

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE,  
KATEDRA BUŇEČNÉ BIOLOGIE ODDĚLENÍ VÝVOJOVÉ BIOLOGIE**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**ROLE „HEAT SHOCK“ PROTEINŮ VE SPERMATOGENEZI SAVCŮ  
(Role of heat shock proteins in mammalian spermatogenesis)**

Vypracovala: Eva Žatecká

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc.

Praha 2008

Ráda bych poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Janě Pěkníkové, CSc. za odborné vedení a rovněž svým kolegům z laboratoře za cenné připomínky a rady.

## OBSAH

Abstract.....	4
Abstrakt.....	5
1. Úvod.....	6
2. Spermatogeneze.....	6
3. Genová exprese v samčích zárodečných buňkách.....	9
3.1. Transkripty specifické pro zárodečné buňky.....	10
4. Heat shock proteiny.....	12
4.1. Heat shock proteiny 70.....	14
4.2. Heat shock protein 60.....	21
4.3. Heat shock protein 41.....	24
5. Závěr.....	25
6. Seznam zkratk.....	27
7. Literatura.....	28

## **Abstract**

Heat shock proteins (Hsps) are molecular chaperones that assist other proteins in their folding, transport and assembly into complexes. Most of these proteins are either constitutively expressed or their expression is induced by heat shock and other stresses. Heat shock proteins produced in male germ cell are developmentally regulated. Hsps are highly conserved, present in organisms ranging from bacteria to man. The presence or absence of Hsps influences almost every aspects of reproduction. In this thesis, the function of Hsp70, Hsp60 and Hsp41 is described. There are two members of Hsp70 family expressed in male germ cells – Hsp70-2 and Hsc70t. Hsc70t is constitutively expressed after meiosis in mouse spermatogenesis and play role in sperm energy production. The Hsp 70 protein is synthesized during the meiotic phase of spermatogenesis and is abundant in pachytene spermatocytes. Male mice lacking Hsp70-2 are infertile and spermatogenic cell development is arrested in prophase of meiosis I at the G<sub>2</sub> – M phase transition and late pachytene spermatocytes were eliminated by apoptosis, resulting in absence of spermatids. Hsp60 is localized in spermatogonia, primary spermatocytes, Sertoli and Leydig cells. Main function of Hsp60 is to fold and transport mitochondrial proteins. Lack of Hsp60 results in male infertility. Hsp41, also known as Apg1, belongs to the Hsp110 family and is inducible by 32°C to 39°C heat shock. Apg1 and is highly expressed in spermatogenic cells, from pachytene spermatocytes to postmeiotic spermatids. Mice deficient in Apg1 have problems with fertility because of reduced number of mature sperm and problems with their motility.

**Key words:** Heat shock proteins 70, Heat shock protein 60, Heat shock protein 41,  
Spermatogenesis, infertility

## Abstrakt

Proteiny tepelného šoku – Heat shock proteiny (Hsps) jsou molekulové chaperony, které pomáhají ostatním proteinům dosáhnout správné konformace, transportovat je a vytvořit proteinové komplexy. Většina těchto proteinů je buď exprimovaná konstitutivně nebo indukována tepelným šokem nebo jinými stresovými faktory. Hsps proteiny jsou vysoce konzervované, přítomné od bakterií až po lidi. Vyskytují se ve všech tkáních včetně testes, kde hrají důležitou roli ve spermatogenezi a jejich absence ovlivňuje téměř každý aspekt reprodukce. V této práci je popsána funkce proteinů Hsp70, Hsp60 and Hsp41. Dva členové Hsp70 rodiny jsou exprimovány v mužských zárodečných buňkách - Hsp70-2 a Hsc70t. Hsc70t gen je exprimován během post-meiotické fáze spermatogeneze a hraje roli v produkci energie. Hsp70-2 je syntetizován během meiotické fáze spermatogeneze a je hojný v pachyténích spermatocytech. Myší samci s nedostatkem Hsp70-2 jsou neplodní a vývoj spermatogenních buněk je zastaven v profázi I. meiotického dělení při přechodu z G<sub>2</sub> do M fáze. Pozdní pachyténní spermatocyty jsou eliminovány procesem apoptózy, důsledkem čehož je nedostatek spermií a neplodnost jedince. Hsp60 je lokalizován ve spermatogoniích, primárních spermatocytech, Sertoliho i Leydigových buňkách. Hlavní funkcí Hsp60 je transport a správné sbalení mitochondriálních proteinů. Nedostatek Hsp60 zapříčiňuje neplodnost. Hsp 41, znám také jako Apg1, patří do rodiny Hsp110 a je indukován změnou teploty z 32°C na 39°C. Apg1 je exprimován ve spermatogenních buňkách od pachyténích spermatocytů po postmeiotické spermatidy. Myší samci s nedostatkem Apg1 jsou neplodní, je to zapříčiněno redukováným počtem zralých spermií a problémy s jejich motilitou.

Klíčová slova: Heat shock proteiny 70, Heat shock protein 60, Heat shock protein 41, spermatogeneze, neplodnost

## 1.Úvod

Spermatogeneze je složitý vývojový proces, během kterého dochází k dramatickým změnám zárodečných buněk, kdy z kulatých spermatogonií vznikají haploidní spermie charakteristického tvaru. Spermatogeneze je regulována na úrovni genové exprese a během ní je exprimováno mnoho genů, jejichž transkripty nenalezneme v žádných jiných než zárodečných buňkách. Zárodečné buňky jako jediné v savčím organismu podstupují redukční meiotické dělení a nalezneme v nich specifické struktury, jako je synaptonemální komplex nebo XY tělísko.

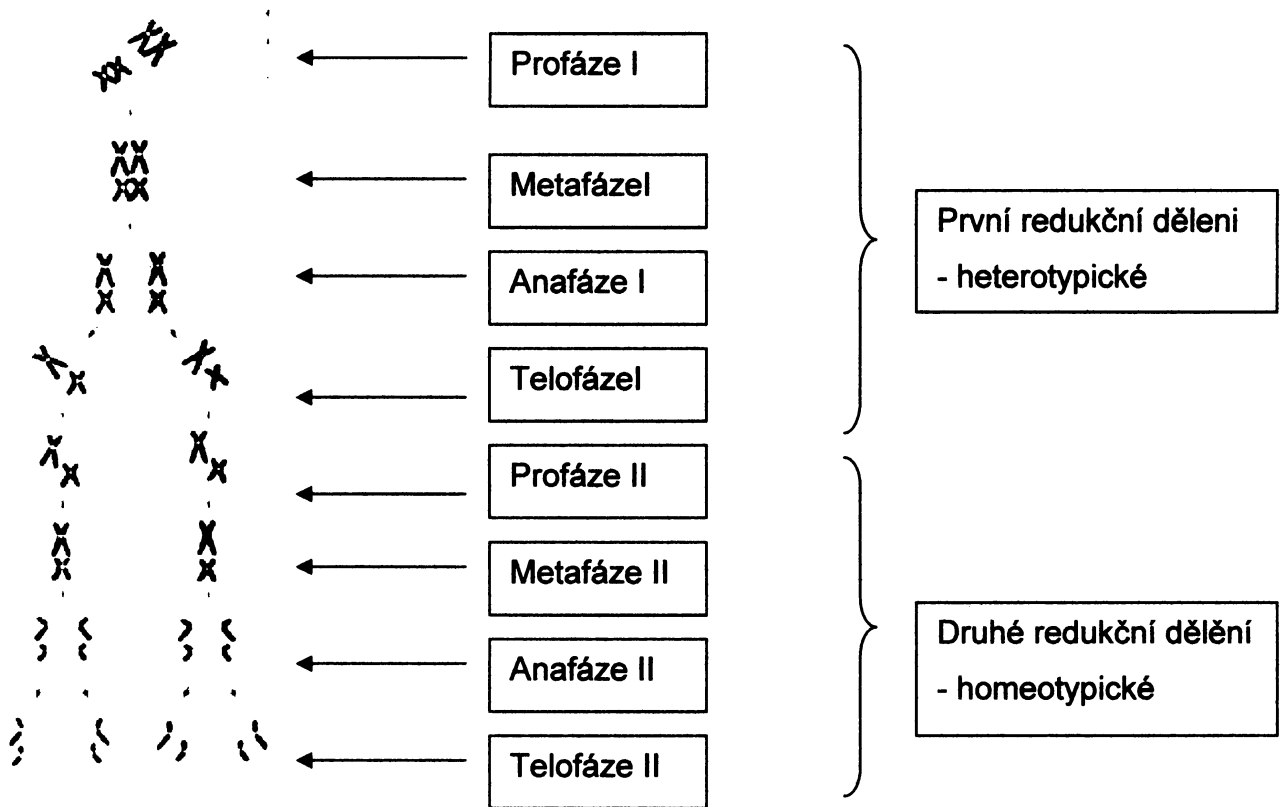
V procesu spermatogeneze hrají, kromě jiných faktorů, velmi důležitou roli proteiny tepelného šoku - heat shock proteiny (Hsps). Hsps se vyskytují ve všech tkáních a jsou to vysoce konzervované proteiny. Mohou být buď konstitutivně exprimovány nebo indukovatelné teplem či dalšími stresovými faktory. Hsps fungují jako molekulární chaperony, které pomáhají proteinům dosáhnout správné konformace. Také pomáhají buňkám přežít stresové situace tím, že chrání jejich proteiny, váží se na částečně denaturované proteiny, kterým pomáhají znovu dosáhnout správné konformace.

