

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS – JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR-JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Gerly Sillaste

**Histoonseoseliste piirkondade tuvastamine koduaise (*Bos taurus*)
seemnerakkude kromatiinis ning seemneraku pinnavalkude valideerimine**

Magistritöö

Juhendajad prof. Andres Salumets

MSc Riho Meier

MSc Triin Viltrop

TARTU 2015

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 Imetajate seemnerakud	8
1.1.1. Seemnerakkude morfoloogia.....	8
1.2 Spermatogenees	10
1.2.1 Spermi posttestikulaarne küpsemine.....	12
1.3 Spermi kromatiin	13
1.3.1 Histooneid	13
1.3.2 Protamiinid.....	14
2. Viljastumine ja varajane geeniekspressioon	15
2.1 Viljastumine	15
2.1.1 Spermi kromatiini muutused viljastumisel.....	16
2.1.2 Varajane geeniekspressioon	17
3. Imetaja spermi pinnaproteoom	18
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	20
2.1 Töö eesmärgid.....	20
2.2 Materjal ja meetodika	20
2.2.1 Üldine katseskeem.....	20
2.2.2 Bioloogiline materjal.....	21
2.2.3 Kromatiini fraktsioneerimine	21
2.2.4 DNA eraldamine histoonefraktsioonist.....	22
2.2.5 Valgufraktsioonide analüüs.....	22
2.2.5.1 Valkude sadestamine	23
2.2.5.2 Valkude geelelektrofoores ja visualiseerimine hõbedaga värvimise meetodil..	23

2.2.5.3 Western blot analüüs	23
2.2.6 Histoonseoseliste DNA piirkondade sekveneerimine	24
2.2.7 Bioinformaatiline analüüs	25
2.2.8 Veise spermi pinnavalkude valideerimine immunotsütokeemia abil.....	26
2.3 Tulemused.....	27
2.3.1. Kromatiini fraktsioneerimine	27
2.3.2 Valkude geelelektroforees ja värvimine hõbedaga	28
2.3.3 Western blot analüüs	29
2.3.4 Histoonseoseliste piirkondade sekveneerimine ja bioinformaatiline analüüs.....	30
2.3.5 Veise spermi pinnavalkude valideerimine immunotsütokeemia abil.....	33
2.4 Arutelu	34
KOKKUVÕTE	42
Summary.....	43
TÄNUSÕNAD	44
KIRJANDUSE LOETELU.....	45
LISAD	57
LISA 1. MNaasiga inkubatsiooni aja optimeerimine	57
LISA 2. Bioinformaatilise analüüsi üldskeem.....	58
LISA 3. <i>Bovine sperm plasma membrane proteomics through biotinylation and subcellular enrichment</i>	59
LIHTLITSENTS.....	75

KASUTATUD LÜHENDID

ACR – akrosiin (*acrosin*)

AR – akrosomaalne regioon (*acrosomal region*)

APS – ammooniumpersulfaat (*ammonium persulfate*)

Brdt – bromodomeeni sisaldav testisespetsiifiline valk (*Bromodomain testis specific protein*)

CACNB4 – *Calcium Channel, Voltage-Dependent, Beta 4 Subunit*

cAMP – tsükliline adenosiinmonofosfaat (*cyclic adenosine monophosphate*)

Chn1 – *chimerin*

CENP-A – tsentromeeri valk A (*centromere protein A*)

CP – tsentraalne tuubulite paar (*central pair*)

CPQ – karboksüpeptidaas Q (*carboxypeptidase Q*)

CPVL – vitellogeniini sarnane karboksüpeptidaas (*carboxypeptidase, vitellogenic-like*)

CTCF – *CCCTC-binding factor (zinc finger protein)*

DA – düneiini õlad (*dynein arms*)

DAPI – 4,6-diamidiino-2-fenüülindool

DEFB126 – beeta defensiin 126 (*defensin, beta 126*)

dpc – päeva pärast paaritumist (*days post coitum*)

DTT – ditiotreitool

EDTA - etüleendiamiintetraatsetaat

Fgf9 – fibroblasti kasvufaktor 9 (*fibroblast growth factor 9*)

FS – kiuline kate (*fibrous sheath*)

GO – geeni ontoloogia (*gene ontology*)

HOX – Homeobox

HRP – mädarõika peroksidaas (*horseradish peroxidase*)

KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LC – kiulise katte pikisuunalised sambad (*longitudinal columns of the fibrous sheath*)

MAR – maatriksile seondumise regioonid (*matrix attachment regions*)

MEST – mesodermi spetsiifiline transkript

MNaas – *Micrococcal nuclease*

MS – mitokondriaalne ümbris (*mitochondrial sheath*)

ODF – välimised tihedad fiibrid (*outer dense fibres*)

OMDA – aksoneemi välimised mikrotuubulite dubletid (*outer microtubule doublets of the axoneme*)

P1/PRM1 – protamiin 1

P2 – protamiin 2

PAR – postakrosomaalne regioon (*postacrosomal region*)

PARP1 – polü(ADP)riboos 1

PARP2 – polü(ADP)riboos 2

PGC – primordiaalsed iduteerakud (*primordial germ cells*)

PM – plasmamembraan

PMSF – fenüülmetaansulfonüülfluoriid

PVDF – polüvinülideenfluoriid

RS – radiaaljätked (*radial spokes*)

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfate*)

TBE – Tris puhverdatud EDTA

TCA – trikloroatsetaathape

TEMED – tetrametüületüleendiamiin

TR – ristliidused (*transverse ribs*)

TSS – transkriptsiooni stardisait

TTS – transkriptsiooni terminatsioonisait

ZP – *zona pellucida*

ZP3 – *zona pellucida* glükoproteiin 3

SISSEJUHATUS

Seemneraku kromatiin erineb oma struktuuri poolest märgatavalt somaatiliste rakkude kromatiinist. Kui somaatilise raku tuumas pakitakse DNA histoonidega, mis moodustavad nukleosoomi, siis seemneraku DNA on pakitud kahel viisil. Enamik DNA-st on seotud aluseliste valkude, protamiinidega, mis pakivad nukleiinhappe sõõrikukujulisteks struktuurideks. Need struktuurid pakivad DNA-d ligi kakskümmend korda tihedamalt kui histoonid. Selline kromatiin ei ole transkriptsiooniliselt aktiivne. Kromatiini kompaktsem paigutus annab seemneraku peale hüdrodünaamilise kuju, soodustades spermi liikumist. Märksa väiksem osa DNA-st on pakitud histoonidega. Miks osa DNA-st jääb seotuks histoonidega, ei ole selge. Arvatakse, et nõrgema kokkupakituse tõttu on nukleosoomsed piirkonnad seotud embrüo varajase geeniekspressiooniga. Seda, millistes piirkondades histoonid spermis säilivad, on uuritud korduvalt, ent tulemused on vastuolulised. Histoonid ja protamiinid pakuvad huvi ka viljatuse aspektist. Varasemalt on näidatud, et DNA ebapiisav või ebakorrekne pakkimine muudab seemneraku DNA kahjustustele vastuvõtlikuks ning alandab sellega viljastamisvõimet.

Spermi viljastamisvõime sõltub suuresti ka seemneraku pinnast. Küpsemisel läbib seemneraku pind ulatuslikud modifikatsioonid, mille tulemusel muutub ka spermi pinna valguline koosseis. Viimastel aastatel on üha enam kasutatud reproduktiivmeditsiinis mudelloomana koduveist (*Bos taurus*). Ühest küljest on selle taga materjali lihtne kättesaadavus ning geneetiline sarnasus inimesega, teisest küljest vajadus uurida tõuloomade viljakust ning rakendada soospetsiifilist selektsiooni.

Käesolevas magistritöös oli kaks eraldiseisvat eesmärki. Töö peamine eesmärk oli tuvastada koduveise spermi histoonseoselised DNA piirkonnad. Teiseks eesmärgiks oli valideerida veise spermi kahe pinnavalgu lokalisatsiooni immunotsütokeemia meetodil. Töö teoreetilises osas antakse ülevaade seemneraku morfoloogiast, arengust ning kromatiini eripärast. Samuti käsitletakse varasemaid töid, kus on kirjeldatud seoseid seemneraku kromatiini ja varajase geeniekspressiooni vahel. Teoreetilise osa teises pooles antakse lühike ülevaade seemneraku pinnavalkude uurimisest. Töö praktilises osas kirjeldatakse veise spermi kromatiini fraktioneerimist ning histoonseoselise DNA eraldamist ja analüüsi. Samuti kirjeldatakse veise pinnavalkude tuvastamist immunotsütokeemia abil.

Käesolev uurimus viidi läbi Tervisetehnoloogiate Arenduskeskus AS-s (endine Reproduktiivmeditsiini TAK AS).

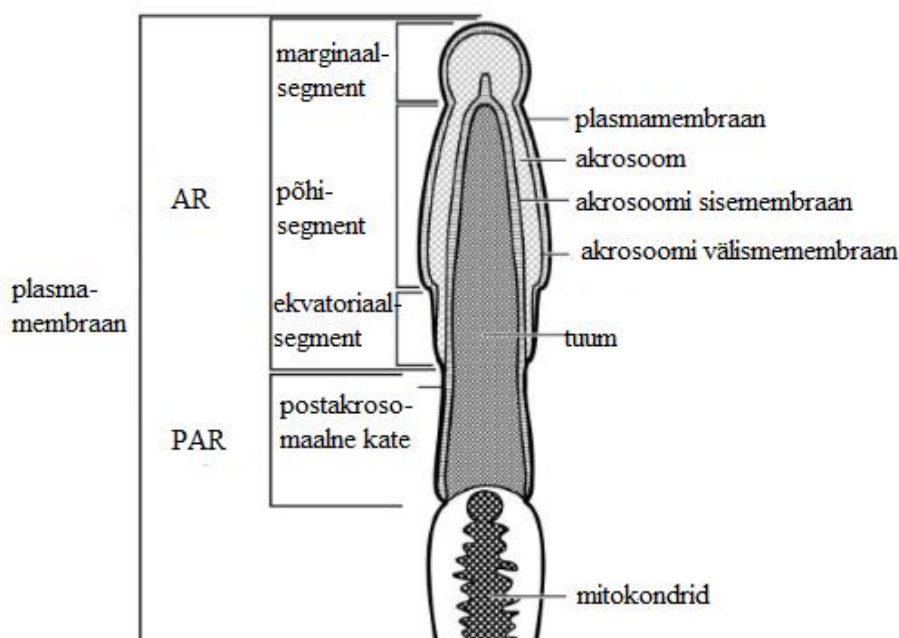
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Imetajate seemnerakud

1.1.1. Seemnerakkude morfoloogia

Imetajate seemnerakud ehk spermid on kõrgelt diferentseerunud rakud. Nende morfoloogia kujuneb välja mitmeetapilise arengu käigus munandites. Üldiselt jaguneb seemnerakk pea-, kaela- ning sabaosaks, mida katab plasmamembraan (Toshimori, 2003). Imetajate spermide üldpikkus varieerub liigiti märgatavalt. Näiteks, koduveise (*Bos taurus*) seemneraku pikkus on 50-60 μm , mis on ligilähedane inimese seemneraku üldpikkusele. Samas osadel makaakidel on spermide üldpikkus vaid ligikaudu 30 μm (Tourmente *et al.*, 2011). Spermide liikidevahelist erisust iseloomustab ka pea morfoloogia. Näiteks, inimese ja veise spermide pea meenutab kujult spaatlit, närilistel on spermide pea üldiselt sirpja kujuga (Sutovsky, 2006).

Imetajate seemneraku peasast moodustab ligi 60% haploidse genoomiga rakutuum, mida katab tuumamembraan ehk tuumaümbris. Pea eesmises osas paikneb hüdrofüüsilisi ensüüme ning munarakuga seondumiseks vajalikke valke sisaldav akrosoom. Akrosoomi katvat piirkonda plasmamembraanil nimetatakse akrosomaalseks regiooniks. Akrosoom ise on ümbritsetud sisemise ja välimise akrosomaalse membraaniga (Joonis 1) (Downing Meisner *et al.*, 2005).



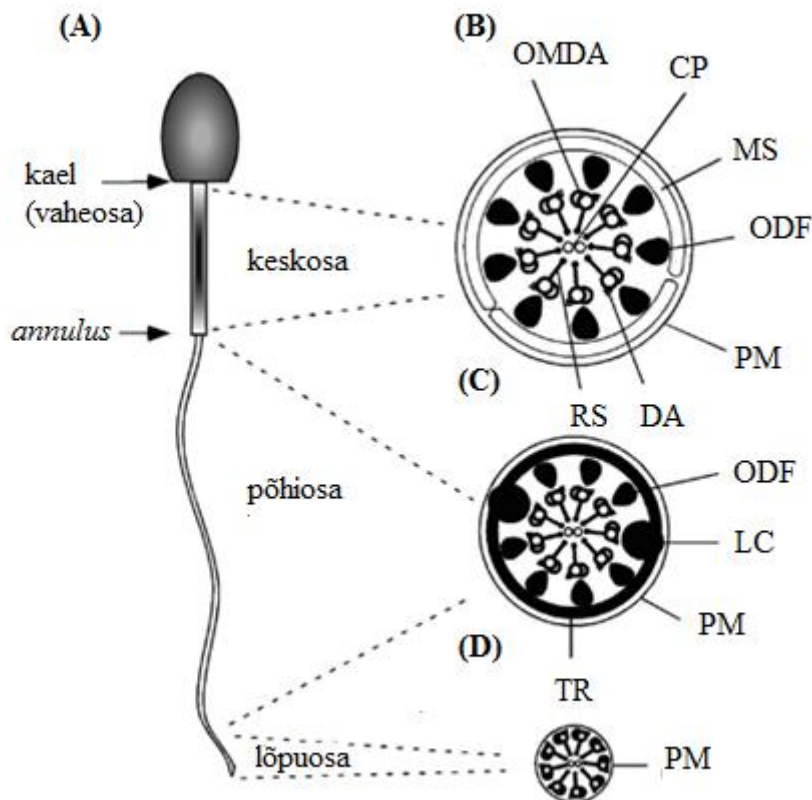
Joonis 1. Imetaja spermide pea pikilõike (Downing Meisner *et al.*, 2005 järgi).

Viljastumisel sulandub akrosoomi välimine membraan kokku spermide plasmamembraaniga ning laguneb eksotsütoosi tulemusel. Akrosoomi sisemembraan jääb esialgu puutumatuks, osaledes

sekundaarses seandumises munarakule (Sutovsky, 2006). Akrosoom jaguneb omakorda marginaal-, põhi- ning ekvatoriaalsegmenndiks, mille järgi nimetatakse ka spermi plasmamembraanil paiknevaid domeene (Joonis 1). Ekvatoriaalse segmendi kohal olev plasmamembraani piirkond on esmase seandumise kohaks munarakuga. (Wolkowicz *et al.*, 2003). Postakrosomaalses regioonis paikneb osa spermi pead toetavast ja kaitsvast tsütoskeleti komponendist, perinukleaarsest teekast.

Spermi pea on sabaga ühendatud kaela kaudu. Selles piirkonnas asuvad tuuma distaalne osa koos tuumaümbrise ja ning proksimaalne ja distaalne tsentriool. Proksimaalne tsentriool osaleb viljastumisel isaspronukleuse moodustumisel (Sathananthan *et al.*, 1996). Proksimaalset tsentriooli ümbritsevad lateraalselt mikrotoobulite triplettidest koosnevad segmenteeritud sambad, mis lähevad üle tihedateks fiibriteks (*outer dense fibers*, ODF) (Ounjai *et al.*, 2012). Distaalne tsentriool annab aluse saba läbivale aksoneemile (Sathananthan *et al.*, 1996). Olenevalt liigist, degenerereerub distaalne tsentriool spermatogeneesis osaliselt või täielikult, osaledes vaid saba formeerumises.

Spermi sabas saab eristada paksemat keskosa, pikka ja peenemat põhiosa ning peenikest lõpuosa (Saacke ja Almquist, 1964) (Joonis 2). Saba läbiv aksoneem koosneb kahest tsentraalsest mikrotoobulist, mida ümbritsevad ringikujuliselt üheksa tuubulite dubletti. Viimastest ulatuvad välja düneiini õlad (*dynein arms*, DA), mis genereerivad mootorset jõudu. Üheksast välimisest tuubulitepaarist ulatuvad välja radiaalsed jätked (*radial spokes*, RS), mille kaudu edastatakse mehhanokeemiline info aksoneemi tsentrist välimiste tuubuliteni (Turner, 2003). Aksoneemi katavad sellega paralleelselt kulgevad üheksa ODF-i, mis võimaldavad saba paindlikku liikumist. Saba keskosas katab fiibreid mitokondriaalne kate (*mitochondrial sheath*, MS), milles paiknevad mitokondrid varustavad rakku energiaga (Joonis 1, 2). Saba põhiosas katab fiibreid omakorda kiuline kest (*fibrous sheath*, FS), mida peetakse spermi ektoskeletiks. FS koosneb kahest pikisuunalisest sambast, mis asendavad kolmandat ja kaheksandat ODF-i, kattes spermi saba ainult põhiosa ulatuses. Sambaid stabiliseerivad nendega risti paiknevad liidused (*transverse ribs*, TR) (Turner, 2003). Spermi saba põhiosa moodustab kogu saba pikkusest ligikaudu 2/3 ning selle kiulises kestas paiknevad glükolüütilised ensüümid ja mitmed tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (cAMP)-sõltuva signaalraja komponendid (Eddy *et al.*, 2003). Saba kesk- ja põhiosa on omavahel seotud *annulus*'e ehk Jenseni rõngaga. Saba lõpuosas esineb vaid aksoneem, mida katab plasmamembraan (Turner, 2003).

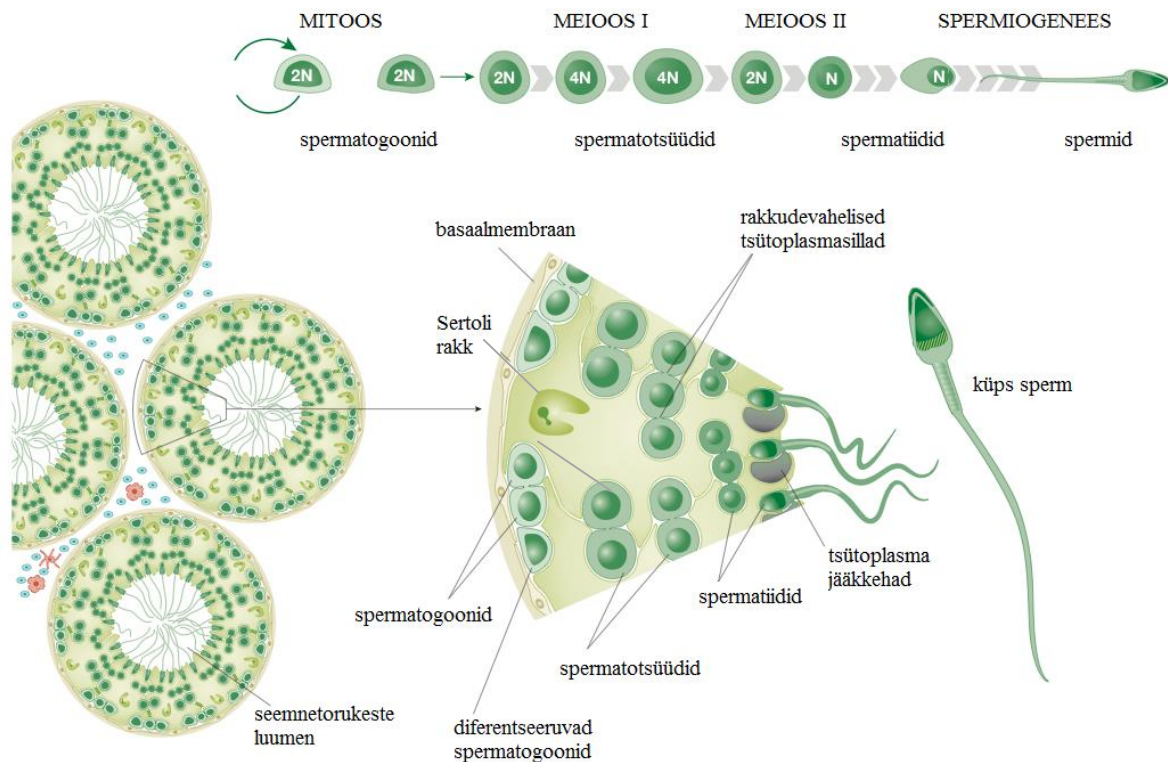


Joonis 2. Spermi saba ultrastruktuur. (A) Spermi saba üldine jaotus. (B) Ristlõige spermi saba keskosast. (C) Ristlõige spermi saba põhiosast. (D) Ristlõige spermi saba lõpuosast. Lühendid: OMDA (aksoneemi välimised mikrotuubulite dubletid); CP (tsentraalne tuubulite paar); MS (mitokondriaalne kate); ODF (välimised tihedad fiibrid); DA (düneiini õlad); RS (radiaaljätked); LC (pikisuunalised kiud); PM (plasmamembraan); TR (ristliidused) (Turner, 2003 järgi).

1.2 Spermatogeneees

Spermatogeneees on protsess, mille käigus arenevad isasorganismi väänilistes seemnetorukestes diploidsetest seemneraku eellasrakkudest haploidsed spetsialiseerunud sugurakud (Joonis 3). Imetajatel algab sugurakkude areng embrüonaalses eas eellasrakkude ehk primordiaalsete iduteerakkude (*primordial germ cells*, PGC) tekke, aktiivse proliferatsiooni ja migratsiooniga genitaalvalli, tulevasse gonaadi. Genitaalvalli jõudnud idurakke nimetatakse gonotsüütideks ehk prespermatogoonideks. Näiteks toimub veise embrüos idurakkude aktiivne proliferatsioon vanuses 50 – 80 dpc (*days post coitum*, päeva pärast paaritumist). Genitaalvallis läbib gonotsüütide genoom ulatuslikud muutused, mille eesmärgiks on totipotentsuse taastamine. Nende käigus demetüleeritakse gonotsüütide genoom, et eemaldada vanemaspetsiifiline monoalleelse geeniekspressiooni muster ehk *imprinting* (Lee *et al.*, 2002). Alles pärast gonaadide diferentseerumist algab *de novo* metülatsioon, millega taastatakse soospetsiifiline monoalleelne geeniekspressiooni muster (Morgan *et al.*, 2005).

Pärast sündi toimub rakkude areng piki väänulist seemnetorukest lainetena ning kaasnevaid muutusi spermatogeense epiteeli kindlas kohas nimetatakse spermatogeense epiteeli tsükliks (Kärner, 1997). Seemnetorukeste diameeter kasvab ning gonadotropiinide sekretsiooni mõjul hakkavad prespermatogoonid seemnetorukeste epiteeli perifeerses osas mitootiliselt jagunema, andes aluse spermatogoonidele, mida pullis võib märgata esimest korda 16. nädalal pärast sündi (Curtis ja Amann, 1981). Spermatogoonid on väikesed ümarad ja organellidevaesed rakud, mis jagunevad mitootiliselt. Osad neist jäävad omavahel tsütoplasmasildadega seotuks, tagades spermatogeneesi käigus rakkude sünkroonse arengu (Wrobel, 2000). Spermatogoone eristatakse heterokromatiini rohkuse alusel. Mida diferentseerunum on rakk, seda rohkem sisaldab tema tuum heterokromatiini (de Rooij ja Russell, 2000). Spermatogoonid kujunevad mitoosi käigus primaarseteks spermatotsüütideks, mis sisenevad meioosi esimesse jagunemisesse. Meioosi esimeses profaasis toimub homoloogiliste kromosoomide vahel risttsiire ning esimese jagunemise tulemusel tekib ühe primaarse spermatotsüüdi kohta kaks haploidset sekundaarset spermatotsüüti. Meioosi teises jagunemises toimub õdekromatiidide lahkumine ning tulemuseks on neli haploidset spermatiidi (Zamudio *et al.*, 2008). Ümara kujuga spermatiidid läbivad diferentseerumisprotsessi ehk spermiogeneesi, mille käigus toimub rida morfoloogilis-funktsionaalseid muutusi. Peamine muutus on spermi pea elongeerumine, mis saab toimuda tänu DNA tihedamale kokkupakkimisele. Kompakteerumine muudab spermi pea hüdrodünaamilisemaks, tagades emassuguteedes efektiivsema liikumise ning kaitseb DNA-d füüsikalise-keemiliste tegurite eest. Spermiogeneesi käigus areneb ka seemneraku saba ning kujuneb lõplikult välja akrosoom (Kärner, 1997). Protsessi lõpufaasis toimub mitmeetapiline spermiatsioon. Selle käigus lõhutakse spermatiidide ja tugifunktsiooniga Sertoli rakkude vahelised tsütoplasmaühendused, üleliigne tsütoplasma koos organellidega fagotsüteeritakse ning spermi pea ja keha muutuvad voolujoonelisemaks. Viimases etapis vabanevad spermid seemnetorukeste luumenisse (O'Donnell *et al.*, 2011). Pulli seemnetorukestes toodetakse päevas ligi kaks miljardit seemnerakku (Sutovsky, 2006).



Joonis 3. Imetajate spermide postnataalne areng väänilistes seemnetoruketes (Krawetz *et al.*, 2009 järgi).

1.2.1 Spermi posttestikulaarne küpsemine

Seemnetorukeste luumenisse vabanenud spermatoosidid liiguvad munandimanusesse. See on piklik ja väändunud struktuur, milles saab histoloogiliselt eristada pea-, keha- ja sabaosa. Esimeses kahes segmendis toimub spermide küpsemine, munandimanuse sabaosas aga funktsionaalsete rakkude säilitamine (Cornwall, 2009). Küpsemise käigus leiab aset ulatuslik spermi pinna modifitseerimine valkude eemaldamise, valkude posttranslatsiooniliste modifikatsioonide ja munandimanuse sekreteeritud valkude poolt (Jones, 1998). Muutused raku pinnal kaitsevad tsütoplasmaavaeid sperme välistegurite eest ning annavad spermile võime ära tunda ja interakteeruda munaraku kestaga (Cornwall, 2009). Näiteks sekreteeritakse imetajate munandimanuses kaitsefunktsiooniga valku beeta-defensiin 126 (DEFB126), mis eemaldatakse raku pinnalt alles emasuguteedes. Arvatakse, et DEFB126 kaitseb sperme emasorganismi immuunsüsteemi rakkude eest. Lisaks võimendavad beeta-defensiinid munandimanuse pea piirkonnas spermi progressiivset liikumist (Zhou *et al.*, 2004), mida iseloomustab viburi sümmeetriline, suhteliselt madala paindeamplituudiga liikumine (Turner, 2003). Viljastamisvõime omandavad spermid alles naissuguteedes pärast mitmeetapilist protsessi, kapatsitatsiooni. Selle käigus muutub raku plasmamembraani lipiidne koostis, läbilaskvus ioonidele, rakusisene pH ning valkude jaotus rakupinnal (Fraser, 1998). Sperm omandab hüperaktiivse suurenenud viburipainde amplituudiga liikumise, mis soodustab tal munajuha

epiteelit vabanemist ning tungimist läbi munarakku ümbritsevate somaatiliste rakkude ja *zona pellucida* (Ho ja Suarez, 2001; Yanagimachi, 1970).

