

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Vendula Plichtová

Vliv formování annulu na kvalitu spermií

The effect of annulus formation on sperm quality

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Ondřej Šanovec

Konzultant: doc. RNDr. Kateřina Komrsková, Ph.D.

Praha, 2025

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Mgr. Ondřeji Šanovci za trpělivost, užitečné rady a čas, který mi během psaní bakalářské práce věnoval. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a svým kamarádům za podporu a pochopení.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 28.4.2025

Vendula Plichtová

Abstrakt:

Správná pohyblivost a morfologie jsou klíčové vlastnosti spermií pro jejich schopnost oplodnit vajíčko. Na oba tyto parametry má mimo jiné vliv správné formování kruhové struktury mezi středním a hlavním segmentem bičíku s názvem annulus. Ten v tomto místě tvoří difúzní bariéru a je zodpovědný za správnou biogenezi bičíku a tím pádem také správnou motilitu a morfologii spermií. Defekty v tvorbě annulu obecně vedou k problémům se správným formováním mitochondriálního pláště, typickému ohybu bičíku v místě obvyklé lokalizace annulu a nižší pohyblivosti a fertilitě spermií při zachování anatomické i histologické stavby okolních tkání. Ve spojitosti s takto abnormálními spermiemi dochází také u lidí k poruchám plodnosti, nejčastěji kvůli snížené pohyblivosti spermií, kvůli čemuž je v současné době annulus a jeho defekty zkoumány v souvislosti s možnou přesnější diagnostikou mužské neplodnosti.

Klíčová slova:

Spermie, motilita spermií, annulus, bičík, mužská neplodnost, astenozoospermie

Abstract:

Motility and morphology are key characteristics of sperm for the ability to fertilize an egg. Both of these parameters are influenced, among other things, by the proper formation of the circular structure between the mid and principal piece of the flagellum called the annulus. The annulus forms a diffusion barrier at this point and is responsible for proper flagellar biogenesis and hence proper sperm motility and morphology. Defects in the formation of the annulus generally lead to problems with the correct formation of the mitochondrial sheath, the typical bending of the flagellum at the site of the usual location of the annulus, and lower sperm motility and fertility while maintaining the anatomical and histological structure of the surrounding tissues. In association with such abnormal spermatozoa, fertility disorders also occur in humans, and the annulus and its defects are currently being investigated in connection with a possible more accurate diagnosis of male infertility.

Keywords:

Sperm, sperm motility, annulus, flagellum, male infertility, asthenozoospermia

Seznam použitých zkratek

- DNA** – Deoxyribonucleic acid – Deoxyribonukleová kyselina
- CABS1** – Calcium-binding protein spermatid-associated 1
- cAMP** – Cyclic adenosine monophosphate – Cyklický adenosinmonofosfát
- CBY3** – Chibby 3
- CCNYL1** – Cyclin Y like 1
- CDK16** – Cyclin dependent kinase 16 – Cyklin-dependentní kináza 16
- CEP76** – Centrosomal protein 76
- CFTR** – Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
- CIBAR1** – Cby1-interacting BAR domain-containing 1
- CYP24A1** – Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1
- DNAJB13** – DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B13
- GTP** – Guanosine-5'-triphosphate – Guanosin-5'-trifosfát
- HSP40** (typ II) – Heat Shock Protein 40
- RNA** – Ribonucleic acid – Ribonukleová kyselina
- mRNA** – Messenger ribonucleic acid – Messengerová ribonukleová kyselina
- SEPT** – Septin
- SLC26** – Solute carrier family 26
- SLC26A8** – Solute carrier family 26 member 8
- TAT1** – Testis anion transporter 1
- TMEM232** – Transmembrane protein 232
- TPR** – Tetraricopeptide repet
- TTC6** – Tetraricopeptide repeat protein 6

Obsah

1. Úvod.....	1
2.Spermie.....	2
2.1 Struktura a funkce spermie	2
2.2. Spermiogeneze.....	4
3. Annulus.....	6
3.1. Popis a funkce.....	6
3.2. Složení	7
3.2.1. Septiny	8
3.2.2. Další významné proteiny	11
3.3 Biogeneze annulu	12
4. Defekty ve formování annulu.....	13
5. Mužská neplodnost.....	17
6. Závěr.....	22
7. Seznam použité literatury	23

1. Úvod

Spermie jsou mužské pohlavní buňky schopné dopravit otcovský genetický materiál do mateřských vajíček, čímž umožňují vznik zygot a posléze nových jedinců. Tento proces může být ovlivněn celou řadou faktorů včetně genetických vad a poruch správného vývoje spermií.

Mužská neplodnost a kvalita spermií je v současné době velmi aktuálním tématem. Jednou z možných příčin snížené plodnosti až neplodnosti může být mimo jiné i nesprávné formování bičíků spermií, tedy struktury umožňující jejich pohyb. V této práci se podrobněji zaměřuji na specifickou strukturu uvnitř bičíku spermií s názvem annulus. Jedná se o kruhovou strukturu nalézající se mezi středním a hlavním segmentem bičíku, mezi kterými tvoří selektivní difúzní bariéru, která je nezbytně důležitá pro správný tvar bičíku a pohyb spermií. Důležitou roli hraje i ve formování těchto segmentů v rámci spermiogeneze, tedy transformace kulaté haploidní spermatidy v buňku charakteristického tvaru pro zralé spermie.

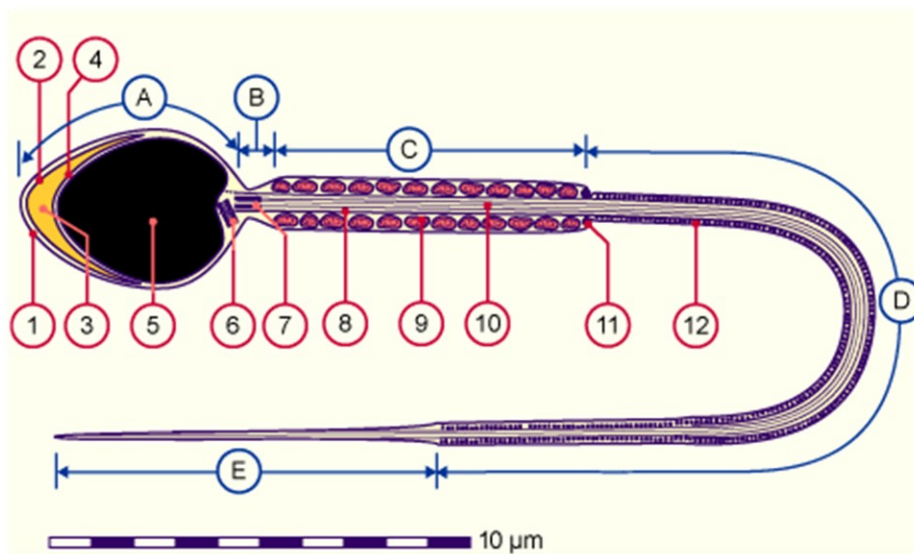
Jakožto součást bičíku je annulus znám již dlouho, avšak mechanismy stojící za jeho biogenezi či jeho funkce a biochemické složení začaly být více studovány teprve nedávno. V této souvislosti je zkoumán také dopad defektů ve formování annulu na biogenezi mitochondriálního pláště a bičíku, stejně tak, jako na pohyblivost spermií a tím i jejich schopnost oplodnit vajíčko. Tyto dopady negativně ovlivňují samčí i mužskou plodnost, a to především ve spojení s astenozoospermií, oligoastenozoospermií nebo teratozoospermií.

Cílem této práce je stručné popsání vývoje bičíku a přiblížení struktury annulu, zejména jeho biogeneze a funkce. Zvláštní důraz je kladen na faktory ovlivňující biogenezi annulu a popis jeho defektů vedoucí ke snížené kvalitě spermií a mužské neplodnosti.

2.Spermie

2.1 Struktura a funkce spermie

Spermie jsou samčí pohlavní buňky schopné dopravit otcovský genetický materiál do mateřských vajíček, čímž umožňují vznik zygot a posléze nových jedinců. Zralá spermie je uzpůsobena svému účelu například ztrátou majority své cytoplazmy, či přítomností akrozomu a bičíku, který je zodpovědný za její pohyb. Morfologicky se tato buňka skládá ze tří částí: hlavičky, spojovacího segmentu (někdy nazývaného krček) a bičíku (flagellum) (*Brito 2007).



1 Plazmatická membrána	7 Bazální tělísko	A Hlavička
2 Vnější akrozomální membrána	8 Vnější denzní vlákna	B Spojovací segment (krček)
3 Akrozom	9 Mitochondriální plášť	C Střední segment bičíku
4 Vnitřní akrozomální membrána	10 Axonema	D Hlavní segment bičíku
5 Jádro	11 Annulus	E Terminální segment bičíku
6 Proximální centriola	12 Fibrózní plášť	

Obrázek 1: Stavba spermie (Převzato z: [http://embryology.ch/en/embryogenese/gametogenesis/spermatogenesis/spermiogenesis-\(spermatohistogenesis\)-and-structure-of-the-sperm-cell.html?p=6#spermiogenesis-\(spermatohistogenesis\)-and-structure-of-the-sperm-cell](http://embryology.ch/en/embryogenese/gametogenesis/spermatogenesis/spermiogenesis-(spermatohistogenesis)-and-structure-of-the-sperm-cell.html?p=6#spermiogenesis-(spermatohistogenesis)-and-structure-of-the-sperm-cell))

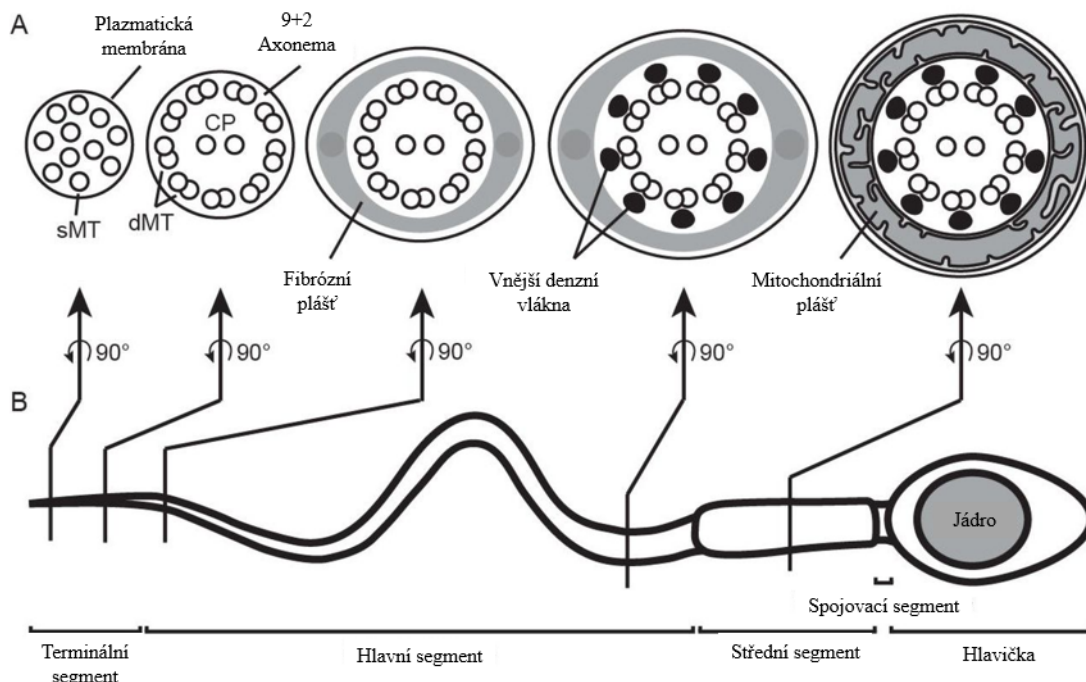
Hlavička obsahuje akrozom, jádro s genetickou informací ve formě deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a zbytky cytoplazmy (*Neill, Plant 2006). Na anteriorní straně hlavičky spermie se nachází akrozom, který u většiny savců, včetně člověka, pokrývá dvě třetiny plochy hlavičky (Hancock 1956). Akrozom je membránová organela obsahující hydrolytické enzymy. Vznikl přeměnou z Golgiho aparátu a je nezbytný pro oplození vajíčka. (Yanagimachi 1972; Gatenby, Beams 1935). Tvar hlavičky většinou koresponduje s tvarem jádra (*Neill, Plant

2006). Jádro spermie nesoucí otcovskou DNA je haploidní a obsahuje kondenzovaný homogenní chromatin, který je více než 7x kondenzovanější než u somatických buněk. Kondenzace chromatinu je unikátní kvůli nahrazení většiny histonů jinými bazickými proteiny vázajícími DNA, kterými jsou protaminy (*Skinner 2018). Jádro je, stejně jako u všech eukaryotických buněk, obklopeno jadernou membránou, která se na posteriorní straně hlavičky setkává s plazmatickou membránou a tvoří posteriorní prstenec. Na posteriorní straně hlavičky se utváří také implantační fossa (jamka) jakožto malá prohloubenina jaderné membrány (*Brito 2007).

Přes tuto fossu spolu sousedí hlavička a spojovací segment spermie. Spojovací segment (krček, anglicky connecting piece) je krátký segment spojující hlavičku s bičíkem. Do implantační fossy hlavičky je vsazené kapitulum. Jedná se o konvexní strukturu sousedící s proximální centriolou. Proximální centriola je složená z mikrotubulů ve složení 9+0 (Fawcett, Phillips 1969). Toto označení vystihuje devět trojic mikrotubulů upořádaných do kruhu a je charakteristické i pro nemotilní cílie (Vorobjev, YuS 1982). Proximální centriola spermie je ve spojovacím segmentu orientována kolmo, v úhlu 75° až 90°, na osu bičíku spermie. Vedle proximální centrioly se zde nalézá ještě centriola distální (Fawcett, Phillips 1969). Z té vzniká během vývoje bičíku bazální tělísko, ze kterého vyrůstá axonema, tvořená komplexem mikrotubulů uspořádaných do vzoru 9+2 (Schmidt et al. 2012; Afzelius 1959). Toto označení vystihuje uspořádání do devíti dvojic, tvořících kruh okolo středního páru. Uspořádání mikrotubulů axonemy spermie je stejné jako u jiných motilních cílií, například u cílií respiračního epitelu (*Skinner 2018). Axonema, procházející také celým bičíkem, slouží spermii coby strukturální opora bičíku a je nezbytná pro jeho správnou funkci. Okolo axonemy se ve spojovacím segmentu nachází ještě vnější denzní vlákna (*Brito 2007). Tato vlákna přispívají k pevnosti spojovacího segmentu a bičíku spermie. (Baltz et al. 1990). Uspořádání axonemy obklopené přídatnými strukturami je typické i pro některé segmenty bičíku.

