

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra Zoologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Dynamika akrozomální reakce při vnitrodruhové
kompetici spermií hlodavců**

Kateřina Veselá

V Praze 2012

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Kateřina Hortová, PhD.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně jen s použitím citované literatury,
pod vedením RNDr. Kateřiny Hortové, PhD.

V Praze, 24. srpna 2012

Kateřina Veselá

Poděkování patří především mé školitelce RNDr. Kateřině Hortové, PhD. za její skvělé vedení všech mých kroků, za její čas, přátelský přístup, cenné názory a rady, které mi během celé doby studia s ochotou poskytovala.

Dále musím poděkovat RNDr. Nataše Šebkové, jejíž rady mi vždy pomohly a posouvaly mne dál, také za její podporu a čas, kterého rozhodně nebylo málo, za který jí tímto ze srdce děkuji.

Děkuji též Lence Bulvové, která mi vždy poskytovala úžasné zázemí pro mou práci, také za její věčný optimismus a ochotu mi kdykoliv a s čímkoliv pomoci.

Díky patří samozřejmě i Mgr. Martině Černé, která mi ukázala veškeré laboratorní metody a díky níž jsem se naučila samostatné práci, děkuji jí i za veškerou podporu, kterou mi po celou dobu mé práce projevovala a za její trpělivost, kterou se mnou vždy měla.

Děkuji také dalším členům naší laboratoře za veškeré podněty, ohleduplnost a vynikající atmosféru, kterou mne po dobu studia obklopovali.

A v neposlední řadě pak děkuji své rodině, přátelům a svému příteli, bez jejichž neustálé podpory, péče a lásky by tato práce vzniknout také nemohla.

Dynamika akrozomální reakce při vnitrodruhové kompetici spermií hlodavců

Integrita akrozómu spermií je u promiskuitního druhu myšic narušena a více než polovina spermií prochází spontánní akrozomální reakcí (AR) ještě před navázáním se na *zona pellucida*. U *Muridae* je dokumentována vysoká míra spontánní AR, jejíž procento vzrůstá u promiskuitních druhů až na 60 % v 60 minutách kapacitace *in vitro*.

Na integritě akrozómu se podílí mimo jiné i protein CD46. Absence CD46 u myšic (*Apodemus*) vykazuje shodný fenotyp jako u CD46 knock-out myší a spermie těchto jedinců mají vyšší míru spontánní AR. Je nutné objasnit, zda u myší pro průnik spermie *zona pellucida* vajíčka je zásadní primární vazba intaktní spermie nebo zda je upřednostňována sekundární vazba spermie po spontánní AR. V této souvislosti je otázkou, zda dochází k relokaci klíčového fúzogenního proteinu IZUMO u spermií se spontánní akrozomální reakcí. Relokalizace IZUMO byla v konkrétních časech kapacitace *in vitro* během spontánní a indukované AR imunofluorescenčně detekována. Na relokaci IZUMO se podílí aktinový cytoskelet, který vytváří též komplexy s $\beta 1$ integrinem. Ten je asociován s proteinem CD46. Dynamika a lokalizace proteinů CD46 a $\beta 1$ integrinu během spontánní a indukované AR byla imunofluorescenčně detekována. Naše výsledky ukazují, že protein IZUMO je během spontánní AR relokován z akrozomální membrány do equatoriálního segmentu a postakrozomální oblasti hlavičky spermie. Zjištění, že zásadní molekulární změny nezbytné pro fúzi spermie a vajíčka reprezentovány dynamickým pohybem IZUMO a následně i $\beta 1$ integrinu jsou monitorovány též během spontánní AR přispívají k pochopení procesu oplození u myší. Zahájení a průběh relokace IZUMO u rodu *Apodemus* navíc pozitivně koreluje s mírou promiskuity a nestability akrozomální membrány. Spermie po spontánní AR mají stejný fertilizační potenciál jako spermie po indukované AR. Spontánní AR zřejmě představuje unikátní mechanismus urychlení fertilizačního procesu ve vysoce promiskuitním prostředí vzniklý pod selekčním tlakem vnitrodruhové kompetice spermií.

Klíčová slova: akrozomální reakce, kapacitace, IZUMO, $\beta 1$ integrin, CD46, kompetice spermií

Dynamics of acrosome reaction during intra-specific sperm competition in rodents

Sperm acrosome integrity is disturbed in promiscuous species field mice (*Apodemus*) and more than half of the spermatozoa undergoing spontaneous acrosome reaction (AR) before binding to the *zona pellucida*. In *Muridae* it is documented a generally high rate of spontaneous AR, and the percentage increases in promiscuous species up to 60 % in 60 min capacitation *in vitro*. The acrosome integrity positively corellates with presence of CD46 protein which absence in wood mouse is fenotypicaly same as in CD46 knock-out mouse leading to accelerated spontaneous AR. It is necessary to clarify whether for mouse sperm it is essential the primary binding of intact sperm to *zona pellucida* of the egg or whether it is preferred secondary sperm binding after spontaneous AR. In this context, the question is whether there is a relocalization of the key fusion protein IZUMO in sperm during spontaneous AR. IZUMO relocalization was monitored by immunofluorescence at specific times of capacitation *in vitro* during spontaneous and induced AR. IZUMO relocalization as closely connected to actin cytoskeleton, and $\beta 1$ integrins. Dynamics and localization of $\beta 1$ integrin during spontaneous and induced AR was also detected by immunofluorescence. Our results indicate that IZUMO as well as $\beta 1$ integrin is relocalized during spontaneous AR from the acrosomal membrane to the equatorial and post-acrosomal segment of the sperm head. Findings, that crucial molecular changes essential for sperm-egg fusion represented by dynamic movements of IZUMO happening also during spontaneous AR contribute to the understanding of the process of fertilization in mice.

Initiation and subsequent relocation of the IZUMO in *Apodemus* species positively correlated with the degree of promiscuity and instability of the acrosome. Sperm after spontaneous AR seems to have the same fertilizing potential as those after induced AR. Spontaneous AR probably represents a unique mechanism for accelerating the process of fertilization in a highly promiscuous environment under selective pressure of intra-specific sperm competition.

Key words: acrosome reaction, capacitation, IZUMO, $\beta 1$ integrin, CD46, sperm competition

Obsah

1	ÚVOD	9
2	CÍLE PRÁCE	11
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
3.1	MORFOLOGIE SPERMIE	12
3.1.1	<i>Hlavička</i>	12
3.1.1.1	Jádro	13
3.1.1.2	Plazmatická membrána	13
3.1.1.3	Akrozóm	13
3.1.1.4	Equatoriální segment	14
3.1.1.5	Postakrozomální oblast	14
3.1.2	<i>Bičik</i>	15
3.2	PŘÍPRAVA SPERMATICKE BUŇKY NA OPLOZENÍ	16
3.2.1	<i>Hyperaktivace</i>	16
3.2.2	<i>Kapacitace</i>	16
3.2.2.1	Lokalizace kapacitace	16
3.2.2.2	Průběh kapacitace	17
3.2.2.3	Změny v aktinovém cytoskeletu během kapacitace	18
3.3	AKROZOMÁLNÍ REAKCE	19
3.3.1	<i>Akrozomální reakce in vitro</i>	20
3.3.2	<i>Iniciace akrozomální reakce</i>	20
3.4	REPRODUKČNÍ STRATEGIE MYŠOVITÝCH HLODAVCŮ (MURIDAE)	21
3.4.1	<i>BALB/c</i>	22
3.4.2	<i>Apodemus</i>	22
3.4.3	<i>Vnitrodruhová kompetice spermií</i>	23
3.4.4	<i>Spontánní akrozomální reakce</i>	23
3.5	PROTEIN IZUMO	24
3.5.1	<i>N-glykosylace</i>	25
3.5.2	<i>Proteinová rodina IZUMO</i>	25
3.5.3	<i>Úloha proteinu IZUMO</i>	26
3.5.4	<i>Relokalizace IZUMO</i>	27
3.6	PROTEIN CD46	28
3.6.1	<i>Expresce CD46 u čeledi Muridae</i>	28
3.6.2	<i>Lokalizace CD46</i>	29
3.6.3	<i>Absence CD46 u rodu Apodemus</i>	29
3.6.4	<i>Význam proteinu CD46 v testes</i>	30
3.7	PROTEIN B1 INTEGRIN	30
3.7.1	<i>$\beta 1$ integrin a CD46</i>	31
4	MATERIÁL A METODY	32
4.1	MATERIÁL	32
4.1.1	<i>Použitá zvířata pro odběr spermií</i>	32
4.1.2	<i>Další materiál</i>	32
4.1.3	<i>Chemikálie</i>	32
4.1.4	<i>Roztoky</i>	32
4.1.5	<i>Imunofluorescenční detekce-protilátky</i>	33
4.1.6	<i>Přístroje</i>	33
4.2	METODY	34
4.2.1	<i>Izolace spermií a příprava roztěrových preparátů</i>	34
4.2.2	<i>Kapacitace in vitro</i>	34
4.2.3	<i>Indukce AR</i>	34
4.2.4	<i>Fixace a permeabilizace preparátů</i>	34
4.2.4.1	Formaldehyd – triton	35
4.2.4.2	Permeabilizace acetonem	35
4.2.5	<i>Imunofluorescenční barvení</i>	35
4.2.5.1	Duální imunofluorescenční barvení	35
4.2.6	<i>Vyhodnocení</i>	36

5	VÝSLEDKY	37
5.1	RELOKALIZACE IZUMO BĚHEM KAPACITACE A SPONTÁNNÍ AR V ZÁVISLOSTI NA ČASE	37
5.2	RELOKALIZACE IZUMO BĚHEM KAPACITACE PŘI SOUČASNÉ INDUKCI AR CAI A PROGESTERONEM .	39
5.2.1	<i>Relokalizace IZUMO při použití CaI</i>	<i>39</i>
5.2.2	<i>Relokalizace IZUMO při použití Progesteronu.....</i>	<i>40</i>
5.3	RELOKALIZACE IZUMO V ZÁVISLOSTI NA VLIVU PROMISKUITNÍHO PROSTŘEDÍ	42
5.4	RELOKALIZACE B1 INTEGRINU BĚHEM SPONTÁNNÍ A INDUKOVANÉ AR V PRŮBĚHU KAPACITACE.....	42
5.4.1	<i>Relokalizace $\beta 1$ integrinu během spontánní AR.....</i>	<i>43</i>
5.4.2	<i>Relokalizace $\beta 1$ integrinu během spontánní AR po přidání Calcium Ionophoru</i>	<i>44</i>
5.5	LOKALIZACE CD46 BĚHEM SPONTÁNNÍ A INDUKOVANÉ AR V PRŮBĚHU KAPACITACE	45
6	DISKUZE	47
7	ZÁVĚR.....	52
8	LITERATURA	53

Seznam zkratek

ATP	adenosin trifosfát
AR	akrozomální reakce
CaI	calcium ionophor
cAMP	cyklicky adenosin monofosfát
cReg protein	complement regulatory protein
DAG	diacylglycerol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
ES	equatoriální segment
FITC	fluoresceinisothiokyanát
Ig	imunoglobulin
IgG	imunoglobulin třídy G
IP ₃	inositol trifosfát
PAR	postakrozomální oblast hlavičky
PBS	fyziologicky roztok
PIP ₂	fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát
PKA	protein kináza A
PKC	protein kináza C
PLC	fosfolipáza C
PM	plazmatická membrána
PNA-lectin	peanut lectin
SPESP1	sperm equatorial segment protein 1
TBS	fyziologicky roztok neobsahující fosfáty
TNPs	transition proteins
Tris	tris (hydromethyl) aminomethan
Tssk6	testis-specific serine kinase 6
ZP	<i>zona pellucida</i>
ZP1, ZP2, ZP3	<i>zona pellucida</i> protein 1, 2, 3

1 Úvod

Oplození u savců představuje složitý proces zahrnující mnoho důležitých dějů a molekulárních mechanismů, které doposud nejsou zcela objasněny. Jednou z nedílných součástí tohoto procesu je AR spouštěna spontánně či navázáním spermie na glykoproteinový obal vajíčka *zona pellucida* (ZP). O mechanismu a úloze spontánní AR není doposud mnoho známo. Spermie myšovitých hlodavců se formují v tzv. „vláčky“, jejichž velikost koreluje s mírou promiskuity daného druhu, a až 60 % spermií při kapacitaci *in vitro* prochází spontánní AR, míra této AR též koreluje s mírou promiskuity daného druhu (Johnson et al. 2007).

O spontánní AR se donedávna uvažovalo pouze jako o nástroji k rozpojení spermií z vláček, zároveň se předpokládalo, že spermie z majoritní populace spermií, které projdou spontánní AR již nejsou schopny oplození. Ukazuje se však, že spermie po spontánní AR by mohly mít minimálně stejný fertilizační potenciál jako spermie z minoritní populace, tedy s intaktním akrozómem (Inoue et al. 2005, Jin et al. 2011). To by znamenalo, že pro spermii v promiskuitním prostředí by nebyla zásadní primární vazba na ZP vazebný protein ZP3, která byla považována za zásadní pro schopnost oplození spermie, ale že by mohla být upřednostňována sekundární vazba spermie na ZP2 protein vajíčka.

Spermie získává schopnost oplození až po úspěšně dokončené kapacitaci a AR. Během těchto procesů dochází k dynamickým změnám aktinového cytoskeletu, které jsou spojeny s relokací primárního fúzogenního proteinu IZUMO spermie. U promiskuitních druhů myšic (*Apodemus*) je navíc značně narušena integrita akrozómu, na čemž se zřejmě podílí absence translace proteinu CD46 (Johnson et al. 2007). Předpokládá se, že jako v somatických buňkách je protein CD46 ve spermiích asociován s $\beta 1$ integrinem a podílí se na integritě akrozomálního váčku, z tohoto důvodu byl rovněž předmětem našeho studia. $\beta 1$ integrin, který byl původně považován za protein pouze na povrchu oocyty, později byl však detekován i na spermii (Schaller, Glander and Dethloff 1993). Podle (Lozahic et al. 2000) jsou $\beta 1$ integriny asociovány s proteinem CD46, jaká je role $\beta 1$ integrinů při procesu oplození a spontánní AR a jaký význam má při absenci proteinu CD46 při AR u rodu *Apodemus* se doposud neví.

Protein IZUMO je primárním fúzogenním proteinem spermie (Inoue et al. 2005), je tedy esenciálním proteinem pro úspěšné oplození. IZUMO je v průběhu AR relokizován z anteriorní oblasti hlavičky do equatoriálního segmentu a postakrozomální oblasti hlavičky spermie (Sosnik et al. 2009). Zda dochází k zásadní relokizaci proteinu i u spontánní AR

v závislosti na čase stejně jako při použití Calcium Ionophoru (CaI) doposud nikdo nezmonitoroval. Pokud by docházelo k obdobné relokizaci IZUMO proteinu u spermíí během spontánní AR dalo by se předpokládat, že taková spermie by byla schopna fúzovat s oocytem.

AR je složitý proces, jehož přesný mechanismus není doposud zcela objasněn, v podmínkách *in vitro* lze AR indukovat pomocí CaI, který pomocí transportu Ca^{2+} dokáže u spermíí indukovat AR. Druhým možným exogenním stimulem AR je fyziologický progesteron. S oběma cestami stimulace se spermie během transportu k vajíčku setkávají, tato práce se pokusí porovnat oba faktory a vyhodnotit, která cesta exogenní stimulace působí rychleji na relokizaci primárního fúzogenního proteinu IZUMO.

Detekce lokalizace a relokizace proteinů IZUMO, CD46 a $\beta 1$ integrinu v průběhu kapacitace a AR u spermíí by měly přispět k objasnění smyslu fyziologické spontánní AR a zodpovědět zda spermie, které prošly spontánní AR mají stejný fertilizační potenciál jako spermie, u nichž byl použit CaI. Množství uvolněných lytických enzymů uvolněných ze spermíí při spontánní AR může být dostatečné k tomu, aby byla rozrušena ZP a pro spermie by byl průnik skrz ní usnadněn. Pokud během spontánní AR dochází k relokizaci IZUMO, cílená ztráta integrity akrozómu díky absenci specifického CD46 proteinu spermíí u vysoce promiskuitních druhů myšic a také vysoká míra spontánní AR mohou reprezentovat unikátní mechanismus urychlení fertilizačního procesu pod selekčním tlakem vnitrodruhové kompetice spermíí.

2 Cíle práce

U spermií laboratorní myši BALB/c, myšice malooké (*Apodemus microps*) a myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) monitorovat relokizaci specifických proteinů v průběhu spontánní nebo současně indukované AR při kapacitaci *in vitro*:

1) Relokizace IZUMO během kapacitace a spontánní AR v závislosti na čase

Monitorovat a časově definovat relokizaci primárního fúzogenního proteinu IZUMO v hlavičce spermie v průběhu kapacitace během spontánní AR.

2) Relokizace IZUMO během kapacitace při současné indukci AR CaI a Progesteronem

Porovnat relokizaci IZUMO v průběhu kapacitace při současné spontánní a exogenně indukované AR. Srovnat rozdíly v IZUMO relokizaci při použití induktoru CaI, nebo progesteronu.

3) Relokizace IZUMO v závislosti na vlivu promiskuitního prostředí

Porovnat časovou relokizaci IZUMO během kapacitace a spontánní i indukované AR s ohledem na míru promiskuity druhu.

4) Relokizace $\beta 1$ integrinu během spontánní a indukované AR v průběhu kapacitace

Monitorovat distribuci $\beta 1$ integrinu v hlavičce spermie během spontánní a indukované AR při kapacitaci s návazností na cíl 5.

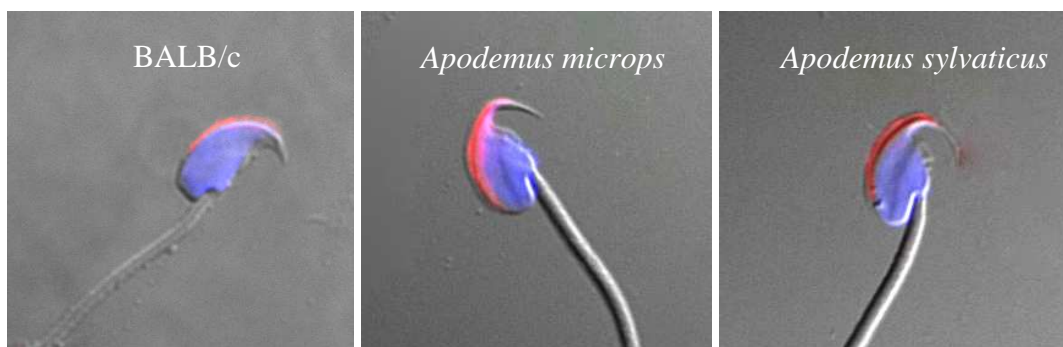
5) Lokalizace CD46 během spontánní a indukované AR v průběhu kapacitace

Monitorovat lokalizaci CD46 u spontánní a indukované AR během kapacitace spermií BALB/c a porovnat schopnost či neschopnost dynamiky $\beta 1$ integrinu u zástupců *Apodemus*, u kterých protein CD46 není exprimován.