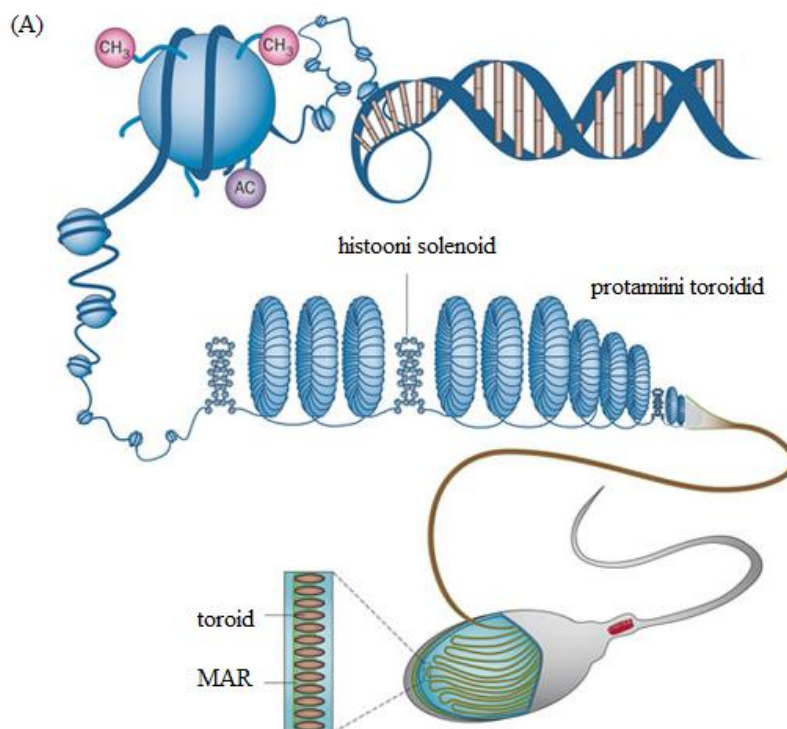
1.3 Spermi kromatiin

Imetaja spermi kromatiinis saab eristada kolme struktuurset regiooni: spetsiifiliste valkudega histoonidega ning protamiinidega seotud DNA piirkonnad ning regioonid, mille kaudu kinnitub DNA tuumamaatriksile (Joonis 4). Neid regioone nimetatakse maatriksile seondumise regioonideks (*matrix attachment region*, MAR), mis jaotavad DNA tuumas lingudeks. Spermi MAR regioonid kanduvad ka isaspronukleusse, säilitades pärast viljastumist DNA integreerituse ning võimaldades replikatsiooni (Ward, 2010). Kuni spermiogeneesini on DNA seotud histoonidega. Spermiogeneesi käigus vahetatakse enamik neist üleminekuvalkude ning seejärel protamiinide vastu. Üleminekuvalgud stabiliseerivad DNA-d kondenseerumisel ning kaitsevad DNA-d katkete eest (Zhao *et al.*, 2004). Sõltuvalt liigist jäävad osad DNA piirkonnad spermis histoonidega seotuks (Braun, 2001).

1.3.1 Histoonid

Imetajate spermides esinevad somaatilistele rakkudele iseloomulikud kanoonilised ehk rakutsükli S-faasis sünteesitavad histoonid H2A, H2B, H3 ja H4. Need moodustavad oktameere, mille ümber keerdub ~ 146 bp pikkune kaheahelaline DNA. Oktameere seob omvahel *linker* histoon H1. Nukleosoomid keerduvad omakorda solenoidstruktuurideks (Joonis 4). Lisaks kanoonilistele histoonidele on imetajate seemnerakkudes mittekanoonilised histoonid, mille süntees on rakutsükli S-faasist sõltumatu (Szenker *et al.*, 2011). Näiteks veise seemnerakus on kirjeldatud tsentromeeride spetsiifilise histooni H3 varianti CENP-A (*Centromere protein A*). Arvatakse, et CENP-A on oluline varajases embrüogeneesis isasgenoomi organiseerumiseks (Palmer *et al.*, 1990). Hiire ja inimese spermis on leitud ka testisespetsiifilisi histoone, näiteks TH2B, H2AL1 ja H2AL2. Võrreldes kanooniliste histoonidega on testisespetsiifilised histoonid ebastabiilsemad. Arvatakse, et see võib soodustada üleminekut protamiinidele (Govin *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2005; Montellier *et al.*, 2013). Ülemineku eelduseks peetakse histoonide ubikvitineerimist, fosforüleerimist ning ulatuslikku histoonide hüperatsetüleerimist, mis vähendab valkude afiinsust DNA suhtes (Braun, 2001; Oliva *et al.*, 1987). Hiire mudelil on näidatud, et hüperatsetüleeritud histooni H4 tunneb ära bromodomeeni sisaldav testisespetsiifiline valk BRDT (*Bromodomain testis specific protien*). See reguleerib histoonide vahetust üleminekuvalkude vastu. BRDT puudumisel ei eemaldata DNA-lt histoone ega toimu asendust üleminekuvalkude ning protamiinide vastu, kuigi mõlemate süntees on korrektne (Gaucher *et al.*, 2012; Pivot-Pajot *et al.*, 2003). Selline

olukord võib põhjustada kromatiini ebapiisavat pakkimist ning mõjutada spermi viljastamisvõimet (de Oliveira *et al.*, 2013).



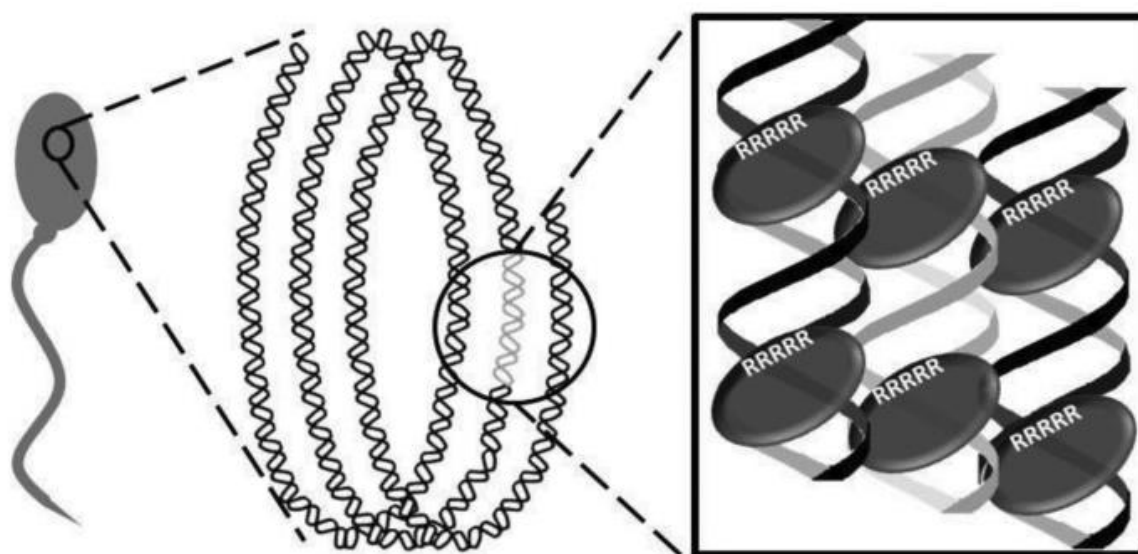
Joonis 4. Sperm DNA struktuursed piirkonnad. Protamiinid on koondunud toroidideks ning histoonid solenoidstruktuurideks. Histoonid on posttranslatsiooniliselt modifitseeritud, näiteks atsetüleeritud või metüleeritud (Schagdarsurengin *et al.*, 2012 järgi).

1.3.2 Protamiinid

Imetajates on kaks protamiini geeni, mida ekspresseeritakse eloneeruvates spermatiidides. Nendeks on protamiin I (P1) ja protamiin II (P2), millest esimene on konserveerunud kõikides imetajates, teine esineb vähestes liikides, näiteks inimeses (Kleene, 1996; Vilfan *et al.*, 2004). Ka veise genoomis leidub P2 geen, ent valku sellelt ei sünteesita (Kremling *et al.*, 1992). Protamiinid on lühikesed ligikaudu 50 aminohappest koosnevad valgud, mida iseloomustab kõrge arginiini sisaldus valgu tsentraalses osas ning tsüsteiini rohkus terminustes. Arginiini positiivsete laengute ja DNA suhkur-fosfaat selgroo negatiivsete laengute vahel mõjuvad elektrostaatiliselt jõud, mis seovad DNA protamiinidega (Joonis 5) (Balhorn, 1982). Tsüsteiinijääkide intra- ja intermolekulaarsed disulfiidsillad valgu terminustes moodustavad tugeva võrgustiku (Balhorn, 1982). See stabiliseerib kromatiini ning võimaldab DNA kuni 20 korda tihedamat pakkimist võrreldes somaatilise raku tuumaga. Kompakteerumine suurendab spermi pea hüdrodünaamilisust, mis on oluline spermi kiiremaks liikumiseks naissuguteedes.

Disulfidsildade võrgustik kujuneb lõplikult välja alles spermide liikumisel läbi munandimanuse (Balhorn, 2007).

Protamiini tsentraalses alas ning N-terminuses esineb rohkelt seriini- ja treoniinirikkad fosforüleerimissaite, ent nende täpne funktsioon on endiselt teadmata (Balhorn, 2007). Üks protamiini molekul keerab end ~10 bp DNA ümber, mis vastab ühele heeliksi täispöördele. Kondenseerumise tulemusel tekivad sõõrikukujulised struktuurid, mille diameeter pullis on ligikaudu 60 nm ning, mis sisaldavad ~50 kb DNA-d (Balhorn, 2007; Vilfan *et al.*, 2004). Selline kondenseerumine muudab spermis kromatiini transkriptsiooniliselt inaktiivseks.



Joonis 5. Protamiinide seondumine DNA-le. Protamiini (hallid ovaalid) arginiinjäägid (R) seonduvad DNA suure vao kaudu suhkur-fosfaat selgroo negatiivsete laengutega (Kanippayoor *et al.*, 2013 järgi).

2. Viljastumine ja varajane geeniekspressioon

2.1 Viljastumine

Viljastumine toimub munajuha ampullaosas. Esmane kontakt spermis ja munarakku ümbritsevate *cumuluse* rakkude vahel indutseerib spermis hüaluronidaasse aktiivsusega valgud, mis aitavad spermil süsivesinike ja valkude rikkast somaatiliste rakkude kihist läbi tungida (Lin *et al.*, 1994). Seejärel seondub spermis plasmamembraani anterioorne osa munarakku ümbritseva glükoproteiinide rikka kesta *zona pellucida*'ga (ZP) (Wassarman *et al.*, 2001). Hiire munarakus peetakse primaarseks retseptoriks *zona pellucida* glükoproteiin 3 (ZP3), mis vallandab spermis signaalkaskaadi (Bleil ja Wassarman, 1983). Avanevad katioonide kanalid, rakk depolariseerub, pH tõuseb ning akrosoomi välismembraan sulandub kokku spermis plasmamembraaniga. Nii eksponeeritakse akrosoomi sisemembraan ning akrosoomi hüdrofüütiline sisu vabaneb. Seda protsessi nimetatakse akrosomaalreaktsiooniks (Florman *et*

al., 1998; Patrat *et al.*, 2000). Esimene kontakt munaraku plasmamembraaniga toimub spermi apikaalse osa kaudu, millele järgneb fuseerumine munarakuga spermi ekvatoriaalse piirkonna vahendusel (Talbot *et al.*, 2003).

2.1.1 Spermi kromatiini muutused viljastumisel

Enne viljastumist on sugurakud erinevas rakutsükli faasis ning nende kromatiin erineva kokkupakituse tasemega. Munaraku areng on peatunud meioosi teises metafasis, omades haploidset histoonseoselist genoomi. Ooplasmasse tunginud spermi genoom on tugevalt kokku pakitud protamiinidega. Gameetide fuseerumisel toimuvad mõlema kromatiinis ulatuslikud muutused. Munarakk lõpetab meioosi teise jagunemise. Selle tulemusel tekivad küps haploidne munarakk, mille tuum areneb emaspronukleuseks ning sekundaarne polaarkeha (Wu ja Zhang, 2010). Samal ajal hakkab moodustuma isaspronukleus. Sperm kaotab tuumaümbrise, kromatiin decondenseerub ning omandab sfäärilise kuju (Wright, 1999). Paralleelselt vahetatakse spermi protamiinid maternaalsete histoonide vastu. Paternaalset päritolu histoonid säilivad. Näidatud on, et näiteks inimese sügoodis säilivad isapoolset päritolu histooni H3 variandid H3.1 ja H3.2, mis tõenäoliselt on olulised epigeneetilise info ülekandmisel replikatsioonil (van der Heijden *et al.*, 2008). Protamiinide asendamisel histoonidega redutseeritakse esmalt protamiinide vahelised disulfiidsillad munaraku glutatiooni abil (Sutovsky ja Schatten, 1997). Seejärel kantakse protamiinid aktseptorile, milleks inimese munarakus peetakse heparaansulfaati (Romanato *et al.*, 2005). Protamiinide vastu vahetatud histoonide seas domineerivad näiteks hiire sügoodis histoon H4 hüperatsetüleeritud vorm (Adenot *et al.*, 1997) ning histoon H3 mittekanooniline vorm H3.3, kuna viimane liidetakse DNA koosseisu ilma replikatsioonita (van der Heijden *et al.*, 2005). Arvatakse, et nende histoonide seondumine isasgenoomile on eelduseks järgnevale ulatuslikule demetülatsiooniprotsessile.

Demetülatsioon algab isaspronukleuses mõne tunni pärast viljastumist ning seda viivad läbi maternaalset päritolu demetülaasid (Oswald *et al.*, 2000). Katseliselt on näidatud ka spermi päritolu demetülatsioonifaktorite olemasolu (Beaujean *et al.*, 2004). Kuna metülatsioon on üldjuhul seotud kromatiini inaktiveerimisega, on tõenäoline, et metülatsioonimustri kustutamine on eelduseks isasgenoomi aktivatsioonile (Dean *et al.*, 2003). Demetülatsioon ei ole isaspronukleuses täielik. Teatud piirkonad, näiteks isapoolselt *imprinditud* geenid (Olek ja Walter, 1997), retrotransposoonid (Lane *et al.*, 2003) ning tsentromeersed alad hiires (Rougier *et al.*, 1998), jäävad metüleerituks. Võimalik, et nende alade transkriptsiooni represseeritakse kromatiini stabiilsuse eesmärgil (Wu ja Zhang, 2010). Ajal, mil isaspronukleuses toimub aktiivne metülatsioonimustri kustutamine, püsib emaspronukleuses metülatsioonitase suhteliselt muutumatuna. Arvatakse, et emaspronukleust kaitsevad demetülatsiooni eest

spetsiifilised histoonide modifikatsioonid (Arney *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2005) ning mittehistsoneerivad faktorid (Nakamura *et al.*, 2007). Alles pärast DNA replikatsiooni ning esimest jagunemist, algab sügoidis emapoolse genoomi metülatsioonimustri passiivne kustumine. Selle käigus jääb igas rakutsüklis üks ödekromatiid metüleeritamata (Morgan *et al.*, 2005). Demetülatsioon kestab moorula staadiumini, mil aktiveerub embrüo enda genoom. Metülatsioonimuster taastatakse *de novo* alles blastotsüsti staadiumis, mil toimub embrüonaalsete ja ekstraembrüonaalsete kudede diferentseerumine. Metülatsioonimustri taastamine on vajalik embrüo enda geeniekspressiooni mustri genereerimiseks (Dobbs *et al.*, 2013).

2.1.2 Varajane geeniekspressioon

Mitmed autorid on näidanud, et varajases embrüonaalses geeniekspressioonis mängivad rolli spermis säilinud nukleosoomid. Hinnangud nende hulga kohta varieeruvad 3% kuni 15%-ni (Gatewood *et al.*, 1987). (Samans *et al.*, 2014). Näidatud on, et nukleosoomid säilivad inimese spermis telomeeride otstes ning arvatakse, et perifeerse paigutuse tõttu tuumas on telomeerid piirkonnaks, mis on seotud isaspronukleuse moodustumisega (Zalenskaya *et al.*, 2000). Samuti on leitud konkreetseid geene, millel säilivad spermis nukleosoomid. Nendeks on näiteks ϵ (eeta) ja γ (gamma) globiini geenid, mis mõlemad ekspresseeruvad inimese embrüo rebukoti erütroblastides. Protamiinidega seotud β (beeta) ja δ (delta) globiinid embrüogeneesis ei avaldu (Gardiner-Garden *et al.*, 1998). Kromatiini immunosadestamise tööd inimese spermidega on näidanud nukleosoomide olemasolu embrüogeneesis oluliste HOX (Homeobox) geenide, mikroRNA-de ja *imprinditud* geenide klastris (Hammoud *et al.*, 2009) ning geenide regulaatoraladel ja promootoritel, mida tunneb ära transkriptsiooni regulaator CCCTC-binding factor (CTCF) (Arpanahi *et al.*, 2009). Ootsüüdis reguleerib CTCF sadade embrüogeneesiks vajalike geenide transkriptsiooni ning selle väljalülitamine hiire ootsüüdis põhjustas häireid embrüo genoomi aktivatsioonis (Wan *et al.*, 2008). Spermis säilinud histoonid omavad aktiivsele kromatiinile omaseid modifikatsioone, näiteks histooni H3 dimetülatsioon 4. lüsiinijäägi küljes (H3K4me2) varajase arengu geenide promootoritel ning trimetülatsioon (H3K4me3) isapoolsetes *imprinditud* lookustes. Samas kannavad geenid, mis varajases embrüogeneesis ei avaldu, represserivad histoonide modifikatsioone (Hammoud *et al.*, 2009). Hiire spermis, kus 1% genoomist jääb pakituks histoonidega (Erkek *et al.*, 2013), esinevad nukleosoomid üle genoomi metüleeritamata GC-rikastes piirkondades, mida nimetatakse CpG saarteks. Need asuvad pidevalt ekspresseeritavate raku elutegevuseks vajalike ehk *housekeeping* geenide promootoritel. Sarnaseid tulemusi on saadud ka inimese spermidega, kus nukleosoomid säilisid peamiselt CpG saartel *housekeeping* geenide promootoritel, aga ka

väiksema GC-sisaldusega spetsiifiliste geenide stardisaitidel (Vavouri ja Lehner, 2011). Huvitaval kombel kattusid spermi nukleosoomidega seotud alad embrüos CpG saarte piirkondadega, kus *de novo* metüleerimist pärast viljastumist ei toimunud. Arvatakse, et neid piirkondi kaitstakse ebaspetsiifiliste metüültransferaaside eest, viidates isalt päritud histoonide rollile embrüo varajases geeniekspressioonis (Vavouri ja Lehner, 2011).

Hiljuti näidati sekveneerimise abil histoonide säilimist inimese ja esmakordselt ka veise spermi intergeensetes alades, DNA korduselementides, tsentromeeride piirkonnas ning retrotransposoonides (Samans *et al.*, 2014). Samas töös leiti, et nukleosoom on rohkem geenikehadel ja/või promootoritel, mille funktsioon oli seotud signaaliülekanne, valkude ja RNA töötlemise, endomembraanide ning mitokondrite elutegevusega. Nende geenide promootorid ja esimesed eksonid olid enamasti hüpometüleeritud, vihjates transkriptsiooniliselt aktiivsele kromatiinile. Hiljuti näidati närilistes esimest korda seost spermi histoonide taseme muutuste ja embrüonaalse geeniekspressiooni vahel. Histoonidelt protamiinidele üleminek sõltub polü(ADP-riboos) polümeraasidest PARP1 ning PARP2. Nende geenide väljalülitamisel muutus spermides histoonide hulk võrreldes metsiktüüpi hiirte seemnerakkudega ning transkriptoomi analüüs tuvastas geeniekspressiooni erinevusi kahe rakulises embrüos, mil hiires toimub üleminek sügoodi genoomi aktivatsioonile (Ihara *et al.*, 2014). Allareguleeritud geenide seas olid näiteks pluripotentsusfaktorid, ribosoomi-, makromolekulide sünteesi ning raku homeostaasi eest vastutavad geenid. Ülesreguleeritud olid hilisema arengu eest vastutavad geenid, mis preimplantatsioonilises embrüos normaaljuhul ei avaldu (Ihara *et al.*, 2014).

3. Imetaja spermi pinnaproteoom

Spermide arengu, küpsemise ning funktsionaalsuse seisukohalt mängivad olulist rolli spermi pinnavalgud ning nendega toimuvad muutused. Spermi pind osaleb signaalide äratundmises munaraku poolt ning vahendab esmast kontakti munarakuga. Seetõttu analüüsitakse spermi pinnavalke ka võimaliku viljatuse aspektist (Domagala *et al.*, 2007). Seemneraku eripäraks on võrreldes somaatiliste rakkudega organellide-ja tsütoplasmavaesus ning transkriptsiooniline ja translatsiooniline inaktiivsus. Samas on spermi proteoomi kujunemisel oluline vahetu kontakt ümbritseva keskkonnaga. Spermi pinda modifitseeritakse ulatuslikult nii küpsemisel munandimanuses (Aitken *et al.*, 2007) kui ka naissuguteedes kapatsitatsioonil (Gadella *et al.*, 2008). Seetõttu on seemnerakk proteoomika seisukohalt huvitav uurimisobjekt. Seemnerakk sisaldab aga rohkelt membraane, mille hüdrofoobseid valke on keeruline analüüsida (Brewis ja Gadella, 2010).

Koduveise spermi pinnaproteoomi on põhjalikumalt kirjeldatud kahes tandem-mass-spektromeetriaal põhinevas töös (Byrne *et al.*, 2012; Kasvandik *et al.*, 2015). Spetsiifiliste

valgufraktsioonide, nagu seda on pinnavalgud, eraldamiseks kasutatakse rikastusmeetodeid. Näiteks, veise spermi pinnavalke on rikastatud lämmastiku kavitatsioonil, millega eraldatakse membraansed vesiikulid (Byrne *et al.*, 2012) või valkude biotinüleerimise abil (Kasvandik *et al.*, 2015). Viimasel juhul märgistatakse valgud hüdrofiilse biotiiniga, mis hüdrofoobsetest membraanidest läbi ei pääse. Biotinüleeritud valgud püütakse biotiini siduva valgu külge. Seejärel lõigatakse valgud lühikesteks peptiidifragmentideks (Kasvandik *et al.*, 2015). Peptiidide aminohappelised järjestused määratakse tandem-mass-spektromeetria abil ning neile vastavad valgud leitakse andmebaasidest. Kui lämmastiku kavitatsiooni on peetud pigem spermi pea apikaalse piirkonna fraktsioonide rikastamiseks (Flesch *et al.*, 1998), siis biotinüleerimine võimaldab pinnavalgude rikastamist terves seemnerakus (Kasvandik *et al.*, 2015). Mõlemas veise spermi pinnaproteoomi töös on leitud kõige rohkem valkude töötlemise, munarakuga interaktsioonis osalevaid ning raku metabolismiga seotud valke (Byrne *et al.*, 2012; Kasvandik *et al.*, 2015).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

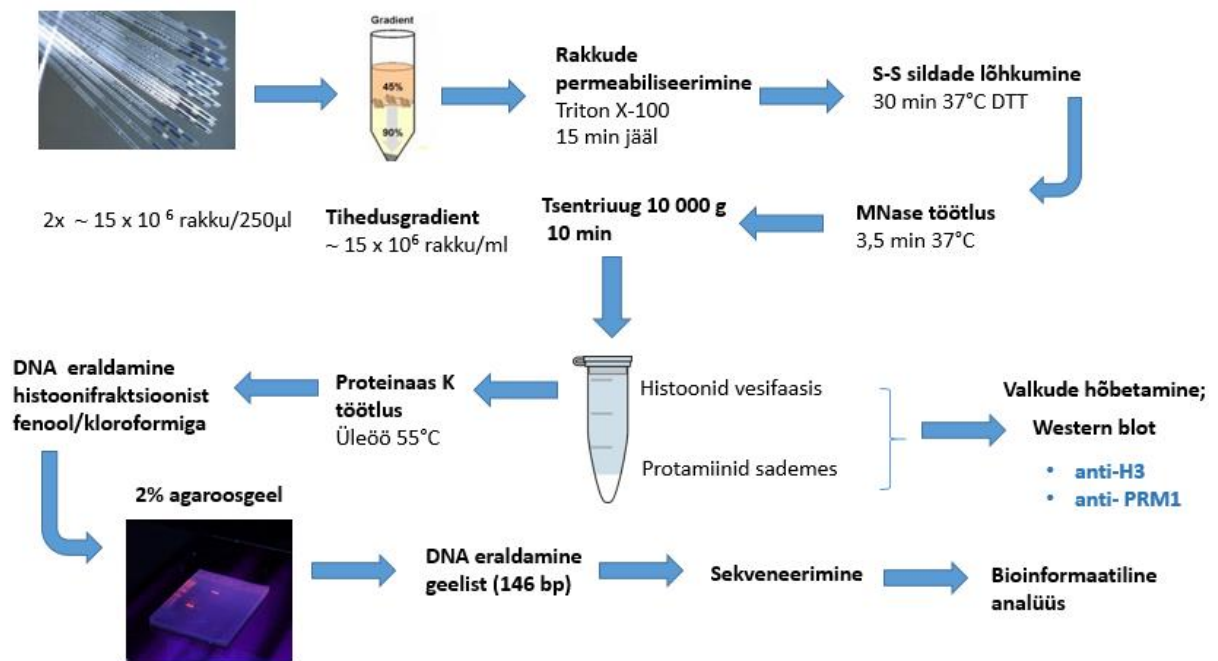
Käesoleva töö eesmärkideks olid:

- tuvastada koduverse spermides histoonseoselised DNA piirkonnad,
- valideerida koduverse spermis pinnavalkude (CPQ, CPVL) lokaliseerimist immunotsütökeemia abil.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Üldine katseskeem

Koduverse külmutatud sperma puhastati tihedusgradiendis. Seejärel permeabiliseeriti rakud Triton X-100 lahuses 15 minuti jooksul jääs. Sadestatud rakke töödeldi valkudevaheliste disulfiidsildade lõhkumiseks 30 minutit 37°C juures DTT (DL-ditiotreitool) lahuses. Mononukleosoomide eraldamiseks inkubeeriti rakke 3,5 minutit ensüümiga *Micrococcal Nuclease* (MNAas) 37°C juures. Seejärel tsentrifugeeriti rakke kümme minutit 10 000 g juures. Selle tulemusel saadi kaks kromatiinfraktsiooni: histoonid vesifaasis ning protamiinid sademes. Tuumavalkude esinemist fraktsioonides kontrolliti valkude sadestamise, hõbedaga värvimise ja Western blot analüüsiga. DNA eraldamiseks valgufraktsioonist töödeldi histoone üleöö 55°C juures proteinaas K lahuses ning järgmisel päeval eraldati DNA fenool/kloroformi töötlemisega ning sadestati. DNA lahutati 2% agarosgeelil, kust lõigati välja 146 bp pikkusele histoonseoselisele DNA-le vastavad fragmendid. DNA eraldati ning sekveneeriti. Bioinformaatiliste meetoditega analüüsiti, millised genoomsete järjestuste klassid on histoonseoselises DNA-s üle- ja alaesindatud. Katseskeem on ülevaatliselt illustreeritud joonisel 6.



Joonis 6. Üldine katseskeem veise spermi kromatiini histoonseoseliste piirkondade tuvastamiseks.

2.2.2 Bioloogiline materjal

Histoonseoseliste piirkondade tuvastamiseks kasutati kana munarebus külmutatud kolme Holstein tõugu pulli seemnerakke algkontsentratsiooniga $\sim 10\text{-}15 \times 10^6$ rakku/250 μl . Külmutatud spermakõrred saadi Eesti Tõuloomakasvatajate Ühistust ning säilitati kuni kasutamiseni vedelas lämmastikus $-196\text{ }^\circ\text{C}$ juures.

Veise pinnavalkude valideerimiseks kasutati kahe Holstein tõugu pulli värsked ejakulaate, mis saadi Eesti Tõuloomakasvatajate Ühistust.

Kõik loomadega seotud katsed on kõõskõlas Euroopa Liidu direktiividega (86/609/EEC) ning katsete tegemiseks on andnud loa Eesti Loomkatseprojekti loakomisjon.

