

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jana Pícková

Akrozomální reakce savčí spermie
The acrosome reaction in mammalian sperm

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Michaela Frolíková, Ph.D.

Praha, 2021

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 03. 05. 2021

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Michaele Frolíkové, Ph.D. za její ochotu, čas a cenné rady, které mi poskytla při psaní této bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během studia.

Abstrakt

K akrozomální reakci (AR) spermie dochází *in vivo* v reprodukčním traktu samice a tento děj je nezbytnou prerekvizitou k tomu, aby spermie mohla oplodnit vajíčko. AR umožňuje spermií proniknout obaly vajíčka a splynout s ním. Spermie musí nejdříve projít procesem kapacitace a teprve poté může dojít k iniciaci AR a vylití akrozomálního obsahu. Co je induktorem AR není stále zcela jasné, důležitou roli hrají nejspíše extracelulární obaly vajíčka – *zona pellucida* a kumulární buňky vylučující progesteron a jiné látky, u nichž byla prokázána schopnost AR iniciovat. V poslední době je předmětem intenzivního studia identifikace místa iniciace AR v rámci reprodukčního traktu samice. Ukázalo se, že u myši podstoupí většina spermií AR v horním isthmu. V ampule se pak nachází jen malé množství spermií a všechny tyto spermie jsou schopné vajíčko oplodnit. Během AR dochází k uvolňování akrozomálního obsahu do extracelulárního prostředí. Nejdříve dochází k uvolnění rozpustné složky akrozomu a až poté je postupně uvolněna akrozomální matrix. Před vylitím obsahu akrozomu musí dojít přes receptory spřažené s G proteiny a receptory tyrosinkinázy k aktivaci fosfolipáz. Poté, co jsou aktivovány i proteinkinázy, dochází k aktivaci kanálů na akrozomu i na plazmatické membráně spermie a uvolnění Ca^{2+} . Dále jsou aktivovány aktin-vazebné proteiny, dochází k depolymeraci aktinu a konečné fúzi plazmatické membrány s vnější akrozomální membránou spermie.

Klíčová slova

akrozom, akrozomální reakce, exocytóza, *zona pellucida*, kumulární buňky

Abstract

The acrosome reaction (AR) of the sperm is a prerequisite for egg fertilization, which takes place in the female reproductive tract. The AR allows sperm to penetrate extracellular egg coats and fuse with the egg. At first, the sperm must undergo the process called capacitation, then AR is initiated and acrosomal content is released. While it is not clear, what initiates the AR, it is probably the egg's extracellular coats – the *zona pellucida* and cumulus cells, secreting progesterone and some other substances, which can initiate the AR. Lately, it was demonstrated, that in the mouse the most sperms undergo the AR in the upper isthmus of the oviduct. Only a few sperms reach the ampulla, but all of them can fertilize eggs. During the AR, the acrosomal content is released into the extracellular space. It was discovered, that the release of acrosomal proteins is not synchronous, soluble components are released faster from the acrosome than are acrosomal matrix proteins. Before the acrosomal release, G-coupled receptors and tyrosine kinase receptors activate phospholipases. Protein kinases are also activated, which results in the opening of Ca^{2+} channels in the acrosome and sperm plasma membrane and the release of Ca^{2+} . The increase of Ca^{2+} leads to actin depolymerization, membrane fusion, and finally, acrosomal exocytosis.

Keywords

acrosome, acrosome reaction, exocytosis, *zona pellucida*, cumulus cells

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce.....	2
3. Stavba spermie	3
3.1 Bičík	3
3.2 Hlavička.....	4
3.2.1 Akrozom.....	4
3.2.2 Aktin.....	7
4. Kapacitace	7
5. Akrozomální reakce	8
5.1 Iniciace akrozomální reakce	9
5.1.1 Induktory AR.....	9
5.1.2 Místo iniciace akrozomální reakce <i>in vivo</i>	12
5.2 Uvolňování akrozomální matrix.....	14
5.3 Relokace klíčových proteinů	15
6. Mechanismus řízení AR	16
7. Závěr.....	19
8. Seznam použité literatury.....	21

1. Úvod

Aby mohl vzniknout nový jedinec, musí dojít k oplození vajíčka spermii. Samotnému splnutí gamet předchází na straně spermie několik podstatných dějů, mezi něž patří kapacitace a následná AR (Yanagimachi 1994). Ihned po ejakulaci není spermie schopná oplodnit vajíčko, nejdříve musí dojít k její kapacitaci. Během kapacitace dochází k maturaci spermie a jejím četným přestavbám (Chang 1951; Austin 1951; Austin 1952). Zásadními změnami prochází během kapacitace plazmatická membrána spermie. Dochází k redistribuci lipidových raftů (van Gestel et al. 2005), změně uspořádání fosfolipidů a snížení cholesterolu v membráně (Nolan a Hammerstedt 1997; Flesch et al. 2001). Díky tomu je membrána destabilizována, což umožňuje její fúzi s akrozomální membránou (Nolan a Hammerstedt 1997). Výrazné změny se týkají také cytoskeletu – především aktinových vláken, která se podílí na AR (Spungin et al. 1995).

Pouze kapacitované spermie mohou podstoupit AR (Fraser 1998). AR je děj, při kterém dochází k fúzi vnější akrozomální membrány s plazmatickou membránou spermie, vytvoření hybridních membránových váčků a uvolnění obsahu akrozomu do okolí (Cardullo a Florman 1993). Přestože byla AR popsána již v padesátých letech minulého století (Dan 1952), nejsou jednotlivé detaily tohoto jevu a jejich mezidruhové rozdíly ještě zcela prozkoumány a pochopeny. Teprve relativně nedávno došlo k objasnění rolí některých proteinů obsažených v akrozomu (Tardif et al. 2010; Isotani et al. 2017; Hirose et al. 2020) a způsobu uvolňování akrozomálního obsahu (Kim et al. 2001b; Kim a Gerton 2003). AR je důležitou prerekvizitou oplození, protože umožňuje proniknutí spermie skrz obaly vajíčka a následně dochází k samotnému splnutí gamet. Během AR dochází k přesunu některých proteinů spermie, které se podílejí právě na její fúzi s vajíčkem (Yoshida et al. 2010; Satouh et al. 2012). Pokud tyto proteiny nejsou ve spermii přítomny, nebo spermie postrádají akrozom či neprošly AR, dochází u nich ke snížení (Toshimori et al. 1998; Yoshinaga et al. 2001) nebo až k úplné ztrátě schopnosti oplodnit vajíčko (Kang-Decker et al. 2001; Inoue et al. 2005; Dam et al. 2007). To dokazuje, jak je AR nezbytně nutná pro oplození.

Velkých pokroků v poznání místa, kde dochází k iniciaci AR, se dosáhlo díky vytvoření geneticky modifikovaných myší. Díky fluorescenčnímu značení pomocí zeleného (GFP) a červeného (DsRed2) fluorescenčního proteinu exprimovaného v akrozomu, respektive mitochondriích spermie (Hasuwa et al. 2010), mohla být pozorována migrace spermii samičím reprodukčním traktem a zároveň jejich akrozomální status a otevřela se tak možnost pozorovat místo iniciace AR *in vivo* (La Spina et al. 2016; Muro et al. 2016; Hino et al. 2016).

Studium AR a objasnění, kde k AR dochází a jak probíhá, je podstatné nejen pro obecné porozumění tohoto děje, ale také pro aplikaci těchto znalostí při asistované reprodukci, neboť v roce 2010 bylo celosvětově 48,5 milionů párů neplodných (Mascarenhas et al. 2012).

2. Cíle práce

V poslední době došlo v rámci výzkumu akrozomální reakce savčí spermie k několika novým a zcela zásadním objevům, které změnily pohled na tento děj. Cílem této bakalářské práce je tyto poznatky shrnout a diskutovat v rámci jednoho uceleného textu. Tato práce se zaměřuje především na:

- 1) význam a mechanismus akrozomální reakce savčí spermie
- 2) místo, kde k akrozomální reakci savčí spermie dochází

3. Stavba spermie

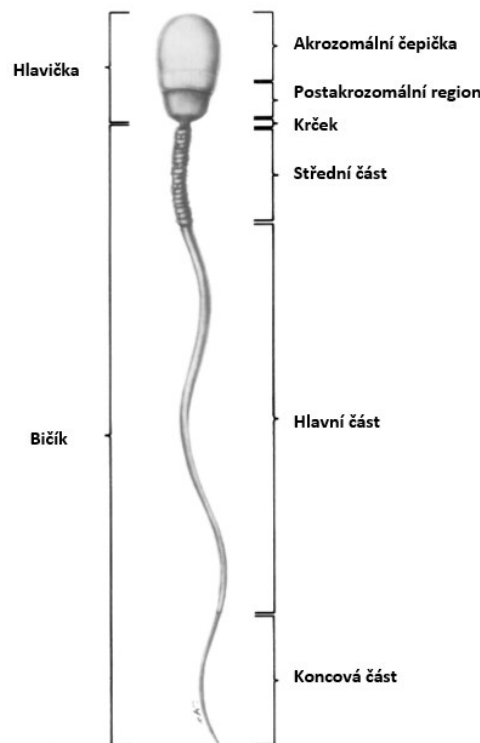
Spermie je specializovaná samčí pohlavní buňka. Je to haploidní buňka, která se skládá z hlavičky a bičíku, který tvoří většinu délky spermie.

3.1 Bičík

Bičík spermie je nutný pro pohyblivost (motilitu) spermie. Uvnitř bičíku se nachází axonema. Jedná se o cytoskeletální strukturu tvořenou 2 centrálními mikrotubuly, které jsou obklopené 9 dvojicemi mikrotubulů (Fawcett 1975). Na dvojice mikrotubulů jsou navázané ATPázy dyneiny, které zajišťují energii potřebnou pro pohyb, přičemž jsou na ně navázané ve formě vnějších a vnitřních dyneinových ramen (Inaba 2003).

Celkem se bičík skládá ze 4 částí: z 1) krčku, který navazuje na hlavičku spermie, 2) střední části obsahující mitochondrie organizované do spirály, které produkují energii potřebnou pro pohyb spermie, 3) nejdelší hlavní části a 4) koncové části, která obsahuje jen axonemu a začíná tam, kde končí vláknitý obal obklopující hlavní část bičíku (obr. 1) (Fawcett 1975).

Délka bičíku se mezi jednotlivými druhy savců liší, přičemž právě různá délka bičíku souvisí s odlišnými délkami spermií různých druhů savců, neboť velikost hlavičky je přibližně stejná (Cummins a Woodall 1985).



Obr. 1: stavba spermie (Fawcett 1975), upraveno

3.2 Hlavička

Tato práce se zaměřuje především na hlavičku spermie, jako část spermie obsahující akrozom – organelu nutnou pro AR spermie, která je předmětem našeho zájmu. Tvar hlavičky se mezi jednotlivými druhy savců liší, můžeme rozlišit 4 typy hlaviček: 1) oválné (spermie kance, králíka), 2) kulaté (spermie lidí, primátů), 3) falciformní – tvar srpů (spermie většiny hlodavců) a 4) hlavičky s velkým akrozomem (spermie morčat, veverky) (Dvořáková et al. 2005).

Hlavička spermie je rozlišena na 3 části: akrozomální čepičku, ekvatoriální segment a postakrozomální region (Fawcett 1975). V hlavičce se nachází pouze dvě organely. První je, jak již bylo uvedeno výše, akrozom, jehož úlohou je pomoci spermii proniknout extracelulární obaly vajíčka a umožnit tak splynutí gamet. Druhou organelou, která je v hlavičce spermie přítomna, je jádro. Jádro je nositelem genetické informace – DNA spermie.

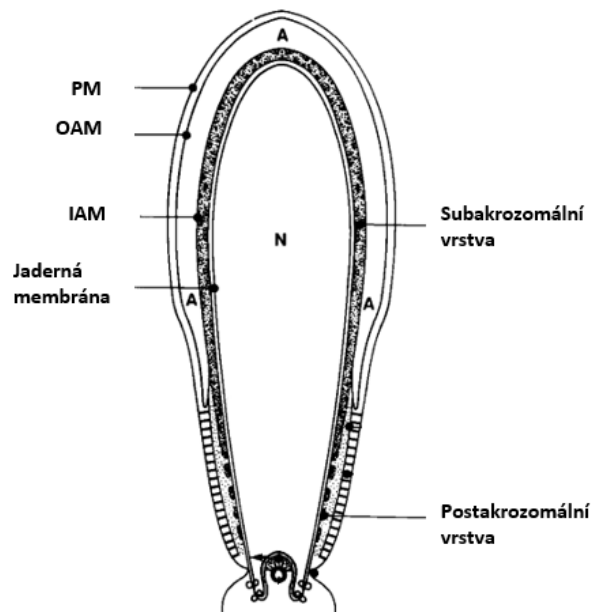
3.2.1 Akrozom

Akrozom je organela, která se nachází na anteriorní části hlavičky spermie. Vznik a vývoj této organely není dosud zcela objasněný. Biogeneze akrozomu savčí spermie se dá rozdělit na 4 fáze: Golgi fázi, fázi čepičky, akrozomální fázi a fázi maturace. V Golgi fázi nejdříve dochází ke vzniku idiosomu, což je struktura považovaná za součást Golgiho aparátu spermie. Uvnitř idiosomu se nachází několik proakrozomálních granulí, které poté splývají a vzniká akrozomální granule. V druhé fázi dochází ke zvětšování a zplošťování této granule, vzniká čepička, která se postupně zvětšuje. Přitom dochází k oddělení idiosomu od akrozomální granule a jeho uvolnění do cytoplazmy. Během třetí, akrozomální fáze, dochází k orientaci spermatid a akrozomální granule se přeměňuje na akrozom. Akrozom se poté prodlužuje stejně jako jádro, které se navíc ještě zplošťuje. Nakonec při fázi maturace dochází k finálnímu dozrání spermie (Clermont a Leblond 1955).

