

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Vývojová biologie
Studijní obor: Vývojová biologie



RNDr. Nataša Šebková

Molekulární mechanizmy a morfologické změny související s fertilizační schopností spermií myši.

Sperm morphology and molecular mechanisms associated with sperm fertilizing ability in mice.

Disertační práce

Školitelka: RNDr. Kateřina Hortová, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 18. 04. 2013

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Kateřině Hortové, Ph.D. za nabídku vypracovat pod jejím vedením disertační práci. Chtěla bych poděkovat za její ochotu a trpělivost, která mi byla po celou dobu studia věnována a také za nemalý čas, který mi byla ochotná poskytnout. Jejího přátelského přístupu, cenných názorů a rad jsem si vždy velice vážila a pomáhaly mi po celou dobu studia.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martině Černé, která byla vždy s maximálním pracovním zapálením ochotna kdykoliv poradit a pomoci. Její optimizmus a stále dobrá nálada pomohla více než dokonale naplánovaný pokus.

Děkuji také Lence Bulvové za vytváření příjemného pracovního prostředí, její ochota, pracovitost a šikovnost byla velice potřebná a vždy potěšila.

Děkuji Mgr. Lukáši Dědovi za pomoc při statistickém zpracování výsledků a za dobré a zajímavé odborné pracovní postřehy.

Děkuji celému kolektivu laboratoře reprodukční biologie za vytvoření příjemného a kamarádského pracovního prostředí.

Velké poděkování bych chtěla věnovat Marii Nohýnkové za její neustálý optimizmus, velkou podporu a víru v to, že tato práce bude jednou napsaná.

A v neposlední řadě pak děkuji své rodině, rodičům a svým přátelům za jejich morální podporu a lásku, bez které by tato práce vzniknout nemohla.

Obsah

Abstrakt

Abstract

Seznam zkratk

1 Úvod	8
1.1. Kapacitace a tyrozinová fosforylace	8
1.1.1. Signální dráhy vedoucí k tyrozinové fosforylaci a kapacitaci spermie	8
1.1.2. Mechanismus indukované akrozomální reakce	12
1.1.3. Spontánní akrozomální reakce	16
1.2. Cytoskeletální funkce a organizace spermie	18
1.3. Estrogenní receptory spojené s G proteiny	22
1.4. Molekulární mechanismy interakce spermie-vajíčko	26
1.4.1. Izumo	27
1.4.2. CD9, CD81	30
2 Cíle práce	32
3 Diskuse k publikacím	33
4 Závěr	50
5 Souhrnná diskuse	52
6 Literatura	56
7 Přehled publikací	70

Abstrakt

Proces kapacitace a akrozomální reakce (AR) spermie jsou velmi dynamické děje nezbytné pro oplození, kterých se účastní mimo jiné i cytoskeletální proteiny v hlavičce spermie. Studium distribuce aktinu, spektrinu a α -tubulinu v hlavičce zástupců savčích spermii ukázala, že před a po AR dochází ke změnám v distribuci cytoskeletálních struktur v hlavičkách spermii všech zástupců a to zejména v apikální části akrozómu, ale také v ekvatoriální a postakrozomální oblasti hlavičky spermie. Zejména dobře prostudovaný aktinový cytoskelet hraje důležitou úlohu jak v průběhu kapacitace, tak před i po AR

Estrogeny vnějšího prostředí mohou interferovat s funkcí endogenních hormonů i ve velmi nízkých koncentracích. Mohou iniciovat interakce se specifickými receptory a tím ovlivňovat signální dráhy vedoucí ke kapacitaci a AR spermii. Účinek 17β -estradiolu, estronu, estriolu a 17α -ethynylestradiolu byl hodnocen podle míry tyrozinové fosforylace a stavu akrozómu během *in vitro* kapacitace v hlavičce spermie. Ukázalo se, že estrogeny výrazně stimulují proces kapacitace v závislosti na jejich koncentraci. Estrogeny také snižují počet spermii, které procházejí indukovanou AR. Zvýšení koncentrace estrogenů v přírodním prostředí může představovat potenciální riziko ve změnách mechanismů vedoucích ke schopnosti spermii oplodnit vajíčko. Účinek estrogenu byl následně studován *in vivo*. Myši byli vystaveni 17β -estradiolem o koncentraci 20ng/ml. Pokusy vedly k předčasné kapacitaci myších spermii s možným negativním dopadem na schopnost reprodukce spermii v reprodukčním traktu samice. Tento jev je zejména způsobený zvýšením fosforylace proteinů hlavičky spermie a předčasným přívodem vápenatých iontů do cytoplasmy.

