WYKORZYSTANIE PROTEOMIKI W BADANIACH PODSTAWOWYCH I APLIKACYJNYCH NASIENIA KARPIA

APPLICATION OF PROTEOMICS IN CARP SEMEN EXAMINATION, BASIC AND APPLIED

Mariola DIETRICH, Andrzej CIERESZKO

Zakład Biologii Gamet i Zarodka,
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie

Streszczenie: Proteomika jest definiowana jako nauka zajmująca się proteomem, czyli komponentem białkowym, kodowanym przez genom. Dotychczasowe podejście metodyczne w badaniach składu białkowego plazmy nasienia ryb opierało się na oczyszczeniu pojedynczego białka przy użyciu technik chromatograficznych oraz na ich identyfikacji poprzez sekwencjonowanie metodą degradacji Edmana. Zidentyfikowano w ten sposób główne białka plazmy nasienia karpia. Wprowadzenie metod proteomicznych (elektroforeza dwukierunkowa, spektrometria mas) do badań nasienia ryb pozwoliło na identyfikację 186 białek w plazmie nasienia karpia i 348 białek w plemnikach karpia. Większość z opisanych białek zidentyfikowano po raz pierwszy dla tego gatunku. Jest to jak dotychczas największy zbiór opisanych białek dla nasienia karpia. Ilościowa porównawcza analiza proteomu osocza krwi i plazmy nasienia karpia przeprowadzona przy użyciu 2D-DIGE wykazała, że większość białek plazmy nasienia wykazuje podobieństwo do krwi, spośród 1220 plam białkowych, 99 białek było charakterystycznych dla plazmy nasienia. Ich występowanie jest najprawdopodobniej związane ze specyficzną funkcją jaką pełnią w układzie rozrodczym ryb tj. regulacja spermatogenezy i ruchliwości plemników, utrzymanie integralności błon plemników czy ochrona antyoksydacyjna plemników. Zastosowanie analiz proteomicznych pozwoliło na monitorowanie zmian w proteomie nasienia karpia powstałych w wyniku kriokonserwacji. Zidentyfikowano 186 białek uwalnianych z plemników po mrożeniu. Białka te mogą być potencjalnymi wskaźnikami uszkodzeń kriogenicznych plemników i/lub przydatności nasienia do kriokonserwacji.

Słowa kluczowe: karp, proteomika, nasienie, plemniki, kriokonserwacja

Summary: Proteomics is defined as the science dealing with the proteome, the protein component encoded by the genome. To date, the methodological approach for protein characterization in fish semen has been based on two major steps: purification of proteins using numerous liquid preparative chromato-

graphic methods and the identification of proteins using Edman sequencing. Purification of carp seminal proteins and their identification through sequencing has led to the identification of the major proteins of carp semen. The introduction of proteomic methods (two dimensional electrophoresis and mass spectrometry) for carp semen analysis allowed for the identification of 186 proteins in seminal plasma and 348 in spermatozoa. Most of the identified proteins were described for the first time for this species. This is, so far, the largest catalogue of carp semen proteins. The quantitative comparison of carp blood and seminal plasma proteome performed using 2D-DIGE revealed that the majority of seminal plasma proteins were similar to blood proteins. Out of 1220 protein spots, 99 proteins were specific to carp seminal plasma. Their presence is probably related to their specific function within the reproductive tract of fish, i.e. control of spermatogenesis and sperm motility, maintenance of sperm membrane integrity or sperm antioxidant protection. Application of the proteomic analysis allowed for monitoring the changes in the proteome of carp semen due to cryopreservation, resulting in the identification of 186 proteins released from the spermatozoa after freezing. These proteins may be potential indicators of sperm cryodamage and/or the usefulness of sperm for cryopreservation.

Key words: carp, proteomics, semen, spermatozoa, cryopreservation

CZYM JEST PROTEOMIKA

Proteomika jest nauką zajmującą się proteomem (ang. *PROTEin complement of the genOME*), czyli komponentem białkowym kodowanym przez genom. Proteom to zestaw wszystkich białek występujących w komórce, tkance czy organizmie, w określonym czasie. Analiza proteomu jest o wiele bardziej skomplikowana niż analiza genomu. Różnica wynika przede wszystkim z faktu, że liczba genów występująca w ludzkim organizmie jest stała i szacuję się, że wynosi ok. 20-25 tyś., natomiast liczba i rodzaj białek zmieniają się w zależności od stanu fizjologicznego organizmu, jego fazy rozwoju oraz warunków środowiska. Ponad to liczba białek znacznie przewyższa liczbę genów. Obecnie ocenia się, że w ludzkim organizmie jest ich ponad milion, czyli prawie czterdzieści razy tyle co genów. Wiąże się to ze zjawiskiem alternatywnego składania genów oraz modyfikacjami potranslacyjnymi zachodzącymi w trakcie ekspresji genów, które wpływają na ostateczną strukturę i funkcję białka (ryc. 1).

