

**UNIwersytet WarMińsko-Mazurski w Olsztynie**

**Wydział Bioinżynierii Zwierząt**



**mgr inż. Katarzyna Alicja Dyrda**

**ANALIZA FOSFOPROTEOMU  
NAJĄDRZOWEGO NASIENIA OGIERA**

Praca doktorska wykonana  
w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt  
pod kierunkiem dr hab. Pawła Wysockiego, prof. UWM  
Promotor pomocniczy: dr inż. Aleksandra Orzolek

**OLSZTYN 2020**

# ***STRESZCZENIE***

**Słowa kluczowe: fosforylacja białek, nasienie najądrzowe, ogier**

## **Analiza fosfoproteomu najądrzowego nasienia ogiera**

Koń domowy (*Equus caballus*) charakteryzuje się sezonowością rozrodu. Klacze wykazują objawy rujowe wraz z wydłużaniem się dnia świetlnego, natomiast aktywność układu rozrodczego ogiera obserwuje się w ciągu całego roku. Dostrzegalne są jednak różnice w jakości pozyskiwanego nasienia pomiędzy okresem określanym mianem sezonu rozrodczego tj. kwiecień-wrzesień, a miesiącami jesienno-zimowymi. Poza sezonem rozrodczym spada koncentracja, obniżają się parametry ruchliwości i żywotności plemników oraz zmniejsza się objętość ejakulatu. Niejednokrotnie w hodowli koni sportowych zdarzają się nagłe wypadki, które eliminują wybitne osobniki z dalszej hodowli. W związku z tym rośnie zainteresowanie wykorzystaniem plemników najądrzowych, będących rezerwuarem materiału genetycznego w inseminacji klaczy przeznaczonych do rozrodu. Analiza porównawcza ruchliwości oraz morfologii plemników najądrzowych i ejakulowanych nie wykazała istotnych różnic pomiędzy nimi, co daje możliwość wykorzystania materiału najądrzowego w przypadku nagłej śmierci wybitnych osobników lub w sytuacji przymusowej kastracji.

Najądrze ogiera dzieli się anatomicznie na trzy segmenty: głowę, która pełni głównie funkcję wydzielniczą, a znajdujące się w niej plemniki są fizjologicznie niedojrzałe i nie posiadają zdolności zapładniających oraz trzon i ogon najądrzy, które pełnią funkcję magazynu tych komórek. Specyficzne środowisko trzonu i ogona najądrzy utrzymuje żywotność plemników, chroni je przed uszkodzeniami wywoływanymi między innymi stresem oksydacyjnym, stanem zapalnym oraz temperaturą. Wszystkie zmiany biochemiczne i morfologiczne, jakim podlegają komórki rozrodcze w przewodzie najądrzy, określane są mianem dojrzewania najądrzowego. Dotyczą one reorganizacji w składzie lipidów i białek błonowych, które wynikają ze zmian rozmieszczenia lub usuwania niektórych komponentów podczas działania enzymów proteolitycznych, enzymów rozkładających reszty

oligosacharydowe oraz przyłączania białek syntetyzowanych de novo w najądrzach. Jedną z reakcji o szczególnie istotnej roli w procesie dojrzewania plemników jest fosforylacja białek znajdujących się w środowisku najądrzy. Fosforylacja jest procesem regulującym aktywność i funkcję polipeptydów. Ufosforylowane białka pełnią rolę regulatorów aktywności komórek, kontrolują ich metabolizm, wzrost czy apoptozę.

W dostępnej literaturze brak jest danych dotyczących intensywności fosforylacji białek nasienia najądrzowego ogiera, jak również nie ma informacji na temat identyfikacji fosfoprotein płynu i plemników najądrzowych. Stosując techniki proteomiczne podjęto badania, których celem była charakterystyka fosfoproteomu nasienia najądrzowego ogiera z uwzględnieniem różnych okresów sezonu reprodukcyjnego.