3 Literární přehled

3.1 Morfologie spermie

Samčí pohlavní buňku neboli spermii lze rozdělit do tří hlavních částí a to na hlavičku, střední část s krčkem a bičík. Hlavička spermie je nositelem genetické informace prostřednictvím jádra, dále obsahuje na svém povrchu akrozóm důležitý k průniku spermie nebuněčným obalem samičí pohlavní buňky oocytu ZP. Další důležitou částí spermie je její střední část, kde jsou lokalizovány mitochondrie, tzv. „továrny“ na ATP sloužící jako zdroj pro pohyb spermie. Bičík je organela sloužící spermatické buňce k dynamickému pohybu směrem k oocytu.



Obr.1: Morfologie spermie u vybraných zástupců hlodavců

Značení pomocí PNA lectinu pro detekci akrozómu (červeně), pro detekci jádra pomocí DAPI (modře)

3.1.1 Hlavička

Hlavička spermie představuje nejdůležitější komponentu spermatické buňky. Její tvar může nabývat různých tvarů a rozměrů jak mezi druhy, tak v rámci jednoho druhu, konkrétně hlavičky spermí myšovitých hlodavců mají falciformní neboli „háčkovitý“ tvar hlavičky (Yanagimachi et al. 1994). Tento háček se vyvíjí po meióze a dokončuje se během spermateliózy (Moore et al. 2002). Velikost těchto háčků souvisí především s tvorbou tzv. „vláček“ (tvořenými až stovkami spermí), která byla u těchto hlodavců popsána (Moore et al. 2002). Jedinci rodu *Apodemus* mají podstatně větší háček než zástupci rodu *Mus*. Extrémním příkladem velikosti „háčku“ je *A. sylvaticus* (obr. 1), u něhož je dokumentována také největší míra spontánní AR (Johnson et al. 2007). Morfologii jednotlivých součástí hlavičky, konkrétně jádra, akrozómu a plazmatické membrány spermie budou věnovány následující podkapitoly.

3.1.1.1 Jádno

Spermatická buňka prochází v průběhu spermatogeneze meiózou, je tedy buňkou haploidní a ve svém kondenzovaném chromatinu obsahuje pouze poloviční počet chromozomů oproti buňkám somatickým. Co se týká morfologie spermie, i tady platí, že je to otázka druhové specifity (obr. 1). U myšovitých hlodavců lze vidět jádro, které má tvar oválný a je dorzoventrálně zploštělé. Uspořádání genetické informace spermie se v průběhu spermatogeneze mění, histony jsou během spermatogeneze nahrazeny nejprve přechodnými proteiny tzv. „transition proteins“ (TNPs) a následně protaminy.

Jádno spermie je obklopeno jaderným obalem, dále se kolem jádra spermatické buňky nachází cytoskeletární struktura, která se nazývá „perinukleární théka“, její morfogeneze naznačuje, že jejím úkolem je zřejmě propojit akrozóm a postakrozomální membránu s jádrem spermie (Longo and Cook 1991). Perinukleární théka je tvořena malým množstvím cytoplasmy a přidruženými cytoskeletárními elementy a sahá až do oblasti postakrozomálního segmentu hlavičky spermie.

3.1.1.2 Plazmatická membrána

Plazmatická membrána (PM) není výhradně pouze na hlavičce spermie, ale obklopuje spermatickou buňku jako celek. PM spermie je typická svým složením, především obsahem specifických glykoproteinů a lipidů, jejichž složení je důležité pro funkci samotné membrány, membránové proteiny jsou dokonce spojovány i s mírou plodnosti u některých živočišných druhů (Souza et al. 2009). Mezi hlavní domény PM patří oblast akrozómu a postakrozomální region. Funkcí PM je více, kromě klasických funkcí, které zajišťují, PM buněk zprostředkovává navíc kontakt spermie a oocyty, právě PM v oblasti equatoriálního segmentu spermie je zodpovědná za kontakt s membránou vajíčka při fúzi spermie a vajíčka.

3.1.1.3 Akrozóm

Akrozóm je organela lokalizována na přední straně hlavičky spermatické buňky (obr. 1) sloužící pro průnik spermie do vajíčka. Akrozóm vzniká v průběhu spermatogeneze fúzí váčků Golgiho aparátu a během maturace v epididymis se formuje jeho obsah a druhově specifický tvar. Uvnitř akrozómu se u maturované spermie nachází celá řada lytických enzymů, tj. proteázy (akrosin), lipázy (fosfolipáza A2, fosfolipáza C) a glykosidázy (β -galaktosidasa, hyaluronidasa, neuraminidasa, β -N-acetylglukosaminidasa). Pomocí těchto enzymů spermie dokáže překonat glykoproteinový obal vajíčka ZP a oplodnit oocyt.

Na akrozómu se nacházejí dvě akrozomální membrány, tzv. vnější a vnitřní. Vnější akrozomální membrána během AR fúzuje s PM což umožní exocytózu lytických enzymů z akrozomálního váčku. Poté dochází k odkrytí vnitřní akrozomální membrány nesoucí řadu důležitých proteinů umožňující následnou fúzi s oocytem. V oblasti vnitřní akrozomální membrány se dle (Mizuno et al. 2004) nachází u myši protein CD46, u rodu *Apodemus* tento protein není vůbec translatován (Johnson et al. 2007).

3.1.1.4 Equatoriální segment

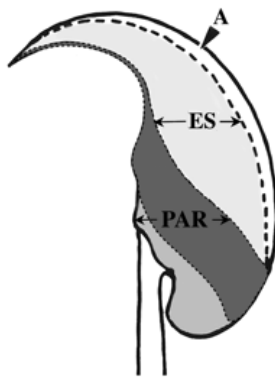
Další ze stěžejních oblastí spermií, důležitá pro tuto DP, je oblast equatoriálního segmentu (ES) hlavičky spermie (obr. 2). ES je fúzogenní oblast spermie, ve které u savčích spermií dochází po podstoupení AR a k iniciaci fúze s oocytem. Nabízí se tedy otázka, jaké proteiny jsou v této oblasti spermie lokalizovány a buď se přímo, nebo nepřímo podílí na fúzi gamet. Složení ES spolu s postakrozomální oblastí hlavičky spermie je modifikováno až po úspěšně dokončené AR (Sosnik et al. 2009).

Protein, jenž je v průběhu AR relokalizován do oblasti ES a je tedy považován za primární fúzogenní protein spermie se nazývá IZUMO (Inoue et al. 2005). Tento protein je tedy zřejmě esenciálním faktorem spermie pro jeho fúzi s oocytem, kde byl jako zásadní fúzogenní protein detekován membránový protein CD9 (Miyado et al. 2000).

Protein IZUMO ovšem není jediným proteinem lokalizovaným v oblasti ES, ale vyskytuje se tam řada jiných proteinů, které mohou plnit druhotnou fúzogenní funkci jako se předpokládá např. u proteinu SPESP1 (sperm equatorial segment protein 1) (Wolkowicz et al. 2003). Tento protein je v oblasti ES lokalizován zřejmě pouze před AR, jeho přímá funkce při procesu oplození, ale nebyla ještě zcela vysvětlena (Fujihara et al. 2010).

3.1.1.5 Postakrozomální oblast

V oblasti hlavičky spermie lze definovat ještě oblast postakrozomálního segmentu či regionu. Hranice postakrozomální oblasti začínají za oblastí equatoriálního segmentu a končí v posteriorní části hlavičky. Stejně jako oblast ES, tak i proteinové složení postakrozomální oblasti je v průběhu přípravy spermie na oplození modifikováno.

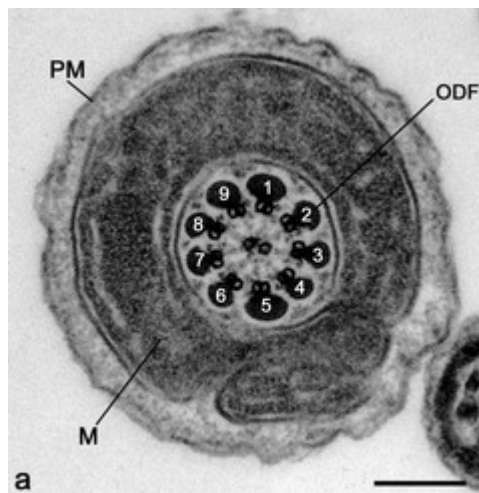


Obr. 2: Morfologie hlavičky spermie:

A, akrozóm; ES, equatoriální segment; PAR, postakrozomální oblast hlavičky (Ito et al. 2009)

3.1.2 Bičík

Mezi hlavičkou a bičíkem je krátký spoj definovaný jako tzv. „krček“, obecně dlouhý okolo 1 μm , který propojuje oblast hlavičky s bičíkem spermie, zásadní organelou pro pohyb spermie směrem k oocytu. Ten lze rozdělit na tři základní části a to na část střední, hlavní a část koncovou. Středná část bičíku je typická svou mitochondriální pochvou, jejíž zásadní význam je v tvorbě ATP především právě pro pohyb spermatické buňky. Tato pochva je po celém obvodu osního vlákna bičíku tzv. „axonemy“, která je tvořena z devíti dvojic do kruhu uspořádaných mikrotubulů (viz obr. 3). Mikrotubuly jsou propojeny pomocí molekulárního motoru dyneinu.



Obr. 3: Axonema s mitochondriální pochvou s viditelným uspořádáním mikrotubulů (9+2)

(<http://www.zoossa.com.au/files/11065-240x245.jpg>)

3.2 Příprava spermatické buňky na oplození

3.2.1 Hyperaktivace

Změny v motilitě spermií po ejakulaci jsou souhrnně nazývány jejich hyperaktivací, (Fraser 1977) byl první, kdo tento proces definoval a popsal u myších spermií. Lokalizace hyperaktivace v průběhu procesu oplození se předpokládá již ve vejcovodu, v děloze nebyly hyperaktivované spermie detekovány (Cooper, Overstreet and Katz 1979). Mechanismus zvýšení progresivní motility spermií souvisí se změnou charakteristického pohybu bičíku, který během hyperaktivace vykazuje intenzivnější pohyb než spermie nehyperaktivované. Tento pohyb je asymetrický a doprovázený zvýšeným vlněním samotného bičíku (Suarez and Osman 1987). Přesný význam hyperaktivace není doposud zcela objasněn, nicméně se předpokládá, že její význam bude souviset s překonáním ovidukálního rezervoáru a má pomoci v proniknutí spermie do extracelulární matrix vajíčka (Suarez 2008).

3.2.2 Kapacitace

Spermie savců tedy i hlodavců po úspěšně dokončené spermatogenezi nejsou ještě zcela připraveny k fúzi s oocytem, jak to lze vidět u spermií ostatních tříd obratlovců. U savců pouze kapacitované spermie mohou podstoupit AR a oplodnit oocyt (Yanagimachi et al. 1994). Kapacitované spermie mohou proniknout vrstvou kumulárních buněk a jsou schopny započít a dokončit AR kontaktem se ZP (Jin et al. 2011). Před samotnou AR dochází v reprodukčním traktu samice, působením složek ovidukální tekutiny, k indukci zásadního procesu, při kterém dochází u spermií pomocí signálních drah k další řadě fyziologických změn. Tento proces definovali již na počátku padesátých let téměř současně Austin a Chang (Austin 1952, Chang 1951) a nese název kapacitace.

Přesné molekulární mechanismy kapacitace doposud nejsou zcela objasněny, proto je studium tohoto zaměření stále velice aktuálním tématem ve vývojové biologii. Co se týká konkrétních změn, během kapacitace dochází ke změně koncentrace intracelulárních iontů, dochází ke změně ve fluiditě membrány a v neposlední řadě se mění i motilita samotných spermií (Yanagimachi et al. 1994).

3.2.2.1 Lokalizace kapacitace

Fyziologickou lokalizaci procesu kapacitace představují vejcovod či děloha (Yanagimachi et al. 1994). Kapacitační proces je možno navodit uměle u ejakuovaných spermií či u spermií odebraných z caudy epididymis i za podmínek *in vitro*. K navození dochází buď přímo za použití ovidukální tekutiny (Yanagimachi et al. 1994), nebo za použití

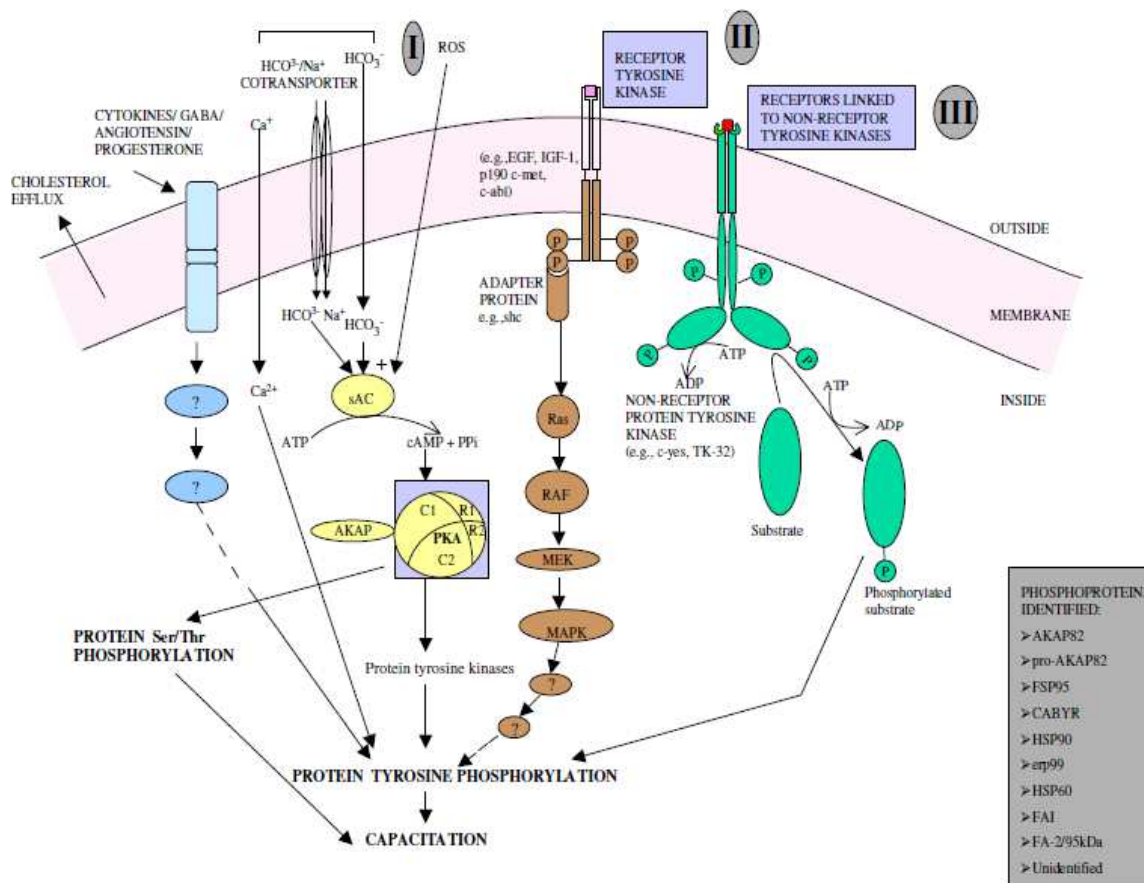
kapacitačního média, obsahujícím sérový albumin, vápenaté ionty a HCO^{3-} , tyto složky jsou podle (Visconti et al. 1995a) zásadní pro správný průběh tyrozinové fosforylace účastníci se procesu kapacitace. Kapacitace spermie je tedy výsledkem celé řady procesů a signálních drah, kterým budou věnovány následující podkapitoly.

3.2.2.2 Průběh kapacitace

Na počátku kapacitace dochází k výraznému snížení koncentrace cholesterolu v PM spermie, tento děj je obecně nazýván cholesterolový eflux. V důsledku cholesterolového efluxu dochází ke zvýšení permeability PM a to především pro ionty Ca^{2+} (Ruknudin and Silver 1990) nebo také pro HCO^{3-} (Okamura, Tajima and Sugita 1988). Dalším z jevů, se kterými se při kapacitaci setkáváme je tzv. hyperpolarizace PM spermie. Podle (Arnoult et al. 1999) dochází u myších spermií během kapacitace k hyperpolarizaci od 40mV do 70mV. Během hyperpolarizace dochází k aktivaci napěťově ovládaných Ca^{2+} iontových kanálů, což následně umožňuje jejich otevření při setkání spermie se ZP3 proteinem vajíčka (Arnoult et al. 1999).

Kapacitace spermií je provázena a především řízena celou řadou signálních drah a molekul, proteinkináza A (PKA) je aktivována pomocí cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) i v průběhu procesu kapacitace, čímž se podílí na její regulaci. Jsou známy dvě hlavní cesty, jak může docházet k regulaci kapacitace spermií (obr. 4), buď pomocí aktivace PKA paralelně s inaktivací Ser/Thr fosfatáz (Krapf et al. 2010). Druhou možností regulace je pomocí Ser/Thr kináz vedoucí přes aktivaci estrogenních receptorů a G-proteinů či pomocí Src kináz, jejíž aktivita je spojená s nárůstem tyrozinové fosforylace asociované s kapacitací spermií. Zvýšená koncentrace intracelulárních iontů Ca^{2+} a HCO^{3-} stimuluje adenylátcyklázu k produkci cAMP. cAMP aktivuje PKA a změny v koncentraci tohoto druhého posla mohou regulovat a řídit činnost PKA (Visconti et al. 1995b).

U spermatických buněk v zásadě neprobíhá transkripce ani translace, řízení dějů vedoucích ke kapacitaci může být tedy ovládáno jen pomocí posttranslačních úprav, konkrétně to tedy jsou fosforylace a defosforylace na tyrozinových, serinových a threoninových zbytcích, které jsou hlavními modifikacemi proteinů řídících proces kapacitace. Kapacitace spermií je významně spojena s tyrozinovou fosforylací proteinů. Doba, při které je tyrozinová fosforylace u spermií maximální je 90 minut (Visconti et al. 1995b).