Bičík je tvořen třemi segmenty, kterými jsou segment střední, hlavní a terminální neboli koncový. Střední segment (taktéž mitochondriální část, anglicky mid piece) je klíčový díky obsahu mitochondrií, které produkují ATP potřebné pro pohyb bičíku a tím celé spermie. (*Brito 2007; *Skinner 2018). Mitochondrie jsou zde seřazeny do spirál a tvoří mitochondriální plášť (*Sun, Yang 2010). Uprostřed středního segmentu pod mitochondriálním pláštěm prochází ještě axonema obklopená devíti vnějšími denzními vlákny (*Skinner 2018; *Sun, Yang 2010). Na konci středního segmentu se nalézá annulus. Jedná se o prstencovou strukturu ležící mezi středním a hlavním segmentem bičíku, které od sebe odděluje. (Elias et al. 1978).

V hlavním segmentu (anglicky principal piece) je axonema obklopená již jen sedmi denzními vlákny různé délky (*Sun, Yang 2010). Oproti mitochondriálnímu plášti středního segmentu se zde nachází plášť fibrózní, který je složen ze dvou podélných provazců, které jsou propojeny půlkruhovitými žebry. Vnější denzní vlákna končí v různých vzdálenostech hlavního segmentu, u lidí například dosahují asi do 60% délky (*Neill, Plant 2006). Na mikrotubulech axonemy se vyskytují ještě vnější a vnitřní dyneinová raménka, umožňující pružný ohyb a aktivní pohyb bičíku (Afzelius et al. 1975). Třetí částí bičíku je terminální (koncový) segment (anglicky end piece). Tato část již neobsahuje žádné přídatné struktury. Končí zde i axonema, její mikrotubuly se zde nacházejí již jen jednotlivě (*Skinner 2018).



Obrázek 2: Struktura savčích (konkrétně lidských) spermii. (A) Průřezy bičíkem spermie a jednotlivé jeho struktury. sMT: samostatné mikrotubuly, dMT: dvojice mikrotubulů, CP: centrální pár. (B) Stavba spermie (Upraveno a převzato z: Zabeo et al. 2019)

2.2. Spermioogeneze

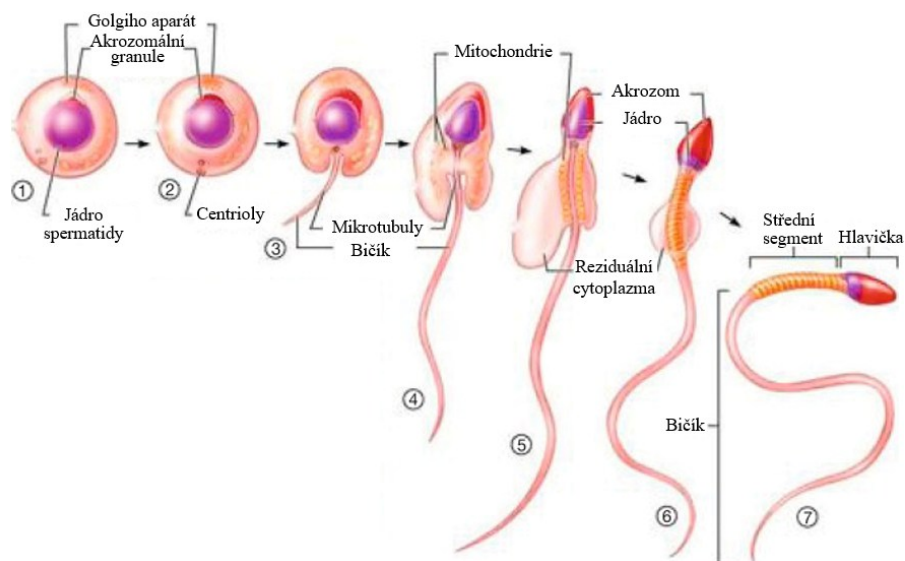
Vývoj spermie neboli spermatogenezi lze rozdělit do tří fází: mitotické, meiotické a fáze spermioogeneze. První je fáze mitotická, do které vstupují nediferencované diploidní spermatogonie, které proliferují prostřednictvím jejich asymetrického dělení, čímž dochází k udržení jejich počtu a zároveň vzniku primárních spermatocytů. Primární spermatocyty dále vstupují do fáze meiotické, při které prochází k meiotickému dělení, a nastává tak redukce chromozomů. Z diploidních primárních spermatocytů vznikají meiózou I haploidní sekundární spermatocyty, které prochází meiózou II za vzniku stále ještě kulatých spermatid (*Skinner 2018). Spermatidy se oproti předchozím stádiím již dále nedělí, nýbrž podstupují sérii změn

v morfologii souhrnně nazývané spermiogeneze, při které dochází ke vzniku spermií. Mezi tyto změny patří tvorba akrozomu a axonemy, kondenzace chromatinu jádra v důsledku výměny histonů za protaminy, reorganizace organel (mitochondrií) a ztráta většiny cytoplazmy. Na základě těchto změn získává buňka i svůj charakteristický tvar, což je nezbytné pro její schopnost oplodnit vajíčko (*Neill, Plant 2006).

Nejlépe je spermiogeneze popsána u myši, kde se rozděluje na 16 kroků. V prvním kroku jsou spermatidy kulaté a nemají viditelný akrozom. V kroku druhém a třetím se z Golgiho aparátu diferencují proakrozomální vezikuly, které spolu fúzí za vzniku akrozomální granule. Tato granule je v kroku čtvrtém navázána k jaderné membráně a má mírně zploštělý vzhled. Během pátého až osmého kroku se akrozom rozpíná a částečně obklopuje jádro, které se v kroku devátém a desátém prodlužuje a dostává pro myši charakteristický tvar háčku. Přibližně ve stejné době se cytoplazma kumuluje na opačné, tedy posteriorní straně buňky. Kondenzace chromatinu jádra probíhá v jedenáctém a dvanáctém kroku. Úzký bičík tvořený prodlužující se axonemou je přítomný již v kroku třináctém, v následujících krocích čtrnáctém a patnáctém začíná bičík tloustnout v důsledku tvorby vnějších denzních vláken. V pozdním stádiu patnáctého kroku začíná být vznikající spermie přesouvána blíže lumen testes a v kroku šestnáctém je do lumen uvolněna (Mäkelä et al. 2020; *Khawar et al. 2019; *Sun, Yang 2010). U člověka je tento proces rozdělen do 12 kroků (Muciaccia et al. 2013).

Během vývoje bičíku zaujímá dceřiná (proximální) centriola polohu blíže k hlavičce a mateřská (distální) centriola polohu vzdálenější. Distální centriola se od proximální liší především přítomností elektron denzního materiálu na svém distálním konci nazývaného subdistální a distální přívěsky (Schmidt et al. 2012). Bez těchto přívěsků by distální centriola nebyla schopna vytvořit axonemu (Tanos et al. 2013).

Nejprve je k cytoplazmatické membráně připojena distální centriola, k té se následně připojují ještě ciliární vezikuly pocházející nejspíše z Golgiho aparátu. Takto vzniká bazální tělísko schopné prodlužovat své mikrotubuly a tvořit axonemu (Schmidt et al. 2012). Při tomto procesu se proximální centriola i bazální tělísko se vznikající axonemou přibližují směrem k jádru a vznikajícímu kapitulu (Yasuzumi et al. 1972). Při tomto pohybu dochází k invaginaci plazmatické membrány v okolí prodlužující se axonemy (Fawcett et al. 1970).



Obrázek 3: Schéma spermiogeneze (Upraveno a převzato z: <https://magapor.com/en/swine-news/sperm-cell-spermiogenesis/>)

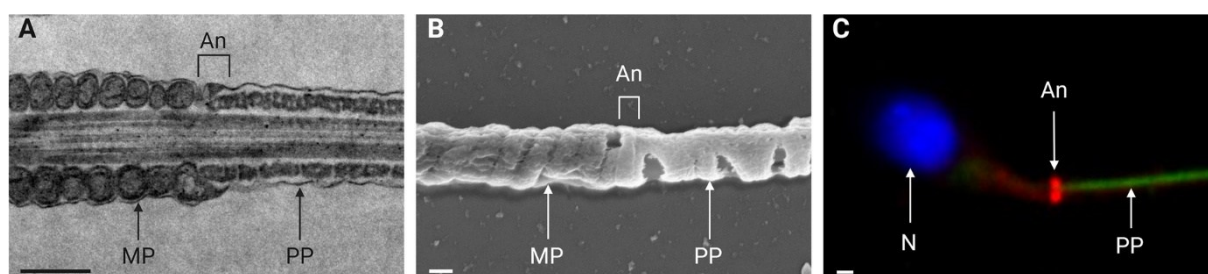
Na bázi bičíku se nachází tranzitní zóna, což je difúzní bariéra, která odděluje oblast bazálního tělíska a axonemy (spojovacího segmentu a bičíku) a reguluje přechod proteinů mezi nimi. Jelikož jsou si obě struktury velmi podobné, mohlo by docházet k vazbám specifických proteinů na nesprávnou strukturu (*Avidor-Reiss et al. 2017). Anterográdní i retrográdní transport potřebného materiálu pro vznikající axonemu v rámci tranzitní zóny zajišťuje proteinový komplex intraflagellárního transportu a intramanžetový transport (Qin et al.2004; *Sun, Yang 2010). Manžeta je přítomná pouze po dobu spermiogeneze. Je složena převážně z mikrotubulů a aktinu a mimo jiné zajišťuje transport mitochondrií do středního segmentu. Během prodlužování axonemy se v jejím okolí tvoří vnější denzní vlákna. Mitochondrie, nacházející se nyní díky intramanžetovému transportu v okolí vznikajících denzních vláken, se začínají prodlužovat a kondenzovat. Vzniká tak mitochondriální plášť a posléze střední segment (*Sun, Yang 2010). Spermatogeneze je zakončena procesem spermiace, při které je vznikající spermie uvolněna do lumen testis a většina její cytoplazmy spolu s přebytečnými mitochondriemi odvrhuta za vzniku reziduálního tělíska, které je následně fagocytováno Sertoliho buňkami (Kingsley Smith, Lacy 1959; *Skinner 2018).

3. Annulus

3.1. Popis a funkce

Annulus (latinsky prstenec), někdy také Jensenův prstenec nebo terminální disk, je součástí bičíku. Jak je již z názvu patrné, jedná se o kruhovou strukturu, poprvé objevenou v roce 1887 zoologem O.S. Jensenem (Jensen 1887). Annulus obklopuje axonemu a odděluje střední

a hlavní segment bičíku (Elias et al. 1978). Přesněji leží blíže fibróznímu plášti hlavního segmentu než mitochondriálnímu plášti segmentu středního. Zobrazení annulu je možné například imunofluorescenčním značením nebo elektronovou mikroskopií (Kissel et al. 2005). Pomocí sledování proteinu basiginu (CD147), který se v průběhu vývoje spermie přesouvá z hlavního segmentu do segmentu středního, bylo navrženo, že annulus spermie tvoří selektivní difuzní bariéru mezi těmito dvěma segmenty. Bez vytvořeného annulu ve spermii má totiž basigin po celou dobu spermiogeneze stejnou koncentraci v obou těchto segmentech. Propustnost annulu pro jednotlivé molekuly se tedy v čase může měnit (Kwitny et al. 2010). Annulus má patrně úlohu i při biogenezi bičíku, neboť spermie postrádající annulus mají problémy například s tvorbou fibrózního pláště hlavního segmentu nebo s uspořádáním mitochondrií středního segmentu (Kissel et al. 2005). Přichycení annulu k plazmatické membráně může být zprostředkováno proteinem SEPT4 a jeho schopností vázat lipidy nebo také díky TAT1 proteinu (Ihara et al. 2005; Touré et al. 2007). Oba proteiny jsou blíže popsány níže. Annulus je nejspíše minimálně na začátku svého vývoje propojený s tranzitní zónou, existuje také hypotéza o tranzitní zóně a annulu coby jedné funkční struktury díky jejich podobnému proteinovému složení včetně septinů a jejich obdobné migraci během spermiogeneze (*Avidor-Reiss et al. 2017). Mezi další teorie patří i zapojení annulu v procesu kapacitace spermie (Wang et al. 2023). Absence annulu je u lidí spojována s problémy s biogenezi bičíku a s mnoha druhy mužské neplodnosti, například astenozoospermií, která značí procento progresivně pohyblivých spermií pod 30 %. (Ihara et al. 2005; World Health Organization 2010; World Health Organization 2021).



Obrázek 4: Mikroskopie annulu (A) Podélný řez myším annulem zobrazený transmisní elektronovou mikroskopií (měřítko: 500nm). (B) Zobrazení myšího annulu rastrovacím elektronovým mikroskopem (měřítko: 200 nm). (C) Imunofluorescenční detekce lidského annulu (SEPT4 červeně, hlavní segment zeleně, DNA modře, měřítko: 1 μ m). MP: střední segment, An: annulus, PP: hlavní segment, N: jádro. (Převzato z: *Whitfield 2024)

3.2. Složení

Hlavní strukturální složkou annulu jsou proteiny ze skupiny septinů. Konkrétně se jedná o septiny 1, 2, 4, 6, 7 a 12, nejnověji ještě 10 a 11 (Ihara et al. 2005; Steels et al. 2007; Kuo et al. 2015;

Shen et al. 2020). Tyto septiny utváří v annulu filamenta, která udržují správnou strukturu annulu a integritu spermie (Kuo et al. 2015). Septin SEPT4 se u spermii často používán jako marker annulu. Na základě toho byl v annulu objeven i další protein, aniontový transportér TAT1 (SLC26A8) (Touré et al. 2007). Při snaze objasnit mechanismy kapacitace spermii byla v annulu objevena také solubilní adenylátcykláza (Hess et al. 2005). V souvislosti se septiny annulu jsou zajímavé i například TMEM232 a androglobin (Cai et al. 2024; Keppner et al. 2022). Všechny tyto proteiny jsou popisovány v následujících podkapitolách. Mnoho dalších proteinů se v annulu objevuje pouze na přechodnou dobu během vývoje spermie, proto jsou tyto proteiny popsány v kapitole biogeneze.