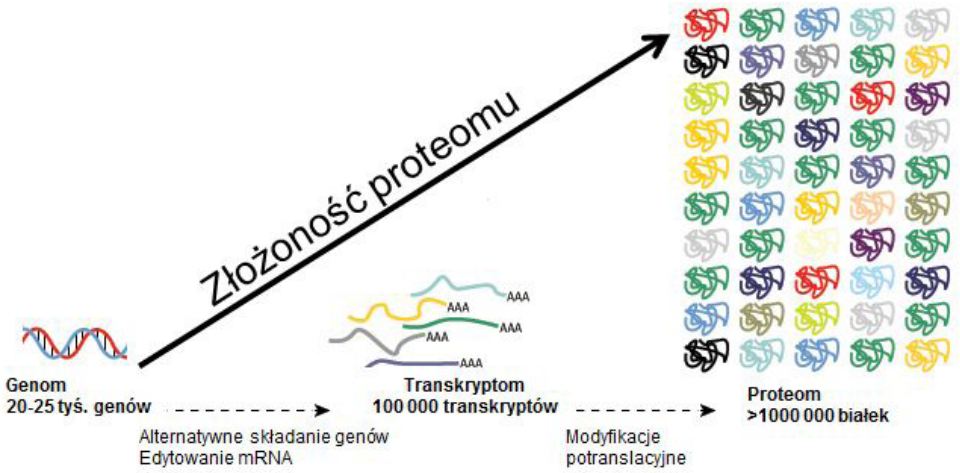
STRATEGIE BADAWCZE W ANALIZACH PROTEOMICZNYCH

Sposób analizy proteomu różni się znacząco od klasycznego podejścia z użyciem technik biochemicznych, za pomocą których staramy się izolować i identyfikować pojedyncze białka i szczegółowo opisywać ich właściwości oraz funkcję. Proteomika natomiast łączy szereg technik służących do równoczesnej analizy wszystkich białek (setek lub tysięcy) uczestniczących w poszczególnych szlakach biochemicznych, zawartych w komórkach, organellach, tkankach i narządach dostarczając bardzo dokładnych i kompleksowych informacji. Warto zaznaczyć, że

proteomika umożliwia nie tylko identyfikację składu białkowego ale przede wszystkim poszukiwanie różnic w ekspresji białek oraz ich modyfikacji potranslacyjnych w określonych warunkach (np. w stanach chorobowych, w odpowiedzi na czynniki środowiska). Do najczęściej występujących modyfikacji zalicza się: sulfatację, fosforylację, hydroksylację, metylację, glikozylację oraz ubikwitynację.

W proteomice, stosuje się głównie metody polegające na rozdziale białek na żelu przy użyciu elektroforezy dwukierunkowej (2DE) i ich identyfikacji z zastosowaniem spektrometrii mas (MS) lub metody typu „shotgun" z trawieniem białek za pomocą enzymów proteolitycznych bezpośrednio w roztworze lub w żelu, a następnie rozdziale mieszaniny uzyskanych peptydów za pomocą chromatografii cieczowej w połączeniu z identyfikacją przy użyciu MS. Zastosowanie w ostatnich latach barwników fluorescencyjnych takich jak Cy3 czy Cy5 do znakowania badanych prób zwiększyło czułość metody 2DE, pozwalając identyfikować białka występujące w stężeniu sięgającym femtogram oraz umożliwiło rozdział wyznakowanych odmiennie prób na tym sam żelu. Użycie barwników fluorescencyjnych w elektroforezie dwukierunkowej (dwukierunkowa elektroforeza różnicowa 2D-DIGE) pozwala na zniwelowanie przesunięć plamek białkowych, a tym samym znacząco ułatwia porównywanie uzyskanych profili białkowych badanych prób.

Wprowadzenie metod proteomicznych do badań nasienia karpia pozwoliło na kompleksową analizę białek (proteomu) nasienia oraz na szersze spojrzenie na procesy zachodzące w męskim układzie rozrodczy tego gatunku.



RYCINA 1. Schematyczne przedstawienie złożoności proteomu powstałej w wyniku alternatywnego składania genów, edytowania mRNA oraz modyfikacji potranslacyjnych. Źródło: schemat opracowano na podstawie http://www.piercenet.com/method/overview-post-translational-modification

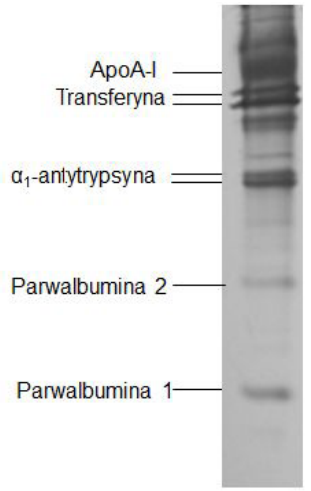
FIGURE 1. Schematic presentation of the proteome complexity increases resulting from alternative splicing, RNA editing and post-translational modifications. Source: The scheme was created based on http://www.piercenet.com/method/overview-post-translational-modification