Obr. 4: Schéma dějů vedoucích ke kapacitaci v savčí spermii (Naz 2004)

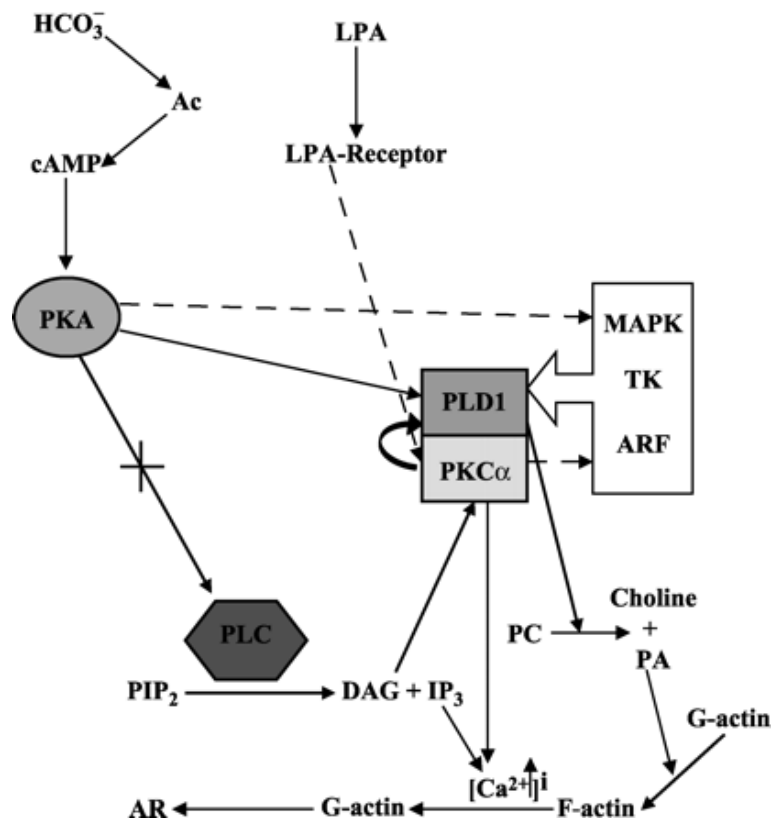
3.2.2.3 Změny v aktinovém cytoskeletu během kapacitace

Mezi další důležité procesy doprovázející přípravu spermie na oplození vajíčka je formování F-aktinu, bez kterého by následně nemohla nastat AR (Brener et al. 2003, Spungin and Breitbart 1996).

Když dojde ke kontaktu spermie se ZP vajíčka, ve spermii dochází k aktivaci fosfolipázy C (PLC) (Breitbart and Naor 1999) (obr. 5). Stejně tak jako v jiných buňkách, i ve spermii následuje kaskáda molekulárních mechanismů počínaje štěpením fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátu (PIP₂) pomocí PLC na známé druhé posly diacylglycerol (DAG) a inositol trifosfát (IP₃). Přítomnost molekuly DAG má za následek aktivaci proteinkinázy C (PKC), která otevírá Ca²⁺ kanály v PM. Pokud je však funkce proteinkinázy C (PKC) uměle inhibována, nedochází k narušení kapacitace ani jí doprovázejícího procesu tyrozinové fosforylace (Visconti et al. 1995b). Funkce PKC je tedy spojena spíše s formováním F-aktinu spermie a následně s AR spermie než se samostatnou kapacitací.

Podle (Lin, Hess and Aitken 2002) je polymerace aktinu důležitá pro zahájení motility spermii v průběhu posttestikulárního zrání, v rámci přípravy spermie na oplození je

polymerace aktinu zásadní pro dekonenzaci jádra spermie a pro její inkorporaci do cytoplasmy vajíčka (Sanchez-Gutierrez, Contreras and Mujica 2002). Během kapacitace hraje aktinový cytoskelet významnou roli, míra aktinové polymerace pozitivně koreluje s kapacitací spermií a to u různých druhů savců (Dvorakova et al. 2005). Při konci kapacitace naopak dochází k depolymerizaci F-aktinu, což je zásadním krokem pro uskutečnění AR. Právě změny v aktinovém cytoskeletu během kapacitace a následné AR a aktivita Ser/Thr proteinkinázy Tssk6 (testis-specific serine kinase 6) hrají zásadní roli pro relokaci proteinu IZUMO do fúzogenních oblastí hlavičky spermie (Sosnik et al. 2009).



Obr. 5: Remodelace aktinu spermie během kapacitace a AR

(Breitbart, Cohen and Rubinstein 2005)

3.3 Akrozomální reakce

K tomu, aby mohlo dojít k fúzi spermie a vajíčka, musí napřed proběhnout specifická exocytická reakce zvaná akrozomální. Ta je umožněna díky akrozómu, struktuře nacházející se na anteriorní části hlavičky spermatické buňky.

Samostatné reakci musí ovšem předcházet úspěšná kapacitace spermie, bez které by spermie nebyla schopna úspěšně podstoupit AR. Poté může dojít k navázání spermie na glykoproteinový obal vajíčka ZP. Ten se u myšovitých hlodavců skládá ze 3 hlavních proteinů ZP1, ZP2 a ZP3 (Bleil and Wassarman 1980). Proteiny ZP2 a ZP3 spolu tvoří dlouhá vlákna, která jsou propojena pomocí proteinu ZP1. Pomocí proteinu ZP3 dochází k vazbě

spermie a vajíčka, konkrétně tedy zřejmě dochází k navázání receptoru na hlavičce spermie na ZP3 protein (Yanagimachi et al. 1994). Sekundární vazbu zprostředkovává protein ZP2 opět spolu se ZP2 receptorem na hlavičce spermie. Po depolymeraci aktinu jsou PM a vnější akrozomální membrána v těsné blízkosti, díky tomu v důsledku kontaktu ZP3 a ZP3 receptoru dochází ke spuštění kaskády fúzogenních reakcí, při kterých dochází k fúzi právě dvou zmíněných membrán. To má za následek uvolnění obsahu akrozomálního váčku, především pak hydrolytických enzymů např. akrosinu a na spermii dochází k odkrytí nových membránových domén nezbytných k oplození vajíčka. Kromě ZP-indukované AR bylo již dokázáno, že AR může být u myši spuštěna pomocí kumulárních buněk (Jin et al. 2011), což potvrzuje, že i spermie po AR jsou zřejmě stále schopny proniknout ZP a oplodnit oocyt (Inoue et al. 2005).

3.3.1 Akrozomální reakce *in vitro*

AR může být navozena i v laboratorních podmínkách, buď přímo pomocí látek fyziologických jako je solubilizovaná ZP či progesteron, nebo pomocí epidermálního růstového faktoru či CaI, látky, která pomocí transportu Ca^{2+} iontů dokáže v laboratorních podmínkách AR navodit (Breitbart and Spungin 1997), dále může být AR indukována pomocí thapsigarginu, který má také za následek zvýšení Ca^{2+} iontů v cytoplasmě, čímž indukuje AR u kapacitovaných spermií (Spungin and Breitbart 1996). Ca^{2+} a HCO_3^- nejsou tedy molekulami esenciálními pouze pro kapacitaci, ale také se podílí na indukci AR (Visconti et al. 1995b).

V této práci byla AR navozována pomocí obou typů induktorů, pomocí fyziologického progesteronu, tak pomocí nefyziologického CaI (A23187).

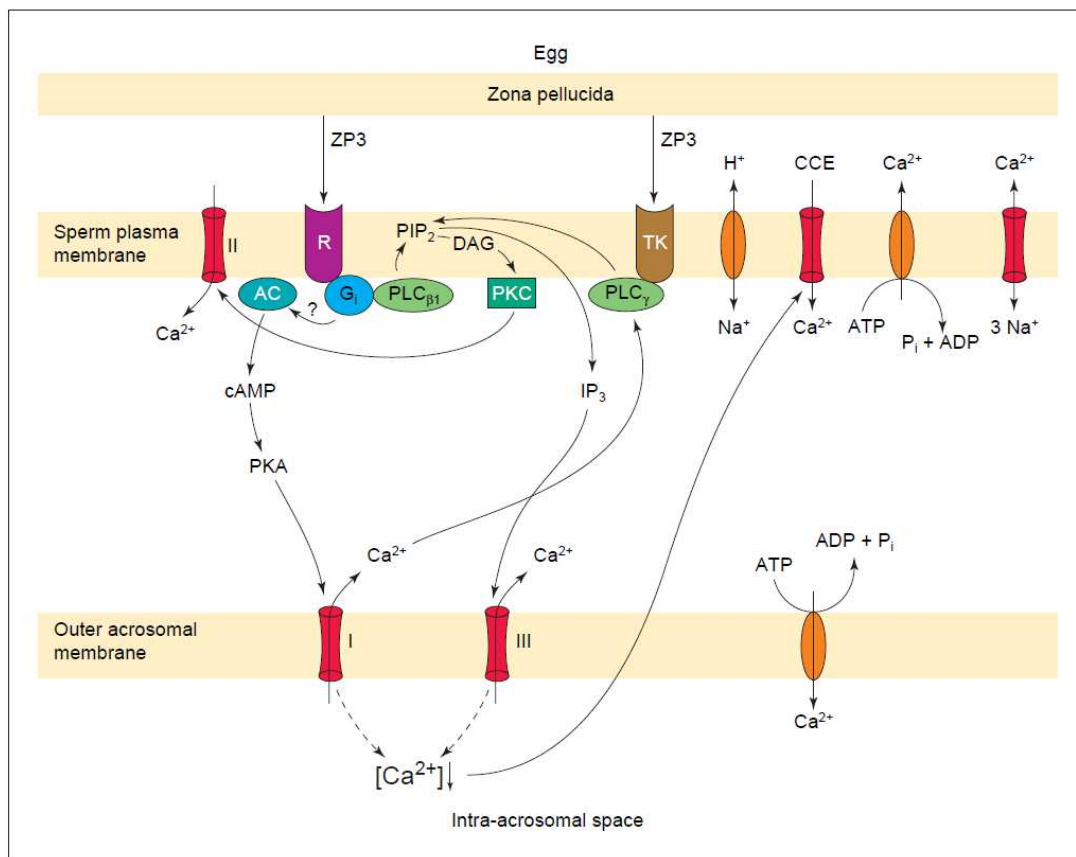
3.3.2 Iniciační akrozomální reakce

Jak bylo již zmíněno, na počátku AR je kontakt spermie se ZP3 receptorem se ZP3 proteinem vajíčka. Konkrétní receptor na spermii je dodnes předmětem diskuzí, je identifikováno více molekul, některé studie se dokonce zabývají hypotézou, že by interakce spermie-vajíčko mohla být zprostředkována více interakcemi a že za spouštění AR nemusí nést zodpovědnost pouze jeden povrchový protein spermie.

Podle (Breitbart and Spungin 1997) případný receptor aktivuje Na^+/H^+ pumpu (obr. 6), která způsobí zvýšení vnitrobuněčné alkalizace a následně tedy i depolarizaci PM. Po této tzv. ZP3 stimulaci dochází k výraznému snížení membránového potenciálu spermie na -25 mV (Arnoult et al. 1996), tato depolarizace je způsobena aktivací kationtových kanálů, tedy ZP3 aktivuje kationtové kanály, ty se aktivují a díky transportu kationtů dochází k depolarizaci

membrány a na G-proteinech závislému zvýšení intracelulárního pH (Florman et al. 1995). Jak je to tomu i u jiných exocytických reakcí v buňce tak i u AR, jakožto zástupce exocytického procesu u pohlavních buněk, tak se i zde významně účastní regulace exocytózy vápenaté ionty. Transport vápenatých iontů je při iniciaci AR prozatím malý (Florman 1994), a proto k indukci signálních drah vedoucích k AR ještě nedochází. Následně však působením depolarizace membrány dochází k otevření napěťově ovládaných iontových kanálů, které byly na spermiích savců detekovány (Arnoult et al. 1996), ty spustí masivní transport Ca^{2+} iontů (obr. 6), a zahájí AR (Florman 1994, Arnoult et al. 1996)

Na receptory spermie se váže progesteron, a to během průchodu buněčného obalu vajíčka *cumulus oophorus*. Navázání progesteronu na receptory je součástí iniciace AR. Součástí signálních drah, které se po navázání na receptory spustí, je i zvýšení Ca^{2+} iontů a změny v pH hlavičky spermie. AR je stejně jako kapacitace velice komplexní děj, kde dochází k aktivaci více i na sobě nezávislých drah a bez kterých AR nemůže proběhnout.



Obr. 6: Schéma znázorňující možné signální dráhy vedoucí k AR (Breitbart and Naor 1999)

3.4 Reprodukční strategie myšovitých hlodavců (Muridae)

Myšovití hlodavci, jejichž reprodukční strategii se na proteinové úrovni částečně dotýká tato DP práce, mají v rámci reprodukce velice dobrý potenciál. Délka jejich březosti je

relativně krátká, četnost jejich rozmnožování vysoká a velikost vrhu je na savce více než dostačující. U samic se setkáváme s tzv. estrálním cyklem, což je pravidelně se opakující fyziologický děj probíhající u samic. Během estrálního cyklu dochází k řadě změn, mezi které patří především změny v hladině hormonů a ve stavbě dělohy samice. Estrální cyklus se dělí na několik fází a to na proestrus, estrus, metaestrus, diestrus a anestrus. Fáze, ve které se samice schopna úspěšného páření je fáze estru.

3.4.1 BALB/c

Zaměříme-li se na konkrétní zástupce, tj. zástupce rodu *Mus* pocházejícího z druhů *Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus*. BALB/c je to albinotický inbrední kmen myši, který systematicky patří do čeledi myšovitých (*Muridae*) a řádu hlodavců (*Rodentia*). Do pohlavní dospělosti se tyto zástupci dostávají mezi 4.-7. týdnem. Myši, stejně jako ostatní hlodavci, patří mezi zvířata polyestrická (estrální cyklus se opakuje několikrát do roku), jejichž estrální cyklus trvá mezi 4-6ti dny a doba gravidity je průměrně 18-22 dní. Co se týká počtu mláďat ve vrhu, číslo se pohybuje mezi 6-20ti mláďaty na vrh.

3.4.2 *Apodemus*

U jedinců rodu *Apodemus* je to obdobné, je to opět živočich polyestrický, doba gravidity se u myšic pohybuje okolo 23 dní a samicím se rodí průměrně okolo 4-6ti mláďat. Myšice malooká (*A. microps*) je nejmenší z našich zástupců myšic, která obývá především bezlesou krajinu. Myšice křovinná (*A. sylvaticus*) je rozměrově oproti myšici malooké mnohem větším a mohutnějším zástupcem, obývá převážně okraje lesních porostů, křovinné stráně i okraje vodních toků.

Některí zástupci se vyznačují vysokou mírou promiskuitního chování, tj. že se samice páří s více než jedním samcem, pokud se tak stane během jednoho estru, v jednom vrhu lze najít mláďata od více samců. Tomuto jevu se obecně říká „mnohonásobná paternita“, ta se dá sledovat pomocí studia mikrosatelitových lokusů pro matku a mláďata. U myšice malooké se mnohonásobné paternity vyskytli jen u přibližně 33 % samic, lze tedy o myšici malooké mluvit jako o fakultativně promiskuitním či spíše monogamním zástupci (Bryja et al., 2005). Párovací systém s vysokou mírou mnohonásobných paternit je u rodu *Apodemus* též dokumentován, zástupce s vyšší mírou tohoto systému je již zmíněná Myšice křovinná, u které byla míra mimopárových paternit přibližně 50 %. To zřejmě souvisí i s velikostí *testes*, Myšice malooká vykazuje v porovnání s promiskuitním zástupcem Myšice křovinné signifikantně menší velikost *testes* (Bryja and Stopka 2005, Bryja et al. 2008).

3.4.3 Vnitrodruhová kompetice spermií

Myšovití hlodavci jsou vysoce teritoriální savci, což je konkrétně u rodu *Apodemus* dokumentováno na výrazném zvětšení jejich *testes* (Bryja and Stopka 2005). Zřejmě i z důvodu kompetice jedinců u čeledi *Muridae* musel vzniknout způsob, jak v rámci vnitrodruhové kompetice vzájemně soupeřit o reprodukční úspěch jednotlivce. Pokud se v reprodukčním traktu samice setkají spermie od více samců ve stejném čase, dochází mezi nimi k „soutěži“ o oplození vajíčka samice. Pokud tato soutěž probíhá v rámci jednoho druhu, mluvíme o tzv. vnitrodruhové kompetici spermií.

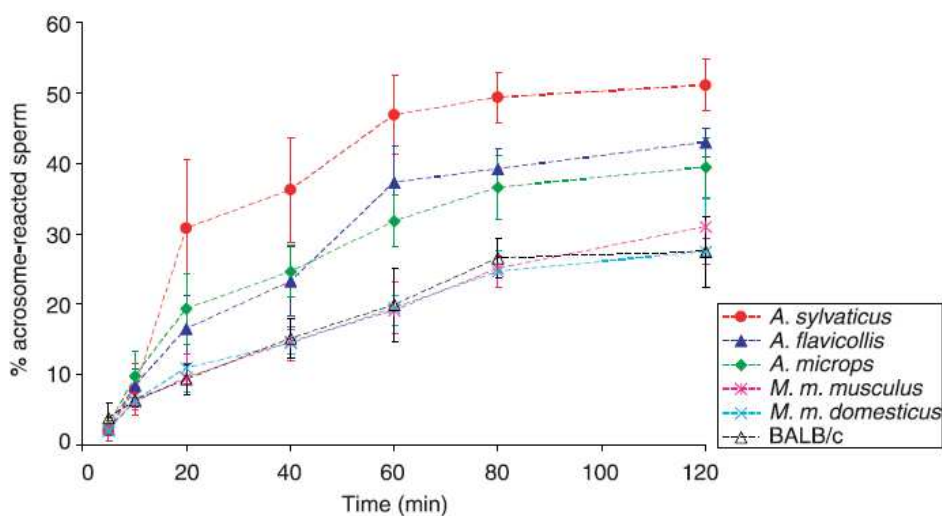
Dá se předpokládat, že pro vyšší rychlost oplození vajíčka vznikl u spermií myšovitých hlodavců unikátní mechanismus tvorby tzv. „vláček“ (Moore et al. 2002). Vlázky se formují tak, že se spermie zachytí pomocí svého falciformního háčku na hlavičce, za háček či bičík jiné spermie. Takto spojené spermie se v počtu stovek až tisíců buněk progresivně pohybují směrem k vajíčku výrazně vyšší rychlostí, než se pohybují spermie samostatně (Moore et al. 2002). Rozpojování těchto vláček začíná podle (Moore et al. 2002) v čase 30 minut a je u všech buněk kompletně dokončeno v čase 90 minut kapacitace *in vitro*. K tomuto rozpojení slouží spermiím tzv. předčasná spontánní AR, jíž je věnována následující podkapitola.