Materiał doświadczalny, czyli najądrza 12 ogierów ras gorąco krwistych, pozyskiwano podczas rutynowych zabiegów kastracji w dwóch okresach sezonu rozrodczego. Wyizolowane metodą chromatografii powinowactwa do jonów metali fosfoproteiny rozdzielano metodą elektroforezy 1D-PAGE, następnie poddawano identyfikacji z wykorzystaniem techniki spektrometrii mas NanoLC-MS/MS. Dodatkowo wykonano analizę stopnia fosforylacji białek przy pomocy metody immunoblottingu.

Analiza fosfoproteomu płynu najądrzowego pobranego w trakcie sezonu rozrodczego, przeprowadzona z wykorzystaniem elektroforezy jednokierunkowej, wykazała obecność 10 wspólnych frakcji dla każdego z segmentów najądrzy (o masach cząsteczkowych 76, 66, 58, 55, 49, 47, 44, 34, 31 i 22 kDa). Dwie frakcje występowały w głowie i trzonie najądrzy (136 i 92 kDa), natomiast jedną odnotowywano głównie w odcinku ogona najądrzy (116 kDa). Natomiast profile fosfopeptydów wyizolowanych poza sezonem rozrodczym wykazały obecność trzech fosfoprotein w głowie i trzonie najądrzy (136, 128 i 92 kDa). Ponadto 15 białek było obecnych we wszystkich segmentach najądrzy (76, 66, 58, 55, 49, 44, 34, 31, 29, 25, 24, 22, 19, 15 i 14 kDa). Wykazano również, że 14 frakcji ulega fosforylacji zarówno podczas jak i poza sezonem rozrodczym (136, 128, 116, 92, 76, 66, 58, 55, 53, 49, 47, 44, 38, 34, 31, 29, 25 i 24 kDa). Największą liczbę frakcji fosfoproteinowych wykazano w ekstraktach z plemników pobranych z głowy i trzonu najądrzy w sezonie i poza sezonem rozrodczym.

Z kolei poza sezonem rozrodczym zaobserwowano spadek liczby ufosforylowanych białek w każdym segmencie najądrzy. Zaobserwowano 28 frakcji fosfoproteinowych (280, 160, 150, 110, 100, 83, 75, 73, 70, 61, 57, 50, 48, 44, 41, 35, 32, 31, 29, 26, 25, 24, 23, 22, 17, 16, 15 i 12 kDa), których obecność była zróżnicowana między osobnikami i segmentami najądrzy.

Zidentyfikowane w niniejszej pracy białka, zwłaszcza enzymy antyoksydacyjne (m.in. ceruloplazmina, peroksyredoksyna -1, -2, -5, serotransferyna, S-transferaza glutationowa mu5) oraz białka szoku termicznego (HSP-70, HSP  $\beta$ 1,) pełnią istotną rolę w regulacji procesów reprodukcyjnych ogiera. Dotyczy to przede wszystkim ochrony układu rozrodczego przed reaktywnymi formami tlenu, regulacji procesu spermatogenezy oraz dojrzewania plemników w najądrzach. Charakterystyka fosfoproteomu nasienia najądrzowego ogiera może pomóc w wyjaśnieniu molekularnych mechanizmów regulujących procesy reprodukcyjne tego gatunku. Stanowi również uzupełnienie wiedzy z zakresu dojrzewania komórek rozrodczych zwierząt gospodarskich.

## ***SUMMARY***

**Key words: protein phosphorylation, epididymal semen, stallion**

### **Analysis of stallion epididymal semen phosphoproteome**

Reproductive cycle of the domestic horse (*Equus caballus*) is strongly characterized by seasonal breeding. Mares show oestrus symptoms during the prolonged daylight, while the activity of the stallion's reproductive system is observed throughout the year. However, there are noticeable differences in the quality of stallion's semen obtained from the period defined as the breeding season (April-September) and out of the breeding season (autumn and winter months). Out of the breeding season, sperm concentration, motility and viability parameters decrease, as well as the volume of ejaculate decreases. Repeatedly, during the sport horses breeding, sudden accidents eliminating valuable stallions from further breeding occur. Therefore, the interest in using the epididymal spermatozoa, which is a reservoir of genetic material is constantly increasing. The analysis of motility and morphology of epididymal and ejaculated spermatozoa did not show significant differences, which makes it possible to use the epididymal sperm in the event of a sudden death of a valuable stallion or forced castration.