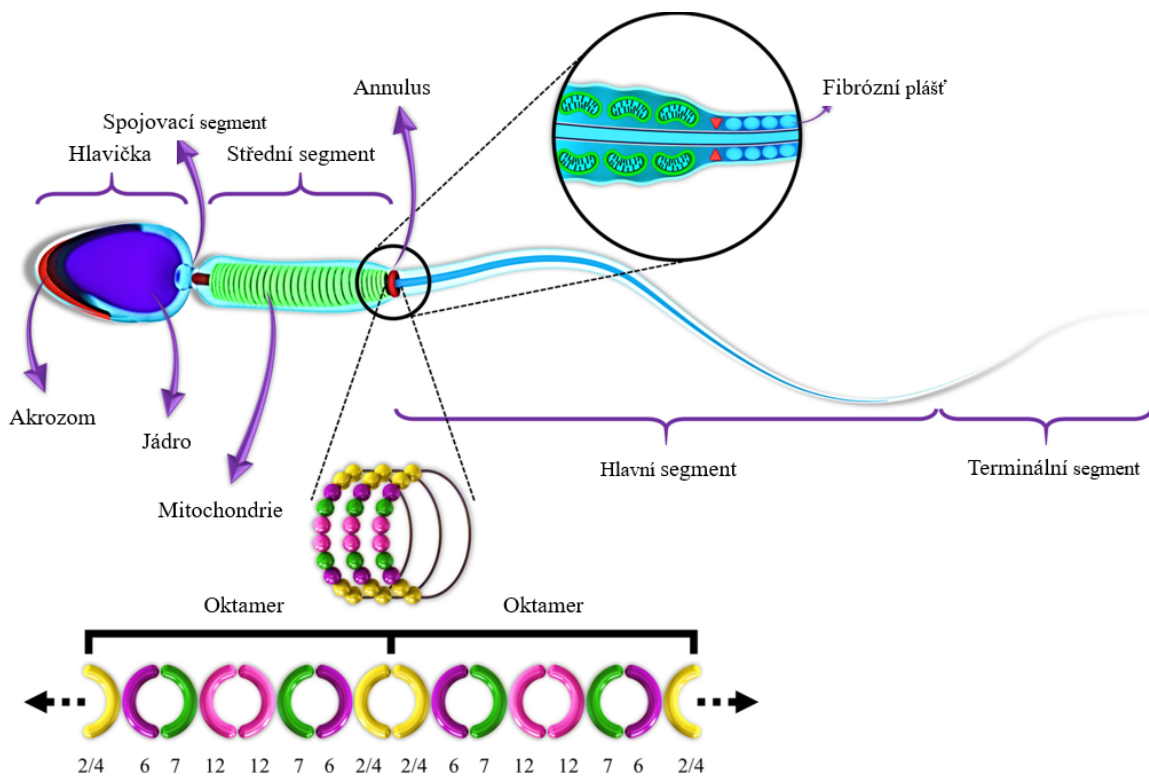
3.2.1. Septiny

Poprvé byly septiny objeveny u dělících se buněk, kde mají důležitou roli v zajištění správné cytokineze (Kinoshita et al. 1997). Od této jejich funkce je odvozen i název, tedy proteiny účastníci se tvorby sept (přepážek) při dělení buněk. Vedle mikrotubulů, aktinových mikrofilament a intermediálních filament jsou septiny kvůli své schopnosti utvářet filamenta považovány za čtvrtou komponentu cytoskeletu (*Valadares et al. 2017). Septiny jsou rodina strukturních proteinových GTPáz (GTP fosfohydroláz) s molekulovou hmotností v rozmezí 35-65 kDa (*Valadares et al. 2017; Kim et al. 2004).

Tyto proteiny mají společné tři hlavní strukturní domény – centrální GTPázovou neboli G-doménu, variabilní region bazických aminokyselin na N-konci a doménu vinuté spirály (coiled coil) na C-konci. Centrální G-doména obsahuje P-loop (phosphate-binding loop) motiv charakteristický pro GTP-vázající proteiny (*Field, Kellogg 1999). Jednotlivé podjednotky spolu interagují prostřednictvím GTP vazebných domén, nebo N- a C- konců (Kuo et al. 2015).

U člověka je známých třináct funkčních genů septinů kódujících proteiny, které se dělí podle homologie do 4 skupin, jmenovitě SEPT2, SEPT3, SEPT6 a SEPT7. Skupina SEPT2 se skládá ze septinů SEPT1, 2, 4 a 5. Skupina SEPT6 obsahuje septiny SEPT6, 8, 10, 11 a 14. Předposlední skupina SEPT7 má prozatím jen jediného zástupce SEPT7 a do poslední skupiny SEPT3 patří SEPT3, 9 a 12 (*Valadares et al. 2017). Gen *SEPT13* byl identifikován jakožto pseudogen (Kuo et al. 2015). Většina genů septinů eukaryot je schopná tvořit vícero izoform svých proteinů skrze alternativní sestřih a alternativní začátky transkripce. Všechny lidské septiny mají konzervovanou doménu vázající GTP, značně se však liší délkou svého N- a C- konce (*Valadares et al. 2017).

Jak již bylo řečeno, septiny tvoří základ annulu spermie, konkrétně jde o SEPT 1,2, 4, 6, 7,10, 11 a 12 (Ihara et al. 2005; Steels et al. 2007; Kuo et al. 2015; Shen et al. 2020). Septiny se v annulu vyskytují ve formě filament, která jsou za normálních okolností heteromery, složené z šesti nebo osmi podjednotek. Pokud se jedná o hexamerní filamenta, jsou složená ze septinů skupin SEPT2, 6 a 7. V případě oktamerních filament se přidávají ještě septiny skupiny SEPT3 (Sellin et al. 2011). Ve filamentech tyto skupiny vytváří palindromy (Kuo et al. 2015). Proto jsou septinová filamenta apolární, nemají tedy plus a minus konec (*Valadares et al. 2017). Skupina pod vedením Kua našla v annulu septiny v uskupení 12-7-6-2-2-6-7-12 a 12-7-6-4-4-6-7-12 (Kuo et al. 2015). Novější studie však předpokládají invertovanou podobu se septiny 2 a 4 na okrajích palindromů (Soroor et al. 2021; Chen et al. 2025). SEPT10 a 11 by se podle odhadů měly vyskytovat na místě s označením 6. Septiny stejné skupiny (tedy SEPT6) by měly být mezi sebou zaměnitelné (Sellin et al. 2011).



Obrázek 5: Schéma spermie se zaměřením na annulus a jeho septinové složení. (Upraveno a převzato z: Mazaheri Moghaddam et al. 2021)

SEPT 2 (někdy označován NEDD5) byl kromě annulu pozorován i na bázi primárních cílů, kde podobně jako v annulu tvoří difúzní bariéru. Cíle buněk, které nebyly schopné exprimovat SEPT2, vůbec nevznikly, při částečném zachování exprese SEPT2 byly cíle signifikantně kratší (Hu et al. 2010).

U myši s deletovanými geny pro SEPT4 nebyly v jejich tkáních zjištěny žádné anatomické ani histologické odlišnosti, nematurované spermie pocházející z caput epididymis bez proteinu SEPT4 rovněž nevykazují žádné abnormality. Po maturaci (odběr z cauda epididymis) však, kvůli absenci annulu a strukturální nestabilitě bičíku, dochází k ohnutí bičíku v místě chybějícího annulu. U těchto spermií je pozorováno rozptýlení septinů 1, 6 a 7 v cytoplasmě a snížená exprese mitochondriálního enzymu cytochromu C. Defekty spermií bez SEPT4 tedy mohou být způsobeny jak strukturálními problémy, tak nedostatkem energie, jelikož tyto spermie mají sníženou schopnost využívat ATP (Ihara et al. 2005).

Na začátku spermiogeneze je SEPT7 součástí manžety nalézající se v okolí jádra ve formě prstencové struktury. Díky jeho možné interakci s δ -tubulinem, který tvoří základ perinukleárního prstence manžety, může SEPT7 pomáhat i v jeho sestavování. Během vývoje spermie migruje většina SEPT7 spolu s mitochondriemi do posteriorní části buňky, část však zůstává v přední části a utváří prstencovou strukturu mezi jádrem a akrozomem. U maturovaných spermií se SEPT7 nachází především v hlavičce a annulu, slabě také ve středním segmentu, odkud se většina SEPT7 během vývoje přesunula do annulu. Je tedy pravděpodobné, že se SEPT7 podílí na sestavování manžety, annulu i středního oddílu, a že jeho role v tvorbě difúzních bariér může být důležitá jak pro annulus, tak pro perinukleární prstenc. Deficience SEPT7, stejně jako u SEPT4, vede k vyššímu výskytu abnormálních a nematurovaných spermií se zchovalou cytoplazmou a krátkým bičíkem v ejakulátu mužů, což naznačuje, že oba tyto proteiny se mohou podílet na regulaci maturace spermií (Chao et al. 2010).

SEPT12 je exprimován výhradně v zárodečných buňkách spermií. Během spermiogeneze tvoří SEPT12, stejně jako SEPT7, prstencovou strukturu kolem jádra a později migruje s mitochondriemi do posteriorní části buňky. U maturovaných spermií se SEPT12 nalézají zejména v hlavičce, spojovacím segmentu a annulu, slabě také ve středním segmentu, odkud se většina SEPT12 během vývoje přesunula do annulu. SEPT12 tak může ovlivňovat formování hlavičky, spojovacího segmentu, středního segmentu i zbytku bičíku. U heterozygotních myši s jednou funkční alelou pro SEPT12 byl pozorován uvolněný a porušený akrozom, v některých případech až téměř úplně nevytvořený. Tvar jádra byl také neobvyklý (Hong et al. 2005; Lin et al. 2009).

Úloha septinů SEPT1, 2, 6, 10 a 11 ve spermiích není stále plně prozkoumána. V současnosti jsou septiny zkoumány hlavně v souvislosti s nervovou soustavou a karcinomy (Ageta-Ishihara et al. 2025; Mohandesi Khosrosroshahi et al. 2025).

3.2.2. Další významné proteiny

Mezi další významné proteiny annulu patří například aniontový transportér Slc26a8 kódovaný stejnojmenným genem. Tento protein je označován také jako TAT1 (testis anion transporter 1) a patří do proteinové rodiny SLC26 (solute carrier family 26) (Touré et al. 2007). TAT1, exprimován hlavně ve vyvíjejících spermatidách a spermatocytech, patrně transportuje sírany, chloridové anionty a oxaláty (Touré et al. 2001; Lohi et al. 2002). V annulu je TAT1 zodpovědný pravděpodobně za jeho přichycení k plazmatické membráně (Touré et al. 2007). TAT1 se mimo annulus vyskytuje také v hlavičce spermie, kde stimuluje CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) aniontové kanály. Tato stimulace může být spojena s procesem kapacitace u spermií, pro ni je totiž nezbytně důležitý influx iontů (například chloridových, bikarbonátových nebo vápenatých) zprostředkovaný mimo jiné i CFTR kanály (Rode et al. 2012; Lee, Storey 1986; DasGupta et al. 1993; Xu et al. 2007). Tento influx způsobuje zvýšení pH a koncentrace cAMP (cyklického adenosinmonofosfátu) tvořeného solubilní nebo transmembránovou adenylátcyklázou (Xu et al. 2007; Branham et al. 2009; Wertheimer et al. 2013). Chloridové kanály CFTR schopné přenášet i bikarbonáty se nachází také ve středním segmentu v blízkosti annulu, přímou součástí annulu však nejspíše nejsou. U spermie po kapacitaci byla solubilní adenylátcykláza nalezena ve velkém množství rovněž v annulu (Rode et al. 2012; Hess et al. 2005). Tato skutečnost přispívá k domněnce souvislosti annulu s procesem kapacitace, stejně tak, jako zvýšené množství proteinů SEPT4 a 12 těsně po kapacitaci (Wang et al. 2023).

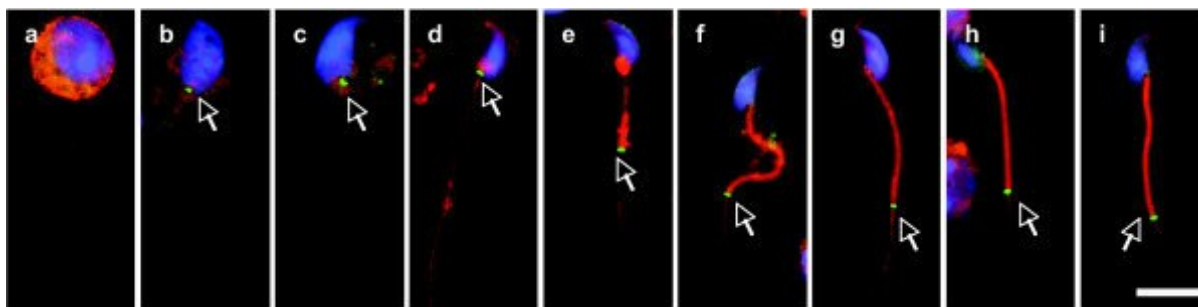
Nedávno byla objevena role transmembránového proteinu TMEM232 (transmembrane protein 232) v souvislosti se septiny. Tento protein je schopný interagovat se SEPT2, 4, 6, 7, 11, 12 a 14. Spermie bez proteinu TMEM232 vykazují sníženou expresi SEPT2, 4, 6 a 7 a DNAJB13. Úplně chybí i SEPT12. Annulus těchto spermií je součástí hlavního segmentu, odtržen od segmentu spojovacího. Abnormality lze pozorovat taktéž v mitochondriálním plášti (Cai et al. 2024). Ovlivněna je rovněž jejich axonema, které oproti typickému 9+2 uspořádání mikrotubulů chybí jedna dvojice vnějšího kruhu (8+2). Jedná se buď o čtvrtý nebo sedmý pár. Mimo zajištění propojení annulu se spojovacím segmentem je tedy TMEM232 důležitý i pro správný vývoj a stabilitu axonemy. Pravděpodobně má ve spermiích i mnoho dalších funkcí

souvisejících například s odvrhnutím cytoplazmy nebo tvorbou vnějších denzních vláken (Cai et al. 2024; He et al. 2023).