2.2.3 Kromatiini fraktsioneerimine

Kromatiini fraktsioneerimise meetodika aluseks võeti protokoll Samansi töögrupi artiklist (Samans *et al.*, 2014) mida vastavalt vajadusele modifitseeriti. Külmutatud seemnerakud sulatati $37\text{ }^\circ\text{C}$ juures kahe minuti jooksul. Kõrre sisu puhastati BoviPure (Nidacon, Mölndal, Rootsi) 40/80 gradiendilahustes tootja protokoll järgi ning puhastatud rakkude arv määrati loenduskambris (Neubauer, Saksamaa). Saagise suurendamiseks kasutati ühe looma samast ejakulaadist kahte seemnekõrt, mille sisu liideti pärast seemnerakkude gradiendis puhastamist. Kahest kõrrest saadi keskmiselt $12\text{-}16 \times 10^6$ rakku/ml. Rakud permeabiliseeriti 1 ml 0,5% Triton-X (Naxo, Tartu, Eesti) - PBS või 0,1% lüsoletsitiini (*L- α -phosphatidylcholine from egg yolk*) (L4129, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) – 1x PBS lahuses 15 minuti jooksul jääl.

Seejärel sadestati rakud tsentrifuugides kolm minutit 10 000 g juures. Sadet pesti kaks korda 1 ml PBS – 1 mM PMSF (fenüülmetaansulfonüülfluoriid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) lahuses. Valkudevaheliste disulfidsildade lõhkumiseks inkubeeriti rakke 0,5 ml-s PBS - 1 mM PMSF - 10 mM DTT (DL-ditiotreitool) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) lahuses 30 minutit 37°C vesivannis. Inkubatsiooni järel lisati mononukleosoomide eraldamiseks lahusesse 0,5 ml 1,8 mM CaCl₂ ning 40 U (1U/μl) ensüümi *Micrococcal Nuclease* (Thermo Scientific™, Rockford, IL, USA). Rakke inkubeeriti ensümaatilise reaktsiooni optimaalseks toimimiseks 3,5 minutit 37°C kraadi juures. Reaktsioon peatati 60 μl 80 mM EDTA (etüleendiamiintetraatsetaat) lisamisega. Seejärel hoiti proove 15 sekundit jääl ning tsentrifuugiti proove 10 minutit 10 000 g juures. Supernatant (1 ml) viidi puhtasse tuubi.

2.2.4 DNA eraldamine histoonifraktsioonist

Histoonseoselise DNA eraldamiseks lisati supernatandile proteinaas K-d (Naxo OÜ, Tartu, Eesti) lõppkontsentratsioonini 200 μg/ml ning SDS-i (*sodium dodecyl sulfate*; naatriumdodetsüülsulfaat) lõppkontsentratsioonini 0,5%. Proove inkubeeriti 55°C juures üleöö. Järgmisel hommikul lisati lahusele ühekordne kogus fenool:kloroform isoamüülakoholi 25:24:1 (Naxo OÜ, Tartu, Eesti) ning tsentrifuugiti kolm minutit 13 000 g juures. Vesifaas viidi puhtasse 1,5 ml tuubi ning korrati eelnevat protseduuri. Seejärel viidi vesifaas taas puhtasse 1,5 ml tuubi ning lahusesse lisati 1/10 supernatandi kogusest 3M naatriumatsetaati, ühekordne kogus isopropanooli ning 1 μl glükogeeni (5 mg/ml) (#AM9510, Thermo Scientific). Proove hoiti üleöö -20°C juures ning tsentrifuugiti 30 minutit 12 000 g juures temperatuuril 4°C. Seejärel eemaldati vesifaas ning sadet pesti 200 μl-s 70% etanoolis. Proove tsentrifuugiti viis minutit 12 000 g juures temperatuuril 4°C ning supernatandi eemaldamisel alles jäänud sadet kuivatati õhu käes etanooli täieliku aurustumiseni. Sade lahustati 10 μl-s H₂O-s (Millipore Milli-Q). DNA lahutati kaheprotsendisel agarosgeelil TBE (Tris-puhverdatud EDTA) puhvril. Markerina kasutati O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder'it (Thermo Scientific). Agarosgeeli jooksutati 135 V juures 17 minutit. Geeli valgustati UV-s Molecular Imager^R Gel DocTM XR (Bio-Rad) abil ning pildistati Image Lab Software 2.01 (Bio-Rad) abil. Seejärel lõigati 146 bp pikkusele, histoonseoselisele DNA-le vastav fragment skalpelliga geelilt välja. DNA eraldati kasutades NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) *kit*'i protokollil. DNA elueeriti 20 μl-s elueerimispuhvril ja kontsentratsioon mõõdeti fluoromeetriga Qubit 2.0 (Life Technologies). DNA säilitati kuni kasutamiseni -20°C juures.

2.2.5 Valgufraktsioonide analüüs

Histoonide ja protamiinide esinemist valgufraktsioonides kontrolliti kahel meetodil. Esiteks, valkude värvimisel hõbedalahusega (*silver staining*) ja teiseks Western blot meetodil. Selleks

sadestati eraldatud fraktsioonidest valgud, lahutati geelelektroforeesil ning geeli värviti hõbedalahusega. Seejärel hinnati valgufragmente suurusmarkeri järgi või detekteeriti valke spetsiifiliste antikehadega Western blot meetodil.

2.2.5.1 Valkude sadestamine

Valgud sadestati eraldatud valgufraktsioonidest trikloroatsetaathappe (TCA) meetodil. Esmalt lahustati protamiinid 150 µl-s 1M Tris-HCl-s (pH 6,8). Seejärel lisati histoonide ning protamiinide lahustele 40% TCA-d lõppkontsentratsioonini 10% (v/v). Valkude efektiivsemaks sadestamiseks hoiti proove üleöö 4°C juures. Järgmisel hommikul tsentrifugiti proove kümme minutit 17 000 g juures temperatuuril 4°C. Valgusadet pesti TCA eemaldamiseks kaks korda jääkülmas 90% atsetoonis ning tsentrifugiti 17 000 g juures temperatuuril 4°C 10 minutit. Supernatandi eemaldamisel alles jäänud sadet kuivatati õhu käes atsetooni täieliku aurustumiseni. Sadet säilitati kuni kasutamiseni -20°C kraadi juures.

2.2.5.2 Valkude geelelektroforees ja visualiseerimine hõbedaga värvimise meetodil

Sadestatud tuumavalgud suspendeeriti 15 µl-s kahekordses tritsiini proovipuhvris (1M Tris pH 6,8; 2,4 ml glütserool; 0,8 g SDS; 2 mg Coomassie sinine G-250; 0,31 g DTT; H₂O) ning kuumutati viis minutit 95°C juures. Valgud lahutati 18% SDS-polüakrüülamiidgeelis. Histonifraktsioonist kanti geelile 15 µl proovi, mis sisaldas ligikaudu kümne miljoni raku valgumaterjali ning protamiinifraktsioonist 7,5 µl. Geele jooksutati poolteist tundi 40 V, seejärel üks tund 60 V ning kaks tundi 80 V, kasutades Bio-Rad MiniProtean II seadet. Jooksutuslahustena kasutati ühekordset katoodipuhvrit (6,05 g Tris; 8,96 g tritsiin; 0,5 g SDS; H₂O) ning ühekordset anoodipuhvrit (Tris base, H₂O, pH 8,9). Lahutatud valkude detekteerimiseks kasutati ProteoSilver Stain Kit (Sigma-Aldrich, Saksmaa) lahuseid tootja protokoll järgi. Valgubändide molekulmassi hinnati suurusmarkeri PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (#26619, Thermo Scientific) järgi.

2.2.5.3 Western blot analüüs

Sadestatud tuumavalgud suspendeeriti 30 µl-s tritsiini proovipuhvris ning kuumutati 95°C juures 5 minutit. Seejärel kanti valgumaterjal arvestatuna kolme miljoni raku kohta 18% SDS-polüakrüülamiidgeelile. Geeli jooksutati üks tund 40 V, seejärel üks tund ja 20 minutit 80 V pingel. Jooksutuslahustena kasutati ühekordset katoodipuhvrit (6,05 g Tris; 8,96 g tritsiin; 0,5 g SDS; H₂O) ning ühekordset anoodipuhvrit (Tris base; H₂O; pH 8,9). Valgud kanti üle nitrotselluloosist membraanile (põori läbimõõt 0,2 µm; Schleicher & Schuell, Saksamaa) ning polüvinülideenfluoriidist membraanile (PVDF) (põori läbimõõt 0,2 µm; Bio-Rad, CA, USA). Selleks kasutati poolkuiva (*semi-dry*) ülekande meetodit. Esmalt immutati membraane vastavalt vees (nitrotselluloos) või metanoolis (PVDF) 30 minutit 4°C juures loksutil.

Paralleelselt märjati filterpabereid 45° kraadise nurga all ülekandepuhvris (48 mM Tris; 39 mM glütsiin pH 9,2; 20% metanool; 0,0375% SDS) kuni täieliku märgumiseni. Lisaks immutati geele pesemiseks kaks korda 15 minutit ülekandepuhvris 4°C juures loksutil. Pärast 30 minuti möödumist asetati metanoolis või vees immutatud membraanid ülekandepuhvrisesse ning hoiti 20 minutit 4°C juures loksutil. Valkude ülekandmiseks kasutati Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, CA, USA) süsteemi. Ülekandeks voolutati valke üks tund 20 V juures. Järgnevalt pesti membraane viis minutit 10 ml 1x PBS-Tween-20 (PBST) puhvris ning blokeeriti 5% lõssilahuses (*non-fat milk*) (5 g lõssipulbrit, 100 ml 1x PBST) üks tund 4°C juures loksutil. Blokeerimislahus pesti maha, leotades membraane kaks korda viis minutit 1x PBST-s. Histoonide ja protamiinide detekteerimiseks inkubeeriti membraane primaarsete antikehade lahjendustega üleöö 4°C juures loksutil. Histoonide detekteerimiseks kasutati küülikus valmistatud anti-histoon H3 antikeha (*Rabbit polyclonal antibody*, ab18521, Abcam, UK) lahjendusel 1:500 5% lõssilahuses. Protamiine detekteeriti hiire valmistatud protamiin 1 (PRM1) vastase antikehaga (*Mouse polyclonal antibody*, ABIN519290, Abnova, Taiwan) lahjendusel 1:500 5% lõssilahuses. Järgmisel päeval pesti membraane kaks korda viis minutit 1x PBST-s, millele järgnes inkubatsioon sekundaarse antikeha lahusega toatemperatuuril 2 h 40 minutit. Histoonide detekteerimiseks kasutati kitses tehtud küüliku vastast mädarõika peroksidaasiga konjugeeritud sekundaarse antikeha (*Goat anti-Rb IgG, horseradish peroxidase*, HRP, ab97051, Abcam) lahjendust 1:5000 5% lõssilahuses. Protamiinide tuvastamiseks kasutati kitses tehtud hiire vastast mädarõika peroksidaasiga konjugeeritud (*Goat anti-mouse IgG*, HRP, sc-2005, Santa Cruz) antikeha 5% piimalahuses. Pärast inkubatsiooni pesti membraane kaks korda viis minutit PBST-s. Signaali võimendamiseks kasutati Amplified Opti-4CN Substrate Kit (170-8238, Bio-Rad, CA, USA) lahuseid tootja protokoll järgi. Pärast amplifikatsioonietappi inkubeeriti membraane streptavidiin-HRP konjugeeritud antikehadega lahjendusel 1:1000 5% piimalahuses loksutil 30 minutit. Seejärel pesti membraane kaks korda viis minutit PBST-s. Kolorimeetriliseks detekteerimiseks kasutati *kit*'i visualiseerimislahuseid tootja protokoll järgi ja Bio-Rad GEL DOC XR+ Imager'i seadet.

2.2.6 Histooseliste DNA piirkondade sekveneerimine

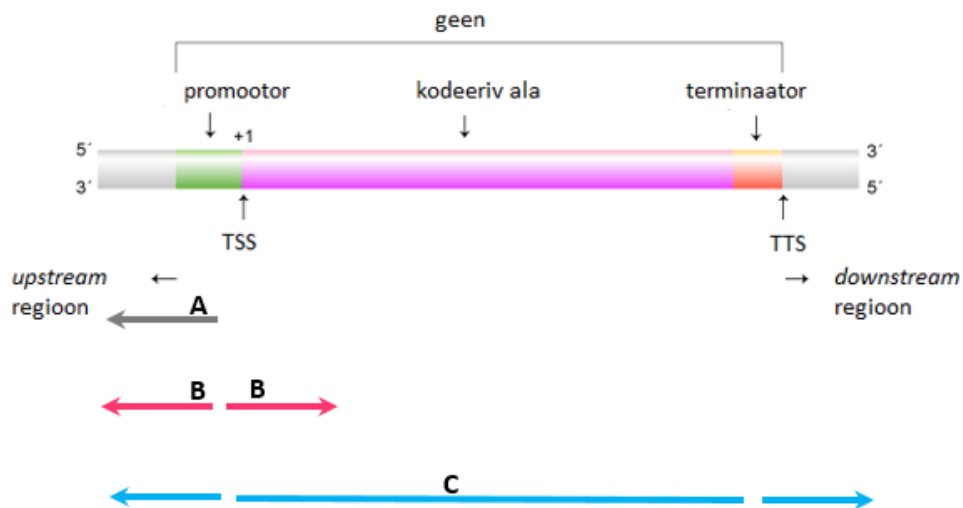
Histooseliste DNA piirkondade sekveneerimiseks kasutati kolme pulli histoonifraktsioonist eraldatud DNA-d. DNA raamatukogud valmistas ette Olga Žilina TÜ MRI biotehnoloogia õppetoolist. Raamatukogude tegemisel kasutati TruSeq® Nano DNA Library Prep (Illumina) Kit'i järgides tootja protokoll. Raamatukogu proovide kontsentratsioone mõõdeti fluoromeetri Qubit® 2.0 (Life Technologies) abil ning fragmentide kvaliteedi määramiseks kasutati Agilent

2200 TapeStation süsteemi (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Sekveneerimine teostati Eesti Biokeskuses Illumina NextSeq500 masinal. Proovid sekveneeriti fragmendi ühest otsast (*single read*) 76 bp ulatuses.

2.2.7 Bioinformaatiline analüüs

Bioinformaatilise analüüsi teostas Lauris Kaplinski TÜ MRI bioinformaatika õppetoolist. Ülevaatlisk skeem bioinformaatilise analüüsi etappidest on toodud lisas 1. Esmalt joondati FastQ formaadis üksiklugemid koduveise genoomi bosTau8 (GenBank ID: GCA_000003055.4) vastu kasutades programmi BowTie2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>) vaikimisi parameetritega. Iga proov joondati eraldi, lisaks tehti joondus kõigi kolme proovi ühendatud lugemitega. Proovi joondusest leiti suure lugemite katvusega regioonid (piigid) kasutades programmi MACS 1.4.2 (<https://github.com/taoliu/MACS>) vaikimisi parameetritega. bosTau8 RefSeq geeniannotatsiooni fail laaditi alla UCSC kodulehelt (<https://genome.ucsc.edu>). Perl skripti abil leiti geenid, mis ise või millega külgnev regioon kattus vähemalt ühe piigiga. Selleks loeti annotatsioonist iga transkripti algus- (TSS) ja lõpp- (TTS) koordinaadid kromosoomil ning nendest arvutati huvipakkuva regiooni algus- ja lõppkoordinaadid. Kui vähemalt üks piik langes täielikult või osaliselt sellesse vahemikku, siis loeti geen edasises analüüsis potentsiaalselt histoonseoseliseks. Kuna polnud üheselt teada, kui kauged piirkondi tuleb arvestada, prooviti läbi järgmised regioonid:

- 1000, 2000, 3000, 5000, 10 000, 20 000 ja 50 000 bp transkriptsiooni algussaidist (TSS) *upstream* regiooni suunas (Joonis 7, A, hall nool),
- 1000, 2000, 3000, 5000, 10 000, 20 000 ja 50 000 bp TSS-st *upstream* kuni sama palju TSS-st *downstream* suunas (Joonis 7, B, roosad nooled),
- 1000, 2000, 3000, 5000, 10 000, 20 000 ja 50 000 bp TSS-st *upstream* regiooni kuni sama palju transkriptsiooni lõppsaidist (TTS) *downstream* regiooni suunas, hõlmates ka kogu geeni (Joonis 7, C, sinised nooled).



Joonis 7. Skeem analüüsitud geenipiirkondadest.

(http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/26/1005.png järgi).

Iga regioonitüübi jaoks leiti kõigepealt kõik potentsiaalselt histoonseoselised geenid individuaalsete proovide jaoks eraldi ning seejärel ühisosa geenidest, mis kattusid piikidega kõigi kolme proovi puhul. Nii leitud konsensusgeenidega teostati ülesindatuse analüüs kasutades programmi g:Profiler (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/index.cgi>). Vaadati ülesindatust järgmistes kategooriates: GO (*gene ontology*) bioloogiline protsess, GO molekulaarne funktsioon, mirBASE mikroRNAd, ja KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) biokeemilised rajad.

Selleks, et leida piigid, mis kattuvad kordusjärjestustega koostati kõigepealt veise genoomi 16-meeride loend programmiga GenomeTester4 (<http://bioinfo.ut.ee/gtester4>). Seejärel leiti iga piigi kõigi 16-meeride jaoks nende arv genoomis ja sellest piigi järjestuse keskmine korduvus. Analüüsist kõrvaldati need piigid, mille keskmine korduvus oli suurem selle piigi rikastatusest.

Imprinditud inimese geenide nimekiri laaditi alla Geneimprint veebilehelt (<http://www.geneimprint.com>). Inimese geene kasutati seetõttu, et veise *imprinditud* geene on teada vähe.

2.2.8 Veise spermi pinnavalkude valideerimine immunotsütotokeemia abil

Hiljuti avaldati töö veise spermi pinnavalkude tuvastamisest vedelikkromatograafia-mass-spektromeetria meetodil (Kasvandik *et al.*, 2015). Valkude asukoha valideerimiseks spermi plasmamembraanil valiti välja kaks valku, mida rikastusanalüüsi järgi esines spermi pinnal rohkelt: CPVL (*carboxypeptidase, vitellogenic-like*) ja CPQ (*carboxypeptidase Q*).

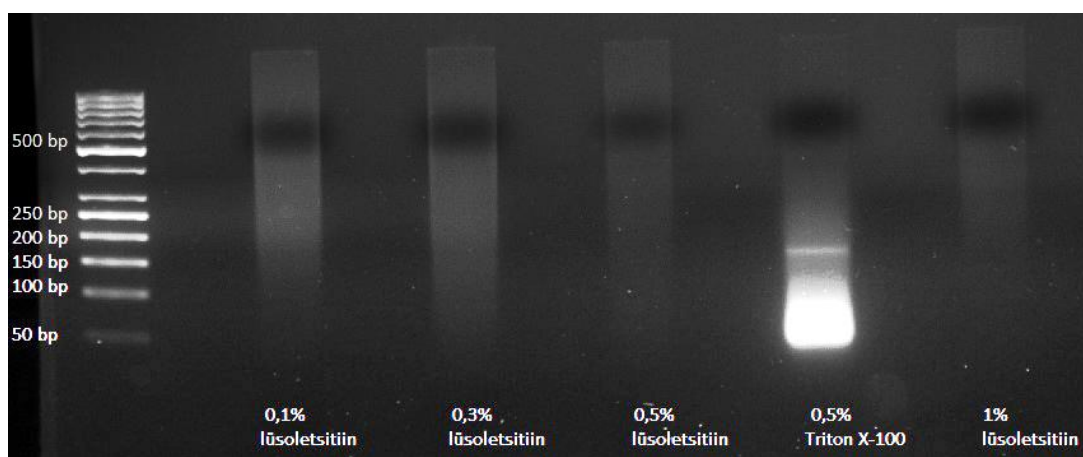
Valkude valideerimiseks kasutati värsket pulli spermat, mida pesti kolm korda 1x PBS-s ning tsentrifuugiti pööretel 500 g 10 minutit. Puhastatud rakke ei permeabiliseeritud ega lüüsitud rakupinna intaktsuse säilitamiseks. Rakusademed kanti puhtale alusklaasile ning kuivatati kümme minutit 37°C juures. Seejärel inkubeeriti sperme paralleelselt primaarse antikeha (1:50) ja 50-kordse blokeerimispeptiidi lahjendustega toatemperatuuril üks tund. Blokeerimispeptiidi abil hinnati antikehade spetsiifilisust. CPVL-i puhul kasutati primaarse antikehana kitses tehtud polükloonaalset antikeha (*Goat polyclonal antibody*, Santa Cruz Biotechnology, sc-10477; Dallas, TX, USA) ning blokeerimispeptiidi CPVL *Blocking Peptide* (Santa Cruz Biotechnology, sc-104177 P, TX, USA). CPQ puhul kasutati küülikus tehtud polükloonaalset antikeha (*Rabbit polyclonal antibody*, Aviva System Biology, San Diego, CA, USA) ning blokeerimispeptiidi CPQ *Blocking Peptide* (33R-9484, Fitzgerald, MA, USA). Pärast inkubatsiooni pesti sperme kolm korda 1 x PBS-s. Seejärel kanti proovidele sekundaarse antikeha-konjugeeritud fluorokroomi lahjendused (1:2000). CPQ puhul kasutati kitses tehtud küülikuvastast antikeha (*Goat anti-rabbit antibody – Alexa 594*, Molecular Probes, A-21442; OR, USA) ning CPVL-i puhul eeslis tehtud kitsevastast antikeha (*Donkey anti-goat antibody - Alexa 594*, Molecular Probes, OR, USA). Inkubatsiooni järgselt korrati pesuetappe 1x PBS-s. Pestud sperme värviti viie minuti jooksul fluorestseeruva nukleiinhapet siduva värviga DAPI (4,6-diamidiino-2-fenüülindool). Seejärel sulundati klaasid värvide kaitseks tuhmumise eest sulundusreagentidega (ProLong Gold Antifade Mountant, Molecular Probes, OR, USA). Tulemusi analüüsiti fluorestsentsmikroskoobiga Olympus BX50, kasutades objektiive UplanFI 40x/0.75 ja 100x/1.30 Oil Iris ning pildistati aparaadiga DP50-CU Photographing System (Olympus, Tokyo, Jaapan).

2.3 Tulemused

2.3.1. Kromatiini fraktsioneerimine

Seemnerakke permeabiliseeriti/lüüsi esialgu Samans *et al.*, 2014 protokoll järgi 15 minutit jääb 0,1% lüsoletsitiini (L-alfa-lüsofosfatidüülkoliin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) – 1x PBS lahuses. Antud protokoll järgi töötas rakkude permeabiliseerimine/lüüs ebastabiilselt. Ainult osadel juhtudel saadi 146 bp pikkused DNA fragmendid. Lüsoletsitiiniga inkubeeritud rakke kasutati ka MNaasi töötamise aja optimeerimiseks (Lisa 1). Rakkude lüüsimise efektiivsust hinnati eelmainitud tingimustel mikroskoobis. Selgus, et inkubatsioon 0,1% lüsoletsitiiniga ei andnud oodatud tulemust. Seega otsustati rakkude lüüsi hindamiseks kasutada tõusvat lüsoletsitiini kontsentratsioonirada ning võrrelda seda Triton X-100 efektiivsusega (Joonis 8). Varasemalt on 0,5% Triton X-100 lahust kasutatud inimese spermide lüüsimiseks (Zalenskaya *et al.*, 2000). Mikroskopeerimisel ei täheldatud lüsoletsitiiniga töödeldud spermide

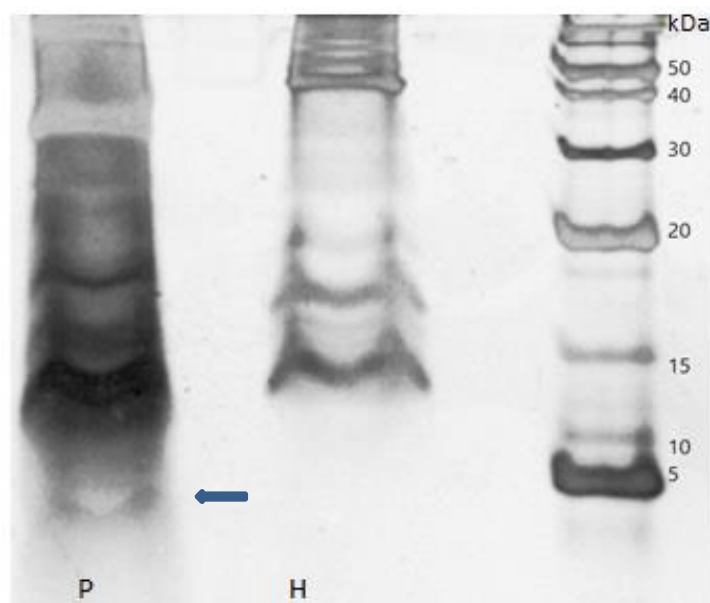
morfoloogias mingeid muutusi. Spermide intaktsus säilis 15-minutilise töötuse järgselt isegi 1% lüsoletsitiini juures. Seevastu Triton X-100 lahusega töödeldud rakkudel nähti pea ja saba eraldumist (Sillaste avaldamata andmed). Lüüsilahustega töödeldud spermidest eraldati DNA ning lahutati geelelektroforeesil. Lüsoletsitiiniga inkubeeritud rakkudest eraldatud DNA puhul ei täheldatud 146 bp pikkust fragmenti ühegi kasutatud kontsentratsiooni puhul. Rakkudest, mida töödeldi 0,5% Triton X-100-ga, eraldatud DNA moodustas selge 146 bp pikkuse fragmendi (Joonis 8). Seetõttu otsustati histoonseoseliste DNA piirkondade väljaselgitamiseks, rakkude permeabiliseerimiseks/lüüsimiseks kasutada 0,5% Triton X – 100 lahust. Eraldatud 146 bp pikkuseid DNA fragmente kasutati järgmistes töö etappides.



Joonis 8. Rakkude permeabiliseerimise/lüüsimise hindamine geelelektroforeesi abil. Rakkude arv igas katses on ~ 1 mln.

2.3.2 Valkude geelelektroforees ja värvimine hõbedaga

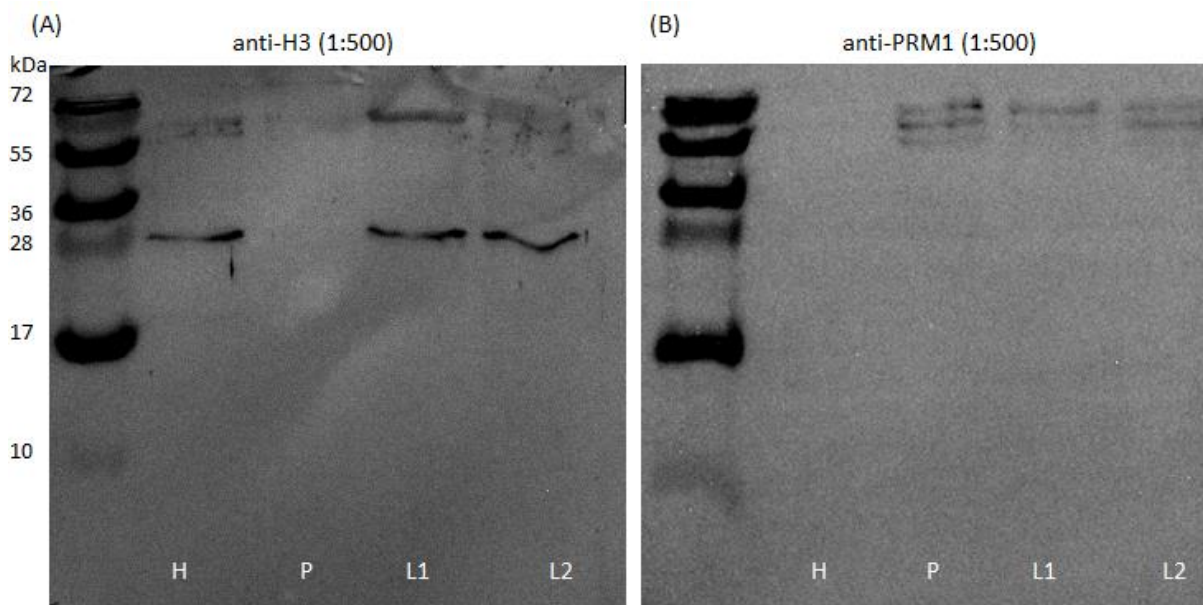
Veise protamiini molekulmass on hinnanguliselt 6,8 kDa (UniProt, www.uniprot.org). Histoonide molekulmass varieerub sõltuvalt valgust vahemikus 11 kDa (H4) kuni 20 kDa (H1) (UniProt). Sellesse vahemikku jäävad ka hiire ja inimese testisespetsiifilised histoonid. Käesolevas katses tuvastati histoonifraktsioonis selged valgutriibud vahemikus 15 kuni 20 kDa (Joonis 9). Madalama molekulmassiga fragmente ei esinenud, kuid alates 40 kDa olid valgufragmendid taas tuvastatavad. Protamiinifraktsioonis oli tuvastatav ~5 kDa valgutriip, mis histoonifraktsioonist puudus (joonis 9 sinine nool). Samuti nähti valgufragmente 15 kDa-st kõrgemal. Kokkuvõtvalt, geelelektroforeesil saadud valkude lahutamisel nähti protamiinide ja histoonide molekulmassidele vastavaid valke. Samas ei ole antud meetod spetsiifiline väitmaks, et tegu on protamiine või histoone sisaldavate valgufraktsioonidega.