Stallion's epididymis is anatomically divided into three segments. Spermatozoa located in the caput of epididymis, which provides mainly secretory functions, are immature and do not have an ability to fertilize the oocyte. Following segments of epididymis - corpus and cauda act as the sperm reservoir. The specific milieu of corpus and cauda epididymis maintain sperm viability, protect it from the oxidative stress, inflammation and temperature. All the biochemical and morphological changes that occur during the passage of spermatozoa through the epididymal duct are defined as the epididymal maturation. They relate to the reorganization of lipids and membrane proteins composition that arise from the change in the distribution or removal of some components during the action of proteolytic enzymes. Such enzymes can easily detach

oligosaccharide residues and attach de novo synthesized proteins to the sperm during its passage in the epididymis.

Protein phosphorylation is one of the most important reactions during the sperm maturation. This process regulates the activity and function of many polypeptides i.e. it regulates cell activity, controls cell metabolism, apoptosis and protein ubiquitination.

There is no data available in the literature concerning the intensity of phosphorylation of the stallion epididymal semen proteins. Moreover, there is no information about identified phosphopeptides from stallion's epididymal fluid and sperm extracts.

The aim of this study was to characterize phosphoproteome of stallion epididymal fluid and sperm extracts in two distinguished periods of breeding season with use of chosen proteomic techniques. The research material were epididymides obtained from 12 mature stallions during routine castration procedures. The phosphoproteins were isolated by immobilized metal-ion affinity chromatography, next they were separated by 1D-PAGE electrophoresis and finally identified by NanoLC-MS/MS mass spectrometry. Additionally, degree of phosphorylated state was analyzed by immuno- and western blot techniques.

Analysis of the 1D PAGE electropherograms of epididymal fluid phosphoproteins, obtained during the breeding season showed the presence of ten, common fractions for every of the epididymis segments (with molecular weights 76, 66, 58, 55, 49, 47, 44, 34, 31 i 22 kDa). Two fractions were present mainly in the caput and corpus (136, 92 kDa), whereas one was found mainly in the cauda of the epididymis (116 kDa). Phosphopeptide profiles, isolated out of the breeding season revealed the presence of three phosphoproteins in the caput and corpus of the epididymis (136, 128 i 92 kDa). In addition, fifteen proteins were present in each epididymal segment (76, 66, 58, 55, 49, 44, 34, 31, 29, 25, 24, 22, 19, 15 i 14 kDa). Fourteen phosphoproteins undergo phosphorylation both during and out of the breeding season (136, 128, 116, 92, 76, 66, 58, 55, 53, 49, 47, 44, 38, 34, 31, 29, 25 i 24 kDa). The highest number of phosphoproteins was found in sperm extracts from the caput and corpus regardless the reproductive season. Decrease in the number of phosphorylated proteins was observed in each segment out of the breeding season. Twenty-eight phosphoprotein fractions were

observed (280, 160, 150, 110, 100, 83, 75, 73, 70, 61, 57, 50, 48, 44, 41, 35, 32, 31, 29, 26, 25, 24, 23, 22, 17, 16, 15 i 12 kDa), which presence varied between individuals and epididymal segments.

The proteins identified in the hereby study, mainly antioxidative enzymes (i.e. ceruloplasmin, peroxiredoxin -1, -2, -5, serotransferrin, glutathione-s-transferase mu 5) and heat shock proteins (HSP 70, HSP  $\beta$ 1), play a crucial role in the regulation of stallion's reproduction processes. Their protective functions against the harmful products of redox reactions, regulation of spermatogenesis and sperm maturation in epididymis can be useful to explain the molecular mechanisms that regulate equine reproduction.