IDENTYFIKACJA POJEDYNCZYCH BIAŁEK NASIENIA KARPIA

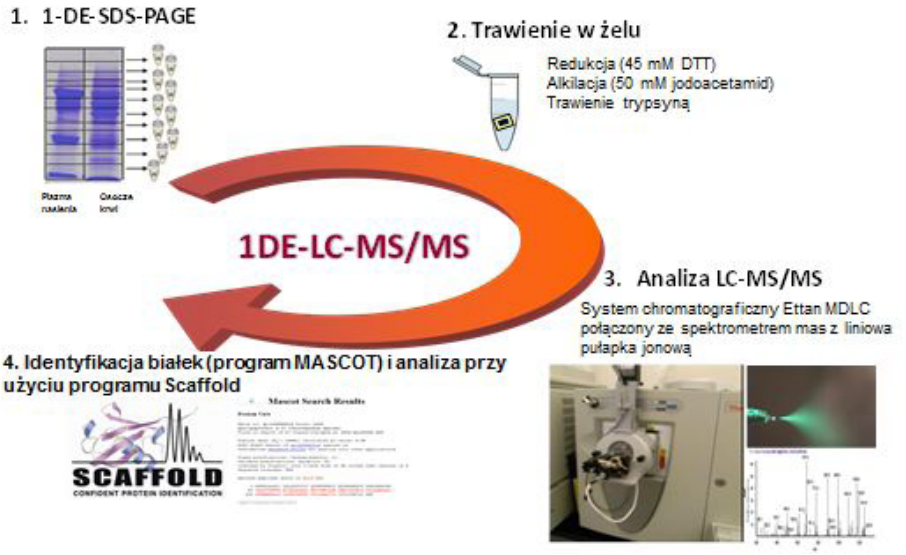
Dotychczasowe podejście metodyczne w badaniach składu białkowego plazmy nasienia ryb opierało się na oczyszczeniu pojedynczego białka przy użyciu licznych technik chromatograficznych i elektroforetycznych oraz na ich identyfikacji poprzez sekwencjonowanie od N-końca metodą degradacji Edmana. Na podstawie uzyskanej sekwencji aminokwasowej i przeszukiwaniu baz danych BLAST identyfikowano wyizolowane białka. Prowadzone przez Zakład Biologii Gamet i Zarodka prace izolacyjne pozwoliły na wyizolowanie i identyfikację głównych białek plazmy nasienia karpia takich jak inhibitor proteinaz serynowych należący do rodziny serpin [14], transferyna (TF) [10, 15], parwalbumina (PV) [8, 9] oraz apolipoproteiny A (ryc. 2) [2]. Identyfikacja tych białek pozwoliła na lepsze zrozumie funkcji jaką pełni plazma nasienia ryb. Zidentyfikowane inhibitory proteinaz serynowych (α_1-antyproteinaza) są prawdopodobnie zaangażowane w regulację spermatogenezy oraz ochronę plemników i tkanek układu rozrodczego przed niekontrolowaną proteolizą [1, 14]. Transferyna zaś jest białkiem wielofunkcyjnym, które oprócz transportu jonów żelaza posiada właściwości antyoksydacyjne i antybakteryjne. Ostatnio wykazano, że TF może także chronić plemniki karpia przed toksycznym działaniem kadmu [6]. Sugeruje się, że PV może brać udział w mechanizmie aktywacji ruchu plemników karpia, w którym pośredniczą jony wapniowe [8, 9]. Wykazano także, że apolipoproteiny A, obecne w dużych ilościach w plazmie nasienia karpia posiadają właściwości antybakteryjne i mogą uczestniczyć w ochronie plemników i tkanek układu rozrodczego przed atakiem drobnoustrojów [2].

SCHEMATY POSTĘPOWANIA METODYCZNEGO W ANALIZACH PROTEOMICZNYCH NASIENIA KARPIA

W chwili obecnej większość badań proteomicznych nasienia dotyczy wyższych kręgowców, takich jak człowiek czy mysz. Niewiele jest informacji dotyczących badań proteomicznych nasienia karpia. W ostatnich latach techniki proteomiczne (2DE) zastosowano w badaniu wpływu kriokonserwacji na proteom plemników karpia [12]. Zidentyfikowano wówczas około 10 białek plemników karpia ulegających zmianie w wyniku mrożenia. W naszych ostatnich badaniach zastosowanie technik proteomicznych (metoda shotgun oraz 2D-DIGE) po raz pierwszy pozwoliło na kompleksową analizę składu białkowego nasienia karpia i stworzenie listy białek plazmy nasienia i plemników karpia oraz identyfikację licznych białek specyficznych dla plazmy nasienia. Ponadto przeprowadzono kompleksową analizę zmian zachodzących w proteomie nasienia karpia pod wpływem kriokonserwacji.