Heat shock proteiny se vyskytují i v samčích zárodečných buňkách, kde jsou většinou vývojově regulovány. Plní zde specifické funkce a jejich nedostatek zapříčiňuje přerušení spermatogeneze a tím i neplodnost. Mezi heat shock proteiny zárodečných buněk patří proteiny Hsp 70 rodiny – Hsp70-2 a Hsc70t. Dále Hsp60 a protein Hsp110 rodiny – Apg1. Tato práce je zaměřena na zmíněné proteiny a cílem práce je shrnout dosavadní poznatky týkající se daných proteinů a jejich funkci v procesu spermatogeneze.

## 2. Spermatogeneze

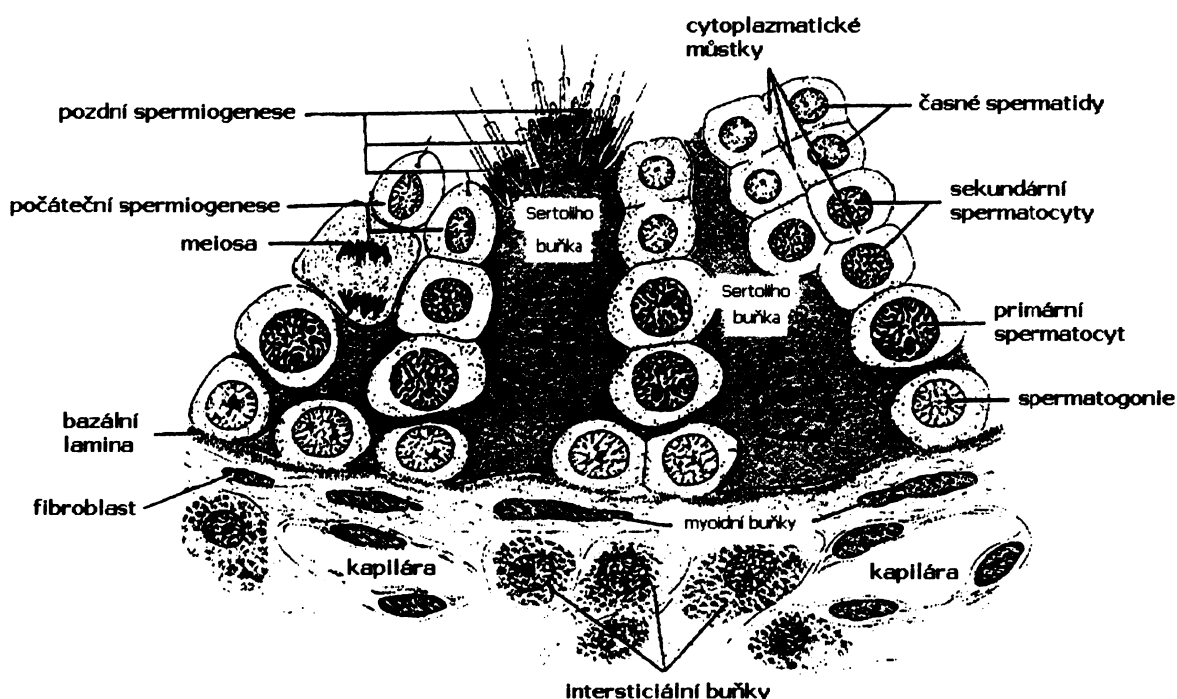
Spermatogeneze je vývojový proces, během kterého se z primordiálních zárodečných buněk vyvíjejí spermie jako vysoce specializované buňky, které mají zásadní úlohu v oplození vajíčka. Spermatogeneze probíhá v semenotvorných kanálcích testes, které obsahují epiteliální buňky, Sertoliho buňky a zárodečné buňky (obr 2). Sertoliho buňky pomáhají vyživovat zárodečné buňky a pomáhají koordinovat důležité děje spermatogeneze (Eddy, 2002). Sertoliho buňky také rozdělují semenotvorné váčky na dvě části – laminární a bazální. Spermatogeneze zahrnuje sérii mitotických dělení spermatogoniálních kmenových buněk, dvě meiotická dělení spermatocytů, rozsáhlé morfologické změny a uvolnění buněk do lumen semenotvorných váčků (postmeiotická fáze). Mitotická fáze probíhá v bazální části testes, zatímco meiotická a postmeiotická fáze v luminální části.

Primordiální zárodečné buňky se v gonádách rozdělí na spermatogonie, které mají kulovitý tvar a jsou uloženy na okrajích semenných kanálků. Spermatogonie se dělí mitoticky, vznikají z nich další spermatogonie, aby byl zachován jejich početní stav, nebo z nich vznikají primární spermatocyty. Primární spermatocyty jsou diploidní, ale dále se dělí meioticky. Každý primární spermatocyt vstupuje do prvního meiotického dělení a dává vznik páru sekundárních spermatocytů, které vstupují do druhého meiotického dělení a vznikají haploidní buňky nazývané spermatidy. Při meióze buňky prodělávají dvě sady dělení a dceřiné buňky obsahují pouze polovinu původního počtu chromozómů. Meióza neboli redukční dělení má několik fází, pro které jsou charakteristické určité děje (obr 1). Ze vzniklých spermatid spermiogenezi vznikají spermie, které jsou uvolňovány a putují do nadvarlete. Spermiogeneze zahrnuje spoustu dějů jako je zahušťování jádra, tvorba bičíku, odvrhování cytoplasmu a tvorba akrosomu.



**Obr. 1:** Fáze meiózy. Profáze se dále dělí na leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakinezi. V leptotene dochází k optické diferenciaci chromozomů, začíná kondenzace. Zygotene je charakteristické párováním homologních chromozomů a tvorbou bivalentů. Dochází také k tvorbě synaptonemálního komplexu a ke genetickým rekombinacím. Během pachytene dochází k další spiralizaci chromozomů a vznikají zřetelné dvouchromatidové struktury. V diplotene dochází k oddalování homologních chromozomů a v diakinezi se tvoří dělicí vřeténko. V metafázi I se vlákna dělicího vřeténka přichycují k chromozomům. Dále nadchází anafáze I, kdy dochází k oddělení homologních chromozomů z bivalentů a jejich transport k opačným buněčným pólům. Během telofáze I vznikají dvě haploidní dceřiné buňky s dvouvláknovými chromozomy. Tyto dceřiné buňky podstupují druhé redukční dělení (homeotypické), které má fáze shodné s prvním redukčním dělením. Během profáze II dochází k přípravě na druhé dělení. V metafázi II se chromozomy samostatně seřazují na střed buňky. Během anafáze II se oddělují centromery a sesterské chromatidy se rozcházejí k buněčným pólům. Konečným produktem telofáze II jsou 4 haploidní buňky s jednovláknovými chromozomy.





**Obr. 2:** Schéma stavby části semenotvorného kanálku a intersticiální tkáně (Junquiera et al., 1992)

### 3. Genová exprese v samčích zárodečných buňkách

Vývoj samčích spermatogenních buněk probíhá ve třech fázích - mitotické, meiotické a postmeiotické. Během tohoto procesu jsou produkovány transkripty specifické pouze pro zárodečné buňky. Jejich exprese je vývojově regulována a vyskytují se jen v dané vývojové fázi. Jsou tři hlavní způsoby, jak tyto transkripty vznikají. První je přepisem genů samčích zárodečných buněk homologních s geny somatických buněk. Druhý způsob je přepisem unikátních genů, které nejsou významně podobné žádnému jinému genu v genomu. Třetí způsob je produkce alternativních transkriptů, které vznikly z genů vyskytujících se v somatických buňkách, ale byly upraveny alternativním sestřihem (Eddy, 2002).

Složitý proces spermatogeneze vyžaduje přesný a dobře koordinovaný program, který reguluje měnící se genovou expresi. Regulaci spermatogeneze lze

rozdělit na tři úrovně – vnitřní, vnější a interaktivní regulace. Vnitřní regulace je představována genetickým programem, který je zodpovědný za sled událostí vedoucích k diferenciaci zárodečných buněk během spermatogeneze. Genetický program určuje, které geny jsou použity a kdy jsou exprimovány (Eddy, 2002).

