

# NABYWANIE ZDOLNOŚCI DO RUCHU PRZEZ PLEMNIKI WIĄŻE SIĘ ZE ZMIANAMI PROTEOMU JĄDROWEGO NASIENIA ODWRÓCONYCH SAMIC ORAZ NORMALNYCH SAMCÓW PSTRĄGA TĘCZOWEGO

Joanna Nynca<sup>1\*</sup>, Mariola Słowińska<sup>1</sup>, Sylwia Judycka<sup>1</sup>, Stefan Dobosz<sup>2</sup>, Andrzej Ciereszko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

<sup>2</sup>Zakład Hodowli Ryb Łososiowatych, Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

\*j.nynca@pan.olsztyn.pl

## WSTĘP

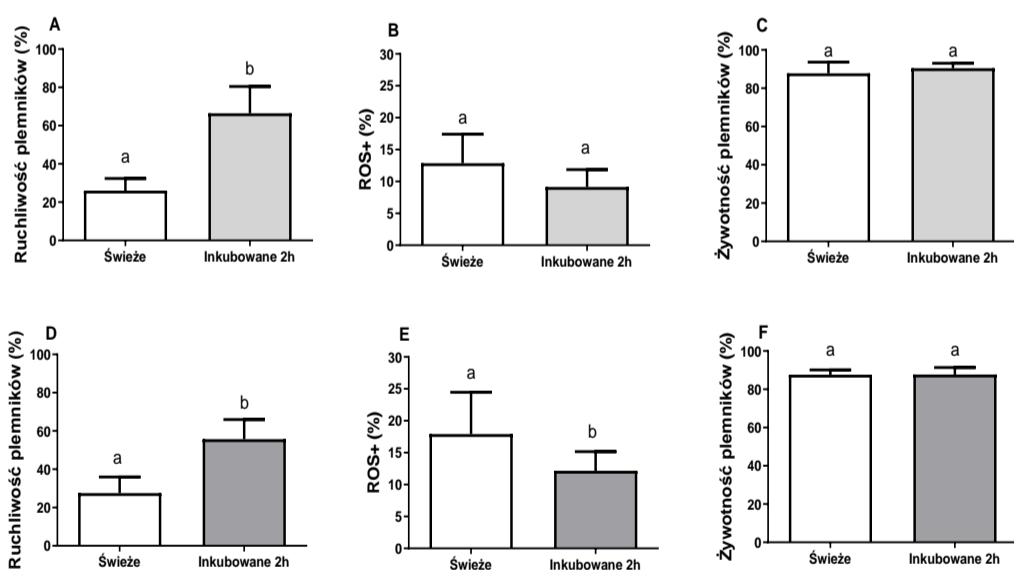
Plemniki jądrowego nasienia ryb łososiowatych nabywają zdolność do ruchu podczas przejścia z jąder do nasieniowodów. Ze względu na brak nasieniowodów u odwróconych samic (neosamców) ich nasienie przypomina nasienie jądrowe normalnych samców i należy je pobierać bezpośrednio z jąder; w związku z tym jest niedojrzałe i charakteryzuje się niską ruchliwością. Efekt nabycia zdolności do ruchu przez plemniki również można uzyskać poprzez inkubację *in vitro* niedojrzałego nasienia jądrowego w zbuforowanych roztworach soli fizjologicznej (ASP), imitujących naturalną plazmę nasienia o alkalicznym pH i zawierających jony wodorowęglanowe. Celem pracy było zbadanie wpływu dojrzewania nasienia *in vitro* na parametry jakości nasienia i profil białkowy plemników odwróconych samic (neosamców) oraz normalnych samców pstrąga tęczowego.