Nedávno bylo u myši prokázáno, že spermie prochází AR již průchodem přes kumulární buňky a spermie po AR mají schopnost se vázat na *zona pellucida* a následně oplodnit vajíčko. Otázkou zůstává, zda k relokaci Izumo dochází během spontánní AR podobně jako během indukované AR. Výsledky ukazují, že k relokaci Izumo během spontánní AR dochází, a to z akrozomální membrány do ekvatoriální (oblast fúze spermie s vajíčkem) a postakrozomální oblasti hlavičky spermie. Tato relokace je shodná s dynamikou Izumo při indukované AR. Výsledky ukazují, že myši spermie po spontánní AR mají stejnou schopnost oplození jako spermie po indukované AR. To může představovat unikátní mechanismus urychlení procesu oplození zejména ve velmi promiskuitním prostředí pod selekčním tlakem intra-specifické kompetice spermii určitých hlodavců.

Abstract

The process of sperm capacitation and acrosome reaction (AR) are highly dynamic processes essential for the fertilization, including cytoskeleton proteins in the sperm head. The study of the distribution of actin, spectrin and α -tubulin in the head of representative mammalian sperm indicates that before and after the AR there were changes in the distribution of the cytoskeleton structures in the sperm head of all representatives, mainly in the apical part of the acrosome, but also in the equatorial and postacrosome part of the sperm head. The particularly well-studied actin cytoskeleton plays an important role during the capacitation and before and after the AR. Environmental estrogens can interfere with the function of endogenous hormones in very low concentrations. They can interact with specific receptors affecting several signalling pathways leading to sperm capacitation and AR. The effect of 17β -estradiol, estrone, estriol and synthetic 17α -ethynylestradiol was evaluated by the ratio of tyrosine phosphorylation and the state of the acrosome during *in vitro* capacitation in the sperm head. This study has provided the evidence that estrogens significantly stimulate capacitation progress in a concentration-dependent manner. Estrogens decrease number of sperm after the induced AR too. The raising concentration of estrogens in the environment may represent a potential risk in altering certain mechanisms contributing to the fertilizing capability of sperm. The effect of estrogen effect was subsequently studied *in vivo*. Mice were exposed to 17β -estradiol at the concentration of 20ng/ml. The exposition of sperm to 17β -estradiol caused premature mouse sperm capacitation with a potential negative impact on the sperm reproductive fitness in the female reproductive tract. This effect is mainly caused by hyperphosphorylation of sperm proteins and premature calcium influx.

It has been recently shown in mice that sperm undergo AR by passing through cumulus cells and sperm after AR have the ability to bind to *zona pellucida*, and consequently fertilize the egg. The question was whether the relocation of Izumo happens during spontaneous AR as in sperm with induced AR. Results show that during spontaneous AR there is a clear Izumo relocation from the acrosomal membrane to the equatorial (sperm-egg fusion region) and post-acrosomal segment. This relocation is consistent with the dynamics of Izumo during induced AR. Therefore it can be concluded that mouse spontaneously acrosome reacted sperm have same fertilizing potential as those after induced AR. Moreover, this may represent a unique mechanism how to accelerate the fertilizing process in a highly promiscuous environment under selective pressure of intra-specific sperm competition of specific rodents.

Seznam zkratek

AES	apikální ekvatoriální segment
ADAM	protein obsahující doménu disintegrin a metaloproteinázu
AR	akrozomální reakce
Asn	asparagin
BSA	bovinní serum albumin
CaI	kalcium ionofor
cAMP	cyclický adenosin monofosfát
CD	diferenciační znak
CP	protein napojující na mRNA čepičku
CRISP1	sekreční protein 1 bohatý na cystein
CRISPs	sekreční proteiny bohaté na cystein
CTC	chlortetracyklin
Da	dalton – molekulární hmotnost
DAG	diacylglycerol
DDE	dichlorodifenylchloroetylen
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
ER	estrogenní receptor
ERK1/2	extracelulární signál-regulující protein kináza 1, 2
F-aktin	filamentární aktin
G-aktin	globulární aktin
GPCRs	receptory vázané s G proteinem
GPR30	G-protein receptor 30
HSP	protein tepelného šoku
IAM38	protein vnitřní akrozomální membrány
Ig	imunoglobulin
IgSF	imunoglobulinová nadrodina
IP3	inositol-trisfosfát
Izumo	název je odvozený od japonské svatyně věnované manželství
KO	knock-out
MAPK	proteinkináza aktivující mitogen