Mezi již méně prozkoumané proteiny patří androglobin, TTC6 a CYP24A1. Androglobin patří do rodiny globinů a je schopný tvořit vazbu s calmodulinem a SEPT10. Nachází se ve spojovacím segmentu i v annulu vyvíjejících se i maturovaných spermií. Ve vývoji spermie je důležitý pro tvorbu bičíku a správný tvar hlavičky (Keppner et al. 2022). Zatím jediná studie se zabývá souvislostí annulu s proteinem TTC6 (tetratricopeptide repeat protein 6) patřícím do rodiny TPR (tetratricopeptide repeat), který je důležitý pro udržení strukturní integrity annulu (Wang et al. 2023). Protein CYP24A1 (cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1) je u zdravých maturovaných spermií exprimován převážně v annulu. Jeho exprese je přímo úměrná kvalitě spermií, konkrétně počtu spermií, koncentraci, motilitě a správné morfologii. CYP24A1 by tedy mohl v budoucnu sloužit coby marker kvality spermií (Blomberg Jensen et al. 2012).

3.3 Biogeneze annulu

Biogeneze annulu začíná v počátcích spermiogeneze. Annulus je u myši možné pozorovat již v kroku deset, po invaginaci plazmatické membrány v okolí vznikající axonemy, v těsné blízkosti distálního konce bazálního tělíska (Kwitny et al. 2010; Yasuzumi et al. 1972; Fawcett et al. 1970). V pozdější fázi spermiogeneze, kroku patnáctém, když jsou již přítomna vnější denzní vlákna a fibrózní plášť, se annulus pohybuje spolu s plazmatickou membránou na své konečné místo mezi středním a hlavním segmentem. Začátek migrace annulu by mohl být spojen se ztrátou distálních přívěsků při přeměně distální centrioly v bazální tělísko (Kwitny et al. 2010; Hoque et al. 2024). Tohoto pohybu se patrně účastní i SEPT12, který je schopný interagovat s α i β tubuliny tvořícími mikrotubuly axonemy (*Lehti, Sironen 2017). V annulu se během jeho biogeneze nachází také protein DNAJB13. Tento protein patřící do kochaperonů rodiny HSP40 typ II (Heat Shock Protein 40) nejspíše může interagovat se SEPT4. Tato skutečnost naznačuje zapojení DNAJB13 do sestavování annulu a jeho navedení do správné pozice. Na začátku spermiogeneze, při lokalizaci annulu v oblasti spojovacího segmentu, je velká akumulace DNAJB13 patrná kromě annulu i v distálněji položeném místě bičíku, v místě budoucího umístění annulu. Do tohoto místa tato velká akumulace DNAJB13 migruje těsně před pohybem samotného annulu. Po dosažení správné pozice annulu dochází k postupnému vymizení DNAJB13 z annulu a tvorbě mitochondriálního pláště (Guan et al. 2009). Ve zralé spermii zůstává DNAJB13 pouze v asociaci s axonemou, a to v celé její délce (Guan, Yuan 2008).



Obrázek 6: Časoprostorový záznam migrace annulu myši. Šipka ukazuje annulus, modře je značené jádro, červeně mitochondrie a zeleně Sept4 (měřítko: 10 μ m). (Převzato z: Guan et al. 2009)

Mezi další možné mechanismy, pomáhající annulu zaujmout správnou pozici, patří CBY3/CIBAR1 komplex. Protein CBY3 patřící do chibby rodiny se při vzniku annulu nachází v jeho těsné blízkosti. V místě správného umístění annulu je pak CBY3 tvořící prstenec jeho přímou součástí. Druhý protein, který je součástí komplexu s CBY3, se nazývá CIBAR1 (Cby1-interacting BAR domain-containing 1). Ten je na bázi bičíku detekovatelný ještě dříve než CBY3. Ve zralé spermii CIBAR1, stejně tak jako CBY3, již není detekovatelný. Protein CBY3 potřebuje ke svému inkorporování do annulu CIBAR1 (Hoque et al. 2024).

V průběhu vývoje spermie vzniká z denzního intersticiálního materiálu mitochondrií chromatoidní tělísko (Fawcett et al. 1970). Lze předpokládat, že toto tělísko nejprve slouží k ukládání a zpracování RNA (ribonukleové kyseliny) (Kotaja et al. 2006). V počátcích biogeneze annulu se chromatoidní tělísko nachází v blízkosti jaderné membrány, odkud se přesouvá směrem k vznikajícímu bičíku a již existujícímu annulu. Zde stejně jako annulus utváří prstenec v těsné blízkosti distálního konce bazálního tělíska. Vznik annulu je na chromatoidním tělísku nezávislý, tyto dva prstence spolu ale asociují. Při jejich společné migraci podél bičíku se chromatoidní prstenec pomalu zmenšuje. Po dosažení konečné lokalizace annulu již chromatoidní prstenec není přítomný (Fawcett et al. 1970). Ačkoli přesná funkce chromatoidního tělíska stále není známá, oba prstence mají při svém společném pohybu vliv na formování mitochondriálního pláště (Shang et al. 2010).

4. Defekty ve formování annulu

Příčiny defektů ve formování annulu spermií mohou být různé. Jak ukazují níže popsané příklady na myších modelech s mutacemi v proteinech ovlivňujících annulus, defekty obecně vedou k problémům se správným formováním mitochondriálního pláště, typickému ohybu bičíku v místě obvyklé lokalizace annulu a nižší pohyblivosti a fertilitě spermií při zachování

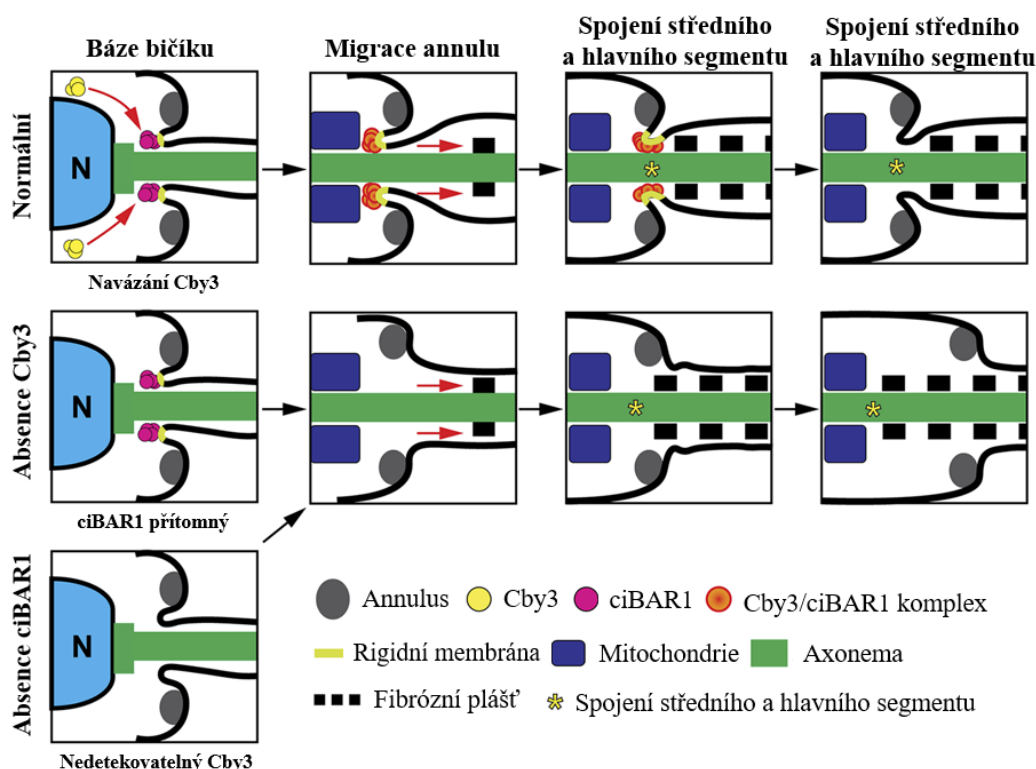
anatomické i histologické stavby okolních tkání. U samic těchto myši nedochází k žádným abnormalitám.

Maturované spermie myši s homozygotně deletovaným genem pro Sept4 nemají annulus. V příslušném místě mají tyto spermie povětšinou pouze zúžený bičík s neporušenou plazmatickou membránou. U 50-70 % maturovaných spermií dochází v tomto místě k ostrému ohybu bičíku směrem k hlavičce (typicky 180°), či k jeho zlomení. Spermie myši s heterozygotní delecí vykazují ve 20-30 % mírnější ohnutí do tvaru L. U nematurovaných spermií v obou případech delecí k tomuto jevu nedochází, křehkost struktury bičíku se tak s vysokou mírou pravděpodobnosti projevuje až při jeho pohybu. Ohnutí bičíku možná narušuje také kinesinový transport uvnitř bičíku a motorickou aktivitu dyneinu. U těchto spermií lze zaznamenat sníženou schopnost využívat ATP, a navíc vykazují abnormality v mitochondriálním plášti. Více než 90 % spermií s absencí Sept4 bylo zcela nemotilních nebo vykazovalo poruchy v pohybu. Homozygotní myši s delecí jsou infertilní, heterozygoti nevykazují nijak sníženou fertilitu nejspíše vlivem sdílení proteinu Sept4 skrz cytoplazmatické můstky během vývoje spermií (Kissel et al. 2005; Ihara et al. 2005).

U chimérických myši s jednou nefunkční alelou pro Sept12 byla zjištěna nižší váha varlat a nižší motilita a celkový počet spermií. Většina jedinců byla sterilní, u některých byl pozorován nižší počet spermií ve všech stádiích vývoje, u dalších pak maturační arrest ve stádiu kulatých spermatid. Mitochondrie těchto jedinců nejsou organizované do mitochondriálního pláště a vyskytují se v některých případech až v okolí akrozomu. Bičík těchto spermií je ohnutý nebo jim zcela chybí (Lin et al. 2009). U homozygotních myši s mutantní alelou s nahrazeným threoninem v místě 96 za izoleucin (*SEPTIN12^{T96I}*) se Sept12 váže na Sept7 méně ochotně, vzniká tak mnohem méně filament. Mutovaný Sept12 je spíše rozpuštěný v cytoplazmě, než ve formě filament (Chen et al. 2025).

Pro sestavování septinových filament jsou důležité i správné posttranslační úpravy. Myši s fosforylovaným Sept12 na Ser198 v GTP vázajícím místě (fosfomimetiční mutanti S198D a S198E) mají sníženou fertilitu. Spermie těchto jedinců exprimují proteiny annulu beze změny, avšak annulus, který by obsahoval Sept4 nebo Sept12, se netvoří. Mezi středním a hlavním segmentem je patrné pouze zúžení bičíku nebo jeho charakteristické zahnutí směrem k hlavičce. Tato fosforylace tedy pravděpodobně zabraňuje tvorbě septinových filament, což naznačuje fyziologickou úlohu posttranslačních úprav v biogenezi bičíku. Defekty těchto spermií jsou mírnější než u jedinců bez funkčního Sept12, přesto mají tyto spermie sníženou motilitu (Shen et al. 2017).

Defekty v biogenezi annulu vykazují také spermie s nefunkčním komplexem Cby3/ciBAR1. Annulus spermií bez Cby3 proteinu je často deformovaný a nachází se až v oblasti hlavního segmentu, případně úplně chybí. I přesto se velikost středního segmentu nemění. Funkce annulu jakožto difúzní bariéry je však narušena. U nadpoloviční většiny spermií bez ciBAR1 dochází obdobně jako u Cby3 k chybnému umístění annulu do oblasti hlavního segmentu a k narušení funkčnosti difúzní bariéry. Protein ciBAR1 je sice schopen se do annulu inkorporovat sám, nicméně bez Cby3 nedokáže následovat annulus při jeho migraci mezi střední a hlavní segment. Celý komplex nejspíše přispívá k lokální rigiditě plazmatické membrány, která je potřebná pro správné umístění annulu (Hoque et al. 2024).



Obrázek 7: Model umístění annulu pomocí komplexu Cby3/ciBAR1. N: jádro. (Upraveno a převzato z: Hoque et al. 2024)

Annulus spermií myši bez Tat1 je připojený pouze k mitochondriálnímu plášti a má neobvyklý oválný tvar. Jedinci jsou sterilní bez změn v počtu spermií, ale jejich spermie jsou nepohyblivé s ohnutým a zúženým bičíkem v místě normální lokalizace annulu a abnormálním středním segmentem. Schopnost kapacitace a akrozomální reakce je také snižena (Touré et al. 2007). V nepřítomnosti Tmem232 je annulus součástí hlavního segmentu a je odtržen od segmentu středního. Anomálie lze pozorovat taktéž v mitochondriálním plášti (Cai et al. 2024). Absence androglobinu způsobuje nesprávnou migraci annulu nebo jeho úplnou nepřítomnost (Keppner et al. 2022). Spermie bez proteinu Ttc6 vykazují charakteristické ohnutí v místě běžné

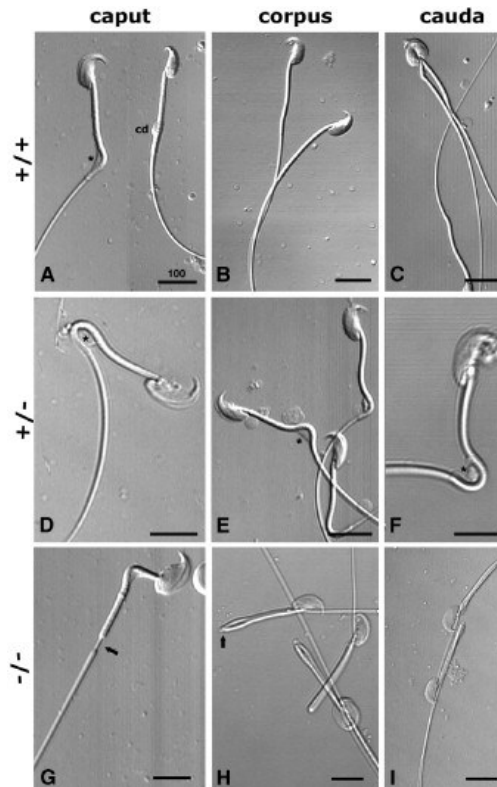
lokalizace annulu, navíc mají tyto spermie sníženou motilitu stejně jako schopnost oplodnit vajíčko (Wang et al. 2023).