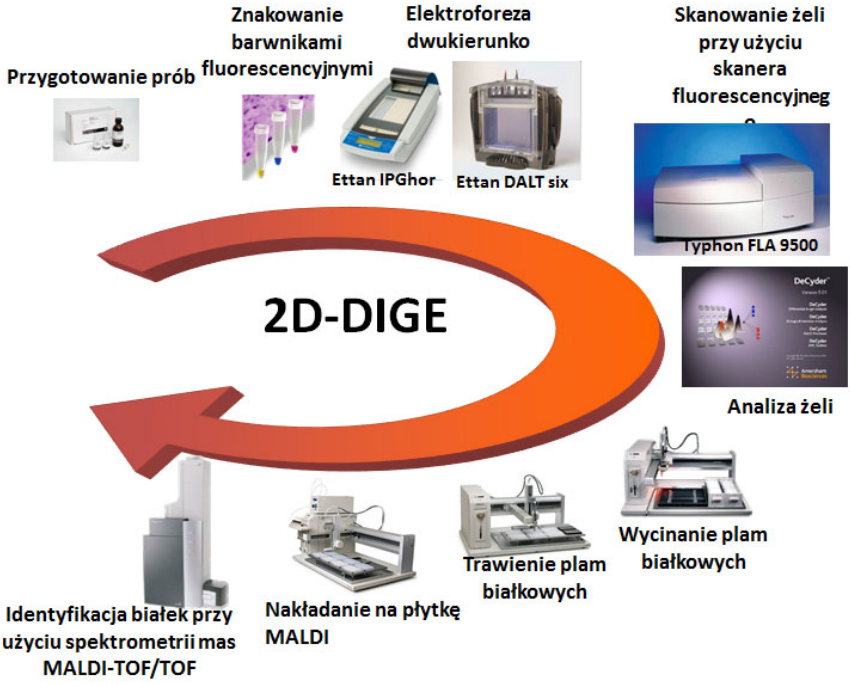
RYCINA 2. Profil białkowy plazmy nasienia karpia uzyskany po jednokierunkowej elektroforezie z zaznaczonymi zidentyfikowanymi do tej pory białkami (ApoA-I, transferyna, α_1-antytrypsyna, parwalbumina)
FIGURE 2. Profile of carp seminal plasma proteins obtained after one-dimensional electrophoresis with marked proteins that have been identified to date (ApoA, transferrin, α_1-antitrypsin, parvalbumin)



RYCINA 3. Ogólny schemat postępowania stosowany w analizach składu białkowego plazmy nasienia i plemników karpia przy użyciu spektometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową (LC-MS/MS)
FIGURE 3. A general workflow used for analysis of the carp seminal plasma and spermatozoa protein composition using mass spectrometry coupled with liquid chromatography (LC-MS/MS)

ANALIZA TYPU „SHOTGUN”

W celu przeprowadzenia kompleksowej identyfikacji proteomu plazmy nasienia i plemników karpia wykorzystano metodę proteomiczną typu „shotgun” z użyciem elektroforezy jednokierunkowej (1DE) w połączeniu ze spektometrią mas sprzężonej z chromatografią cieczową (1DE-LC-MS/MS, ryc. 3). W pierwszym etapie próby rozdzielano względem mas przy użyciu elektroforezy 1D-SDS-PAGE, frakcjonowano i poddano trawieniu trypsyną w żelu. Białka identyfikowano z użyciem tandemowego spektrometru mas z liniową pułapką jonową (LTQ) sprzężonego z HPLC (kolumna C18). Otrzymane widma masowe przeszukiwano w bazach danych sekwencji białkowych w programie MASCOT. Uzyskane wyniki analizowano w programie Scaffold (Proteome Software), który pozwolił na utworzenie listy białek plazmy nasienia i plemników karpia.



RYCINA 4. Ogólny schemat postępowania stosowany w analizach porównawczych plazmy nasienia i osocza krwi karpia oraz określenia wpływu kriokonserwacji na profil białkowy nasienia karpia przy użyciu metody 2D-DIGE

FIGURE 4. A general workflow used in the comparative analysis of carp seminal and blood plasma or fresh and cryopreserved semen using the 2D-DIGE method