MN9	ekvatorin
PIP2	fosfatidylinositol bisfosfát
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLA2	fosfolipáza A2
PLD	fosfolipáza D
PLC	fosfolipáza C
PNA	lektin z podzemnice olejné
PTKs	proteintyrozinkináza
Raf	protein urychlující růst fibrosarkomu
Ras	první proteiny této rodiny byly objeveny u sarkomu potkana (angl. Rat sarcom)
RTKs	receptorové tyrozinkinázy
SDS-PAGE	dodecyl sulfát sodný - elektroforéza s polyakrylamidovým gelem
SNARE	receptor pro synaptický protein
TCP-11	T-complex protein 11
<i>Tff1</i>	trefoil faktor 1
Tssk	testis specifická serinkináza
TyrP	tyrozinová fosforylace
WES	celý ekvatoriální segment
WSH	celá hlavička spermie
WT	divoký typ (myši)
ZP	<i>zona pellucida</i>
ZP1, 2, 3	<i>zona pellucida</i> protein 1, 2, 3
ZPBP	<i>zona pellucida</i> vázající protein (sp38, sp56)

1 Úvod

1.1. Kapacitace a tyrozinová fosforylace

1.1.1. Signální dráhy vedoucí k tyrozinové fosforylaci a kapacitaci spermií

Molekulární mechanizmy oplození savců zahrnující mechanizmy interakce spermií-vajíčko a intracelulární i extracelulární změny probíhající v obou gametách jsou stále předmětem studia mnoha výzkumných týmů.

K úspěšnému oplození vajíčka spermií u savců vede několik kroků probíhající v samčím oviduktu. Ty zahrnují vazbu spermií k *zona pellucida* (ZP), proces akrozomální reakce (AR), průchod spermií přes ZP a fúzi spermií s oolemou vajíčka (Yanagimachi 1994). Savčí spermií, které jsou uvolněny do reprodukčního traktu samice, nejsou schopny oplození. Proto, aby k oplození došlo, prochází spermií celou řadou biochemických změn a funkčních modifikací, nazývaných se kapacitace, která probíhá v reprodukčním traktu samice *in vivo* (Chang 1951; Austin 1952; Abou-haila & Tulsiani 2009), zejména působením složek ovikultální tekutiny.

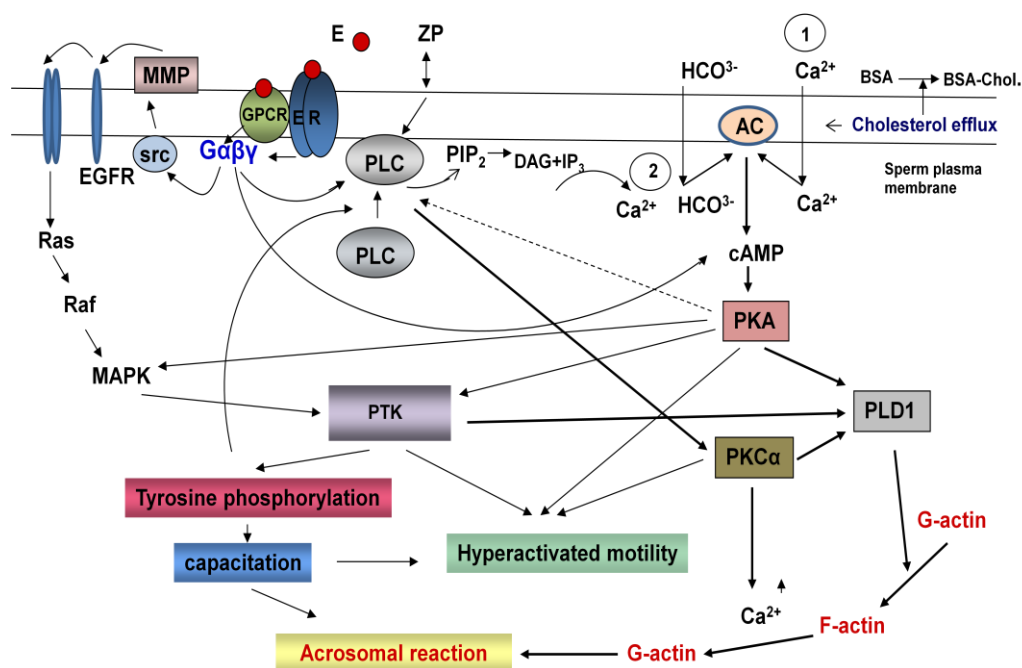
Spermií odebrané z *cauda epididymis* nebo po ejakulaci, mohou plně kapacitovat také *in vitro*, pokud jsou inkubovány ve vhodném médiu. Proces kapacitace zahrnuje aktivaci iontových kanálů, externalizaci membránových receptorů, změny periferních membránových faktorů (Fraser 1989), změny v lipidovém složení membrány, změnu fluidity membrány, tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů (Aitken 1995), změny v intracelulárním složení iontů spermií, změnu její motility (Yanagimachi, 1994) i zvýšení intracelulárního cAMP (Fraser 1990) a tyrozinové fosforylace (TyrP), (Visconti et al. 1995 I). V průběhu kapacitace dochází sice k velice malým změnám v celkovém množství fosfolipidů plazmatické membrány spermií, ale mění se distribuce lipidů vnější a vnitřní vrstvy plazmatické membrány (Yanagimachi 1994; Kawano et al. 2011). Kompletní molekulární změny vedoucí ke schopnosti spermií oplodnit vajíčko nejsou však stále dosud známé. Během kapacitace dochází k hyperpolarizaci plazmatické membrány spermií, která reguluje schopnost spermií generovat přechodné zvýšení Ca^{2+} , vedoucí ke schopnosti spermií iniciovat exocytózu (indukovat AR) během pozdějšího kontaktu se ZP. Hyperpolarizace membrány spermií během kapacitace je dostatečná pro aktivaci a přechod napětově ovládaných Ca^{2+} kanálů do uzavřeného stavu, který mohou změnit ve stav otevřený během oplození. U spermií, které