Stále není jasné, jestli je akrozom odvozený z Golgiho aparátu, jak vyplývá z některých studií (Tang et al. 1982; Moreno et al. 2000). Je možné, že by akrozom mohl patřit mezi organely, které jsou příbuzné lyzozomu. V akrozomu byly totiž identifikovány lyzozomální enzymy, jako je např. kyselá fosfatáza nebo aryl sulfatáza (Allison a Hartree 1970). Tuto hypotézu také podporuje to, že akrozom je zpočátku odvozen od Golgiho aparátu (Clermont a Leblond 1955). V posledních letech byly publikovány studie, které hypotézu, že akrozom je organela příbuzná s lyzozomem potvrzují. Proteomická analýza akrozomální matrix a melanozomu, který patří mezi lyzozomy, ukázala shodu ve 21 %. Je ale možné, že je shodných proteinů více, neboť při této analýze byly porovnávány jen proteiny akrozomální matrix nikoliv všechny proteiny akrozomu (Guyonnet et al. 2012).

V další studii byl umlčen gen spojený s autofágií – *Atg7*, aby mohla být zkoumána role autofágie v biogenezi akrozomu. Mutantní myši samci nebyli plodní, přičemž jejich spermie měly nepravidelně kulaté hlavičky. Chybějící *Atg7* neměl vliv na časnou, ale až na pozdější fázi biogeneze, kdy v Golgi fázi nedošlo k fúzi proakrozomálních váčků do jednoho akrozomálního váčku. Po přidání inhibitoru autofágie (3-methyladeninu) nebo inhibitoru autolyzozomu (chlorochinu nebo NH_4Cl) měly spermie kulaté hlavičky a poškozené akrozomy, stejně jako spermie s mutací v *Atg7*. Tyto výsledky podporují hypotézu, že akrozom pochází z autolyzozomu a že autofágie je důležitá pro biogenezi akrozomu (Wang et al. 2014). Navíc to, že spermie s poškozenými akrozomy nejsou schopné oplození (Wang et al. 2014) ukazuje na důležitost akrozomu při oplození. Důležitost akrozomu podporuje i další studie, kde byla zkoumána role proteinu Hrb v utváření akrozomu. Ve spermích s mutací v *Hrb* také nedošlo k fúzi proakrozomálních váčků do jednoho akrozomálního váčku. Tyto mutantní spermie měly kulaté hlavičky a nebyly schopné oplození (Kang-Decker et al. 2001).

Akrozom je ohraničen akrozomální membránou, která se dělí na vnější (OAM) a vnitřní (IAM) akrozomální membránu, přičemž vnější obklopuje plazmatickou membránu (PM) a vnitřní je v blízkosti jádra spermie (obr. 2) (Buffone et al. 2008). Během AR dochází k fúzi OAM s PM a uvolnění obsahu akrozomu (Cardullo a Florman 1993).



Obr. 2: detail hlavičky spermie, PM – plazmatická membrána, OAM – vnější akrozomální membrána, IAM – vnitřní akrozomální membrána, N – jádro, A - akrozom (Longo et al. 1987), upraveno

Lumen akrozomu obsahuje 2 kompartmenty: akrozomální matrix (AM) a rozpustnou složku akrozomu, která není součástí AM. Rozpustnou složku akrozomu tvoří například hyaluronidáza nebo dipeptidyl peptidáza (Hardy et al. 1991).

Mezi nejvíce prostudované proteiny AM patří serinová proteáza **acrosin**. Nejdříve je syntetizován proacrosin (enzymaticky neaktivní forma acrosinu), který je proteolyticky štěpen na acrosin (Baba et al. 1989). Stále není jasné, jestli je acrosin nezbytně nutný pro penetraci spermie obaly vajíčka, jak bylo dříve často naznačováno. Baba et al. (1994) objevili, že myší homozygotní mutantní spermie s mutací genu pro acrosin jsou schopné proniknout obaly vajíčka a jsou plodné. Je ale možné, že to je způsobeno tím, že v myších spermích je acrosinu málo (Erickson a Martin 1974).

Stejně jako u myších spermí, potkaní spermie s mutací v genu pro acrosin byly schopné proniknout obalem vajíčka: *zona pellucida* (ZP), pokud byla vajíčka zbavená kumulárních buněk. Avšak u vajíček s kumulárními buňkami pronikaly mutantní spermie skrze ZP hůře než spermie bez mutace (Isotani et al. 2017). Vzhledem k výše uvedenému a k tomu, že potkaní a myší spermie bez acrosinu jsou plodné, bude acrosin u potkanů a myší nejspíše hrát roli v průniku spermie skrz kumulární buňky.

Oproti tomu spermie křečků s mutací acrosinu byly neplodné. Tyto spermie ale byly schopné podstoupit AR stejně jako spermie bez mutace. Zároveň bylo zjištěno, že mutantní spermie jsou schopné projít skrz kumulární buňky vajíčka, přes ZP ovšem neprošly a pokud byla ZP odstraněna, mutantní spermie byly schopné vajíčko oplodnit. Zdá se tedy, že se acrosin u křečků nepodílí na penetraci kumulárních buněk, ani na iniciaci AR, ale že je podstatný pro průnik spermie skrz ZP (Hirose et al. 2020). Role acrosinu při oplození se tedy pravděpodobně mezi jednotlivými druhy liší.

Dalším akrozomálním proteinem je **zonadhesin**, který byl poprvé izolován z membrán prasečí spermie s tím, že se jedná o protein, který se váže druhově specificky na ZP (Hardy a Garberss 1994; 1995). Role zonadhesinu v druhově specifické vazbě spermie na ZP byla dokázána i v další studii. Myší spermie postrádající zonadhesin vykazovaly ztrátu mezidruhové specifity ve vazbě na ZP. Tyto spermie byly stále plodné, ale ve srovnání s wild-type (WT) spermii se vázaly na prasečí a králičí ZP mnohonásobně více (Tardif et al. 2010).

V AM se nachází i další proteiny jako např. sp56 (Kim et al. 2001a), který byl původně popsán jako protein, který se nachází na PM spermie a je schopný vázat ZP3 glykoprotein (Bleil a Wassarman 1990; Cheng et al. 1994).

3.2.2 Aktin

V cytoplazmě v hlavičce spermie se nachází také cytoskelet, jehož součástí jsou aktinová vlákna. Aktinový cytoskelet se významně podílí na AR.

Ve spermatogenních buňkách se aktinová filamenta nachází v subakrozomální vrstvě (Vogl 1990) (obr. 2), ale v průběhu spermatogeneze se lokalizace aktinu mění, přičemž jeho redistribuce je druhově specifická (Fouquet a Kann 1992). K přesunu aktinu dochází i během AR. Například ve spermích morčat je F-aktin (filamentární aktin) lokalizován v akrozomální oblasti a po AR dochází k jeho přesunu do ekvatoriálního segmentu a postakrozomální vrstvy (obr. 2) (Moreno-Fierros et al. 1992).

Polymerace a depolymerace aktinu hraje roli jak při kapacitaci, tak při AR (Spungin et al. 1995; Brener et al. 2003), přičemž ve spermích byly objeveny aktin-vazebné proteiny, které polymeraci a depolymeraci aktinu regulují (Howes et al. 2001; Cabello-Agüeros et al. 2003). Důležitost aktinu v AR dokazuje i to, že při použití cytochalasinu D (inhibitoru polymerace aktinu) dochází k inhibici AR (Brener et al. 2003).

F-aktin přítomný v kortikální oblasti hlavičky spermie mezi její PM a OAM funguje jako bariéra, která zabráňuje fúzi PM a OAM, neboť je na tyto dvě membrány navázán a teprve až poté, co dojde při iniciaci AR k jeho depolymeraci, může dojít k fúzi těchto membrán. Aktin také slouží jako opora pro proteiny, např. pro fosfolipázu C (PLC γ) (Spungin et al. 1995), která se podílí na řízení AR (více v kapitole Mechanismus řízení AR). Význam aktinového cytoskeletu v AR potvrzuje výzkum provedený na spermích morčat. Ten ukázal, že během AR dochází pomocí aktinových sítí k přesunu proteinu calmodulinu z ekvatoriálního segmentu do postakrozomálního regionu (Moreno-Fierros et al. 1992). Calmodulin se podílí na řízení AR, neboť při použití antagonistů calmodulinu dochází k inhibici indukované AR, a naopak po přidání calmodulinu dochází k vyrušení tohoto inhibičního efektu (Bendahmane et al. 2001).

4. Kapacitace

Aby byly spermie schopné vazby a fúze s vajíčkem, musí v samičím reprodukčním traktu projít maturačním procesem zvaným kapacitace. Tento proces zahrnuje řadu biochemických a fyziologických změn (Chang 1951; Austin 1951; Austin 1952).

Plazmatická membrána spermie je díky vysokému obsahu cholesterolu velice málo fluidní, což umožňuje její kompartmentalizaci (Travis et al. 2001). van Gestel et al. (2005) potvrdili existenci lipidových raftů v PM spermie a ukázali, že během kapacitace dochází k jejich redistribuci a koncentraci v apikální části hlavičky. Během kapacitace dochází celkově k přestavbě PM spermie, původně asymetrické uspořádání fosfolipidů se mění na symetrické a také dochází ke snížení množství cholesterolu v membráně (Nolan a Hammerstedt 1997).

Důležitou roli při oplození, konkrétně při kapacitaci spermie, hrají HCO_3^- ionty (Suzuki et al. 1994; Shi a Roldan 1995a). Díky HCO_3^- dochází k redistribuci cholesterolu do apikální části hlavičky spermie a poté v přítomnosti akceptoru cholesterolu (např. albuminu) dochází k vyvázání cholesterolu ze spermií (Flesch et al. 2001). Díky všem těmto změnám je membrána destabilizována a při AR může dojít k její fúzi s OAM (Nolan a Hammerstedt 1997). HCO_3^- také stimuluje enzym rozpustnou adenylátcyklázu, dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace cAMP (Chen et al. 2000). Rozpustná adenylátcykláza hraje důležitou roli i v motilitě spermií, neboť spermie s mutací v tomto enzymu nejsou schopné oplození právě kvůli poškození jejich motility (Esposito et al. 2004).

Při kapacitaci dochází k hyperpolarizaci PM (Zeng et al. 1995). Nekapacitované spermie mají depolarizovanou PM, při kapacitaci dochází k její hyperpolarizaci. Hyperpolarizace PM ovlivňuje vápníkové kanály, které jsou aktivovány nízkým napětím. Díky tomu dochází ke změně inaktivovaných kanálů do stavu, kdy jsou uzavřené a jsou připraveny k otevření po kontaktu s vajíčkem (Arnoult et al. 1996; Arnoult et al. 1999). Spermie, které neprošly kapacitací mají tyto kanály v inaktivním stavu, nemůže tedy dojít k předčasné AR (Arnoult et al. 1999).

Důležitou roli při oplození hrají vápníkové ionty (Iwamatsu a Chang 1971). Změna koncentrace intracelulárního Ca^{2+} je potřeba jak pro kapacitaci spermie, tak pro AR (Fraser a McDermott 1992). Díky Ca^{2+} může během AR dojít ke konečné fúzi OAM s PM spermie, neboť dochází k depolymeraci F-aktinu, který fúzi brání (Spungin et al. 1995). Ca^{2+} jsou také zodpovědné za změnu pohyblivosti spermií – tzv. hyperaktivaci (Ho et al. 2002). Na řízení hyperaktivace spermie se podílí CatSper 1-4 kanály, které se nacházejí na hlavní části bičíku a jsou ovládané napětím (Kirichok et al. 2006; Qi et al. 2007). Tyto kanály jsou pro hyperaktivaci spermie důležité, neboť u spermií myších samců nesoucích mutaci v CatSper 1-4 nedochází k vyvolání hyperaktivace a tito samci jsou neplodní (Quill et al. 2003; Jin et al. 2007; Qi et al. 2007).

V hlavičkách savčích spermií dochází při kapacitaci k polymeraci aktinu (Spungin et al. 1995; Brener et al. 2003). Polymerace aktinu je nezbytnou prerekvizitou AR, neboť působením inhibitoru polymerace aktinu – cytochalasinu D na spermie dochází k zablokování AR a snížení plodnosti spermií (Brener et al. 2003), jak již bylo zmíněno výše. Mohlo by to být nejspíše tím, že aktin poté nemůže sloužit jako opora pro proteiny, které se podílí na řízení AR.

5. Akrozomální reakce

Akrozomální reakce je děj, při kterém dochází k zhroucení aktinových sítí kortikálního cytoskeletu spermie, fúzi OAM s PM (Spungin et al. 1995) a následnému uvolnění obsahu akrozomu (Cardullo a Florman 1993). Díky tomuto ději může spermie překonat extracelulární obaly vajíčka a navázat se na jeho PM. Z tohoto důvodu je AR nezbytnou prerekvizitou pro fúzi vajíčka a spermie. Během AR navíc dochází k přemístění klíčových proteinů spermie, které se podílejí na vazbě a fúzi gamet, z akrozomální

membrány do místa kontaktu membrán spermie a vajíčka (více v podkapitole 5.3 Relokace klíčových proteinů). To, že je AR podstatná pro oplození, dokazuje i fakt, že spermie, které postrádají akrozom nebo neprošly AR nejsou oplození schopné (Kang-Decker et al. 2001; Dam et al. 2007).

5.1 Iniciace akrozomální reakce

5.1.1 Induktory AR

AR je děj indukovaný z vnějšího prostředí, přičemž stále není jasné, co přesně je induktorem AR. Mezi nejvíce diskutované induktory AR patří ZP a kumulární buňky, které vytváří extracelulární obaly okolo PM vajíčka. Je ale také možné, že se na iniciaci AR podílejí i některé alternativní faktory.