3.4.4 Spontánní akrozomální reakce

K indukci AR u myši dochází kontaktem spermie se ZP nebo vrstvou kumulárních buněk oocyty (Jin et al. 2011). U čeledi *Muridae* se setkáváme navíc se spontánní AR, jejíž mechanismus není doposud zcela objasněn, název „spontánní“ je brán spíše ilustrativně jak již bylo řečeno neví se, jak tato AR probíhá ani jaký je její mechanismus. Podle (Moore et al. 2002) je spontánní AR především nástrojem k rozpojení spermií z tzv. vláčkového uspořádání. Uspořádání do vláček definovali (Johnson et al. 2007), dochází k němu u myšovitých hlodavců, jejichž spermie obsahují falciformní háček na hlavičce spermie, pomocí nichž dochází k asociaci spermií, ve kterých dochází k propojení pomocí těchto háčků.

Jak bylo řečeno, při spontánní AR dochází k rozpojení vláčkového uspořádání spermií během procesu oplození (Johnson et al. 2007). Touto AR prochází až 50 % spermatických buněk (Moore et al. 2002). K nejvyššímu nárustu spermií po spontánní AR (obr. 7) dochází u myšovitých hlodavců v čase 60 minut kapacitace *in vitro* (Moore et al. 2002, Johnson et al. 2007). Mezi zástupce s nejvyšší mírou spontánní AR patří *A. sylvaticus* s přibližně 50 % spontánní AR, u dalších vybraných zástupců *A. microps* a laboratorního

kmene myši BALB/c lze vidět nižší míru spontánní AR, konkrétně tedy u *A. microps* je to přibližně 30 % a u BALB/c 20 % v závislosti na čase (obr. 7).



Obr. 7: Míra spontánní AR u zástupců rodu *Apodemus* ve srovnání se zástupci *Mus musculus* (Johnson et al. 2007)

Jaké spermie prochází spontánní AR? Spermie, tvořící vláček jsou za sebe zaklesnuty pomocí háčků a právě tímto kontaktem dochází k indukci spontánní AR. Spermie na začátku vláčku neboli „vůdčí“ spermie neprochází spontánní AR, dá se tedy předpokládat, že schopnost oplození tato spermie neztrácí. Otázkou tedy zůstává, zda jsou i spermie uvnitř vláčku po této spontánní AR i nadále schopny oplodnit oocyt, nebo zda je spontánní AR jen určitým altruistickým „sebeobětováním“ spermii umožňujícím zvýšení motility a tím i zvýšení reprodukčního úspěchu jedince.

Doposud byla spontánní AR chápána jako určitý sebe-destruktivní proces, po kterém spermie ztrácí schopnost oplození (Moore et al. 2002). Jak se však ukázalo, i spermie, které prošly AR jsou stále schopny oplodnit vajíčko (Inoue et al. 2011). V důsledku toho může být vyslovena hypotéza, zda spontánní AR nepředstavuje pro spermie naopak určitou selekční výhodu, pomocí které by došlo k urychlení procesu oplození ve vysoce promiskuitním prostředí.

3.5 Protein IZUMO

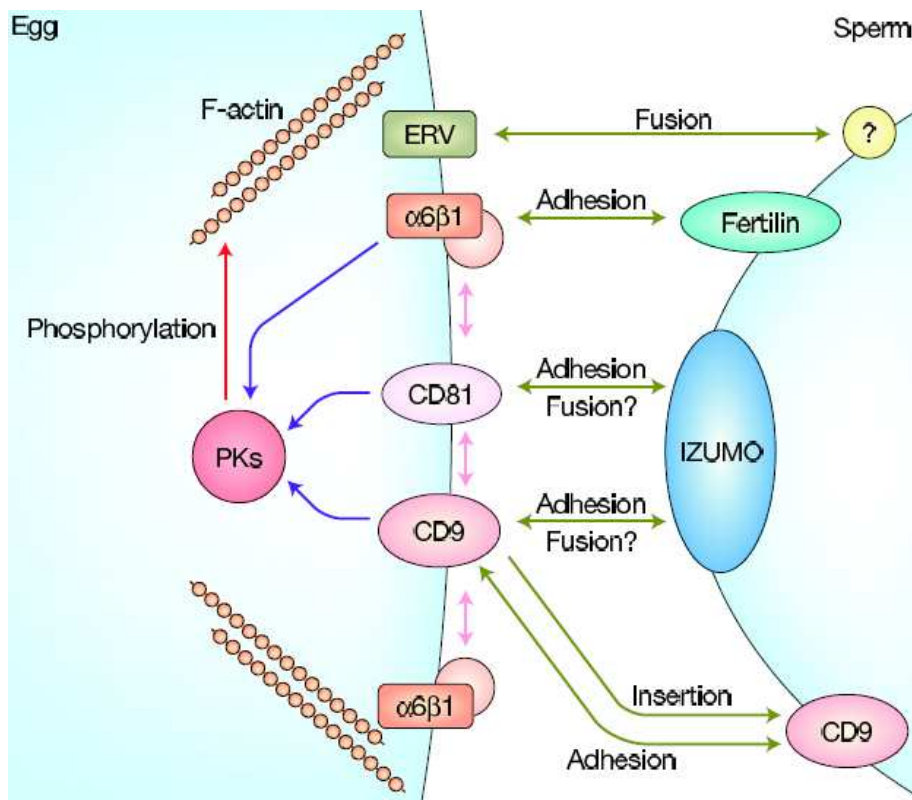
Protein IZUMO je transmembránový protein (membránový protein typu I) patřící do rodiny imunoglobulinových (Ig) proteinů, který obsahuje Ig doménu ve své extracelulární části. IZUMO je primárním fúzogenním proteinem spermie (obr. 8), dle výsledků (Wang et

kDa (Inoue et al. 2005), tato forma je esenciální pro fúzi spermie a vajíčka. Ovšem v práci (Ellerman et al. 2009) byla kromě popsané formy objevena ještě jedna a to o velikosti 60 kDa, ta byla v téže publikaci popsána jako fosforylovaná forma IZUMO 1. IZUMO 3 a 4 byli detekováni ve dvou formách, zde se podle (Ellerman et al. 2009) jedná o různé formy sestříhu. Po AR zůstává však významně v hlavičce spermie zastoupena pouze 56 kDa forma IZUMO 1 a dvě formy IZUMO 3, ztrátu 60 kDa formy IZUMO 1 (Ellerman et al. 2009) vysvětluje možnou lokalizací této formy na vnější akrozomální membráně či její defosforylací.

3.5.3 Úloha proteinu IZUMO

Interakce mezi gametami a splynutí jejich PM je složitý proces zahrnující interakci více proteinů na povrchu spermie a vajíčka (Rubinstein et al. 2006). Fúze gamet je vrcholným krokem procesu oplození, po kterém z haploidních buněk vzniká buňka diploidní, zygota. O molekulárních mechanismech fúze gamet není doposud mnoho známo, IZUMO je jedním z mnoha proteinů účastnících se fúze spermie a vajíčka a je považován za primární fúzogenní protein spermie (Inoue et al. 2005). Spermie knock-out samců pro tento protein vykazují normální viabilitu i motilitu avšak u nich nedochází k fúzi s vajíčkem. Spermie těchto jedinců dokáží proniknout ZP, ale následně dochází k jejich selhání právě při fúzi s oocytem. Aby k této fúzi mohlo vůbec dojít, musí být IZUMO relokalizován z oblasti akrozomální membrány do oblasti equatorálního a post-akrozomálního regionu hlavičky spermie (Inoue et al. 2005, Sosnik et al. 2009). Tato relokalizace IZUMO je zřejmě zprostředkována pomocí aktinového cytoskeletu spermie (Sosnik et al. 2009) a Tssk6, U Tssk6-knockout jedinců byla pozorována normální viabilita, ovšem spermie nebyly schopny fúzovat s oocytem (Sosnik et al. 2009). Jen ty spermie, které projdou AR následně mohou projít obalem ZP (Bedford 1968, Stein, Primakoff and Myles 2004), tedy AR je nezbytnou součástí penetrace a následné fúze spermie a vajíčka. IZUMO je tedy akrozomálním transmembránovým proteinem.

Aby mohlo dojít k fúzi s oocytem, musí existovat i primární fúzogenní protein u samičí pohlavní buňky, vajíčka. Jako primární byl definován protein na povrchu vajíčka, protein z rodiny tetraspaninů CD9 (obr. 10) (Le Naour et al. 2000). Protein CD9 je integrální membránový protein oocytu asociovaný s integriny a dalšími proteiny. Protein IZUMO, který je po AR lokalizován v equatoriálním segmentu spermie se zřejmě váže na protein CD9 na oolemě vajíčka, mechanismus této případné vazby není doposud objasněn, uvažuje se však o vazbě pomocí již zmíněné Ig domény (Ellerman et al. 2009).



Obr. 10: Potenciální mechanismus fúze spermie a vajíčka podle (Sutovsky 2009)

3.5.4 Relokalizace IZUMO

IZUMO není u spermii lokalizován na PM, ale je skryt pod PM (Inoue et al. 2005), současně s AR dochází k jeho relokalizaci. IZUMO je před AR lokalizován pouze na anteriorní části hlavičky a postupně dochází k jeho relokalizaci do equatoriální až postakrozomální oblasti hlavičky spermie (Inoue et al. 2005). Předpokládá se, že právě v těchto oblastech spermie se nachází fúzogenní oblast spermie, ovšem i v závislosti na konkrétním druhu. Bylo prokázáno, že změny v lokalizaci proteinů jsou alespoň z části způsobené aktinovým cytoskeletem (Hernandez-Gonzalez et al. 2000), předpokládá se tedy, že relokalizace proteinu IZUMO souvisí právě s dynamickými změnami v cytoskeletárním aktinu spermie, které probíhají při kapacitaci a AR (Dvorakova et al. 2005).

Tssk6, též známá jako Sstk, je postmeioticky exprimovaná kináza v samčích zárodečných buňkách (Visconti et al. 2001), která se podílí na relokalizaci IZUMO během AR (Sosnik et al. 2009). Tssk6 je vysoce konzervovaným proteinem i savců, u jiných organismů nebyly žádné podobné homologní proteiny k této kináze nalezeny. Podle (Sosnik et al. 2009) po vyřazení Tssk6 nedochází k obvyklé relokalizaci a distribuci proteinu IZUMO do postakrozomální oblasti spermie. Tssk6 je lokalizována v oblastech, kde se nachází polymerizovaný aktin, ten je lokalizován v oblasti střední části spermie, v posteriorní části

hlavičky a v perforatoriu spermie (Dvorakova et al. 2005). Výsledky (Sosnik et al. 2009) ukazují, že dynamické změny v cytoskeletárním aktinu by mohly souviset s regulací pohybu IZUMO proteinu, Tssk6 a aktin jsou tedy zřejmě hlavními nástroji sloužící k transportu IZUMO do fúzogenních oblastí.

Tato práce se zabývá funkcí AR spermií myšovitých hlodavců, po AR dochází k odkrytí akrozomální membrány a je modifikováno membránové složení ekvatoriálního a postakrozomálního regionu spermie (Baldi et al. 2000), proto byla jako hlavní metoda v této práci použita imunofluorescenční detekce vybraných proteinů spermie, prvním ze zkoumaných proteinů je právě protein IZUMO.

3.6 Protein CD46

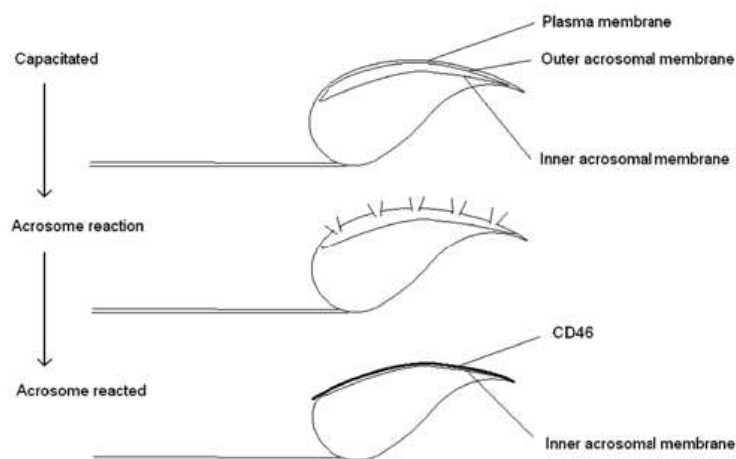
Protein CD46 je membránový kofaktorový protein, který je známý především jako komplementový receptor buněk chránící je před škodlivými účinky a poškozením vlastním komplementovým systémem (Cattaneo 2004). Protein se skládá se 4 krátkých repetitivních domén bohatých na serin a threonin, transmembránové domény a cytoplasmatického konce. Tento protein byl objeven u mnoha savců (Hosokawa et al. 1996, Miwa et al. 1998, Tsujimura et al. 1998) a donedávna se o něm uvažovalo pouze jako o součásti imunitního systému chránícím buňky před vlastním imunitním systémem. Úloha proteinu CD46 a detekce ve spermatických buňkách některých hlodavců však vedli k dalším výzkumům a k úvahám, jakou roli hraje tento protein při procesu oplození u hlodavců.

3.6.1 Exprese CD46 u čeledi *Muridae*

Expresa proteinu CD46 na spermiu byla prozatím prokázána u potkanů a myší (Mizuno et al. 2004, Johnson et al. 2007), u těchto hlodavců je dokumentována exprese tohoto proteinu pouze v *testes*. Co se týče zástupců myšic (*Apodemus*), protein CD46 u zástupců tohoto rodu není vůbec translatován. Konkrétně u zástupců *A. sylvaticus*, *A. flavicollis* a *A. microps* se objevuje alternativní splicing testikulární CD46 mRNA postrádající exony 5-7 či 6-7 a to v kombinaci s prodloužením 3' nepřekládané oblasti a často i s delecí v 5' terminální sekvenci. Všechny tyto faktory nakonec způsobují absenci exprese proteinu CD46 u spermií těchto zástupců (Johnson et al. 2007). Podobně je na tom i selhání exprese u zástupce *A. agrarius*, důvod chybné exprese není sice totožný, jako v předchozím případě, výsledkem je opět selhání translace proteinu CD46 (Clift et al. 2009).

3.6.2 Lokalizace CD46

Spermie musí podstoupit morfologické změny zvané AR, bez kterých nemůže dojít k oplodnění oocyty. Protein CD46 se nachází na anteriorní části hlavičky spermie, je lokalizován na vnitřní akrozomální membráně spermatických buněk (Anderson, Michaelson and Johnson 1989, Mizuno et al. 2004) (obr. 11). Během AR spermie ztrácí svou PM v oblasti akrozómu, čímž dochází k odkrytí vnitřní akrozomální membrány, kde je protein CD46 lokalizován (Inoue et al. 2003). Vzhledem k jeho lokalizaci na akrozomální membráně je protein CD46 vystaven vnějšímu prostředí a stává se plně detekovatelným až po AR (Riley et al. 2002). Na povrchu PM se nevyskytuje, jeho funkce v ochraně proti komplementu je tak u spermii spíše nepravděpodobná. I právě proto se předpokládalo, že protein CD46 bude v reprodukčním procesu hrát úplně jinou roli. Podle (Seya et al. 1993, Cervoni et al. 1992) by CD46 protein mohl představovat ochranu proti komplementu v samičím reprodukčním traktu u spermii, které již prošli AR.



Obr.11: Lokalizace proteinu CD46 ve spermii (Frolikova et al. 2012)

3.6.3 Absence CD46 u rodu *Apodemus*

Reprodukční trakt samice představuje oblast s vysokou mírou komplementové imunity chránící tělo samice proti nejrůznějším genitálním patogenům (Hasty et al. 1994). Protein CD46 je znám právě jako tzv. Creg protein (complement regulatory protein) (Johnson et al. 2007), tedy chrání buňky před poškozením pomocí komplementu (Cummerson et al. 2006). U rodu *Apodemus* se setkáváme s vysokou mírou spontánní AR a zároveň u rodu *Apodemus* však nedochází k expresi proteinu CD46 na akrozomální membráně spermie (Johnson et al. 2007). Nabízela se tedy otázka, zda je role proteinu CD46 jako komplement-regulujícího proteinu hlavním důvodem jeho exprese na akrozomální membráně některých myšovitých hlodavců případně jakou souvislost má absence proteinu CD46 s vyšší mírou spontánní AR.

Zároveň se nabízela otázka, jaké jiné proteiny nahrazují komplement-regulující funkci tohoto proteinu právě v *testes*. Těmito dalšími proteiny, které se účastní ochrany vlastních buněk proti komplementu a mohly by tedy nahradit roli proteinu CD46 v reprodukčním traktu jsou proteiny CD55 a CD59 (Cummerson et al. 2006, Clift et al. 2009). (Clift et al. 2009) prokázali přítomnost těchto proteinů u zástupců rodů *Apodemus* a *Mus*. Ochranu proti komplementu by tedy skutečně mohli nahradit tyto proteiny (lokalizované na PM) zvláště pak u jedinců, kde exprese proteinu CD46 úplně chybí.

3.6.4 Význam proteinu CD46 v *testes*

Pokud by hlavní funkce CD46 nebyla v ochraně proti komplementovému ataku buněk, jakou roli by protein CD46 u spermií měl? Data publikovaná skupinami (Inoue et al. 2003, Johnson et al. 2007) ukazují, že úloha proteinu souvisí spíše než s ochranou spermatických buněk s integritou akrozómu, na které se protein CD46 zřejmě podílí. Podle (Inoue et al. 2003) by se CD46 mohl podílet na stabilizaci akrozomální membrány, (Johnson et al. 2007) ve své práci zase ukazuje souvislost mezi absencí proteinu CD46 a vyšší mírou spontánní AR, které spolu pozitivně korelují. Z těchto souvislostí se dá usuzovat, že protein CD46 nebude hrát u hlodavců stejnou roli, jako je tomu u ostatních savčích buněk, svou roli bude mít zřejmě právě při procesu oplození, konkrétně tedy při spontánní AR. Pokud by totiž absence proteinu CD46 umožňovala spermiím procházet předčasně AR, mohla by právě tato skutečnost představovat mechanismus urychlení procesu oplození u promiskuitních druhů hlodavců.

3.7 Protein $\beta 1$ integrin

Protein $\beta 1$ integrin patří do velice známé a charakterizované rodiny buněčných adhezních receptorů umožňujících interakce buněk s okolním prostředím. Integriny představují transmembránové receptory, které se podílejí na zprostředkování buněčné adheze, účastní se migrace buněk, proliferace a diferenciací, zároveň dokáží zprostředkovat přenos signálu ven i vně buňky (Liu, Calderwood and Ginsberg 2000). Integriny se přirozeně spojují nekovalentními vazbami z α a β řetězců, které spolu tvoří heterodimery.

Tato práce je zaměřena konkrétně na $\beta 1$ podjednotku, ta byla detekována u lidských spermií histochemicky na membráně semenotvorných kanálků, spermatocytů, spermatid i spermatických buněk (Schaller et al. 1993). (Barraud-Lange et al. 2007) ukazují pomocí několika metod, že $\beta 1$ integrin je exprimován i u myších spermií a že je zahrnut v interakčním procesu spermie-vajíčko.