Samčích zárodečné buňky se vyvíjejí v překrývajících se vlnách a jejich vývoj je synchronizovaný. Proto daná buňka potřebuje komunikovat se sousedními buňkami, přijímat od nich a poskytovat jim informace. Není známo, jak přesně probíhá tato interaktivní regulace, ale bylo prokázáno, že klíčovou roli v ní mají Sertoliho buňky.

Vnější regulace je založena hlavně na působení testosteronu a folikuly stimulujícím hormonu (FSH). Tyto hormony přímo ovlivňují genovou expresi somatických buněk testes a ovlivňují tak prostředí, ve kterém probíhá interaktivní regulace. Nepřímo tak ovlivňují genovou expresi v zárodečných buňkách (Eddy, 2002).

Zásadní role vnitřního programu zárodečných buněk byla ukázána na pokusu, kdy byly krysí spermatogonie transplantovány do semenotvorných váčků myších testes (Clouthier et al., 1996). Krysí spermatogonie se vyvinuly v normálně vypadající krysí spermie. Vyvíjely se dokonce stejnou rychlostí jako v krysích testes, i když u myší je normálně vývoj rychlejší než u krys.

### **3.1. Transkripty specifické pro zárodečné buňky**

Geny exprimované pouze v zárodečných buňkách jsou nejčastěji homology genů exprimovaných v somatických buňkách. Příkladem může být glycerinaldehyd- 3 – fosfát dehydrogenáza (Gapd), vysoce konzervovaný gen kódující enzym nezbytný při glykolýze. V zárodečných buňkách se nachází specifický Gapd – Gapds. Tento gen je inaktivní během meiotické fáze a je aktivován v rané postmeiotické fázi (Welch et al., 1992). Aminokyselinová sekvence Gapds je z více než 70% identická se sekvencí Gapd. Gapds má velkou prolin bohatou doménu na N – konci, která není u Gapd. Tato doména slouží k ukotvení Gapds na fibrilárních vláknech. Rozdílná molekulární struktura Gapds a Gapd umožňuje Gapds přepínat se z inaktivního stavu na stav aktivní (Welch et al., 2002)

Dalším příkladem mohou být dva členové rodiny Hsp70. Hsp 70 proteiny jsou chaperony, které pomáhají ostatním proteinům správně se sbalit, případně vytvořit komplex. Hsp70 proteiny jsou exprimovány ve všech tkáních a jsou exprimovány konstitutivně nebo po tepelném šoku. Ovšem dva členové Hsp70 rodiny jsou exprimovány specificky ve spermatogenních buňkách a jejich exprese je regulována vývojově – jsou to Hsp70-2 a Hsc70T. Hsp70-2 je exprimován během meiotické fáze spermatogeneze a nalezneme ho hlavně u pachytémních spermatocytů. Hsc70t gen je exprimován během post-meiotické fáze spermatogeneze a byl nalezen hlavně v cytoplazmě spermatid (Eddy, 1999).

Některé geny exprimované v mužských zárodečných buňkách nemají homology v ostatních buňkách. Většina z těchto genů je exprimována během postmeiotické fáze, kdy jsou produkovány specializované strukturální komponenty spermií. Jedním z těchto genů je gen pro protamin. Protaminy jsou produkty genů exprimovaných pouze v zárodečných buňkách. Jsou to malé bazické proteiny, které sbalí jádro na objem zhruba jedné dvacetiny objemu somatického jádra. V postmeiotické fázi dochází mimo jiné i k remodelaci jádra. Remodelace jádra je spojená s přesouváním histonů z nukleární DNA a jejich nahrazením protaminy. Vazbou protaminů vznikne transkripčně inaktivní jádro charakteristické pro spermie (Nayernia et al., 1996).

Během meiotické fáze spermatogeneze se tvoří unikátní struktury, které se vyskytují jen zárodečných buňkách. Jsou to synaptonemální komplex a XY tělísko. Synaptonemální komplex se vyskytuje ve spermatocytech i v oocytech. Jeho funkcí je spojit homologní chromosomy a vytvořit komplex, ve kterém může proběhnout genetická rekombinace a crossing over (Dix et al., 1997). XY tělísko je specializovaná jaderná doména, kde dochází k vazbě X a Y chromozomů. Je zde omezena transkripce i rekombinace. XY tělísko nalezneme v jádrech spermatocytů (Handel, 2004).

Proteiny specifické pro samčí zárodečné buňky mohou být také syntetizovány z alternativních transkriptů. Alternativní transkripty vznikají užitím promotorů a transkripčních faktorů, které zahájí transkripci na jiném místě než je běžné nebo alternativním sestřihem. Mohou také vznikat alternativní polyadenylací. Příkladem

alternativního transkriptu může být hexokináza (Hk) – první enzym glykolytické cesty. Jsou známy tři transkripty specifické pro zárodečné buňky – Hk1-sa, Hk1-sb, Hk1-sc. Hk1-s mRNA pochází ze stejného genu jako mRNA HK1 somatických buněk. Hk1 a Hk1-s jsou si velmi podobné na kódující částí, ale liší se na 5' konci a HK1-s nemají porin vazající doménu. Jednotlivé Hk1-s se mezi sebou také liší svými 5' konci a vyskytují se v různých fázích spermatogeneze. Hk1-s transkript je přítomen během meiózy, zatímco Hk1-sb je přítomen v postmeiotické fázi. Svou unikátní sekvenci získávají Hk1-s použitím alternativních promotorů a vývojově regulovaným alternativním sestřihem (Mori et al., 1998).

Expres mnoha genů v zárodečných buňkách je vývojově regulovaná. Tato regulace je možná díky včlenění promotorů, které řídí expresi pouze v zárodečných buňkách. Geny, které jsou exprimovány i v somatických buňkách podstupují modifikace, aby mohli být vývojově regulované v zárodečných buňkách. Dochází buď k včlenění promotoru, nebo k použití unikátních transkripčních faktorů (Eddy, 2002). Regulace exprese v zárodečných buňkách nebyla studována do hloubky a bylo identifikováno jen několik transkripčních faktorů. Jedním z nich je Erg4 transkripční faktor. V případě mutace genu pro Erg4 byl přerušen vývoj zárodečných buněk (Tourtellotte et al., 1999).

#### **4. Heat shock proteiny**

Heat shock proteiny byly objeveny roku 1974 Ritossou, když v experimentu náhodou došlo ke zvýšení inkubační teploty *Drosophily*. V jejích chromosomech byl objeven gen se zvýšenou transkripcí neznámého proteinu. Tento jev byl později popsán jako „heat shock response“ a objevené proteiny byly nazvány „Heat shock proteins“ (Hsps) (Schleisinger, 1990).

Heat shock proteiny jsou klasifikované do rodin podle své molekulové hmotnosti. Označení Hsp se používá pro teplem indukované proteiny, zatímco Hsc je používáno pro konstitutivně exprimované proteiny, které jsou vysoce homologní s Hsp avšak nikoliv teplem indukované, jedná se o tzv. housekeeping genes (Neuer et al., 1999).

Heat shock proteiny patří mezi stresové proteiny, značnou část z nich představují proteiny indukovatelné teplem a dalšími stresovými faktory a část jsou konstitutivně exprimované proteiny. Heat shock proteiny fungují jako molekulární chaperony, které pomáhají jiným intracelulárním proteinům dosáhnout správné konformace, případně pomáhají i při skládání oligomerních struktur. Navíc mají rozhodující úlohu v prevenci proti nesprávné asociaci a sbalení proteinů, při intracelulárním transportu, udržování proteinů v inaktivní formě a v denaturaci proteinů. Hsp proteiny mají ATP-azovou aktivitu, štěpení ATP na ADP napomáhá chaperonům periodicky se vázat a uvolňovat k hydrofobním oblastem vznikajícího proteinu, a tím je umožněno správné sbalení nebo správné utvoření proteinového komplexu (Schleisinger, 1990).

Jejich další funkcí je pomáhat buňkám vypořádat se se stresem, jako je zvýšení teploty či jiné nepříznivé vlivy prostředí. Jejich pomoc spočívá hlavně v ochraně proteinů před denaturací a případnou agregací (Eddy, 1999).

Heat shock proteiny (Hsps) jsou vysoce konzervované a jsou přítomné v organismech od bakterií až k lidem, umožňují buňkám přežít nepříznivé vlivy prostředí hlavně tím, že chrání proteiny před denaturací. Všechny studované organismy odpovídají na vzrůstající teplotu syntézou heat shock proteinů. Tento typ buněčné odpovědi se během evoluce příliš nezměnil, heat shock proteiny si jsou velmi podobné i u jinak velmi odlišných organismů a sdílí vysokou homologii aminokyselinové sekvence (Schlesinger, 1990; Eddy, 1999).

Hsps nalezneme téměř v každé tkáni včetně testes, kde plní různé funkce. V testes je většinou jejich exprese vývojově regulovaná a vyskytují se jen v určitých fázích spermatogeneze. Vyskytují se zde Hsps, které nenalezneme v žádné jiné tkáni a mají zde specifické funkce (Eddy, 2002). Přítomnost či absence Hsps ovlivňuje téměř každý aspekt reprodukce. Mají nezastupitelnou roli nejen ve spermatogenezi, ale i v interakci gamet, fertilizaci a jsou mezi prvními proteiny exprimovanými v časném embryonálním vývoji (Neuer et al., 1999).