Ke spuštění AR *in vitro* může dojít i spontánně v médiu, do kterého nebyl přidán žádný induktor (Mortimer et al. 1989), jedná se o tzv. spontánní akrozomální reakci. Spermie, které podstoupí spontánní AR jsou dále schopné oplození (Naito et al. 1992). Protein CD-46, který se nachází na IAM spermie, ovlivňuje spontánní AR. Ve srovnání s WT spermii, mnohem více spermii bez CD-46 podstoupilo spontánní AR. Také bylo ukázáno, že tyto mutantní spermie jsou schopné oplození (Inoue et al. 2003). Navíc během AR dochází k přesunu proteinu CD-46 z akrozomu do ekvatoriálního segmentu, což by mohlo znamenat jeho roli ve fúzi spermie a vajíčka (Frolikova et al. 2016).

5.1.1.1 Zona pellucida

Zona pellucida je extracelulární obal, který obklopuje vajíčko savců. Mezi jednotlivými druhy savců se ZP liší v počtu glykoproteinů, ze kterých se skládá. Myší ZP se skládá ze 3 glykoproteinů: ZP1, ZP2 a ZP3 (Bleil a Wassarman 1980b). Oproti tomu potkaní, křeččí a lidská ZP se skládá ze 4 glykoproteinů: ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4 (Lefièvre et al. 2004; Hoodbhoy et al. 2005; Izquierdo-Rico et al. 2009).

Obecně bylo přijímáno, že k AR dochází po kontaktu kapacitované spermie se ZP. U myší je za induktor AR považován ZP3 glykoprotein (Bleil a Wassarman 1980a; Bleil a Wassarman 1983). O-vázané oligosacharidy na ZP3 slouží nejspíše jako místo, kam se spermie váže. Polypeptidový řetězec ZP3 hraje roli v zahájení AR, neboť proteolýzou řetězce nedochází k indukci AR, ale funkce ZP3 pro navázání spermie zůstává zachována (Florman et al. 1984; Florman a Wassarman 1985).

Zkoumána byla i iniciace AR lidských spermii, přičemž bylo zjištěno, že AR je u lidí indukována po vazbě spermie na ZP (Cross et al. 1988). Oproti myší ZP, lidská ZP se skládá ze 4 glykoproteinů: ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4 (Lefièvre et al. 2004). Oba glykoproteiny ZP3 i ZP4 jsou schopné indukovat AR. Když byly deglykosylovány (zbaveny N- i O-vázaných oligosacharidů), došlo v porovnání s glykosylovanými ZP3 a ZP4 k poklesu indukce AR stejně, jako když byly zbaveny jen N-vázaných oligosacharidů. Oproti tomu, když byly ZP3 a ZP4 zbaveny jen O-vázaných oligosacharidů, nebyl rozdíl v iniciaci AR významný. Tyto výsledky ukazují, že v iniciaci AR lidské spermie jsou zapojené spíše N-vázané oligosacharidy, zatímco O-vázané oligosacharidy se na indukci AR u lidí nejspíše nepodílí (Chiu et al.

2008), což je rozdílné oproti myši ZP. ZP3 a ZP4 nejsou jediné glykoproteiny lidské ZP schopné iniciace AR, také glykoprotein ZP1 je schopný indukovat AR (Ganguly et al. 2010).

Hypotézu, že k zahájení AR dochází po kontaktu spermie se ZP podporuje studie ukazující, že **PH-20** protein, který se nachází na PM myši a lidské spermie, má hyaluronidázovou aktivitu a umožňuje spermii s intaktním akrozomem proniknout skrz kumulární buňky, jejichž extracelulární matrix obsahuje kyselinu hyaluronovou. Když byla na PH-20 navázána protilátka, došlo k zablokování průniku spermie skrz kumulární buňky (Lin et al. 1994). Oproti tomu další studie ukázala, že myši spermie bez proteinu PH-20 jsou plodné. U těchto spermií pouze docházelo k poklesu počtu oplozených vajíček oproti kontrole, což bylo nejspíše způsobeno zpožděním v průniku skrz kumulární buňky. Navíc byl objeven další protein s hyaluronidázovou aktivitou, který je během AR uvolňován z akrozomu, což znamená, že PH-20 není jediný protein s hyaluronidázovou aktivitou nacházející se v myši spermii, jak bylo dříve tvrzeno (Baba et al. 2002). Tyto výsledky sice nevyvracejí to, že k AR dochází na ZP, ale ukazují, že protein PH-20 nebude nezbytně nutný k oplození vajíčka, alespoň co se týká myši. Ovšem to, že u mutantních spermií bez PH-20 došlo k poklesu míry oplození, dokazuje, že tento protein usnadňuje průchod skrz kumulární buňky.

K zamyšlení stojí fakt, že v některých *in vitro* studiích, které se zabývaly objasněním role ZP jako možného induktoru AR a které tuto její funkci potvrdily, byla použita vajíčka zbavená kumulárních buněk (Bleil a Wassarman 1980a; Florman a Storey 1982; Bleil a Wassarman 1983). Je možné, že tato skutečnost mohla negativně ovlivnit získané výsledky a *in vivo* se kumulární buňky na iniciaci AR významnou měrou podílejí.

5.1.1.2 Kumulární buňky

Zkoumána byla i role kumulárních buněk v oplození. Když byly kumulární buňky odstraněny z myších vajíček, došlo k poklesu míry jejich oplodnění (Cross a Brinster 1970; Miyamoto a Chang 1972). *In vitro* téměř 50 % spermií, které podstoupily AR před kontaktem se ZP, bylo schopných ZP úspěšně projít. Na rozdíl od toho jen 2 % spermií s nedotčenými akrozomy před kontaktem se ZP jí úspěšně pronikly. Většina (77 %) spermií kapacitovaných *in vivo*, které byly pozorovány v kumulárních buňkách, podstoupily AR, přičemž nebyly pozorovány žádné spermie, které by se vázaly na ZP a měly intaktní akrozom (Jin et al. 2011). Z těchto údajů vyplývá, že spermie, které podstoupí AR před kontaktem se ZP, mají větší šanci skrz ni projít, a to platí jak v *in vitro*, tak v *in vivo* podmínkách. Oproti tomu u křečků (Miyamoto a Chang 1972) a králíků (Fraser et al. 1971; Chang et al. 1971) rozdíl v míře oplození u vajíček s kumulárními buňkami a bez nich pozorován nebyl. I v další studii bylo pozorováno, že u křečků nedochází k AR na kumulárních buňkách, ale na ZP (Yudin et al. 1988). Mohlo by to tedy znamenat, že role kumulárních buněk bude nejspíše druhově specifická a také, že ZP nemusí být u všech druhů spouštěčem AR.

Objevení a popsání proteinu **NYD-SP8** také podpořilo názor, že kumulární buňky spouští AR. Tento protein se nachází na PM na hlavičce lidské a myši spermie, kde je upevněn pomocí GPI (glykofosfatidylinositolové) kotvy. NYD-SP8 se váže na kumulární buňky, přičemž po jeho navázání dochází v kumulárních buňkách ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} a uvolnění progesteronu (Yin et al. 2009), který je schopný indukovat AR. Bylo ukázáno, že kumulární buňky a progesteron zvýšily počet spermií, které podstoupily AR v porovnání s kontrolním vzorkem. Progesteron byl navíc schopný tento počet znovu navýšit poté, co došlo k jeho snížení při použití protilátky proti NYD-SP8 (Yin et al. 2009). Z toho vyplývá, že na zahájení AR u myši by se mohly podílet právě kumulární buňky a ne ZP.

Jak již bylo zmíněno v odstavci výše, kumulární buňky produkují **progesteron** (Chian et al. 1999; Teves et al. 2006; Oren-Benaroya et al. 2008; Guidobaldi et al. 2008), který je schopný indukovat AR (Osman et al. 1989; Roldan et al. 1994; Shi a Roldan 1995b). Během iniciace AR dochází díky progesteronu ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} v hlavičce spermie, což je potřeba k zahájení AR (Thomas a Meizel 1988; Meizel et al. 1997). Progesteron totiž aktivuje Ca^{2+} kanály, jako například CatSper kanály, které zprostředkovávají influx Ca^{2+} (Strünker et al. 2011). Dále se na PM spermií nachází receptory pro progesteron, přičemž při navázání protilátky na tyto receptory dochází k inhibici AR indukované progesteronem (Sabeur et al. 1996; Cheng et al. 1998; Luconi et al. 2004).

Kumulární buňky vylučují progesteron, přičemž okolo nich dochází ke vzniku gradientu progesteronu (Teves et al. 2006). Největší koncentrace progesteronu je tedy v okolí vajíčka a dále od vajíčka se jeho koncentrace snižuje. Při nízké koncentraci progesteronu dochází ke zvýšení aktivity tyrosinových kináz a indukci motility spermie. Poté co dochází ke zvyšování koncentrace progesteronu, dochází k hyperaktivaci a indukci AR spermie (Sagare-Patil et al. 2012). Z toho vyplývá, že gradient progesteronu hraje důležitou roli v oplození, neboť jeho různé koncentrace vyvolávají a regulují aktivitu několika procesů odehrávajících se ve spermii včetně AR.

V úvahu přichází i to, že AR může spouštět více faktorů. AR indukuje také např. kyselina γ -aminomáselná (GABA). Navíc bylo ukázáno, že současným působením GABA a progesteronu podstoupilo AR více spermií (cca 55 %) v porovnání s působením GABA (cca 40 %) a progesteronu (cca 30 %) samostatně (Shi et al. 1997).

Kumulární buňky vylučují i jiné látky kromě progesteronu. Mezi ně patří např. **lysofosfatidylcholin** (LPC) a **lysofosfatidová kyselina** (LPA), přičemž tyto látky jsou schopné indukovat AR (Garbi et al. 2000; Gómez-Torres et al. 2015). Je tedy možné, že se na indukci AR podílí více látek vylučovaných kumulárními buňkami.

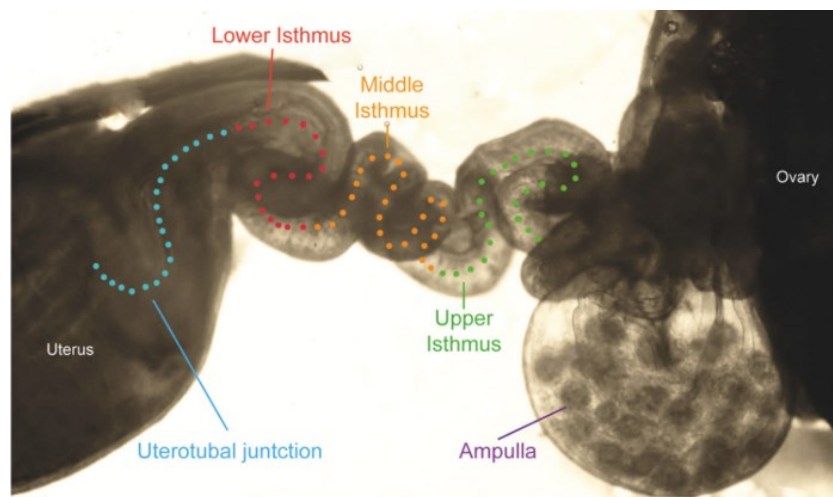
5.1.1.3 Alternativní induktory AR

Je také možné, že induktorem AR nemusí být ani ZP ani kumulární buňky, ale může se jednat o alternativní faktory. Jedním z nich by mohlo být například extracelulární ATP (Foresta et al. 1992). V děloze potkanů při estrálním cyklu sice ke změnám jeho koncentrace nedochází, ale během říje dochází v tekutině ve vejcovodech k významnému zvýšení koncentrace ATP, což stačí k indukci AR (Torres-Fuentes et al. 2015).

5.1.2 Místo iniciace akrozomální reakce *in vivo*

Hasuwa et al. (2010) vytvořili transgenní myší linii, přičemž spermie těchto myší obsahují zelený fluorescenční protein (GFP), který je exprimován uvnitř akrozomu, a červený fluorescenční protein (DsRed2), který je exprimován v mitochondriích v krčku spermie. Díky GFP může být pozorováno, zda má spermie intaktní akrozom nebo zda spermie podstoupila AR, což se projeví právě ztrátou GFP. DsRed2 slouží k tomu, aby mohla být spermie pozorována i poté, co dojde k AR, tedy poté, co dochází ke ztrátě zeleného signálu. Vytvoření této myší linie ovlivnilo zásadním způsobem zkoumání AR a otevřelo otázku, v jakém místě reprodukčního traktu samice k AR *in vivo* dochází.

Pomocí fluorescenčního značení popsaného výše mohly být pozorovány živé ejakulované myší spermie pohybující se v samičím reprodukčním traktu, protože fluorescenční signál mohl být zaznamenáván i skrz stěnu vejcovodu. Díky tomu mohlo být zkoumáno, jak dochází k migraci spermií a oplození *in vivo* v samičím reprodukčním traktu (obr. 3).