neprošly kapacitací tyto kanály nejsou aktivní, k AR nedochází. U myších spermií dochází během kapacitace k hyperpolarizaci od 40mV do 70mV (Arnoult et al. 1999).

Studium vhodného inkubačního média pro *in vitro* pokusy ukázalo, že bovinní sérum albumin (BSA), Ca^{2+} a NaHCO_3 jsou nezbytné pro to, aby spermie získané z *cauda epididymis* mohly projít kompletním procesem kapacitace (Fraser 1987; Neill & Olds-Clarke 1987; Visconti et al. 1995 I). Bylo také prokázáno, že se stavem kapacitace spermií koreluje míra TyrP a to prostřednictvím proteinů o molekulové hmotnosti 40 až 120 kDa. V průběhu kapacitace dochází k časově závislému zvýšení TyrP proteinů a dosahuje maxima po 90 minutách kapacitace (Visconti et al. 1995 II). TyrP tak představuje důležitý regulační systém, který může ovlivňovat děje vedoucí ke kapacitaci spermií (Visconti et al. 1995 I). Otázkou zůstává, jaké signální dráhy ovlivňují zvýšení TyrP a dráhy, které vedou k finální fázi kapacitace. Míra TyrP je sice spojována se stavem kapacitace, ale pouze reprezentuje důležitý krok v signálních drahách vedoucí ke kapacitaci a AR (Emiliozzi & Fenichel 1997).

BSA hraje důležitou roli v extracelulárním odlivu cholesterolu z plazmatické membrány spermie (Davis 1976, 1980), který vede ke změně membránové fluidity a permeability k Ca^{2+} (Singh et al. 1978), a/nebo HCO_3^- (Okamura et al. 1988). Vyřádlé spermie jsou terminálně diferencované a specializované buňky, které postrádají hlavní transkripční a translační aktivitu. Proto jsou u nich významné posttranslační úpravy jako například fosforylace či defosforylace proteinů regulující důležité procesy spermie (kapacitace, hyperaktivní motilita a AR) potřebné pro proces oplození. Kromě Ser/Thr fosforylace hraje velmi důležitou úlohu TyrP, která je důležitým ukazatelem probíhající signální transdukce spermie (Visconti et al. 1995 I). K TyrP dochází jak v cytosolu, na povrchu hlavičky spermie, tak v bičíku. Tyrozinkinázy je možné rozdělit do dvou skupin, na receptorové tyrozinkinázy (RTKs) a nereceptorové protein tyrozinkinázy (PTKs), lokalizované volně v cytosolu, jádře či vázaná k cytosolové straně plazmatické membrány (Fischer et al. 1998). Proces kapacitace a AR je regulován několika vzájemně propojenými signálními drahami. Hlavním regulátorem TyrP je cAMP/PKA signalizace (obr. 1), která je aktivována uvolněním cholesterolu z plazmatické membrány spermie (Visconti et al. 1999). Změny v permeabilitě membrány a s ní související změna intracelulární koncentrace Ca^{2+} a HCO_3^- iontů aktivují enzym adenylátcyklázu. Výsledkem je tvorba cyklického AMP (cAMP) a aktivita cAMP-dependentní proteinkinázy A (PKA) vedoucí k aktivaci tyrozinkináz (Visconti et al. 1995 II). Výsledkem tohoto signálu je aktivace TyrP nebo může dojít