Joonis 9. Valgufraktsioonide lahutamine geelelektroforeesil ja visualiseerimine *silver stain* meetodil. Protamiinide fraktsioonis (P; 5 mln raku materjal) on tuvastatav ~5 kDa suurune valgutriip (sinine nool). Histoonide fraktsioonis (H; 10 mln raku materjal) ei esine madalmolekulaarseid valke. See-eest on seal näha valgutriipe vahemikus 15 – 20 kDa, mis tühtib histoonide molekulmassi vahemikuga.

2.3.3 Western blot analüüs

Valgufraktsioonisegudest spetsiifiliste valkude identifitseerimiseks kasutati Western blot analüüsi. Abcam'i kodulehel (www.abcam.com) kirjeldatud histoonide Western bloti protokoll järgi on 0,2 µl läbimõõduga nitrotselluloosist membraan histoonide seondumiseks optimaalne. Samansi töögrupp kasutas aga PVDF membraani (Samans *et al.*, 2014). Hindamaks membraanide efektiivsust, kasutati antud katses valkude ülekandmiseks mõlemat membraani 0,2 µm-se poori läbimõõduga. Histoonivastased antikehad kanti nitrotselluloosmembraanile ja protamiinivastased antikehad PVDF membraanile. Selgus, et histoonivastased antikehad töötasid nitrotselluloosmembraanil ning protamiinivastased antikehad PVDF membraanil. Kontrollprovidena kasutati gradiendis puhastatud veise seemnerakkude lüsaati ning gradiendis puhastamata seemnerakkude lüsaati. Histoon H3 spetsiifiline antikeha fragment oli tuvastatav 28 kDa juures nii histoonifraktsioonis kui ka mõlemas kontrollproovis, kuid puudus protamiinifraktsioonis (Joonis 10A).



Joonis 10. Western blot analüüs (A) anti-H3 ja (B) anti-PRM1 antikehadega lahjendusel 1:500. Proovide tähised: H (histoonifraktsioon), P (protamiinifraktsioon) L1, (gradiendis puhastatud seemnerakkude lüsaat), L2 (gradiendis puhastamata seemnerakkude lüsaat).

Antud katses tuvastati ka kõrgmolekulaarsed valgutriibud 72 kDa juures, kusjuures protamiinireal olev fargment oli võrreldes histoonirea ning kontrollidega tunduvalt nõrgem. PRM1 spetsiifilised valgufragmentid esinesid protamiinifraktsioonis ning kontrollproovides 55 ja 72 kDa juures (Joonis 10B). Histoonide fraktsioonis ei esinenud ühtegi PRM1 spetsiifilist fragmenti. Kokkuvõtvalt, antud meetodikaga saab eristada protamiine ja histoone.

2.3.4 Histoonseoseliste piirkondade sekveneerimine ja bioinformaatiline analüüs

Sekveneerimisel saadi iga pulli kohta ~14 000 000 – 15 000 000 lugemit (*read*'i). Keskmiselt 95% lugemitest õnnestus joondus veise referentsgenoomile. Bioinformaatilisel analüüsil leiti kõigi kolme pulli genoomi histoonidega rikastatud piirkondade (piikide) arvud ja keskmised pikkused (Tabel 1). Proovidele ühiseid piike oli 3644, piikide keskmiseks pikkuseks oli 670 bp.

Tabel 1. Histoonidega rikastatud piirkondade (piikide) arvud ja keskmised pikkused.

	Histoonseoseliste piikide arv	Piikide keskmine pikkus (bp)
Veis 1	8419	533
Veis 2	12097	493
Veis 3	12157	483
Ühised	3644	670

Järgmiseks hinnati histoonseoselises DNA-s GC sisaldust. Koduveise täisgenoomi GC sisaldus bosTau8 (GenBank ID: GCA_000003055.4) järgi on 41%. Käesolevas töös selgus, et kõigi kolme veise histoonseoselise DNA (kõigi sekveneerimislugemite) keskmine GC sisaldus oli 48%. Histoonidega rikastatud piirkondades (piikides) oli keskmine GC sisaldus 51%.

Seejärel vaadati, kas piigid esinevad peamiselt geenide läheduses või intergeensetel aladel. Selleks arvutati vaadeldud regioonide ehk geenide ümbruste summaarsed pikkused (bp) ja leiti nende suhe kogu genoomi pikkusesse ning võrreldi seda piikide suhtelise arvuga nendes geeniumbrustes. Tulemusi illustreerib alljärgnev Tabel 2.

Tabel 2. Histoonidega rikastatud piirkond genoomis.

Regioon	Regioonide kogupikkus genoomis (%)	Piikide arv kõikidest piikidest (%)
us_1000	0,6	0,4
us_2000	1,1	0,8
us_3000	1,7	1,2
us_5000	2,8	2,0
us_10000	5,5	3,7
us_20000	11,0	7,4
us_50000	27,5	18,9
us_1000_ds_1000	1,1	1,0
us_2000_ds_2000	2,2	1,8
us_3000_ds_3000	3,3	2,6
us_5000_ds_5000	5,5	4,1
us_10000_ds_10000	11,0	7,8
us_20000_ds_20000	22,0	15,2
us_50000_ds_50000	55,0	38,4
us_1000_gene_ds_1000	24,8	20,5
us_2000_gene_ds_2000	25,9	21,3
us_3000_gene_ds_3000	27,0	22,2
us_5000_gene_ds_5000	29,2	23,2
us_10000_gene_ds_10000	34,7	27,4
us_20000_gene_ds_20000	45,7	34,8
us_50000_gene_ds_50000	78,8	57,8

Näiteks, regioonid, mis olid 1000 bp TSS-st *upstream* regiooni suunas, moodustasid kogu genoomi pikkusest 0,6%. Nendele regioonidega kattuvad piigid moodustasid kõikidest leitud piikidest 0,4%. Regioonide suhteline pikkus oli veidi suurem piikide suhtelisest arvust kõikide vaadeldud regioonide puhul, mis viitab asjaolule, et histoonseoselised piirkonnad esinesid sagedamini pigem intergeensetel aladel.

Seejärel leiti annoteeritud geenid, mis kas ise või mille naabrus kattus histoonidega rikastatud piirkondadega ning analüüsiti nende geenide ontoloogiat ja osalust ainevahetusradades. Tulemused on toodud Tabelis 3.

Tabel 3. Olulised geenikategooriad eri pikkusega regioonide jaoks.

Genoomi piirkond	GO/mirBase/KEGG	Kategooria	p-väärtus
us_1000_gene_ds_1000	<u>GO:0006814</u>	sodium ion transport (BP)	1.85e-02
	<u>MI:hsa-miR-570</u>	MI:hsa-miR-570 (MI)	1.46e-02
us_2000_gene_ds_2000	<u>GO:0006814</u>	sodium ion transport (BP)	4.14e-02
	<u>MI:hsa-miR-570</u>	MI:hsa-miR-570 (MI)	3.42e-02
us_3000_gene_ds_3000	<u>MI:hsa-miR-570</u>	MI:hsa-miR-570 (MI)	4.36e-02
us_5000	<u>GO:0006702</u>	androgen biosynthetic process (BP)	6.84e-03
us_5000_ds_5000	<u>GO:0006702</u>	androgen biosynthetic process (BP)	2.41e-02
	<u>MI:bta-let-7d</u>	MI:bta-let-7d (MI)	4.10e-02
	<u>MI:bta-let-7c</u>	MI:bta-let-7c (MI)	4.53e-02
us_10000_gene_ds_10000	<u>MI:mmu-miR-466d-3p</u>	MI:mmu-miR-466d-3p (MI)	4.77e-02
us_20000	<u>KEGG:03020</u>	RNA polymerase (KE)	2.38e-02
us_20000_ds_20000	<u>GO:0030261</u>	chromosome condensation (BP)	4.98e-02
	<u>MI:hsa-miR-508-5p</u>	MI:hsa-miR-508-5p (MI)	3.37e-02
us_50000	<u>GO:0070098</u>	chemokine-mediated signaling pathway (BP)	1.97e-02
	<u>GO:0048248</u>	CXCR3 chemokine receptor binding (MF)	2.44e-02
	<u>MI:hsa-miR-625</u>	MI:hsa-miR-625 (MI)	2.34e-02
us_50000_ds_50000	<u>GO:0030261</u>	chromosome condensation (BP)	1.91e-03

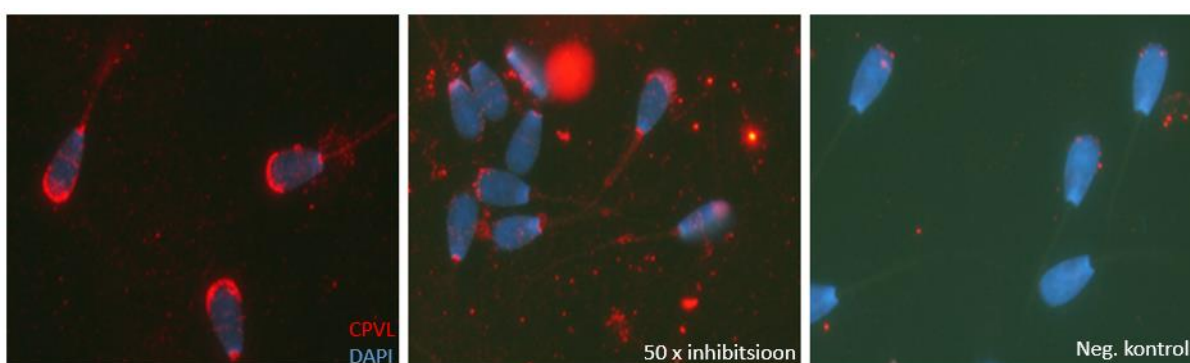
Edasi vaadati, millised *imprinditud* geenid asuvad histoonseoselistes piirkondades. Tulemused on toodud alljärgnevas Tabelis 4.

Tabel 4. Paternaalselt *imprinditud* geenide nimekiri kõikidest vaadeldud regioonidest.

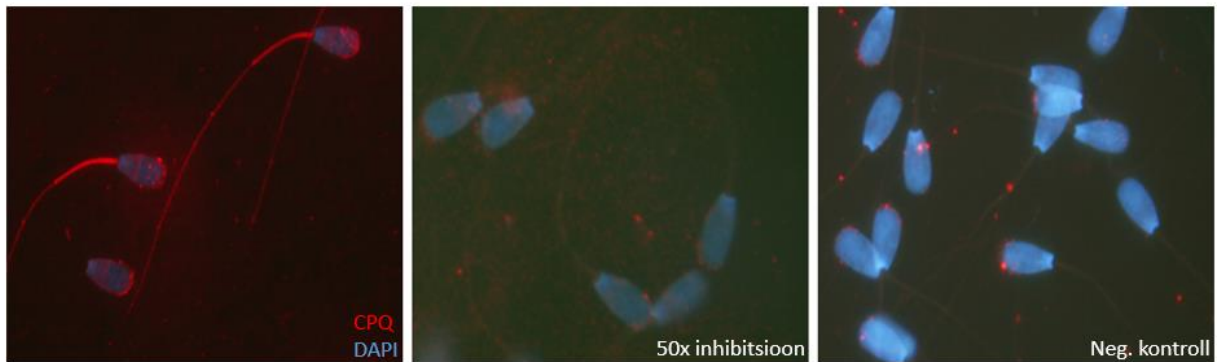
Geeni nimi	Valgu nimi
APBA1	<i>amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 1</i>
ASB4	<i>ankyrin repeat and SOCS box containing 4</i>
COMMD1	<i>copper metabolism (Murr1) domain containing 1</i>
COPG2	<i>coatomer protein complex, subunit gamma 2</i>
GDAP1L1	<i>ganglioside induced differentiation associated protein 1-like 1</i>
MEST	<i>mesoderm specific transcript</i>
NDN	<i>necdin homolog</i>

2.3.5 Veise sperm pinnavalkude valideerimine immunotsütökeemia abil

Veise sperm pinnavalkude valideerimiseks valiti välja kaks valku: CPVL ning CPQ. Tulemused kinnitasid mõlema valgu olemasolu töötlemata spermidel. CPVL esines sperm pea apikaalses osas mütsitaolise struktuurina, ent signaal oli tuvastatav ka ekvatoriaalpiirkonnas ning sperm kaelas (Joonis 10A). Inhibitsioon blokeerimispeptiidiga nõrgestas valgu signaali, ent täielikult ära ei kaotanud (Joonis 10B). CPQ spetsiifilised antikehad andsid tugeva signaali sperm sabas, eelkõige selle keskosas. Töötlus blokeerimispeptiidiga kaotas valgu signaali peaaegu täielikult (Joonis 11B). Negatiivsed kontrollid ei andnud signaali kummagi valgu puhul (Joonis 10, 11C).



Joonis 10. CPVL lokaliseerimise tuvastamine immunotsütökeemia meetodil. (A) CPVL spetsiifiliste antikehade signaal sperm pea apikaalses osas, ekvatoriaalpiirkonnas ning kaelas (punane). (B) 50x blokeerimislahuse mõju signaali tugevusele. (C) Negatiivne kontroll.



Joonis 11. CPQ lokalisatsiooni tuvastamine immunotsütokeemia meetodil. (A) CPQ spetsiifiliste antikehade tugev signaal spermi saba keskosas. **(B)** 50x blokeerimislahuse mõju signaalile saba piirkonnas. **(C)** Negatiivne kontroll.

2.4 Arutelu

Seemnerakkude arengu käigus toimuvad muutused on eelduseks funktsionaalsete spermide moodustumisele. Lisaks morfoloogilistele muutustele toimub seemnerakus ka ulatuslik kromatiini modifitseerimine, mille käigus vahetatakse tuumas somaatilised histoonid testisespetsiifiliste histoonide, üleminekuvalkude ning lõpuks protamiinide vastu (Braun, 2001). Siiski säilib spermi kromatiinis osa somaatilistest histoonidest. Seda nähtust on seostatud varajase embrüonaalse geeniekspressiooniga (Gardiner-Garden *et al.*, 1998; Hammoud *et al.*, 2009; Ihara *et al.*, 2014) ja *imprintinguga* (Hammoud *et al.*, 2009), mistõttu spermi tuumas konserveerunud histoonide uurimine pakub suurt huvi.

Käesolevas magistritöös analüüsiti histoonidega seotud piirkondi koduverse seemnerakus. Selleks fraktsioneeriti spermi kromatiin, millest eraldati ja sekveneeriti histoonseoseline DNA. Eksperimentaalse töö aluseks võeti protokoll hiljuti avaldatud tööst koduverse spermi histoonseoselistest piirkondadest (Samans *et al.*, 2014). Käesolevas töös muudeti meetodi kahte olulist etappi ning optimeeriti protokoll, millest tulenevalt võivad kahe töö tulemused üksteisest erineda. Samansi uurimisgrupp ei kirjelda seemnerakkude puhastamist tihedusgradiendis ega teistel meetoditel. Seetõttu on võimalik, et nende kasutatud proovid sisaldasid somaatilisi rakke ning ebaküpsid või kahjustunud sperme. Võrdlemaks puhastatud ja puhastamata rakkudest tingitud erinevusi histoonseoselise DNA kvaliteedis, fraktisoneeriti käesolevas magistritöös ka tihedusgradiendis puhastamata seemnerakke. Puhastamata spermidest eraldatud DNA tekitas geelelektroforeesil tugevama intensiivsusega, laia 150-300 bp pikkuse DNA bändi, mis tõenäoliselt sisaldas lisaks seemneraku histoonseoselisele DNA-le ka somaatiliste rakkude nukleosomaalset DNA-d (Sillaste avaldamata andmed). Somaatiliste rakkude kromatiini poolt tekitatud müra minimaliseerimiseks, otsustati käesolevas magistritöös seemnerakud eelnevalt tihedusgradiendis puhastada. Teise olulise erinevusena muudeti

lüüsi protokoll. Samans *et al.*, 2014 lüüsisid rakke 0,1% lüsoletsitiiniga 15 minutit jääl, ent antud protokoll andis käesolevas magistritöös ebastabiilseid tulemusi. Lüsoletsitiini täpne toime rakkude permeabiliseerimisel/lüüsimisel on teadmata. Looduslikul kujul esineb seda teatud määral rakumembraanides. Arvatakse, et see osaleb membraanide destabiliseerimises, paigutades fosfolipiide kihis ümber. Närilistel on näidatud, et 20 mM lüsoletsitiin kahjustab peensoole limaskesta rakke, muutes need läbitavaks kuni 70 kDa suurustele molekulidele (Tagesson *et al.*, 1985). Tootja kodulehe (Sigma-Aldrich; www.sigmaaldrich.com, L4129) järgi on lüsoletsitiin tundlik oksüdeerumise ja niiskuse suhtes, mistõttu on tõenäoline, et säilitustingimused ei olnud sobivad ning keemilised muutused põhjustasid lüsoletsitiini kvaliteedi langust. Ebaefektiivset rakkude lüüsi võiks seletada ka looduslikku päritolu lüsoletsitiini heterogeensusega. Lüsoletsitiini efektiivsus sõltub nii rakumembraani tüübist kui ka lüsoletsitiini rasvhappejäägi pikkusest ning iseloomust. Antud magistritöös kasutati munarebust pärinevat lüsoletsitiini. Seda, millist lüsoletsitiini kasutas Samansi töögrupp, ei ole autorid kirjeldanud. Seega võivad kahe protokolliga vahelised erinevused olla tingitud ka konkreetse lüsoletsitiini tootja valikust. Samas on varasemalt inimese spermidega näidatud, et looduslikku päritolu lüsoletsitiin vähendab seemnerakkude liikuvust, ent ei kahjusta nende rakumembraane (Keller *et al.*, 1997). Kuna eelnevates töodes on nii inimese (Zalenskaya *et al.*, 2000) kui ka metssea (Jakop *et al.*, 2009) spermide permeabiliseerimiseks kasutatud Triton X-100 lahust, otsustati antud magistritöös võrrelda 0,5% Triton X-100 efekti lüsoletsitiini toimega, kasutades viimase puhul tõusvat kontsentratsioonirida. Katse tulemustest selgus, et Triton X-100 on rakkude permeabiliseerimiseks/lüüsimiseks efektiivne, ent lüsoletsitiin ei töötnud isegi 1% kontsentratsiooni juures (Joonis 8). Varasemalt on näidatud ka, et inimese seemnerakkude lüüsimiseks on võrreldes Triton X-100 töötlusega vaja kümme korda kõrgemat lüsoletsitiini kontsentratsiooni (Morozumi *et al.*, 2006). Seetõttu otsustati rakke edapsidi lüüsida 0,5% Triton X-100 lahusega 15 minuti jooksul jääl.

Tuumavalkude olemasolu ning fraktsioonide puhtust kontrolliti valguga tasemel kahel meetodil. Esiteks, sadestatud valkude värvimisel hõbedaga ning hinnates suurusmarkeri järgi. Teiseks, histooni – ja protamiinispetsiifiliste antikehade abil. Valkude värvimine hõbedaga näitas, et histoonifraktsioonis esinesid valgutriibud, mis vastavad histoonide molekulmassi vahemikule 15 kuni 20 kDa. Kuna selles fraktsioonis ei tuvastatud madalmolekulaarset ~5 kDa suurust triipu, mis tõenäoliselt vastab protamiini fragmendile (6,8 kDa), võib oletada, et histoonifraktsioon ei sisaldanud protamiine. Siiski ei saa antud katse põhjal väita, kas kõrgmolekulaarsed valgufragmendid (alates 40 kDa) histoonifraktsioonis olid tekkinud nukleosoomsetest kompleksidest, protamiinivõrgustikest või antud töös analüüsimata

valkudest. Protamiinifraktsioonis esines eeldatud ~5 kDa suurune valgutriip. Lisaks nähti triipe, mille lokalisatsioon on võrreldav histoonifraktsioonis esinevate fragmentidega. Seetõttu võib oletada, et protamiinifraktsioon sisaldas ka histoone. Seda, et spermi kromatiini fraktsioneerimisel säilib osa histoone protamiinifraktsioonis, on kirjeldanud ka Zalenskaya *et al.*, 2000. Suurema molekulmassiga valgufragmendid protamiinifraktsioonis võivad tähistada protamiinide võrgustikke, mille lõhkumine viie minuti jooksul 95°C kraadi juures DTT olemasolul oli ebapiisav. Western blot analüüsil nähti valgutriipu histoon H3 spetsiifiliste antikehadega histoonifraktsioonis ning mõlemas kontrollproovis 28 kDa juures, kuid mitte protamiinifraktsioonis. Tootja kodulehel (Abcam, www.abcam.com; ab18521) eksponeeritud geelipildil esineb H3 spetsiifiline triip 17 kDa juures ning lisaks on eristatavad kõrgmolekulaarsed fragmendid. Ka antud katses tuvastati kõrgmolekulaarsed valgutriibud 72 kDa juures, kusjuures protamiinireal olev fragment oli võrreldes histoonirea ning kontrollidega tunduvalt nõrgem. Võimalik, et antud katses ei õnnestunud nukleosomaalseid komplekse edukalt lahutada ning histooniga H3 jäid seotuks teised histoonvalgud. See seletaks ka asjaolu, miks esines valgufragment 28 kDa juures, mitte 17 kDa juures nagu tootja kodulehel kirjeldatud. Histoone fraktsioonis ei esinenud ühtegi PRM1 spetsiifilist fragmenti, mistõttu võib oletada, et selles fraktsioonis protamiine ei esinenud. Seega võib arvata, et tuumavalkude fraktsioneerimine õnnestus.

Histoonifraktsioonist eraldatud 146 bp pikkused fragmendid sekveneeriti teise põlvkonna sekvenaatoris. Bioinformaatilisel analüüsil leiti spermide histoonidega rikastatud piirkonnad (piigid) eraldi kõigi kolme pulli jaoks ja kõigi lugemite ühendamisel (*poolimisel*). Lisaks leiti piigid, mis olid ühised kõigil kolmel pullil. Piikide arvud ja keskmised pikkused on toodud tabelis 1. Nende arvude põhjal võib eeldada, et histoonseoselise DNA eraldamine õnnestus, sest kõigil kolmel loomal olid sarnased tulemused piikide arvu ja pikkuste osas. Ühiseid piike oli tunduvalt rohkem kui võiks eeldada DNA regioonide juhusliku kokkulangevuse põhjal. Kuna ühiste piikide keskmine pikkus oli suurem individuaalsete proovide keskmisest piikide pikkusest, võib oletada, et leitud ühised piigid olid olulised ja mittejuhuslikud. Seega ei olnud piikide asukohad erinevate loomade spermides juhuslikud. See viitab sellele, et histoonide asukohad on vähemalt osaliselt konserveerunud. Järelikult võis histoonidega rikastatud piirkondade ühisosa kasutada edasisel analüüsil.

Analüüsil selgus, et histoonidega rikastatud piirkondade GC sisaldus oli kõrgem nii genoomi keskmisest kui mittekonserveerunud histoonidega seondunud DNA-st. Veise genoomi keskmine GC sisaldus on 41%, kolme uuritud pulli kogu histoonseoselise DNA GC sisaldus oli 48% ning histoonidega rikastatud piirkondades, st piikidega kattuvates alades, 51%. Selline

tulemus langeb kokku ka varasemate uuringutega nukleosoomide asukohast inimese (Vavouri ja Lehner, 2011) ja hiire (Erkek *et al.*, 2013) seemnerakkudes. Näiteks, inimese spermides säilivad nukleosoomid GC-rikastes piirkondades *housekeeping* geenide promootoritel. *Housekeeping* geenid on konstitutiivselt transkribeeritavad geenid, mis tagavad raku elutegevuse. Nende geenide promootorid asuvad enamasti piirkondades, mida nimetatakse CG dinukleotiidide kõrge sisalduse tõttu CpG saarteks (CpG *island*). CpG saared (ja järelkult ka promootorid) on hüpometüleeritud, võimaldades nende geenide pidevat transkriptsiooni (Deaton ja Bird, 2011). Seega säilitatakse inimese spermis histoonid geenidel, mida on vaja transkribeerida pidevalt või suurel määral, et säilitada raku elutegevuseks vajalikud protsessid (Vavouri ja Lehner, 2011). Antud magistritöös ei detekteeritud eraldi *housekeeping* gene, kuna puudus võrdlev nimekiri veise *housekeeping* geenidest. Samas võib omistada *housekeeping* funktsiooni mitmetele geenidele, mis leiti histoonseoseliste piirkondade funktsionaalsete kategooriate, nagu näiteks Na⁺ transport ja RNA polümeraas, alt (Tabel 3). Histoonide säilimisele *housekeeping* geenide promootoritel võiks olla kaks seletust. Esiteks, kuna tegu on raku elutegevuseks absoluutselt vajalike geenidega, siis kandub see info histoonide (või nende modifikatsioonide) kujul seemneraku kaudu varajasse sügooti. Histoonid paiknevad nende geenide läheduses, isegi kui geenikehad on seotud protamiinidega. Munarakus tuntakse need piirkonnad ära tänu histoonide (modifikatsioonidele) ning seetõttu algab protamiinide vahetus maternaalsete histoonide vastu just nendest piirkondadest. Teiseks, võimalik on ka variant, et *housekeeping* geenide ees on nukleosoomid säilinud seetõttu, et nendelt geenidelt toimus transkriptsioon kuni spermatogeneesi hiliste etappideni, mil toimus kromatiini kompakteerumine. Sarnase hüpoteesiga on tulnud välja ka Vavouri ja Lehner (2011). Sel juhul säilivad nukleosoomid nende geenide läheduses, sest neid on elutegevuseks vaja seemnerakule, mitte varajase geeniekspressiooni tagamiseks. Lisaks *housekeeping* geenide promootoritele asuvad CpG saared suurema tõenäosusega ka *imprinditud* geenide promootoritel (Reik ja Walter, 2001). Seda, et inimese spermis säilivad nukleosoomid *imprinditud* geeniklastrite ees, näitas ka Hammoud *et al.*, 2009. Käesolevas töös leiti ühe histoonseoselise geenina isapoolselt alleelilt ekspresseeritav mesodermi spetsiifiline transkript MEST. Hiires põhjustab *Mest* geeni puudumine embrüo kasvuhäireid (Beechey, 2000) ning inimeses on selle geeni hüpermetülatsiooni seostatud madala seemnerakkude arvuga (Marques *et al.*, 2008).