#### 4.1. Heat shock proteiny 70

Jedna z nejvíce prozkoumaných rodin je rodina proteinů tepelného šoku se 70 kDa hmotností - heat shock proteiny 70 (Hsp70). Slouží v buňce jako molekulové chaperony, které napomáhají ve správném sbalení proteinů tím, že se váží na jejich hydrofobní oblasti nascentního proteinu vycházejícího z ribosomu a zabraňují, aby se tyto oblasti předčasně navzájem sbalovaly. Neméně důležitou funkcí je jejich schopnost ochraňovat buňku před stresovými faktory, jako je zvýšení teploty nebo kontaminace toxickými chemikáliemi, hlavně těžkými kovy jako je arsen, měď, rtuť atd. (Neuer et al., 2000).



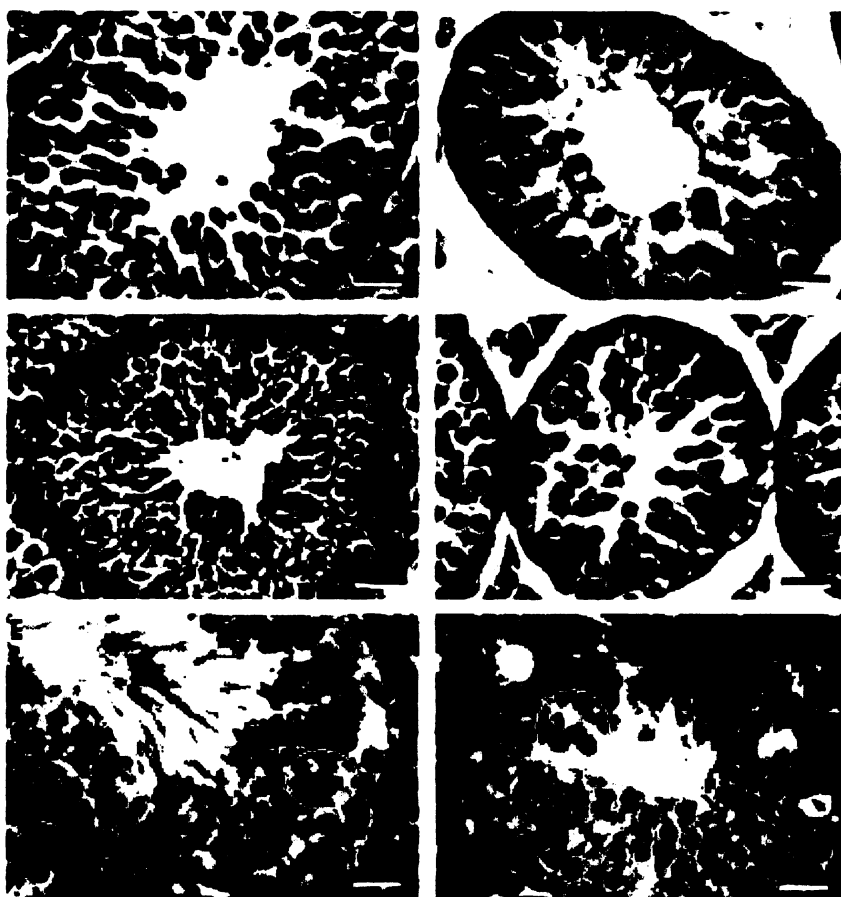
**Obr. 3:** Krystalová struktura 70-kDa krysího heat shock proteinu po hydrolýze ATP (Chang et al., 2007)

Jak již bylo zmíněno výše, Hsp70 proteiny jsou vysoce konzervované, některé jsou exprimovány v buňkách konstitutivně nebo po indukci tepelným šokem, případně jiným stresem. Ovšem dva členové Hsp70 rodiny jsou exprimovány specificky ve spermatogenních buňkách a jejich exprese je regulována vývojově – jsou to Hsp70-2

a Hsc70t (Eddy, 1999). Hsc70t gen je exprimován během post-meiotické fáze spermatogeneze a byl nalezen hlavně v cytoplazmě spermatid. (Eddy, 1999). Pro objasnění funkce Hsc70t proteinu byly použity pokusy na myších s homozygotní mutací genu Hsc70t (Hsc70t  $\bar{t}$ ). Hsc70t  $\bar{t}$  myši byly fertilní a histologické studie prokázaly, že vývoj zárodečných buněk nebyl přerušen. Nicméně když byly spermie Hsc70t  $\bar{t}$  myši přeneseny do podmínek in vitro, staly se imotilními během jedné hodiny, zatímco spermie divokého typu myši zůstaly motilní několik hodin. Hladina ATP u Hsc70t  $\bar{t}$  spermií byla nízká a produkce ATP omezená (Eddy, 2002). Tato pozorování naznačují, že Hsc70t slouží v zárodečných buňkách jako chaperon proteinů zahrnutých v produkci energie.

Hsp70-2 protein je syntetizován během meiotické fáze spermatogeneze a hojně se vyskytuje u pachyteních spermatocytů. Jeho exprese začíná ve fázi leptotene. Gen pro Hsp70-2 byl lokalizován na myším chromosomu 12. Homolog Hsp70-2 proteinu byl nalezen i v lidských testes, je nazýván HspA2 a zdá se, že plní i stejnou nebo velmi podobnou funkci (Feng et al., 2001).

Hypotéza, že Hsp70-2 má nezastupitelnou roli během spermatogeneze, byla ověřena při pokusu, během kterého byla navozena mutace Hsp70-2 genu u myší. Homozygotní samci s mutací genu Hsp70-2 (Hsp70-2  $\bar{t}$ ) měli nedostatek postmeiotických spermatid a zralých spermií a byli neplodní. Oproti tomu meióza ani plodnost nebyly ovlivněny u Hsp70-2  $\bar{t}$  samic (Dix et al., 1996). Což také dokazuje, že Hsp70-2 gen je signifikantně exprimován pouze v samčích zárodečných buňkách. Ovlivněna byla i hmotnost testes, která u dospělých Hsp70-2  $\bar{t}$  myší byla o 50% nižší než u Hsp70-2  $+/+$  a Hsp70-2  $+/+$  myší, zatímco hmotnost semenných váčků a epidydimu byla normální a ostatní sekundární znaky byly také neovlivněné. Histologické vyšetření ukázalo, že spermatogeneze byla přerušena. Meiotické a meiotické zárodečné buňky byly přítomny, ale post-meiotické zárodečné buňky a spermie chyběly (Dix et al., 1997) (obr. 4).



**Obr.4:** Morfologie semenotvorných kanálků u Hsp70-2 <sup>+/+</sup> (A, C, E) a u Hsp70-2 <sup>-/-</sup> (B, D, F) myši ze stáří 24 dnů (A, B), 28 dnů (C, D) a z dospělosti (E, F). U Hsp70-2 <sup>+/+</sup> myši byly ve stáří 24 dnů pozorovány hlavně spermatidy (A) a ve stáří 28 dnů prodlužující se spermatidy (C). Zatímco u Hsp70-2 <sup>-/-</sup> myši jsou viděny převážně degenerující buňky s nerozpoznatelnou chromosomální strukturou (B, D). v dospělosti většina semenotvorných váčků u Hsp70-2 <sup>-/-</sup> (F) myši obnoví svoji organizaci a jsou zde viditelné spermatocyty (fáze pachytene je označena šipkou v červeném kroužku) a apoptické buňky (označeny hrotem šipky ve žlutém kroužku). Naproti tomu u dospělých Hsp70-2 <sup>+/+</sup> myši (E) byly v semenotvorných váčcích pozorovány spermatocyty (označeny šipkou v červeném kroužku), spermatidy (označeny hrotem šipky ve žlutém kroužku) a prodlužující se spermatidy uvolňované do lumen váčku (Dix et al., 1997).