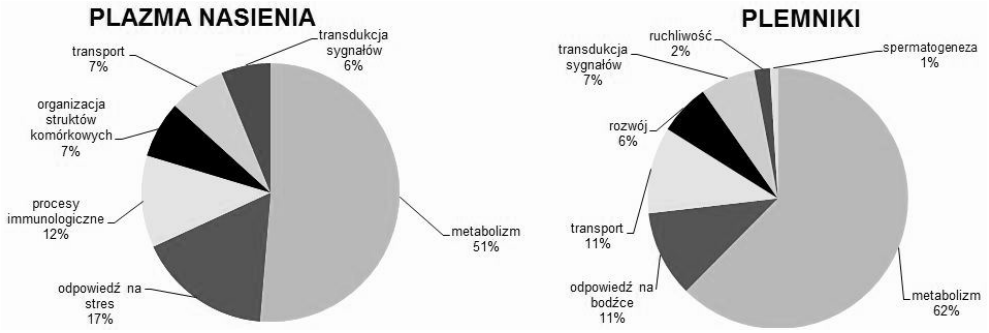
ELEKTROFOREZA 2D-DIGE

Do analiz porównawczych plazmy nasienia i osocza krwi oraz badania wpływu kriokonserwacji na proteom nasienia karpia użyto elektroforezy 2D-DIGE, która umożliwia ilościową analizę różnicową ekspresji białek w badanym materiale (ryc. 4). W pierwszym etapie próby są znakowane barwnikami fluorescencyjnymi (Cy2, Cy3, Cy5) i poddane elektroforezie dwukierunkowej z wykorzystaniem Ettan IPGphor 3, Ettan DALT six. Żele są następnie skanowane przy użyciu skanera fluorescencyjnego Typhon FLA 9500. Uzyskane elektroforegramy proteomu plazmy nasienia i osocza krwi oraz plazmy nasienia świeżego i supernatantu po mrożeniu, które składają się z kilkudziesięciu, kilkuset plam odpowiadających poszczególnym białkom lub ich formom, są poddane analizie porównawczej przy użyciu programu DeCyder, w celu identyfikacji spotów białkowych specyficznych dla plazmy nasienia lub spotów białkowych pojawiających się w supernatancie po mrożeniu. Wyselekcjonowane spoty wycinane są z żelu (Ettan Spot Picker), trawione (Ettan Digester), nanoszone na matryce MALDI TOF/TOF (Ettan Spotter) i identyfikowane z użyciem spektrometru mas typu MALDI-TOF-TOF. Zastosowanie spektrometru mas pozwala na identyfikację badanych białek na podstawie mas uzyskanych peptydów.

CHARAKTERYSTYKA PROTEOMU NASIENIA KARPIA

ANALIZA PROTEOMICZNA PLAZMY NASIENIA KARPIA

Zastosowanie metody „shotgun" (ryc. 3) pozwoliło na kompleksową analizę proteomu plazmy nasienia karpia. Badania te doprowadziły do identyfikacji 186 białek, większość z których opisano po raz pierwszy dla tego gatunku. Jest to dotychczas największy zbiór opisanych białek dla plazmy nasienia karpia [4]. Ponadto wyróżniono główne białka plazmy nasienia tj. TF, apolipoproteiny A, białka układu dopełniacza, inhibitory proteinaz serynowych, białka szoku cieplnego (HSP90) oraz białko aklimatyzacji do ciepłych temperatur. Klasyfikacja zidentyfikowanych białek pod względem kryterium „procesy biologiczne" wykazała ich dominujący udział w metabolizmie (51%), w odpowiedzi na stres (17%) oraz procesach immunologicznych (12%, ryc. 5). Podział pod względem „funkcji molekularnych" pokazał, że 44% białek posiada aktywność katalityczną (wyróżniono ligazy, hydrolazy, oksydoreduktazy, transferazy, izomerazy) zaś 36% posiada funkcje wiążące (jony wapnia, DNA, tłuszcze).



RYCINA 5. Klasyfikacja zidentyfikowanych białek plazmy nasienia i plemników karpia pod względem procesów biologicznych
FIGURE 5. Classification of identified proteins of carp seminal plasma and spermatozoa, defined according to the biological processes

ANALIZA PROTEOMICZNA PLEMNIKÓW KARPIA

Plemnik to specyficzna i wysoce wyspecjalizowana haploidalna komórka, zawierająca minimalne ilości cytoplazmy oraz skondensowane DNA. Uważa się, że plemniki są nieaktywne transkrypcyjnie, w związku z czym ich proteom jest bardziej statyczny co umożliwia dokładne poznanie ich składu białkowego przy użyciu metod proteomicznych.

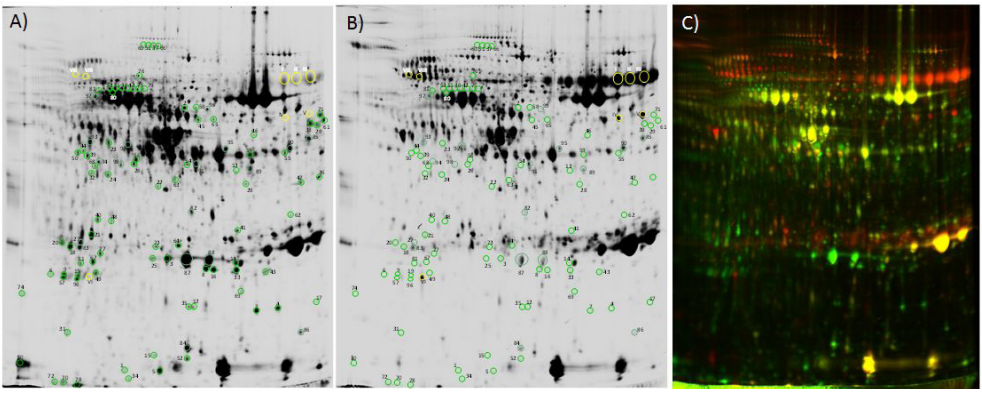
Stosując podejście typu „shotgun" zidentyfikowano 348 białek plemników karpia [3]. Na podstawie kryterium „procesy biologiczne" białka zostały zakwalifikowane jako uczestniczące w metabolizmie (62%), odpowiedzi na bodźce (11%), transporcie (11%), transdukcji sygnałów (7%), ruchliwości (2%) oraz spermatogenezie (1%) (ryc. 5). Wykazano, że większość białek posiada aktywność enzymatyczną (44%; hydrolazy, oksydoreduktazy, transferazy, izomerazy, ligazy, inhibitory proteinaz) oraz posiada funkcje wiążące (41%; w większości nukleotydy i jony metali).