Käesolevas töös vaadeldi ka piikide paiknemist geenide suhtes. Selleks võrreldi omavahel piikidega kattuvate vaadeldud regioonide pikkuste suhet genoomis piikide suhtarvuga. Selgus, et piigid esinesid genoomis veidi suurema tõenäosusega geenidevahelistel aladel võrreldes geenide ja nende vahetu ümbrusega. Sarnaseid tulemusi kirjeldas ka Samansi töögrupp (Samans

et al., 2014), kelle andmetel säilivad nukleosoomid peamiselt inimese ja veise spermi intergeensetel aladel. Samansi grupi tööst selgus ka, et DNA jääb histoonseoseliseks geenide promootoritel ja/või geenikehadel, mis on seotud signaali ülekande, valkude töötlemise ja mitokondrite elutegevusega. Käesolevas magistritöös vaadeldi geene ja neid ümbritsevaid regioone, mis kattusid vähemalt ühe piigiga. GO, mirBASE ja KEGG ainevahetusradade analüüs näitas, et histoon on märgatavalt rohkem Na⁺ transpordi, kromosoomi kondensatsiooni, androgeeni biosünteesi, RNA polümeraasi, kemokiinide vahendatud signaalradade ning teatavate miRNA-de poolt reguleeritavate geenide läheduses (Tabel 3). Enamik p-väärtusi jäid olulisuse nivoo 0,05 lähedusse, mistõttu võib ilmselt usaldusväärsemaks pidada kategooriaid, mis tulid esile mitme erineva regiooni pikkuse puhul. Saadud tulemused erinevad Samansi töögrupi tulemustest, kus peamiseks GO kategooriateks histoonseoseliste geenide puhul olid signaaliülekanne, valkude töötlemine, mitokondriaalne elutegevus ning endomembraansüsteem. Antud töös moodustasid kõige sagedasema kategooria vaadeldud regioonide seas teatavate miRNA-de poolt reguleeritud geenid. Huvitaval kombel on ka varem näidatud, et miRNA-de klastrid on spermis seotud histoonidega ning neil on roll embrüo varajases arengus (Hammoud *et al.*, 2009). Käesolevas töös leiti mitmeid miRNA-de poolt reguleeritud geene, mille osalust on kirjeldatud ka embrüogeneesis. Kusjuures, ühise leiuna Hammoud'i töögrupiga tuli välja potentsiaalselt histoonseoselise miRNA *bta-let7c*. See miRNA osaleb nii kahepaiksete kui ka imetajate lootelehtede diferentseerumises (Colas *et al.*, 2012). Teatud miRNA-de, sealhulgas magistritöös leitud *bta-let-7d* ja *bta-let-7c* ekspressioonitase metssea spermides korreleerub ka seemnerakkude morfoloogia ja metabolismi ning seetõttu liikuvusega (Curry *et al.*, 2011). Mitmes vaadeldud regioonis tulid välja *hsa-mir-570* reguleeritavad valgud (Tabel 3). See miRNA reguleerib näiteks valke, mis osalevad gastrulatsioonis esimeses rakkude suunatud liikumises, epiboolias. Üheks selliseks valguks on CHIMERIN. Selle geeni *Chn1* puudumine sebrakalas (*Danio rerio*) põhjustas seljakeeliku arengudefekte (Leskow *et al.*, 2006). Lisaks leiti miRNA-de poolt reguleeritavaid valke, mis osalevad näiteks raku metabolismis, signaaliülekandes, jagunemises ja ainete transpordis.

Kaks huvipakkuvat funktsionaalset kategooriat vaadeldud regioonide seas olid veel kemokiinide vahendatud signaalradad ning androgeeni biosüntees. Kemokiinid on kemotaktilised tsütokiinid, mis lisaks immuunprotsessidele osalevad embrüogeneesis. Sebrakala gastrulatsioonis vahendavad kemokiinid endodermi ja mesodermi rakkude migratsiooni (Raz ja Mahabaleshwar, 2009) ning imetajatel blastotsüsti implanteerumist emaka limaskestale (Hannan *et al.*, 2006). Androgeenide biosünteesirada on seotud

meessuguhormoonide tootmisega embrüogeneesis. Androgeenid osalevad urogenitaaltrakti arengus, spermatogeneesi initsieerimises ja progressioonis ning sekundaarsete sugutunnuste kujunemises (Bormann *et al.*, 2011). Üllatava tulemusena leiti regioonidest us_20000_ds_20000 ning us_50000_ds_50000 kromosoomi kondensatsiooni kategooriast protamiinide geenid (PRM1, PRM2 ja PRM3). See tähendab, et nukleosoomid säilivad protamiinigeenide transkriptsioonisaatidest mõnekümne tuhande bp kaugusel, ent ilmselt mitte geenikehas endas. Samas, rotil on nukleosoomid väidetavalt säilinud PRM1 geenis (Adroer ja Oliva, 1998), ent kirjanduses rohkem sarnaseid leide teadaolevalt kirjeldatud ei ole. Rohkelt on arutletud selle üle, et protamiinidega seotud geenid avalduvad embrüos hiljem kui histoonseoselised geenid. Sel juhul, arvestades antud tulemusi, tekib küsimus, kas ka protamiinid on varajasele lootele olulised. Kuna protamiinid pakivad DNA kordades tihedamalt kui histoonid (Balhorn, 2007), on transkriptsioon nendelt raskendatud. Seega võib oletada, et protamiinide läheduses on histoonid mitte seetõttu, et tagada varajaste geenide avaldumist embrüos, vaid seepärast, et protamiinid transkribeeriti spermatogeneesi lõpufaasis. Samuti on võimalik, et protamiinide läheduses on säilinud üleminekuhistoonid, mis võimaldavad üleminekut histoonidelt protamiinidele.

Eelnimetatud kategooriad (Tabel 3) baseeruvad kõikidel piikidel, sealhulgas ka nendel, mis paiknevad kordusjärjestustel. Kui viimased analüüsilt kõrvaldati, jäid kategooriatest olulisteks vaid miRNA-dega seotud geenid (Sillaste ja Kaplinski avaldamata andmed). Huvitaval kombel ei kattunud need miRNA-d esialgsete tulemustega, ent nende poolt reguleeritud geenid olid seotud sarnaste protsessidega. Geenid olid seotud näiteks ionide transpordi, transkriptsiooni regulatsiooni, rakutsükli regulatooni, embrüo telgede formeerumise, metabolismi ning interleukiinidega.

Arutelu selle üle, et DNA pakkimine histoonide või protamiinidega mõjutab seda, kas geenid avalduvad embrüonaalses eas vara või hiljem, on küll huvitav, ent tekib küsimus, mida peetakse antud kontekstis varajaseks ja hilisemaks embrüonaalseks eaks. Üheks võimaluseks oleks seda ajaliselt eristada embrüo enda genoomi aktivatsiooni hetkest. Arvestades, et embrüo genoomi aktivatsioonile eelneb translatsioon maternaalsetelt järjestustelt, võiks varajaseks embrüoks veise puhul pidada kuni 8-16 rakulist embrüot, mil toimub üleminek embrüo enda genoomi aktivatsioonile. Sellest ajahetkest alates hakkab loode transkribeerima oma genoomsetelt järjestustelt ega sõltu maternaalsetest mRNA-dest. Vähetõenäoline on, et sellel ajal mängib loote jaoks enam olulist rolli isapoolse genoomi pakitus histoonide või protamiinidega, sest protamiinid vahetatakse maternaalsete histoonide vastu mõne tunni jooksul peale viljastumist. Samas arvatakse, et veises algab osaline transkriptsioon juba varem, kahe rakulises embrüos

(Memili ja First, 2000). Siiski on viimase leiu kohta vähe andmeid ning ei ole täpselt teada, kumma vanema genoomilt transkriptsioon nii varajases arengus toimub. Tõenäolisem oleks, et kromatiini kokkupakitus mõjutab päris esimesi sügoodi arengu etappe peale viljastumist. Sellisel juhul tuleks varajaseks embrüoks pidada üherakulist sügooti. Kui siis isalt pärit histoonide funktsioon seisneb histoonseoseliste geenide varjases avaldumises, peaksid need ekspresseeruma kohe pärast viljastumist. Teadaolevalt ei ole seda kirjeldatud ning sügoodis on ema- ja isapoolsed histoonid pärast protamiinide eemaldamist üksteisest eristamatud (van der Heijden *et al.*, 2008). Seega, kui mõlemalt vanemalt pärit genoomid on pakitud histoonidega, võiks eeldada, et transkriptsioon saab toimuda mõlemalt genoomilt ajaliselt võrdselt. Iseasi on kui paternaalset päritolu histoonid modifitseeritakse nii, et transkriptsioon histoonseoselistelt piirkondadelt on takistatud või võimendatud. Samas on hiires näidatud, et protamiinide vastu vahetatud histoonide seas on näiteks hüperatsetüleeritud histoon H4 (Adenot *et al.*, 1997). Atsetüleerimine aga vähendab histooni positiivset laengut ning seega afiinsust DNA suhtes. Järelikult võimaldab histoonide atsetüleerimine transkriptsiooni.

Kui aga isapoolsed histoonid kannavad edasi epigeneetilist infot (läbi modifikatsioonide), siis ei pruugi neil olla tingimata seost varajase geeniekspressiooniga. *Imprinting* võib avalduda hilisemas embrüogeneesis või postnataalselt. Samuti võivad keskkondlikud tegurid *imprintingu* mustrit muuta (Moore *et al.*, 2015). Sel juhul ei saa luua otseseid seoseid histoonide olemasolu ja varajase geeniekspressiooni vahel.

Töö teises osas valideeriti veise spermis kahe pinnavalgu lokalisatsiooni raku pinnal. Valitud valkudeks olid karboksüpeptidaasid CPVL ja CPQ. Nii CPVL kui ka CPQ olid veise seemnerakkudes teadaolevalt kirjeldamata. CPVL-i ekspressiooni on varasemalt kirjeldatud makrofaagide membraanikurdudes (*membrane ruffles*) (Harris *et al.*, 2006). Immunotsütokeemia analüüs tuvastas valgu tugeva ekspressiooni spemi pea apikaalses osas, kuid täpsemat lokalisatsiooni ei uuritud. Signaal esines ka ekvatoriaalses piirkonnas ning kaelas. Kuna tegu on karboksüpeptidaasiga, mis lõikab valke peptiidideks, ning CPVL esineb piirkondades, mis on munarakuga seondumiseks olulised, on võimalik, et CPVL lõhub munarakku ümbritsevate kestade valgulisi komponente, võimaldades spermil neist läbi tungida. CPQ ekspressioon tuvastati seemneraku saba keskosas, mis viitab selle osalusele spermi liikumises. Varasemalt on seda valku kirjeldatud jäära seminaalplasma (Souza *et al.*, 2012). Tõenäoliselt kinnitub CPQ seemneraku saba külge ejakulatsioonil. Kuna käesolevas katses ei fikseeritud rakke ega töödeldud permeabiliseerivate reagentidega, võib oletada, et seemnerakkude intaktsus säilis. Sel juhul saab öelda, et saadud tulemused kinnitasid mass-

spektromeetrial saadud tulemusi. Samas ei saa välistada, et katse käigus ei toimunud rakkude (osalist) permeabiliseerimist.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärkideks olid koduveise spermist histoonseoseliste piirkondade tuvastamine ning kahe spermi pinnavalgu (CPVL, CPQ) asukoha valideerimine immunotsütökeemia meetodil. Histoonseoseliste piirkondade tuvastamiseks fraktsioneeriti kolme veise seemnerakkude kromatiin. Saadi kaks kromatiinifraktsiooni: histoonid ning protamiinid. Fraktsioneerimise õnnestumist kontrolliti kahel meetodil. Esiteks, geelelektroforeesil eraldatud valkude värvimisel hõbedalahusega ja hinnates fragmentide suurust suurusmarkeri järgi. Teiseks, spetsiifiliste antikehadega Western blot analüüsil. Histoonifraktsioonist eraldati DNA, mis kanti agarosgeelile ja lahutati geelelektroforeesil. Seejärel lõigati geelist välja nukleosomaalsele DNA-le vastavad 146 bp pikkused lõigud, millest eraldati DNA. DNA sekveneeriti teise põlvkonna sekvenaatori abil ning saadud järjestustele teostati bioinformaatiline analüüs. Histoonseoseliste piirkondade tuvastamisel saadud peamised tulemused olid:

- seemnerakkude kromatiini fraktsioneerimiseks töötati välja toimiv protokoll, mille abil saadi kaks kromatiinifraktsiooni: protamiini- ja histoonifraktsioon,
- histoonide lokalisatsioon oli osaliselt konserveerunud,
- histoonid säilisid spermides GC rikastel aladel,
- histoonid esinesid genoomis pigem geenidevahelistel aladel,
- histoone esines rohkem Na⁺ transpordi, kromosoomi kondensatsiooni, androgeeni biosünteesi, RNA polümeraasi, kemokiinide vahendatud signaalradade ning teatavate miRNA-de poolt reguleeritavate geenide läheduses. Korduste eemaldamisel jäid olulisteks kategooriateks miRNA-de poolt reguleeritud geenid.

Veise spermi pinnavalkude asukoha valideerimiseks kasutati kahe Holstein tõugu veise seemnerakke. Permeabiliseerimata ja lüüsimata rakkudele teostati immunotsütöemiline analüüs, kus hinnati kahe valgu, CPVL ja CPQ, olemasolu. Selleks kasutati spetsiifilisi antikehi, mille efektiivsust kontrolliti kommertsiaalsete blokeerivate peptiididega:

- CPVL lokaliseerus peamiselt spermi pea apikaalses osas, aga ka ekvatoriaalsegmendis ning kaelas,
- CPQ lokaliseerus spermi saba keskosas.

Detection of histone associated regions in *Bos taurus* sperm chromatin and validation of the location of bovine sperm surface proteins

Gerly Sillaste

Summary

The goals of the study were to detect histone associated DNA regions in sperm chromatin of *Bos taurus* and to validate the location of two bovine sperm surface proteins by immunocytochemistry. The proteins selected for validation were carboxypeptidases CPVL and CPQ. To detect nucleosomal regions, sperm chromatin was fractionated into two chromatin fractions containing histones and protamines. In order to assess the quality of fractionation, two methods were used. First, the precipitation of nuclear proteins and silver staining, followed by the comparison of the size of protein fragments with protein ladder. Second, by using anti-histone and anti-protamine antibodies. DNA from nucleosomal fraction was extracted and separated in agarose gel. Nucleosomal fragments, 146 bp long, were cut from agarose gel and DNA was isolated. The nucleosomal DNA was sequenced by using Next-Generation Sequencing and analyzed by bioinformatics.

The localization of carboxypeptidases on the surface of the untreated sperm was validated by using specific antibodies. As a control for antibody specificity, commercial blocking peptides were used.

The main results of the study were:

- a functional protocol for fractionating sperm chromatin into histone and protamine fractions was developed,
- the localization of histones in sperm chromatin was at least partially conserved,
- histones were located in GC-rich regions of genome,
- histones were more common in intergenic areas,
- the main functional groups of genes near conserved histones were: sodium ion transport, androgenic biosynthesis, chemokine mediated signalling, RNA polymerase and several microRNAs-regulated groups. After removal of repeats from analyzed sequences, only microRNA associated genes remained as a significant category.
- CPVL expression was found on the apical part of the sperm head, equatorial segment and sperm neck, while CPQ was detected on the sperm middle piece.

TÄNUSÕNAD

Minu südamlük tänu toredatele juhendajatele, kolleegidele ja sõpradele: **prof. Andres Salumets** (Tervisetehnoloogiate Arenduskeskus AS), **Riho Meier** (TÜ MRI arengubioloogia õppetool), **Triin Viltrop** (Tervisetehnoloogiate Arenduskeskus AS) – aitäh, et lasite mul õppida ja areneda ning usaldasite ja uskusite. **Lauris Kaplinski** (TÜ MRI bioinformaatika õppetool) – aitäh, et oled olemas. Aitäh nende lõputute tundide eest erksinise ekraani taga. **Elo Eriste** (Tervisetehnoloogiate Arenduskeskus AS) – aitäh, et näitasid kui keeruline ja põnev on valkude maailm. **Tambet Tõnissoo** (TÜ MRI arengubioloogia õppetool) – aitäh, et hoolid. **Külli Samuel** (Tervisetehnoloogiate Arenduskeskus AS) – aitäh, et vastasid mu arvukatele küsimustele ja õpetasid mind rakke lugema. Lisaks suured tänud **prof. Ants Kurele** ja **Olga Žilinale** (TÜ MRI biotehnoloogia õppetool) abivalmiduse eest sekveneerimisprotsessi ettevalmistamisel. Aitäh (re)produktiivsetele pullidele!

KIRJANDUSE LOETELU

Adenot, P.G., Mercier, Y., Renard, J.P., and Thompson, E.M. (1997). Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development* *124*, 4615-4625.

Adroer, R., and Oliva, R. (1998). Nucleosome positioning in the rat protamine 1 gene in vivo and in vitro. *Biochimica et biophysica acta* *1442*, 252-260.

Aitken, R.J., Nixon, B., Lin, M., Koppers, A.J., Lee, Y.H., and Baker, M.A. (2007). Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian journal of andrology* *9*, 554-564.

Arney, K.L., Bao, S., Bannister, A.J., Kouzarides, T., and Surani, M.A. (2002). Histone methylation defines epigenetic asymmetry in the mouse zygote. *The International journal of developmental biology* *46*, 317-320.

Arpanahi, A., Brinkworth, M., Iles, D., Krawetz, S.A., Paradowska, A., Platts, A.E., Saida, M., Steger, K., Tedder, P., and Miller, D. (2009). Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome research* *19*, 1338-1349.

Balhorn, R. (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *The Journal of cell biology* *93*, 298-305.

Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome biology* *8*, 227.

Beaujean, N., Taylor, J.E., McGarry, M., Gardner, J.O., Wilmut, I., Loi, P., Ptak, G., Galli, C., Lazzari, G., Bird, A., *et al.* (2004). The effect of interspecific oocytes on demethylation of sperm DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 7636-7640.

Beechey, C.V. (2000). Peg1/Mest locates distal to the currently defined imprinting region on mouse proximal chromosome 6 and identifies a new imprinting region affecting growth. *Cytogenetics and cell genetics* 90, 309-314.

Bleil, J.D., and Wassarman, P.M. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Developmental biology* 95, 317-324.

Bormann, C.L., Smith, G.D., Padmanabhan, V., and Lee, T.M. (2011). Prenatal testosterone and dihydrotestosterone exposure disrupts ovine testicular development. *Reproduction* 142, 167-173.

Braun, R.E. (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature genetics* 28, 10-12.

Brewis, I.A., and Gadella, B.M. (2010). Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Molecular human reproduction* 16, 68-79.

Byrne, K., Leahy, T., McCulloch, R., Colgrave, M.L., and Holland, M.K. (2012). Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. *Proteomics* 12, 3559-3579.

Colas, A.R., McKeithan, W.L., Cunningham, T.J., Bushway, P.J., Garmire, L.X., Dueter, G., Subramaniam, S., and Mercola, M. (2012). Whole-genome microRNA screening identifies let-7 and mir-18 as regulators of germ layer formation during early embryogenesis. *Genes & development* 26, 2567-2579.

Cornwall, G.A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human reproduction update* 15, 213-227.

Curry, E., Safranski, T.J., and Pratt, S.L. (2011). Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. *Theriogenology* 76, 1532-1539.

de Oliveira, R.V., Dogan, S., Belser, L.E., Kaya, A., Topper, E., Moura, A., Thibaudeau, G., and Memili, E. (2013). Molecular morphology and function of bull spermatozoa linked to histones and associated with fertility. *Reproduction* 146, 263-272.

de Rooij, D.G., and Russell, L.D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology* 21, 776-798.

Dean, W., Santos, F., and Reik, W. (2003). Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Seminars in cell & developmental biology* 14, 93-100.

Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development* 25, 1010-1022.

Dobbs, K.B., Rodriguez, M., Sudano, M.J., Ortega, M.S., and Hansen, P.J. (2013). Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation bovine embryo. *PLoS One* 8, e66230.

Domagala, A., Pulido, S., Kurpisz, M., and Herr, J.C. (2007). Application of proteomic methods for identification of sperm immunogenic antigens. *Molecular human reproduction* 13, 437-444.

Downing Meisner, A., Klaus, A.V., and O'Leary, M.A. (2005). Sperm head morphology in 36 species of artiodactylans, perissodactylans, and cetaceans (Mammalia). *J Morphol* 263, 179-202.

Erkek, S., Hisano, M., Liang, C.Y., Gill, M., Murr, R., Dieker, J., Schubeler, D., van der Vlag, J., Stadler, M.B., and Peters, A.H. (2013). Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nature structural & molecular biology* 20, 868-875.

Flesch, F.M., Voorhout, W.F., Colenbrander, B., van Golde, L.M., and Gadella, B.M. (1998). Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biology of reproduction* 59, 1530-1539.

- Florman, H.M., Arnoult, C., Kazam, I.G., Li, C., and O'Toole, C.M. (1998). A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biology of reproduction* 59, 12-16.
- Fraser, L.R. (1998). Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human reproduction* 13 *Suppl 1*, 9-19.
- Gadella, B.M., Tsai, P.S., Boerke, A., and Brewis, I.A. (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *The International journal of developmental biology* 52, 473-480.
- Gardiner-Garden, M., Ballesteros, M., Gordon, M., and Tam, P.P. (1998). Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Molecular and cellular biology* 18, 3350-3356.
- Gaucher, J., Boussouar, F., Montellier, E., Curtet, S., Buchou, T., Bertrand, S., Hery, P., Jounier, S., Depaux, A., Vitte, A.L., *et al.* (2012). Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *The EMBO journal* 31, 3809-3820.
- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thevenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S., *et al.* (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *The Journal of cell biology* 176, 283-294.
- Hammoud, S.S., Nix, D.A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D.T., and Cairns, B.R. (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460, 473-478.
- Hannan, N.J., Jones, R.L., White, C.A., and Salamonsen, L.A. (2006). The chemokines, CX3CL1, CCL14, and CCL4, promote human trophoblast migration at the fetomaternal interface. *Biology of reproduction* 74, 896-904.
- Harris, J., Schwinn, N., Mahoney, J.A., Lin, H.H., Shaw, M., Howard, C.J., da Silva, R.P., and Gordon, S. (2006). A vitellogenic-like carboxypeptidase expressed by human macrophages is localized in endoplasmic reticulum and membrane ruffles. *International journal of experimental pathology* 87, 29-39.

Ho, H.C., and Suarez, S.S. (2001). Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* 122, 519-526.

Ihara, M., Meyer-Ficca, M.L., Leu, N.A., Rao, S., Li, F., Gregory, B.D., Zalenskaya, I.A., Schultz, R.M., and Meyer, R.G. (2014). Paternal poly (adp-ribose) metabolism modulates retention of inheritable sperm histones and early embryonic gene expression. *PLoS Genet* 10, e1004317.

Jakop, U., Fuchs, B., Suss, R., Wibbelt, G., Braun, B., Muller, K., and Schiller, J. (2009). The solubilisation of boar sperm membranes by different detergents - a microscopic, MALDI-TOF MS, (31)P NMR and PAGE study on membrane lysis, extraction efficiency, lipid and protein composition. *Lipids in health and disease* 8, 49.

Jones, R. (1998). Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 53, 73-84.

Kanippayoor, R.L., Alpern, J.H., and Moehring, A.J. (2013). Protamines and spermatogenesis in and : A comparative analysis. *Spermatogenesis* 3, e24376.

Kasvandik, S., Sillaste, G., Velthut-Meikas, A., Mikelsaar, A.V., Hallap, T., Padrik, P., Tenson, T., Jaakma, U., Koks, S., and Salumets, A. (2015). Bovine sperm plasma membrane proteomics through biotinylation and subcellular enrichment. *Proteomics*.

Keller, F., Togni, G., Soldati, G., Balmelli, T., Medici, G., Rose, K., and Balerna, M. (1997). Nature's motility blockers: controlling human sperm motility machinery from the outside. Chemical characterization of a peritoneal fluid lipid that induces sperm immobilization. *Molecular human reproduction* 3, 241-248.

Kleene, K.C. (1996). Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Molecular reproduction and development* 43, 268-281.

Krawetz, S.A., De Rooij, D.G., and Hedger, M.P. (2009). Molecular aspects of male fertility. *International Workshop on Molecular Andrology. EMBO reports* 10, 1087-1092.

Kremling, H., Reinhart, N., Schlosser, M., and Engel, W. (1992). The bovine protamine 2 gene: evidence for alternative splicing. *Biochim Biophys Acta* *1132*, 133-139.

Kärner, J. (1997). *Sissejuhatus arengubioloogiasse* (Tartu Ülikooli Kirjastus).

Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J., and Reik, W. (2003). Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis* *35*, 88-93.

Lee, J., Inoue, K., Ono, R., Ogonuki, N., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., Ogura, A., and Ishino, F. (2002). Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* *129*, 1807-1817.

Leskow, F.C., Holloway, B.A., Wang, H., Mullins, M.C., and Kazanietz, M.G. (2006). The zebrafish homologue of mammalian chimerin Rac-GAPs is implicated in epiboly progression during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 5373-5378.

Li, A., Maffey, A.H., Abbott, W.D., Conde e Silva, N., Prunell, A., Siino, J., Churikov, D., Zalensky, A.O., and Ausio, J. (2005). Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B). *Biochemistry* *44*, 2529-2535.

Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W.F., Myles, D.G., and Primakoff, P. (1994). A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *The Journal of cell biology* *125*, 1157-1163.

Marques, C.J., Costa, P., Vaz, B., Carvalho, F., Fernandes, S., Barros, A., and Sousa, M. (2008). Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Molecular human reproduction* *14*, 67-74.

Memili, E., and First, N.L. (2000). Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* *8*, 87-96.

Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., Zhang, K., Buchou, T., Fenaille, F., Shiota, H., Debernardi, A., Hery, P., Curtet, S., *et al.* (2013). Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes & development* 27, 1680-1692.

Moore, G.E., Ishida, M., Demetriou, C., Al-Olabi, L., Leon, L.J., Thomas, A.C., Abu-Amero, S., Frost, J.M., Stafford, J.L., Chaoqun, Y., *et al.* (2015). The role and interaction of imprinted genes in human fetal growth. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 370, 20140074.

Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., and Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Human molecular genetics* 14 *Spec No 1*, R47-58.

Morozumi, K., Shikano, T., Miyazaki, S., and Yanagimachi, R. (2006). Simultaneous removal of sperm plasma membrane and acrosome before intracytoplasmic sperm injection improves oocyte activation/embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17661-17666.

Nakamura, T., Arai, Y., Umehara, H., Masuhara, M., Kimura, T., Taniguchi, H., Sekimoto, T., Ikawa, M., Yoneda, Y., Okabe, M., *et al.* (2007). PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nature cell biology* 9, 64-71.

O'Donnell, L., Nicholls, P.K., O'Bryan, M.K., McLachlan, R.I., and Stanton, P.G. (2011). Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis* 1, 14-35.

Olek, A., and Walter, J. (1997). The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nature genetics* 17, 275-276.

Oliva, R., Bazett-Jones, D., Mezquita, C., and Dixon, G.H. (1987). Factors affecting nucleosome disassembly by protamines in vitro. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins. *The Journal of biological chemistry* 262, 17016-17025.

Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W., and Walter, J. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Current biology : CB* 10, 475-478.

Ounjai, P., Kim, K.D., Lishko, P.V., and Downing, K.H. (2012). Three-dimensional structure of the bovine sperm connecting piece revealed by electron cryotomography. *Biology of reproduction* 87, 73.

Palmer, D.K., O'Day, K., and Margolis, R.L. (1990). The centromere specific histone CENP-A is selectively retained in discrete foci in mammalian sperm nuclei. *Chromosoma* 100, 32-36.

Patrat, C., Serres, C., and Jouannet, P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell* 92, 255-266.

Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2003). Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Molecular and cellular biology* 23, 5354-5365.

Raz, E., and Mahabaleshwar, H. (2009). Chemokine signaling in embryonic cell migration: a fisheye view. *Development* 136, 1223-1229.

Reik, W., and Walter, J. (2001). Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature reviews Genetics* 2, 21-32.

Romanato, M., Regueira, E., Cameo, M.S., Baldini, C., Calvo, L., and Calvo, J.C. (2005). Further evidence on the role of heparan sulfate as protamine acceptor during the decondensation of human spermatozoa. *Human reproduction* 20, 2784-2789.

Rougier, N., Bourc'his, D., Gomes, D.M., Niveleau, A., Plachot, M., Paldi, A., and Viegas-Pequignot, E. (1998). Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes & development* 12, 2108-2113.