Ještě donedávna byl β 1 integrin považován za protein lokalizován výhradně u vajíčka, dnes se ukazuje, že protein může být jak u vajíčka, tak u spermie a že by mohl hrát významnou roli v procesu oplození. β podjednotky jsou charakteristické řadou cystein-bohatých opakování stabilizovaných pomocí disulfidických můstků. Ve studii byl β 1 integrin lokalizován na povrchu kapacitovaných spermií i u spermií po AR. Expresí β 1 integrinu podle (Reddy, Rajeev and Gupta 2003) u lidských spermií pozitivně koreluje s jejich fertilizační schopností, podle čehož se dá usuzovat, že β 1 integrin hraje zásadní roli při interakci spermie a vajíčka.

3.7.1 β 1 integrin a CD46

Tato práce se zaměřuje především na úlohu spontánní AR, jejíž mechanismus není doposud zcela zřejmý. Předpokládá se, že protein CD46 hraje při tomto procesu určitou úlohu, doposud se však neví, jakým způsobem se CD46 může podílet na signalizačních drahách vedoucích k AR. Bylo prokázáno, že CD46 asociuje s některými kinázami účastnících se AR a to buď přímo či nepřímo zřejmě právě přes molekuly β 1 integrinu (Zaffran et al. 2001, Almog et al. 2008). Z tohoto důvodu bylo do této práce zahrnuto i studium relokace β 1 integrinu u spermatických buněk. Podle (Lozahic et al. 2000, Kurita-Taniguchi et al. 2002, Rezcallah et al. 2005) protein je CD46 asociován s β 1 integriny, včetně α 2 β 1 a α 5 β 1, které nevytvářejí komplexy s tetraspaniny. Tato studie ukazuje, že protein CD46 je v asociaci s β 1 integriny a v důsledku toho i s tetraspaniny. Tyto výsledky ve své studii (Lozahic et al. 2000) potvrzuje i objevením komplexu CD46/integrin. β 1 integrin je v interakci a aktinovým cytoskeletem (Calderwood, Shattil and Ginsberg 2000), ten hraje důležitou roli během kapacitace a AR a během relokace primárního fúzogenního proteinu IZUMO (Sosnik et al. 2009). To vede k hypotéze, že by absence proteinu CD46 mohla souviset s rychlejším zhroucením F-aktinu ve spermii a tudíž by mohlo dojít k rychlejší AR.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Použitá zvířata pro odběr spermií

laboratorní myš ((inbrední BALB/c SPF kmen, Velaz)

Myšice malooká (*Apodemus microps/uralensis*)

Myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*)

4.1.2 Další materiál

petriho misky: Cell culture dish 35mm x 10mm (430165, Corning)

sklíčka podložní: 76 x 26 mm (4174970, Menzel-Gläzer)

sklíčka krycí: 20 x 20 mm (8000103, Hirschmann laborgeräte)

4.1.3 Chemikálie

M2 medium (M7167, Sigma)

Paraffinöl (8904.1, Roth)

Aceton (30005, LACH-NER, s.r.o.)

Triton X – 100 (Sigma)

Goat serum (G 9023, Sigma)

Bovine serum albumin (A7906, Sigma)

Calcimycin A 23187 (C7522, Sigma)

Progesteron (P8783, Sigma)

Lektin PNA conjugates Alexa Fluor 568 (L32458, Molecular Probes)

Vectashield mounting medium with DAPI (H1500, Vector)

4.1.4 Roztoky

15 mmol NH₄Cl

0,4 g NH₄Cl bylo rozpuštěno v 0,5 l PBS

PBS

100 ml destilované H₂O

1,37 mM NaCl

2,7 mM KCl

8,7 mM Na₂HPO₄ (pro 12 H₂O)

1,5 mM KH₂PO₄

TBS

10 ml destilované H₂O

1 mM NaCl

10 ml TRIS

3,7% formaldehyd

ředěn v PBS

0,1% TRITON

ředěn v PBS

4.1.5 Imunofluorescenční detekce-protilátky

Primární protilátky

Anti-mouse CD46 clone MM10 (HM118, Hycult biotech)

IZUMO 1 (K14) goat polyclonal IgG (79539, Santa Cruz Biotechnology)

Monoclonal anti-mouse Integrin β1 antibody (CD29) (MAB2405, R&D systems)

Sekundární protilátky

Alexa Fluor 488 donkey anti-rat IgG (H+L) (A21208, Invitrogen)

Donkey anti-goat IgG-FITC (2024, Santa Cruz Biotechnology)

4.1.6 Přístroje:

CO₂ inkubátor (NB-203LC, N-Biotek)

Flowbox (Bio II A, TELSTAR)

Světelný mikroskop (CX21, Olympus)

Binolupa (SZ, Olympus)

Centrifuga (Mini spin plus, Eppendorf)

Vortex (PV-1, P-LAB a.s.)

Váha (WPS 360/C/2, Radwag)

Invertovaný fluorescenční mikroskop se systémem Cell ^ R (mikroskop IX81, Olympus;

kamera Hamamatsu ORCA C4742-80-12AG)

4.2 Metody

4.2.1 Izolace spermií a příprava roztěrových preparátů

Po usmrcení dospělých samců byla odebrána *cauda epididymis* a vložena do 250 μ l TBS vytemperovaného na 37 °C. Dále byly spermie uvolňovány po dobu 5 minut v inkubátoru při 37 °C a v přítomnosti CO₂. *Cauda epididymis* byla poté vyjmuta a suspenze byla promyta 2x v PBS a stočena při 3000 rpm po dobu 5ti minut. Potřebná koncentrace a kvalita spermií byly zkontrolovány pod světelným mikroskopem. Pro dosažení potřebné koncentrace byla suspenze spermií následně naředěna a poté rozetřena na podložní sklíčka. Roztěry spermií byly dále fixovány vybraným způsobem.

4.2.2 Kapacitace *in vitro*

Pro přípravu roztěrových preparátů kapacitovaných spermií byla u spermií indukována kapacitace *in vitro*. V inkubátoru byly za přítomnosti 5% CO₂ vytemperovány petriho misky s 200 μ l a 100 μ l M2 kapacitačního média překrytým parafínovým olejem na 37 °C. Spermie byly po dobu 10ti minut uvolňovány z *cauda epididymis* v petriho misce s 200 μ l M2 kapacitačního média. Ze zásoby bylo následně odebráno vždy 5 μ l do připravených misek se 100 μ l kapacitačního média, aby výsledná koncentrace spermií byla přibližně 5×10^6 / ml. Pro monitorování změn v průběhu kapacitace byly spermie odebírány ve zvolených časech (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 a 90 minut).

4.2.3 Indukce AR

Pro navození AR byl do M2 kapacitačního média přidán CaI nebo Progesteron. CaI byl přidán do Petriho misek s M2 kapacitačním médiem a suspenzí spermií po příslušném čase kapacitace (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 a 90 minut) v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace byla 5 μ M. CaI byl ponechán v Petriho miskách po dobu 60ti minut. Progesteron byl přidán již na začátku kapacitace, tedy v čase 0 minut, a byl ponechán po celou dobu příslušného času kapacitace (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 a 90 minut).

4.2.4 Fixace a permeabilizace preparátů

Preparáty byly pro další použití fixovány nebo permeabilizovány jednou z následujících metod.

4.2.4.1 Formaldehyd – triton

Preparát byl po zaschnutí umístěn do kyvet a dle následujícího postupu fixován:

- zalití na 10 min 3,7% formaldehydem
- promytí 3 x 5min v PBS
- zalití na 5 min v 15mmol NH₄Cl
- promytí 3 x 5 min v PBS
- zalití max. na 3 min 0,1% TRITON
- promytí 3 x 5min v PBS

4.2.4.2 Permeabilizace acetonem

Spermie byly ponořeny na 10 minut do kyvety s acetonem o teplotě -20 °C.

Pro imunofluorescenční detekci proteinů CD46 a IZUMO byly preparáty permeabilizovány pomocí acetonu, pro detekci β1 integrinu byla použita fixace formaldehyd-triton.

4.2.5 Imunofluorescenční barvení

Preparáty byly po dobu 5 minut zavodňovány v PBS. Po vyjmutí z PBS byly preparáty blokovány po dobu 1 hod. pomocí 3% BSA v PBS nebo 10% kozího séra v PBS dle dané protilátky. Poté byla nanášena primární protilátka o dané koncentraci a byla 2 hodiny inkubována při pokojové teplotě ve vlhké komůrce. Poté byla primární protilátka po čase 3 x 5 minut odmyta pomocí PBS. Následně byla nanášena protilátka sekundární, která byla inkubována po dobu 1 hod., poté byla protilátka opět odmyta 3 x 5minut pomocí PBS. Preparáty byly nakonec zamontovány do Vectashield mounting medium s DAPI pro detekci jader spermií.

4.2.5.1 Duální imunofluorescenční barvení

Pro duální barvení byl postup přípravy shodný s klasickým imunofluorescenčním barvením. Po odmytí sekundární protilátky byl nanášen ještě PNA lectin, pomocí něhož lze sledovat akrozóm spermie a průběh AR. PNA lectin byl ponechán na preparátu po dobu 15 minut, a poté opět odmyt 3 x 5minut v PBS. Preparáty byly poté opět zamontovány do Vectashield mounting medium s DAPI pro detekci jader spermií.

4.2.6 Vyhodnocení

Z námi vybraných zástupců (BALB/c, *A. microps*, *A. sylvaticus*) byly připraveny preparáty se třemi skupinami spermií. První skupinou jsou spermie, které byly bez jakékoliv indukce pouze rozetřeny na podložní sklíčko. Druhou skupinou jsou spermie, které byly podrobeny různým časům kapacity *in vitro* a jako vnější stimul byl použit CaI. Třetí skupinou jsou spermie, které byly podrobeny kapacitaci *in vitro*, ke kterým byl následně přidán jako vnější induktor AR Progesteron. Tyto tři skupiny byly podrobeny imunofluorescenční detekci proteinů na invertovaném fluorescenčním mikroskopu Olympus IX81. Výsledky byly mezi sebou následně porovnávány a vyhodnocovány.

5 Výsledky

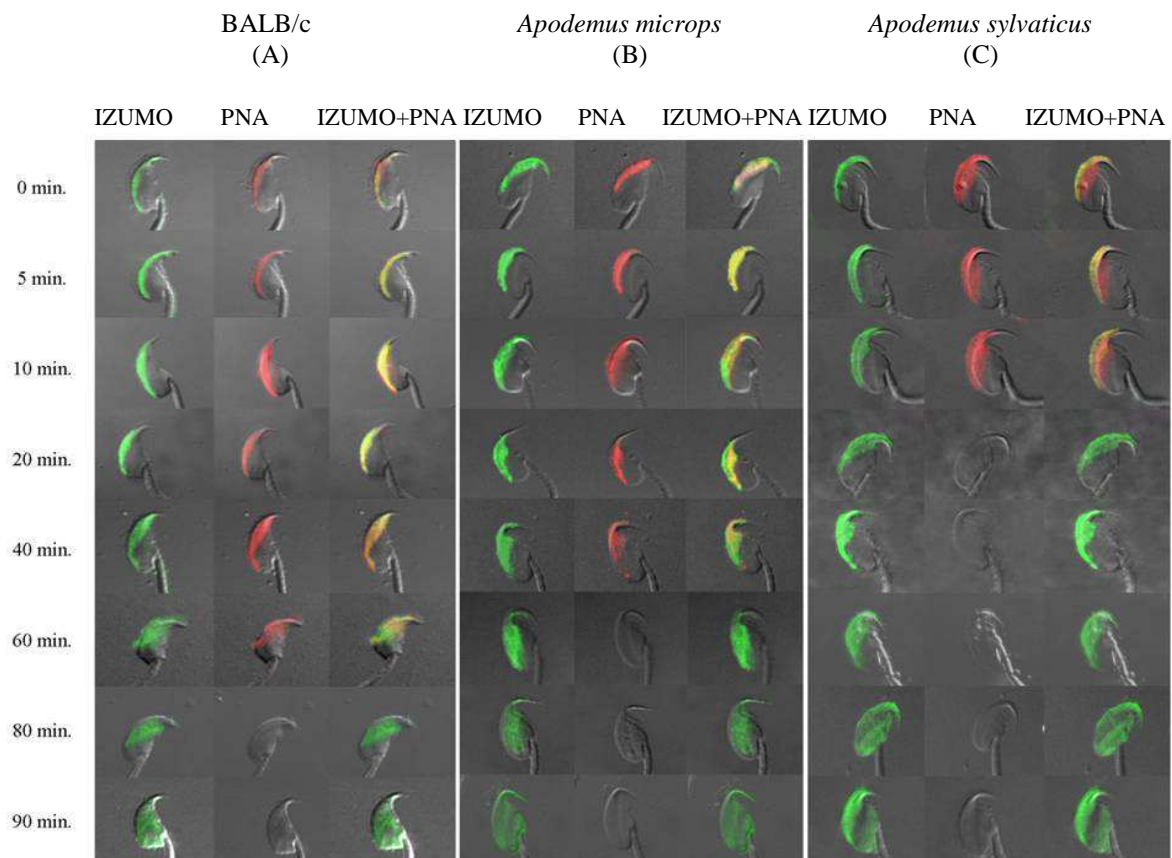
5.1 Relokalizace IZUMO během kapacitace a spontánní AR v závislosti na čase

Relokalizace proteinu IZUMO byla pozorována u zástupců BALB/c, *A. microps* a *A. sylvaticus* (obr. 12). Spermie byly kapacitovány v *in vitro* podmínkách po dobu 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 a 90 minut, následně u nich byla u imunofluorescenčně detekována a dokumentována relokalizace proteinu IZUMO. Pro určení stavu akrozómu bylo ve všech experimentech použito imunofluorescenční značení pomocí PNA lectinu. Časové údaje o relokalizaci IZUMO jsou přehledně uspořádány v tab. 1.

Relokalizace proteinu IZUMO u BALB/c během kapacitace *in vitro* a spontánní AR (obr. 12 A) začíná v čase 40 minut kapacitace, kdy se IZUMO přesouvá do apikální oblasti spermie. Do oblasti celého equatoriálního segmentu se IZUMO začíná relokalizovat v čase 60 minut a úplně jím je prostoupen v čase 80 minut. Do postakrozomální oblasti se IZUMO dostává v čase 90 minut kapacitace. Do času 40 minut nebyla relokalizace proteinu IZUMO u spermií BALB/c pozorována.

U spermií *A. microps* (obr. 12 B) dochází k prvním známkám relokalizace IZUMO z apikální oblasti akrozómu do equatoriálního segmentu hlavičky spermie již v čase 20 minut kapacitace *in vitro*. Celé oblasti equatoriálního segmentu nabývá IZUMO v čase 60 minut a následně je IZUMO relokalizován do oblasti postakrozomální a do celé oblasti hlavičky spermie v čase 90 minut kapacitace *in vitro*.

U spermií *A. sylvaticus* (obr. 12 C) dochází k přesunu IZUMO již v čase 10 minut. IZUMO je následně relokalizován a v čase 40 minut je prostoupen celou oblastí equatoriálního segmentu. Postupně je protein přesouván do postakrozomální oblasti a oblasti celé hlavičky spermie v čase 80 minut kapacitace. Nejprogresivnější relokalizace IZUMO během kapacitace a spontánní AR je pozorována u *A. sylvaticus* (tab. 1).



Obr. 12: Relokalizace IZUMO u BALB/c (A), *A. microps* (B) a *A. sylvaticus* (C) během kapacitace *in vitro* a spontánní AR

5.2 Relokalizace IZUMO během kapacitace při současné indukci AR CaI a Progesteronem

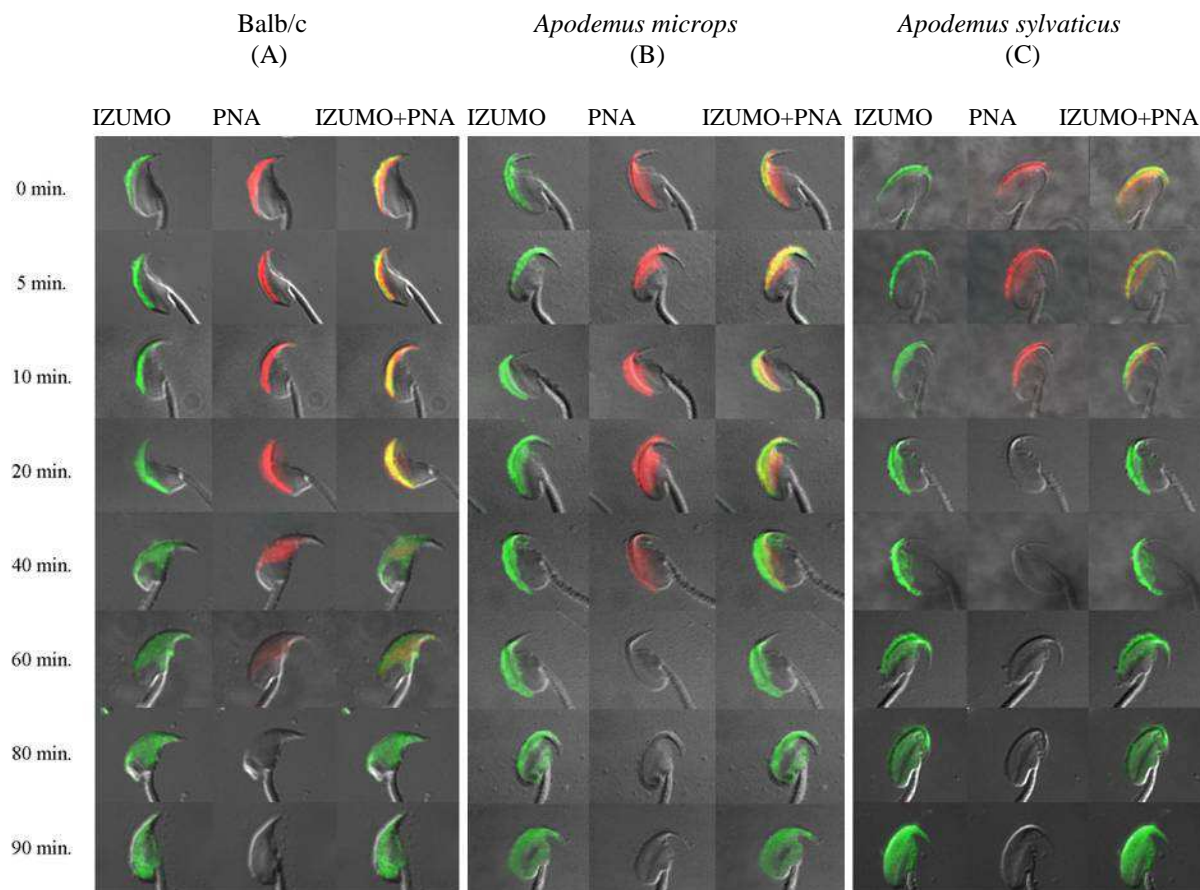
V tomto experimentu byla indukována AR pomocí dvou stimulů, CaI a Progesteronu u BALB/c, *A. microps* a *A. sylvaticus*. Na následujících fotografiích lze vidět, že k relokalizaci proteinu dochází u obou skupin v rozdílných časech, tedy že u indukce pomocí progesteronu dochází k časnější iniciaci relokalizace proteinu IZUMO (tab. 1).