Roli ve formaci annulu a jeho migraci má rovněž centriolární protein Cep76. Funkci má tento protein i v tranzitní zóně a potenciálně i manžetě. U mutantů bez Cep76 nebyly při prvotním pozorování zjištěny žádné anatomické ani histologické odlišnosti tkání, pouze část jejich spermií nebyla schopná projít spermiací. Všichni jedinci byli přesto sterilní. Spermie těchto mutantů jsou abnormální, mají kratší všechny segmenty bičíku, defekty akrozomu, mitochondriálního pláště, vnějších denzních vláken a tvaru hlavičky a jádra. Motilních spermií je pouze minimum, tyto se navíc pohybují pouze na místě. U části spermií byla pozorována absence centrální dvojce mikrotubulů nebo přítomnost tří centriol. Annulus u těchto spermií často nebyl kvůli velkým deformacím fibrózního pláště jasně rozlišitelný. Při bližším zkoumání byl nalezen coby součást hlavního segmentu, odtržen od segmentu středního. Při sledování Sept4, jakožto markeru annulu, byl tento protein pozorován kromě annulu také ve spojovacím segmentu, což naznačuje fragmentaci annulu. Oproti zdravým jedincům je u těchto mutantů výskyt spermií bez hlavičky dvojnásobný (Houston et al. 2024).

Doposud málo probádaná je úloha membránového cyklinu Ccny11 (Cyclin Y-like 1) vytvářejícího komplex s kinázou CDK16. Tento cyklin je v cytoplazmatických membránách vyvíjejících se spermiích přítomný až do vzniku reziduálního tělíska, jehož odhození se pravděpodobně účastní. Tento komplex má s největší pravděpodobností ve spermiogenezi i další role, nicméně tyto nejsou doposud probádané. Při deleci genu pro cyklin Ccny11 nevykazují jedinci žádné anatomické ani histologické odchylky, narušena je ale jejich fertilita. Počet spermií je nezměněný, spermie jsou ale až na výjimky nemotilní se zúženinou na konci mitochondriálního pláště, annulem přichyceným pouze k hlavnímu segmentu a častým zahnutím bičíku v některých případech vedoucím až k omotání hlavičky a spojovacího segmentu (Zi et al. 2015).

Další protein, který se sice v annulu přímo nevyskytuje, avšak má úlohu ve spermiogenezi a akrozomální reakci, je Cabs1 (calcium-binding protein spermatid-associated 1). Tento protein je exprimován v prodlužujících se spermatidách a v akrozomu a hlavním segmentu maturovaných spermií. U myši s delecí genu pro Cabs1 nebyly nalezeny žádné anomálie, okolo 60 % jejich spermií však vykazuje morfologické defekty včetně chybějícího annulu, zahnutého bičíku a zúžení mezi středním a hlavním segmentem. Počet spermií není ovlivněný, jejich motilita je ale značně nižší. Někteří jedinci byli sterilní (~30 %), jiní nevykazovali žádné odchylky v plodnosti. Funkce Cabs1 není dostatečně prozkoumaná, přesto má nejspíše

důležitou roli v sestavení bičíku a annulu. U spermií myši bez tohoto proteinu dochází z nevysvětlených důvodů ke změnám v expresi mnoha proteinů, vyšší exprese je patrná například u *Ccny11*, naopak u *Sept4* je exprese výrazně snižena (Zhang et al. 2021). Tyto spermie mají rovněž menší množství ATP, což by mohlo souviset s jejich sníženou motilitou (Zhao et al. 2024).



Obrázek 8: Reprezentativní obrázek defektů spojených s chybným formováním annulu. Horní řádek ukazuje normální spermie, střední řádek heterozygotní delecí a spodní řádek homozygotní delecí genu *SEPT4*. Sloupce ukazují části epididymis, ze kterých byly spermie odebírány. Procento ohnutých spermií se s průchodem epididymis zvětšuje. (Převzato z: Kissel et al. 2005)

defekt	myší model	detekovatelnost annulu	zúžený bičík	ohnutý bičík	abnormální mitochondriální plášť	poruchy pohyblivosti	fertilita	zdroj
Sept4	knock-out	ne	ano	ano	ano	ano	ne	Kissel et al. 2005; Ihara et al. 2005
Sept12	heterozygotní chimerická delece	-	-	ano	ano	ano	ne/snížená	Lin et al. 2009
fosforylovaný Sept12 (Ser198)	mutant (S196E)	ne	ano	ano	ne	ano	snížená	Shen et al. 2017
Cby3/ciBARI	knock-out	ne/v hlavním segmentu	-	ano	-	ano	ne/snížená	Hoque et al. 2024
Tat1	knock-out	ve středním segmentu	ano	ano	ano	ano	ne	Touré et al. 2007
Tmem232	knock-out	v hlavním segmentu	ano	-	ano	ano	ne	Cai et al. 2024
androglobin	knock-out	ne/nesprávná pozice	-	-	ano	-	ne	Keppner et al. 2022
Ttc6	knock-out	-	ano	ano	ne	ano	ne/snížená	Wang et al. 2023
Cep76	knock-out	v hlavním segmentu	-	-	ano	ano	ne	Houston et al. 2024
CcnyII	knock-out	v hlavním segmentu	ano	ano	ano	ano	ne	Zi et al. 2015

Tabulka1: Porovnání některých defektů annulu. - : data nejsou k dispozici

5. Mužská neplodnost

Mezinárodní slovník neplodnosti a péče o plodnost definuje neplodnost jako neschopnost jedince počít dítě se zdravým partnerem po dobu 12 a více měsíců při pravidelném nechráněném pohlavním styku (Zegers-Hochschild et al. 2017). Celosvětově je přibližně 17,5 % párů neplodných, v Evropě 16,5 % (World Health Organization 2023). Muži jsou za neplodnost páru zodpovědní z 20-30 %, dalších 20-30 % tvoří kombinace ženských i mužských faktorů. Celosvětově je neplodných mužů v závislosti na geografické oblasti 2,5-12 %, z čehož největší procento neplodných mužů se nachází ve střední a východní Evropě (8-12 %) a v Austrálii (8-9 %) (Agarwal et al. 2015). Mužská neplodnost může být dána řadou genetických příčin i dalších faktorů spojených s životním stylem, například častým kouřením cigaret, nadměrným pitím alkoholu, užíváním drog, obezitou a špatným stravováním nebo stresem (Kuo et al. 2012; Qin et al. 2024; Ramlau-Hansen et al. 2007; Durairajanayagam 2018).

Některé z výše popsaných defektů u myší byly popsány také u mužů diagnostikovaných s poruchou plodnosti. Nejčastější diagnózy zahrnují: Astenozoospermii, která značí procento progresivně pohyblivých spermií pod 30 %. Oligoastenozoospermii, při které se k této definici přidává ještě menší celkový počet spermií než 39×10^6 na ejakulát nebo menší koncentrace než 16×10^6 na ml. Samotnou oligozoospermii vyjadřující menší celkový počet spermií (nebo koncentraci), než je dolní referenční hodnota. Teratozoospermii, u které se jedná o procento morfologicky normálních spermií pod 4 %. Její kombinaci s astenozoospermii, kterou je astenoteratozoospermie, při které je procento motilních i morfologicky standartních spermií pod dolní referenční hodnotou. A oligoastenoteratozoospermii, která pak spojuje všechny předchozí patologie. Pokud jsou všechny hodnoty v normě, jedná se o normospermii (World Health Organization 2010; World Health Organization 2021).

Prevalence astenozoospermie je těžce určitelná. Při studii 1085 neplodných argentinských mužů byla u 82 % pozorována změna pohyblivosti spermií, přičemž 19 % bylo diagnostikováno s astenozoospermii a zbylých 63 % s astenozoospermii spojenou s oligozoospermii a/nebo teratozoospermii. (Curi et al. 2003). Retrospektivní (2018-2021) studie 64 452 neplodných indických mužů ukázala abnormality spermií u 72,1 %, astenozoospermie tvořila pouze 2 % (Bhoi et al. 2023). Astenozoospermie či její kombinace s dalšími patologiemi je přesto častou diagnózou u neplodných mužů. Výzkumu příčin tohoto onemocnění se díky tomu věnuje velká pozornost a tím pádem též defektům annulu, kvůli jejich dopadu na motilitu spermií.

U dvou čínských mužů s astenozoospermií byly objeveny dvě recesivní mutace znamenající ztrátu funkce proteinu v genu *SEPT4*. Spermie těchto homozygotních mužů měly úzký i jinak atypický střední segment, ohnutý bičík o 90° v místě spojení středního a hlavního segmentu a *SEPT6* a 12 lokalizované v oblasti spojovacího segmentu. U žádných spermie těchto mužů nebyl nalezen annulus (Wang et al. 2022). Při vyšetření dalších dvou čínských mužů s astenozoospermií byly objeveny dvě mutace genu *SLC26A8*. Jedna mutace způsobuje záměnu jedné aminokyseliny v proteinu, druhá vede ke ztrátě funkce proteinu, oba muži byli homozygoti. Spermie těchto mužů měly úzký střední segment s chybějícím annulem a mitochondriálním pláštěm, malé množství mitochondrií těchto spermií bylo lokalizováno mimo střední segment (Gao et al. 2022). Vyšetření 146 mužů s diagnostikovanou astenozoospermií ve Francii ukázalo heterozygotní varianty genu *SLC26A8* u 7 z nich. Tři z těchto mužů byli zkoumáni blíže, první muž měl malý objem ejakulátu a jeho spermie vykazovaly vyšší výskyt morfologických atypičností včetně stočených bičíků a špatného tvaru posteriorní části hlavičky. Spermie druhého muže se od normálních lišily pouze častějšími defekty bičíku včetně annulu a abnormálním středním segmentem. Poslední blíže sledovaný muž měl nižší celkový počet spermií a časté morfologické abnormality s nesprávným tvarem hlavičky a středního segmentu a defekty bičíku a annulu, protein *SLC26A8* byl neobvykle rozmístěn ve středním segmentu (Dirami et al. 2013).

Na vzorku 30 mužů, z nichž 11 trpělo astenozoospermií, bylo zjištěno nižší množství *SEPT12* u spermií s abnormalitami hlavičky, krčku nebo bičíku. Porovnání obou skupin ukázalo nižší množství *SEPT12* u mužů s astenozoospermií (Lin et al. 2009).

Při prověřování genotypu 160 neplodných mužů byly objeveny dvě mutace genu *SEPT12* v GTP vázajícím místě. V jedné mutaci jde o nahrazení threoninu za metionin (T89M), v druhé pak aspartátu za asparagin (D197N). Oba muži byli heterozygoté, muž s první zmíněnou mutací trpěl astenozoospermií, druhá mutace způsobila oligostenozoospermií. Blíže vyšetření spermií muže s mutací *SEPT12*^{D197N} ukázalo většinu jeho maturovaných spermií s ohnutým bičíkem, zúženým místem mezi středním a hlavním segmentem a obnaženou axonemu. Annulus, který neobsahoval žádný *SEPT12*, měl u těchto spermií mnohačetné vady jako například nižší výšku. Spermie tohoto muže mají sníženou motilitu, koncentraci a vícero strukturálních defektů. Mutovaný *SEPT12* tedy nejspíše narušuje strukturální integritu annulu (Kuo et al. 2012).

Stejná mutace jediného genu se může prezentovat více způsoby, což dokazuje mutace *SEPT12*^{T96I} opět v GTP vázajícím místě, která u dvou mužů vedla k astenozoospermií

bez zjevných morfologických defektů a teratozoospermii s těmito defekty. U druhého zmiňovaného mají spermie abnormální tvar hlavičky s velkou variací od malých a tenkých až po nadměrně veliké. Spermie s touto mutací mají dekonenzovaný akrozom, stále přítomné nepravidelně umístěné kapky cytoplasmy a velké jaderné vakuoly signalizující abnormální kondenzaci chromatinu (Chen et al. 2025).

Studie 9 mužů s normospermii a 21 mužů s astenozoospermii v tchajwanské nemocnici stanovila procento přítomných nenarušených spermií v ejakulátu s defektním signálem SEPT7 na 19,1 % u mužů s normospermii a 36,1 % u mužů s astenozoospermii. U abnormálních spermií se toto číslo vyšplhalo až na 50,7 % u zdravých a 90,3 % u mužů s astenozoospermii. Závažnost astenozoospermie korelovala s procentem spermií vykazujících defektní SEPT7 signál (Chao et al. 2010).

Pouze malá část studií se zabývá četností defektů annulu u neplodných mužů. Studie 108 neplodných jedinců z Japonska detekovala defekty annulu u 13 %. Přesněji bylo nesprávné imunoznačení annulu pro SEPT4 a/nebo SEPT7 jakožto markerů annulu pozorováno u 30 % mužů s astenozoospermii (10 z 33) a 5 % neplodných s jinou diagnózou (4 z 75) (Sugino et al. 2008).

Oproti tomu studie zaměřující se na detekci SLC26A8 u europoidních jedinců zkoumající 329 mužů s astenozoospermii našla defektní annulus nebo jeho absenci pouze u 1,21 % (4 z 329) (Dirami et al. 2015). Podobné výsledky dostala také studie detekující stejný protein u 75 francouzských mužů, z nichž 28 trpělo astenozoospermii, 13 oligostenozoospermii a 34 astenoteratozoospermii. Defekty v annulu vykazoval pouze jediný muž trpící teratoastenozoospermii. Detekce SEPT4 a 7 byla u spermií tohoto jedince neúspěšná, 93 % spermií mělo defekty také v mitochondriálním plášti a 42 % nemělo propojený střední a hlavní segment (Lhuillier et al. 2009). Studie 100 íránských mužů s astenozoospermii detekující SEPT4 a SEPT7 našla defekty annulu stejně jako předchozí zmíněná pouze u jediného muže. U 75 % spermií tohoto muže nebylo možné detekovat SEPT4 ani SEPT7 (Hosseiniifar et al. 2014).

Rozpor těchto studií naznačuje možné etnické rozdíly. Všechny studie posuzují své výsledky velmi opatrně, pracují totiž s relativně malými počty mužů. U zkoumaných mužů navíc může docházet k defektům annulu, které tyto studie nebyly schopné odhalit.