Příčina nedokončení meiózy u Hsp70-2 <sup>-/-</sup> myši má souvislost s funkcí, kterou Hsp70-2 plní v buněčném cyklu a to při přechodu z G<sub>2</sub> fáze do M fáze spermatocytů. Bylo prokázáno, že Hsp70-2 je nezbytným pro správnou funkci CDC2/cyklin B1

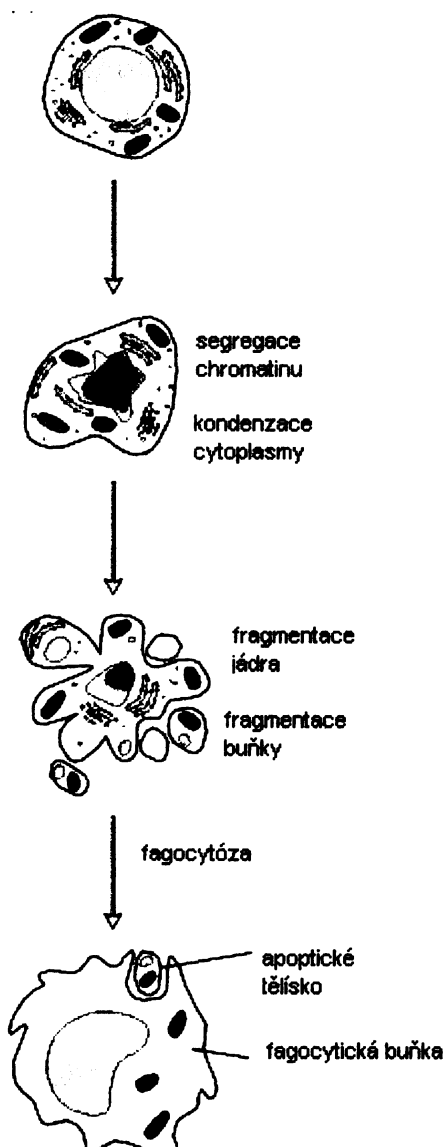


komplexu (Zhu et al., 1997). CDC2/cyklin B1 komplex je složen z cyklin B1 regulační podjednotky a CDC2 katalytické podjednotky, která má kinázovou aktivitu. CDC2 získává protein kinázovou aktivitu až po navázání cyklin B1 podjednotky. CDC2/cyklin B1 komplex, nazývaný se maturation promoting factor – MPF, je nezbytný pro přechod z G1 do S fáze a z G2 do M fáze buněčného cyklu (Dumphy et al., 1988). Transkript CDC2 je nejhojnější v pozdním pachytene a diplotene spermatocytů připravujících se na I. meiotické dělení. HSP70-2 je nejhojnější v té samé fázi buněčného cyklu, což samo o sobě naznačuje jistou souvislost. Navíc vyřazením (knockout) genu pro Hsp70-2 se buněčný vývoj zastaví při přechodu z G<sub>2</sub> fáze do M fáze a je započata apoptóza. Bylo prokázáno, že Hsp70-2 asociuje pouze s CDC2, pravděpodobně mu pomáhá zaujmout správnou konformaci pro zformování funkčního heterodimeru s cyklinem B1. U Hsp70-2<sup>-/-</sup> myši byla přítomna CDC2 podjednotka i cyklin B1 podjednotka, ale nevytvořil se funkční komplex CDC2-cyklin B1 heterodimer a tím pádem CDC2 postrádala kinázovou aktivitu a došlo k zastavení buněčného cyklu. Souvislost mezi HSP70-2 a funkcí komplexu CDC2/cyklin B1 byla definitivně prokázána pokusem in vitro, kdy do čerstvě připraveného extraktu z testes Hsp70-2<sup>-/-</sup> myši byl přidán HSP70-2. Nejen že došlo k sestavení CDC2/cyklin B1 komplexu, ale byla i znovu nastavena CDC2 kinázová aktivita (Zhu et al., 1997). Tyto výsledky prokázaly hypotézu, že Hsp70-2 protein je nezbytný k vytvoření CDC2-cyklinB1 komplexu a získání kinázové aktivity CDC2.

Další příčinou přerušení meiózy by mohla být nesprávná funkce synaptonemálního komplexu zapříčiněná absencí Hsp 70-2 (Allen et al., 1996). Synaptonemální komplex se formuje během zygotene meiotické profáze, kdy se homologní chromozomy seřadí uprostřed buňky a vytvoří synaptonemální komplex. Jedná se o komplex proteinů, v němž jsou hojně zastoupeny koheziny. Během diplotene potom dojde k desynapsi a chromozomy kondenzují, aby mohlo dojít k I. meiotickému rozdělení (Dix et al., 1997). Barvením bylo prokázáno, že HSP70-2 je přítomný v synaptonemálním komplexu spermií myši a křečka, ale v synaptonemálním komplexu vajíčka přítomen nebyl (Allen et al., 1996). U myši s nedostatkem Hsp70-2 byl detekován synaptonemální komplex, to znamená, že tento protein není nezbytný pro jeho tvorbu. Avšak u takto vzniklého synaptonemálního komplexu nedošlo v pozdní pachytene k desynapsi a byly patrné strukturální abnormality. Jen velmi zřídka tyto buňky dokončily I. meiotické dělení

(Dix et al., 1996/1997). Z čehož vyplývá, že Hsp70-2 je nezbytný pro desynapsi synaptonemálního komplexu a jeho absence vážně poškozuje vývoj spermatocytů a zapříčiňuje apoptózu těchto buněk. Role Hsp70-2 v desynapsi není přesně známá, ale existuje několik hypotéz. Za prvé Hsp70-2 může být strukturální část synaptonemálního komplexu. Další hypotéza předpokládá, že absence Cdc2 kinázové aktivity může způsobit problémy s desynapsí. Jak bylo uvedeno výše, Hsp70-2 je nezbytným chaperonem pro CDC2 protein kinázu. Vztah mezi tímto nálezem a selháním desynapse synaptonemálního komplexu není znám, ale jisté souvislosti jsou již známé. Například hlavními komponenty filament synaptonemálního komplexu jsou proteiny SCP1 a SYN1, které mají na svém karboxylovém konci potencionální vazebné místo pro CDC2 proteinkinázu. K rozpojování proteinových komplexů je v buňkách běžně použita fosforylace, proto je pravděpodobné, že CDC2 hraje roli v desynapsi synaptonemálního komplexu. Přítomnost Hsp70-2 na synaptonemálním komplexu by pak byla vysvětlována jako prostředek k ulehčení aktivace CDC2 pro tento proces. Další možnost je, že Hsp70-2 pomáhá složit synaptonemální komplex takovým způsobem, který umožňuje pozdější desynapsi. Poslední hypotéza předpokládá, že Hsp70-2 pomáhá sbalit další proteiny asociované se synaptonemálním komplexem, které vytvoří funkční komplex a umožní pozdější desynapsi (Eddy, 1999).

Řadou studií byl prokázán vliv Hsp70 na apoptózu buněk. Některé z nich jsou již uvedeny výše, například indukce apoptózy spojená se ztrátou CDC2 kinázové aktivity a problémy s desynapsí synaptonemálního komplexu. Apoptóza je programovaná buněčná smrt a je charakterizovaná ztrátou fosfolipidové symetrie v plasmatické membráně, kondenzací chromatinu, fragmentací DNA. V konečné fázi se apoptické buňky rozpadnou na apoptická tělíška, která jsou rychle fagocytována bez poškození okolních buněk (obr. 5.). Apoptická smrt je častý jev vyskytující se u různých druhů v mnoha tkáních a různých procesech. Apoptóza spermatogonických buněk v testes je u savců rozšířeným jevem. Nejčastěji k ní dochází u spermatogonií, ale můžeme ji pozorovat v průběhu celé spermatogeneze (Allan et al. 1992). U zdravého jedince dochází k zániku asi 75% zárodečných buněk, což může sloužit jednak k odstranění vadných zárodečných buněk, nebo k redukci zárodečných buněk na počet o který jsou schopny se postarat Sertoliho buňky. Sertoliho buňky také podstupují apoptózu, která in vivo slouží k formování semenotvorných váčků.



**Obr.5:** Schematická kresba znázorňující morfologické změny, ke kterým dochází v průběhu apoptózy (Lodish et al., 2000).

Během prvních dvou týdnů postnatálního vývoje nebyl pozorován rozdíl mezi divokým typem myši a mutantním typem myši (Hsp70-2<sup>-/-</sup>) v procesu apoptózy. Již během patnáctého dne se však počet apoptických buněk u mutantních myši zvýšil oproti divokým myším a byl značně vyšší sedmáctý den - při první vlně spermatogeneze (Mori et al., 1997). Všechny pachytení spermatocyty zanikly do 19. dne, z čehož vyplývá, že k aktivaci apoptózy dochází již před přerušením meiózy zapříčiněným nedostatkem Hsp70-2. Hlavní cesta aktivace apoptózy je přes p53 – dependentní mechanismus, ale není tomu tak u Hsp70-2<sup>-/-</sup> myši. Bylo to prokázáno

pokusem, kdy byly zkříženy Hsp70-2  $\gamma$  samice s p53  $\gamma$  samci, aby vznikl dvojitý homozygotní mutant Hsp70-2  $\gamma$ , p53  $\gamma$ . Tito mutanti byli neplodní a všechny jejich spermatocyty podstoupily apoptózu. Z toho vyplývá, že aktivace apoptózy u Hsp70-2  $\gamma$  myší probíhá p53 – nezávislou cestou (Dix et al., 1997).