5.2.1 Relokalizace IZUMO při použití CaI

Na obr. 13 lze pozorovat relokalizaci IZUMO u všech tří zástupců. Během indukce AR u BALB/c (obr. 13 A) pomocí CaI do apikální oblasti equatoriálního segmentu v čase 40 minut, celé oblasti equatoriálního segmentu nabývá IZUMO v čase 60 minut a do postakrozomální oblasti je relokalizován v čase 90 minut kapacitace.

U *A. microps* (obr. 13 B) dochází k relokalizaci IZUMO do apikální části equatoriálního segmentu v čase 10 minut a je jím kompletně prostoupen v čase 40 minut. Do oblasti postakrozomální a celé hlavičky spermie se IZUMO dostává v čase 90 minut.

U *A. sylvaticus* (obr. 13 C) je relokalizace IZUMO do equatoriálního segmentu zahájena v čase 20 minut a dokončena v čase 60 minut. Kompletní relokalizace do celé oblasti hlavičky spermie a postakrozomální oblasti vrcholí v čase 80 minut.



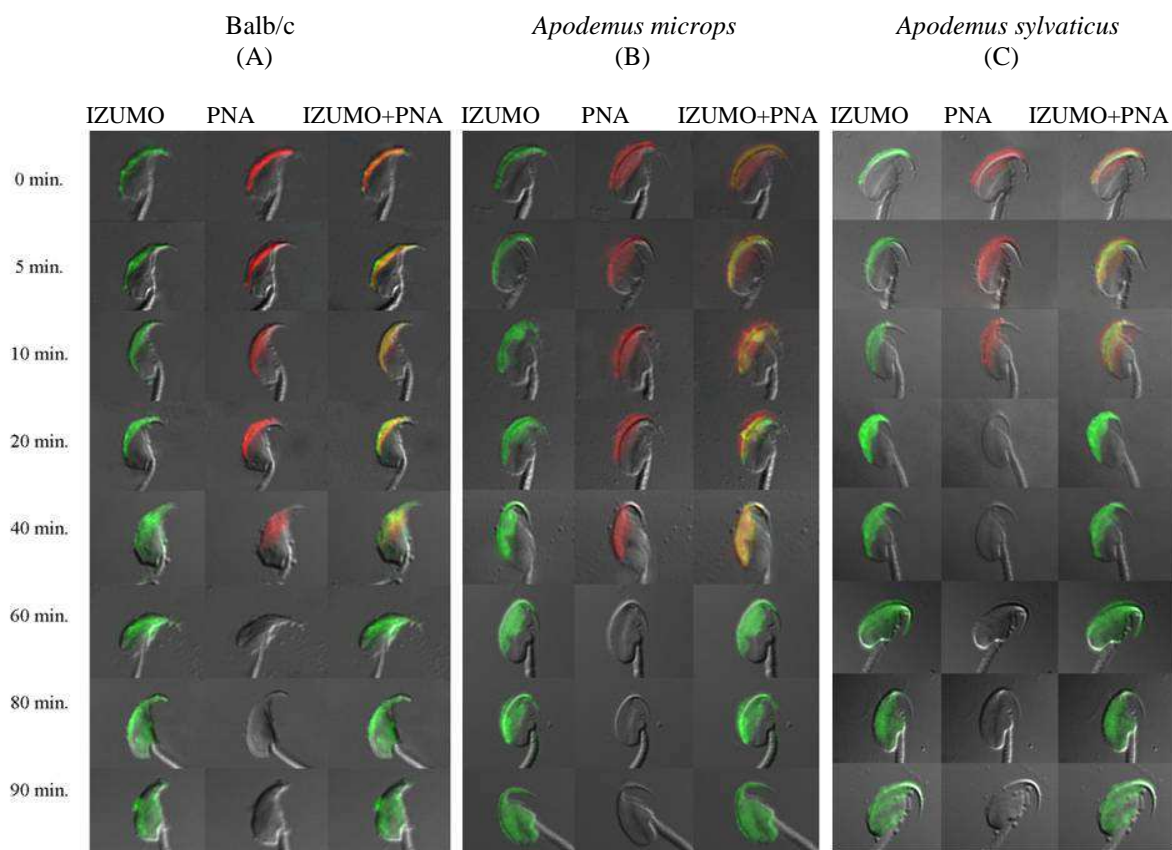
Obr. 13: Relokalizace IZUMO u BALB/c (A), *Apodemus microps* (B) a *Apodemus sylvaticus* (C) při indukci AR pomocí CaI

5.2.2 Relokalizace IZUMO při použití Progesteronu

Při indukci AR pomocí progesteronu (obr. 14) je evidentní progresivnější iniciace relokalizace IZUMO u všech tří zástupců (tab. 1). U BALB/c (obr. 14 A) k relokalizaci IZUMO do apikální oblasti equatoriálního segmentu dochází v čase 20 minut a prostupuje jím do času 40 minut, k relokalizaci do oblastí equatoriálního segmentu dochází o 20 minut dříve, než při indukci AR pomocí CaI. Oblasti postakrozomální nabývá IZUMO při indukci progesteronem v čase 80 minut kapacitace, což je o 10 minut dříve než při použití CaI (tab. 1).

K relokalizaci IZUMO dochází u rodu *Apodemus* výrazně dříve, u *A. microps* (obr. 14 B) k relokalizaci IZUMO do apikální oblasti equatoriálního segmentu dochází již v čase 5 minut a je jím kompletně prostoupen v čase 20 minut. U *A. sylvaticus* (obr. 14 C) je přesun do equatoriálního segmentu zahájen v čase 10 minut a dokončen v čase 40 minut. K relokalizaci do oblastí equatoriálního segmentu dochází při použití Progesteronu o 10 minut, u *A. sylvaticus* dokonce o 5 minut dříve než u BALB/c. Do oblastí celé fúzogenní oblasti equatoriálního segmentu se IZUMO dostává přibližně o 20 minut dříve u obou zástupců rodu

Apodemus než u indukce AR pomocí CaI. Do oblasti postakrozomální se IZUMO dostává identicky u použití obou stimulů, tj. u *A. microps* v čase 80 minut, u *A. sylvaticus* v čase 60 minut kapacity (tab. 1).



Obr. 14: Relokalizace IZUMO u BALB/c (A), *Apodemus microps* (B) a *Apodemus sylvaticus* (C) při indukci AR pomocí Progesteronu

	AES			ES			PAR		
	S	I	P	S	I	P	S	I	P
BALB/c	40	40	20	60	60	40	90	90	80
<i>A. sylvaticus</i>	20	20	10	60	60	40	90	80	80
<i>A. microps</i>	10	10	5	40	40	20	80	80	60

Tabulka 1: Relokalizace proteinu IZUMO u BALB/c, *A. microps* a *A. sylvaticus*:

Relokalizace IZUMO do apikální oblasti equatoriálního segmentu (AES), equatoriálního segmentu (ES) a postakrozomální oblasti (PAR) během spontánní (S) AR bez použití vnějšího stimulu nebo po přidání CaI (I) či Progesteronu (P)

5.3 Relokalizace IZUMO v závislosti na vlivu promiskuitního prostředí

Laboratorní kmen myši BALB/c, představuje organismus s nízkou mírou spontánní AR u spermií, naopak u rodu *Apodemus* míra spontánní AR stoupá se stoupající promiskuitou druhu (obr. 7, Johnson et al. 2007).

Mezidruhové srovnání relokalizace IZUMO během kapacitace je shrnuto v tabulce č. 1 a vyplývá z výsledků imunofluorescenčního značení.

Jak lze pozorovat na obr.12 (A), u spermií BALB/c ponechaných při kapacitaci *in vitro* byly první známky relokalizace IZUMO z apikální oblasti pozorovány v čase 40 minut kapacitace. K výraznému nárůstu relokalizace IZUMO dochází kolem času 60 minut, zde dochází k přesunu IZUMO proteinu do oblasti equatoriálního segmentu hlavičky spermie. V časech 80 a 90 minut kapacitace nabývá protein IZUMO oblasti celého equatoriálního segmentu až celé oblasti hlavičky spermie včetně oblasti postakrozomálního regionu hlavičky spermie.

Dle obr. 12 (B) lze u spermií zástupců *A. microps* pozorovat počátek relokalizace proteinu IZUMO z apikální oblasti do oblasti equatoriálního segmentu o 40 minut dříve než u BALB/c, tedy již v čase 20 minut kapacitace *in vitro*. Ke kompletní relokalizaci do oblasti equatoriálního segmentu dochází v čase 60 minut, do postakrozomální oblasti a celé hlavičky spermie se protein IZUMO relokalizuje ve stejném čase jako u BALB/c, tedy v čase 90 minut.

Relokalizace IZUMO u *A. sylvaticus* (obr. 12 C) začíná u spermií již v čase 10 minut kapacitace *in vitro*, kdy dochází k jeho relokalizaci do oblasti equatoriálního segmentu. To je v porovnání s *A. microps* o 10 minut dříve a o 50 minut dříve, než u spermií laboratorního kmene BALB/c. K finální relokalizaci do celé oblasti hlavičky včetně postakrozomální oblasti hlavičky spermie dochází v čase 80 minut kapacitace, tedy o 10 minut dříve než u *A. microps* a BALB/c.

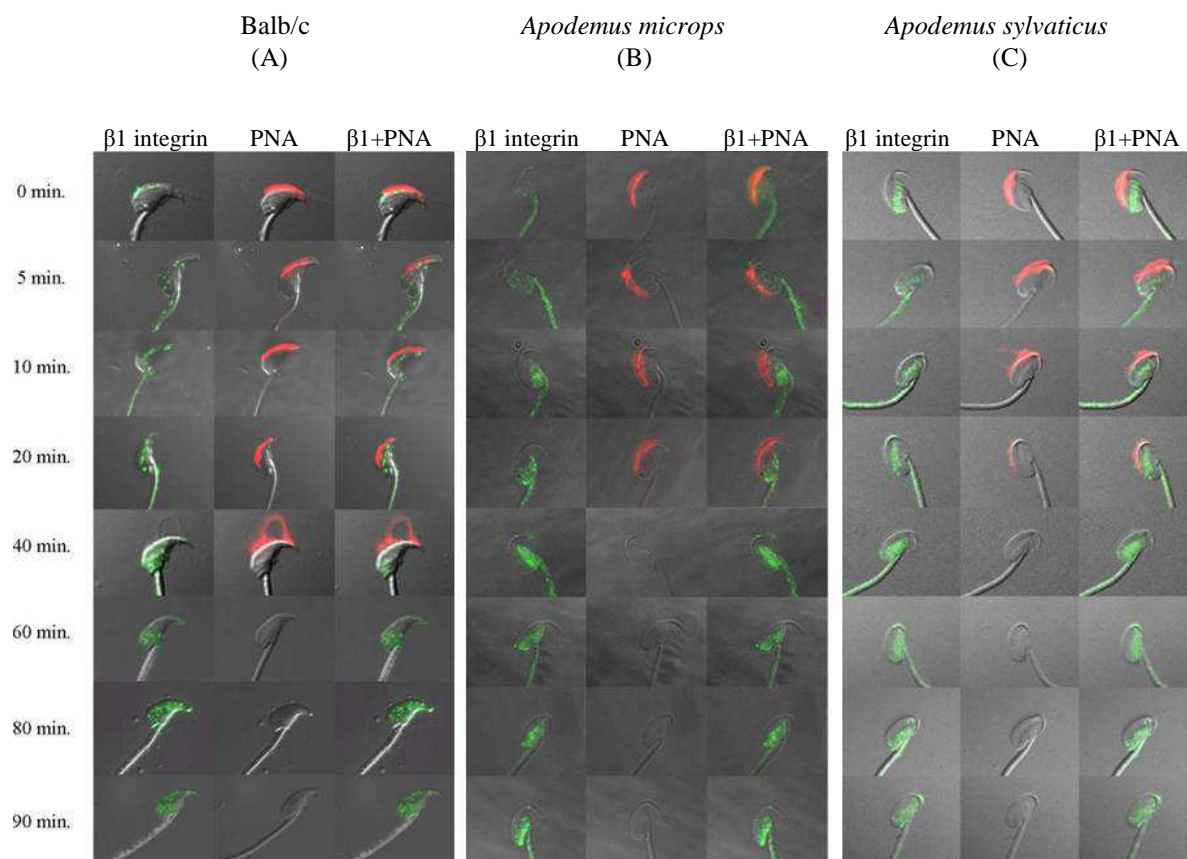
5.4 Relokalizace $\beta 1$ integrinu během spontánní a indukované AR v průběhu kapacitace

Cílem tohoto experimentu bylo detekovat protein $\beta 1$ integrin v rámci spermie myšovitých hlodavců během spontánní a CaI indukované AR. Jedna skupina spermií byla podrobena kapacitaci v *in vitro* podmínkách po dobu 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 a 90 minut. U druhé skupiny byla provedena kapacitace *in vitro* stejným způsobem, následně k těmto spermiím byl přidán CaI. Na obr. 15 a 16 lze vidět lokalizaci $\beta 1$ integrinu u zástupců BALB/c, *A. microps* a *A. sylvaticus* v závislosti na čase. U obou skupin byla provedena

imunofluorescenční detekce $\beta 1$ integrinu paralelně s imunofluorescenčním značením akrozómu pomocí PNA lectinu pro zjištění fáze AR.

5.4.1 Relokalizace $\beta 1$ integrinu během spontánní AR

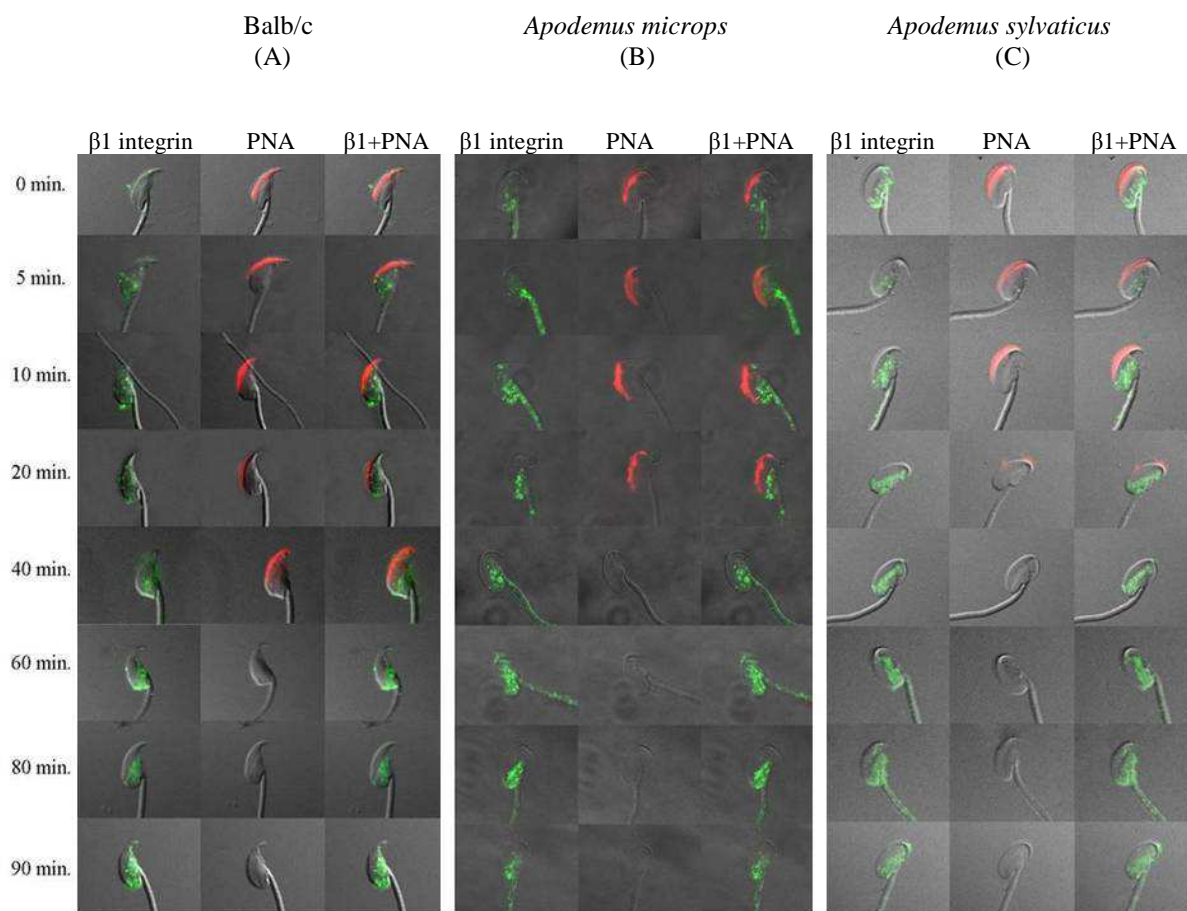
Relokalizace $\beta 1$ integrinu při spontánní AR je zdokumentována na obr. 15. U BALB/c (obr. 15 A) lze pozorovat před a v průběhu AR, začínající v čase 40 minut kapacitace, dynamický přesun $\beta 1$ integrinu z oblasti akrozomální membrány přes equatoriální segment do postakrozomální oblasti hlavičky spermie. U *A. microps* (obr. 15 B) a *A. sylvaticus* (obr. 15 C) je situace odlišná. $\beta 1$ integrin je lokalizován již od počátku kapacitace do equatoriálního segmentu, a zcela chybí jeho počáteční lokalizace v apikální akrozomální membráně. Po dokončené AR je $\beta 1$ integrin lokalizován opět obdobně jako u předchozího zástupce v postakrozomální oblasti hlavičky spermie.