Další studie si dala za cíl místo přímé detekce annulu změřit pouze úroveň transkripce genu pro SEPT4 u ejakulovaných spermií 20 jedinců s astenozoospermii a 20

s astenoteratozoospermii z Íránu. Jejich výsledky ukazují signifikantně menší expresi u obou skupin oproti kontrolní skupině s normospermii (Jannatifar et al. 2023). K podobným výsledkům dospěla i studie zaměřující se na odhalení biomarkeru neplodnosti pomocí analýzy proteinů spermií mužů z Indie, z nichž 18 trpělo oligozoospermii, 24 astenozoospermii a 12 oligoastenozoospermii, která zjistila absenci nebo sníženou expresi SEPT4 při astenozoospermii a oligoastenozoospermii. Z těchto výsledků vyplývá možné využití SEPT4 jako biomarkeru při diagnostice mužské neplodnosti, a to konkrétně astenozoospermie s možnými kombinacemi s terato- a oligozoospermii (Vickram et al. 2021).

Podobný přístup zvolila i studie zaměřující se na úroveň genové transkripce genu *SEPT2* u 20 jedinců s astenozoospermii a 20 s teratozoospermii. Tato transkripce byla výrazně snížena u mužů s astenozoospermii, u mužů s teratozoospermii se nelišila od zdravých. Korelační analýza odhalila signifikantní vztah mezi množstvím mRNA (messengerové ribonukleové kyseliny) genu *SEPT2* a progresivní motilitou spermií (Mazaheri Moghaddam et al. 2021).

Studie sledující zmíněné muže po delší dobu ukazují velkou úspěšnost metod asistované reprodukce (intracytoplazmatické injekce spermií, intrauterinní inseminace a in vitro fertilizace). Děti těchto mužů se rodí zdravé, otázkou však zůstává budoucí plodnost takto narozených chlapců s ohledem na zděděné genetické mutace (Dirami et al. 2015; Sugino et al. 2008; Wang et al. 2022; Gao et al. 2022).

6. Závěr

Annulus je proteinová kruhová struktura nalézající se mezi středním a hlavním segmentem bičíku spermie, kde vytváří selektivní difúzní bariéru. Hraje klíčovou roli nejen při vývoji bičíku a jeho jednotlivých komponent, ale také přispívá k motilitě spermie, a tím i její schopnosti oplodnit vajíčko. Přestože byl annulus popsán již před více než 130 lety, teprve s rozvojem molekulárních metod v posledních desetiletích se otevřela cesta k pochopení jeho biochemického složení, funkce a mechanismů biogeneze a migrace.

Z předložených studií vyplývá jeho zásadní úloha v biogenezi bičíku, zejména jeho funkce jakožto difúzní bariéry a organizátoru mitochondriálního pláště. Tyto poznatky byly získány převážně na modelech geneticky modifikovaných myší s delecemi nebo mutacemi genů kódujících proteiny annulu či jiné proteiny, u kterých se ukázala dosud nepředpokládaná provázanost s annulem (např. solubilní adenylátcykláza). Zajímavá je i hypotéza o možné úloze

annulu v procesu kapacitace, zejména ve vztahu ke zvýšené koncentraci cAMP, která byla v annulu po skončení tohoto procesu objevena.

Dosud byly v annulu prokázány například septiny, Tat1 nebo TMEM232, u dalších proteinů se jejich lokalizace a funkce stále zkoumá. Septiny jsou základními strukturními komponentami díky schopnosti vytvářet filamenta, TAT1 zajišťuje ukotvení annulu k plazmatické membráně, TMEM232 propojuje annulus se spojovacím segmentem a androglobin je považován za další důležitý faktor s dosud ne zcela objasněnou funkcí.

Mutace nebo delece těchto proteinů vedou ke strukturálním poruchám spermií, včetně deformace bičíku, chybného umístění annulu a narušení mitochondriálního pláště. Tyto defekty mají za následek sníženou motilitu spermií a následně i fertilitu, často až sterilitu, přičemž fertilita samic zůstává neovlivněna.

Studie na geneticky modifikovaných myších podnítily bližší výzkum mužské neplodnosti v souvislosti s defekty annulu. Při nich byly identifikovány mutace septinů a dalších proteinů u mužů s různými diagnózami poruch spermií, nejčastěji však s poruchou pohyblivosti spermií. Výsledky se liší podle velikosti vzorku i zkoumané populace – vyšší výskyt defektů annulu byl pozorován v asijské populaci oproti evropské či americké.

Možnost využití proteinů annulu jako biomarkerů mužské neplodnosti zůstává předmětem intenzivního výzkumu. Jejich detekce by mohla nabídnout přesnější diagnostiku i prognózu než běžně používaný spermioqram. Zároveň se otevírá možnost využití těchto proteinů ve vývoji mužské antikoncepce, což však vyžaduje další detailní výzkum.

7. Seznam použité literatury

* označuje sekundární zdroje

AFZELIUS, B A, ELIASSON, R, JOHNSEN, O and LINDHOLMER, C, 1975. Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *The Journal of cell biology*. 1 August 1975. Vol. 66, no. 2, p. 225–232. DOI 10.1083/jcb.66.2.225.

AFZELIUS, Björn, 1959. Electron Microscopy of the Sperm Tail Results Obtained with a New Fixative. *The Journal of Cell Biology*. 25 March 1959. Vol. 5, no. 2, p. 269–278. DOI 10.1083/jcb.5.2.269.

AGARWAL, Ashok, MULGUND, Aditi, HAMADA, Alaa and CHYATTE, Michelle Renee, 2015. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*. December 2015. Vol. 13, no. 1, p. 37. DOI 10.1186/s12958-015-0032-1.

AGETA-ISHIHARA, Natsumi, FUKAZAWA, Yugo, ARIMA-YOSHIDA, Fumiko, OKUNO, Hiroyuki, ISHII, Yuichiro, TAKAO, Keizo, KONNO, Kohtarou, FUJISHIMA, Kazuto, AGETA, Hiroshi, HIOKI, Hiroyuki, TSUCHIDA, Kunihiro, SATO, Yoshikatsu, KENGAKU, Mineko, WATANABE, Masahiko, WATABE, Ayako M., MANABE, Toshiya, MIYAKAWA, Tsuyoshi, INOKUCHI, Kaoru, BITO, Haruhiko and KINOSHITA, Makoto, 2025. Septin 3 regulates memory and L-LTP-dependent extension of endoplasmic reticulum into spines. *Cell Reports*. March 2025. Vol. 44, no. 3, p. 115352. DOI 10.1016/j.celrep.2025.115352.

*AVIDOR-REISS, Tomer, HA, Andrew and BASIRI, Marcus L., 2017. Transition Zone Migration: A Mechanism for Cytoplasmic Ciliogenesis and Postaxonemal Centriole Elongation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. August 2017. Vol. 9, no. 8, p. a028142. DOI 10.1101/cshperspect.a028142.

BALTZ, Jay M., ONEEKA WILLIAMS, P. and CONE, Richard A., 1990. Dense Fibers Protect Mammalian Sperm Against Damage1. *Biology of Reproduction*. 1 September 1990. Vol. 43, no. 3, p. 485–491. DOI 10.1095/biolreprod43.3.485.

BHOI, N. R., CHANDRA, V., MURDIA, N., MURDIA, K., AGGRAWAL, R., SHAH, N., BASANT, S., SALUNKHE, A., & SUWALKA, I. (2023). Geographical distribution of semen quality parameters in men visiting tertiary care infertility centers across India: A retrospective study. *Fertility Science and Research*, 10(3), 158–163. https://doi.org/10.4103/fsr.fsr_31_23

BLOMBERG JENSEN, M., JØRGENSEN, A., NIELSEN, J. E., BJERRUM, P. J., SKALKAM, M., PETERSEN, J. H., EGEBERG, D. L., BANGSBØLL, S., ANDERSEN, A. N., SKAKKEBÆK, N. E., JUUL, A., RAJPERT-DE MEYTS, E., DISSING, S., LEFFERS, H. and JØRGENSEN, N., 2012. Expression of the vitamin D metabolizing enzyme CYP24A1 at the annulus of human spermatozoa may serve as a novel marker of semen quality. *International Journal of Andrology*. August 2012. Vol. 35, no. 4, p. 499–510. DOI 10.1111/j.1365-2605.2012.01256.x.

BRANHAM, María T., BUSTOS, Matías A., DE BLAS, Gerardo A., REHMANN, Holger, ZARELLI, Valeria E.P., TREVIÑO, Claudia L., DARSZON, Alberto, MAYORGA, Luis S. and TOMES, Claudia N., 2009. Epac Activates the Small G Proteins Rap1 and Rab3A to Achieve Exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. September 2009. Vol. 284, no. 37, p. 24825–24839. DOI 10.1074/jbc.M109.015362.

*BRITO, Leonardo F.C., 2007. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*. December 2007. Vol. 6, no. 4, p. 249–264. DOI 10.1053/j.ctep.2007.09.004. CAI, Xinying, ZHANG, Hui, KONG, Shuai, XU, Weilong, ZHENG, Jie, WANG, Ning, HE, Shuai, LI, Shupe, SHEN, Yiru, WANG, Ke, ZHANG, Zengyunou, CAI, Haijian, MA, Fang, BAI, Shun, ZHU, Fuxi, XIAO, Fengli and WANG, Fengsong, 2024. TMEM232 is required for the formation of sperm flagellum and male fertility in mice. *Cell Death & Disease*. 8 November 2024. Vol. 15, no. 11, p. 806. DOI 10.1038/s41419-024-07200-9.

CHAO, Hsin-Chih Albert, LIN, Ying-Hung, KUO, Yung-Che, SHEN, Chiung-Jiung, PAN, Hsian-Ann and KUO, Pao-Lin, 2010. The expression pattern of SEPT7 correlates with sperm morphology. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. June 2010. Vol. 27, no. 6, p. 299–307. DOI 10.1007/s10815-010-9409-4.

CHEN, Kuan-Ru, WANG, Han-Yu, KUO, Yung-Che, LO, Yu-Chih and KUO, Pao-Lin, 2025. A novel SEPT12 mutation, T96I, is associated with sperm head and annulus defects. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 7 January 2025. Vol. 12, p. 1498013. DOI 10.3389/fcell.2024.1498013.

CURI, S. M., ARIAGNO, J. I., CHENLO, P. H., MENDELUK, G. R., PUGLIESE, M. N., SARDI SEGOVIA, L. M., REPETTO, H. E. H. and BLANCO, A. M., 2003. ASTHENOZOOSPERMIA: ANALYSIS OF A LARGE POPULATION. *Archives of Andrology*. January 2003. Vol. 49, no. 5, p. 343–349. DOI 10.1080/01485010390219656.

DASGUPTA, S., MILLS, C. L. and FRASER, L. R., 1993. Ca²⁺-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *Reproduction*. 1 September 1993. Vol. 99, no. 1, p. 135–143. DOI 10.1530/jrf.0.0990135.

DIRAMI, Thassadite, RODE, Baptiste, JOLLIVET, Mathilde, DA SILVA, Nathalie, ESCALIER, Denise, GAITCH, Natacha, NOREZ, Caroline, TUFFERY, Pierre, WOLF, Jean-Philippe, BECQ, Frédéric, RAY, Pierre F., DULIOUST, Emmanuel, GACON, Gérard, BIENVENU, Thierry and TOURÉ, Aminata, 2013. Missense Mutations in SLC26A8, Encoding a Sperm-Specific Activator of CFTR, Are Associated with Human Asthenozoospermia. *The American Journal of Human Genetics*. May 2013. Vol. 92, no. 5, p. 760–766. DOI 10.1016/j.ajhg.2013.03.016.

DIRAMI, Thassadite, RODE, Baptiste, WOLF, Jean-Philippe, GACON, Gérard, DULIOUST, Emmanuel and TOURÉ, Aminata, 2015. Assessment of the frequency of sperm annulus defects in a large cohort of patients presenting asthenozoospermia. *Basic and Clinical Andrology*. 15 November 2015. Vol. 25, no. 1, p. 10. DOI 10.1186/s12610-015-0026-z.

DURAIRAJANAYAGAM, Damayanthi, 2018. Lifestyle causes of male infertility. *Arab Journal of Urology*. March 2018. Vol. 16, no. 1, p. 10–20. DOI 10.1016/j.aju.2017.12.004.

ELIAS, P M, GOERKE, J, FRIEND, D S and BROWN, B E, 1978. Freeze-fracture identification of sterol-digitonin complexes in cell and liposome membranes. *The Journal of cell biology*. 1 August 1978. Vol. 78, no. 2, p. 577–596. DOI 10.1083/jcb.78.2.577.

FAWCETT, Don W., EDDY, Edward M. and PHILLIPS, David M., 1970. Observations on the Fine Structure and Relationships of the Chromatoid Body in Mammalian Spermatogenesis1. *Biology of Reproduction*. 1 February 1970. Vol. 2, no. 1, p. 129–153. DOI 10.1095/biolreprod2.1.129.

FAWCETT, Don W. and PHILLIPS, David M., 1969. The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. *The Anatomical Record*. October 1969. Vol. 165, no. 2, p. 153–183. DOI 10.1002/ar.1091650204.

*FIELD, Christine M. and KELLOGG, Douglas, 1999. Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends in Cell Biology*. October 1999. Vol. 9, no. 10, p. 387–394. DOI 10.1016/S0962-8924(99)01632-3.

GAO, Yang, WU, Huan, XU, Yuping, SHEN, Qunshan, XU, Chuan, GENG, Hao, LV, Mingrong, TAN, Qing, LI, Kuokuo, TANG, Dongdong, SONG, Bing, ZHOU, Ping, WEI, Zhaolian, HE, Xiaojin and CAO, Yunxia, 2022. Novel biallelic mutations in *SLC26A8* cause severe asthenozoospermia in humans owing to midpiece defects: Insights into a putative dominant genetic disease. *Human Mutation*. March 2022. Vol. 43, no. 3, p. 434–443. DOI 10.1002/humu.24322.

GATENBY, J. Bronte and BEAMS, H. W., 1935. The Cytoplasmic Inclusions in the Spermatogenesis of Man. *Journal of Cell Science*. 1 October 1935. Vol. S2-78, no. 309, p. 1–29. DOI 10.1242/jcs.s2-78.309.1.