Hsp70 pomáhá chránit buňky před apoptózou i v ranném embryonálním vývoji. Přítomnost anti-HSP protilátky v kultuře buněk ve stadiu 3. až 9. dne zvýšila apoptózu a významně redukovala počet embryí, které dosáhly stadia blastocysty (Matwee et al., 2001). U myších blastocyst kultivovaných v přítomnosti anti-Hsp byla fragmentace DNA pozorována daleko častěji než u normálních blastocyt. Apoptóza by tedy mohla být důsledkem toxikace embrya spojenou s inhibicí Hsp70 (Neuer et al., 1999). Přesný mechanismus, kterým Hsps zabraňují apoptóze není znám a vyžaduje další výzkum.

Hsp70 má také schopnost indukovat 24 hodinovou zástavu buněčného cyklu. Tato zástava je pravděpodobně mechanismus, kterým se buňky brání apoptóze. Získají tím čas na opravení škod způsobených buněčným stresem. Rozhodnutí mezi zástavou buněčného cyklu a apoptózou pravděpodobně závisí na typu buňky a rozsahu jejího poškození (Matwee et al., 2001).

Ukázalo se, že Hsp70 hraje důležitou roli i v interakci gamet. Bylo to prokázáno řadou studií, například přítomnost anti-Hsp protilátky výrazně snížila vazbu spermie na zona pellucida hovězího ovocytu a přerušila dokončení meiózy II a formaci pronukleu (Matwee et al., 2001). Ačkoliv se ukázalo, že počáteční rozpoznání spermie-oocyt nebylo ovlivněno anti-Hsp70 protilátkou, bylo prokázáno, že většina spermií vázaných na zona pellucida oocytu tuto vazbu ztratí po inkubaci s anti-Hsp70. Hsp 70 možná nehraje roli v časném rozpoznání spermie a vajíčka, ale určitě je důležitý pro navázání spermie, které následuje hned po časném rozpoznání oocytu (Matwee et al., 2001). Navíc Hsp70 je přítomen na acrosomu ejakuovaných býčích spermií a podstupuje relokalizaci do oblasti ekvatoriálního segmentu během kapacitace a akrosomální reakce, což také naznačuje jeho funkci při vazbě spermie na vajíčko (Kammarudin et al., 2004). Výsledky Matwee et al. (2001) ukázaly, že Hsp70 může ovlivňovat nejen vazbu spermie na vajíčko, ale v pozdější fázi fertilizace i fúzi membrány spermie s membránou vajíčka. Hsp70 má význam i v post-

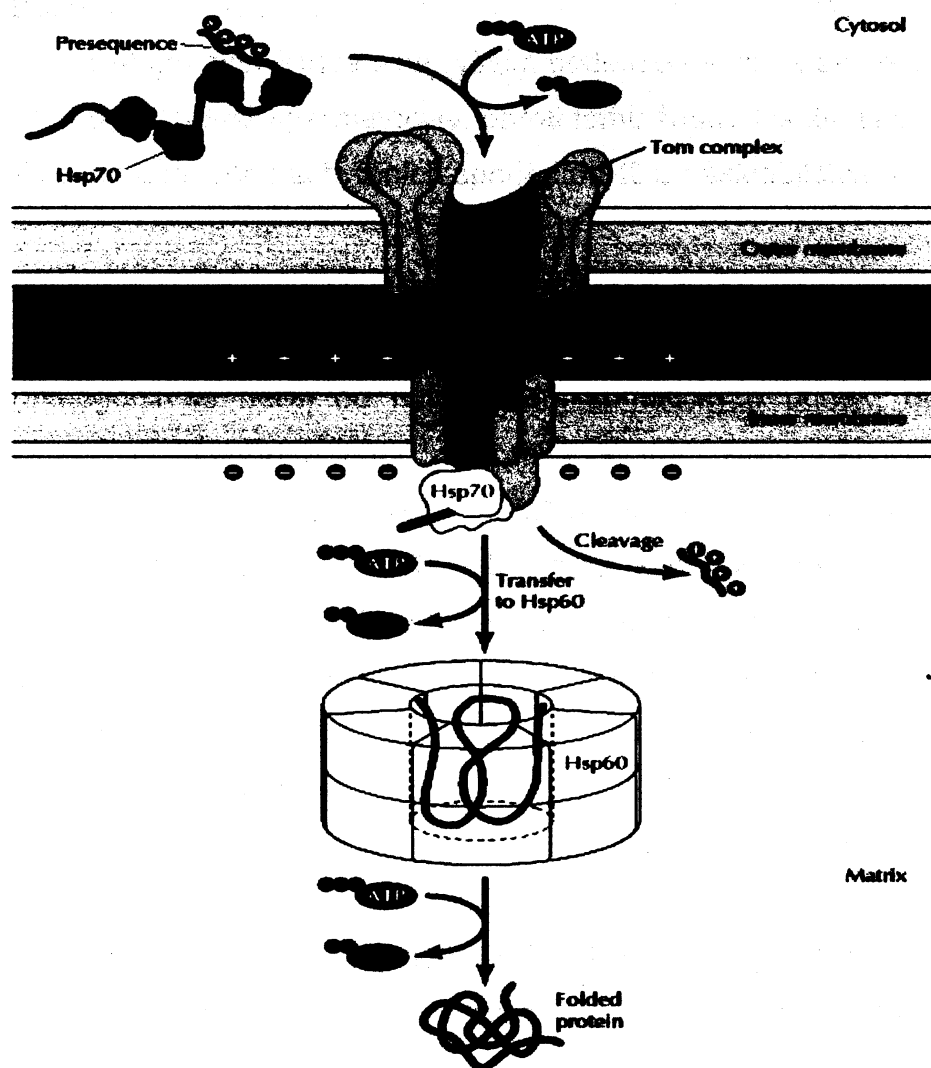
fertilizačních procesech. Je pravděpodobné, že ochraňuje vajíčko před stresem v časně fázi rýhování, před tím než je aktivován embryonální genom. Syntéza heat shock proteinů je pravděpodobně regulována na úrovni transkripce po dosažení čtyřbuněčného stádia, ale indukce syntézy Hsps není optimální až do stadia blastocysty. Proto má tepelný šok velmi škodlivý efekt na ranný embryonální vývoj oocytů skotu a naopak fáze moruly či blastuly jsou proti tomuto šoku poměrně rezistentní (Matwee et al., 2001).

Jak již bylo zmíněno výše, homolog Hsp70-2 byl nalezen i v lidských testes a je znám pod názvem HspA2. Je signifikantně exprimován pouze v lidských testes s normálně probíhající spermatogenezí, zatím co v testes s abnormálně probíhající spermatogenezí je ho nedostatek. Nejvíce HspA2 bylo pozorováno u spermatocytů v časně fázi meiózy. Naopak u spermatocytů, u kterých bylo pozorováno zastavení meiózy, bylo detekováno jen velmi málo HspA2. V Leydigových a Sertoliho buňkách přítomnost HspA2 detekována nebyla. Tyto výsledky nasvědčují tomu, že HspA2 u lidí má, stejně jako Hsp70-2 u myši, nezastupitelnou roli ve spermatogenezi a jeho nedostatek může zapříčinit mužskou neplodnost (Huai L. et al., 2001).

## **4.2. Heat shock protein 60**

Heat shock protein 60 (Hsp60) také patří do rozsáhlé rodiny „heat shock“ proteinů, které se vyskytují v širokém okruhu eukaryotických a prokaryotických buněk. U eukaryotických buněk je Hsp60 kódován jadernou DNA, syntetizován cytoplazmatickými ribosomy a transferován do mitochondriální matrix. Je to vysoce konzervovaný protein, skládající se ze sedmi podjednotek (Meinhardt et al., 1995). Hlavní funkce mitochondriálního Hsp 60 je správné sbalení nově importovaných proteinů a zabránění jejich agregaci či špatnému sbalení. Váže se na nesbalené proteiny, následně je uvolňuje ATP dependentním způsobem a spolupracuje při tom s ko-chaperonem Hsp10. Transport do mitochondrií obstarává cytosolický Hsp70 (obr. 6.). Kromě tohoto je Hsp60 také zodpovědný za export určitých proteinů z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru. Hsp60 drží tyto proteiny v nesbaleném stavu, protože jedině tak mohou být přeneseny přes vnitřní mitochondriální membránu do mezimembránového prostoru (Werner et al., 1997).

Mitochondrie jsou semiautonomní organely s vlastní DNA, ale většina jejich proteinů je kódována v jádře, syntetizována v cytoplazmě a poté transportována do mitochondrií. Proto jsou výše uvedené funkce Hsp60 pro mitochondrie a jejich správnou funkci nezbytné. Hsp60 je jeden z hlavních proteinů, které představují nezbytnou komponentu specifické cesty pro zrání a sbalení mitochondriálních proteinů.