k aktivaci fosfoproteinofosfatáz . Inhibice cAMP fosfodiesterázové aktivity nebo analogů cAMP u myši *in vitro* urychluje kapacitaci spermií (Fraser 1979, 1981).



Obr. 1. Signální dráhy vedoucí ke kapacitaci a AR probíhající v hlavičce spermie.

Vzájemný vztah mezi tyrozinkinázu/fosfatázou a signální dráhou vedoucí k PKA popsal Visconti et al. 1995II. Blokováním aktivity PKA inhibitory byl zjištěn její vliv na TyrP i kapacitaci. PKA hraje důležitou úlohu v regulaci těchto dvou dějů. Příliv Ca²⁺ iontů může ale také aktivovat cyklickou nukleotid fosfodiesterázu a zabránit další aktivaci signální dráhy (Visconti et al. 1995 II). Takto aktivovaná signální dráha se nachází u většiny savčích spermií. Ve spermiích mnoha druhů savců byla dokázána přítomnost nejen cytosolových proteintyrozinkináz (PTKs), ale také receptorových tyrozinkináz (RTKs), vázaných v plazmatické membráně spermie. Tyto kinázy a jejich následné signální dráhy jsou aktivované estrogen vázajícími estrogenními receptory ER α a ER β , případně G protein vázajícími receptory (GPR30), (Thomas et al. 2005). Oba typy receptorů zprostředkovávají rychlou negenomovou signální odezvu na estrogény (viz kapitola 1.3.). U myši, člověka, králíka a potkana byla identifikována receptorová tyrozinkináza epidermálního růstového faktoru (EGFR), (Naz & Ahmad 1992), která po vazbě ligandu spouští signální dráhu přes aktivaci Ras, která stimuluje Ser/Thr kinázu Raf (protein urychlující růst fibrosarkomu). Raf

fosforyluje a aktivuje MEK (mitogen-extracelulární kináza) a výsledkem této signální dráhy je fosforylace (extracelulární signál-regulující protein kináza) ERK1 a ERK2 (MAPK p44/p42 -proteinkináza aktivující mitogen), (Nixon et al. 2010) a následně TyrP. Inhibice ERK1, 2 vede k zablokování TyrP vedoucí ke kapacitaci. Regulace *in vitro* této signální dráhy u myši ukázala také její důležitou úlohu pro kapacitaci a roli ERK v modifikaci povrchu spermie, důležitou pro proces oplození (Nixon et al. 2010).

Jedním z prvních výzkumů, který ukázal souvislost mezi TyrP a schopností spermie oplodnit vajíčko byla práce Ecroyd et al. 2003. Tato studie detekovala protein tepelného šoku (HSP-90) fosforylovaný na tyrozinech, který je jeden z hlavních cílů signální dráhy během kapacitace. Fosforylace tohoto proteinu byla detekována u myši, potkana i člověka. Asquith et al. 2004 ukazují, že TyrP hraje důležitou roli také v přetváření povrchu spermie, a ukazují podobnou souvislost mezi TyrP a schopností spermie oplodnit vajíčko. TyrP během kapacitace aktivuje povrchové chaperony, vyvolává jejich konformační změny usnadňující tvorbu funkčních receptorů pro rozpoznání a interakci spermie-ZP na povrchu savčích spermií. Cílem této TyrP byly prokázány například proteiny endoplasmu a HSP-60, přítomné na povrchu myších spermií (Asquith et al. 2004). Důležitost TyrP těchto proteinů ukázal pokus inhibice TyrP inkubací spermií v médiu bez NaHCO₃. K vazbě spermie k ZP nedošlo. Dalšími proteiny, u kterých byla detekována TyrP byly: protein obsahující valosin (VCP), homolog SNARE-interagující fúzní protein senzitivní k N-ethylmaleimidu (NSF), a dva členové A kináza-kotvící proteinové rodiny (AKAP), (Ficarro et al. 2003). Izolací dvou ZP vázajících proteinů o molekulové hmotnosti 35 a 46 kDa z plazmatické membrány kapacitovaných kančích spermií bylo zjištěno, že také tyto proteiny jsou fosforylované na tyrozinech. Tato TyrP ale nebyla nalezena u čerstvě ejakulovaných spermií, což znamená, že TyrP vede také k aktivaci ZP vázajících proteinů (Flesch 2001).