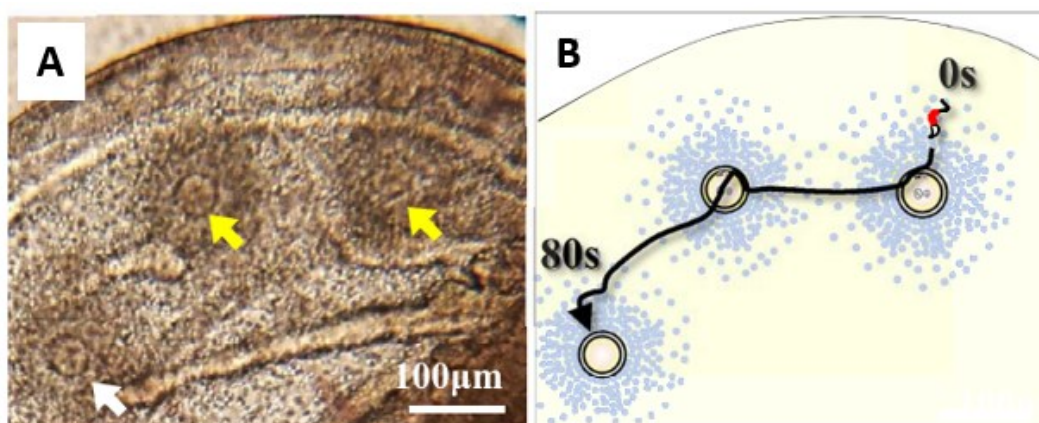


Obr. 3: Části vejcovodu zleva: děloha (uterus), uterotubální spoj (uterotubal junction) modře, spodní (lower) isthmus červeně, střední (middle) isthmus žlutě, horní (upper) isthmus zeleně, ampulla (ampulla) fialově, vaječník (ovary) (La Spina et al. 2016)

1,5 hodiny po páření se nejvíce spermií nacházelo v uterotubálním spoji a spodním a středním isthmu, přičemž u většiny (95-97 %) spermií v těchto oblastech reprodukčního traktu nedošlo k AR. Po 4 hodinách od doby páření se do horního isthmusu a ampule dostalo jen malé množství spermií. V horním isthmusu prošlo AR 38 % spermií a v ampule prošly AR téměř všechny spermie, jen u 5 % spermií k AR nedošlo. Některé spermie se během migrace vejcovodem vázaly na epitel jak uterotubálního spoje, tak isthmusu. Údaje z této studie naznačují, že k AR myši spermie dochází nejspíše již v horním isthmusu. Dále bylo pozorováno, že 7 hodin po páření došlo k oplození většiny (90 %) vajíček, ve srovnání s množstvím oplozených vajíček (40 %) po 4 hodinách po páření (La Spina et al. 2016).

Pohyb myších spermií reprodukčním traktem samice byl zkoumán i v další studii. V horním isthmusu bylo po AR 71 % spermií (Muro et al. 2016). To souhlasí s předchozími studiemi v tom, že k AR dochází nejspíše v horním isthmusu. 4 hodiny po páření se v ampule se 4 vajíčky nacházely jen 3 spermie, přičemž každá spermie oplodnila jedno vajíčko. 6 hodin po páření bylo pozorováno 9 samic. Celkem z 87 vajíček bylo pomocí 72 spermií oplodněno 72 vajíček s tím, že se v ampule nenacházely žádné volně se pohybující spermie (Muro et al. 2016). To dokazuje, že všechny spermie nacházející se v ampule byly schopné oplodnit vajíčko a žádné se tam nevyskytovaly navíc.

I v další studii byl pozorován pohyb spermií vejcovodem stejně jako v předchozích dvou, ale navíc bylo také zkoumáno chování spermie v ampule. Když se spermie, která již podstoupila AR, dostala k oplozenému vajíčku, prošla kumulárními buňkami k ZP, kde se přichytila. Následně ale došlo k jejímu odpoutání, úniku z kumulárních buněk a postupné migraci k dalšímu oplozenému vajíčku, kde se toto chování opakovalo. Poté, co spermie dorazila k neoplozenému vajíčku, došlo k jeho oplození (obr. 4). Také bylo pozorováno, že spermie jsou schopné oplodnit vajíčko s kumulárními buňkami ještě 4 hodiny poté, co podstoupí AR (Hino et al. 2016).



Obr. 4: A: 2 oplozená (žluté šipky) a 1 neoplozené vajíčko (bílá šipka) v ampule, B: schéma pohybu spermie (Hino et al. 2016)

Všechny tyto 3 studie (La Spina et al. 2016; Muro et al. 2016; Hino et al. 2016) ukazují, že v porovnání s oplozením vajíček *in vitro*, kdy jsou vajíčka oplozena přibližně v rámci 1 hodiny (Baba et al. 1994), oplození vajíček *in vivo* trvá déle. Je to způsobené nejspíše tím, že se spermie přichytávají na epitel stěn isthmu (Suarez 1987), jak bylo i v těchto studiích ukázáno.

Přichytáváním spermií na stěny vejcovodu, konkrétně na epitel v oblasti isthmu, dochází ke vzniku tzv. oviduktálního rezervoáru spermií (Suarez 2008). Rezervoár může sloužit jako ochrana před oplozením vajíčka více spermiemi (polyspermií), neboť k uvolňování spermií z rezervoáru dochází postupně (Suarez 2008). Dokazuje to také to, že když bylo do ampuly prasat uměle vloženo velké množství kapacitovaných spermií, došlo ke zvýšení výskytu polyspermie (Hunter 1973). Další funkce rezervoáru je nejspíše v tom, že udržuje spermie, které jsou přichycené na epitel, životaschopné a dále schopné oplození, a tím dochází k synchronizaci mezi ovulací a kapacitací spermií (Timothy Smith a Yanagimachi 1990; Pollard et al. 1991). Uvolnění spermií z rezervoáru může být způsobeno změnami, kterými spermie prochází v rámci kapacitace (Ignotz et al. 2001). Při kapacitaci dochází k hyperaktivaci, přičemž bylo objeveno, že právě hyperaktivované spermie se byly schopné odvázat od epitelu vejcovodů (Demott a Suarez 1992). To potvrzuje i to, že mutantní spermie bez CatSper kanálů, které se podílejí na hyperaktivaci, nejsou schopné z oviduktálního rezervoáru vycestovat, tyto spermie zůstávají navázané na epitelu (Ho et al. 2009).

5.2 Uvolňování akrozomální matrix

Akrozom se skládá ze 2 biochemických kompartmentů: AM a rozpustné složky akrozomu (Hardy et al. 1991). Kromě těchto biochemických kompartmentů, je akrozom rozdělen na několik domén i morfologicky (Olson a Winfrey 1985; 1994). Např. u křečků se nachází 2 matrixové domény, které jsou označeny jako M1 a M2, lišící se elektronovou hustotou. Tyto domény jsou v kontaktu s OAM (Yanagimachi a Noda 1970; Olson et al. 1988). U morčat jsou morfologické domény tři – M1, M2, M3 (Olson et al. 1987; Westbrook-Case et al. 1994), přičemž např. v M1 doméně se nachází protein AM67, homolog myšího sp56 proteinu (Foster et al. 1997), a v M3 doméně je AM50 protein (Westbrook-Case et al. 1994). Tyto domény by se mohly podílet na postupném uvolňování akrozomálního obsahu.

Při pozorování, jak dochází k uvolňování obsahu akrozomu, bylo zaznamenáno, že nejdříve dochází k uvolnění rozpustné složky akrozomu (jako např. CRISP-2), zatímco proteiny AM byly uvolněny až později od indukce AR s tím, že protein AM67 byl ze spermií uvolněn dříve než protein AM50. To znamená, že nedochází k uvolnění veškerého obsahu akrozomu najednou, ale akrozomální obsah je uvolňován postupně, spermie prochází přechodnými stádii, než dojde ke kompletnímu vylití obsahu akrozomu (Kim et al. 2001b).

V další studii bylo sledování postupného uvolňování obsahu akrozomu umožněno díky GFP a proteinu sp56 (Kim a Gerton 2003). Jak již je uvedeno výše, za lokalizaci sp56 byla původně považována PM spermie (Bleil a Wassarman 1990), ale nakonec bylo objeveno, že se tento protein nachází v AM (Kim et al. 2001a). To vedlo k přehodnocení role AM v AR. Pomocí GFP, který byl řízen proacrosinovým promotorem, a vazby spermie na kuličky s navázanými anti-sp56 protilátkami, byla identifikována 4 různá stádia spermie. Nejdříve docházelo k postupnému vázání spermií s GFP na kuličky s anti-sp56, poté ke ztrátě GFP, a nakonec se spermie přestaly vázat na kuličky, což značilo uvolnění veškerého akrozomálního obsahu (Kim a Gerton 2003). Dále bylo zkoumáno, jaká je role jednotlivých látek v médiu pro kapacitaci ve vztahu k AR. Když jednotlivě vynechali HCO_3^- , glukózu nebo BSA, došlo ke ztrátě GFP stejně jako k němu došlo v kompletním médiu a spermie prošly všemi stádii, došlo ke spontánní AR. Oproti tomu, když při inkubaci spermií v médiu chyběly vápenaté ionty, GFP uvolněn nebyl, spermie zůstaly v prvním stádiu. Z toho vyplývá, že kapacitace, a především vápenaté ionty, regulují uvolnění akrozomálních proteinů při spontánní AR. Na základě těchto výsledků byl navrhnout model AR – model akrozomální exocytózy, který předpokládá, že již během kapacitace spermie dochází k dokování OAM s PM, přičemž když dojde k překročení určité prahové hodnoty signálů pro exocytózu, podstoupí spermie spontánní AR. Pokud je ovšem spermie v přítomnosti vajíčka a naváže se na ZP, dochází ke zrychlení fúze membrán a postupnému vylití akrozomálního obsahu. Tento model akrozomální exocytózy předpokládá, že spontánní AR je přirozený děj, spermie před iniciací AR nemusí mít intaktní akrozom, a že ZP spíše zrychluje akrozomální exocytózu, během které dochází k postupnému uvolňování obsahu akrozomu, než že by ji indukovala, neboť už během kapacitace dochází k postupnému zahájení exocytózy (Kim a Gerton 2003).

5.3 Relokace klíčových proteinů

Během AR dochází k relokaci klíčových proteinů účastnících se vazby a fúze spermie na vajíčko do oblasti ekvatoriálního segmentu, který je prvním místem kontaktu membrán spermie a vajíčka a který se stává fúzogenním až po AR (Bedford et al. 1979; Takano et al. 1993).

Jedním z proteinů, k jehož přemístění dochází, je protein **Izumo**, který je nutný pro fúzi vajíčka a spermie (Inoue et al. 2005). Izumo protein je během AR přemístěn z akrozomální čepičky, konkrétně z vnější a vnitřní akrozomální membrány, do oblasti ekvatoriálního segmentu (Satouh et al. 2012). Důležitost Izumo proteinu dokazuje to, že samci bez Izumo proteinu jsou neplodní, neboť jejich spermie, které tento protein postrádají, nejsou schopné fúze s vajíčkem (Inoue et al. 2005). U některých hlodavců byla dokonce popsána souvislost mezi mírou jejich promiskuitního chování a přemístěním Izumo proteinu během spontánní AR (Sebkova et al. 2014).

Izumo není jediný protein nutný pro fúzi gamet. Nově díky průlomové technologii CRISPR-Cas9, která umožňuje editování genomu, byly v myších spermiích identifikovány 3 proteiny – SOF1, TMEM95 a SPACA6, které jsou také důležité pro fúzi spermie s vajíčkem. Samci, jejichž mutantní spermie tyto proteiny postrádají, jsou neplodní, protože tyto spermie nejsou schopné splynout s PM vajíčka. Objevení těchto proteinů spolu s CRISPR-Cas9 technologií může významným způsobem přispět k celkovému pochopení molekulárního mechanismu fúze gamet (Noda et al. 2020).

Dalším proteinem, který je během AR přemístěn do PM v ekvatoriálním segmentu, je **ekvatorin** (Yoshida et al. 2010). Ekvatorin je důležitý protein zapojený do fúze spermie a vajíčka, protože při použití protilátek proti tomuto proteinu dochází ke snížení míry oplození, přičemž tyto protilátky neovlivnily ani motilitu spermie, ani její vazbu a průnik skrz ZP (Toshimori et al. 1998). Použití protilátky proti ekvatorinu navíc snížilo míru oplodnění i v *in vivo* podmínkách, kdy byly protilátky vstříknuty přímo do ampuly vejcovodu (Yoshinaga et al. 2001).

Mezi další proteiny patří i protein podobný lyozymu (sperm lyozyme-like protein) SLLP₁, který se podílí nejspíše na adhezi spermie na vajíčko a jejich fúzi. SLLP₁ se nachází v anteriorní části akrozomu a po AR dochází k jeho přemístění také do ekvatoriálního segmentu spermie (Herrero et al. 2005).

6. Mechanismus řízení AR

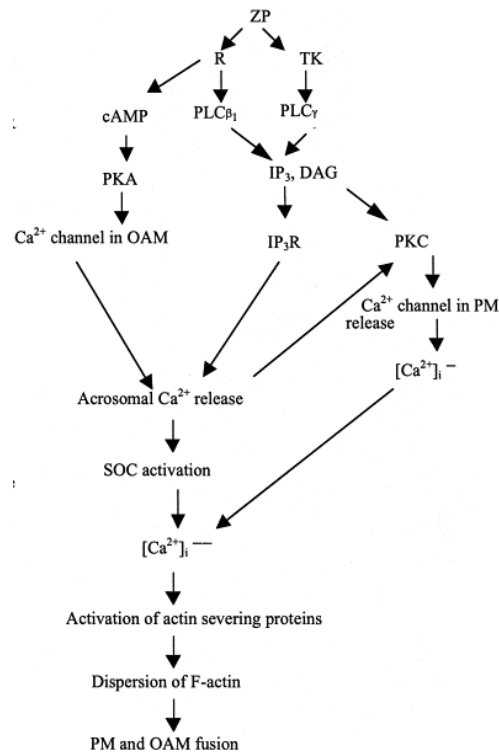
Po kontaktu spermie se ZP3 dochází k depolarizaci membrány spermie, což vede přes další mediátory až ke zvýšení pH (Florman et al. 1989), zvýšení koncentrace Ca²⁺ a AR (Arnoult et al. 1996a).

