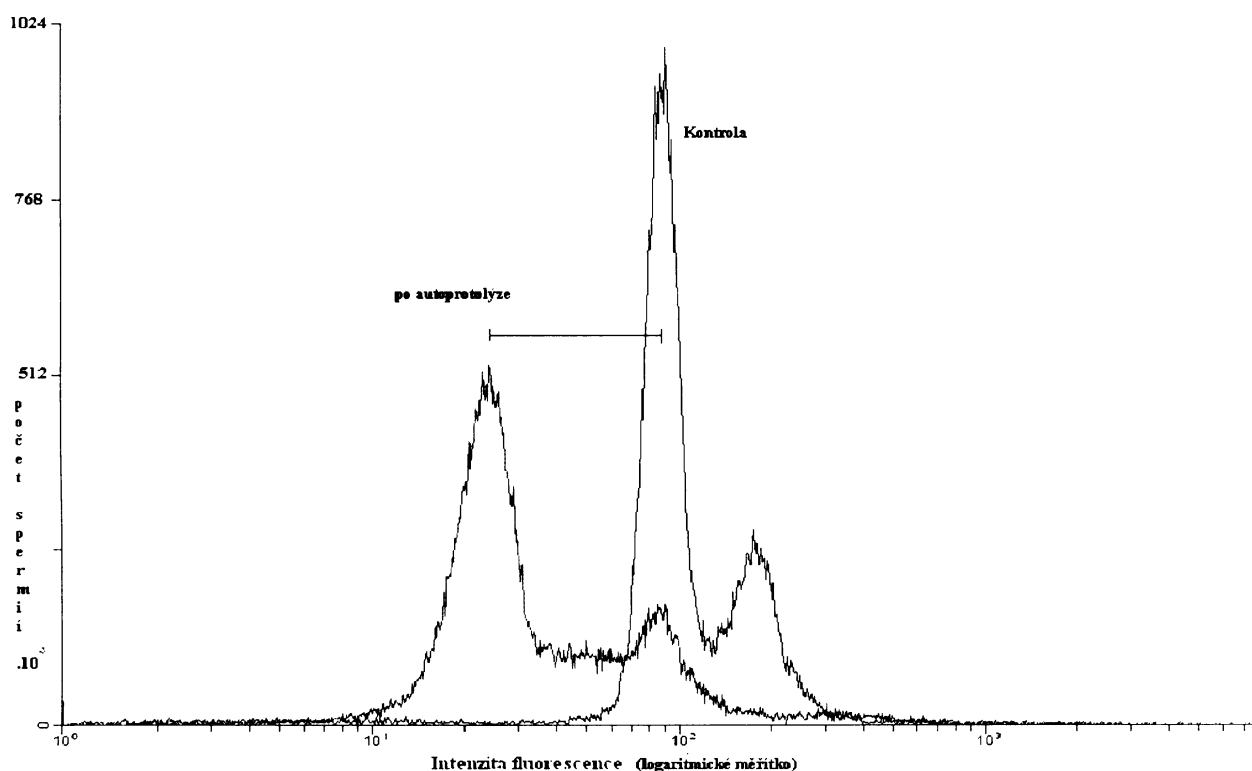
Obr. 18 – Epitely oviduktu (EO) - posuny maxim píků, odečtených z histogramů a zpracovaných do přehledného schéma; Kontrola – bez enzymatické modifikace, A-gal - α -galaktosidáza, B-gal - β -galaktosidáza, Fuc – fukosidáza, Hex – hexosaminidáza, Neur – neuraminidáza, PNG – PNGáza F

Hodnoty maxim píků jednotlivých vzorků – proteinů epitelů oviduktu (EO) s navázaným FITC barvivem inkubovaných s jednotlivými enzymy navázaných na býčí spermie a analyzovaných průtokovým cytofluorimetrem.

Největší vliv na EO měl enzym neuraminidáza. Změna schopnosti vázat, kterou způsobil, je celkově největší změnou afinity studovaných proteinů z urogenitálního traktu krávy k býčí spermii. Nepatrně menší vliv měla hexosaminidáza, o pouhých 10 %. Dále vidíme ovlivnění β -galaktosidázou, fukosidázou, α -galaktosidázou a PNGázou F.

3.10.3 Studie změny schopnosti tekutin oviduktu vázat se na spermii v závislosti na autoprotolýze tekutin oviduktu

Touto metodou byla ověřována změna vazby tekutin oviduktu (TO) na živou spermii po autoprotolýze. Metoda byla provedena postupem uvedeným v kap. 2.2.15, str. 38. Výstupem metody je histogram uvedený na Obr. 19.