Samans, B., Yang, Y., Krebs, S., Sarode, G.V., Blum, H., Reichenbach, M., Wolf, E., Steger, K., Dansranjav, T., and Schagdarsurengin, U. (2014a). Uniformity of nucleosome

preservation pattern in Mammalian sperm and its connection to repetitive DNA elements. *Dev Cell* 30, 23-35.

Samans, B., Yang, Y., Krebs, S., Sarode, G.V., Blum, H., Reichenbach, M., Wolf, E., Steger, K., Dansranjav, T., and Schagdarsurengin, U. (2014b). Uniformity of nucleosome preservation pattern in Mammalian sperm and its connection to repetitive DNA elements. *Dev Cell* 30, 23-35.

Santos, F., Peters, A.H., Otte, A.P., Reik, W., and Dean, W. (2005). Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Developmental biology* 280, 225-236.

Sathananthan, A.H., Ratnam, S.S., Ng, S.C., Tarin, J.J., Gianaroli, L., and Trounson, A. (1996). The sperm centriole: its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos. *Human reproduction* 11, 345-356.

Schagdarsurengin, U., Paradowska, A., and Steger, K. (2012). Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. *Nature reviews Urology* 9, 609-619.

Souza, C.E., Rego, J.P., Lobo, C.H., Oliveira, J.T., Nogueira, F.C., Domont, G.B., Fioramonte, M., Gozzo, F.C., Moreno, F.B., Monteiro-Moreira, A.C., *et al.* (2012). Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *Journal of proteomics* 75, 4436-4456.

Szenker, E., Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2011). The double face of the histone variant H3.3. *Cell research* 21, 421-434.

Sutovsky, P., and Schatten, G. (1997). Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biology of reproduction* 56, 1503-1512.

Sutovsky, P.M., G. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In *The Sperm Cell Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, C.B. De Jonge, C., ed. (Cambridge University Press), pp. 1-30.

Zalenskaya, I.A., Bradbury, E.M., and Zalensky, A.O. (2000). Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochemical and biophysical research communications* 279, 213-218.

Zhao, M., Shirley, C.R., Hayashi, S., Marcon, L., Mohapatra, B., Suganuma, R., Behringer, R.R., Boissonneault, G., Yanagimachi, R., and Meistrich, M.L. (2004). Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* 38, 200-213.

Zhou, C.X., Zhang, Y.L., Xiao, L., Zheng, M., Leung, K.M., Chan, M.Y., Lo, P.S., Tsang, L.L., Wong, H.Y., Ho, L.S., *et al.* (2004). An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nat Cell Biol* 6, 458-464.

Tagesson, C., Franzen, L., Dahl, G., and Westrom, B. (1985). Lysophosphatidylcholine increases rat ileal permeability to macromolecules. *Gut* 26, 369-377.

Talbot, P., Shur, B.D., and Myles, D.G. (2003). Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biology of reproduction* 68, 1-9.

Toshimori, K. (2003). Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microscopy research and technique* 61, 1-6.

Tourmente, M., Gomendio, M., and Roldan, E.R. (2011). Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC evolutionary biology* 11, 12.

Turner, R.M. (2003). Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *Journal of Andrology* 24, 790-803.

van der Heijden, G.W., Dieker, J.W., Derijck, A.A., Muller, S., Berden, J.H., Braat, D.D., van der Vlag, J., and de Boer, P. (2005). Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mechanisms of development* 122, 1008-1022.

van der Heijden, G.W., Ramos, L., Baart, E.B., van den Berg, I.M., Derijck, A.A., van der Vlag, J., Martini, E., and de Boer, P. (2008). Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC developmental biology* 8, 34.

Wan, L.B., Pan, H., Hannenhalli, S., Cheng, Y., Ma, J., Fedoriw, A., Lobanenkov, V., Latham, K.E., Schultz, R.M., and Bartolomei, M.S. (2008). Maternal depletion of CTCF reveals multiple functions during oocyte and preimplantation embryo development. *Development* 135, 2729-2738.

Ward, W.S. (2010). Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Molecular human reproduction* 16, 30-36.

Wassarman, P.M., Jovine, L., and Litscher, E.S. (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nature cell biology* 3, E59-64.

Vavouri, T., and Lehner, B. (2011). Chromatin organization in sperm may be the major functional consequence of base composition variation in the human genome. *PLoS Genet* 7, e1002036.

Vilfan, I.D., Conwell, C.C., and Hud, N.V. (2004). Formation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. *The Journal of biological chemistry* 279, 20088-20095.

Wright, S.J. (1999). Sperm nuclear activation during fertilization. *Current topics in developmental biology* 46, 133-178.

Wrobel, K.H. (2000). Prespermatogenesis and spermatogoniogenesis in the bovine testis. *Anatomy and embryology* 202, 209-222.

Wu, S.C., and Zhang, Y. (2010). Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 607-620.

Yanagimachi, R. (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *Journal of reproduction and fertility* 23, 193-196.

Kasutatud veebiallikad:

<http://www.abcam.com/protocols/histone-western-blot-protocol> - 24.06.15

<http://www.abcam.com/histone-h3-antibody-ab18521.html> - 01.07.15

<http://www.antibodies-online.com/antibody/519290/anti-Protamine+1+PRM1+full+length/> -
01.07.15

http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/14129pis.pdf - 15.07.15

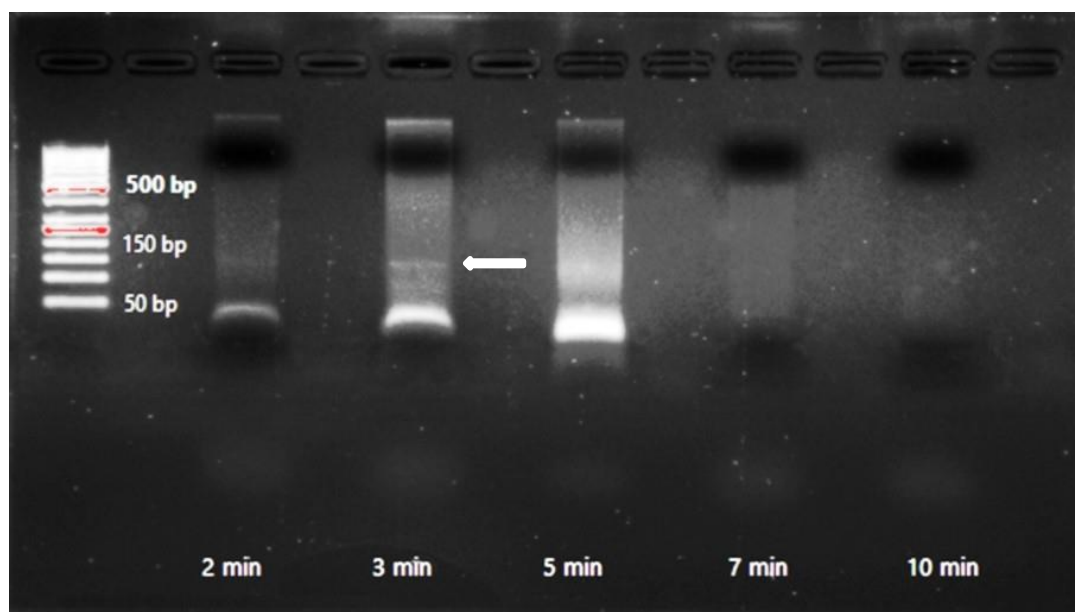
http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/26/1005.png - 06.08.15

www.uniprot.org

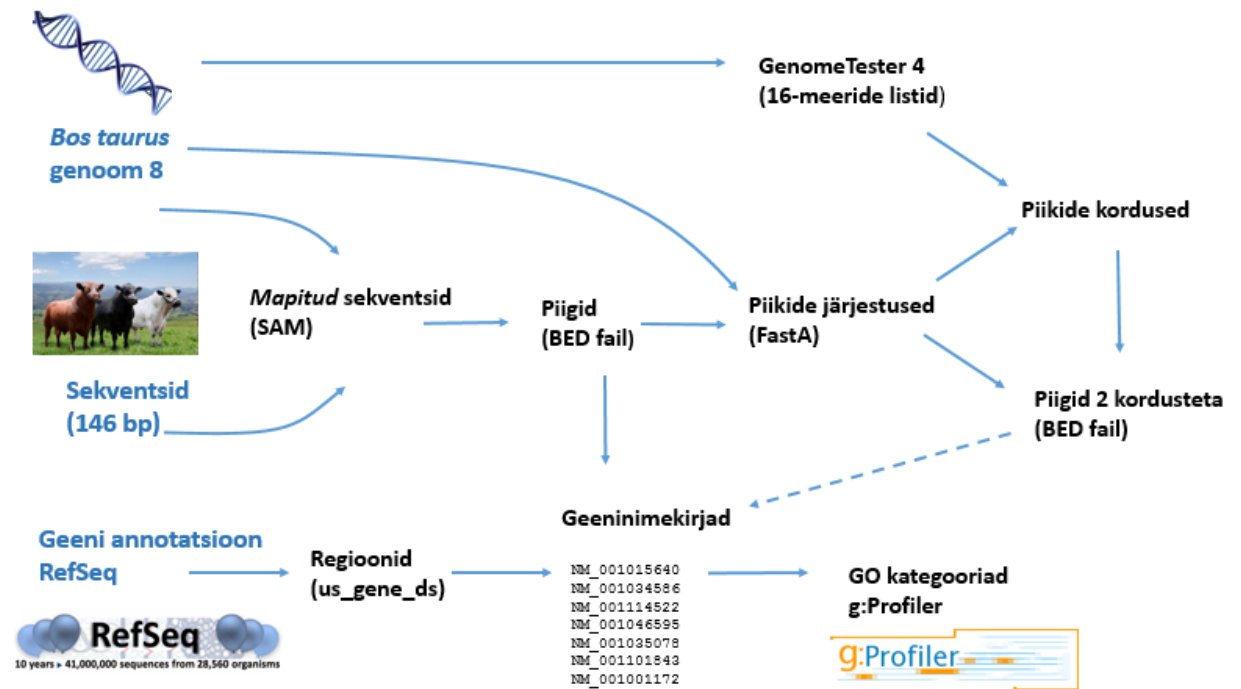
LISAD

LISA 1. MNaasiga inkubatsiooni aja optimeerimine

Seemnerakke lüüsi 0,1% lüsoletsitiini-PBS lahuses 15 minutit jääl. Lüüsitud rakke inkubeeriti nukleaasi *Micrococcal nuclease* lahusega (20 U; 1U/ μ l) (Thermo Scientific) vastavalt kaks, kolm, viis, seitse ning kümme minutit. Ensüümi aktiivsust kontrolliti histoonidest eraldatud DNA fragmentide analüüsil 2% TBE agarosgeelil. Optimaalseimaks nukleaasi aktiivsuse ajaks antud kontsentratsioonil ja tingimustel osutus kolm minutit. 146 bp pikkune fragment (valge nool) on võrreldes kahe- ja kolmeminutilise töötusega kontsentreeritum. Lühikeste, alla 50 bp pikkuste fragmentide osakaal tõuseb märgatavalt viieminutilise inkubatsiooni tulemusel. Seitsme- ja künneminutiline inkubatsioon fragmenteerib DNA tõenäoliselt väga lühikesteks antud geelil tuvastamata lõikudeks. Markerina kasutati O'GeneRuler 50 bp DNA ladder (Thermo Scientific). Rakkude algarv iga katserea kohta on ~ 13 mln/ml.



LISA 2. Bioinformaatilise analüüsi üldskeem



LISA 3. Bovine sperm plasma membrane proteomics through biotinylation and subcellular enrichment

Sergo Kasvandik^{1,2,3}, **Gerly Sillaste**², Agne Velthut-Meikas^{2,3,4}, Aavo-Valdur Mikelsaar⁵, Triin Hallap⁶, Peeter Padrik⁷, Tanel Tenson¹, Ülle Jaakma^{2,6}, Sulev Kõks⁵ and Andres Salumets^{2,3,5}

¹ Proteomics Core Facility, Institute of Technology, University of Tartu, Tartu, Estonia

² Competence Centre on Reproductive Medicine and Biology, Tartu, Estonia

³ Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Tartu, Tartu, Estonia

⁴ Center for Biology of Integrated Systems, Tallinn University of Technology, Tallinn, Estonia

⁵ Institute of Biomedicine and Translational Medicine, University of Tartu, Tartu, Estonia

⁶ Department of Reproductive Biology, Institute of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Estonian University of Life Sciences, Tartu, Estonia

⁷ Animal Breeders Association of Estonia, Keava, Kehtna vald, Raplamaa, Estonia

RESEARCH ARTICLE

Bovine sperm plasma membrane proteomics through biotinylation and subcellular enrichment

Sergo Kasvandik^{1,2,3}, Gerly Sillaste², Agne Velthut-Meikas^{2,3,4}, Aavo-Valdur Mikelsaar⁵, Triin Hallap⁶, Peeter Padrik⁷, Tanel Tenson¹, Ülle Jaakma^{2,6}, Sulev Kõks⁵ and Andres Salumets^{2,3,5}

¹ Proteomics Core Facility, Institute of Technology, University of Tartu, Tartu, Estonia

² Competence Centre on Reproductive Medicine and Biology, Tartu, Estonia

³ Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Tartu, Tartu, Estonia

⁴ Center for Biology of Integrated Systems, Tallinn University of Technology, Tallinn, Estonia

⁵ Institute of Biomedicine and Translational Medicine, University of Tartu, Tartu, Estonia

⁶ Department of Reproductive Biology, Institute of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Estonian University of Life Sciences, Tartu, Estonia

⁷ Animal Breeders Association of Estonia, Keava, Kehtna vald, Raplamaa, Estonia

A significant proportion of mammalian fertilization is mediated through the proteomic composition of the sperm surface. These protein constituents can present as biomarkers to control and regulate breeding of agricultural animals. Previous studies have addressed the bovine sperm cell apical plasma membrane (PM) proteome with nitrogen cavitation enrichment. Alternative workflows would enable to expand the compositional data more globally around the entire sperm's surface. We used a cell surface biotin-labeling in combination with differential centrifugation to enrich sperm surface proteins. Using nano-LC MS/MS, 338 proteins were confidently identified in the PM-enriched proteome. Functional categories of sperm-egg interaction, protein turnover, metabolism as well as molecular transport, spermatogenesis, and signal transduction were represented by proteins with high quantitative signal in our study. A highly significant degree of enrichment was found for transmembrane and PM-targeted proteins. Among them, we also report proteins previously not described on bovine sperm (CPQ, CD58, CKLF, CPVL, GLB1L3, and LPCAT2B) of which CPQ and CPVL cell surface localization was further validated. A descriptive overview of the bovine sperm PM integral and peripheral proteins is provided to complement future studies on animal reproduction and its relation to sperm cell surface. All MS data have been deposited in the ProteomeXchange with identifier PXD001096 (<http://proteomecentral.proteomexchange.org/dataset/PXD001096>).

Keywords:

Animal proteomics / Biotinylation / *Bos taurus* / Plasma membrane proteome / Reproductive biology / Sperm cell



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Received: June 30, 2014
Revised: November 1, 2014
Accepted: January 15, 2015

1 Introduction

Mammalian fertilization entails sophisticated interplay and timing between a sperm cell and an oocyte, to create a new life. The fertilization process involves multiple complex interactions between the sperm surface proteins and coatings of the oocyte that ends in the fusion of their membranes. Therefore, the surface of the spermatozoon is an important

Colour Online: See the article online to view Figs. 1–5 in colour.

Correspondence: Sergo Kasvandik, Proteomics Core Facility, Institute of Technology, University of Tartu, Nooruse 1, Tartu 50411, Estonia

E-mail: sergo.kasvandik@ut.ee

Abbreviations: emPAI, exponentially modified protein abundance index; GPI, glycosylphosphatidylinositol; ICC, immunocytochemistry; PM, plasma membrane; SN, supernatant; ZP, zona pellucida

component mediating the process of fertilization. However, a sperm cell must undergo extensive changes during a long period of time to become competent for oocyte activation and fertilization, which include major modifications on the cell surface proteome. These intricate transformations occur during the production and maturation of sperm cells in the male reproductive organs and continue following intercourse as sperm cells travel along the female reproductive tract to encounter and fertilize an oocyte.

Starting as a diploid spermatogonium, the developing sperm cell undergoes successive meiotic divisions and spermiogenesis to become a spermatozoon. Transcriptionally silent cells are released into the lumen of seminiferous tubules and transported to the epididymis. During their transit, sperms acquire progressive motility, and several proteins are adsorbed from the epididymal fluid to the cell surface or are proteolytically cleaved to their mature form. These include protective surface factors in addition to proteins needed for interactions with the oviductal epithelium and oocyte [1]. Upon ejaculation, sperm cells become mixed with seminal plasma, the components of which coat the surface of the sperm cell and protect them from extracellular stress in the harsh conditions of the female lower genital tract [2], where they undergo final maturation called capacitation. During this process, major reorganization of components of plasma membrane (PM) occur, including the activation of membrane ion transporters, efflux of cholesterol, disruption of PM symmetry, and exposure of membrane-associated proteins to the surface. These surface proteome modifications at different stages of sperm production and maturation have interested researchers to understand in greater detail sperm biology required for successful oocyte fertilization.

Global mammalian sperm cell proteomic profiles have been described in humans [3–5], rodents [6, 7], and agriculturally important animals, for example the bull [8]. These studies found approximately 1000 proteins, some of them as potential biomarkers for fertility and possible targets for male contraceptives for reproductive health purposes, indicating an increasing need for proteomic studies in reproductive biology. The rapid development in MS-based proteomics is further expanding the frontiers and possibilities for proteomic studies in veterinary sciences.

Sperm cells are characterized by their high content of membranes. Compared to cytosolic proteins, membrane proteins are expressed in relatively low levels, and their hydrophobic properties make them even more complicated to analyze, leading to the under-representation of PM proteins in full proteome studies [9, 10]. Many different methods have been used to investigate cell surface proteins, ranging from crude biochemical isolation, such as differential and gradient (ultra)centrifugation, to biotinylation and glycoprotein capture by lectins [9–11]. More specialized approaches have been described and reviewed, namely two-phase partitioning [11] and colloidal silica [11, 12], the former being based on the differential phase-partitioning of PM and other membrane proteins, whereas the latter deals with the interactions

of PM glycoproteins and phospholipids with coated silica beads.

Byrne et al. [13] have published a list of bovine sperm surface proteins, noting the presence of 237 proteins that are enriched in the surface proteome fraction. The study used nitrogen cavitation to generate vesicles from the PM of sperm cells. This method has been reported to favor the preferential formation of membrane vesicles from the sperm head [14, 15]. Therefore, to avoid creating a topographic bias in studying the sperm surface, we decided to apply a more global PM isolation strategy, combining biotinylation with classical differential centrifugation. This approach centers on the use of a hydrophilic small-molecule labeling of proteins on the cell surface (Fig. 1). The method starts by maximizing the number of viable cells in the sample of sperm by a discontinuous colloid centrifugation. Next, they are incubated briefly with an amine reactive biotin-label. The label is designed to be hydrophilic (i.e. membrane impermeable) and contains a disulfide bridge that is unstable under reducing intracellular conditions but provides efficient target for avidin affinity separation in later steps. To enhance the purity of PM proteins, the hypotonically lysed cellular material is first fractionated by classical differential centrifugation, after which previously labeled proteins are captured to a modified avidin support. Bound proteins eluted by disulfide reduction are proteolyzed and identified by conventional MS-based shotgun proteomics.

2 Materials and methods

2.1 Sample collection and preparation of sperm cells for biotinylation

Bovine semen was obtained from Estonian Holstein breeding bulls ($n = 3$) having normal fertility acceptable for breeding purposes. Semen was collected by artificial vagina following routine semen collection regimen. The sample was diluted 1:1 into Triladyl (Minitüb, Tiefenbach, Germany) extender without egg-yolk supplementation and transported at 10°C to laboratory within 3 h. The sperm cells were washed of residual seminal plasma and nonmotile cells with SupraSperm (ORIGIO, Måløv, Denmark) colloid in PBS. Briefly, 3 mL of diluted sample in Triladyl (10^8 cells/mL) was laid on top of a discontinuous gradient consisting of 7 mL 40% w/v and 5 mL 80% w/v colloid. The solution was centrifuged for 25 min at $400 \times g$. The supernatant (SN) was discarded and the pellet was transferred to a new tube containing 40 mL PBS, suspended gently, and quickly recentrifuged at $400 \times g$ for 5 min. The pellet was transferred to Protein LoBind (Eppendorf, Hamburg, Germany) tubes for biotinylation.

2.2 Biotinylation reaction

One milliliter of freshly prepared 0.25 mg/mL Sulfo-NHS-SS-Biotin (where NHS is *N*-hydroxysuccinimide; Thermo Fisher

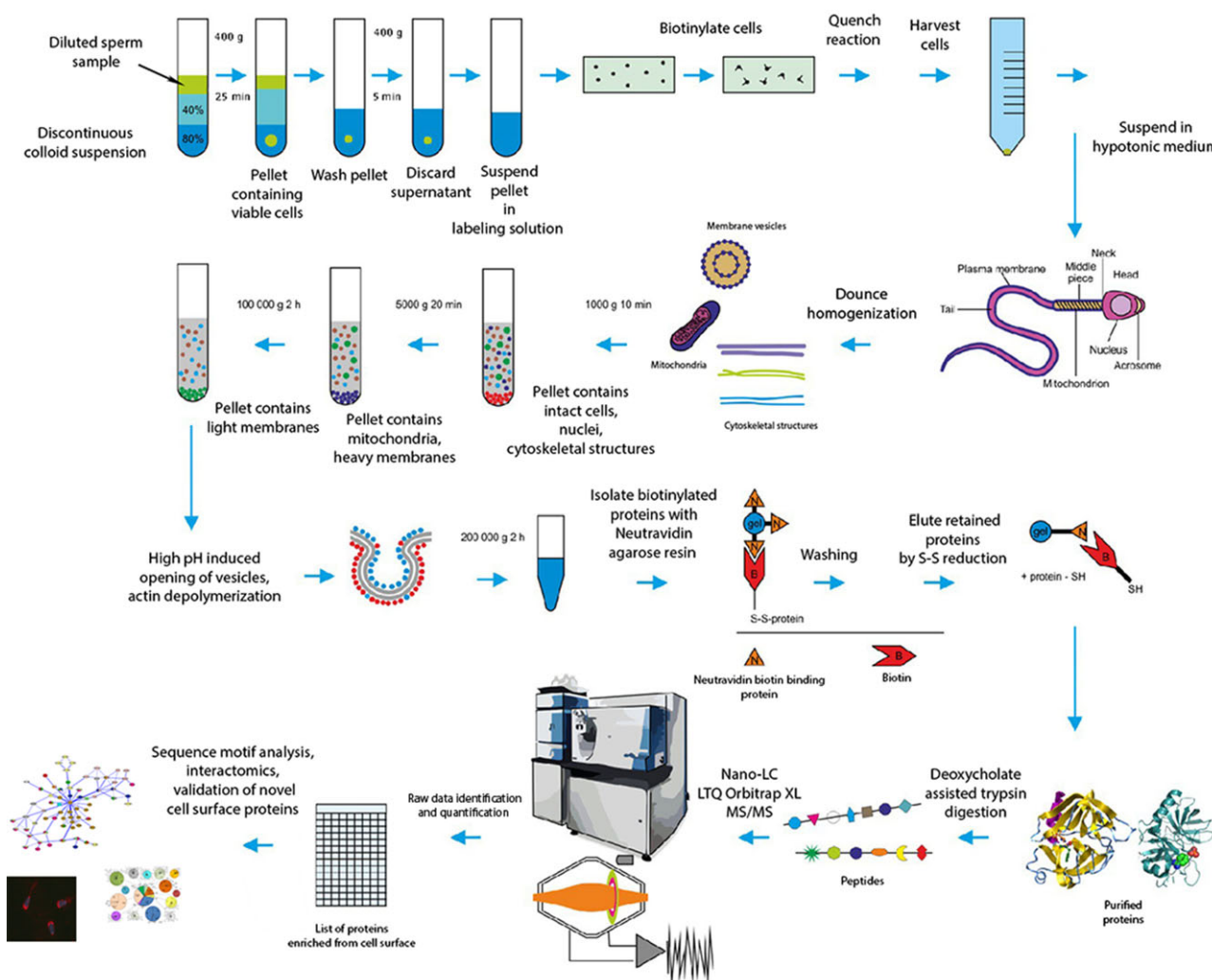


Figure 1. Outline of the biotinylation- and differential centrifugation proteomics workflow for analyzing the sperm cell surface proteome.

Scientific, Waltham, MA, USA) was added per 10^8 cells and rotated 15 min at room temperature. The reaction was rapidly quenched by adding one-tenth volume of quenching solution (100 mM Tris-HCl pH 8, 1 M NH_4Cl , 10 mM oxidized GSH, and $10\times$ complete protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland)), and rotating for 5 min. The labeled cells were spun down at $1000 \times g$ for 10 min, the SN was discarded, and the pellets were stored at -20°C until further purification.

2.3 Differential centrifugation

The cell pellet was suspended in hypotonic buffer (4.8 mL 10 mM Tris pH 7.5, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM oxidized GSH, and $1\times$ complete protease inhibitor cocktail (Roche) per 10^8 cells) and incubated 10 min at room temperature. The cells were homogenized in a Dounce

homogenizer using 35 strokes. Intact cells and nuclei were pelleted at $1000 \times g$ for 10 min. The postnuclear SN was centrifuged at $5000 \times g$ for 20 min to obtain a light membrane SN. NaCl was added to 1 M before ultracentrifugation at $100\,000 \times g$ for 2 h in a fixed angle Ti70.1 rotor (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The membranes retrieved were suspended in 100 mM Na_2CO_3 (pH 11.6) in 1 M NaCl solution and vortexed for 10 min to induce opening of the vesicles [16] and favor the dissociation of intravesicular proteins. The solution was ultracentrifuged at $200\,000 \times g$ for 2 h, after which the SN was discarded and the pellet consisting of washed membranes was affinity purified.

2.4 Affinity purification of biotinylated proteins

Isolated proteins were solubilized and captured on NeutrAvidin™ (Thermo Fisher Scientific) agarose using a

solubilization and capture mix (6 mL per 0.3 mL of agarose slurry) consisting of 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 1.5% DOC, 500 mM NaCl, and 1× Roche protease inhibitor cocktail. This mixture was supplemented with 2 μ L PNGase F (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) to deglycosylate membrane proteins and increase downstream sequence coverage. The solubilization mixture was incubated 4 h with vortexing at room temperature, after which the NeutrAvidin agarose was collected into a snap-cap filter tube and the flow-through discarded. The resin was washed three times with 800 μ L 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl by inverting the tube two to three times and centrifuging at 500 \times *g* for 1 min. Bound biotinylated proteins were eluted by incubating the resin with 150 μ L 20 mM Tris-HCl pH 8, 1% w/v DOC, and 10 mM DTT, on a vortex for 1 h. The solution was centrifuged at 1000 \times *g* for 2 min. Elution buffer without DTT (50 μ L) was added to wash the resin, centrifuged at 1000 \times *g* for 1 min and the eluates were combined.

2.5 Sample preparation for LC-MS/MS analysis

DOC was added to the isolated proteins to 5% w/v and incubated 5 min at 95°C. The protein sample was alkylated with 20 mM iodoacetamide for 30 min in the dark. Prior to digestion, DOC was diluted to 2.5% with 100 mM ammonium bicarbonate. A total of 500 ng of proteomics grade trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added and the solutions were incubated at 37°C overnight. TFA was added to 1.5% w/v, vortexed, and the precipitated DOC was pelleted at 17 000 \times *g* for 5 min. The SNs were desalted on a C18 material (3M Empore, Two Harbours, MN, USA) StageTips [17], eluted, and reconstituted in 0.5% TFA.