PORÓWNANIE OSOCZA KRWI I PLAZMY NASIENIA

Określenie związku pomiędzy osoczem krwi i plazmą nasienia ryb jest istotnym zagadnieniem dotyczącym fizjologii męskiego układu rozrodczego i pozwala na określenie pochodzenia białek plazmy nasienia. Związane z tym tematy obejmują: poznanie selektywności bariery krew-jadro, określenie związku pomiędzy układem rozrodczym i innymi tkankami oraz specyfiki układu rozrodczego. Nasze wcześniejsze badania dotyczące porównania plazmy nasienia i osocza krwi karpia,

przeprowadzone przy użyciu elektroforezy jednokierunkowej (1-DE), wykazały że większość białek tj. TF, ApoA-I, α1-antytrypsyna, jest wspólna dla obu płynów ustrojowych [10, 14, 15]. Wyselekcjonowano tylko dwa białka jako specyficzne dla nasienia: PV oraz inhibitor proteinaz serynowych typu Kazal [7, 8, 9].

Ilościowa porównawcza analiza osocza krwi i plazmy nasienia przeprowadzona przy użyciu metody 2D-DIGE wykazała, że większość białek plazmy nasienia wykazuje podobieństwo do krwi. Spośród 1240 spotów, 1014 spotów było wspólnych dla plazmy nasienia i osocza krwi, 99 spotów białkowych specyficznych dla plazmy nasienia i 127 specyficznych dla osocza krwi (ryc. 6) [10]. Spośród 99 spotów białkowych charakterystycznych dla plazmy nasienia zidentyfikowano 63 spoty jako parwalbuminę, ApoA-I, ApoE, NKEF, kofilinę, białka szoku termicznego HSP90, białka antyoksydacyjne, katepsynę oraz białka strukturalne plemnika. Większość z tych białek występowała w postaci licznych proteoform (10 proteoform ApoE czy 8 proteoform ApoA-I). Jak wspomniano powyżej, ApoA-I została sklasyfikowana na podstawie 1DE jako białko wspólne dla obu płynów ustrojowych. Dopiero, zastosowanie 2D-DIGE oraz 2DE wykazało, że istnieją zarówno proteoformy ApoA-I wspólne dla nasienia i krwi oraz proteoformy specyficzne tylko dla nasienia (ryc. 7).



RYCINA 6. Fluorescencyjna elektroforeza różnicowa (2D-DIGE) plazmy nasienia (A) i osocza krwi (B) karpia z zaznaczonymi 116 spotami (1-116) o wyższej intensywności w plazmie nasienia w porównaniu do krwi. Zaznaczone spoty białkowe zostały wycięte z żelu, poddane trawieniu trypsyną i zidentyfikowane z użyciem spektrometrii mas (MALDI-ToF). C – obraz uzyskany po nałożeniu map proteomicznych plazmy nasienia i osocza krwi. Spoty czerwone dominują w osoczu krwi, spoty zielone dominują w plazmie nasienia

FIGURE 6. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) of carp seminal (A) and blood (B) plasma with the selected 116 spots (1-116) of higher intensity in the seminal plasma compared to the blood plasma. The selected spots were picked from the gel, digested and identified using mass spectrometry (MALDI-TOF). C – overlay of carp seminal and blood plasma profile. The red spots represent proteins that are more abundant in blood plasma; the green spots represent proteins more abundant in seminal plasma

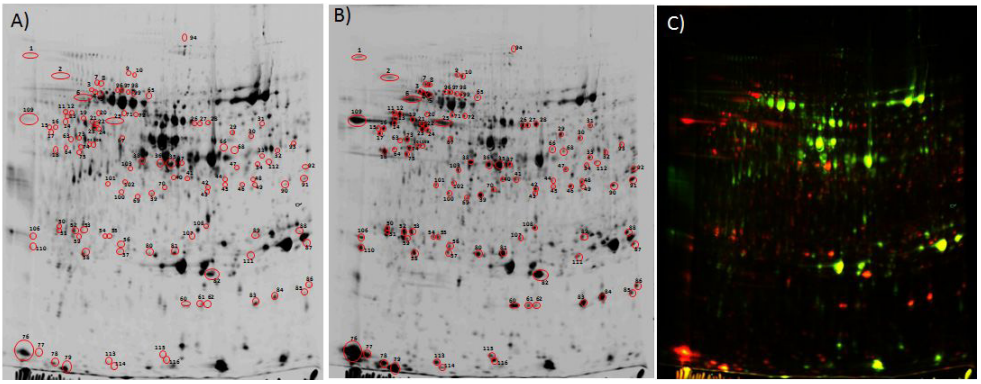
RYCINA 7. Porównanie profili białkowych apolipoproteiny A plazmy nasienia i osocza krwi karpia przy użyciu metody jednokierunkowej (1DE) oraz dwukierunkowej 2DE.
FIGURE 7. Comparison of the aplipoprotein A protein profile from carp seminal and blood plasma using one-dimensional (1DE) and two-dimensional (2DE) electrophoresis

Występowanie białek specyficznych dla nasienia związane jest z funkcją jaką mogą pełnić w układzie rozrodczym ryb tj. w regulacji spermatogenezy i ruchliwości plemników, utrzymaniu integralności błon plemników czy ochronie antyoksydacyjnej plemników. Uzyskane wyniki wskazują, że białka wspólne dla krwi i plazmy nasienia mogą pochodzić z krwi, zaś białka specyficzne dla nasienia najprawdopodobniej ulegają ekspresji na obszarze układu rozrodczego. Ponadto obecność białek specyficznych dla krwi, które nie występują w plazmie nasienia wskazuje na selektywność bariery krew-jądro.