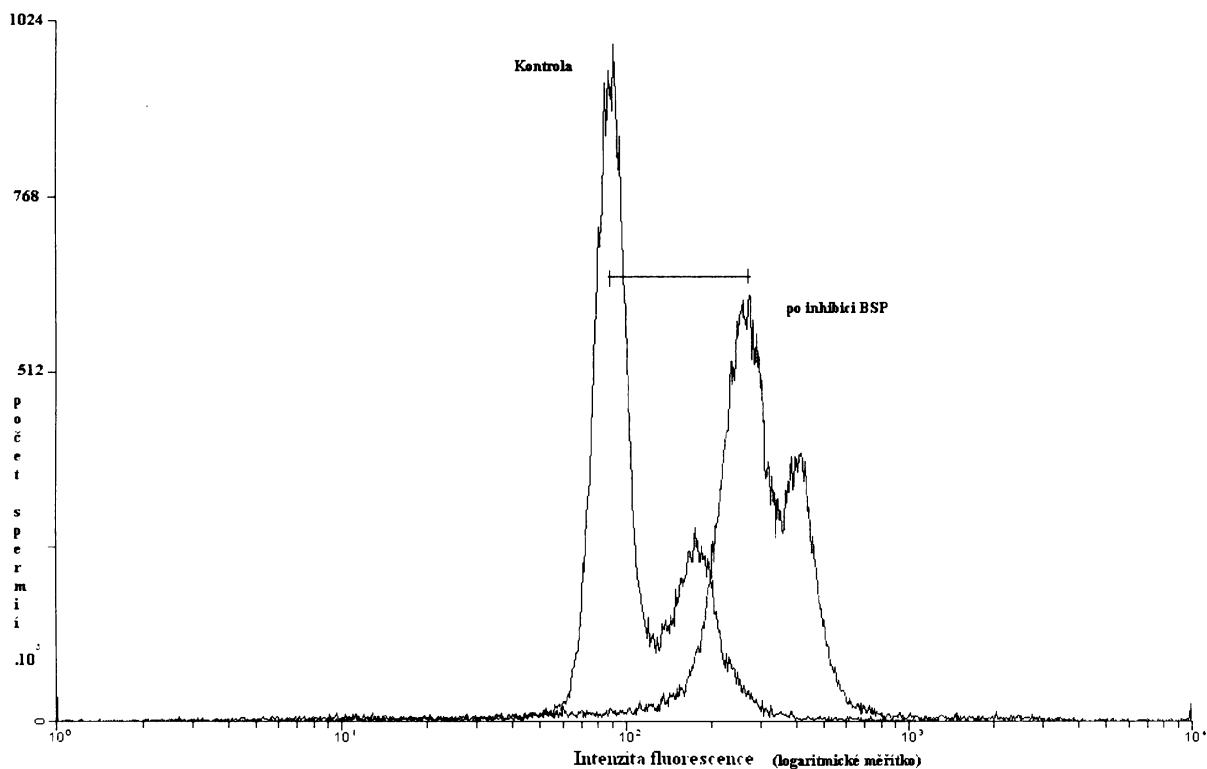
Obr. 19 – Histogram studie vlivu autoprotolýzy tekutin oviduktu (TO) na vazbu TO na býčí spermii; závislost logaritmu intenzity fluorescence na počtu spermií

Naměřená data ukázala velmi výrazný efekt snížení vazby TO na býčí spermii v závislosti na autoprotolýze. 24 hod autoprotolýza snížila interakci o 22 %.

3.10.4 Studie inhibičních účinků býčí semenné plazmy na vazbu tekutin oviduktu na spermii

Experimentem byla ověřována změna vazby tekutin oviduktu (TO) na živou spermii po přidavku býčí semenné plazmy. Metoda byla provedena postupem uvedeným v kap. 2.2.15,

str. 38. Výstupem metody je histogram uvedený na (Obr. 20) Přídavek semenné vazby k omytým spermii překvapivě zvyšoval interakci TO se spermii 150 %.



Obr. 20 – Histogram studie vlivu býčí semenné plazmy na vazbu tekutin oviduktu (TO) na býčí spermii; závislost logaritmu intenzity fluorescence na počtu spermii

3.11 Fluorescenční mikroskopie

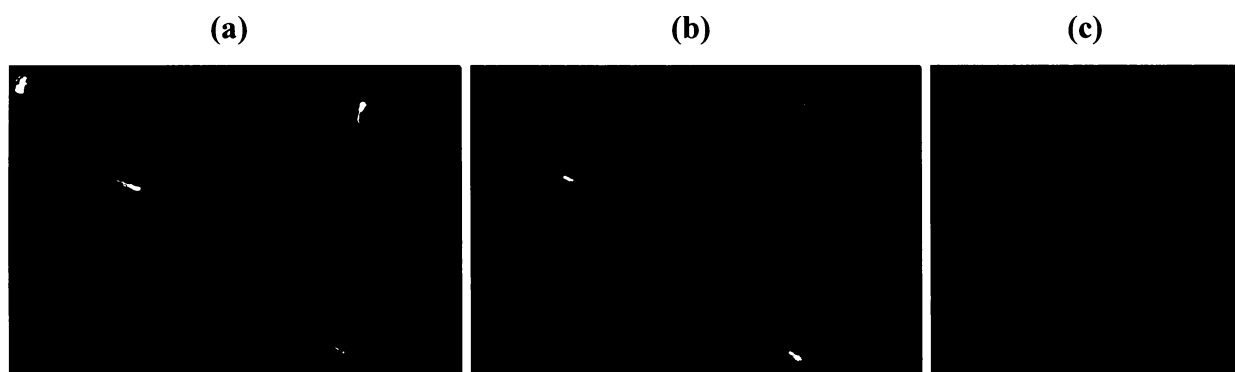
Mikroskopické preparáty byly připraveny metodou popsanou v kap. 2.2.14, str. 37 a analyzovány fluorescenčním mikroskopem na katedře biochemie PŘF UK.

FITC barvivo navázané na tekutinách oviduktu (TO), dělohy (TD) nebo epitelech oviduktu (EO) je detekovatelné fluorescenčním mikroskopem. Snímky byly získány v 600x zvětšení. Plné verze jsou uvedeny na příloženém CD. V následujících kapitolách byly pro názornost použity jen výřezy z těchto snímků.

3.11.1 Mikroskopické pozorování změny vaznosti tekutin oviduktu, tekutin dělohy a epitelů oviduktu na spermii po inkubaci s enzymy

Následující snímky ukazují vazbu modifikovaných TD, TO, EO na spermii. Snímky potvrzují kvantitativní informaci získanou z cytofluorimetrické analýzy také kvalitativně. Snímky jsou zobrazovány v porovnání s kontrolou a snímkem bez fluorescenční detekce, aby bylo prokázáno, že na snímku nejsou další spermie bez navázaných modifikovaných proteinů.

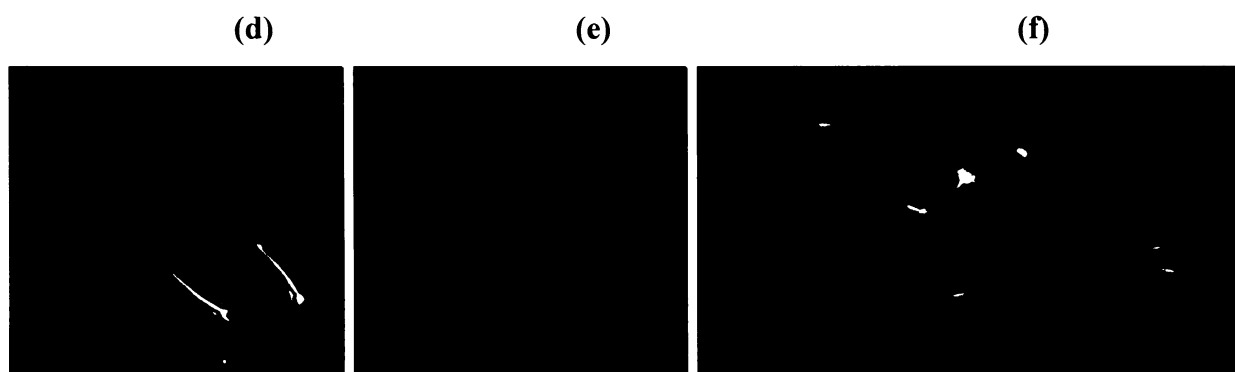
Zde jsou uvedeny nejdůležitější snímky, všechny analyzované preparáty jsou uvedeny na příloženém CD ve složce Mikroskopie.



