

UNIwersytet WarMińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Bioinżynierii Zwierząt



mgr inż. Anna Żmudzińska

**Wpływ wieku psa na zmiany w proteomie  
i parametrach jakości plemników  
najądrzowych poddanych sonikacji**

Rozprawa doktorska wykonana

w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt

*pod kierunkiem*

*dr hab. inż. Marzeny Mogielnickiej-Brzozowskiej, prof. UWM*

*oraz drugiego promotora*

*dr hab. inż. Magdaleny Zielińskiej, prof. UWM*

Olsztyn 2022

## Streszczenie

Przedłożona rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o wyniki uzyskane i zaprezentowane w cyklu dwóch publikacji naukowych. Pierwsze badanie miało na celu analizę proteomiczną wewnątrzkomórkowych i związanych z błoną frakcji plemników najądrzowych psa oraz dodatkowo określenie optymalnych parametrów sonikacji do separacji struktur morfologicznych plemników najądrzowych i izolacji białek plemników. Plemniki zostały pobrane od 15 psów, wyizolowano z nich następujące frakcje białkowe: wewnątrzkomórkowe (SIPs) oraz związane z błoną (SMAPs). Po sonikacji oceniano morfologię plemników przy użyciu Spermac Stain™. Frakcje białkowe plemników analizowano za pomocą elektroforezy żelowej (SDS-PAGE) i ultrasprawnej chromatografii cieczowej o nano przepływach połączonej z tandemową spektrometrią mas typu kwadrupol z analizatorem czasu przelotu (NanoUPLC-Q-TOF/MS). Identyfikacja oparta na bazie UniProt pozwoliła wyróżnić 42 białka zidentyfikowane jako SIPs i 153 białka zidentyfikowane jako SMAPs. W obu frakcjach wyodrębniono białka charakteryzujące się zróżnicowaną zawartością (DAPs). Na podstawie analizy ontologii genów określono dominujące funkcje molekularne. W przypadku SIPs były to: aktywność katalityczna (50%) i funkcja wiązania innych substancji (28%). Aktywność hydrolazowa (33%) i transferazowa (21%) były dominujące we frakcji SMAPs. Analiza bioinformatyczna SIPs i SMAPs wykazała ich udział w ważnych szlakach metabolicznych plemników najądrzowych, co może sugerować ich potencjał jako biomarkerów jakości nasienia.

Drugie badanie miało na celu określenie związku pomiędzy jakością funkcjonalną a proteomem plemników najądrzowych psów w różnym wieku. Badanie przeprowadzono na 30 samcach, które podzielono na trzy grupy wiekowe: G1 – 12 do 41 miesięcy, G2 – 42 do 77 miesięcy i G3 – 78 do 132 miesięcy. Próbkę plemników oceniano za pomocą komputerowego systemu analizy nasienia (CASA). Białka plemników najądrzowych analizowano za pomocą

SDS-PAGE, NanoUPLC-Q-TOF/MS i narzędzi bioinformatycznych. Parametry jakości nasienia były istotnie niższe u starszych psów. Identyfikacja NanoUPLC-Q-TOF/MS pozwoliła wyróżnić 865 białek w G1, 472 w G2 i 435 w G3. Wszystkie trzy grupy wiekowe charakteryzowały się obecnością siedmiu białek, a cztery z nich (ACTB, CE10, NPC2, CRISP2) wykazywały istotne zmiany zawartości wśród badanych grup.

W badaniach po raz pierwszy przedstawiono wyniki spektrometrii mas i analizy bioinformatycznej białek wewnątrzkomórkowych i związanych z błoną plemników najądrzowych psa. Dodatkowo zastosowano sonikację do separacji elementów morfologicznych plemników najądrzowych psa (główki, witki i akrosomu). Wyniki wskazują na obecność DAPs istotnych dla funkcji plemników i ich zdolności do zapłodnienia w obu analizowanych frakcjach białkowych. Ponadto wykryto zależne od wieku zmiany w składzie proteomu plemników, które były powiązane z ważnymi szlakami metabolicznymi, co może sugerować, że niektóre białka zaangażowane w dojrzewanie plemników mogą być potencjalnymi biomarkerami procesów starzenia.

UNIVERSITY OF WARMIA AND MAZURY IN OLSZTYN  
FACULTY OF ANIMAL BIOENGINEERING



Anna Żmudzińska, M.Sc.

**AGE RELATED CHANGES IN PROTEOME AND QUALITY  
PARAMETERS OF SONICATED DOG EPIDIDYMAL  
SPERMATOZOA**

Doctoral thesis conducted  
at the Department of Animal Biochemistry and Biotechnology  
*under the supervision of*  
*dr hab. inż. Marzena Mogielnicka-Brzozowska, prof. UWM*  
*and second supervisor*  
*dr hab. inż. Magdalena Zielińska, prof. UWM*

Olsztyn 2022

## **Abstract**

This PhD thesis was performed in two studies. The first study was provided for proteomic analysis of intracellular and membrane-associated fractions of canine (*Canis lupus familiaris*) epididymal spermatozoa and additionally to find optimal sonication parameters for the epididymal sperm morphological structure separation and sperm protein isolation. Sperm samples were collected from 15 dogs. Protein fractions (PFs): intracellular (SIPs) and membrane-associated (SMAPs) were isolated. After sonication, sperm morphology was evaluated using Spermac Stain™. The sperm PFs were analyzed using gel electrophoresis (SDS-PAGE) and nanoliquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry (NanoLC-Q-TOF/MS). UniProt database-supported identification resulted in 42 proteins identified in the SIPs and 153 proteins in the SMAPs. Differentially abundant proteins (DAPs) were found in SIPs and SMAPs. Based on a gene ontology analysis, the dominant molecular functions of SIPs were catalytic activity (50%) and binding (28%). Hydrolase activity (33%) and transferase activity (21%) functions were dominant for SMAPs. Bioinformatic analysis of SIPs and SMAPs showed their participation in important metabolic pathways in epididymal sperm, which may suggest their potential as sperm quality biomarkers.

The second study aimed to investigate the relationship between the functional quality and proteome of epididymal spermatozoa of dogs that were differing in age. The study was conducted on 30 male dogs that were divided into three age groups. G1 – 12 to 41 months old, G2 – 42 to 77 months old, and G3 – 78 to 132 months old. The sperm samples were assessed using a computer-assisted semen analysis (CASA). The epididymal sperm proteins were analyzed using SDS-PAGE, NanoUPLC-Q-TOF/MS and bioinformatic tools. The sperm quality parameters were significantly lower in older dogs. NanoUPLC-Q-TOF/MS identification resulted in 865 proteins that were found in the G1, 472 in G2, and 435 in G3.

There were seven proteins that were present in all three age groups, and four of them (ACTB, CE10, NPC2, CRISP2) showed significant changes among the studied groups.

The studies showed, for the first time, mass spectrometry and bioinformatic analysis of intracellular and membrane-associated proteins of canine epididymal spermatozoa. Additionally, sonication was used for the separation of dog epididymal sperm morphological elements (heads, tails and acrosomes). The results revealed the presence of DAPs in both sperm protein fractions significant for sperm function and fertilizing ability. Additionally, the age-dependent variations were detected in the sperm proteome composition and were related to important metabolic pathways, which might suggest that some proteins implicated in sperm maturation could be potential aging biomarkers.