Analiza fosfoproteomów ejakulatów indorów (*Meleagris gallopavo*) o zróżnicowanej jakości biologicznej

mgr inż. Katarzyna Teresa Rafalska

Streszczenie

W przemysłowej hodowli indyków (*Meleagris gallopavo*) rozród odbywa się wyłącznie poprzez sztuczną inseminację w związku ze zbyt dużym dymorfizmem płciowym samców i samic tego gatunku. Dodatkowym utrudnieniem jest wykorzystanie do inseminacji jedynie nasienia świeżego, ponieważ wciąż nie ustalono optymalnego składu buforu pozwalającego na kriokonserwację nasienia indorów. Przy zbyt długiej ekspozycji na wysoką temperaturę mechanizmy termoregulacyjne ptaków mogą zostać przeciążone. W rezultacie może dojść do wystąpienia stresu cieplnego i zachwiania homeostazy organizmu. W populacji indorów około 10-16% osobników dotkniętych jest syndromem żółtego nasienia (YSS). Występowanie omawianego syndromu charakteryzuje się niższymi i/lub podwyższonymi wartościami wybranych parametrów ilościowych i jakościowych ejakulatów a także obecnością i/lub brakiem wybranych białek w nasieniu indorów. Użycie ejakulatów YSS podczas zabiegu sztucznego unasieniania prowadzi do obniżenia skuteczności zapładniania samic. Przyczyny występowania YSS nadal pozostają nieznane.

Celem niniejszej pracy była analiza fosfoproteomów plazm nasienia i plemników pochodzących z ejakulatów prawidłowych i z YSS podczas dwóch wyodrębnionych sezonów tj. wiosenno-letniego i jesienno-zimowego, którą poprzedzono dokładną analizą ilościową i jakościową ejakulatów.

W nasieniu świeżym dokonano pomiaru koncentracji i ruchliwości plemników oraz oceny ich żywotności, w tym integralności błon komórkowych w regionie akrosomowym, funkcjonalności mitochondriów, występowania zmian apoptotycznych oraz detekcji tlenku azotu w plemnikach. W plazmach nasienia oraz plemnikach przeprowadzono oznaczenia aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych – SOD, GPx, CAT oraz pomiar zawartości GSH i MDA. Dodatkowo w plazmach nasienia oznaczono zawartość białka całkowitego oraz zmierzono aktywność fosfatazy kwaśnej i alkalicznej. Ponadto z obu składowych nasienia wyizolowano białka ufosforylowane i rozdzielono je przy pomocy metod Native-PAGE, Tricine-PAGE, Urea-PAGE, SDS-PAGE oraz 2D-PAGE. Wybrane

fosfoproteiny, rozdzielone przy użyciu dwóch ostatnich technik, zidentyfikowano metodą Nano LC-MS/MS i/lub MALDI-TOF/TOF.

W ramach niniejszej pracy potwierdzono, że nasienie żółte indorów cechuje się obniżonymi parametrami jakościowymi w stosunku do nasienia białego. Po raz pierwszy wykazano, że sezon wpływa na wybrane parametry biologiczne i biochemiczne nasienia indorów. Statystycznie istotnie wyższe poziomy aktywności fosfataz kwaśnej i alkalicznej obserwowano w plazmach nasienia YSS oraz podczas sezonu jesienno-zimowego. Dowiedziono, że na profile ufosforylowania reszt serynowych i tyrozynowych białek wpływ mają zarówno występowanie syndromu żółtego nasienia jak i sezon. W nasieniu indorów zidentyfikowano łącznie 142 fosfoproteiny. Wśród nich występowały m.in. białka kodowane przez geny: UBB, RPS27A, SPATA18, CDC42, ACTN, TBB, ACTA, ODF2, GAPDH, PGAM, PGK, TPI, ALDOC, LDH, SDHA, FASN, APOA, CKM, GOT, CA, CALM, TRFC, FTH, HSPA, HSP, GST, PRDX, QSOX, ASTL, ANXA, ACR, GSN, VDAC oraz PLCZ1. Zidentyfikowane fosfoproteiny biorą m.in. udział w interakcji i wiązaniu się z plemnika z komórką jajową, procesie zapłodnienia, organizacji cytoszkieletu, metabolizmie plemników, transporcie wewnątrzkomórkowym oraz ustalaniu składów proteomów poszczególnych przedziałów komórkowych. Wykazano, że na stopień ufosforylowania omawianych białek wpływa rodzaj nasienia jak również trwający sezon.

Słowa kluczowe: indor, plazma nasienia, plemniki, nasienie białe, YSS, sezon, parametry biologiczne i biochemiczne ejakulatu, fosfoproteom nasienia