Obr. 21 – Mikroskopické snímky býčích spermií s navázanými tekutinami oviduktu krávy upravenými působením enzymu α -galaktosidáza

- (a) snímek býčí spermie s fázovým kontrastem bez fluorescence
- (a) fluorescenční detekce povrchových glykoproteinových struktur z tekutin oviduktu značených FITC barvivem na povrchu býčí spermie
- (b) snímek kontroly, tekutiny oviduktu značené FITCem bez enzymatické modifikace na povrchu býčí spermie

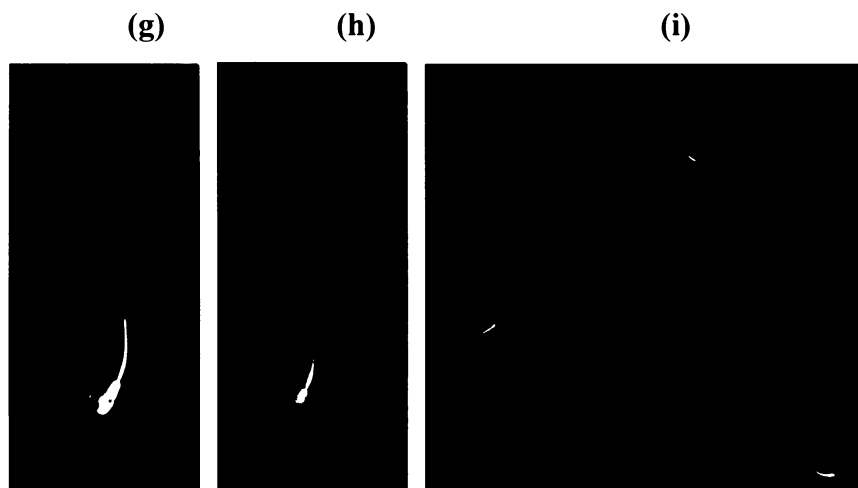
Snímané spermie potvrzují informace získané průtokovým cytofluorimetrem, vazba tekutin oviduktu je poměrně silná. Změna způsobená α -galaktosidázou je patrná i na snímcích (Obr. 21).



Obr. 22 – Mikroskopické snímky býčích spermií s navázanými tekutinami dělohy krávy upravenými působením enzymu β -galaktosidáza

- (c) snímek býčí spermie s fázovým kontrastem bez fluorescence
- (d) fluorescenční detekce povrchových glykoproteinových struktur z tekutin dělohy značených FITC barvivem na povrchu býčí spermie
- (e) snímek kontroly, tekutiny dělohy značené FITCem bez enzymatické modifikace na povrchu býčí spermie

Rozdíly v intenzitách bílé barvy spermií potvrzují informace získané průtokovým cytofluorimetrem, vazba tekutin dělohy je velmi slabá a změna způsobená β -galaktosidázou je minimální (Obr. 22, str. 57).



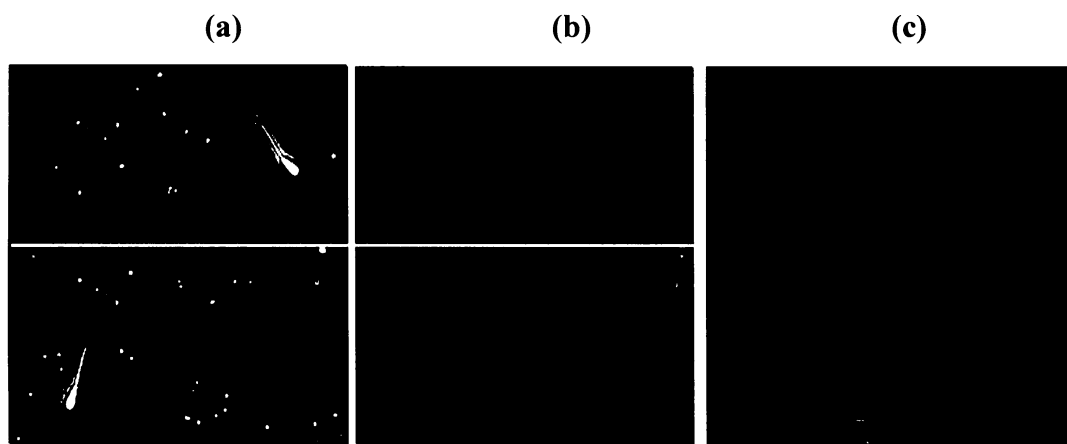
Obr. 23 – Mikroskopické snímky býčích spermií s navázanými epitely oviduktu krávy upravenými působením enzymu neuraminidázou

- (f) snímek býčí spermie s fázovým kontrastem bez fluorescence
- (g) fluorescenční detekce povrchových glykoproteinových struktur z epitelů dělohy značených FITC barvivem na povrchu býčí spermie
- (h) snímek kontroly, epitely dělohy značené FITCem bez enzymatické modifikace na povrchu býčí spermie

Opět zde vidíme porovnáním intenzit bílé barvy spermií. Shodují se s informacemi z cytofluorimetrie. Afinita povrchových glykoproteinových struktur z epitelů oviduktu je velmi silná, nejsilnější ze studovaných frakcí a změna způsobená neuraminidázou je viditelná pouhým okem na snímcích z fluorescenčního mikroskopu (Obr. 23).