**Obr. 6:** Import proteinů do mitochondrií. Proteiny obsahují cílovou sekvenci, která se skládá hlavně z pozitivně nabitých aminokyselin. Proteiny jsou udržovány v rozbaleném stavu cytosolickým Hsp70 a jsou rozpoznány receptory na povrchu mitochondrií. Rozbalený polypeptidový řetězec je pak translokován přes komplex zvaný Tom na vnější membráně a přenesen na komplex Tim na vnitřní membráně a dále do matrix. V matrix je předán Hsp60, který zprostředkuje jeho správné sbalení (Cooper, 2000).

Hsp 60 je exprimován i v samčích testes, a to jak v spermatogenních buňkách, tak v Sertoliho a Leydigových buňkách. Řadou studií bylo prokázáno, že exprese Hsp60 je regulována během spermatogeneze a vyskytuje se jen v určitých buněčných typech. Například studie Meinhardt et al. (1998), ve které byly použity imunohistochemické a Western blot analýzy, prokázala vývojově regulovanou distribuci Hsp60 v zárodečných buňkách a endokrinních buňkách testes u makaků. Sertoliho buňky byly vždy Hsp60 pozitivní, zatímco barvení spermatogonií bylo závislé na stupni proliferace s nejvyšším bodem u mitoticky se dělících buněk. Hsp60 pozitivní byly i rané spermatocyty, oproti tomu žádná Hsp60 imunoreaktivita nebyla detekována u raných pachyténích spermatocytů a následujících buněčných stádií.

Mitochondrie zárodečných buněk podstupují velké morfologické změny během spermatogeneze. V prepubertálních zárodečných buňkách nebo u dospělých spermatogonií se neliší od mitochondrií somatických buněk. Během meiózy se objevuje tzv. „kondenzovaný“ typ mitochondrií, který nalezneme například u pachyteních spermatocytů. Tyto mitochondrie jsou vakuolizované a mají méně diferenciovanou strukturu a málo nebo žádné krysty (Seitz et al., 1995). Meiotické a postmeiotické spermatogenické buňky jsou většinou závislé na anaerobní glykolýze, spíše než na aerobním způsobu získávání energie. Také jsou závislé na substrátech, které jim poskytují Sertoliho buňky (laktát, pyruvát), jejich mitochondrie se mění na kondenzovaný typ a nevyskytuje se zde Hsp60. Předpokládá se, že tyto morfologické změny odráží změny ve funkci mitochondrií (Meinhardt et al., 1998).

Expresa Hsp60 v Leydigových buňkách se zdá být během vývoje hormonálně regulovaná. V pre-pubertálních testes nebylo viditelné žádné barvení, zatímco Leydigovy buňky z testes dospělých samců byly pozitivní. Po vystavení Leydigových buněk hormonům FSH (folikuly stimulující hormon) a hCG (human chorionic gonadotropin) byly výsledky následující. Přidání FSH nemělo žádný vliv na přítomnost Hsp60 v Leydigových buňkách, zatímco hCG samotné nebo v kombinaci s FSH zapříčinilo signifikantní vzrůst. Je známo, že hCG indukuje proliferaci Leydigových buněk a proto indukuje i biogenezi mitochondrií. Navíc hCG zvyšuje i sekreci testosteronu v Leydigových buňkách (Meinhardt et al., 1998).

Mitochondrie jsou životně důležité pro fyziologii buňky, při jejich nesprávné funkci buňka zaniká. Jak již bylo zmíněno výše, nejvyšší exprese Hsp60 je u mitoticky se dělících buněk, aby bylo možné vytvořit další mitochondrie pro dceřiné buňky. Proto buňky s nedostatkem Hsp60, mají problémy s dělením a vedou k zastavení mitotického dělení spermatogenních buněk a tím i k nedostatečné spermatogenezi (Meinhardt et al., 1995).

### 4.3. Heat shock protein 41

Hsp 41 je spíše znám jako Apg1 – ATP and peptide binding protein in germ cells. Někdy ho nalezneme i pod označením Osp94. Patří do rodiny Hsp110, která zahrnuje tři geny kódující vysoce konzervované proteiny – Apg1, Apg2, Hsp110. Apg1 je exprimován ve všech myších tkáních, převážně však v testes. Nalezneme ho ve spermatogenních buňkách od pozdních pachyteních spermatocytů po postmeiotické spermatidy (Held et al., 2006). Pachytení spermatocyty exprimují dva typy Apg1, jeden o velikosti 3,5kb a druhý o velikosti 3,0kb, zatímco spermatidy exprimují jen ten 3,0kb (Kaneko et al., 1997). Tyto dva typy transkriptů se pravděpodobně liší délkou poly-A konce. Signifikantně je Apg1 exprimován také v ledvinách, kde je jeho výskyt omezen na epitelální buňky distálních tubulů. Apg1 v ledvinách je nejen teplem, ale i hyperosmoticky indukován (Held et al., 2006).

Teplota, při které dochází k indukci Hsps se mezi organismy liší. Pro ptáky a savce je to kolem 40°C až 50°C a liší se i mezi jednotlivými buněčnými typy daného organismu. U mnoha savců včetně člověka sestupují testes během embryonálního a raného postnatálního vývoje do šourku. V šourku je teplota obvykle o 4°C až 7°C chladnější než je tělesná teplota (Kaneko et al., 1997). Zárůdečné buňky jsou náchylné na poškození zvýšením teploty. Nižší teplota v testes má pravděpodobně souvislost s tím, že exprese Apg1 je indukována nižší teplotou než je obvyklé. Apg1 transkript je indukován v testikulárních somatických buňkách změnou teploty z 32°C na 39°C, přičemž tradičně dochází k indukci Hsps při změně z 37°C na 42°C (Kaneko et al., 1997; Nonoguchi et al., 2001)



Bylo zjištěno, že v zárodečných buňkách není výskyt Apg1 závislý jen na teplotě, ale hlavně je vývojově regulován. Což naznačuje, že Apg1 hraje roli ve spermatogenezi. Jeho přesná funkce není známa, nicméně pokusy na Apg1<sup>-/-</sup> myších tuto hypotézu prokázaly. Homozygotní mutanti Apg1<sup>-/-</sup> neměly problémy s vývojem do dospělosti, ale většina samců byla neplodná (Held et al., 2006). Tato neplodnost byla charakterizována nedostatkem spermií a problémy s jejich motilitou. Pozorovaná redukce spermatogeneze byla důsledkem zvýšení apoptózy zárodečných buněk. U Apg1<sup>-/-</sup> myší byly rozeznány všechny fáze spermatogenních zárodečných buněk. Avšak počet prodlužujících spermatid byl významně redukován. Pozdní spermatocyty, meiotické buňky a částečně i haploidní zárodečné buňky vykazovaly znaky degenerace jako je kondenzace chromatinu, fragmentace DNA, předčasné uvolnění zárodečných buněk do lumen a výjimečně i přítomnost velkých vícejaderných buněk. Snížení motility spermií by mohlo být zapříčiněno buď strukturálními defekty, nebo porušením procesu vedoucího k rozvoji motility spermií. U Apg1<sup>-/-</sup> spermií nebyly pozorovány žádné abnormality ve struktuře bičíku, takže snížení motility spermií bude spíše souviset s porušením fyziologických procesů vedoucích k získání motility. Apg1 je jedním z hlavních proteinů vážících vápník ve spermatogenních buňkách. Vápník reguluje aktivitu enzymů, jako jsou proteinkinasy a adenylátcyklasa, které jsou zahrnuty v regulaci ohýbání bičíku (Held et al., 2006). Při nedostatku Apg1 by mohlo dojít k porušení tohoto procesu a tím i k snížení motility.

## 5. Závěr

Heat shock proteiny mají nezastupitelnou roli v spermatogenezi, fertilizaci a v raném vývoji embrya. V tomto směru je nejvíce prozkoumán Hsp 70.2, který má nepostradatelnou funkci ve spermatogenezi obzvláště pak ve fázi meiotického dělení. Bylo prokázáno, že je součástí synaptonemálního komplexu a zodpovídá za správnou funkci CDC2 protein kinázy. Jeho absence má fatální důsledky pro fertilitu daného jedince. Navíc bylo prokázáno, že Hsp70 pomáhá chránit ranné embryonální buňky před apoptózou a hraje také roli v interakci gamet. Dalším důležitým heat shock proteinem je mitochondriální Hsp60, který pomáhá transportovat mitochondriální proteiny z cytoplazmy do mitochondriální matrix. Hsp 60 se vyskytuje ve spermatogenních buňkách, zvláště v těch které se mitoticky dělí. Oproti tomu

v pachyténích spermatocytech a následujících stádiích nebyl Hsp 60 detekován. Dále se Hsp 60 vyskytuje v Sertoliho a Leydigových buňkách. Nedostatek Hsp 60 vede k zastavení mitotického dělení spermatogonií a tím k problémům s plodností. Apg1 je dalším heat shock proteinem vyskytujícím se v buňkách testes. Nalezneme ho ve spermatogenních buňkách od pozdních pachyteních spermatocytů po postmeiotické spermatidy. A jeho absence zapříčiňuje neplodnost. V somatických testikulárních buňkách je tento protein tepelně indukován a to změnou z 32°C na 39°C. Kromě tohoto mají Hsps schopnost chránit buňky před vlivem stresových faktorů a pomáhají jim zregenerovat z poškození způsobené tepelným šokem či jinými stresovými faktory. Spermatogeneze je proces, který je náchylný k přerušení mírným zvýšením teploty nebo jinými škodlivými vlivy prostředí. Hsps slouží jako tzv. „antistresové proteiny“, pomáhají buňkám překonat stresové období hlavně tím, že chrání jejich proteiny před denaturací a v případě poškození jim umožňují se zregenerovat.