ZP aktivuje receptory spřažené s G proteiny, které se účastní AR (Endo et al. 1987; 1988; Franken et al. 1996), přičemž tyto G proteiny jsou poté schopné aktivovat fosfolipázu C (PLC β1) (Lee et al. 1992). Také tyrosinová fosforylace hraje roli při AR, což bylo dokázáno na receptoru pro epidermální růstový faktor (EGF), který se nachází v apikální části hlavičky spermie tura domácího a navázáním EGF na tento receptor dojde k indukci AR prostřednictvím aktivace tyrosinkinázy. To bylo dokázáno pomocí inhibitoru tyrosinkinázy, při jeho použití totiž došlo k inhibici AR indukované EGF (Lax et al. 1994). Lokalizace receptoru pro EGF v akrozomální oblasti spermie a jeho zvýšená fosforylace po inkubaci s EGF byla prokázána i v další studii (Naz a Ahmad 1992). Navázáním EGF na receptor spermie dojde také k přesunu PLC γ do PM, přičemž F-aktin slouží jako podpora PLC γ. Zvýšením koncentrace Ca²⁺ dojde pomocí PLC γ k rozštěpení membránových fosfolipidů (Spungin et al. 1995). Jedním z produktů štěpení je diacylglycerol (DAG), který 1) usnadňuje fúzi membrán (Siegel et al. 1989) a 2) aktivuje proteinkinázu C (PKC), která se dále podílí na regulaci AR (De Jonge et al. 1991b; Breitbart et al. 1992) tím, že aktivuje vápníkové kanály, které se nachází na PM, přičemž se jedná o kanály závislé na napětí (Spungin a Breitbart 1996). Druhým produktem štěpení je inositoltrisfosfát (IP₃). Receptor pro IP₃ (IP₃R) byl u spermie lokalizován na akrozomální čepičce, přičemž jeho lokalizace je přizpůsobena tvaru akrozomu jednotlivých druhů. Navázáním IP₃ na tento receptor dochází nejspíše k uvolnění Ca²⁺

z akrozomu (Walensky a Snyder 1995). K uvolnění Ca^{2+} z akrozomu dochází i po přidání cAMP, přičemž toto uvolnění bylo částečně inhibováno pomocí inhibitoru (H89) cAMP-dependentní proteinkinázy A (PKA). To naznačuje, že tento kanál je závislý na cAMP nebo se také může jednat o kanál závislý na fosforylaci PKA (Spungin a Breitbart 1996), která se také účastní AR (De Jonge et al. 1991a; Lefièvre et al. 2002) stejně jako adenylátcykláza (De Jonge et al. 1991a; Leclerc a Kopf 1995). Také bylo objeveno, že při AR dochází k aktivaci kanálů ovládaných intracelulární zásobou vápníku (store-operated channel SOC). Konkrétně ZP3 glykoprotein způsobí influx Ca^{2+} v myší spermii, ke kterému dojde právě díky aktivaci SOC (O'Toole et al. 2000).

Akrozom i PM spermie obsahují také vápníkové pumpy, které pumpují Ca^{2+} pryč z cytoplazmy (Spungin a Breitbart 1996). Při použití inhibitoru Ca^{2+} pump endoplazmatického retikula (thapsigarginu) (Thastrup et al. 1990), došlo k inhibici pumpy na akrozomu (Spungin a Breitbart 1996). Navíc bylo ukázáno, že v lidské spermii je thapsigargin schopný zvýšit koncentraci Ca^{2+} (Blackmore 1993) a také indukovat AR (Meizel a Turner 1993). Tudíž, když je Ca^{2+} pumpa na akrozomu inhibována thapsigarginem a ten je zároveň schopný indukovat AR, vyplývá z toho, že akrozom slouží jako zásobárna vápníku, která je poté při AR využita (Spungin a Breitbart 1996). To, že akrozom nejspíše slouží jako zásobárna vápníku dokazuje i to, že se na OAM nachází IP_3R a že po navázání IP_3 dochází k uvolnění Ca^{2+} z akrozomu (Walensky a Snyder 1995). Po uvolnění Ca^{2+} dochází k fúzi OAM s PM spermie, aby poté mohlo dojít k uvolnění akrozomálního obsahu (Cardullo a Florman 1993). Fúze je závislá na Ca^{2+} , obě membrány musí být kapacitované a navíc před samotnou fúzí dochází k depolymeraci F-aktinu (Spungin et al. 1995).

Souhrnné schéma mechanismu AR (obr. 5): *Zona pellucida* (ZP) se váže na receptor spřažený s G proteiny (R), který je schopný aktivovat PLC β_1 , a na receptor tyrosinkinázy (TK), který aktivuje PLC γ . Aktivované fosfolipázy poté produkují inositoltrisfosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG), přičemž IP₃ se váže na svůj receptor (IP₃R) a dochází k uvolnění Ca²⁺ z akrozomu, na čemž se podílí i cAMP a cAMP-dependentní PKA. DAG aktivuje proteinkázu C (PKC), která aktivuje Ca²⁺ kanály na PM spermie a dochází k uvolnění Ca²⁺. Dále dochází k aktivaci kanálů ovládaných intracelulární zásobou vápníku (SOC). Po zvýšení koncentrace Ca²⁺ dochází k aktivaci aktin-vazebných proteinů, dochází k depolymeraci F-aktinu a fúzi plazmatické membrány (PM) spermie s vnější akrozomální membránou (OAM).



Obr. 5: souhrnné schéma mechanismu AR (Breitbart 2002)

7. Závěr

Akrozomální reakce je důležitou součástí oplození. Spermie musí podstoupit AR, aby mohlo dojít k vylíčení akrozomálního obsahu, průniku spermie skrz obaly vajíčka a fúzi vajíčka a spermie. Spermie, které nemají akrozom nebo neprošly AR, nejsou oplození schopné, což potvrzuje AR jako nezbytnou součást oplození. Důležitost AR také spočívá v tom, že během ní dochází ve spermiu k relokaci některých proteinů, například Izumo a ekvatorinu, do ekvatoriálního segmentu, které se poté podílejí na fúzi spermie s vajíčkem.

Akrozom je nezbytnou součástí spermie, avšak jeho biogeneze není stále zcela jasná. Je možné, že akrozom pochází z Golgiho aparátu, ale nejnovější studie naznačují, že akrozom by mohl patřit mezi organely, které jsou příbuzné lysozomu. Díky zkoumání role genu spojeného s autofágií – *Atg7*, bylo objeveno, že akrozom pochází nejspíše z autolysozomu a že autofágie je součástí jeho biogeneze.

Nezbytnou prerekvizitou pro AR je kapacitace, při které dochází mimo jiné ke změnám v PM spermie, snížení obsahu cholesterolu a změně uspořádání fosfolipidů, což umožní její fúzi. Během kapacitace dochází k hyperaktivaci spermií, změně motility spermií, která umožňuje jejich vycestování z ovidukálního rezervoáru. Ten vzniká přichytáváním spermií na epitel stěn vejcovodu. Ovidukální rezervoár spermií slouží jako ochrana před polyspermií a také udržuje spermie, které jsou přichycené na epitelální buňky stěn oviduktu, dále schopné oplození.

Stále není jasné, co je induktorem AR. K iniciaci AR spermie může dojít *in vitro* i spontánně bez přidání induktorů, jedná se o tzv. spontánní AR, přičemž tyto spermie jsou schopné oplození. Dále bylo objeveno, že spontánní AR ovlivňuje protein CD-46, který se nachází na IAM.

Nejvíce diskutovaným induktorem AR je *zona pellucida*, u myši je to konkrétně ZP3 glykoprotein a u lidské ZP, která se oproti myši skládá ze 4 glykoproteinů, je AR schopný indukovat ZP3, ZP4 ale také ZP1 glykoprotein. V některých studiích, kde byl zkoumán vliv ZP na indukci AR, bylo ovšem pracováno s vajíčky, která byla zbavená kumulárních buněk. Tím pádem mohl být vliv kumulárních buněk na iniciaci AR opomenutý. V dalších studiích ovšem byla zkoumána i role kumulárních buněk v indukci AR, přičemž u myši většina spermií v kumulárních buňkách vajíčka podstoupila AR. Tento názor, že by kumulární buňky mohly spouštět AR, byl podpořen i objevením proteinu NYD-SP8, který se nachází na hlavičce spermie a který se váže na kumulární buňky. Díky tomu dochází k uvolnění progesteronu, který stimuluje AR. V samičím reprodukčním traktu vzniká gradient progesteronu, přičemž v blízkosti kumulárních buněk je ho nejvíce a dále od vajíčka se jeho koncentrace snižuje. Při nízké koncentraci progesteronu dochází mimo jiné k indukci motility a při vyšších koncentracích dochází k hyperaktivaci a indukci AR spermie. Kumulární buňky vylučují i jiné látky, jako např. LPC a LPA, které jsou schopné indukovat AR.

U křečků se však vliv kumulárních buněk na iniciaci AR neprokázal. Je tedy možné a zůstává to otázkou, zda zahájení AR je u všech savců stejné, nebo jestli se jedná o druhově specifický proces. Také je možné, že AR nemusí indukovat ZP nebo látky vylučované kumulárními buňkami, ale že AR může být iniciována alternativními faktory, jako je ATP. Také se může jednat o kombinaci více těchto faktorů.

V poslední době došlo díky novým studiím k objasnění, kde v rámci reprodukčního traktu myši samice k AR dochází. Tato pozorování byla umožněna vytvořením transgenní myši linie, jejichž spermie obsahovaly GFP exprimovaný v akrozomu a DsRed2 exprimovaný v mitochondriích v krčku. Bylo pozorováno, že většina spermií prošla AR v horním isthmu a v ampule se nacházelo jen velmi malé množství spermií, přičemž všechny byly schopné oplodnit vajíčka.

Došlo i ke změně pohledu na uvolňování obsahu akrozomu. Dřívější pohled na uvolňování obsahu akrozomu byl, že k němu dochází najednou a že existují jen 2 stavy spermie – spermie s intaktním akrozomem, u které k AR nedošlo a poté spermie, co už AR prošla. Bylo ale objeveno, že uvolňování akrozomálního obsahu je postupné a že spermie prochází alespoň 4 stádii.

Obsah akrozomu je tvořen rozpustnou složkou a AM. Součástí AM je proteáza acrosin, jejíž role při oplození je druhově specifická. U myši se nejspíše významně nepodílí na průniku obaly vajíčka. Oproti tomu ale u křečků hraje roli v penetraci skrz ZP a u potkanů skrz kumulární buňky. Součástí akrozomálního obsahu je také zonadhesin, který se váže druhově specificky na ZP.

I když bylo objeveno již několik proteinů, které se účastní AR, přesný mechanismus včetně jeho regulace zůstává nejasný. Podstatnou roli v AR však hraje aktin. Slouží jako opora pro ostatní proteiny, a navíc také jako bariéra, která zabraňuje fúzi PM a OAM, dokud nedojde ke zvýšení Ca^{2+} a depolymeraci F-aktinu.

Spermie se na vajíčko váže nejspíše přes receptory sprzęžené s G proteiny a přes receptory tyrosinkinázy, následně dochází k aktivaci fosfolipáz, které produkují IP_3 a DAG. Navázáním IP_3 na svůj receptor dochází k uvolnění Ca^{2+} z akrozomu, přičemž se na tom podílí i cAMP s cAMP-dependentní PKA. DAG aktivuje proteinkinázu C, dochází k aktivaci kanálů v PM spermie a uvolnění Ca^{2+} . K dalšímu influxu Ca^{2+} dojde po aktivaci kanálů ovládaných intracelulární zásobou vápníku. Díky zvýšené koncentraci Ca^{2+} dochází k depolymeraci F-aktinu a následuje konečná fúze PM s OAM.

Přestože došlo k několika novým objevům, jako např. kde v reprodukčním traktu dochází k AR, nebo také k objasnění uvolňování obsahu akrozomu, stále není jasné, co je tím induktorem AR. Jedná se o ZP glykoproteiny nebo o progesteron či jiné látky vylučované kumulárními buňkami? Anebo AR spouští něco úplně jiného? Tyto otázky spolu s detailnějším prostudováním biogeneze akrozomu a mechanismu AR včetně jeho regulace zůstávají otevřené pro další studie.

8. Seznam použité literatury

ALLISON, A. C. a E. F. HARTREE, 1970. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *Journal of reproduction and fertility* [online]. **21**(3), 501–515. ISSN 00224251. Dostupné z: doi:10.1530/jrf.0.0210501

ARNOULT, C, Y ZENG a H M FLORMAN, 1996a. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *Journal of Cell Biology* [online]. **134**(3), 637–645. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.134.3.637

ARNOULT, Christophe, Richard A. CARDULLO, Jose R. LEMOS a Harvey M. FLORMAN, 1996b. Activation of mouse sperm T-type Ca²⁺ channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **93**(23), 13004–13009. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.93.23.13004

ARNOULT, Christophe, Imrana G. KAZAM, Pablo E. VISCONTI, Gregory S. KOPF, Michel VILLAZ a Harvey M. FLORMAN, 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **96**(12), 6757–6762. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.96.12.6757

AUSTIN, C. R., 1951. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Australian journal of scientific research. Ser. B: Biological sciences* [online]. **4**(4), 581–596. ISSN 0004-9417. Dostupné z: doi:10.1071/bi9510581

AUSTIN, C. R., 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* [online]. **170**(4321), 326. ISSN 00280836. Dostupné z: doi:10.1038/170326a0

BABA, Daichi, Shin ichi KASHIWABARA, Arata HONDA, Kazuo YAMAGATA, Qing WU, Masahito IKAWA, Masaru OKABE a Tadashi BABA, 2002. Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *The Journal of biological chemistry* [online]. **277**(33), 30310–30314. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M204596200

BABA, Tadashi, Sadahiro AZUMA, Shin Ichi KASHIWABARA a Yutaka TOYODA, 1994. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **269**(50), 31845–31849. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/s0021-9258(18)31772-1

*BABA, Tadashi, Yuichi MICHIKAWA, Kazuhiko KAWAKURA a Yuji ARAI, 1989. Activation of boar proacrosin is effected by processing at both N-and C-terminal portions of the zymogen molecule.