2.6 nano-LC/MS/MS analysis

Peptides were separated on an Agilent 1200 series nano-LC with in-house packed (3 μ m 100 Å ReproSil-Pur C18AQ particles, Dr Maisch, Entingen, Germany) 15 cm 75 μ m id (tip diameter 8 μ m) emitter-columns (New Objective, Woburn, MA, USA) using 5–40% B (135 min) and 40–60% B (15 min) separating gradients. Buffer A was 0.5% acetic acid in water and B 0.5% acetic acid in 80% (ACN). Separated peptides were eluted at 200 nL/min (spray voltage 2.0 kV) to an LTQ Orbitrap XL mass-spectrometer (Thermo Fisher Scientific) operating with a top-5 MS/MS strategy. Briefly, one high-resolution MS scan was taken with a resolution setting of 60 000 at 400 *m/z* and five most intense precursors were subjected to linear ion trap MS/MS. Full scan (target value 1 000 000 ions) and MS/MS (5000 ions) injection times were 500 and 150 ms, respectively. Dynamic exclusion (list size 500) was set to 120 s and only charge states $>+1$ were subjected to MS/MS.

2.7 Raw data analysis

Mass-spectrometric raw data were analyzed with MaxQuant 1.4.0.8 [18] using the UniProt bovine complete proteome database (<http://www.uniprot.org/>, 2012 December version). Three missed cleavages were allowed to account for larger peptides resulting from lysine modification. Carbamidomethylation was set as a fixed modification and methionine oxidation, N-terminal acetylation, asparagine deamidation, and S-carbamidomethylated lysines as variable modifications. Criteria for identification were specified as following: one peptide, minimum length of seven residues and false discovery rate $<1\%$ using a target-decoy approach. Match between runs was enabled, and all other parameters were default. The MS proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD001096 [19]. Only proteins that were found in all three biological replicates were considered for further analysis. Additionally, all bovine protein hits with currently unassigned gene names were supplemented with a closest ortholog gene name using NCBI Protein BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). All protein intensities (summed peptide peak areas) were normalized by division with the total sample intensity. Contributions of protein categories with different functions (e.g. molecular transport) or properties (e.g. transmembrane) were calculated based on normalized protein intensities (giving a category total ion current fraction or TIC%). For increased abundance accuracy on the protein level, contributions of individual members were estimated by the exponentially modified protein abundance index (emPAI) [20] using an optimized exponent base of 6.5 [21].

2.8 Protein sequence motif analysis

Entire protein amino acid sequences were retrieved from UniProt according to its accession number. Several motifs leading to the association of identified proteins with cellular membranes and secretory pathways were determined. TMHMM v.2.0 [22] was used for predicting transmembrane helices. N-terminal signal peptides for protein secretion were estimated via SignalP v.4.1 [23]. The probability of a protein following the noncanonical secretory pathway was predicted using SecretomeP v.2.0 [24]. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor motif was predicted by four independent algorithms: PredGPI [25], big-PI [26], GPI-SOM [27], and FragAnchor [28]. If two of the four algorithms predicted a GPI anchor, the protein was taken as containing the motif. ngLOC [29] was used for estimating the final subcellular location of each protein according to their amino acid composition. Proteins localizing to PM or extracellular space with at least 10% probability were reported.

2.9 GO enrichment

Enrichment of GO terms, signaling pathways, and tissue expression used the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v.6.7 [30, 31]. For better coverage of identified proteins, official protein gene symbols were uploaded and human background was used. Enrichment was applied for following GOTERM categories: biological process, molecular function, and cellular component. Additional enrichment used the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathways and UniProt tissue annotation. False discovery rate <5% was used as the cut-off for statistical significance.

2.10 Graphics

Interaction models between proteins were predicted using STRING v.9.1 [32, 33] with human background information. The networks were created from secreted and PM proteins predicted by ngLOC. A cut-off value of 0.4 was used for the combined score, which was computed by combining the probabilities from the different evidence channels (experimental and curated data) and corrected for the probability of randomly observing an interaction [34]. The predicted network data were transferred to Cytoscape v.2.8.2 for visualization, using MultiColoredNodes package v.2.54.

2.11 Validation of proteins by immunocytochemistry

The PM localization of two proteins, plasma glutamate carboxypeptidase, CPQ, and carboxypeptidase, vitellogenic-like, CPVL, in spermatozoa was confirmed by immunocytochemistry (ICC) using specific antibodies. Ejaculated semen was obtained from additional two bulls with normal fertility that did not provide semen samples for the MS study. Fresh semen was washed three times with PBS and centrifuged at $500 \times g$ for 10 min. Pellets suspended in PBS were pipetted to microscope glass slides and dried at 37°C degrees for 10 min. No permeabilization was used. Next, sperms were incubated 1 h at room temperature with primary antibody dilution (1:50) or primary antibody with 50× blocking peptide solution in order to assess specificity of antibodies. Antibodies used were CPQ rabbit polyclonal antibody (Aviva System Biology, San Diego, CA, USA) and CPVL goat polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, sc-10477; Dallas, TX, USA), blocking peptides used were CPQ Blocking Peptide (33R-9484, Fitzgerald) and CPVL Blocking Peptide (Santa Cruz Biotechnology, sc-104177 P). Samples were washed three times with PBS and immunolabeling was visualized by incubating the sperms for 1 h at room temperature with the secondary goat anti-rabbit antibody conjugated with fluorochrome Alexa 594 (Molecular Probes, A-21442; OR, USA) and donkey anti-goat antibody conjugated with Alexa 594 (Molecular Probes) for CPQ and CPVL, respectively. After incubation,

the slides were washed three times with PBS, followed by the counterstaining with DAPI for 5 min. Finally, the slides were mounted in the antifading mounting medium (ProLong Gold Antifade Mountant, Molecular Probes) in order to protect the dyes. The immunostaining of sperms was checked by a visual microscoping system Olympus BX50, using objectives UplanFI 40x/0.75 or 100x/1.30 Oil Iris, and photographed with DP50-CU Photographing System (Olympus, Tokyo, Japan).

3 Results

3.1 Identified proteome after enrichment

Double enrichment for bovine sperm surface proteins was carried out using cell surface biotin-labeling and subcellular fractionation (Fig. 1). Purified proteins were proteolyzed with trypsin and the peptide mixtures analyzed with nanoflow-LC LTQ Orbitrap XL MS/MS. Overall, we identified 453 different protein groups (Supporting Information Fig. 1) across replicates. To minimize the inclusion of proteins that are potentially background to biochemical purification, and would therefore show high variation, only proteins that were common to all three replicates ($n = 338$) were further investigated.

For compositional comparison, we obtained a list of proteins ($n = 946$) from the sperm total lysate under identical analytical MS measuring time ($t = 150$ min). The results for the enriched PM proteome and total cellular lysate analysis are summarized in Supporting Information Tables 1 and 2, respectively. A summarized view of the distribution of the functional categories of PM-enriched proteins, based on signal contribution estimation (functional category TIC% and protein emPAI), is depicted in Fig. 2.

3.2 Estimation of surface proteome purification efficiency and prediction of protein sequence motifs

One way to evaluate subcellular enrichment is to monitor a PM marker enzyme (e.g. alkaline phosphatase) specific activity. However, this approach is prone to loss of enzymatic activity in the course of prolonged denaturing purification, and would thus be an inaccurate estimate for purification. For evaluating the success of our enrichment approach, we first predicted protein motifs for the list of proteins obtained by the LC/MS/MS using various freely available algorithms (for complete list see Section 2.8). We then used the protein intensity data (obtained by summing individual peptide chromatographic peak areas) to monitor how the enrichment affects the relative composition of different motifs in the analyzed proteome (Table 1A). Due to the large size (on average $n = 96$ members) of the protein motif groups, the differential signal contributions originating from unequal sequence lengths and ionization efficiencies would average out and therefore enable estimations based on intensity data.

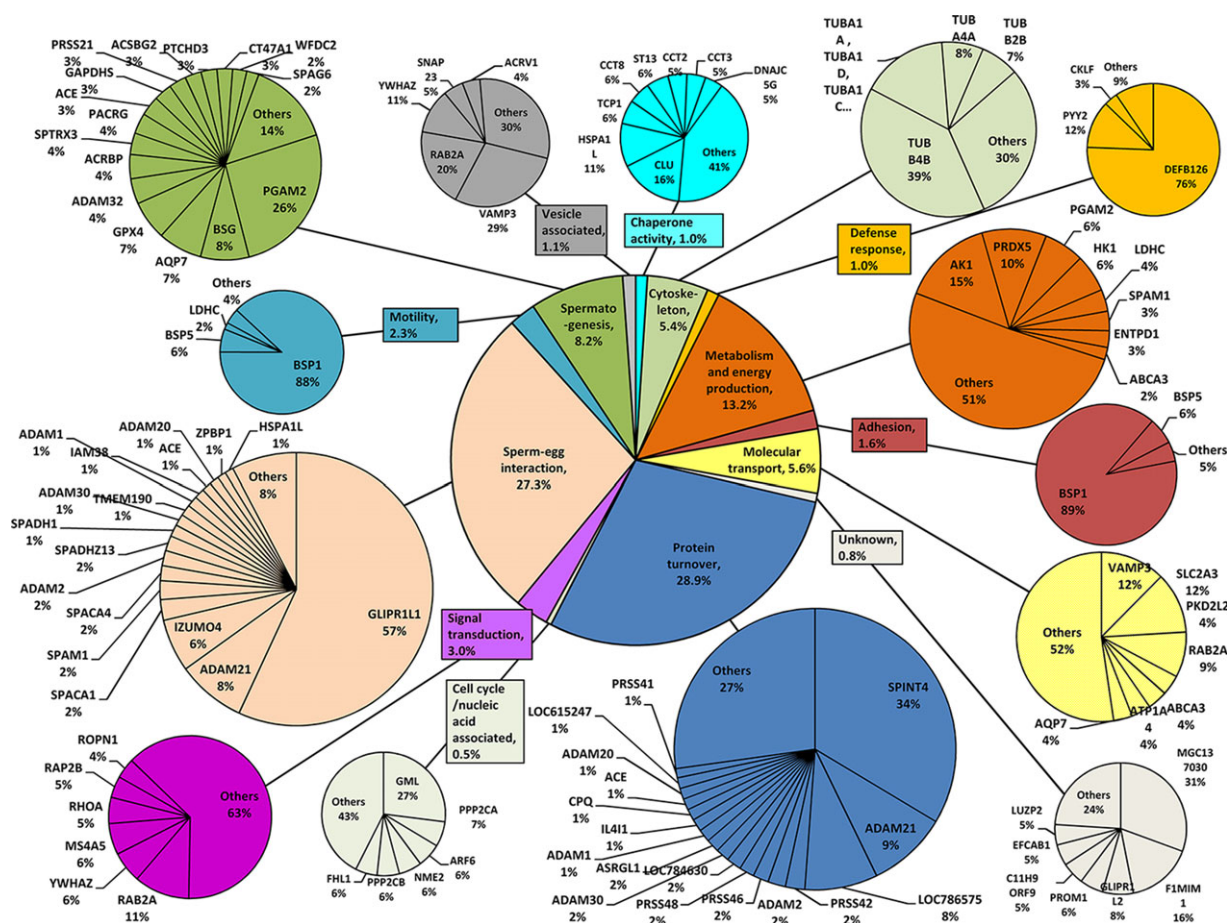


Figure 2. Graphical representation of identified proteins in the plasma membrane enriched proteome. Functional category contributions are calculated based on summed protein intensities. Individual protein contributions are derived by the empAI method.

As a result of the biotinylation and differential centrifugation, we observed highly significant enrichment for transmembrane ($p < 0.005$) and PM-targeted proteins ($p < 0.001$), and significant enrichment of GPI-anchor containing proteins ($p < 0.05$) (Table 1B). The enrichments for transmembrane, GPI-anchor (canonically targeted to the PM [35]), and PM + GPI combined proteins were on average 4.3-, 17.0-, and 11-fold compared to the crude cell lysate. The enrichments for secreted and extracellular proteins were, however, not significant and appeared to result from the high abundance of seminal plasma proteins (namely BSP1 and -5) in the total cell lysate samples (Supporting Information Table 2). These most likely nonspecifically adsorbed proteins would be removed from membranes during the washing steps of the enrichment protocol.

3.3 Functional classification of proteins

Proteins were functionally classified into 13 categories based on the UniProt GO annotations and the sperm proteome literature. The classifications included (with relative quantitative

contributions in parentheses, also Fig. 2 central pie chart): protein turnover $n = 75$ (28.9%), sperm–oocyte interaction $n = 40$ (27.3%), metabolism/energy production $n = 88$ (13.2%), spermatogenesis $n = 25$ (8.2%), molecular transport $n = 52$ (5.6%), cytoskeleton $n = 17$ (5.4%), signal transduction $n = 48$ (3%), motility and sperm fertility $n = 15$ (2.3%), adhesion $n = 12$ (1.6%), vesicle-associated proteins $n = 20$ (1.1%), defense response $n = 10$ (1.0%), chaperone $n = 20$ (1.0%), and cell cycle/nucleic acid associated $n = 17$ (0.5%) proteins. Proteins with unknown function were designated as uncharacterized $n = 16$ (0.8%). Of the 338 proteins, 84 ($n = 84$) were divided into maximum of three functional categories and 254 proteins into one specific category. The 338 proteins were compared with the data of 237 proteins recently published by Byrne et al. [13]. The functional comparison was based on gene names or UniProt identifiers. There were 209 unique findings in our study and 129 proteins in common between the studies. In terms of individual proteins, the largest protein groups in both studies included metabolism and energy production ($n = 32$), molecular transport ($n = 28$), protein turnover ($n = 24$), sperm–oocyte interaction ($n = 24$), and signal transduction ($n = 18$).

Table 1. Enrichment analysis based on fraction of summed protein intensities (TIC%) belonging to a specific protein motif: (A) Data of the plasma membrane enriched and nonenriched total cellular lysate proteomes and (B) summary of enrichment for different motifs, *n*-fold enrichment along with calculated *p*-values are indicated

(A)	Plasma membrane enriched proteome				Nonenriched total cell lysate			
	Rep. 1 (%)	Rep. 2 (%)	Rep. 3 (%)	Mean ± SE (%)	Rep. 1 (%)	Rep. 2 (%)	Rep. 3 (%)	Mean ± SE (%)
TM proteins	28.5	33.5	44.7	35.6 ± 4.8	7.1	11.2	6.4	8.2 ± 1.5
CL secretion	33.1	39.3	38.5	37.0 ± 1.9	45.3	13.6	23.3	27.4 ± 9.4
NCL secretion	60.4	57.9	59.2	59.2 ± 0.7	67.1	49.0	61.1	59.1 ± 5.3
CL and/or NCL secretion	70.3	76.9	70.7	72.6 ± 2.1	69.8	52.9	62.9	61.9 ± 4.9
GPI-anchor	11.5	26.8	14.7	17.7 ± 4.7	0.8	1.6	0.7	1.0 ± 0.3
PM proteins	37.2	36.4	48.9	40.8 ± 4.1	3.5	7.4	2.3	4.4 ± 1.5
PM + GPI-proteins	48.4	62.3	62.8	57.8 ± 4.7	4.1	8.7	2.9	5.3 ± 1.8
EXC proteins	5.4	12.0	8.7	8.7 ± 1.9	40.0	4.9	17.6	20.8 ± 10.3

(B)	Enrichment, <i>n</i> -fold	<i>p</i> -Value*
TM proteins	4.3	0.003
CL secretion	1.4	0.4
NCL secretion	1.0	1.00
CL and/or NCL secretion	1.2	0.11
GPI-anchor	17.0	0.03
PM proteins	9.3	0.0009
PM + GPI-proteins	11.0	0.0005
EXC proteins	0.4	0.34

Algorithms used for motif predictions were TMHMM v.2.0 (transmembrane proteins), SignalP v.4.1 (N-terminal signal peptide, classical secretion motif), SecretomeP v.2.0 (nonclassical secretion), and ngLoc (subcellular localization prediction). For GPI-anchor analysis, four algorithms were used: PredGPI, big-PI, GPI-SOM, and FragAnchor. TM, transmembrane; CL, classical; NCL, nonclassical; PM, plasma membrane; EXC, extracellular; SE, standard error.

*Percentages were arcsine transformed and significance calculated with two samples *t*-test or Welch's test (estimation for equal or unequal variances was done with the *F*-test).

3.4 GO enrichment

Analysis of the identified proteins, according to GO terms, identified significant enrichment of 114 terms in the domain of biological processes (Supporting Information Table 3). The statistically most relevant terms were related to metabolic pathways and to fertilization (single fertilization, fertilization, sexual reproduction, sperm–egg recognition, and others). According to UniProt tissue expression database, a significant enrichment for testis and sperm proteins was observed (Supporting Information Table 3).

3.5 Interactions on the sperm PM

Since a large proportion of proteins found in our data (Supporting Information Table 1) were predicted to be secreted, we were also interested in the interaction networks formed on the sperm surface between PM integral and peripheral proteins. STRING v.9.1 software was used to draw a network based on known protein–protein interactions between the predicted PM and extracellular proteins annotated by the ngLOC algorithm. The found networks are depicted in Fig. 3. In the largest network, proteins with the highest number of interaction partners are albumin (ALB with 25 interactions),

sperm adhesion molecule 1 (SPAM1 with 8 interactions), synaptosomal associated protein, 23 kDa (SNAP23 with 6 interactions), acrosin (ACR with 6 interactions), and izumo sperm–egg fusion 1 (IZUMO1 with 4 interactions). Additionally, two separate smaller networks were found where ATP1A4 (four interactions) and DNAJC5G (three interactions) were present as the central proteins (Fig. 3).

3.6 Validation of proteins by ICC

We selected two proteins, CPVL and CPQ, present in our enriched proteome and previously not reported in bovine sperm (Table 2) to be validated by ICC. Both proteins apparently do not contain transmembrane helices (TMHMM 2.0). CPQ is predicted to be extracellular seminal plasma protein (ngLOC), whereas CPVL had the highest predicted localization in the PM (ngLOC). Nevertheless, CPVL is to our knowledge a completely new finding in sperm and has previously been reported in the context of immune cells [36].

Validation of the selected proteins by ICC showed both proteins to be present in bovine sperm. Using specific antibodies and blocking peptide control, we found CPVL located as a cap structure in the region of apical PM. The signal

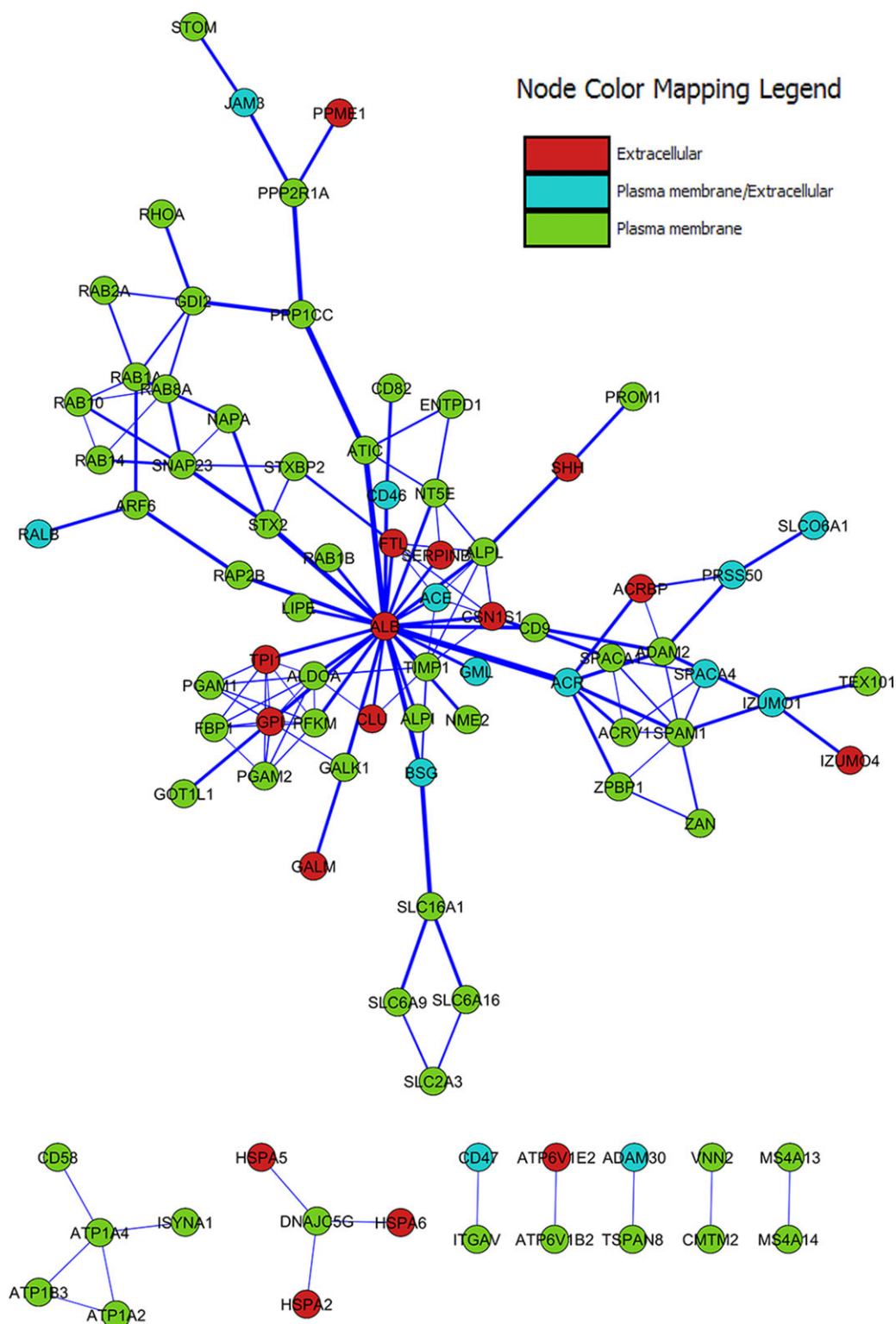


Figure 3. Network based on known and predicted protein–protein interactions of extracellular and plasma membrane proteins. Subcellular localization for the input proteins was estimated by ngLOC algorithm according to their amino acid sequence. Proteins with $\geq 10\%$ estimate to be localized in plasma membrane or secreted were used to draw the interaction map according to STRING v.9.1. Confidence view of the network is presented, with line thickness correlating to the combined score explained in Section 2, representing both functional and physical interactions between the proteins. Predicted protein localization is visualized by the indicated color-code.

Table 2. Proteins previously not described on bovine sperm surface

Gene	Protein	Prior evidence from other sources	Organism and source	Possible function	Number of identified peptides in the enriched proteome	TIC% in total cell lysate (%)	TIC% in enriched proteome (%)
CPQ	Carboxypeptidase Q	[41], 2D-PAGE and mass spectrometry	Ram reproductive fluid	Protease	14	0.21	0.50
CD58	Lymphocyte function associated antigen 3	[71], flow cytometry	Human postacrosomal sperm	Sperm-egg adhesion	6	ND	0.03
CKLF	Chemokine-like factor	[72], immunofluorescence	Human U937, COS7 cell lines	Inflammation Fertility	3	ND	0.02
CPVL	Probable serine carboxypeptidase	[36], immunofluorescence	Human macrophages, membrane ruffles	Protease	15	0.07	0.24
GLB1L3	Beta-galactosidase (Fragment)	[50], cDNA microarray	Boar testicular and epididymal tissue	Spermatogenesis	8	ND	0.05
LPCAT2B	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2B	[51], immunofluorescence	Human COS7, Huh7, A431 lines	Lipid metabolism	8	0.001	0.03

TIC%, intensity fraction; ND, not detected.

was weakened but not absolutely inhibited by the blocking peptide (Fig. 4, Supporting Information Fig. 3). CPQ however showed a strong signal mainly in the sperm midpiece and tail. Inhibition with the blocking peptide lost the staining almost completely (Fig. 5). However, despite the identical treatment of spermatozoa in samples taken from both bulls, the signal intensity reduction after inhibition varied between the different animals (Supporting Information Fig. 4). Yet, as it appeared, the blocking peptide significantly decreased the staining in midpiece and proximal part of the tail, implying the CPQ's association primarily with the sperm tail (Fig. 5). As spermatozoa used for ICC were native, nonfixed, and not permeabilized, we conclude along with the enrichment data that the validated proteins are true sperm membrane associated proteins.

4 Discussion

This study was based on a biotinylation and classical subcellular fractionation (Fig. 1) to probe the surface proteome of bovine sperm cells. Using shotgun proteomics, 338 proteins were confidently identified, of which the most numerous representatives were proteins associated with the regulation of metabolism/energy production, protein turnover, molecular transport, and signal transduction along with proteins mediating sperm-oocyte interactions and spermatogenesis. Based on total protein intensities, proteins associated with protein turnover and sperm-oocyte interactions had one of the strongest quantitative signals in our data (Fig. 2), underlying the fact that our protein enrichment method preferentially purified and analyzed proteins involved in sperm-oocyte interactions.

Comparing our results to the recently published bovine sperm surface proteomics data that applied nitrogen cavitation as the enrichment method [13], only 29% (129/446) of the proteins were found to overlap in the combined list. This can be attributed to the different PM protein enrichment selectivities and the associated dynamic range dependent detection probabilities [37]. For example, nitrogen cavitation favors the analysis of PM from the apical portion of the sperm [15], while biotinylation is expected to profile the proteome uniformly around the whole cellular PM preferentially labeling lysine-rich proteins. Therefore, we believe that both methods yield complementary information on the protein composition of the sperm PM that cannot be entirely captured by one method alone.

Biotinylation with Sulfo-NHS-SS-Biotin in combination with additional purification steps has been reported to yield up to 70% of PM proteins in the enriched list [38]. This biotinylation reagent is water-soluble and relatively unstable in the reducing cytosolic environment [39], thereby reducing possible contamination by intracellular proteins. Our data indicate that approximately 11-fold enrichment (not accounting extracellular proteins) for PM-targeted proteins (Table 1B, PM + GPI proteins) was achieved compared to the

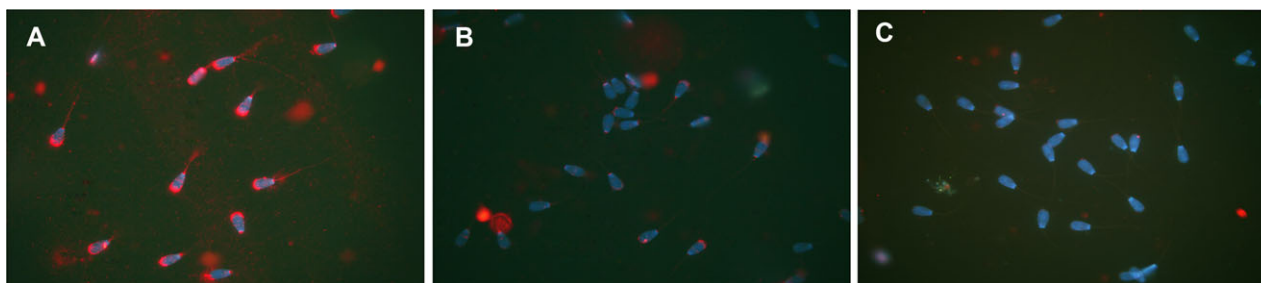


Figure 4. Immunolocalization of CPVL in native nonfixed nonpermeabilized spermatozoa. **(A)** CPVL is strongly stained as a cap-like structure in the apical region of sperm head and weakly in the middle piece (red color). **(B)** Addition of 50× blocking peptide to the primary antibody markedly decreased the intensity of CPVL staining. **(C)** Negative control staining of sperms with secondary antibody. The sperm head is stained with DAPI (blue color).

nonpurified cell lysate. Therefore, we consider the biotinylation-based approach as adequate in describing the bovine sperm cell surface integral and peripheral proteome.

According to protein sequence motif analysis, membrane-associated and secreted proteins were predicted to constitute a network of diverse interactions based on STRING analysis (Fig. 3). Several proteins assigned with similar functions cluster together (Supporting Information Fig. 2), suggesting more or less specific functional and/or physical interaction networks on the cell surface.