## MATERIAŁY I METODY

Przeprowadzono dwa niezależne eksperymenty (i) wpływ dojrzewania na zmiany w proteomie plemników neosamców (n=7) oraz (ii) wpływ dojrzewania na zmiany w proteomie plemników normalnych samców (n=6) pstrąga tęczowego. Próbkę 50 µg białka w dwóch wariantach (1) ekstrakt plemników nasienia świeżego, (2) ekstrakt plemników po 2 h inkubacji *in vitro* (inkubowane przez 2 h) rozpuszczono w buforze do znakowania fluorescencyjnego i znakowano barwnikami CyDye DIGE Fluor (GE Healthcare), a następnie przeprowadzono rozdział białek w pierwszym kierunku (izoelektroogniskowanie), następnie w drugim kierunku (SDS-PAGE). Po elektroforezie żele skanowano, analizowano przy użyciu oprogramowania DeCyder (GE Healthcare). Białka różnicujące wycinano, trawiono i identyfikowano przy pomocy spektrometru mas MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics). Parametry ruchu plemników badano za pomocą komputerowej analizy ruchu plemników (CASA). Poziomy reaktywnych form tlenu (ROS) w plemnikach oraz żywotność oszacowano przy użyciu Muse Cell Analyzer (Millipore).

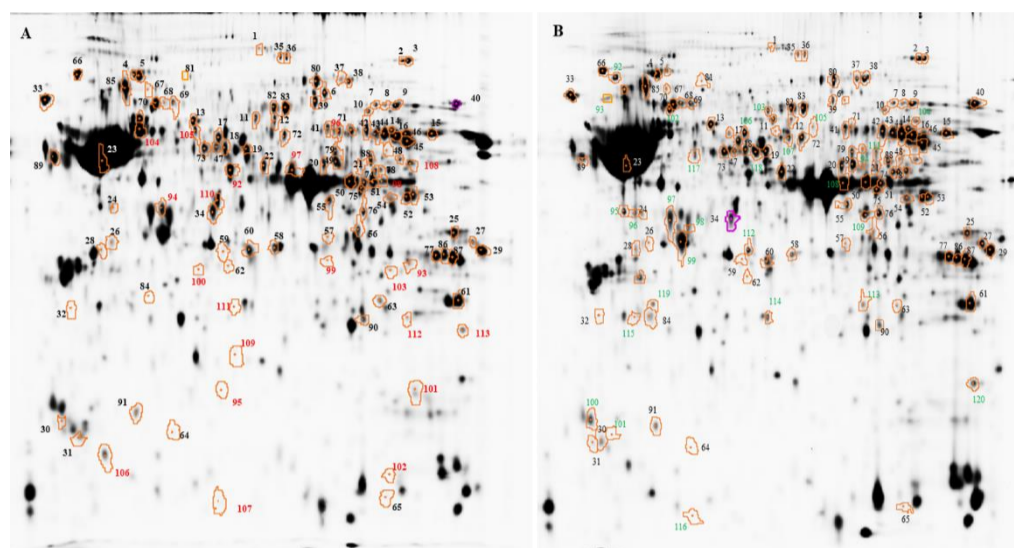
## WYNIKI

Dojrzewanie *in vitro*, zarówno u neosamców oraz normalnych samców wiązało się ze znacznym wzrostem odsetka ruchliwych plemników (z 26 do 66% i 28 do 56% odpowiednio dla neosamców i normalnych samców), spadkiem odsetka plemników ROS+ (z 12,9% do 9,1% dla neosamców i 17,9% do 12,2% dla normalnych samców), oraz brakiem wpływu na żywotność plemników (Rys. 1).