3.11.2 Mikroskopická studie změny schopnosti vázat tekutiny oviduktu na spermii v závislosti na autoprotolýze tekutinami oviduktu

Vzorek připravený pro studium změny schopnosti proteinů tekutin oviduktu vázat se na spermii v závislosti na autoprotolýze tekutinami oviduktu podle návodu v kap. 2.2.14.2, str. 38, byl také analyzován fluorescenčním mikroskopem (Obr. 24, str. 59). Data získaná cytofluorimetrií ukazují, že afinita ke spermii se autoprotolýzou snižuje. Potvrzení vidíme na následujících snímcích (Obr. 24, str. 59).

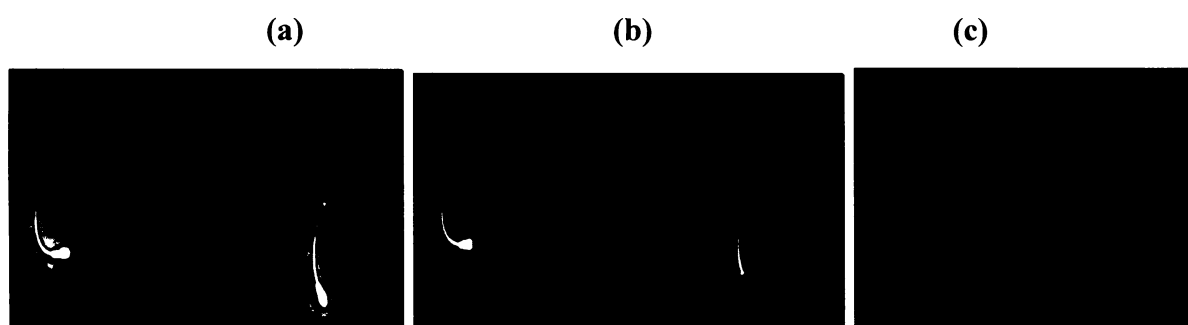


Obr. 24 – Mikroskopické snímky býčích spermií s navázanými tekutinami oviduktu podrobenými autoprotolýze

- (a) snímek býčí spermie s fázovým kontrastem bez fluorescence
- (b) fluorescenční detekce tekutin oviduktu značených FITC barvivem, navázaných na povrchu býčí spermie po 24 hod autoprotolýze
- (c) kontrolní snímek, fluorescenční detekce povrchových struktur tekutin oviduktu značených FITC barvivem bez autoprotolýzy

3.11.3 Studie účinků býčí semenné plazmy na vazbu tekutin oviduktu na spermii

Vzorek připravený pro studium účinků býčí semenné plazmy na vazbu tekutin oviduktu na spermii podle návodu v kap.2.2.14.3, str. 38, byl také analyzován fluorescenčním mikroskopem (Obr. 25). Srovnáním kontrolního snímku se snímek vazby spermií na TO je zřejmé, že přítomnost semenné plazmy v preparátu vazbu TO na spermii zvyšuje. Obdobně jako je tomu v případě experimentu provedeného metodou průtokové cytofluorimetrie.



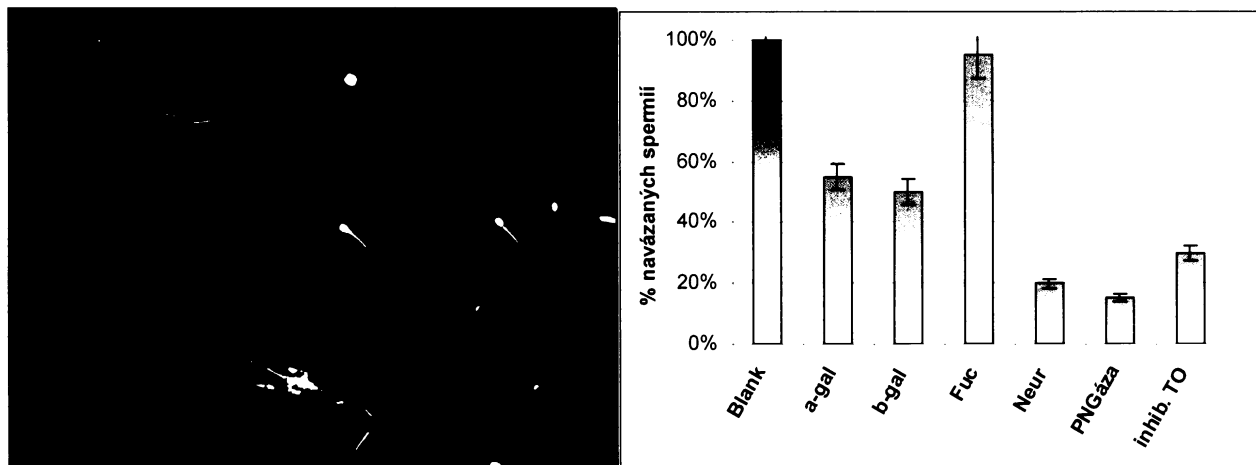
Obr. 25 – Mikroskopické snímky býčích spermií s navázanými tekutinami oviduktu krávy po ovlivnění této vazby býčí semennou plazmou

- (a) snímek býčí spermie bez detekce navázaných tekutin oviduktu
- (b) fluorescenční detekce tekutin oviduktu značených FITC barvivem, navázaných na povrchu býčí spermie po ovlivnění této vazby býčí semennou plazmou
- (c) kontrolní snímek, fluorescenční detekce povrchových struktur tekutin oviduktu značených FITC barvivem bez ovlivnění této vazby býčí semennou plazmou

3.11.4 Fluorescenční mikroskopie na tkáních

Fluorescenční mikroskopie byla použita pro studium schopnosti býčích spermií vázat se na čerstvé tkáň z urogenitálního traktu krávy. Provedení experimentu je popsáno v kap. 2.2.16.2, str. 39. Ze získaných dat je zde uveden obrázek vazby spermií na fukosidázou parciálně deglykosylovaný ovidukální epitel (Obr. 26, str. 60). Množství spermií navázaných na epitel bylo pro každý enzym a snímek spočítáno a výsledná data shrnutá do grafu (Obr. 26).

Všechny výsledné snímky jsou na přiloženém CD ve složce Mikroskopie.