Obr. 15: Relokalizace proteinu $\beta 1$ integrinu u spermii během spontánní AR u BALB/c (A), *Apodemus microps* (B) a *Apodemus sylvaticus* (C)

5.4.2 Relokalizace $\beta 1$ integrinu během spontánní AR po přidání Calcium Ionophoru

Na obr. 16 je vidět relokalizace $\beta 1$ integrinu při spontánní AR po přidání CaI. U BALB/c (obr. 16 A) je vidět analogická lokalizace $\beta 1$ integrinu obdobně jako u spontánní AR bez přidání CaI, tj. lokalizace $\beta 1$ integrinu je primárně v čase 0 minut v apikálním akrozómu a následně se posouvá do equatoriálního segmentu, kde setrvává do počátku AR v čase kolem 40 minut. Po AR je protein u BALB/c detekovatelný v postakrozomální oblasti hlavičky spermie. U *A. microps* (obr. 16 B) a *A. sylvaticus* (obr. 16 C) chybí počáteční lokalizace $\beta 1$ integrinu v apikálním akrozómu do zahájení AR, tj. do času 20 minut (*A. microps*) a 10 minut (*A. sylvaticus*). $\beta 1$ integrin je v tomto případě lokalizován v equatoriálním segmentu a následně při probíhající AR je protein přesunut do postakrozomální oblasti hlavičky spermie opět obdobně jako u spontánní AR.



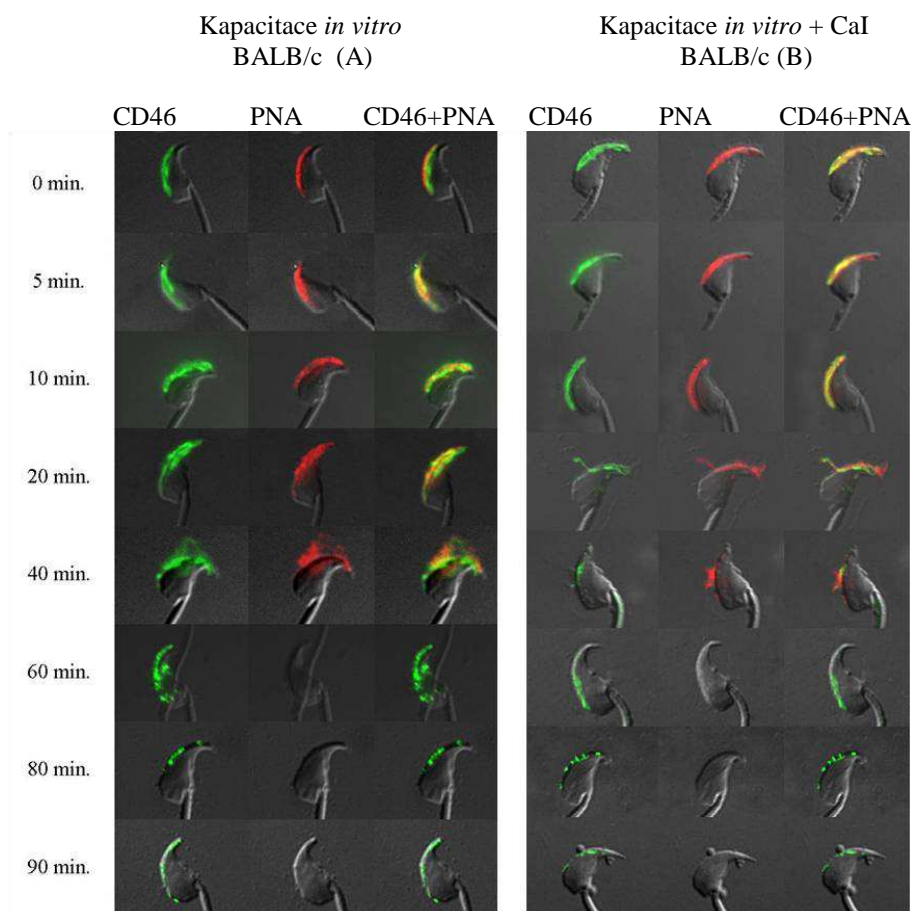
Obr. 16: Relokalizace proteinu $\beta 1$ integrinu u spermií během spontánní AR po přidání CaI u BALB/c (A), *Apodemus microps* (B) a *Apodemus sylvaticus* (C)

5.5 Lokalizace CD46 během spontánní a indukované AR v průběhu kapacitace

Cílem tohoto experimentu je detekovat protein CD46 během spontánní a indukované AR u spermií laboratorního kmene myši BALB/c. Obě zkoumané skupiny spermií BALB/c byly podrobeny kapacitaci *in vitro* po dobu 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 a 90 minut, následně byl k jedné skupině spermií přidán CaI. U obou skupin byla provedena imunofluorescenční detekce proteinu CD46 paralelně s imunofluorescenčním značením akrozómu pomocí PNA lectinu pro zjištění fáze AR.

Výsledky pokusu lze vidět na obr. 17, jde tedy o detekci proteinu CD46, který je lokalizován na akrozomální membráně definující akrozomální váček. Co se týče porovnání lokalizace proteinu CD46 u obou skupin je na obr. 17 evidentní, že protein CD46 je lokalizován po celou dobu ve stejné oblasti jak při spontánní (obr. 17 A), tak při CaI indukované AR (obr. 17 B). CD46 je po AR ukotven do vnitřní akrozomální membrány a

nepodléhá dynamickým pochodům. Pro určení fáze AR bylo použito značení akrozómu pomocí PNA lectinu.



Obr. 17: Relokalizace CD46 u spermií BALB/c po spontánní AR(A) a po přidání CaI (B)

6 Diskuze

K indukci AR dochází u myši kontaktem spermie se ZP nebo průchodem vrstvou buněčného obalu vajíčka *cumulus oophorus* (Jin et al. 2011). U čeledi *Muridae* se setkáváme i s tzv. spontánní AR, jejíž mechanismus a význam není doposud zcela objasněn. V této práci byla porovnávána relokalizace primárního fúzogenního proteinu IZUMO během AR spontánní a po přidání CaI či progesteronu, jako fyziologických induktorů AR u *A. sylvaticus*, *A. microps* a BALB/c. Při provádění experimentu se může stát, že jsou od sebe odděleny procesy, které jsou v přirozeném prostředí v nějakém vztahu či posloupnosti. Právě jako spontánní a indukovaná AR, tyto reakce zřejmě probíhají současně či může jedna následovat druhou. Z tohoto důvodu byl induktor AR přidán na začátku inkubace spermií tedy již v průběhu kapacity *in vitro*. Co se ovšem stane se spermiemi, které projdou spontánní AR, tedy dříve, než by došlo k indukci AR kontaktem se ZP? IZUMO je klíčovým proteinem pro fúzi spermie a vajíčka (Inoue et al. 2005), pro úspěšné oplození je IZUMO v průběhu AR relokalizován z anteriorní oblasti hlavičky do equatoriálního segmentu a postakrozomální oblasti hlavičky spermie (Sosnik et al. 2009). V případě, že by relokalizace IZUMO u spermií po spontánní AR byla stejná jako po přidání vnějšího induktoru, dalo by se předpokládat, že spermie po spontánní AR mají stejný fertilizační potenciál jako spermie, které prochází AR indukovanou.

Míra spontánní AR stoupá s mírou promiskuity daného zástupce (Johnson et al. 2007). Cílem této práce bylo porovnat relokalizaci primárního fúzogenního proteinu IZUMO s ohledem na vliv promiskuitního prostředí daných zástupců rodu *Mus* a *Apodemus*. Jako zástupce s vysokou mírou mnohonásobných paternit byl zvolen *A. sylvaticus*, u kterého je míra spontánní AR až 60 % při kapacitaci *in vitro* (Johnson et al. 2007). Dále byl použit fakultativně promiskuitní zástupce *A. microps*, u kterého je míra mnohonásobných paternit výrazně nižší (Bryja and Stopka 2005), jako kontrola sloužil laboratorní kmen myši BALB/c. U zkoumaných zástupců doba relokalizace IZUMO pozitivně koreluje s mírou promiskuity daného druhu a negativně koreluje se stabilitou akrozómu. To by mohlo odrážet skutečnost, že relokalizace IZUMO je spíše než na AR závislá na probíhající kapacitaci, a že přesun IZUMO není u myši závislý na integritě akrozómu.

AR je komplexní děj, během kterého dochází k aktivaci více na sobě nezávislých drah, bez kterých by AR nemohla proběhnout. K iniciaci AR dochází u savců po navázání spermie na glykoproteinový obal vajíčka ZP a tím dochází k jejímu zahájení. V důsledku depolarizace

membrány dochází k otevření napětově ovládaných iontových kanálů, ty následně spustí masivní transport Ca^{2+} iontů, čímž je zahájena AR (Florman 1994, Arnoult et al. 1996). Progesteron je v přirozeném prostředí vylučován buňkami *Cumulus oophorus* (Meizel, Turner and Nuccitelli 1997, Therien and Manjunath 2003), během průchodu spermie buněčným obalem vajíčka *cumulus oophorus* se progesteron váže na receptory spermie, to podle (Jin et al. 2011) může indukovat AR ještě před kontaktem se ZP. Kromě ZP-indukované AR může být tedy AR spuštěna i za pomoci kumulárních buněk vajíčka (Jin et al. 2011) což potvrzuje, že i spermie po takto indukované AR jsou i nadále schopny proniknout ZP a oplodnit oocyt (Inoue et al. 20011).

Během experimentu byly skupiny spermií při kapacitaci buď ponechány volně projít spontánní AR, nebo byly vystaveny rozdílným stimulům indukujícím u nich AR. Prvním z nich byl CaI tedy látka, která pomocí transportu Ca^{2+} iontů dokáže v laboratorních podmínkách AR navodit (Breitbart and Spungin 1997). Druhým použitým induktorem AR byl progesteron, fyziologická látka vylučována pomocí vrstvy kumulárních buněk vajíčka a indukující AR (Jin et al. 2011), u spermií byla následně provedena imunofluorescenční detekce proteinu IZUMO.

Ve fyziologickém prostředí se spermie setkává s masivním transportem Ca^{2+} iontů i progesteronem zároveň, experimentální podmínky nám umožňují oddělit tyto dvě paralelní složky iniciace AR a pozorovat odděleně vliv jednotlivých induktorů na relokizaci proteinu IZUMO u spermií vybraných zástupců. U AR indukované progesteronem je viditelná progresivnější relokizace proteinu IZUMO u všech tří zkoumaných skupin. Nejrychlejší relokizace IZUMO je po indukci progesteronem i CaI vidět u *A. sylvaticus*.

Relokizace primárního fúzogenního proteinu IZUMO do fúzogenní oblasti hlavičky spermie je zásadní pro úspěšnou fúzi spermie s oocytem (Inoue et al. 2005). Cílem této práce bylo též porovnat relokizaci proteinu IZUMO u vybraných zástupců v závislosti na odlišnosti jejich reprodukčních strategií. U zástupců rodu *Mus* je dokumentována spontánní AR u přibližně 20 % spermií, u rodu *Apodemus* se setkáváme s vyšší mírou této předčasné AR, u *A. microps* je monitorována spontánní AR u zhruba 30 % a u *A. sylvaticus* až u 50 % spermií. Míra spontánní AR u těchto zástupců pozitivně koreluje s mírou jejich promiskuitního chování (Johnson et al. 2007).

Relokizace IZUMO během indukované AR byla již dokumentována (Sosnik et al. 2009, Inoue et al. 2005, Inoue et al. 2011, Miranda et al. 2009), ovšem otázka možnosti relokizace IZUMO v závislosti na probíhající kapacitaci spermií nebyla vznesena. AR nemůže nastat bez předešlé kapacity, ta je zásadně spojena s molekulárními změnami a

dynamickým pohybem aktinového cytoskeletu (Breitbart, Cohen and Rubinstein 2005, Dvorakova et al. 2005), který souvisí následně i s relokací proteinu IZUMO (Sosnik et al. 2009). Aktinový cytoskelet je ve spermiích interagován kromě IZUMO i s $\beta 1$ integriny (Calderwood, Shattil and Ginsberg 2000).

Spontánní AR je dobře dokumentována u myšovitých hlodavců (Moore et al. 2002, Johnson et al. 2007, Clift et al. 2009), zda však jsou tyto spermie i nadále schopny oplodnit samičí oocyt doposud nebylo doposud objasněno. U zástupců rodu *Apodemus* dochází ke spontánní AR u více jak poloviny spermií, míra této spontánní AR dle (Johnson et al. 2007) koreluje s mírou promiskuity daných zástupců. U zástupců rodu *Apodemus* navíc nedochází k translaci proteinu CD46 (Clift et al. 2009, Johnson et al. 2007) a jsou tedy fenotypově shodní s CD46-knockout jedinci (Inoue et al. 2003), to zřejmě souvisí se stabilitou akrozomální membrány a tím i s vyšší mírou spontánní AR u těchto zástupců (Inoue et al. 2003).

Uvedené výsledky však ukazují, že relokace IZUMO nemusí souviset se stabilitou akrozomální membrány. Při porovnání relokace proteinu IZUMO během spontánní AR lze vidět, že k iniciaci relokace dochází u zástupců *Apodemus* výrazně dříve a to až o 30 minut než u BALB/c. To by mohlo představovat selektivní výhodu pro spermie samců během vnitrodruhové kompetice spermií. Celý proces molekulárních změn probíhajících před samotným oplozením by tak mohl započít dříve v závislosti na míře promiskuitního chování. Reálný čas potřebný pro celkovou relokaci proteinu do oblasti equatoriálního segmentu a postakrozomální oblasti hlavičky spermie je rychlejší pouze u *A. sylvaticus*. U spermií zástupců *A. microps* je viditelné obdobně rychlé načasování relokace IZUMO jako u BALB/c, k relokaci do postakrozomální oblasti nedochází u *A. microps* a BALB/c před časem 90 minut a před časem 80 minut kapacitace *in vitro* ani u *A. sylvaticus*. Tedy rozdíl mezi jednotlivými zástupci není tak významný a může souviset spíše než s AR s časem potřebným k dokončení procesu kapacitace.

Expresi $\beta 1$ integrinu ve spermiích myši a jeho účast při interakčním procesu spermie-vajíčko potvrzuje pomocí nezávislých metod i (Barraud-Lange et al. 2007). Jakým způsobem je však zahrnut při procesu oplodnění se doposud neví, podle (Lozahic et al. 2000) jsou $\beta 1$ integriny asociovány s proteinem CD46, jehož absence u rodu *Apodemus* zřejmě souvisí s narušením integrity akrozomálního váčku a s vyšší mírou spontánní AR (Johnson et al. 2007). (Calderwood, Shattil and Ginsberg 2000) přispěli objevením interakce $\beta 1$ integrinu s aktinovým cytoskeletem k hypotéze, že se $\beta 1$ integrin podílí na procesu oplození. Aktinový cytoskelet hraje zásadní roli při relokaci primárního fúzogenního proteinu spermie

IZUMO (Sosnik et al. 2009) a k jeho dynamickým změnám dochází během přípravy spermie na oplození (Dvorakova et al. 2005). Objevení komplexu CD46/ β 1 integrin (Lozahic et al. 2000) hypotézu o roli β 1 integrinu jen podporuje. Tedy, že by absence proteinu CD46 mohla souviset s urychlením zkroucení F-aktinu ve spermii a tím přispět k rychlejší AR. V této práci byla proto monitorována distribuce β 1 integrinu v hlavičce spermie během spontánní AR a po přidání CaI při kapacitaci.

U zástupců myšic (*A. microps* a *A. sylvaticus*) je detekována rozdílná lokalizace β 1 integrinu oproti BALB/c. U zástupců rodu *Apodemus* je β 1 integrin detekován od počátku kapacitace v equatoriálním segmentu a nebyl nalezen v apikální akrozomální oblasti. Rychlost jeho následné relokalizace do postakrozomálního segmentu v průběhu AR ovšem koreluje s promiskuitou daného druhu a rovněž s rychlostí relokalizace IZUMO. Oproti tomu u BALB/c je primární lokalizace β 1 integrinu v apikální akrozomální oblasti a postupně je v průběhu kapacitace a následně AR relokalizován přes equatoriální segment do oblasti postakrozomální. Po iniciaci AR je však β 1 integrin u BALB/c, *A. microps* i *A. sylvaticus* detekován shodně v postakrozomální části hlavičky spermie. Rozdílná distribuce β 1 integrinu u zástupců rodu *Mus* a *Apodemus*, by mohla souviset s absencí proteinu CD46, který se podílí na integritě akrozomální membrány u rodu *Apodemus* (Johnson et al. 2007), neboť právě úzká vazba integrinů na CD46 je jeden z klíčových aspektů cytoskeletální sítě, avšak tato hypotéza musí být potvrzena. Nicméně rozdílná distribuce a rychlost relokalizace β 1 integrinu u jednotlivých zástupců odráží rozdílné reprodukční strategie těchto druhů. Jakým způsobem by se β 1 integrin mohl blíže účastnit procesu oplození u jednotlivých zástupců by mělo být předmětem dalšího studia.

V této práci byla též monitorována a porovnáována distribuce β 1 integrinu v hlavičce spermie během spontánní AR a po přidání CaI při kapacitaci u zástupců rodu *Mus* a *Apodemus*. Imunofluorescenční detekce β 1 integrinu v hlavičce spermie je analogická při spontánní AR i po přidání vnějšího stimulu CaI. Během spontánní AR evidentně dochází ve spermii ke shodné distribuci β 1 integrinu a spermie z pohledu β 1 integrinu neztrácí svůj fertilizační potenciál.

Protein CD46 je znám především jako protein, který chrání somatické buňky před atakem vlastního komplementového systému, u myší je však exprese CD46 dokumentována pouze v *testes*, u rodu *Apodemus* naopak není protein vůbec translatován (Johnson et al, 2007). Protein CD46 je po AR lokalizován na vnitřní akrozomální membráně spermie (Anderson et al. 1989; Mizuno, 2004). Úloha proteinu CD46 u myšovitých hlodavců nebyla doposud zcela objasněna, role proteinu CD46 v rámci ochrany spermatických buněk před

komplementem je vzhledem k lokalizaci CD46 spíše nepravděpodobná. CD46 je rovněž součástí tzv. tetraspaninové sítě a ukazuje se, že se účastní při sekundární fúzi spermie a oocyty (Lozahic et al. 2000). Podle (Inoue, 2003 Johnson, 2007) by úloha CD46 u spermii mohla souviset s integritou akrozómu a následně i s vyšší mírou spontánní AR. Pokud by tedy spermie po spontánní AR byly nadále schopny oplození, absence proteinu CD46 a následná destabilizace akrozomální membrány vedoucí k vyšší míře spontánní AR by mohla představovat unikátní mechanismus k urychlení oplození u hlodavců s promiskuitním prostředím.