ANALIZA PROTEOMICZNA ZMIAN W PROFILU BIAŁKOWYM NASIENIA KARPIA PO KRIOKONSERWACJI

Kriokonserwacja nasienia umożliwia długookresowe przechowywanie genomów osobników z cennych linii hodowlanych, uzyskanych na drodze wieloletnich prac selekcyjnych lub w wyniku manipulacji hormonalnych i chromosomowych a także pozwala na zabezpieczenia nasienia wolnego od chorób. Od kilkunastu lat tworzone są banki nasienia ryb, w Polsce chroni się materiał genetyczny np. linii karpia [11]. Jednakże w wyniku kriokonserwacji dochodzi do zmian subletalych takich jak uszkodzenie plazmalemmy czy DNA, które skutkują obniżoną ruchliwością oraz zdolnością zapładniającą nasienia po mrożeniu. W wyniku uszkodzenia błony plemników dochodzi do wycieku białek. Wyciek ten jest najczęściej sprawdzany poprzez pomiar aktywności enzymów plemnikowych takich jak arylosulfataza czy dehydrogenaza mleczanowa, które są wyznacznikiem uszkodzeń plemników [13].

Zastosowanie elektroforezy 2D-DIGE oraz 1DE-LC-MS/MS umożliwiło kompleksowe monitorowanie zmian w proteomie nasienia karpia powstałe w wyniku kriokonserwacji [5]. Porównanie świeżej plazmy nasienia i supernatantu po kriokonserwacji pozwoliło na identyfikację 186 białek uwalnianych z plemników po mrożeniu (ryc. 8). Białka te mogą być potencjalnymi wskaźnikami uszkodzeń kriogenicznych plemników i/lub przydatności nasienia do kriokonserwacji. Białka te zostały sklasyfikowane pod względem procesów biologicznych oraz lokalizacji komórkowej. Wykazano, że 49% białek bierze udział w metabolizmie (kinaza kreatynowa, α-enolaza, dehydrogenaza izocytrynianowa, dehydrogenaza jabłczanowa), 14% w odpowiedzi na stres (białko zawierające domenę tioredoksyny białka szoku cieplnego), 12% w transdukcji sygnału, 5% w komunikacji komórkowej (białka Ras, Ran, ADP-ribosylation factor), 5% w rozrodzie, 4% białek w organizacji cytoszkieletu (kofilina, dyneina, aktyna, tubulina) oraz 3% w naprawie DNA. Klasyfikacja pod względem „lokalizacji komórkowej" wykazała, że większość białek uwolnionych z plemników w wyniku kriokonserwacji to białka cytozolowe (65%). Ponadto wykazano obecność białek błonowych (13%), jądrowych (10%), cytoszkieletowych (8%) oraz mitochondrialnych (4%).



RYCINA 8. Fluorescencyjna elektroforeza różnicowa (2D-DIGE) świeżej plazmy nasienia (A) i supernatantu po kriokonserwacji nasienia karpia (B) z zaznaczonymi 119 spotami (1-119) o wyższej intensywności w supernatancie po kriokonserwacji w porównaniu do świeżej plazmy nasienia. Zaznaczone spoty białkowe zostały wycięte z żelu, poddane trawieniu trypsyną i zidentyfikowane z użyciem spektrometrii mas (MALDI-ToF). C – obraz uzyskany po nałożeniu map proteomicznych plazmy nasienia przed kriokonserwacją i supernatantu po kriokonserwacji nasienia karpia. Spoty czerwone reprezentują białka uwolnione z plemników do supernatantu w wyniku kriokonserwacji

FIGURE 8. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) of fresh carp seminal plasma (A) and supernatant after cryopreservation (B) with the selected 119 spots (1–119) of higher intensity in the supernatant after cryopreservation, compared to fresh seminal plasma. The selected spots were picked from the gel, before then being digested and identified using mass spectrometry (MALDI-TOF). C – overlay of carp seminal plasma before cryopreservation and supernatant after cryopreservation profile. The red spots represent proteins released from the spermatozoa to the supernatant due to the cryopreservation process

Wprowadzenie do analiz nasienia ryb nowego podejścia metodycznego jakim jest proteomika pozwoliło na dokonanie przełomu w badaniach umożliwiając kompleksową analizę złożonych mieszanin białkowych. Stosując techniki proteomiczne scharakteryzowano proteom nasienia (plazmy nasienia i plemników) karpia, większość z opisanych białek zidentyfikowano po raz pierwszy dla tego gatunku. Uzyskane wyniki dają podstawę do dalszych badań aplikacyjnych, polegających na poszukiwaniu markerów jakości nasienia. Ponadto zidentyfikowane białka uwolnione z plemników w wyniku kriokonserwacji mogą być potencjalnymi wskaźnikami uszkodzeń kriogenicznych plemników i/lub przydatności nasienia do kriokonserwacji.