One of the largest protein groups in our report was protein turnover group with the highest abundance of Kunitz-type protease inhibitor 4 (SPINT4) (Fig. 2, Supporting Information Table 1). SPINT4 is an epididymis-specific serine protease inhibitor that is involved in control of proteolytic processing of sperm surface in epididymis, and therefore is a putative target for male contraceptives in humans. With high emPAI values in the protein turnover group, our dataset also included a family of serine proteases (PRSS21, 40, 41, 42, 45, 46, 48, 50, and 55), of which PRSS21 (testisin) influences sperm morphology and motility, with the deficiency of this enzyme reducing sperm's fertilizing capacity [40].

We also identified a protease carboxypeptidase Q (CPQ; Table 2, Supporting Information Table 1), which to our knowledge has not been previously described on the bovine

sperm surface. Nevertheless, CPQ has been found in reproductive fluids in male rams [41]. CPQ is possibly secreted to the cell surface where it hydrolyses C-termini of peptides in the PM, contributing to membrane modifications during sperm maturation. ICC showed CPQ to locate mainly in the sperm middle piece and tail (Fig. 5), suggesting its possible role in sperm tail function. Another carboxypeptidase that appears to be a new finding in sperm membrane is a probable serine carboxypeptidase, vitellogenic-like CPVL (Table 2, Supporting Information Table 1). It has been thought to be restricted to macrophages, although its expression has also been detected in placenta and other tissues. CPVL locates in membrane ruffles in human macrophages and is transported to the PM by the secretory pathway [36]. In sperm, ICC showed significant staining in the apical PM region of the sperm head (Fig. 4), which may imply on its role in surface protein remodeling aiming for interactions between sperm and egg coatings.

The protein turnover group also included a number of subunits of the 26S proteasome group 20S core particle—PSMA2–6, 8 (alpha type subunits 2–6, 8) and PSMB1–6 (beta-type subunits 1–6). The identification of numerous proteasome subunits is in accordance with the previous bovine surface proteome study [13]. Proteasomes located in the neck region and on the surface of the mammalian sperm acrosome

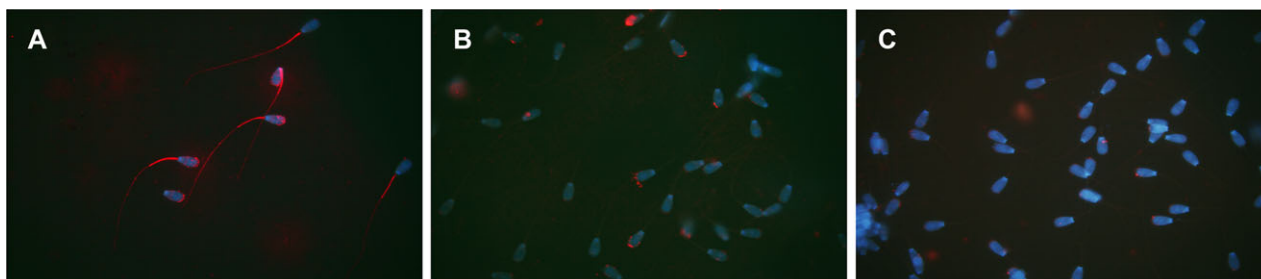


Figure 5. Immunolocalization of CPQ in native nonfixed nonpermeabilized spermatozoa. **(A)** CPQ stains red in the middle piece and sperm tail. **(B)** Addition of 50× blocking peptide to the primary antibody almost completely removed the specific staining of CPQ. **(C)** Negative control staining of sperms with secondary antibody. The sperm head is stained with DAPI (blue color).

may be involved in several critical stages of capacitation [42], acrosomal reaction [43], oocyte zona pellucida (ZP) penetration [44], and pronuclear development in zygotes [45] since proteasomal inhibitors block these processes.

Aforementioned processes along with sperm motility require energy. In addition to the mitochondria in the middle piece, ATP is produced by the glycolytic enzymes that locate in the cytoskeletal structure, fibrous sheath, residing just beneath the PM in the flagellum of many mammals [46]. We identified glycolytic enzymes that were recently found to locate also in the head region of human sperm. Surprisingly, some of them, aldolase A (ALDOA) and triosephosphate isomerase (TPI1), have been proposed to mediate interactions with ZP glycoproteins [47]. Our data also affirmed the presence of metabolic enzymes such as hexokinase-1 (HK1) [48], glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) pyruvate kinase (PK) [49], and enolase-1 (ENO1) [47]. These proteins have been found in posterior and anterior regions of the sperm head in murines and boar, ENO1 in human sperm. Moreover, HK1 along with a member of lactate dehydrogenase (LDH) family, LDHAL6B, is a constituent of lipid rafts with ordered assemblies of specific proteins in the PM of uncapacitated spermatozoa in mice. This could explain our finding of L-lactate dehydrogenase A (LDHA).

Two metabolic proteins that to our knowledge have not been described in bovine sperm, but may have important roles in sperm fertility are beta-galactosidase-1-like protein 3 (GLB1L3) and lysophosphatidylcholine acyltransferase 2B (LPCAT2B). Both were identified in our PM-enriched proteome and predicted to be secreted to the PM (Table 2, Supporting Information Table 1). GLB1L3 is involved in digestion of glycosyl groups with its close relative beta-galactosidase-1-like protein 4 (GLB1L4) considered to be bound to the head region of sperm during sperm maturation in rats [50]. LPCAT2B, found on the surface of lipid droplets in human cell cultures, is responsible for synthesis of phosphatidylcholine, a major component of PM [51]. In ram sperm, phosphatidylcholine protects sperm from rapid temperature decrease and raises the responsiveness to acrosome reaction in vitro in human sperm [52, 53].

The proteins involved in molecular transport are also highly represented in our dataset, most abundant group consisting of members of the membrane integral solute carrier family (Fig. 2), forming a predictive network based on STRING analysis (Fig. 3, Supporting Information Fig. 2). For example, solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3 (SLC2A3), facilitates hexose transport in human bull and rat sperm [54]. A membrane-bound monocarboxylate transporter 1 (SLC16A1) facilitates lactate or pyruvate transport into sperm cell, providing alternative substrates for ATP production during spermatogenesis. Based on extracellular protein network (Fig. 3), SLC16A1 is a binding partner for basigin, a constituent of membrane lipid rafts, which targets monocarboxylate transporters to the PM and is required for fertility and embryo implantation in mice [55, 56].

Aside molecular transport function, members of Ras-related proteins in the brain (Rab) family function also as signal transducers. Rab proteins belong to the small GTPase superfamily that contains also Rho and ADP-ribosylation factor (Arf) families, all present in our data. Different members of these families occur on distinct endomembranes and the PM in eukaryotes. Our data show numerous Rab proteins (Supporting Information Table 1, Fig. 2), which have been attributed diverse functions in sperm. Ras-related protein Rab-2A (RAB2A) is required for vesicle accumulation and coalescence to form an acrosome in bovine sperm [57]. RAB10 regulates trafficking of glucose transporters from the intracellular compartments to the PM in adipocytes [58], implying their possible role in sugar import and energy production in sperm cells. RAB14, which has relatively high protein levels in testis, is involved in biosynthetic/recycling pathway between Golgi apparatus and endosomes [59].

For successful fertilization, a sperm cell must first interact with the somatic cumulus cells surrounding the egg, then the ZP, and finally it must fuse with the PM of the oocyte. STRING analysis with our enrichment data shows a group of proteins mediating sperm–oocyte interactions that form a network on the cell surface (Fig. 3). One of the proteins with the highest number of binding partners is a sperm adhesion molecule 1 (SPAM1), with its hyaluronidase activity enabling a sperm to penetrate the cumulus matrix surrounding the egg. GPI-anchored SPAM1 is transported to the surface of the sperm cell by membranous vesicles of epididymal origin [60]. PM-located testis-expressed sequence 101 protein (TEX101) and IZUMO proteins may be the closest binding partners for SPAM1, as also previously suggested from mice studies [56]. GPI-anchored and complex-forming IZUMO1 and extracellular IZUMO4 proteins are involved in sperm–egg fusion in mice [61]. SPAM1 also interacts with several acrosomal proteins, including acrosin (ACR), zonadhesin (ZAN), and sperm acrosome membrane associated proteins 1 and 4 (SPACA1 and SPACA4). A previous study also addressed interactions with SPAM1 and heat shock related 70 kDa protein 2 (HSPA2) [62] that was represented in our dataset.

Another highly represented group in our study included the a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) protein family (Fig. 2, Supporting Information Table 1), which along with proteolysis is involved in cell adhesion. As they contain a disintegrin domain, they can potentially bind to integrins in the PM of the oocyte [63], which explains interactions between ADAM2 (fertilin β) and other proteins involved in sperm–egg fusion such as ACR, ACRBP, SPAM1, and IZUMO proteins (Fig. 3). We also found several other testis/germ cell-specific ADAM proteins: ADAM1 (fertilin α), ADAM3A (cyritestin), ADAM20, ADAM21, ADAM30, and ADAM32. Another protein family that may have a role in gamete interactions is the sperm-coating protein glioma pathogenesis-related 1 (GLIPR1) family, with two representatives in our study: GLIPR1-like 1 (GLIPR1L1) and GLIPR1-like 2 (GLIPR1L2). Both belong to the cysteine-rich secretory protein (CRISP), antigen 5, and pathogenesis-related 1

(CAP) superfamily thought to be involved in cell–cell adhesion among their other functions [64]. GLIPR1L1 was detected as one of the most abundant proteins in sperm–egg interaction category (Fig. 2, Supporting Information Table 1). The protein has also been recently identified in bovine sperm lipid raft membrane domains, and was detected in sperm PM preparations by Western blotting [65]. Additionally, anti-GLIPR1L1 antibodies impaired sperm binding to ZP.

Arylsulfatase A (ARSA), sperm surface protein, is obtained by epididymal transit and remains on the cell surface during capacitation [66]. ARSA seems to bind to mouse ZP receptor 2 (mZP2) and mouse ZP receptor 3 (mZP3) [67]. In addition, we found a tetraspanin family protein (CD9) that has only recently been described in mouse sperm. It is hypothesized to mediate sperm–oocyte fusion via homophilic interaction with CD9 on the oocyte. Sperm CD9 is normally associated with the inner acrosomal membrane, and is exposed to PM in the acrosomal reaction [68]. Another protein that is exposed after acrosomal exocytosis is complement regulatory protein 46 (CD46), which protects the sperm from the female complement system [69], regulates the acrosome reaction [70], and is involved in the penetration to the oocyte [71]. As both, CD46 and CD9 are exposed only after the acrosomal reaction, it cannot be ruled out that the acrosomal reaction had occurred, at least to some extent, in our samples, thereby exposing proteins normally masked in uncapacitated spermatozoa. However, STRING analysis indicates that CD46 associates with the PM-bound cell adhesion antigen, CD82 (Fig. 3). Thus, another explanation is CD46 copurification with CD82 in case of strong protein–protein interactions. Among adhesion molecules we also detected lymphocyte function associated antigen 3 (CD58), a protein whose low expression in human sperm correlates with poor oolemma penetration [72]. CD58 has not been identified on bovine sperm so far and appears to have transmembrane motif (Supporting Information Table 1, TMHMM 2.0). Our data also include an inflammatory protein chemokine-like factor (CKLF), which is highly expressed in human testis [73]. Human CKLF has four isoforms of which two possess transmembrane domains (UniProt), being also consistent with our results (Table 2, Supporting Information Table 1). CKLF has not been previously described in bovine spermatozoa to our knowledge; also it remains unclear whether the expressed CKLF is necessary for bull's fertility, or is it being expressed because of inflammation.

Overall, our enrichment approach appeared to capture a significant proportion of seminal plasma proteins. We suggest that these proteins serve physiological role in sperm viability and function. Seminal plasma proteins are secreted by testis, epididymis, and accessory reproductive glands, and several of them are adsorbed to the cell surface at ejaculation. These proteins are shown to stabilize the structure of sperm surface and restore the cold-shock damage of ram sperms [74]. Also, some proteins are believed to prevent premature capacitation in cooled boar sperm, which may result from inhibition of signal transduction pathways and changes in sperm PM [75].

The mechanisms by which seminal plasma proteins bind to the PM are varied. Many of them, such as BSPs, are heparin binding proteins that attach to choline phospholipids, phosphatidylcholine plasmalogen, and sphingomyelin, very common in sperm PM [76]. A study by Kumar et al. [77] revealed a list of heparin binding proteins from male seminal fluid of which some resemble to our results. The majority of proteins found in human account for enzymes, particularly proteases. Our ICC results confirm the presence of two proteases, CPVL and CPQ, previously not described in bovine sperm or the sperm cell surface context. Both proteins lack apparent transmembrane helices and contain motifs that would target them to the secretory pathway. Covalent lipid modifications are, for example, common modifications that have been described to increase affinity for PM [78]. It is possible that seminal plasma proteins found in this study attach to PM via lipid or sugar modifications, and not to a specific receptor. Since the current samples were not capacitated and seminal plasma proteins, adhered to PM at ejaculation, are essential for sperm viability, it offers an explanation to the abundance of these extracellular proteins in our dataset.

In summary, we have applied a multistage purification strategy for sperm PM proteins using biotinylation with subcellular fractionation to expand and support the subcellular localization data of various sperm proteins previously described in global proteomics experiments. Using mass-spectrometric label-free data along with bioinformatic motif detection algorithms, we estimated a highly significant purification for PM-targeted proteins. Numerous of these proteins have not previously been reported in bovine sperm, including CPVL, a novel sperm protein, which was further validated by ICC. We also show that among the identified proteome, a diverse interconnected network of proteins can be visualized further supporting the relevance of the identified proteome to the sperm surface.

The MS proteomics data in this paper have been deposited in the ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) via the PRIDE partner repository [19]: dataset identifier PXD001096. This research was funded by Estonian Ministry of Education and Research (grant SF0180044s09), Enterprise Estonia (grant EU30020), Archimedes Foundation (ANIREP 3.2.0701.12-0036), COST Action FA1201, and the European Regional Development Fund through the Center of Excellence in Chemical Biology. The authors would also like to thank Triin Viltrop, Olav Sarv, and Monika Nõmm for helpful discussions on sperm physiology.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Leahy, T., Gadella, B. M., Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction* 2011, 142, 759–778.

- [2] Muiño-Blanco, T., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J. A., Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod. Domest. Anim.* 2008, *43*, 18–31.
- [3] Baker, M. A., Reeves, G., Hetherington, L., Müller, J. et al., Identification of gene products present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS/MS analysis. *Proteomics Clin. Appl.* 2007, *1*, 524–532.
- [4] Johnston, D. S., Wooters, J., Kopf, G. S., Qiu, Y., Roberts, K. P., Analysis of the human sperm proteome. *Ann. NY Acad. Sci.* 2005, *1061*, 190–202.
- [5] Wang, G., Guo, Y., Zhou, T., Shi, X. et al., In-depth proteomic analysis of the human sperm reveals complex protein compositions. *J. Proteomics* 2013, *79*, 114–122.
- [6] Baker, M. A., Hetherington, L., Reeves, G. M., Aitken, R. J., The mouse sperm proteome characterized via IPG strip pre-fractionation and LC-MS/MS identification. *Proteomics* 2008, *8*, 1720–1730.
- [7] Baker, M. A., Hetherington, L., Reeves, G., Müller, J., Aitken, R. J., The rat sperm proteome characterized via IPG strip pre-fractionation and LC-MS/MS identification. *Proteomics* 2008, *8*, 2312–2321.
- [8] Peddinti, D., Nanduri, B., Kaya, A., Feugang, J. M. et al., Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Syst. Biol.* 2008, *2*, 19.
- [9] Cordwell, S. J., Thingholm, T. E., Technologies for plasma membrane proteomics. *Proteomics* 2010, *10*, 611–627.
- [10] Helbig, A. O., Heck, A. J., Slijper, M., Exploring the membrane proteome—challenges and analytical strategies. *J. Proteomics* 2010, *73*, 868–878.
- [11] Speers, A. E., Wu, C. C., Proteomics of integral membrane proteins—theory and application. *Chem. Rev.* 2007, *107*, 3687–3714.
- [12] Elschenbroich, S., Kim, Y., Medin, J. A., Kislinger, T., Isolation of cell surface proteins for mass spectrometry-based proteomics. *Exp. Rev. Proteomics* 2010, *7*, 141–154.
- [13] Byrne, K., Leahy, T., McCulloch, R., Colgrave, M. L., Holland, M. K., Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. *Proteomics* 2012, *12*, 3559–3579.
- [14] Bongalhardo, D. C., Somnapan-Kakuda, N., Buhr, M. M., Isolation and unique composition of purified head plasma membrane from rooster sperm. *Poult. Sci.* 2002, *81*, 1877–1883.
- [15] Brewis, I. A., Gadella, B. M., Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Mol. Hum. Reprod.* 2010, *16*, 68–79.
- [16] Fujiki, Y., Hubbard, A. L., Fowler, S., Lazarow, P. B., Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 1982, *93*, 97–102.
- [17] Rappsilber, J., Ishihama, Y., Mann, M., Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.* 2003, *75*, 663–670.
- [18] Cox, J., Mann, M., MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 2008, *26*, 1367–1372.
- [19] Vizcaino, J. A., Deutsch, E. W., Wang, R., Csordas, A. et al., ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat. Biotechnol.* 2014, *32*, 223–226.
- [20] Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T. et al., Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteomics* 2005, *4*, 1265–1272.
- [21] Kudlicki, A., The optimal exponent base for emPAI is 6.5. *PLoS One* 2012, *7*, e32339.
- [22] Sonnhammer, E. L., vonHeijne, G., Krogh, A., A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 1998, *6*, 175–182.
- [23] Petersen, T. N., Brunak, S., vonHeijne, G., Nielsen, H., SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 2011, *8*, 785–786.
- [24] Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., VonHeijne, G., Brunak, S., Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng. Des. Sel.* 2004, *17*, 349–356.
- [25] Pierleoni, A., Martelli, P. L., Casadio, R., PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics* 2008, *9*, 392.
- [26] Eisenhaber, B., Bork, P., Eisenhaber, F., Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. *J. Mol. Biol.* 1999, *292*, 741–758.
- [27] Fankhauser, N., Maser, P., Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics* 2005, *21*, 1846–1852.
- [28] Poisson, G., Chauve, C., Chen, X., Bergeron, A., FragAnchor: a large-scale predictor of glycosylphosphatidylinositol anchors in eukaryote protein sequences by qualitative scoring. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2007, *5*, 121–130.
- [29] King, B. R., Guda, C., nGLOC: an n-gram-based Bayesian method for estimating the subcellular proteomes of eukaryotes. *Genome Biol.* 2007, *8*, R68.
- [30] Huang, da W., Sherman, B. T., Lempicki, R. A., Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009, *37*, 1–13.
- [31] Huang, da W., Sherman, B. T., Lempicki, R. A., Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 2009, *4*, 44–57.
- [32] Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M. et al., STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* 2013, *41*, D808–D815.
- [33] Snel, B., Lehmann, G., Bork, P., Huynen, M. A., STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res.* 2000, *28*, 3442–3444.

- [34] von Mering, C., Jensen, L. J., Snel, B., Hooper, S. D. et al., STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res.* 2005, *33*, D433–D437.
- [35] Kinoshita, T., Fujita, M., Maeda, Y., Biosynthesis, remodelling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: recent progress. *J. Biochem.* 2008, *144*, 287–294.
- [36] Harris, J., Schwinn, N., Mahoney, J. A., Lin, H. H. et al., A vitellogenic-like carboxypeptidase expressed by human macrophages is localized in endoplasmic reticulum and membrane ruffles. *Int. J. Exp. Pathol.* 2006, *87*, 29–39.
- [37] Zubarev, R. A., The challenge of the proteome dynamic range and its implications for in-depth proteomics. *Proteomics* 2013, *13*, 723–726.
- [38] Zhao, Y., Zhang, W., Kho, Y., Zhao, Y., Proteomic analysis of integral plasma membrane proteins. *Anal. Chem.* 2004, *76*, 1817–1823.
- [39] Elia, G., Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins. *Proteomics* 2008, *8*, 4012–4024.
- [40] Netzel-Arnett, S., Bugge, T. H., Hess, R. A., Carnes, K. et al., The glycosylphosphatidylinositol-anchored serine protease PRSS21 (testisin) imparts murine epididymal sperm cell maturation and fertilizing ability. *Biol. Reprod.* 2009, *81*, 921–932.
- [41] Souza, C. E., Rego, J. P., Lobo, C. H., Oliveira, J. T. et al., Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *J. Proteomics* 2012, *75*, 4436–4456.
- [42] Kong, M., Diaz, E. S., Morales, P., Participation of the human sperm proteasome in the capacitation process and its regulation by protein kinase A and tyrosine kinase. *Biol. Reprod.* 2009, *80*, 1026–1035.
- [43] Morales, P., Kong, M., Pizarro, E., Pasten, C., Participation of the sperm proteasome in human fertilization. *Hum. Reprod.* 2003, *18*, 1010–1017.
- [44] Sawada, H., Sakai, N., Abe, Y., Tanaka, E., et al., Extracellular ubiquitination and proteasome-mediated degradation of the ascidian sperm receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, *99*, 1223–1228.
- [45] Rawe, V. Y., Díaz, E. S., Abdelmassih, R., Wójcik, C. et al., The role of sperm proteasomes during sperm aster formation and early zygote development: implications for fertilization failure in humans. *Hum. Reprod.* 2008, *23*, 573–580.
- [46] Mukai, C., Okuno, M., Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol. Reprod.* 2004, *71*, 540–547.
- [47] Petit, F. M., Serres, C., Bourgeon, F., Pineau, C., Auer, J., Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding. *Hum. Reprod.* 2013, *28*, 852–865.
- [48] Travis, A. J., Foster, J. A., Rosenbaum, N. A., Visconti, P. E. et al., Targeting of a germ cell-specific type 1 hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. *Mol. Biol. Cell* 1998, *9*, 263–276.
- [49] Feiden, S., Wolfrum, U., Wegener, G., Kamp, G., Expression and compartmentalisation of the glycolytic enzymes GAPDH and pyruvate kinase in boar spermatogenesis. *Reprod. Fertil. Dev.* 2008, *20*, 713–723.
- [50] Zhen, W., Li, P., He, B., Guo, J., Zhang, Y. L., The novel epididymis-specific beta-galactosidase-like gene Glb114 is essential in epididymal development and sperm maturation in rats. *Biol. Reprod.* 2009, *80*, 696–706.
- [51] Moessinger, C., Kuerschner, L., Spandl, J., Shevchenko, A., Thiele, C., Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 2011, *286*, 21330–21339.
- [52] Simpson, A. M., Swan, M. A., White, I. G., Action of phosphatidylcholine in protecting ram sperm from cold shock. *Gamete Res.* 1986, *15*, 43–56.
- [53] Cross, N., Phosphatidylcholine enhances the acrosomal responsiveness of human sperm. *J. Androl.* 1994, *15*, 484–488.
- [54] Angulo, C., Rauch, M. C., Droppelmann, A., Reyes, A. M. et al., Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J. Cell. Biochem.* 1998, *71*, 189–203.
- [55] Muramatsu, T., Miyauchi, T., Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol. Histopathol.* 2003, *18*, 981–987.
- [56] Sleight, S. B., Miranda, P. V., Plaskett, N. W., Maier, B. et al., Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation. *Biol. Reprod.* 2005, *73*, 721–729.
- [57] Mountjoy, J. R., Xu, W., McLeod, D., Hyndman, D., Oko, R., RAB2A: a major subacrosomal protein of bovine spermatozoa implicated in acrosomal biogenesis. *Biol. Reprod.* 2008, *79*, 223–232.
- [58] Sadacca, L. A., Bruno, J., Wen, J., Xiong, W., McGraw, T. E., Specialized sorting of GLUT4 and its recruitment to the cell surface are independently regulated by distinct Rabs. *Mol. Biol. Cell.* 2013, *24*, 2544–2557.
- [59] Junutula, J. R., DeMazière, A. M., Peden, A. A., Ervin, K. E. et al., Rab14 is involved in membrane trafficking between the Golgi complex and endosomes. *Mol. Biol. Cell.* 2004, *15*, 2218–2229.
- [60] Zhang, H., Martin-Deleon, P. A., Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. *J. Androl.* 2003, *24*, 51–58.
- [61] Ellerman, D. A., Pei, J., Gupta, S., Snell, W. J. et al., Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 2009, *76*, 1188–1199.
- [62] Redgrove, K. A., Nixon, B., Baker, M. A., Hetherington, L. et al., The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition. *PLoS One* 2012, *7*, e50851.
- [63] Yuan, R., Primakoff, P., Myles, D. G., A role for the disintegrin domain of cyrtestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *J. Cell. Biol.* 1997, *137*, 105–112.

- [64] Gibbs, G. M., Lo, J. C., Nixon, B., Jamsai, D. et al., Glioma pathogenesis-related 1-like 1 is testis enriched, dynamically modified, and redistributed during male germ cell maturation and has a potential role in sperm-oocyte binding. *Endocrinology* 2010, *151*, 2331–2342.
- [65] Caballero, J., Frenette, G., D'Amours, O., Belleanne, C. et al., Bovine sperm raft membrane associated glioma pathogenesis-related 1-like protein 1 (GliPr1L1) is modified during the epididymal transit and is potentially involved in sperm binding to the zona pellucida. *J. Cell. Physiol.* 2012, *227*, 3876–3886.
- [66] Weerachatanukul, W., Xu, H., Anupriwan, A., Carmona, E. et al., Acquisition of arylsulfatase A onto the mouse sperm surface during epididymal transit. *Biol. Reprod.* 2003, *69*, 1183–1192.
- [67] Xu, H., Liu, F., Srakaew, N., Koppisetty, C. et al., Sperm arylsulfatase A binds to mZP2 and mZP3 glycoproteins in a nonenzymatic manner. *Reproduction* 2012, *144*, 209–219.
- [68] Ito, C., Yamatoya, K., Yoshida, K., Maekawa, M. et al., Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell Tissue Res.* 2010, *340*, 583–594.
- [69] Cervoni, F., Oglesby, T. J., Adams, E. M., Milesifluet, C. et al., Identification and characterization of membrane cofactor protein of human spermatozoa. *J. Immunol.* 1992, *148*, 1431–1437.
- [70] Inoue, N., Ikawa, M., Nakanishi, T., Matsumoto, M. et al., Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Mol. Cell. Biol.* 2003, *23*, 2614–2622.
- [71] Taylor, C. T., Biljan, M. M., Kingsland, C. R., Johnson, P. M., Inhibition of human spermatozoon-oocyte interaction in vitro by monoclonal antibodies to CD46 (membrane cofactor protein). *Hum. Reprod.* 1994, *9*, 907–911.
- [72] Henkel, R., Schaller, J., Glander, H. J., Schill, W. B., Low expression of adhesion molecules and matrix proteins in patients showing poor penetration in zona-free hamster oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 1996, *2*, 335–339.
- [73] Han, W. L., Rui, M., Zhang, Y. M., Chen, Y. Y. et al., Stimulatory effect of chemokine-like factor 1 (CKLF1) on the growth of bone marrow cells. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2001, *23*, 119–122.
- [74] Barrios, B., Perez-Pe, R., Gallego, M., Tato, A. et al., Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.* 2000, *63*, 1531–1537.
- [75] Vadnais, M. L., Roberts, K. P., Effects of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm. *J. Androl.* 2007, *28*, 416–422.
- [76] Manjunath, P., Therien, I., Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.* 2002, *53*, 109–119.
- [77] Kumar, V., Hassan, M. I., Tomar, A. K., Kashav, T. et al., Proteomic analysis of heparin-binding proteins from human seminal plasma: a step towards identification of molecular markers of male fertility. *J. Biosci.* 2009, *34*, 899–908.
- [78] Resh, M. D., Covalent lipid modifications of proteins. *Curr. Biol.* 2013, *23*, R431–R435.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, **Gerly Sillaste** (sünnikuupäev 05.07.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Histoonseoseliste piirkondade tuvastamine koduaise (*Bos taurus*) seemnerakkude kromatiinis ning seemneraku pinnavalkude valideerimine

(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on: **professor Andres Salumets, Riho Meier (MSc) ning Triin Viltrop (MSc)**

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.08.15