V této práci byl CD46 detekován u jedné skupiny myších spermii během kapacitace *in vitro* a jeho lokalizace byla porovnávána se spermii, ke kterým byl přidán CaI jako vnější induktor AR. Z výsledků detekce u obou skupin spermii lze vidět, že během AR dochází v důsledku fúze plazmatické a vnější akrozomální membrány k odkrytí vnitřní akrozomální membrány, na které je očividně protein CD46 lokalizován. V čase 60 minut, kdy dochází vlivem AR zcela k fúzi PM a vnější akrozomální membrány zůstává protein detekovatelným na vnitřní akrozomální membráně. CD46 může být lokalizován i na vnější akrozomální membráně, ta ale během AR fúzuje s PM, čímž by docházelo k částečnému odloučení proteinu spolu s membránou. Během spontánní AR u myší nedochází k žádným pozorovatelným změnám v lokalizaci proteinu CD46 a lokalizace proteinu CD46 je totožná u obou pozorovaných skupin. Vzhledem k získaným výsledkům u pozorovaných skupin spermii lze říci, že spermie po spontánní AR i po přidání vnějšího stimulu jsou z hlediska proteinu CD46 srovnatelné.

7 Závěr

U myšic (*Apodemus*) relokace IZUMO pozitivně koreluje s mírou promiskuity a negativně koreluje se stabilitou akrozomální membrány. Relokace IZUMO dle získaných výsledků probíhá při kapacitaci nikoliv AR a není závislá na integritě akrozómu.

V přítomnosti induktorů AR dochází k rychlejší relokaci IZUMO do fúzogenních oblastí hlavičky spermie. Tento proces je v případě progesteronu časnější než při použití CaI, a to jak u BALB/c tak *A. microps* a *A. sylvaticus*.

Relokace IZUMO je analogická u spermií po spontánní AR i za současné přítomnosti vnějšího induktoru. Spermie po spontánní AR vykazují shodnou dynamiku relokace IZUMO jako spermie s intaktním akrozómem.

Distribuce $\beta 1$ integrinu v hlavičce spermie je opět analogická u všech zástupců a probíhá nezávisle na průběhu AR. Rozdílnou lokalizaci v počátku kapacitace lze pozorovat u zástupců *Apodemus*, kde je $\beta 1$ integrin lokalizován výhradně v oblasti equatoriálního segmentu již před AR.

Protein CD46 je u BALB/c během spontánní i indukované AR lokalizován shodně v oblasti akrozomální membrány a v průběhu kapacitace ani AR nedochází k jeho další relokaci.

V rámci této práce nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v lokalizaci proteinů účastnících se procesu oplození u skupin spermií během spontánní či indukované AR. Jako zásadní je zjištění, že k dynamickým pochodům fúzogenního proteinu IZUMO a $\beta 1$ integrinu dochází v průběhu kapacitace, nezávisle na integritě akrozómu. Ze zjištěných výsledků se dá předpokládat, že spermie po spontánní AR vykazují v rámci zkoumaných proteinů stejný fertilizační potenciál jako spermie s intaktním akrozómem k jehož ztrátě dochází při indukované AR. Spontánní AR, která je časově výrazně rychlejší tedy může představovat selekční výhodu vzniklou vlivem promiskuitního prostředí v rámci vnitrodruhové kompetice spermií myšovitých hlodavců.

8 Literatura

- Almog, T., S. Lazar, N. Reiss, N. Etkovitz, E. Milch, N. Rahamim, M. Dobkin-Bekman, R. Rotem, M. Kalina, J. Ramon, A. Raziell, H. Breitbart, R. Seger & Z. Naor (2008) Identification of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 MAPK as regulators of human sperm motility and acrosome reaction and as predictors of poor spermatozoan quality (vol 283, pg 14479, 2008). *Journal of Biological Chemistry*, 283, 36060-36060.
- Anderson, D. J., J. S. Michaelson & P. M. Johnson (1989) Trophoblast leukocyte-common antigen is expressed by human testicular germ-cells and appears on the surface of acrosome-reacted SPERM. *Biology of Reproduction*, 41, 285-293.
- Arnoult, C., R. A. Cardullo, J. R. Lemos & H. M. Florman (1996) 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*, 93, 13004-13009.
- Arnoult, C., I. G. Kazam, P. E. Visconti, G. S. Kopf, M. Villaz & H. 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*, 96, 6757-6762.
- Austin, C. R. (1952) The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*, 170, 326-326.
- Baldi, E., M. Luconi, L. Bonaccorsi, M. Muratori & G. Forti (2000) Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Frontiers in Bioscience*, 5, E110-E123.
- Barraud-Lange, V., N. Naud-Barriant, L. Saffar, L. Gattegno, B. Ducot, A. S. Drillet, M. Bomsel, J. P. Wolf & A. Ziyat (2007) Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization. *Bmc Developmental Biology*, 7.
- Bedford, J. M. (1968) Ultrastructural changes in sperm head during fertilization in rabbit. *American Journal of Anatomy*, 123, 329-&.
- Bleil, J. D. & P. M. Wassarman (1980) Structure and function of the zona pellucida - identification and characterization of the proteins of the mouse oocytes zona pellucida. *Developmental Biology*, 76, 185-202.
- Breitbart, H., G. Cohen & S. Rubinstein (2005) Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction*, 129, 263-268.
- Breitbart, H. & Z. Naor (1999) Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reviews of Reproduction*, 4, 151-159.
- Breitbart, H. & B. Spungin (1997) The biochemistry of the acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction*, 3, 195-202.
- Brener, E., S. Rubinstein, G. Cohen, K. Shternall, J. Rivlin & H. Breitbart (2003) Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, 68, 837-845.
- Bryja, J., H. Patzenhauerova, T. Albrecht, L. Mosansky, M. Stanko & P. Stopka (2008) Varying levels of female promiscuity in four Apodemus mice species. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63, 251-260.
- Bryja, J. & P. Stopka (2005) Facultative promiscuity in a presumably monogamous mouse Apodemus microps. *Acta Theriologica*, 50, 189-196.
- Calderwood, D. A., S. J. Shattil & M. H. Ginsberg (2000) Integrins and actin filaments: Reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 22607-22610.
- Cattaneo, R. (2004) Four viruses, two bacteria, and one receptor: Membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. *Journal of Virology*, 78, 4385-4388.

- Cervoni, F., T. J. Oglesby, E. M. Adams, C. Milesifluet, M. Nickells, P. Fenichel, J. P. Atkinson & B. L. Hsi (1992) Identification and characterization of membrane cofactor protein of human spermatozoa. *Journal of Immunology*, 148, 1431-1437.
- Chang, M. C. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168, 697-698.
- Clift, L. E., K. Dvorakova-Hortova, M. Frolikova, P. Andrlíkova, S. Salman, P. Stopka, B. F. Flanagan & P. M. Johnson (2009) CD55 and CD59 protein expression by Apodemus (field mice) sperm in the absence of CD46. *Journal of Reproductive Immunology*, 81, 62-73.
- Cooper, G. W., J. W. Overstreet & D. F. Katz (1979) Motility of rabbit spermatozoa recovered from the female reproductive-TRACT. *Gamete Research*, 2, 35-42.
- Cummerson, J. A., B. F. Flanagan, D. G. Spiller & P. M. Johnson (2006) The complement regulatory proteins CD55 (decay accelerating factor) and CD59 are expressed on the inner acrosomal membrane of human spermatozoa as well as CD46 (membrane cofactor protein). *Immunology*, 118, 333-342.
- Dvorakova, K., H. D. M. Moore, N. Sebkova & J. Palecek (2005) Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction*, 130, 61-69.
- Ellerman, D. A., J. M. Pei, S. Gupta, W. J. Snell, D. Myles & P. Primakoff (2009) Izumo Is Part of a Multiprotein Family Whose Members Form Large Complexes on Mammalian Sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 76, 1188-1199.
- Florman, H. M. (1994) Sequential focal and global elevations of sperm intracellular ca²⁺ are initiated by the zona-pellucida during acrosomal exocytosis. *Developmental Biology*, 165, 152-164.
- Florman, H. M., J. R. Lemos, C. Arnoult, J. A. Oberdorf & Y. Zeng (1995) Exo(cyto)tic ion channels in mammalian sperm. *Human Sperm Acrosome Reaction*, 236, 179-189.
- Fraser, L. R. (1977) Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation. *Journal of Experimental Zoology*, 202, 439-444.
- Frolikova, M., R. Stopkova, J. Antalíkova, P. M. Johnson, P. Stopka & K. Dvorakova-Hortova (2012) Role of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 in reproduction. *Folia Zoologica*, 61, 84-94.
- Fujihara, Y., M. Murakami, N. Inoue, Y. Satouh, K. Kaseda, M. Ikawa & M. Okabe (2010) Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse. *Journal of Cell Science*, 123, 1531-1536.
- Hasty, L. A., J. D. Lambris, B. A. Lessey, K. Pruksananonda & C. R. Lyttle (1994) Hormonal-regulation of complement components and receptors throughout the menstrual-cycle. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 170, 168-175.
- Hernandez-Gonzalez, E. O., A. N. Lecona-Valera, J. Escobar-Herrera & A. Mujica (2000) Involvement of an F-actin skeleton on the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 46, 43-58.
- Hosokawa, M., M. Nonaka, N. Okada & H. Okada (1996) Molecular cloning of guinea pig membrane cofactor protein - Preferential expression in testis. *Journal of Immunology*, 157, 4946-4952.
- Inoue, N., M. Ikawa, A. Isotani & M. Okabe (2005) A novel immunoglobulin superfamily protein, Izumo, is required for sperm to fuse with eggs. *International Journal of Andrology*, 28, 29-29.
- Inoue, N., M. Ikawa, T. Nakanishi, M. Matsumoto, M. Nomura, T. Seya & M. Okabe (2003) Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 2614-2622.

- Inoue, N., M. Ikawa & M. Okabe (2008) Putative sperm fusion protein IZUMO and the role of N-glycosylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377, 910-914.
- Inoue, N., Y. Satouh, M. Ikawa, M. Okabe & R. Yanagimachi (2011) Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 20008-20011.
- Ito, C., H. Akutsu, R. Yao, K. Kyono, F. Suzuki-Toyota, Y. Toyama, M. Maekawa, T. Noda & K. Toshimori (2009) Oocyte activation ability correlates with head flatness and presence of perinuclear theca substance in human and mouse sperm. *Human Reproduction*, 24, 2588-2595.
- Jin, M., E. Fujiwara, Y. Kakiuchi, M. Okabe, Y. Satouh, S. A. Baba, K. Chiba & N. 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*, 108, 4892-4896.
- Johnson, P. M., L. E. Clift, P. Andriikova, M. Jursova, B. F. Flanagan, J. A. Cummerson, P. Stopka & K. Dvorakova-Hortova (2007) Rapid sperm acrosome reaction in the absence of acrosomal CD46 expression in promiscuous field mice (Apodemus). *Reproduction*, 134, 739-747.
- Krapf, D., E. Arcelay, E. V. Wertheimer, A. Sanjay, S. H. Pilder, A. M. Salicioni & P. E. Visconti (2010) Inhibition of Ser/Thr Phosphatases Induces Capacitation-associated Signaling in the Presence of Src Kinase Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 7977-7985.
- Kurita-Taniguchi, M., K. Hazeki, N. Murabayashi, A. Fukui, S. Tsuji, M. Matsumoto, K. Toyoshima & T. Seya (2002) Molecular assembly of CD46 with CD9, alpha3-beta1 integrin and protein tyrosine phosphatase SHP-1 in human macrophages through differentiation by GM-CSF. *Molecular Immunology*, 38, 689-700.
- Le Naour, F., E. Rubinstein, C. Jasmin, M. Prenant & C. Boucheix (2000) Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*, 287, 319-321.
- Lin, M., R. Hess & R. J. Aitken (2002) Induction of sperm maturation in vitro in epididymal cell cultures of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*): disruption of motility initiation and sperm morphogenesis by inhibition of actin polymerization. *Reproduction*, 124, 107-117.
- Liu, S. C., D. A. Calderwood & M. H. Ginsberg (2000) Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *Journal of Cell Science*, 113, 3563-3571.
- Longo, F. J. & S. Cook (1991) Formation of the perinuclear theca in spermatozoa of diverse mammalian-species - relationship of the manchette and multiple band polypeptides. *Molecular Reproduction and Development*, 28, 380-393.
- Lozahic, S., D. Christiansen, S. Manie, D. Gerlier, M. Billard, C. Boucheix & E. Rubinstein (2000) CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta 1 integrins and tetraspans. *European Journal of Immunology*, 30, 900-907.
- Meizel, S., K. O. Turner & R. Nuccitelli (1997) Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Developmental Biology*, 182, 67-75.
- Miranda, P. V., A. Allaire, J. Sosnik & P. E. Visconti (2009) Localization of Low-Density Detergent-Resistant Membrane Proteins in Intact and Acrosome-Reacted Mouse Sperm. *Biology of Reproduction*, 80, 897-904.
- Miwa, T., M. Nonaka, N. Okada, S. Wakana, T. Shiroishi & H. Okada (1998) Molecular cloning of rat and mouse membrane cofactor protein (MCP, CD46): preferential

- expression in testis and close linkage between the mouse Mcp and Cr2 genes on distal chromosome 1. *Immunogenetics*, 48, 363-371.
- Miyado, K., G. Yamada, S. Yamada, H. Hasuwa, Y. Nakamura, F. Ryu, K. Suzuki, K. Kosai, K. Inoue, A. Ogura, M. Okabe & E. Mekada (2000) Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*, 287, 321-324.
- Mizuno, M., C. L. Harris, P. M. Johnson & B. P. Morgan (2004) Rat membrane cofactor protein (MCP; CD46) is expressed only in the acrosome of developing and mature spermatozoa and mediates binding to immobilized activated C3. *Biology of Reproduction*, 71, 1374-1383.
- Moore, H., K. Dvorakova, N. Jenkins & W. Breed (2002) Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. *Nature*, 418, 174-177.
- Naz RK, Rajesh PB, Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol* 2004 2:1-12
- Okamura, N., Y. Tajima & Y. Sugita (1988) Decrease in bicarbonate transport activities during epididymal maturation of porcine sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 157, 1280-1287.
- Reddy, V. R. K., S. K. Rajeev & V. Gupta (2003) alpha 6 beta 1 integrin is a potential clinical marker for evaluating sperm quality in men. *Fertility and Sterility*, 79, 1590-1596.
- Rezcallah, M. S., K. Hodges, D. B. Gill, J. P. Atkinson, B. N. Wang & P. P. Cleary (2005) Engagement of CD46 and alpha 5 beta 1 integrin by group A streptococci is required for efficient invasion of epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 7, 645-653.
- Riley, R. C., C. Kemper, M. Leung & J. P. Atkinson (2002) Characterization of human membrane cofactor protein (MCP; CD46) on spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 62, 534-546.
- Rubinstein, E., A. Ziyat, J. P. Wolf, F. Le Naour & C. Boucheix (2006) The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 17, 254-263.
- Ruknudin, A. & I. A. Silver (1990) Ca²⁺ uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on ca²⁺ uptake. *Molecular Reproduction and Development*, 26, 63-68.
- Sanchez-Gutierrez, M., R. G. Contreras & A. Mujica (2002) Cytochalasin-D retards sperm incorporation deep into the egg cytoplasm but not membrane fusion with the egg plasma membrane. *Molecular Reproduction and Development*, 63, 518-528.
- Schaller, J., H. J. Glander & J. Dethloff (1993) Evidence of beta-1 integrins and fibronectin on spermatogenic cells in human testis. *Human Reproduction*, 8, 1873-1878.
- Seya, T., T. Hara, M. Matsumoto, H. Kiyohara, I. Nakanishi, T. Kinouchi, M. Okabe, A. Shimizu & H. Akedo (1993) Membrane cofactor protein (mcp, cd46) in seminal plasma and on spermatozoa in normal and sterile SUBJECTS. *European Journal of Immunology*, 23, 1322-1327.
- Sosnik, J., P. V. Miranda, N. A. Spiridonov, S. Y. Yoon, R. A. Fissore, G. R. Johnson & P. E. Visconti (2009) Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *Journal of Cell Science*, 122, 2741-2749.
- Souza, F. F., V. H. Chirinea, M. I. M. Martins & M. D. Lopes (2009) Osteopontin in Seminal Plasma and Sperm Membrane of Dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 283-286.
- Spungin, B. & H. Breitbart (1996) Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *Journal of Cell Science*, 109, 1947-1955.
- Stein, K. K., P. Primakoff & D. Myles (2004) Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *Journal of Cell Science*, 117, 6269-6274.

- Suarez, S. S. (2008) Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *International Journal of Developmental Biology*, 52, 455-462.
- Suarez, S. S. & R. A. Osman (1987) Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive-tract. *Biology of Reproduction*, 36, 1191-1198.
- Sutovsky, P. (2009) Sperm-egg adhesion and fusion in mammals. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11.
- Therien, I. & P. Manjunath (2003) Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, 69, 1408-1415.
- Tsujimura, A., K. Shida, M. Kitamura, M. Nomura, J. Takeda, H. Tanaka, M. Matsumoto, K. Matsumiya, A. Okuyama, Y. Nishimune, M. Okabe & T. Seya (1998) Molecular cloning of a murine homologue of membrane cofactor protein (CD46): preferential expression in testicular germ cells. *Biochemical Journal*, 330, 163-168.
- Visconti, P. E., J. L. Bailey, G. D. Moore, D. Y. Pan, P. Oldsclarke & G. S. Kopf (1995a) Capacitation of mouse spermatozoa .1. correlation between the capacitation state and protein-tyrosine phosphorylation. *Development*, 121, 1129-1137.
- Visconti, P. E., Z. L. Hao, M. A. Purdon, P. Stein, B. R. Balsara, J. R. Testa, J. C. Herr, S. B. Moss & G. S. Kopf (2001) Cloning and chromosomal localization of a gene encoding a novel serine/threonine kinase belonging to the subfamily of testis-specific kinases. *Genomics*, 77, 163-170.
- Visconti, P. E., G. D. Moore, J. L. Bailey, P. Leclerc, S. A. Connors, D. Y. Pan, P. Oldsclarke & G. S. Kopf (1995b) Capacitation of mouse spermatozoa .2. protein-tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a camp-dependent pathway. *Development*, 121, 1139-1150.
- Wang, M., Z. M. Lv, J. L. Shi, Y. Q. Hu & C. Xu (2009) Immunocontraceptive Potential of the Ig-Like Domain of Izumo. *Molecular Reproduction and Development*, 76, 794-801.
- Wolkowicz, M. J., J. Shetty, A. Westbrook, K. Klotz, F. Jayes, A. Mandal, C. J. Flickinger & J. C. Herr (2003) Equatorial segment protein defines a discrete acrosomal subcompartment persisting throughout acrosomal biogenesis. *Biology of Reproduction*, 69, 735-745.
- Yanagimachi, R. (1994): Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*, vol. 1. (Knobil, E. and Neill, J., eds.). Raven Press, New York. 189-317
- Zaffran, Y., O. Destaing, A. Roux, S. Ory, T. Nheu, P. Jurdic, C. Rabourdin-Combe & A. L. Astier (2001) CD46/CD3 costimulation induces morphological changes of human T cells and activation of Vav, Rac, and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *Journal of Immunology*, 167, 6780-6785.