FEBS Letters [online]. **244**(1), 132–136. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(89)81178-0

BEDFORD, J. M., H. D.M. MOORE a L. E. FRANKLIN, 1979. Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Experimental Cell Research* [online]. **119**(1), 119–126. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1016/0014-4827(79)90341-0

BENDAHMANE, Malika, Christopher LYNCH a Daulat R.P. TULSIANI, 2001. Calmodulin signals capacitation and triggers the agonist-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **390**(1), 1–8. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1006/abbi.2001.2364

BLACKMORE, P. F., 1993. Thapsigargin elevates and potentiates the ability of progesterone to increase intracellular free calcium in human sperm: possible role of perinuclear calcium. *Cell Calcium* [online]. **14**(1), 53–60. ISSN 01434160. Dostupné z: doi:10.1016/0143-4160(93)90018-2

BLEIL, J. D. a P. M. WASSARMAN, 1990. Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **87**(14), 5563–5567. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.87.14.5563

BLEIL, Jeffrey D. a Paul M. WASSARMAN, 1980a. Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* [online]. **20**(3), 873–882. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(80)90334-7

BLEIL, Jeffrey D. a Paul M. WASSARMAN, 1980b. Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Developmental Biology* [online]. **76**(1), 185–202. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/0012-1606(80)90371-1

BLEIL, Jeffrey D. a Paul M. WASSARMAN, 1983. Sperm-egg interactions in the mouse: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Developmental Biology* [online]. **95**(2), 317–324. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/0012-1606(83)90032-5

BREITBART, H., J. LAX, R. ROTEM a Z. NAOR, 1992. Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochemical Journal* [online]. **281**(2), 473–476. ISSN 02646021. Dostupné z: doi:10.1042/bj2810473

BREITBART, Haim, 2002. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. **187**(1-2), 139–144. ISSN 03037207. Dostupné z: doi:10.1016/S0303-7207(01)00704-3

BRENER, Ephraim, Sara RUBINSTEIN, Gili COHEN, Keren SHTERNALL, Joel RIVLIN a Haim BREITBART, 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction* [online]. **68**(3), 837–845. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.102.009233

*BUFFONE, Mariano G., James A. FOSTER a George L. GERTON, 2008. The role of the acrosomal matrix in fertilization. *International Journal of Developmental Biology* [online]. **52**(5–6), 511–522. ISSN 02146282. Dostupné z: doi:10.1387/ijdb.072532mb

CABELLO-AGÜEROS, José F., Enrique O. HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ a Adela MÚJICA, 2003. The role of F-actin cytoskeleton-associated gelsolin in the guinea pig capacitation and acrosome reaction. *Cell Motility and the Cytoskeleton* [online]. **56**(2), 94–108. ISSN 08861544. Dostupné z: doi:10.1002/cm.10135

CARDULLO, Richard A. a Harvey M. FLORMAN, 1993. Strategies and methods for evaluating acrosome reaction. *Methods in Enzymology* [online]. **225**(C), 136–153. ISSN 15577988. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(93)25011-P

CHANG, M. C., 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* [online]. **168**(4277), 697–698. ISSN 00280836. Dostupné z: doi:10.1038/168697b0

CHANG, M. C., A. HANADA a Dorothy M. HUNT, 1971. Fertilization of denuded rabbit eggs in vitro by sperm recovered from the uterus or vagina. *Nature* [online]. **232**(5309), 343–344. ISSN 00280836. Dostupné z: doi:10.1038/232343a0

CHEN, Yanqiu, Martin J. CANN, Tatiana N. LITVIN, Vadim IOURGENKO, Meeghan L. SINCLAIR, Lonny R. LEVIN a Jochen BUCK, 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* [online]. **289**(5479), 625–628. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.289.5479.625

CHENG, Alice, Tam LE, Maria PALACIOS, Louis H. BOOKBINDER, Paul M. WASSARMAN, Fumie SUZUKI a Jeffrey D. BLEIL, 1994. Sperm-egg recognition in the mouse: Characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. *Journal of Cell Biology* [online]. **125**(4), 867–878. ISSN 00219525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.125.4.867

CHENG, Feng-Pang, Barend M. GADELLA, Wim F. VOORHOUT, Alireza FAZELI, Mart M. BEVERS a Ben COLENBRANDER, 1998. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biology of Reproduction* [online]. **59**(4), 733–742. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod59.4.733

CHIAN, Ri Cheng, Asangla AO, Hugh J. CLARKE, Togas TULANDI a Seang Lin TAN, 1999. Production of steroids from human cumulus cells treated with different concentrations of gonadotropins during culture in vitro. *Fertility and Sterility* [online]. **71**(1), 61–66. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/S0015-0282(98)00416-6

CHIU, Philip C.N., Ben S.T. WONG, Man-Kin CHUNG, Kevin K.W. LAM, Ronald T.K. PANG, Kai-Fai LEE, S.B. SUMITRO, S.K. GUPTA a William S.B. YEUNG, 2008. Effects of native human zona pellucida glycoproteins 3 and 4 on acrosome reaction and zona pellucida binding of human spermatozoa. *Biology of Reproduction* [online]. **79**(5), 869–877. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.108.069344

CLERMONT, Y. a C. P. LEBLOND, 1955. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the „periodic acid-schiff" technique. *American Journal of Anatomy* [online]. **96**(2), 229–253. ISSN 0002-9106. Dostupné z: doi:10.1002/aja.1000960203

CROSS, Nicholas L., Patricio MORALES, James W. OVERSTREET a Frederick W. HANSON, 1988. Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. *Biology of Reproduction* [online]. **38**(1), 235–244. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod38.1.235

CROSS, P. C. a R. L. BRINSTER, 1970. In vitro development of mouse oocytes. *Biology of Reproduction* [online]. **3**(3), 298–307. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1093/biolreprod/3.3.298

CUMMINS, J. M. a P. F. WOODALL, 1985. On mammalian sperm dimensions. *Journal of Reproduction and Fertility* [online]. **75**(1), 153–175. ISSN 00224251. Dostupné z: doi:10.1530/jrf.0.0750153

*DAM, A.H.D.M., I. FEENSTRA, J.R. WESTPHAL, L. RAMOS, R.J.T. VAN GOLDE a J.A.M. KREMER, 2007. Globozoospermia revisited. *Human Reproduction Update* [online]. **13**(1), 63–75. ISSN 1460-2369. Dostupné z: doi:10.1093/humupd/dml047

DAN, J. C., 1952. Studies on the acrosome. I. Reaction to egg-water and other stimuli. *The Biological Bulletin* [online]. **103**(1), 54–66. ISSN 0006-3185. Dostupné z: doi:10.2307/1538405

DE JONGE, C. J., H. -L HAN, H. LAWRIE, S. R. MACK a L. J.D. ZANEVELD, 1991a. Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. *Journal of Experimental Zoology* [online]. **258**(1), 113–125. ISSN 1097010X. Dostupné z: doi:10.1002/jez.1402580113

DE JONGE, Christopher J., Hui-Ling -L HAN, Stephen R. MACK a Lourens J.D. ZANEVELD, 1991b. Effect of phorbol diesters, synthetic diacylglycerols, and a protein kinase C inhibitor on the human sperm acrosome reaction. *Journal of Andrology* [online]. **12**(1), 62–70. ISSN 19394640. Dostupné

z: doi:10.1002/j.1939-4640.1991.tb00216.x

DEMOTT, R. P. a S. S. SUAREZ, 1992. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biology of Reproduction* [online]. **46**(5), 779–785. ISSN 00063363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod46.5.779

*DVOŘÁKOVÁ, Kateřina, Harry D.M. MOORE, Nataša ŠEBKOVÁ a Jiří PALEČEK, 2005. Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction* [online]. **130**(1), 61–69. ISSN 14701626. Dostupné z: doi:10.1530/rep.1.00549

ENDO, Yoshihiro, Michael A. LEE a Gregory S. KOPF, 1987. Evidence for the role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the zona pellucida-induced mouse sperm acrosome reaction. *Developmental Biology* [online]. **119**(1), 210–216. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/0012-1606(87)90222-3

ENDO, Yoshihiro, Michael A. LEE a Gregory S. KOPF, 1988. Characterization of an islet-activating protein-sensitive site in mouse sperm that is involved in the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Developmental Biology* [online]. **129**(1), 12–24. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/0012-1606(88)90157-1

ERICKSON, Robert P. a Susan R. MARTIN, 1974. Demonstration of the lack of acrosin in mouse spermatozoa by a radioassay. *Contraception* [online]. **9**(5), 539–544. ISSN 00107824. Dostupné z: doi:10.1016/0010-7824(74)90065-1

ESPOSITO, Gloria, Byjay S. JAISWAL, Fang XIE, Magda A.M. KRAJNC-FRANKEN, Tamara J.A.A. ROBBEN, Ankie M. STRIK, Cor KUIL, Ria L.A. PHILIPSEN, Marcel VAN DUIN, Marco CONTI a Jan A. GOSSEN, 2004. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **101**(9), 2993–2998. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0400050101

*FAWCETT, Don W., 1975. The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology* [online]. **44**(2), 394–436. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/0012-1606(75)90411-X

FLESCHE, F. M., J. F.H.M. BROUWERS, P. F.E.M. NIEVELSTEIN, A. J. VERKLEIJ, L. M.G. VAN GOLDE, B. COLENBRANDER a B. M. GADELLA, 2001. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal of Cell Science*. **114**(19), 3543–3555. ISSN 00219533.

FLORMAN, Harvey M., Kathleen B. BECHTOL a Paul M. WASSARMAN, 1984. Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Developmental Biology* [online]. **106**(1), 243–255. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/0012-1606(84)90079-4

- FLORMAN, Harvey M. a Bayard T. STOREY, 1982. Mouse gamete interactions: The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Developmental Biology* [online]. **91**(1), 121–130. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/0012-1606(82)90015-X
- FLORMAN, Harvey M., Robert M. TOMBES, Neal L. FIRST a Donner F. BABCOCK, 1989. An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca²⁺ and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Developmental Biology* [online]. **135**(1), 133–146. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/0012-1606(89)90164-4
- FLORMAN, Harvey M. a Paul M. WASSARMAN, 1985. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* [online]. **41**(1), 313–324. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(85)90084-4
- FORESTA, C., M. ROSSATO a F. DI VIRGILIO, 1992. Extracellular ATP is a trigger for the acrosome reaction in human spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **267**(27), 19443–19447. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/s0021-9258(18)41795-4
- FOSTER, James A., Bret B. FRIDAY, Maristelle T. MAULIT, Carl BLOBEL, Virginia P. WINFREY, Gary E. OLSON, Kye Seong KIM a George L. GERTON, 1997. AM67, a secretory component of the guinea pig sperm acrosomal matrix, is related to mouse sperm protein sp56 and the complement component 4-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **272**(19), 12714–12722. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.19.12714
- FOUQUET, Jean-Pierre a Marie-Louise KANN, 1992. Species-specific localization of actin in mammalian spermatozoa: Factor artifact? *Microscopy Research and Technique* [online]. **20**(3), 251–258. ISSN 1059-910X. Dostupné z: doi:10.1002/jemt.1070200304
- FRANKEN, D. R., P. J. MORALES a U. F. HABENICHT, 1996. Inhibition of G protein in human sperm and its influence on acrosome reaction and zona pellucida binding. *Fertility and Sterility* [online]. **66**(6), 1009–1011. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/s0015-0282(16)58698-1
- FRASER, L. R. a C. A. MCDERMOTT, 1992. Ca²⁺-related changes in the mouse sperm capacitation state: A possible role for Ca²⁺-ATPase. *Journal of Reproduction and Fertility* [online]. **96**(1), 363–377. ISSN 00224251. Dostupné z: doi:10.1530/jrf.0.0960363
- FRASER, Lynn R., 1998. Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human Reproduction* [online]. **13**(1), 9–19. ISSN 02681161. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/13.suppl_1.9
- FRASER, Lynn R., Pramila V. DANDEKAR a Rama A. VAIDYA, 1971. In vitro fertilization of tubal rabbit ova partially or totally denuded of follicular cells. *Biology of Reproduction* [online]. **4**(2), 229–233. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1093/biolreprod/4.2.229

FROLIKOVA, Michaela, Natasa SEBKOVA, Lukas DED a Katerina DVORAKOVA-HORTOVA, 2016. Characterization of CD46 and $\beta 1$ integrin dynamics during sperm acrosome reaction. *Scientific Reports* [online]. **6**(1), 1–15. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep33714

GANGULY, Anasua, Antonin BUKOVSKY, Raj K. SHARMA, Pankaj BANSAL, Beena BHANDARI a Satish K. GUPTA, 2010. In humans, zona pellucida glycoprotein-1 binds to spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. *Human Reproduction* [online]. **25**(7), 1643–1656. ISSN 14602350. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/deq105

GARBI, Meirav, Sara RUBINSTEIN, Yehudit LAX a Haim BREITBART, 2000. Activation of protein kinase $C\alpha$ in the lysophosphatidic acid-induced bovine sperm acrosome reaction and phospholipase D1 regulation. *Biology of Reproduction* [online]. **63**(5), 1271–1277. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod63.5.1271

GÓMEZ-TORRES, María José, Eva María GARCÍA, Jaime GUERRERO, Sonia MEDINA, María José IZQUIERDO-RICO, Ángel GIL-IZQUIERDO, Jesús ORDUNA, María SAVIRÓN, Leopoldo GONZÁLEZ-BRUSI, Jorge TEN, Rafael BERNABEU a Manuel AVILÉS, 2015. Metabolites involved in cellular communication among human cumulus-oocyte-complex and sperm during in vitro fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology* [online]. **13**, 123. ISSN 14777827. Dostupné z: doi:10.1186/s12958-015-0118-9