Obr. 26 – Vazba spermií na ovidukální epitel a její ovlivnění parciální deglykosylací specifickými enzymy

Vlevo snímek epitelu vejcovodu krávy upravené fukosidázou (inkubace 5 hod) s navázanými býčími spermiemi značenými FITCem.

Vpravo graf závislosti počtu spermií (%) navázaných na tkáň oviduktu krávy v závislosti na inkubaci s enzymy α-galaktosidázou (α-gal), β-galaktosidázou (β-gal), fukosidázou (Fuc), neuraminidázou (Neur), PNGázou F (PNGáza) a po inhibici tekutinami oviduktu (inhib. TO)

Z grafu po porovnání s tkání bez enzymatického vlivu je patrný vliv chybějících koncových sacharidových struktur na vazbu spermie na tkáň zejména u PNGázy a neuraminidázy. Výrazné ovlivnění způsobují dále i enzymy α-galaktosidáza a β-galaktosidáza, naopak fukosidáza má vliv na vazbu minimální, téměř žádný.

Jako velmi výrazný inhibitor se prokázaly i tekutiny oviduktu. Počet navázaných spermií klesl o celých 70 %.

4 Diskuze

Setkání spermie s vajíčkem je výsledkem mnoha procesů. Dochází k němu v prostředí oviduktu, který celou událost moduluje. Spermie jsou po ejakulaci zachytávány v istmické části oviduktu, vytváří se zde rezervoár. Odtud jsou později řízeně uvolňovány již kapacitované spermie pro setkání s vajíčkem. Správná funkce oviduktu je velmi důležitá pro celý proces fertilizace. Prostředí oviduktu (tekutiny, které ovidukty vyplňují i epitel oviduktu) se podílí na selekci životaschopných, nepoškozených, akrosomově intaktních spermií, na načasování jejich kapacity a uvolnění [7].

Jednou z otázek, které jsme si kladli v této práci bylo, proč je právě ovidukt místem, kde se rezervoár spermií vytváří. Z předchozích experimentů víme, že děložní epitel vykazuje stejné sacharidové komponenty (D-galaktóza, D-manóza) jako glykoproteiny děložní tekutiny. Býčí semenná plazma i spermie mají afinitu k tekutinám dělohy, byť velmi malou (Obr. 17, str. 54 a kap. 3.3, str. 43) Důvodem, proč se spermie nenaváží již v děloze je, že tekutiny dělohy fungují jako výrazný inhibitor vazby spermií na děložní epitel [63].

Při přechodu děložního epitelu v oviduktální se však mění sacharidové epitopy (přechod děložního rohu ve vaječník). Projevem této změny je rozdílná afinita spermií k těmto epitelům (viz dále). Literatura popisuje některé mechanismy podílející se na tvorbě oviduktálního rezervoáru spermií u krávy. Například schopnost spermie (povrchových struktur spermie, resp. proteinů vázaných na plazmatickou membránu spermie) vázat D-galaktosylové a D-manosylové zbytky, které se vyskytují na epitelech oviduktu [64]. Jiná práce mluví o funkci β -fukosylových zbytků jako zprostředkovatelů této vazby [66], to se nám ale nepodařilo potvrdit.

Naše experimenty prokázaly, že oviduktální tekutiny, které jsou výrazným inhibitorem vazby spermií na oviduktální epitel, jsou však při průchodu oviduktem proteolyticky degradovány přítomnou proteázou (Mr 95 000). Produkty této degradace mají mnohem menší potenciál inhibovat vazbu spermií na epitel oviduktu (Obr. 19, str. 55). Autoprotolýza tekutin dělohy nebyla ověřována, protože tekutiny dělohy se skládají z autoprotolyzovaných tekutin oviduktu, které inhibují vazbu spermií na děložní epitel mnohem silněji, než na epitel oviduktální [65].

Naše výsledky ukazují, že tekutiny oviduktu obsahují sacharidy (7,7 % sacharidů metodou podle Dubois) a sialové kyseliny (1,4 %) (kap. 3.5, str. 46, kap. 3.6, str. 47). Také obsahují glykoproteiny s Mr 14 000 – 16 000, které jsou schopné vázat býčí semennou plazmu a tedy spermie (kap. 3.3.1, str. 45). Pro rozeznání epitelů oviduktu spermií jsou důležité jiné sacharidové komponenty než při vazbě oviduktální tekutiny na spermie (kap. 3.10, str. 51 a kap. 3.11, str. 56).

Byly sledovány interakce glykoproteinů tekutin oviduktu s býčí semennou plazmou ELBA metodou. Vazba byla inhibována D-galaktózou, D-manózou, kyselinou hyaluronovou, ovšem nejvýraznější snížení schopnosti vázat býčí semennou plazmu způsobil N-acetyl-D-glukosamin. Kyselina hyaluronová a terminální N-acetyl-D-glukosamin, D-galaktóza, D-manóza a tedy hrají důležitou roli ve vazbě na tekutiny oviduktu. Obdobné výsledky byly získány při sledování vazby parciálně deglykosylovaných glykoproteinů tekutin oviduktu na spermie průtokovou cytofluorimetrií (kap. 3.10, str. 51). Glykoproteiny oviduktálních tekutin inkubované s α -galaktosidázou vykazovaly největší změnu schopnosti vázat se na spermii. Na rozdíl od výsledků získaných ELBA metodou zde hexosaminidáza odštěpující N-acetylhexosamin žádný velký vliv na sledovanou interakci neměla (kap. 3.9, str. 50). Tento jev si vysvětlujeme faktem, že spermie může nést i jiné sacharid – rozpoznávací komponenty, které nejsou obsaženy v separované a studované býčí semenné plazmě.