Hsp proteiny jsou nezbytné pro reprodukce schopnost jedince. Jejich přesný mechanismus, kterým působí ve spermatogenních buňkách není vždy zcela znám. Jejich další výzkum je dle mého názoru potřebný. Hlavně ve světle vzrůstající mužské neplodnosti, která je z velké části zapříčiněna škodlivými vlivy prostředí. Vzhledem k tomu, že Hsp pomáhají chránit buňky před stresovými faktory, by jejich další výzkum mohl pomoci najít řešení, jak buňky před těmito škodlivými vlivy chránit.

## 6. Seznam zkratek

<b>ADP</b>	- adenosindifosfát
<b>Apg</b>	- protein z rodiny proteinů tepelného šoku (Hsp110)
<b>ATP</b>	- adenosintrifosfát
<b>CDC2</b>	- cyklin dependentní protein kináza2
<b>DNA</b>	- deoxyribonuklová kyselina
<b>FSH</b>	- folikuly stimulující hormon
<b>Gapd</b>	- glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
<b>Gapds</b>	- glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza specifická pro zárodečné buňky
<b>hCG</b>	- human chorionic gonadotropin
<b>Hk</b>	- hexokináza
<b>Hk1-s</b>	- hexokináza specifická pro zárodečné buňky
<b>Hsc</b>	- heat shock protein (protein tepelného šoku), který je exprimován konstitutivně
<b>Hsp</b>	- heat shock protein (protein tepelného šoku)
<b>MPF</b>	- maturation promoting factor
<b>mRNA</b>	- mediátorová ribonukleová kyselin
<b>p53</b>	- tumor supresorový protein o váze 53 kDa
<b>SCP1</b>	- synaptonemal complex protein 1(synaptonemální proteinový komplex 1)
<b>SYN1</b>	- synapsin 1

## 7. Literatura

- 1) Alberts B., Dennis B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1998) *Základy buněčné biologie*, Espero Publishing.
- 2) Allan D.J., Harmon B.V., Roberts S.A. (1992) Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Proliferation* 25:241-50.
- 3) Allen W.J., Dix D.J., Collins B.W., Merrick B.A., He C., Poorman-Allen P., Selkirk J.K., Dresser M.E., Eddy E.M. (1996) HSP70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma* 104:414-421.
- 4) Clouthier D.E., Averbock M.A., Maika S.D., Hammer R.E., Brinster R.L. (1996) Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 381:418-421.
- 5) Cooper M.G. (2000) *The Cell – Molecular Approach*, Sinauer Associates, Inc.
- 6) Dix D.J., Allen W.J., Collins B.W., Morio Ch., Nakamura N., Poorman-Allen P., Goulding E.H., Eddy E.M. (1996) Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Developmental Biology* 93:3264-3268.
- 7) Dix D.J., Allen W.J., Collins B.W., Poorman-Allen P., Mori Ch., Blizard D.R., Brown P.R., Goulding E.H., Strong B.D., Eddy E.M. (1997) HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development* 124:4595-4603.
- 8) Dunphy W.G., Brizuela L., Beach D., Newport, J. (1988) The *Xenopus* homolog of *cdc2* is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 54:423-431.
- 9) Eddy E.M. (1999) Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis.

- Reviews of Reproduction 4:23–30.
- 10) Eddy E.M. (2002) Male germ cell gene expression. Recent Progress in Hormone Research 57:103-28.
- 11) Feng H.L., Sandlow J.I., Sparks A.E. (2001) Decreased expression of the heat shockprotein hsp70-2 is associated with the pathogenesis of male infertility. Fertility and Sterility 76:1136-1139.
- 12) Handel M.A. (2004) The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. Experimental Cell Research 15:57-63.
- 13) Held T., Paprotta I., Khulan J., Hemmerlein B., Binder L., Wolf S., Schubert S., Meinhardt A., Engel W., Adham I.M. (2006) Hspa4l-Deficient Mice Display Increased Incidence of Male Infertility and Hydronephrosis Development. Molecular and Cellular Biology 26:8099-8108.
- 14) Chang Y.-W., Sun Y.-J., Wang C., Hsiao C.-D. (2007)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=63632>
- 15) Junquiera L.C., Carniero J., Kelley R.O. (1992) Základy histologie, nakladatelství a vydavatelství H&H.
- 16) Kamaruddin M., Kroetsch T., Basrur P.K., Hansen P.J., King W.A. (2004) Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. Andrologia 36:327-334.
- 17) Kaneko Y., Kimura T., Nishiyama H., Noda Y., Fujita J. (1997) Developmentally Regulated Expression of APG-1, a Member of Heat Shock Protein 110 Family in Murine Male Germ Cells. Biochemical and Biophysical Research Communication 233:113-116.
- 18) Lodish H., Berk A., Zipursky L.S., Matsudaria P., Baltimore D., Darnell J. (2000) Molecular Cell Biology, W.H. Freeman copany.

- 19) Matwee C., Kamaruddin M., Betts D.H., Basrur P.K., King W.A. (2001) The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. *Molecular Human Reproduction* 7:829-37.
- 20) Meinhardt A., Parvinem M., Bacher M., Aumuller G., Hakovirta H., Yagi A., Seitz J. (1995) Expression of mitochondrial heat shock protein 60 in distinct cell types and defined stages of rat seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction* 52:798-807.
- 21) Meinhardt A., Seitz J., Arslan M., Aumuller G., Weinbauer G.F. (1998) Hormonal regulation and germ cell-specific expression of heat shock protein 60 (hsp60) in the testis of macaque monkeys (*Macaca mulatta* and *M. fascicularis*). *International Journal of Andrology* 21: 301-307.
- 22) Mori Ch., Nakamura N., Dix D.J., Fujioka M., Nakagawa S., Shiota K., Eddy E.M. (1997) Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70-2 knockout mice. *Developmental Dynamics* 208:125-36.
- 23) Mori Ch., Nakamura N., Welch J.E., Gotoh H., Goulding E.H., Fajioka M., Eddy E.M. (1998) Mouse spermatogenic-cell specific type 1 hexokinase (mHk1-s) transcripts are expressed by alternative splicing from the mHk1 gene and the HK1- S protein is localized mainly in the sperm tail. *Molecular Reproduction and Development* 49:374–385.
- 24) Nayernia K., Adham I., Kremling H., Reim K., Schlicker M., Schluter G., Engel W. (1996) Stage and developmental specific gene expression during mammalian Spermatogenesis. *Developmental Biology* 40:379-383.
- 25) Neuer A., Spandorfer P.D., Giraldo P., Jeremias J., Dieterle S., Korneeva I., Liu H.-C., Rosenwaks Z., Witkin S.S. (1999) Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis. *Infectious Disease in Obsteric and Gynekology* 7:10-16.

- 26) Neuer A., Spandorfer P.D., Giraldo P., Dieterle S., Rosenwaks Z., Witkin S.S. (2000) The role of heat shock proteins in reproduction. *Human reproduction Update* 6:149-155.
- 27) Nonoguchi K., HIROMU Tokuchi H., Okuno H., Watanabe H., Egawa H., Saito K., Ogawa O., Fujita J. (2001) Expression of Apg-1, a member of the Hsp 110 family, in the human testis and sperm. *International Journal of Urology* 8:308-314.
- 28) Seitz J., Mobius J., Bergmann M., Meinhardt A. (1995) Mitochondrial differentiation during meiosis of male germ cells. *International Journal of Andrology* 2:7-11.
- 29) Schlesinger M.J. (1990) Heat shock proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 265:12111-12114.
- 30) Tourtellotte W., Nagarajan J., Auyeung A., Mueller C., Milbrandt J. (1999) Infertility associated with incomplete spermatogenic arrest and oligozoospermia in Efr4-deficient mice. *Development* 126:5061–5071.
- 31) Welch J.E., Schatte E.C., O'Brien D.A., Eddy E.M. (1992) Expression of a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene specific to mouse spermatogenic cells. *Biology of Reproduction* 46:869–878.
- 32) Werner A., Meinhardt A., Seitz J., Bergmann M. (1997) Distribution of heat-shock protein 60 immunoreactivity in testes of infertile men. *Cell and Tissue Research* 288:539-544.
- 33) Zhu D., Dix D.J., Eddy E.M. (1997) HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development* 124:3007-3014.