GUIDOBALDI, Héctor Alejandro, María Eugenia TEVES, Diego Rafael UÑATES, Agustín ANASTASÍA a Laura Cecilia GIOJALAS, 2008. Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS ONE* [online]. **3**(8), e3040. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0003040

GUYONNET, Benoit, Masoud ZABET-MOGHADDAM, Susan SANFRANCISCO a Gail A. CORNWALL, 2012. Isolation and proteomic characterization of the mouse sperm acrosomal matrix. *Molecular and Cellular Proteomics* [online]. **11**(9), 758–774. ISSN 15359476. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M112.020339

HARDY, D. M. a D. L. GARBERS, 1995. A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **270**(44), 26025–26028. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.44.26025

HARDY, D. M., M. N. ODA, D. S. FRIEND a T. T.F. HUANG, 1991. A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction. *Biochemical Journal* [online]. **275**(3), 759–766. ISSN 02646021. Dostupné z: doi:10.1042/bj2750759

- HARDY, Daniel M a David L GARBERS, 1994. Species-specific binding of sperm proteins to the extracellular matrix (zona pellucida) of the egg. *Journal of Biological chemistry* [online]. **269**(29), 19000-19004. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(17)32265-2
- HASUWA, Hidetoshi, Yuko MURO, Masahito IKAWA, Noriko KATO, Yoshihide TSUJIMOTO a Masaru OKABE, 2010. Transgenic mouse sperm that have green acrosome and red mitochondria allow visualization of sperm and their acrosome reaction in vivo. *Experimental Animals* [online]. **59**(1), 105-107. ISSN 13411357. Dostupné z: doi:10.1538/expanim.59.105
- HERRERO, María Belén, Arabinda MANDAL, Laura C. DIGILIO, Scott A. COONROD, Bernhard MAIER a John C. HERR, 2005. Mouse SLLP1, a sperm lysozyme-like protein involved in sperm-egg binding and fertilization. *Developmental Biology* [online]. **284**(1), 126–142. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/j.ydbio.2005.05.008
- HINO, T., Y. MURO, M. TAMURA-NAKANO, M. OKABE, H. TATENO a R. YANAGIMACHI, 2016. The behavior and acrosomal status of mouse spermatozoa in vitro, and within the oviduct during fertilization after natural mating. *Biology of Reproduction* [online]. **95**(3), 1–11. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.116.140400
- HIROSE, Michiko, Arata HONDA, Helena FULKA, Miwa TAMURA-NAKANO, Shogo MATOBA, Toshiko TOMISHIMA, Keiji MOCHIDA, Ayumi HASEGAWA, Kiyoshi NAGASHIMA, Kimiko INOUE, Masato OHTSUKA, Tadashi BABA, Ryuzo YANAGIMACHI a Atsuo OGURA, 2020. Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **117**(5), 2513–2518. ISSN 10916490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1917595117
- HO, Han Chen, Katherine A. GRANISH a Susan S. SUAREZ, 2002. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Developmental Biology* [online]. **250**(1), 208–217. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1006/dbio.2002.0797
- HO, Katharine, Collin A. WOLFF a Susan S. SUAREZ, 2009. CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reproduction, Fertility and Development* [online]. **21**(2), 345–350. ISSN 10313613. Dostupné z: doi:10.1071/RD08183
- HOODBHOY, Tanya, Saurabh JOSHI, Emily S. BOJA, Suzannah A. WILLIAMS, Pamela STANLEY a Jurrien DEAN, 2005. Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **280**(13), 12721–12731. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M413569200
- HOWES, E. A., S. M. HURST a R. JONES, 2001. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: Potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal

maturation and the acrosome reaction. *Journal of Andrology* [online]. **22**(1), 62–72. ISSN 01963635. Dostupné z: doi:10.1002/j.1939-4640.2001.tb02154.x

HUNTER, R. H.F., 1973. Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology* [online]. **183**(1), 57–62. ISSN 1097010X. Dostupné z: doi:10.1002/jez.1401830107

IGNOTZ, George G., Margaret C. LO, Carissa L. PEREZ, TanYa M. GWATHMEY a Susan S. SUAREZ, 2001. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biology of Reproduction* [online]. **64**(6), 1806–1811. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod64.6.1806

*INABA, Kazuo, 2003. Molecular architecture of the sperm flagella: Molecules for motility and signaling. *Zoological Science* [online]. **20**(9), 1043–1056. ISSN 0289-0003. Dostupné z: doi:10.2108/zsj.20.1043

INOUE, Naokazu, Masahito IKAWA, Ayako ISOTANI a Masaru OKABE, 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* [online]. **434**(7030), 234–238. ISSN 00280836. Dostupné z: doi:10.1038/nature03362

INOUE, Naokazu, Masahito IKAWA, Tomoko NAKANISHI, Misako MATSUMOTO, Midori NOMURA, Tsukasa SEYA a Masaru OKABE, 2003. Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **23**(7), 2614–2622. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/mcb.23.7.2614-2622.2003

ISOTANI, Ayako, Takafumi MATSUMURA, Masaki OGAWA, Takahiro TANAKA, Kazuo YAMAGATA, Masahito IKAWA a Masaru OKABE, 2017. A delayed sperm penetration of cumulus layers by disruption of acrosin gene in rats. *Biology of Reproduction* [online]. **97**(1), 61–68. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1093/biolre/iox066

IWAMATSU, T. a M. C. CHANG, 1971. Factors involved in the fertilization of mouse eggs in vitro. *Journal of reproduction and fertility* [online]. **26**(2), 197–208. ISSN 00224251. Dostupné z: doi:10.1530/jrf.0.0260197

IZQUIERDO-RICO, M. J., M. JIMÉNEZ-MOVILLA, E. LLOP, A. B. PÉREZ-OLIVA, J. BALLESTA, R. GUTIÉRREZ-GALLEGO, C. JIMÉNEZ-CERVANTES a M. AVILÉS, 2009. Hamster zona pellucida is formed by four glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4. *Journal of Proteome Research* [online]. **8**(2), 926–941. ISSN 15353893. Dostupné z: doi:10.1021/pr800568x

JIN, Jingling, Nange JIN, Huili ZHENG, Seungil RO, Dora TAFOLLA, Kenton M. SANDERS a Wei YAN, 2007. Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in

the mouse. *Biology of Reproduction* [online]. **77**(1), 37–44. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.107.060186

JIN, Mayuko, Eiji FUJIWARA, Yasutaka KAKIUCHI, Masaru OKABE, Yuhkoh SATOUH, Shoji A. BABA, Kazuyoshi CHIBA a Noritaka HIROHASHI, 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **108**(12), 4892–4896. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1018202108

KANG-DECKER, N., G. T. MANTCHEV, S. C. JUNEJA, M. A. MCNIVEN a J. M.A. VAN DEURSEN, 2001. Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice. *Science* [online]. **294**(5546), 1531–1533. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1063665

KIM, Kye-Seong, Moon C. CHA a George L. GERTON, 2001a. Mouse sperm protein sp56 Is a component of the acrosomal matrix. *Biology of Reproduction* [online]. **64**(1), 36–43. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod64.1.36

KIM, Kye-Seong, James A. FOSTER a George L. GERTON, 2001b. Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biology of Reproduction* [online]. **64**(1), 148–156. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod64.1.148

KIM, Kye Seong a George L. GERTON, 2003. Differential release of soluble and matrix components: Evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Developmental Biology* [online]. **264**(1), 141–152. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/j.ydbio.2003.08.006

KIRICHOK, Yuriy, Betsy NAVARRO a David E. CLAPHAM, 2006. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature* [online]. **439**(7077), 737–740. ISSN 14764687. Dostupné z: doi:10.1038/nature04417

LA SPINA, Florenza A., Lis C. PUGA MOLINA, Ana ROMAROWSKI, Alejandra M. VITALE, Tomas L. FALZONE, Dario KRAPF, Noritaka HIROHASHI a Mariano G. BUFFONE, 2016. Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Developmental Biology* [online]. **411**(2), 172–182. ISSN 1095564X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ydbio.2016.02.006

LAX, Y., S. RUBINSTEIN a H. BREITBART, 1994. Epidermal growth factor induces acrosomal exocytosis in bovine sperm. *FEBS Letters* [online]. **339**(3), 234–238. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(94)80422-2

LECLERC, Pierre a Gregory S. KOPF, 1995. Mouse sperm adenylyl cyclase: general properties and regulation by the zona pellucida. *Biology of Reproduction* [online]. **52**(6), 1227–1233. ISSN 0006-3363.

Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod52.6.1227

LEE, Chang Ho, Dongeun PARK, Dianqing WU, Sue Goo RHEEG a Melvin I SIMONLLL, 1992. Members of the Gq alpha subunit gene family activate phospholipase C beta isozymes. *The Journal of biological chemistry* [online]. **267**(23), 16044–16047. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)41962-X

LEFIÈVRE, L., S. J. CONNER, A. SALPEKAR, O. OLUFOWOBI, P. ASHTON, B. PAVLOVIC, W. LENTON, M. AFNAN, I. A. BREWIS, M. MONK, D. C. HUGHES a C. L.R. BARRATT, 2004. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reproduction* [online]. **19**(7), 1580–1586. ISSN 02681161. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/deh301

LEFIÈVRE, Linda, Kula N. JHA, Eve DE LAMIRANDE, Pablo E. VISCONTI a Claude GAGNON, 2002. Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction. *Journal of Andrology* [online]. **23**(5), 709–716. ISSN 01963635. Dostupné z: doi:10.1002/j.1939-4640.2002.tb02314.x

LIN, Ying, Kimberly MAHAN, William F. LATHROP, Diana G. MYLES a Paul PRIMAKOFF, 1994. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *Journal of Cell Biology* [online]. **125**(5), 1157–1163. ISSN 00219525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.125.5.1157

LONGO, F. J., G. KROHNE a W. W. FRANKE, 1987. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *Journal of Cell Biology* [online]. **105**(3), 1105–1120. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.105.3.1105

LUCONI, M., F. FRANCAVILLA, I. PORAZZI, B. MACEROLA, G. FORTI a E. BALDI, 2004. Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids* [online]. **69**(8-9), 553–559. ISSN 0039128X. Dostupné z: doi:10.1016/j.steroids.2004.05.013

MASCARENHAS, Maya N., Seth R. FLAXMAN, Ties BOERMA, Sheryl VANDERPOEL a Gretchen A. STEVENS, 2012. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: A systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Medicine* [online]. **9**(12), e1001356. ISSN 15491277. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pmed.1001356

MEIZEL, Stanley a Kenneth O. TURNER, 1993. Initiation of the human sperm acrosome reaction by thapsigargin. *Journal of Experimental Zoology* [online]. **267**(3), 350–355. ISSN 0022-104X. Dostupné z: doi:10.1002/jez.1402670312

- MEIZEL, Stanley, Kenneth O. TURNER a Richard NUCCITELLI, 1997. Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Developmental Biology* [online]. **182**(1), 67–75. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1006/dbio.1997.8477
- MIYAMOTO, H. a M. C. CHANG, 1972. Fertilization in vitro of mouse and hamster eggs after the removal of follicular cells. *Journal of reproduction and fertility* [online]. **30**(2), 309–312. ISSN 00224251. Dostupné z: doi:10.1530/jrf.0.0300309
- MORENO-FIERROS, Leticia, Enrique Othon HERNÁNDEZ, Zaira O. SALGADO a Adela MÚJICA, 1992. F-actin in guinea pig spermatozoa: Its role in calmodulin translocation during acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development* [online]. **33**(2), 172–181. ISSN 1040452X. Dostupné z: doi:10.1002/mrd.1080330209
- MORENO, Ricardo D., João RAMALHO-SANTOS, Peter SUTOVSKY, Edward K.L. CHAN a Gerald SCHATTEN, 2000. Vesicular traffic and Golgi apparatus dynamics during mammalian spermatogenesis: Implications for acrosome architecture. *Biology of Reproduction* [online]. **63**(1), 89–98. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod63.1.89
- MORTIMER, D., E. F. CURTIS, A. R. CAMENZIND a S. TANAKA, 1989. The spontaneous acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro. *Human Reproduction* [online]. **4**(1), 57–62. ISSN 02681161. Dostupné z: doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a136846
- MURO, Yuko, Hidetoshi HASUWA, Ayako ISOTANI, Haruhiko MIYATA, Kazuo YAMAGATA, Masahito IKAWA, Ryuzo YANAGIMACHI a Masaru OKABE, 2016. Behavior of mouse spermatozoa in the female reproductive tract from soon after mating to the beginning of fertilization. *Biology of Reproduction* [online]. **94**(4), 1–7. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.115.135368
- NAITO, Kuniyuki, Yutaka TOYODA a Ryuzo YANAGIMACHI, 1992. Production of normal mice from oocytes fertilized and developed without zonae pellucidae. *Human Reproduction* [online]. **7**(2), 281–285. ISSN 1460-2350. Dostupné z: doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a137633
- NAZ, Rajesh K. a Khaliq AHMAD, 1992. Presence of expression products of c-erbB-1 and c-erbB-2/HER2 genes on mammalian sperm cell, and effects of their regulation on fertilization. *Journal of Reproductive Immunology* [online]. **21**(3), 223–239. ISSN 01650378. Dostupné z: doi:10.1016/0165-0378(92)90028-3
- NODA, Taichi, Yonggang LU, Yoshitaka FUJIHARA, Seiya OURA, Takayuki KOYANO a Sumire KOBAYASHI, 2020. Sperm proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 are required for sperm-oocyte fusion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **117**(21), 11493–11502. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1922650117