GUAN, Jikui, KINOSHITA, Makoto and YUAN, Li, 2009. Spatiotemporal association of DNAJB13 with the annulus during mouse sperm flagellum development. *BMC Developmental Biology*. December 2009. Vol. 9, no. 1, p. 23. DOI 10.1186/1471-213X-9-23.

GUAN, Jikui and YUAN, Li, 2008. A heat-shock protein 40, DNAJB13, is an axoneme-associated component in mouse spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*. September 2008. Vol. 75, no. 9, p. 1379–1386. DOI 10.1002/mrd.20874.

HANCOCK, J. L., 1956. THE MORPHOLOGY OF BOAR SPERMATOZOA. *Journal of the Royal Microscopical Society*. September 1956. Vol. 76, no. 3, p. 84–97. DOI 10.1111/j.1365-2818.1956.tb00443.x.

HE, Xiuqing, MU, Wenyu, WANG, Ziqi, XU, Ke, YIN, Yingying, LU, Gang, CHAN, Wai-Yee, LIU, Hongbin, LV, Yue and LIU, Shangming, 2023. Deficiency of the Tmem232 Gene Causes Male Infertility with Morphological Abnormalities of the Sperm Flagellum in Mice. *Cells*. 13 June 2023. Vol. 12, no. 12, p. 1614. DOI 10.3390/cells12121614.

HESS, Kenneth C., JONES, Brian H., MARQUEZ, Becky, CHEN, Yanqiu, ORD, Teri S., KAMENETSKY, Margarita, MIYAMOTO, Catarina, ZIPPIN, Jonathan H., KOPF, Gregory S., SUAREZ, Susan S., LEVIN, Lonny R., WILLIAMS, Carmen J., BUCK, Jochen and MOSS, Stuart B., 2005. The “Soluble” Adenylyl Cyclase in Sperm Mediates Multiple Signaling Events Required for Fertilization. *Developmental Cell*. August 2005. Vol. 9, no. 2, p. 249–259. DOI 10.1016/j.devcel.2005.06.007.

HONG, Sungeun, CHOI, Inchul, WOO, Jong-Min, OH, Jungsu, KIM, Taewan, CHOI, Eunyoung, KIM, Tae-Wan, JUNG, Yong-Keun, KIM, Do Han, SUN, Choong-Hyun, YI, Gwan-Su, EDDY, Edward M. and CHO, Chunghee, 2005. Identification and Integrative Analysis of 28 Novel Genes Specifically Expressed and Developmentally Regulated in Murine Spermatogenic Cells. *Journal of Biological Chemistry*. March 2005. Vol. 280, no. 9, p. 7685–7693. DOI 10.1074/jbc.M412444200.

HOQUE, Mohammed, LI, Feng-Qian, WEBER, William David, CHEN, Jun Jie, KIM, Eunice N., KUO, Pao-Lin, VISCONTI, Pablo E. and TAKEMARU, Ken-Ichi, 2024. The Cby3/ciBAR1 complex positions the annulus along the sperm flagellum during spermiogenesis. *Journal of Cell Biology*. 4 March 2024. Vol. 223, no. 3, p. e202307147. DOI 10.1083/jcb.202307147.

HOSSEINIFAR, Hani, SHAFIPOUR, Maryam, MODARRESI, Tahereh, AZAD, Mahnaz, SADIGHI GILANI, Mohammad Ali, SHAHHOSSEINI, Maryam and SABBAGHIAN, Marjan, 2014. Relationship between absence of annulus and asthenozoospermia in Iranian men. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. December 2014. Vol. 31, no. 12, p. 1681–1685. DOI 10.1007/s10815-014-0353-6.

HOUSTON, Brendan J, MERRINER, D Jo, STATHATOS, G Gemma, NGUYEN, Joseph H, O'CONNOR, Anne E, LOPES, Alexandra M, CONRAD, Donald F, BAKER, Mark, DUNLEAVY, Jessica Em and O'BRYAN, Moira K, 2024. Genetic mutation of *Cep76* results in male infertility due to abnormal sperm tail composition. *Life Science Alliance*. June 2024. Vol. 7, no. 6, p. e202302452. DOI 10.26508/lsa.202302452.

HU, Qicong, MILENKOVIC, Ljiljana, JIN, Hua, SCOTT, Matthew P., NACHURY, Maxence V., SPILIOTIS, Elias T. and NELSON, W. James, 2010. A Septin Diffusion Barrier at the Base of the Primary Cilium Maintains Ciliary Membrane Protein Distribution. *Science*. 23 July 2010. Vol. 329, no. 5990, p. 436–439. DOI 10.1126/science.1191054.

IHARA, Masafumi, KINOSHITA, Ayae, YAMADA, Shuichi, TANAKA, Hiromitsu, TANIGAKI, Ai, KITANO, Ayumi, GOTO, Motohito, OKUBO, Kazutoshi, NISHIYAMA, Hiroyuki, OGAWA, Osamu, TAKAHASHI, Chiaki, ITOHARA, Shigeyoshi, NISHIMUNE, Yoshitake, NODA, Makoto and KINOSHITA, Makoto, 2005. Cortical Organization by the Septin Cytoskeleton Is Essential for Structural and Mechanical Integrity of Mammalian Spermatozoa. *Developmental Cell*. March 2005. Vol. 8, no. 3, p. 343–352. DOI 10.1016/j.devcel.2004.12.005.

JANNATIFAR, Rahil, PIROOZMANESH, Hamid, JALALABADI, Fahimeh Naghi and MOMENI, Hamid Reza, 2023. The correlation of Septin4 gene expression with sperm quality, DNA damage, and oxidative stress level in infertile patients. *Anatomy & Cell Biology*. 31 December 2023. Vol. 56, no. 4, p. 518–525. DOI 10.5115/acb.22.222.

JENSEN, O. S., 1887. Untersuchungen über die Samenkörper der Säugethiere, Vögel und Amphibien. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*. December 1887. Vol. 30, no. 1, p. 379–425. DOI 10.1007/BF02955618.

KEPPNER, Anna, CORREIA, Miguel, SANTAMBROGIO, Sara, KOAY, Teng Wei, MARIC, Darko, OSTERHOF, Carina, WINTER, Denise V, CLERC, Angèle, STUMPE, Michael, CHALMEL, Frédéric, DEWILDE, Sylvia, ODERMATT, Alex, KRESSLER, Dieter, HANKELN, Thomas, WENGER, Roland H and HOOGEWIJS, David, 2022. Androglobin, a chimeric mammalian globin, is required for male fertility. *eLife*. 14 June 2022. Vol. 11, p. e72374. DOI 10.7554/eLife.72374.

*KHAWAR, Muhammad Babar, GAO, Hui and LI, Wei, 2019. Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 18 September 2019. Vol. 7, p. 195. DOI 10.3389/fcell.2019.00195.

KIM, Dong-Seok, HUBBARD, Sherri-Lynn, PERAUD, Aurelia, SALHIA, Bodour, SAKAI, Keiichi and RUTKA, James T., 2004. Analysis of Mammalian Septin Expression in Human Malignant Brain Tumors. *Neoplasia*. March 2004. Vol. 6, no. 2, p. 168–178. DOI 10.1593/neo.03310.

KINGSLEY SMITH, B. V. and LACY, D., 1959. Residual Bodies of Seminiferous Tubules of the Rat. *Nature*. July 1959. Vol. 184, no. 4682, p. 249–251. DOI 10.1038/184249a0.

KINOSHITA, M, KUMAR, S, MIZOGUCHI, A, IDE, C, KINOSHITA, A, HARAGUCHI, T, HIRAOKA, Y and NODA, M, 1997. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes & Development*. 15 June 1997. Vol. 11, no. 12, p. 1535–1547. DOI 10.1101/gad.11.12.1535.

KISSEL, Holger, GEORGESCU, Maria-Magdalena, LARISCH, Sarit, MANOVA, Katia, HUNNICUTT, Gary R. and STELLER, Hermann, 2005. The Sept4 Septin Locus Is Required for Sperm Terminal Differentiation in Mice. *Developmental Cell*. March 2005. Vol. 8, no. 3, p. 353–364. DOI 10.1016/j.devcel.2005.01.021.

KOTAJA, Noora, BHATTACHARYYA, Suvendra N., JASKIEWICZ, Lukasz, KIMMINS, Sarah, PARVINEN, Martti, FILIPOWICZ, Witold and SASSONE-CORSI, Paolo, 2006. The chromatoid body of male germ cells: Similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 21 February 2006. Vol. 103, no. 8, p. 2647–2652. DOI 10.1073/pnas.0509333103.

KUO, Yung-Che, LIN, Ying-Hung, CHEN, Hau-Inh, WANG, Ya-Yun, CHIOU, Yu-Wei, LIN, Hsi-Hui, PAN, Hsien-An, WU, Ching-Ming, SU, Shih-Ming, HSU, Chao-Chin and KUO, Pao-Lin, 2012. *SEPT12* mutations cause male infertility with defective sperm annulus. *Human Mutation*. April 2012. Vol. 33, no. 4, p. 710–719. DOI 10.1002/humu.22028.

KUO, Yung-Che, SHEN, Yi-Ru, CHEN, Hau-Inh, LIN, Ying-Hung, WANG, Ya-Yun, CHEN, Yet-Ran, WANG, Chia-Yih and KUO, Pao-Lin, 2015. *SEPT12* orchestrates the formation of mammalian sperm annulus by organizing *SEPT12-7-6-2/-4* core complexes. *Journal of Cell Science*. 1 January 2015. P. jcs.158998. DOI 10.1242/jcs.158998.

KWITNY, Susanna, KLAUS, Angela V. and HUNNICUTT, Gary R., 2010. The Annulus of the Mouse Sperm Tail Is Required to Establish a Membrane Diffusion Barrier That Is Engaged During the Late Steps of Spermiogenesis. *Biology of Reproduction*. 1 April 2010. Vol. 82, no. 4, p. 669–678. DOI 10.1095/biolreprod.109.079566.

LEE, Michael A. and STOREY, Bayard T., 1986. Bicarbonate is Essential for Fertilization of Mouse Eggs: Mouse Sperm Require it to Undergo the Acrosome Reaction¹. *Biology of Reproduction*. 1 March 1986. Vol. 34, no. 2, p. 349–356. DOI 10.1095/biolreprod34.2.349.

*LEHTI, Mari S and SIRONEN, Anu, 2017. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects[†]. *Biology of Reproduction*. 1 October 2017. Vol. 97, no. 4, p. 522–536. DOI 10.1093/biolre/iox096.

LHULLIER, P., RODE, B., ESCALIER, D., LORÈS, P., DIRAMI, T., BIENVENU, T., GACON, G., DULIOUST, E. and TOURÉ, A., 2009. Absence of annulus in human asthenozoospermia: Case Report[†]. *Human Reproduction*. June 2009. Vol. 24, no. 6, p. 1296–1303. DOI 10.1093/humrep/dep020.

LIN, Ying-Hung, LIN, Yung-Ming, WANG, Ya-Yun, YU, I-Shing, LIN, Yi-Wen, WANG, Yun-Han, WU, Ching-Ming, PAN, Hsien-An, CHAO, Shin-Chih, YEN, Pauline H., LIN, Shu-Wha and KUO, Pao-Lin, 2009. The Expression Level of Septin12 Is Critical for Spermiogenesis. *The American Journal of Pathology*. May 2009. Vol. 174, no. 5, p. 1857–1868. DOI 10.2353/ajpath.2009.080955.

LOHI, Hannes, KUJALA, Minna, MÄKELÄ, Siru, LEHTONEN, Eero, KESTILÄ, Marjo, SAARIALHO-KERE, Ulpu, MARKOVICH, Daniel and KERE, Juha, 2002. Functional Characterization of Three Novel Tissue-specific Anion Exchangers SLC26A7, -A8, and -A9. *Journal of Biological Chemistry*. April 2002. Vol. 277, no. 16, p. 14246–14254. DOI 10.1074/jbc.M111802200.

MÄKELÄ, Juho-Antti, CISNEROS-MONTALVO, Sheyla, LEHTINIEMI, Tiina, OLOTU, Opeyemi, LA, Hue M., TOPPARI, Jorma, HOBBS, Robin M., PARVINEN, Martti and KOTAJA, Noora, 2020. Transillumination-Assisted Dissection of Specific Stages of the Mouse Seminiferous Epithelial Cycle for Downstream Immunostaining Analyses. *Journal of Visualized Experiments*. 7 October 2020. No. 164, p. 61800. DOI 10.3791/61800.

MAZAHERI MOGHADDAM, Madiheh, MAZAHERI MOGHADDAM, Marziyeh, AMINI, Mohammad, BAHRAMZADEH, Behzad, BAGHBANZADEH, Amir, BIGLARI, Alireza and SAKHINIA, Ebrahim, 2021. Evaluation of *SEPT2* and *SEPT4* transcript contents in spermatozoa from men with asthenozoospermia and teratozoospermia. *Health Science Reports*. December 2021. Vol. 4, no. 4, p. e436. DOI 10.1002/hsr2.436.

MUCIACCIA, Barbara, BOITANI, Carla, BERLOCO, B. Pasquale, NUDO, Francesco, SPADETTA, Gustavo, STEFANINI, Mario, DE ROOIJ, Dirk G. and VICINI, Elena, 2013. Novel Stage Classification of Human Spermatogenesis Based on Acrosome Development¹. *Biology of Reproduction*. Online. 1 September 2013. Vol. 89, no. 3. DOI 10.1095/biolreprod.113.111682.

MOHANDESI KHOSROSROSHAHI, Elaheh, BASHI ZADEH FAKHAR, Haniyeh, AKBARI, Mohammad-Esmail and IZADI, Neda, 2025. Investigating the expression level of 9-methylated septin 9 in different grades of colorectal cancer—a meta-analysis study. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 26 February 2025. Vol. 26, no. 1, p. 38. DOI 10.1186/s43042-025-00666-y.

*NEILL, Jimmy D. and PLANT, Tony M. (eds.), 2006. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier/AP. ISBN 978-0-08-053527-2.

QIN, Hongmin, DIENER, Dennis R., GEIMER, Stefan, COLE, Douglas G. and ROSENBAUM, Joel L., 2004. Intraflagellar transport (IFT) cargo. *The Journal of Cell Biology*. 19 January 2004. Vol. 164, no. 2, p. 255–266. DOI 10.1083/jcb.200308132.