Dále byly studii podrobeny epitelu oviduktu urogenitálního traktu krávy. Experimenty byly provedeny na izolované frakci i na čerstvých tkáních. V izolované frakci epitelů oviduktu bylo stanoveno 5,9 % sacharidů metodou podle Dubois a 0,52 % sialových kyselin (kap. 3.5, str. 46, kap. 3.6, str. 47). Sacharidové komponenty oviduktálního epitelu významné pro vazbu spermie byly identifikovány pomocí parciální enzymatické deglykosylace čerstvého epitelu a sledováním vazby spermii na takto modifikovaný epitel fluorescenční mikroskopií (kap. 3.11.4, str. 60). Afinitu spermii k modifikovanému epitelu nejvíce ovlivnila PNGáza, neuraminidáza a β -galaktosidáza. Získané výstupy z fluorescenční mikroskopie na tkáních byly také potvrzeny průtokovou cytofluorimetrií. Zde byla sledována vazba parciálně deglykosylovaných glykoproteinů izolovaných z epitelů oviduktu na býčí spermii (kap. 3.10, str. 51 a kap. 3.11, str. 56). Afinita epitelů oviduktu k spermii byla asi 1,2x větší než afinita tekutin oviduktu ke spermii, ale téměř 3x větší než afinita tekutin dělohy ke spermii (Obr. 15, str. 52).

Oproti tekutinám oviduktu se ukázalo, že při vazbě spermie na epitel hraje významnou roli terminální D-galaktosylové zbytky (Obr. 26, str. 60). Překvapivě velkou roli hrají neuraminové kyseliny (Obr. 18, str. 54) a také N-acetyl-hexosaminidylové terminální sacharidy (Obr. 18, str. 54). V našich experimentech se nepodařilo potvrdit v literatuře popsanou závislost vazby spermii do oviduktu na L-fukose [66].

Data získaná nejen v této diplomové práci ukazují, že tvorba oviduktálního rezervoáru spermii je dynamický proces ovlivňovaný celou řadou faktorů. Vazba spermii v isthmu je pravděpodobně umožněna tím, že zde jsou již tekutiny oviduktu autoprotolyzovány a nekompetují tedy s epitelem o vazebná místa na spermii (kap. 3.10.3, str. 55), protože tekutiny oviduktu jsou nesený proudem putujícím od ampulí vejcovodů k děloze a po celou dobu jsou

postupně autoprotolyzovány (kap. 3.10.3, str. 55). Kromě toho nabízejí epitely jiné specifické sacharidové komponenty, které umožňují lepší vazbu spermie.

V rezervoáru později probíhá proces kapacitace, kterým jsou pozměněny vazebné schopnosti povrchových proteinů spermie a pravděpodobně tato změna umožňuje spermii odpoutat se a vyrazit ve správný čas směrem k ovulovanému vajíčku.

Výše uvedené skutečnosti napomáhají pochopit mechanismus tvorby rezervoáru spermií v oviduktu krávy stejně jako mechanismus uvolňování spermií z rezervoáru a indikují potenciální význam pro veterinární praxi.

5 Závěr

- Byly izolovány preparáty z urogenitálního traktu krávy – tekutiny oviduktu, tekutiny dělohy, epitely oviduktu a epitely dělohy. Tyto preparáty byly lyofilizovány a části byly značeny biotinem a FITCem pro použití v dalších analýzách
- Izolované preparáty byly charakterizovány SDS – elektroforézou v denaturujícím prostředí, byla zde zjištěna přítomnost proteinů i glykoproteinů. Hlavní frakce proteinů má Mr cca 60 000, je glykosylována. Další majoritní frakce glykoproteinů má Mr cca 14 000 - 16 000.
- S tekutinami oviduktu a tekutinami dělohy byla provedena gelová chromatografie, eluent obsahující proteinové složky byl jímán a obsažené proteiny byly charakterizovány SDS – elektroforézou. Metodou gelové chromatografie bylo zjištěno, že velké molekuly s malými tvoří agregáty, které gelem putují dohromady a rozdělí se až v prostředí SDS – elektroforézy.
- S tekutinami oviduktu a tekutinami dělohy byla provedena afinitní chromatografie na imobilizované býčí semenné plazmě. Eluent obsahující proteinové složky byl jímán a rozdělené proteiny byly charakterizovány SDS – elektroforézou. Tekutiny dělohy i tekutiny oviduktu obsahovaly frakce s afinitou k býčí semenné plazmě a Mr mezi 14 000 a 16 000. Tyto BSP – vázající proteiny byly sekvenovány, bohužel zjištěna byla pouze blokáce jejich N- terminální aminokyseliny, nikoli aminokyselinová sekvence.
- Dále byla provedena stanovení charakterizující a porovnávající obsah sacharidů a sialových kyselin ve frakcích izolovaných z urogenitálního traktu krávy. Přítomnost sacharidů byla testována metodou podle Dubios. Největší koncentrace sacharidů byla zjištěna u lyofilizátu z tekutin oviduktu, jen o málo méně vykazaly epitely oviduktu. Největší koncentrace sialových kyselin byla také zjištěna u tekutin oviduktu.
- Byly studovány enzymatické degradace izolovaných frakcí z urogenitálního traktu krávy ve fyziologickém prostředí. Byla prokázána přítomnost proteolytických enzymů s Mr cca 95 000. Tyto enzymy byly úspěšně inhibovány jak přidavkem inhibitorů metaloproteáz, tak inhibitory serinových proteáz. U tekutin dělohy a oviduktu byla prokázána přítomnost kyselých fosfatáz, v obou co do aktivity podobná.
- ELBA metodou byly studovány inhibiční účinky L-fukózy, ovalbuminu, D-galaktózy, D-manózy, heparinu, N-acetyl-D-glukosaminu, chondroitin sulfátu, kyseliny hyaluronové, N-acetyl-D-galaktosaminu, fetuinu a mucinu z podčelistních žláz na vazbu

mezi tekutinami oviduktu a proteiny býčí semenné plazmy. Látkami, které vazbu téměř neovlivnily nebo jen velmi málo, jsou L-fukóza, ovalbumin, heparin, chondroitin sulfát, N-acetylgalaktosamin, fetuin a mucin z podčelistních žláz. Malé ovlivnění, snížení schopnosti BSP se vázat na TO asi o 20 % způsobily D-galaktóza, D-manóza a kyselina hyaluronová. Nejvýraznější snížení schopnosti vázat způsobil N-acetyl-D-glukosamin, snížil schopnost BSP navázat se na TO téměř o celých 50 %.