NOLAN, John P. a Roy H. HAMMERSTEDT, 1997. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *The FASEB Journal* [online]. **11**(8), 670–682. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fasebj.11.8.9240968

O'TOOLE, Christine M.B., Christophe ARNOULT, Alberto DARSZON, Richard A. STEINHARDT a Harvey M. FLORMAN, 2000. Ca²⁺ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Molecular Biology of the Cell* [online]. **11**(5), 1571–1584. ISSN 10591524. Dostupné z: doi:10.1091/mbc.11.5.1571

OLSON, G. E., V. P. WINFREY, M. A. WINER a G. R. DAVENPORT, 1987. Outer acrosomal membrane of guinea pig spermatozoa: Isolation and structural characterization. *Gamete Research* [online]. **17**(1), 77–94. ISSN 15543919. Dostupné z: doi:10.1002/mrd.1120170109

OLSON, Gary E. a Virginia P. WINFREY, 1985. Structure of membrane domains and matrix components of the bovine acrosome. *Journal of Ultrastructure Research and Molecular Structure Research* [online]. **90**(1), 9–25. ISSN 08891605. Dostupné z: doi:10.1016/0889-1605(85)90113-2

OLSON, Gary E. a Virginia P. WINFREY, 1994. Structure of acrosomal matrix domains of rabbit sperm. *Journal of Structural Biology* [online]. **112**(1), 41–48. ISSN 10478477. Dostupné z: doi:10.1006/jsbi.1994.1005

OLSON, Gary E., Virginia P. WINFREY a G. RODMAN DAVENPORT, 1988. Characterization of matrix domains of the hamster acrosome. *Biology of Reproduction* [online]. **39**(5), 1145–1158. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod39.5.1145

OREN-BENAROYA, R., R. ORVIETO, A. GAKAMSKY, M. PINCHASOV a M. EISENBACH, 2008. The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Human Reproduction* [online]. **23**(10), 2339–2345. ISSN 14602350. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/den265

OSMAN, Richard A., Matthew L. ANDRIA, A. Daniel JONES a Stanley MEIZEL, 1989. Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **160**(2), 828–833. ISSN 10902104. Dostupné z: doi:10.1016/0006-291X(89)92508-4

POLLARD, John W., Claire PLANTE, W. ALLAN KING, Peter J. HANSEN, Keith J. BETTERIDGE a Susan S. SUAREZ, 1991. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biology of Reproduction* [online]. **44**(1), 102–107. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod44.1.102

QI, Huayu, Magdalene M. MORAN, Betsy NAVARRO, Jayhong A. CHONG, Grigory KRAPIVINSKY, Luba KRAPIVINSKY, Yuriy KIRICHOK, I. Scott RAMSEY, Timothy A. QUILL a

David E. CLAPHAM, 2007. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **104**(4), 1219–1223. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0610286104

QUILL, Timothy A., Sarah A. SUGDEN, Kristen L. ROSSI, Lynda K. DOOLITTLE, Robert E. HAMMER a David L. GARBERS, 2003. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **100**(25), 14869–14874. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.2136654100

ROLDAN, Eduardo R.S., Tetsuma MURASE a Qi Xian SHI, 1994. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* [online]. **266**(5190), 1578–1581. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.7985030

SABEUR, Khalida, Dean P. EDWARDS a Stanley MEIZEL, 1996. Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biology of Reproduction* [online]. **54**(5), 993–1001. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod54.5.993

SAGARE-PATIL, V., M. GALVANKAR, M. SATIYA, B. BHANDARI, S. K. GUPTA a D. MODI, 2012. Differential concentration and time dependent effects of progesterone on kinase activity, hyperactivation and acrosome reaction in human spermatozoa. *International Journal of Andrology* [online]. **35**(5), 633–644. ISSN 01056263. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2605.2012.01291.x

SATOUH, Yuhkoh, Naokazu INOUE, Masahito IKAWA a Masaru OKABE, 2012. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *Journal of Cell Science* [online]. **125**(21), 4985–4990. ISSN 00219533. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.100867

SEBKOVA, Natasa, Lukas DED, Katerina VESELA a Katerina DVORAKOVA-HORTOVA, 2014. Progress of sperm IZUMO1 relocation during spontaneous acrosome reaction. *Reproduction* [online]. **147**(2), 231–240. ISSN 14701626. Dostupné z: doi:10.1530/REP-13-0193

SHI, Q., Yu-Ying YUAN a Eduardo R.S. ROLDAN, 1997. gamma-Aminobutyric acid (GABA) induces the acrosome reaction in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* [online]. **3**(8), 677–683. ISSN 14602407. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/3.8.677

SHI, Qi-Xian a E.R.S. ROLDAN, 1995a. Bicarbonate/CO₂ is not required for zona pellucida- or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation. *Biology of Reproduction* [online]. **52**(3), 540–546. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod52.3.540

SHI, Qi-Xian a E.R.S. ROLDAN, 1995b. Evidence that a GABA-like receptor is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction* [online]. **52**(2), 373–381. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod52.2.373

SIEGEL, David P., James BANSCHBACH, Dennis ALFORD, Joe BENTZ, Harma ELLENS, Leonard J. LIS, Peter J. QUINN a Philip L. YEAGLE, 1989. Physiological levels of diacylglycerols in phospholipid membranes induce membrane fusion and stabilize inverted phases. *Biochemistry* [online]. **28**(9), 3703–3709. ISSN 15204995. Dostupné z: doi:10.1021/bi00435a012

SPUNGIN, B., I. MARGALIT a H. BREITBART, 1995. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *Journal of Cell Science*. **108**(6), 2525–2535. ISSN 00219533.

SPUNGIN, Ben a Haim BREITBART, 1996. Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *Journal of Cell Science*. **109**(7), 1947–1955. ISSN 00219533.

STRÜNKER, Timo, Normann GOODWIN, Christoph BRENKER, Nachiket D. KASHIKAR, Ingo WEYAND, Reinhard SEIFERT a U. Benjamin KAUPP, 2011. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* [online]. **471**(7338), 382–386. ISSN 00280836. Dostupné z: doi:10.1038/nature09769

SUAREZ, Susan S., 1987. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: Observations in situ. *Biology of Reproduction* [online]. **36**(1), 203–210. ISSN 00063363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod36.1.203

*SUAREZ, Susan S., 2008. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *The International Journal of Developmental Biology* [online]. **52**(5–6), 455–462. ISSN 02146282. Dostupné z: doi:10.1387/ijdb.072527ss

SUZUKI, K., M. EBIHARA, T. NAGAI, N. G.E. CLARK a R. A.R. HARRISON, 1994. Importance of bicarbonate/CO₂ for fertilization of pig oocytes in vitro, and synergism with caffeine. *Reproduction, Fertility and Development* [online]. **6**(2), 221–227. ISSN 14485990. Dostupné z: doi:10.1071/RD9940221

TAKANO, Hiroko, R. YANAGIMACHI a Umberto A. URCH, 1993. Evidence that acrosin activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with the oolemma: Inhibitor studies using the golden hamster. *Zygote* [online]. **1**(1), 79–91. ISSN 14698730. Dostupné z: doi:10.1017/S0967199400001325

TANG, X. M., M. F. LALLI a Y. CLERMONT, 1982. A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *American Journal of Anatomy* [online]. **163**(4), 283–

294. ISSN 15530795. Dostupné z: doi:10.1002/aja.1001630402

TARDIF, Steve, Michael D. WILSON, Rebecca WAGNER, Peter HUNT, Marina GERTSENSTEIN, Andras NAGY, Corrinne LOBE, Ben F. KOOP a Daniel M. HARDY, 2010. Zonadhesin is essential for species specificity of sperm adhesion to the egg zona pellucida. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **285**(32), 24863–24870. ISSN 1083351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.123125

TEVES, María Eugenia, Flavia BARBANO, Héctor Alejandro GUIDOBALDI, Raúl SANCHEZ, Werner MISKA a Laura Cecilia GIOJALAS, 2006. Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertility and Sterility* [online]. **86**(3), 745–749. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2006.02.080

THASTRUP, O., P. J. CULLEN, B. K. DROBAK, M. R. HANLEY a A. P. DAWSON, 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **87**(7), 2466–2470. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.87.7.2466

THOMAS, Paul a Stanley MEIZEL, 1988. An influx of extracellular calcium is required for initiation of the human sperm acrosome reaction induced by human follicular fluid. *Gamete Research* [online]. **20**(4), 397–411. ISSN 15543919. Dostupné z: doi:10.1002/mrd.1120200402

TIMOTHY SMITH, T. a Ryuzo YANAGIMACHI, 1990. The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: The importance of sperm-epithelium contact for sperm survival. *Biology of Reproduction* [online]. **42**(3), 450–457. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod42.3.450

TORRES-FUENTES, Jorge L., Mariana RIOS a Ricardo D. MORENO, 2015. Involvement of a P2X7 receptor in the acrosome reaction induced by ATP in rat spermatozoa. *Journal of Cellular Physiology* [online]. **230**(12), 3068–3075. ISSN 00219541. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.25044

TOSHIMORI, K., D. K. SAXENA, I. TANII a K. YOSHINAGA, 1998. An MN9 antigenic molecule, equatorin, is required for successful sperm- oocyte fusion in mice. *Biology of Reproduction* [online]. **59**(1), 22–29. ISSN 00063363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod59.1.22

TRAVIS, Alexander J., Tanya MERDIUSHEV, Louis A. VARGAS, Brian H. JONES, Marie A. PURDON, Rick W. NIPPER, Josephine GALATIOTO, Stuart B. MOSS, Gary R. HUNNICUTT a Gregory S. KOPF, 2001. Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and guinea pig spermatozoa. *Developmental Biology* [online]. **240**(2), 599–610. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1006/dbio.2001.0475

VAN GESTEL, R.A., I.A. BREWIS, P.R. ASHTON, J.B. HELMS, J.F. BROUWERS a B.M. GADELLA, 2005. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Molecular Human Reproduction* [online]. **11**(8), 583–590. ISSN 1460-2407. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/gah200

VOGL, A. Wayne, 1990. Distribution and function of organized concentrations of actin filaments in mammalian spermatogenic cells and Sertoli cells. *International Review of Cytology* [online]. **119**(C), 1–56. ISSN 00747696. Dostupné z: doi:10.1016/S0074-7696(08)60648-8

WALENSKY, Loren D. a Solomon H. SNYDER, 1995. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *Journal of Cell Biology* [online]. **130**(4), 857–869. ISSN 00219525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.130.4.857

WANG, Hongna, Haifeng WAN, Xixia LI, Weixiao LIU, Qi CHEN, Yaqing WANG, Lin YANG, Hongmei TANG, Xiujun ZHANG, Enkui DUAN, Xiaoyang ZHAO, Fei GAO a Wei LI, 2014. Atg7 is required for acrosome biogenesis during spermatogenesis in mice. *Cell Research* [online]. **24**(7), 852–869. ISSN 17487838. Dostupné z: doi:10.1038/cr.2014.70

WESTBROOK-CASE, V. A., V. P. WINFREY a G. E. OLSON, 1994. A Domain-specific 50-kilodalton structural protein of the acrosomal matrix is processed and released during the acrosome reaction in the guinea pig. *Biology of Reproduction* [online]. **51**(1), 1–13. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod51.1.1

*YANAGIMACHI, R., 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: Its development and relativity. *Zygote* [online]. **2**(4), 371–372. ISSN 14698730. Dostupné z: doi:10.1017/S0967199400002240

YANAGIMACHI, R. a Y. D. NODA, 1970. Fine structure of the hamster sperm head. *American Journal of Anatomy* [online]. **128**(3), 367–387. ISSN 15530795. Dostupné z: doi:10.1002/aja.1001280307

YIN, L., C. M. CHUNG, R. HUO, H. LIU, C. ZHOU, W. XU, H. ZHU, J. ZHANG, Q. SHI, H. Y.C. WONG, J. CHEN, Y. LU, Y. BI, C. ZHAO, Y. DU, M. MA, Y. CAI, W. Y. CHEN, K. L. FOK, L. L. TSANG, K. LI, Y. NI, Y. W. CHUNG, Z. ZHOU, J. SHA a H. C. CHAN, 2009. A sperm GPI-anchored protein elicits sperm-cumulus cross-talk leading to the acrosome reaction. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. **66**(5), 900–908. ISSN 1420682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-009-8482-2

YOSHIDA, Keiichi, Chizuru ITO, Kenji YAMATOYA, Mamiko MAEKAWA, Yoshiro TOYAMA, Fumie SUZUKI-TOYOTA a Kiyotaka TOSHIMORI, 2010. A model of the acrosome reaction progression via the acrosomal membrane-anchored protein equatorin. *Reproduction* [online]. **139**(3), 533–544. ISSN 14701626. Dostupné z: doi:10.1530/REP-09-0434

YOSHINAGA, K, DK SAXENA, T OH-OKA, I TANII a K TOSHIMORI, 2001. Inhibition of mouse fertilization in vivo by intra-oviductal injection of an anti-equatorin monoclonal antibody. *Reproduction* [online]. **122**(4), 649–655. ISSN 1470-1626. Dostupné z: doi:10.1530/rep.0.1220649

YUDIN, Ashley I., Gary N. CHERR a David F. KATZ, 1988. Structure of the cumulus matrix and zona pellucida in the golden hamster: A new view of sperm interaction with oocyte-associated extracellular matrices. *Cell and Tissue Research* [online]. **251**(3), 555–564. ISSN 0302766X. Dostupné z: doi:10.1007/BF00214003

ZENG, Yang, Edward N. CLARK a Harvey M. FLORMAN, 1995. Sperm membrane potential: Hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Developmental Biology* [online]. **171**(2), 554–563. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1006/dbio.1995.1304