QIN, Jiao, WANG, Jinyu, CHEN, Jianhai, XU, Jinyan, LIU, Shanling, DENG, Dong and LI, Fuping, 2024. Homozygous variant in DRC3 (LRRC48) gene causes asthenozoospermia and male infertility. *Journal of Human Genetics*. August 2024. Vol. 69, no. 8, p. 401–409. DOI 10.1038/s10038-024-01253-6.

RAMLAU-HANSEN, C.H., THULSTRUP, A.M., AGGERHOLM, A.S., JENSEN, M.S., TOFT, G. and BONDE, J.P., 2007. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Human Reproduction*. January 2007. Vol. 22, no. 1, p. 188–196. DOI 10.1093/humrep/del364.

RODE, Baptiste, DIRAMI, Thassadite, BAKOUH, Naziha, RIZK-RABIN, Marthe, NOREZ, Caroline, LHUILLIER, Pierre, LORÈS, Patrick, JOLLIVET, Mathilde, MELIN, Patricia, ZVETKOVA, Ilona, BIENVENU, Thierry, BECQ, Frédéric, PLANELLES, Gabrielle, EDELMAN, Aleksander, GACON, Gérard and TOURÉ, Aminata, 2012. The testis anion transporter TAT1 (SLC26A8) physically and functionally interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel: a potential role during sperm capacitation. *Human Molecular Genetics*. 15 March 2012. Vol. 21, no. 6, p. 1287–1298. DOI 10.1093/hmg/ddr558.

SCHMIDT, Kerstin N., KUHNS, Stefanie, NEUNER, Annett, HUB, Birgit, ZENTGRAF, Hanswalter and PEREIRA, Gislene, 2012. Cep164 mediates vesicular docking to the mother centriole during early steps of ciliogenesis. *Journal of Cell Biology*. 24 December 2012. Vol. 199, no. 7, p. 1083–1101. DOI 10.1083/jcb.201202126.

SELLIN, Mikael E., SANDBLAD, Linda, STENMARK, Sonja and GULLBERG, Martin, 2011. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. KELLOGG, Douglas R. (ed.), *Molecular Biology of the Cell*. September 2011. Vol. 22, no. 17, p. 3152–3164. DOI 10.1091/mbc.e11-03-0253.

SHANG, Peng, BAARENDS, Willy M., HOOGERBRUGGE, Jos, OOMS, Marja P., VAN CAPPELLEN, Wiggert A., DE JONG, Antonius A. W., DOHLE, Gert R., VAN EENENNAAM, Hans, GOSSEN, Jan A. and GROOTEGOED, J. Anton, 2010. Functional transformation of the chromatoid body in mouse spermatids requires testis-specific serine/threonine kinases. *Journal of Cell Science*. 1 February 2010. Vol. 123, no. 3, p. 331–339. DOI 10.1242/jcs.059949.

SHEN, Yi-Ru, WANG, Han-Yu, KUO, Yung-Che, SHIH, Shih-Chuan, HSU, Chun-Hua, CHEN, Yet-Ran, WU, Shang-Rung, WANG, Chia-Yih and KUO, Pao-Lin, 2017. SEPT12 phosphorylation results in loss of the septin ring/sperm annulus, defective sperm motility and poor male fertility. VISCONTI, Pablo E. (ed.), *PLOS Genetics*. 27 March 2017. Vol. 13, no. 3, p. e1006631. DOI 10.1371/journal.pgen.1006631.

SHEN, Yi-Ru, WANG, Han-Yu, TSAI, Yung-Chieh, KUO, Yung-Che, WU, Shang-Rung, WANG, Chia-Yih and KUO, Pao-Lin, 2020. The SEPT12 complex is required for the establishment of a functional sperm head–tail junction. *Molecular Human Reproduction*. 1 June 2020. Vol. 26, no. 6, p. 402–412. DOI 10.1093/molehr/gaaa031.

*SKINNER, Michael K., 2018. *Encyclopedia of Reproduction*. 2nd ed. San Diego: Elsevier Science & Technology. ISBN 978-0-12-815145-7.

SOROOR, Forooz, KIM, Moshe S., PALANDER, Oliva, BALACHANDRAN, Yadu, COLLINS, Richard F., BENLEKBIR, Samir, RUBINSTEIN, John L. and TRIMBLE, William S., 2021. Revised subunit order of mammalian septin complexes explains their in vitro polymerization properties. ROLL-MECAK, Antonina (ed.), *Molecular Biology of the Cell*. 1 February 2021. Vol. 32, no. 3, p. 289–300. DOI 10.1091/mbc.E20-06-0398.

STEELES, Jonathan D., ESTEY, Mathew P., FROESE, Carol D., REYNAUD, Denis, PACE-ASCIAK, Cecil and TRIMBLE, William S., 2007. Sept12 is a component of the mammalian sperm tail annulus. *Cell Motility*. October 2007. Vol. 64, no. 10, p. 794–807. DOI 10.1002/cm.20224.

SUGINO, Yoshio, ICHIOKA, Kentaro, SODA, Takeshi, IHARA, Masafumi, KINOSHITA, Makoto, OGAWA, Osamu and NISHIYAMA, Hiroyuki, 2008. Septins as Diagnostic Markers for a Subset of Human Asthenozoospermia. *Journal of Urology*. December 2008. Vol. 180, no. 6, p. 2706–2709. DOI 10.1016/j.juro.2008.08.005.

*SUN, Xiao and YANG, Wan-Xi, 2010. Mitochondria: transportation, distribution and function during spermiogenesis. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2010. Vol. 01, no. 02, p. 97–109. DOI 10.4236/abb.2010.12014.

TANOS, Barbara E., YANG, Hui-Ju, SONI, Rajesh, WANG, Won-Jing, MACALUSO, Frank P., ASARA, John M. and TSOU, Meng-Fu Bryan, 2013. Centriole distal appendages promote membrane docking, leading to cilia initiation. *Genes & Development*. 15 January 2013. Vol. 27, no. 2, p. 163–168. DOI 10.1101/gad.207043.112.

TOURÉ, Aminata, LHUILLIER, Pierre, GOSSEN, Jan A., KUIL, Cor W., LHÔTE, David, JÉGOU, Bernard, ESCALIER, Denise and GACON, Gérard, 2007. The Testis Anion Transporter 1 (Slc26a8) is required for sperm terminal differentiation and male fertility in the mouse. *Human Molecular Genetics*. 1 August 2007. Vol. 16, no. 15, p. 1783–1793. DOI 10.1093/hmg/ddm117.

TOURÉ, Aminata, MORIN, Laurence, PINEAU, Charles, BECQ, Frédéric, DORSEUIL, Olivier and GACON, Gérard, 2001. Tat1, a Novel Sulfate Transporter Specifically Expressed in Human Male Germ Cells and Potentially Linked to RhoGTPase Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. January 2001. Vol. 276, no. 23, p. 20309–20315. DOI 10.1074/jbc.M011740200.

*VALADARES, Napoleão Fonseca, D' MUNIZ PEREIRA, Humberto, ULIAN ARAUJO, Ana Paula and GARRATT, Richard Charles, 2017. Septin structure and filament assembly. *Biophysical Reviews*. October 2017. Vol. 9, no. 5, p. 481–500. DOI 10.1007/s12551-017-0320-4.

VICKRAM, A. S., ANBARASU, K., JEYANTHI, Palanivelu, GULOTHUNGAN, G., NANMARAN, R., THANIGAIVEL, S., SRIDHARAN, T. B. and ROHINI, Karunakaran, 2021. Identification and Structure Prediction of Human Septin-4 as a Biomarker for Diagnosis of Asthenozoospermic Infertile Patients—Critical Finding Toward Personalized Medicine. *Frontiers in Medicine*. 3 December 2021. Vol. 8, p. 723019. DOI 10.3389/fmed.2021.723019.

VOROBJEV, I A and YUS, Chentsov, 1982. Centrioles in the cell cycle. I. Epithelial cells. *The Journal of cell biology*. 1 June 1982. Vol. 93, no. 3, p. 938–949. DOI 10.1083/jcb.93.3.938.

WANG, Guanxiong, ZHU, Xiaoyu, GAO, Yang, LV, Mingrong, LI, Kuokuo, TANG, Dongdong, WU, Huan, XU, Chuan, GENG, Hao, SHEN, Qunshan, ZHA, Xiaomin, DUAN, Zongliu, ZHANG, Jingjing, HUA, Rong, TAO, Fangbiao, ZHOU, Ping, WEI, Zhaolian, CAO, Yunxia, GUO, Rui and HE, Xiaojin, 2022. Biallelic loss-of-function mutations in *SEPTIN4* (*C17ORF47*), encoding a conserved annulus protein, cause thin midpiece spermatozoa and male infertility in humans. *Human Mutation*. December 2022. Vol. 43, no. 12, p. 2079–2090. DOI 10.1002/humu.24475.

WANG, Han-Yu, SHEN, Yi-Ru, TSAI, Yung-Chieh, WU, Shang-Rung, WANG, Chia-Yih and KUO, Pao-Lin, 2023. Proper phosphorylation of septin 12 regulates septin 4 and soluble adenylyl cyclase expression to induce sperm capacitation. *Journal of Cellular Physiology*. March 2023. Vol. 238, no. 3, p. 597–609. DOI 10.1002/jcp.30951.

WANG, Ziqi, FANG, Kailun, WAN, Yanling, YIN, Yingying, LI, Mengjing, XU, Ke, LI, Tongtong, CAO, Yongzhi, LV, Yue, LU, Gang, LIU, Hongbin and HUANG, Tao, 2023. TTC6-Mediated Stabilization of the Flagellum Annulus Ensures the Rapid and Directed Motion of Sperm. *Cells*. 18 August 2023. Vol. 12, no. 16, p. 2091. DOI 10.3390/cells12162091.

WERTHEIMER, Eva, KRAPF, Dario, DE LA VEGA-BELTRAN, José L., SÁNCHEZ-CÁRDENAS, Claudia, NAVARRETE, Felipe, HADDAD, Douglas, ESCOFFIER, Jessica, SALICIONI, Ana M., LEVIN, Lonny R., BUCK, Jochen, MAGER, Jesse, DARSZON, Alberto and VISCONTI, Pablo E., 2013. Compartmentalization of Distinct cAMP Signaling Pathways in Mammalian Sperm. *Journal of Biological Chemistry*. December 2013. Vol. 288, no. 49, p. 35307–35320. DOI 10.1074/jbc.M113.489476.

*WHITFIELD, Marjorie, 2024. The annulus: composition, role and importance in sperm flagellum biogenesis and male fertility. *Basic and Clinical Andrology*. 16 December 2024. Vol. 34, no. 1, p. 25. DOI 10.1186/s12610-024-00241-2.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Infertility Prevalence Estimates, 1990-2021*. 1st ed. Geneva: 2023. ISBN 978-92-4-006831-5.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. 2010. ISBN 978-92-4-154778-9

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. 2021. ISBN 978-92-4-003078-7

XU, Wen Ming, SHI, Qi Xian, CHEN, Wen Ying, ZHOU, Chen Xi, NI, Ya, ROWLANDS, Dewi Kenneth, YI LIU, Guo, ZHU, Hu, MA, Ze Gang, WANG, Xiao Fei, CHEN, Zhang Hui, ZHOU, Si Chang, DONG, Hong Shan, ZHANG, Xiao Hu, CHUNG, Yiu Wa, YUAN, Yu Ying, YANG, Wan Xi and CHAN, Hsiao Chang, 2007. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 5 June 2007. Vol. 104, no. 23, p. 9816–9821. DOI 10.1073/pnas.0609253104.

YANAGIMACHI, R., 1972. PENETRATION OF GUINEA-PIG SPERMATOZOA INTO HAMSTER EGGS IN VITRO. *Reproduction*. 1 March 1972. Vol. 28, no. 3, p. 477–480. DOI 10.1530/jrf.0.0280477.

YASUZUMI, Gonpachiro, SHIRAIWA, Shunichiro and YAMAMOTO, Hiroshi, 1972. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy: XXVII. Development of the neck region and flagellum of the cat spermatozoon. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. 1972. Vol. 125, no. 4, p. 497–505. DOI 10.1007/BF00306656.

ZABEO, Davide, CROFT, Jacob T. and HÖÖG, Johanna L., 2019. Axonemal doublet microtubules can split into two complete singlets in human sperm flagellum tips. *FEBS Letters*. May 2019. Vol. 593, no. 9, p. 892–902. DOI 10.1002/1873-3468.13379.

ZEGERS-HOCHSCHILD, Fernando, ADAMSON, G. David, DYER, Silke, RACOWSKY, Catherine, DE MOUZON, Jacques, SOKOL, Rebecca, RIENZI, Laura, SUNDE, Arne, SCHMIDT, Lone, COOKE, Ian D., SIMPSON, Joe Leigh and VAN DER POEL, Sheryl, 2017. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*. September 2017. Vol. 108, no. 3, p. 393–406. DOI 10.1016/j.fertnstert.2017.06.005.

ZHANG, Xiaoning, ZHOU, Wenwen, ZHANG, Peng, GAO, Fengxin, ZHAO, Xiuling, SHUM, Winnie Waichi and ZENG, Xuhui, 2021. Cabs1 Maintains Structural Integrity of Mouse Sperm Flagella during Epididymal Transit of Sperm. *International Journal of Molecular Sciences*. 11 January 2021. Vol. 22, no. 2, p. 652. DOI 10.3390/ijms22020652.

ZHAO, Xiuling, NIE, Junyu, ZHOU, Wenwen, ZENG, Xuhui and SUN, Xiaoli, 2024. The metabolomics changes in epididymal lumen fluid of CABS1 deficient male mice potentially contribute to sperm deformity. *Frontiers in Endocrinology*. 21 August 2024. Vol. 15, p. 1432612. DOI 10.3389/fendo.2024.1432612.

ZI, Zhenzhen, ZHANG, Zhuzhen, LI, Qingrun, AN, Weiwei, ZENG, Liyong, GAO, Dayuan, YANG, Ying, ZHU, Xueliang, ZENG, Rong, SHUM, Winnie Waichi and WU, Jiarui, 2015. CCNYL1, but Not CCNY, Cooperates with CDK16 to Regulate Spermatogenesis in Mouse. YAN, Wei (ed.), *PLOS Genetics*. 25 August 2015. Vol. 11, no. 8, p. e1005485. DOI 10.1371/journal.pgen.1005485.