- Byla studována sacharidová specifita vazby tekutin oviduktu, tekutin dělohy a epitelů oviduktu na živou býčí spermii. Enzymatická modifikace těchto proteinů se projevila po analyzování vzorků průtokovým cytofluorimetrem. Největší vliv na vazbu tekutin dělohy na býčí spermii měl enzym β -galaktosidáza, i když v tomto případě bylo ovlivnění zanedbatelné. Výrazná změna afinity byla zaznamenána u tekutin oviduktu inkubovaných s α -galaktosidázou a největší změnu afinity vykazaly epitelové buňky oviduktu po inkubaci s neuraminidázou. Také byla ukázána změna afinity tekutin oviduktu k spermii po autoprotolýze a po přidání býčí semenné plazmy. Obě změny byly nepatrné.
- Sacharidová specifita byla potvrzena experimenty zahrnující fluorescenční mikroskopii. Enzymatická modifikace vazby byla detekována také na mikroskopických preparátech spermií s navázanými tekutinami oviduktu, dělohy a epitelové buňky oviduktu značenými FITCem. Data získaná průtokovým cytofluorimetrem tak byla potvrzena a dokumentována.
- Byla provedena studie sacharidové specifity vazby spermie přímo na čerstvou tkáň epitelu oviduktu zbavenou tekutin oviduktu. Epitelové buňky oviduktu byly modifikovány enzymy, poté obnaženy a inkubovány se spermii zbavenými býčí semenné plazmy. Analýza fluorescenčním mikroskopem ukázala, že po deglykosylaci epitelových buněk enzymem neuraminidázou se vazba spermie na epitel výrazně sníží. Obdobný účinek prokázala PNGáza, ale i α -galaktosidáza a β -galaktosidáza, naopak fukosidáza nemá vliv téměř žádný. Jako výrazný inhibitor se projevily po přidání k jedné sérii vzorků i tekutiny oviduktu.

Klíčová slova: Fertilizace, oviduktální rezervoár, oviduktální epitel, tekutiny oviduktu, tekutiny dělohy, býčí semenná plazma, býčí spermie

6 Literatura

1. Romanovský, A. a kol.: *Obecná biologie*, SPN, Praha (1988), 519-560
2. Kudláč, E.; Elečko, J. a kol.: *Veterinární porodnictví a gynekologie*, SZN, Praha (1987)
3. prof. MVDr. Ing. František Jílek, CSc. a kol.: *Biologické základy chovu hospodářských zvířat*, Česká zemědělská univerzita v Praze (2002)
4. Ivan Majzlík: *Chov zvířat I.*, Česká zemědělská univerzita, Agronomická fakulta (2003)
5. Wessells, N.K., Hopson, J.L.: *Animal Development*, v knize *Biology*, 1st edition, Random House, Inc., kapitola 16 (1988)
6. Stryer, L.: *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York (1995) – cit. dle 4.
7. Yanagimachi, R.: *The Physiology of Reproduction*, (Knobil, E. and Neil, J. et all, eds.) Raven Press, Ltd., New York , 135-172 (1988) – cit. dle 4.
8. Evans, J.P., Florman, H.M.: *Nature Cell Biology & Nature Medecine*, s57-s63, <http://www.nature.com/fertility/index.html#reviews>, (obr. 3 byl upraven)
9. Yanagimachi, R.: *Mammalian Fertilization*, v knize *The Spermatozoon*, v knize *The Physiology of Reproduction*, vol. 1, 2nd edition (Knobil, E., Neill, J.D.), Raven Press, Ltd., New York (1994)
10. Jiménez, I., Gonzalez-Marquez, H., Ortiz, R., Herrera, J.A., Garcii, A., Betancourt, M., Fierro, R.: *Theriogenology* 59(5-6), 1171-80 (2003)
11. Wassarman, P.M.: *Development* 108 (1), 1-17 (1990)
12. Wassarman, P.M.: *Mt. Sinai. J. Med.* 69(3), 148-55 (2002)
13. Töpfer- Petersen, E., Mann, K., Calvete, J.J.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 411-417 (1993)
14. Šmerha J. a kol.: *Biologie rozmnožování hospodářských zvířat*, SZN Praha (1964)
15. Mann, T., Lutwak-Mann, C.: *Male Reproductive Function and Semen*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (1981), (převzatý obr. 2 byl upraven)
16. Pěkníková, J., Kubátová, A., Sulimenko, V., Draberová, E., Viklický, V., Hozák, P., Dráber, P.: *Biol. Reprod.* 65(3):672-9 (2001)
17. Setchell, B.P., Maddocks, S., Brooks, D.E.: *Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract*, v knize *The Physiology of Reproduction*, vol. 1, 2nd edition (Knobil, E., Neill, J.D.), Raven Press, Ltd., New York (1994)
18. Badia, E., Briz, M.D., Pinart, E., Sancho, S., Garcia, N., Bassols, J., Pruneda, A., Bussalleu, E., Yeste, M., Casas, I., Bonet, S.: *Tissue Cell.* 38, 7-18 (2006)