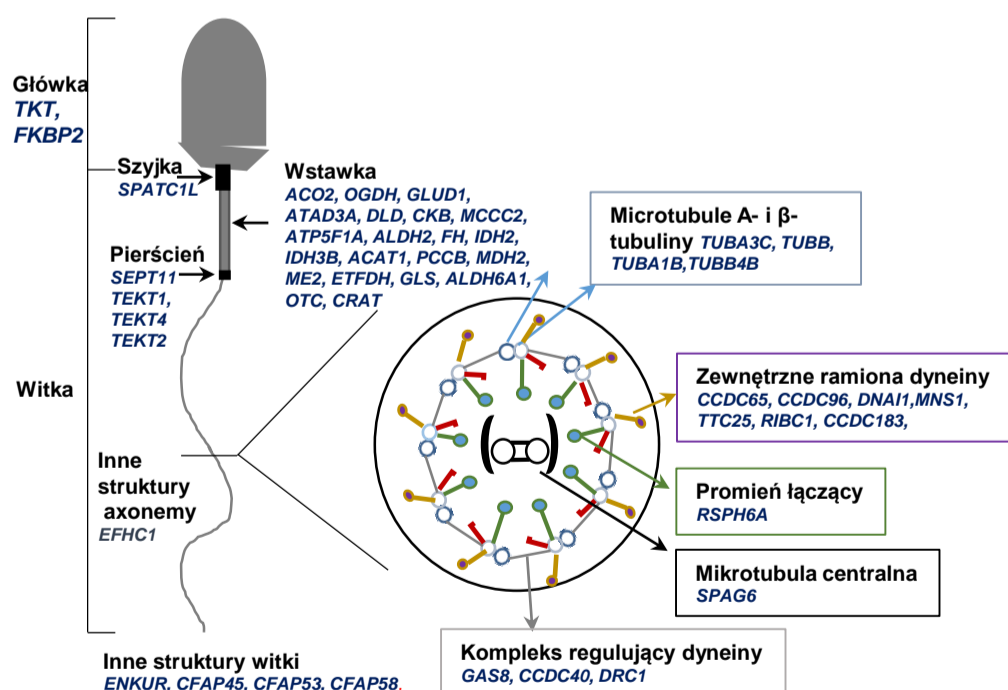
**Rys. 1.** Wpływ dojrzewanie *in vitro* nasienia jądrowego na ruchliwość plemników, zawartość komórek ROS+ oraz żywotność plemników w nasieniu neosamców (A-C)(n=7) i normalnych samców (D-F)(n=6) pstrąga tęczowego. Wyniki wyrażono jako średnie ± SD. Wartości oznaczone różnymi indeksami literowymi (a, b) różniły się od siebie statystycznie (P<0,05).

Dojrzewanie *in vitro* skutkowało zmianami w profilach białkowych plemników neosamców oraz normalnych samców. Zastosowanie metody 2D DIGE uwidoczniło więcej plam białkowych o zmienionej intensywności (126 plam białkowych) po uzyskaniu zdolności do ruchu przez plemniki normalnych samców w porównaniu do neosamców (116 plam białkowych)(Rys. 2).



**Rys. 2.** Dwukierunkowa elektroforeza różnicowa plemników A) neosamców oraz B) normalnych samców pstrąga tęczowego po 2h inkubacji *in vitro* w ASP. Plamy białkowe ponumerowane od 1-91 - plamy białkowe, których ekspresja zmieniła się po 2h inkubacji zarówno w plemnikach neosamców oraz normalnych samców. Plamy białkowe 92-113 zaznaczone na czerwono odpowiadają platom białkowym zmienionym tylko w plemnikach neosamców. Plamy białkowe 92-120 zaznaczone na zielono odpowiadają platom białkowym zmienionym tylko w plemnikach w normalnych męskich plemnikach po 2h inkubacji w ASP.

Większość zidentyfikowanych białek w plemnikach neosamców i normalnych samców, ulegających zmianie pod wpływem dojrzewania nasienia *in vitro* w ASP jest zaangażowanych w różnorodne szlaki i funkcje, tj. ruch i organizację cytoszkieletu, metabolizm i produkcję energii, fałdowanie białek i ich rozpad oraz wiązanie cząsteczek (Rys. 3).



**Rys. 3.** Zmiany w białkach strukturalnych i metabolicznych podczas dojrzewania plemników neosamców oraz normalnych samców *in vitro*.

## PODSUMOWANIE

Znaczące zmiany w proteomie nasienia w obrębie białek strukturalnych plemników związanych z ruchem, organizacją cytoszkieletu i witki, a także białek metabolicznych, wskazują na zmiany w aparacie ruchu plemników podczas sztucznego dojrzewania *in vitro* i jednocześnie wskazują na podobieństwa do zmian białek zachodzących podczas dłuższego procesu naturalnego dojrzewania nasienia. Podobne zmiany w parametrach jakości nasienia oraz profilu białkowym plemników neosamców oraz normalnych samców w wyniku inkubacji w ASP sugerują zbliżony mechanizm nabycia przez plemniki zdolności do ruchu. Uzyskane wyniki mogą mieć znaczenie dla praktyki wylęgarnicznej w zakresie zwiększenia wiedzy na temat charakterystyki nasienia neosamców i procesów związanych z jego dojrzewaniem.