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. Próbki 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.