19. Badia, E., Pinart, E., Briz, M., Pastor, L.M., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Bassols, J., Kadar, E., Pruneda, A., Bussalleu, E., Yeste, M., Bonet, S.: *Eur. J. Histochem.* 49 (2), 131-138 (2005)
20. Eddy, E.M., O'Brien, D.A.: The Spermatozoon, v knize *The Physiology of Reproduction*, vol. 1, 2nd edition (Knobil, E., Neill, J.D.), Raven Press, Ltd., New York (1994)
21. Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O., *Základy histologie*, sedmé vydání (Appleton & Lange, 1992), nakladatelství a vydavatelství H & H (ČR), kapitola 22 (1997)
22. Liberda, J.: Studium vazebných vlastností heparin vázajících proteinů z kančí a lidské semenné plazmy, diplomová práce, PřF UK, Praha (1996)
23. Markham, C.L., Coffey, D.S.R.: The male sex accesory tissues, v knize *The Physiology of Reproduction*, vol. 1, 2nd edition (Knobil, E., Neill, J.D.), Raven Press, Ltd., New York (1994)
24. Tulsiani, D.R., Abou-Haila, A.: *Zygote* 9(1), 51-69 (2001)
25. Yanagimachi, R.: *The Physiology of Reproduction*, vol. 1, 2nd edition (Knobil, E. and Neil, J.D., eds.) Raven Press, Ltd., New York (1994) – cit. dle 3.
26. Cooper, T.G.: *The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1986) – cit. dle 3.
27. Myles, D.G., Primakoff, P.: *Biol. Reprod.* 56, 320-327 (1997), cit. dle 7
28. Kraus, M.: Studium interakce spermadhesinů z kančí seminální plazmy se sacharidy, diplomová práce, PřF UK, Praha (1994)
29. Evans, J.P., Kopf, G.S.: *Andrologia* 30, 297-307 (1998)
30. Talbot, P.: *Am. J. Anat.* 174, 331-346 (1985)
31. Töpfer-Petersen, E.: *Arch. Tierz., Dummerstorf* 44 Special Issue, 114-117 (2001)
32. Töpfer-Petersen, E.; Romero, A.; Varela, P.F.; Ekhlasi-Hundrieser, M.; Dostálová, Z.; Sanz, L.; Calvete, J.J.: *Andrologia* 30, 217-224 (1998)
33. Tesařík, J.; Drahorád, J.; Pěkníková, J.: *Fertil.Steril.* 50, 133-141 (1988)
34. Dostálová, Z.: Proteiny lektinové povahy v semenné plazmě kance, diplomová práce, PřF UK, Praha (1991)
35. Maňásková, P., Balínová, P., Kraus, M., Tichá, M., Jonáková, V.: *AJRI* 50, 399-410 (2003)
36. Calvete, J.J., Sanz, L., Ensslin, M., Töpfer-Petersen, E.: *Reprod. Dom. Anim.* 31, 101-105 (1996)
37. Töpfer-Petersen, E.: *J. Exp. Zool* 15, 285(3), 259-66 (1999)
38. Calvete, J.J., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E.: *Ass. Reprod. Tech. Androl.* 6, 316-330 (1994)
39. Desnoyers, L., Manjunath, P.: *J. Biol. Chem.* 267 (14), 10149-55 (1992)

40. Calvete, J.J., Raida, M., Gentyel, M., Urbanke, C., Sany, L., Töpfer-Petersen, E.: FEBS Lett. 407 (2), 201-6 (1997)
41. Jonáková, V., Kraus, M., Veselský, L., Čechová, D., Bezouška, K., Tichá, M.: J. Reprod. Fertil 114, 25-34 (1998)
42. Maňásková, P., Mészárosová, A., Liberda, J., Voburka, Z., Tichá, M., Jonáková, V.: Folia Biol. (Praha) 45, 193-201 (1999)
43. Novotná, V., Mikeš, L., Horák, P., Jonáková, V., Tichá, M. J. Biochromatogr. 2, 37-47 (1996)
44. Jelínková, P., Ryšlavá, H., Liberda, J., Jonáková, V., Tichá, M.: Collect. Czech. Chem. Commun., 69, 616-630 (2004)
45. Leblond, E., Desnoyers, L., Manjunath, P.: Mol. Reprod. Dev. 34, 443 (1993)
46. Švesták, M.: Studium interakce proteinů semenné plazmy s fosforylcholinem, diplomová práce, PŘF UK, Praha (1994)
47. Gasset, M., Saiz, J.L., Laynez, J., Sanz, L., Gentzel, M., Topfer-Petersen, E., Calvete, J.: Eur. J. Biochem. 250, 735 (1997)
48. Maňásková, P.; Liberda, J.; Tichá, M.; Jonáková, V.: Folia Biol. (Praha) 46, 143-151 (2000)
49. Jonáková, V.; Maňásková, P.; Kraus, M.; Liberda, J.; Tichá, M.: Mol. Reprod. Dev. 56 (2. Suppl.), 275-277 (2000)
50. Suarez, S.S.: Regulation of Sperm Transport in the Mammalian Oviduct, v knize The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications, 1st edition (Gagnon, C.), Cache River Press, Saint Louis (1999)
51. Suarez, S., S.: Cell Tissues Organs 168, 105-112 (2001)
52. Merchán M, Peiró R, Santacreu MA, Francino O, Folch JM.; Mol Reprod Dev. 2007 Jun;74(6): 687-93
53. Suarez, S.: Cells Tissues Organs 168, 105-112 (2001)
54. Hendrix E, Hewetson A, Mansharamani M, Chilton BS.; Endocrinology. 2001 May;142(5):2151
55. Töpfer-Petersen, E.; Wagner, A.; Friedrich, J.; Petrunkina, A.; Ekhlesi-Hundrieser, M.; Waberski, D.; Drommer, W.: J. Exp. Zool. 292, 210-215 (2002)
56. Wagner, A.; Ekhlesi-Hundrieser, M.; Hettel, C.; Petrunkina, A.; Waberski, D.; Nimtz, M.; Töpfer-Petersen, E.: Mol. Reprod. Dev. 61, 249-257 (2002)
57. Petrunkina, A.; Friedrich, J.; Drommer, W.; Bicker, G.; Waberski, D.; Töpfer-Petersen, E.: Reproduction 122, 469-480 (2001)
58. Petrunkina, A.M., Gelhaar, R., Drommer, W., Warverski, D., Töpfer-petersen, E.: Reprod. 121, 889-896 (2001)

59. Fazeli, A., Duncan, A.E., Watson, P.F., Holt, W.: Biol. Reprod. 60, 879-886 (1999)
60. Töpfer-Petersen, E.: Hum. Reprod. Update. 5, 314-329 (1999)
61. Laemmli, U.K.: Nature 227, 680-685 (1970)
62. Prelovská, L.: Protein - sacharidové interakce podílející se na tvorbě oviduktálního rezervoáru spermií u prasnice, diplomová práce, PŘF UK, Praha (2006)
63. Mádlová, A.: Studium interakcí povrchových proteinů spermie býka s oviduktálními tekutinami, bakalářská práce, PŘF UK, Praha (2005)
64. Lefebvre R, Lo MC, Suarez SS.: Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition Biol Reprod, 56, 1198-204 (1997)
65. Prelovská L.: osobní sdělení (prezentováno na XII.sjezdu reprodukčních imunologů) (2006)
66. Igotz, G. G., Lo M. C., Perez, L. C., Gwathmey M. T., Suarez, S.S.: Biol. Reprod., 64: 1806-1811 (2001)