PODZIĘKOWANIA

Badania finansowano w ramach projektu badawczego 2011/01/D/NZ9/00628 „Identyfikacja i charakterystyka specyficznych białek plazmy nasienia karpia (*Cyprinus carpio* L) – zastosowanie metod klasycznych i proteomicznych" finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki oraz środków statutowych Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie

LITERATURA

[1] Dabrowski K, Ciereszko A. Proteinase inhibitors in seminal plasma of teleost fish. *J. Fish Biol.* 1994; **45**: 801-810.

[2] Dietrich MA, Adamek M, Bilińska B, Hejmej A, Steinhagen D, Ciereszko A. Characterization, expression and antibacterial properties of apolipoproteins A from carp (*Cyprinus carpio* L.) seminal plasma. *Fish Shellfish Immunol* 2014; **41**: 389-401.

[3] Dietrich MA, Arnold GJ, Fröhlich T, Ciereszko A. In-depth proteomic analysis of carp (Cyprinus carpio L) spermatozoa. *Comp Biochem Physiol – Part D: Genomics and Proteomics* 2014; **12**: 10-15.

[4] Dietrich MA, Arnold GJ, Nynca J, Fröhlich T, Otte K, Ciereszko A. Characterization of carp seminal plasma proteome in relation to blood plasma. *J Proteomics* 2014; **98**: 218-232.

[5] Dietrich MA, Arnold GJ, Otte K, Dietrich GJ, Ciereszko A. Proteomic analysis of alteration in protein composition of carp semen after cryopreservation. Aquaculture Europe, Donostia-San Sebastian, Spain, 14-17.X.2014. pp. 337-338.

[6] Dietrich MA, Dietrich GJ, Hliwa P, Ciereszko A. Carp transferrin can protect spermatozoa against toxic effects of cadmium ions. *Comp. Biochem. Physiol Part C* 2011; **153**: 422-429.

[7] Dietrich MA, Karol H., Ciereszko A. Identification of Kazal-type serine proteinase inhibitor in carp seminal plasma. Reproductive Biology, The 3rd Winter Workshop of the Society for Biology of Reproduction. Zakopane 30.01-01.02. 2013. Vol. 13, Supp 1, str 24.

[8] Dietrich MA, Nynca J, Bilińska B, Kuba J, Kotula-Balak M, Karol H, Ciereszko A. Identification of parvalbumin-like protein as a major protein of common carp *(Cyprinus carpio* L) spermatozoa which appears during final stage of spermatogenesis. *Comp Biochem Physiol B*. 2010; **157**: 224-231.

[9] Dietrich M, Westfalewicz B, Jurecka P, Irnazarow I, Ciereszko A. Isolation, characterization and cDNA sequencing of new form of parvalbumin from carp semen. *Reprod Fertil Dev* 2014; **26**: 1117-1128.

[10] Dietrich MA, Żmijewski D, Karol H, Hejmej A, Bilińska B, Jurecka P, Irnazarow I, Słowińska M, Hliwa P, Ciereszko A. Isolation and characterization of transferrin from common carp (*Cyprinus carpio* L) seminal plasma. *Fish Shelfish Immunol* 2010; **29**: 66-74.

[11] Glogowski J, Ciereszko A. Cryopreservation of fish sperm – meaning, specificity, and national achievements in the last decade – *Med. Wet*. 2008; **64**: 551-554

[12] Li P, Hulak M; Koubek P; Sulc M; Dzyuba B, Boryshpolets S; Rodina M, Gela D. Manaskova-Postlerova P, Peknicova J, Linhart O. Ice-age endurance: the effects of cryopreservation on proteins of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Theriogenology* 2010; **74**: 413-423.

[13] Sarosiek B, Ciereszko A, Rzemieniecki A, Domagała J, Glogowski J. The influence of semen cryopreservation on the release of some enzymes from siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa. *Arch. Pol. Fish*. 2004; **12**: 13-21.

[14] Wojtczak M, Całka J, Glogowski J, Ciereszko A. Isolation and characterization of A1-proteinase inhibitor from common carp (*Cyprinus carpio*) seminal plasma. *Comp Biochem Physiol B* 2007; **148**: 264-276.

[15] Wojtczak M, Dietrich GJ, Ciereszko A. Transferrin and antiproteases are major proteins of common carp seminal plasma. *Fish Shellfish Immunol* 2005; 19: 387-391.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 04.02.2015
Przyjęto: 04.03.2015
Mariola Dietrich
Zakład Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN
ul. Bydgoska 7, 10-243 Olsztyn
tel. 48 89 5393135,
fax: 48 89 535 74 21
e-mail: m.dietrich@pan.olsztyn.pl