Proces kapacitace nezahrnuje pouze intracelulární změny, ale také změny na povrchu ejakulovaných spermií ještě před kapacitací spermie. Zde dochází k odstranění proteinů seminální plazmy (dekapacitačních faktorů, akrozóm stabilizujících faktorů, glykoproteinů, inhibitoru akrozinu) adsorbovaných na povrchu spermií, dále k modifikaci a reorganizaci molekul na povrchu plazmatické membrány (Jones 1989). Uvolňované povrchové dekapacitační faktory jsou produkovány nadvarlaty a samčími přídatnými orgány. Po návratu těchto faktorů do suspenze spermií v pokusu *in vitro* bylo prokázáno potlačení kapacitačních dějů včetně možnosti projít progesteronem indukovanou AR a vázat se k ZP (Nixon et al. 2006). Také přítomnost vysoké koncentrace cholesterolu v seminální plasmě, která udržuje

vysokou koncentraci cholesterolu v plazmatické membráně spermie, je důležitým faktorem v inhibici kapacitace (Cross 1996).

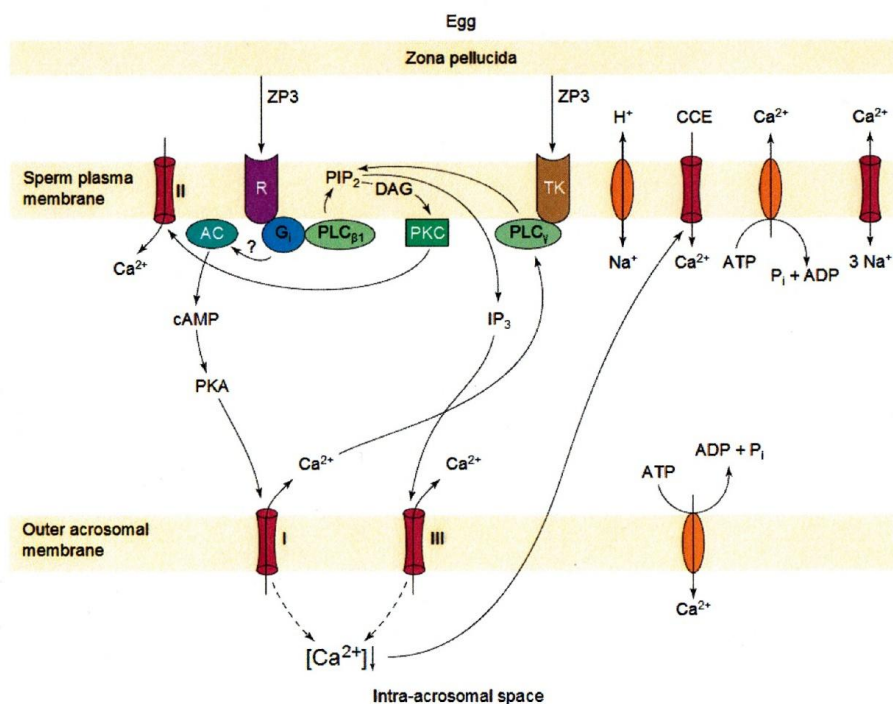
K TyrP nedochází během kapacitace pouze v hlavičce spermie, ale také v oblasti bičíku. V průběhu kapacitace dochází ke změně motility spermie (Neill & Olds Clarke 1987, Olds Clarke 1990). Důležitou roli v této změně hraje cAMP a signální dráhy vedoucí k TyrP (Tash & Means 1983). Byla nalezena souvislost mezi TyrP v průběhu kapacitace a hyperaktivní pohyblivostí spermií (Vijayaraghavan et al. 1997; Si & Okuno 1999; Holt & Harrison 2002; Mariappa et al. 2006). Hyperaktivní rázový pohyb bičíku spermie je nezbytný pro průchod spermie přes kumulární buňky, vazbu k ZP a také umožňuje AR (Katz & Drobniz 1990).

1.1.2. Mechanismus indukované akrozomální reakce

Spermie, která prošla kompletním procesem kapacitace má schopnost rozpoznání a vazby k ZP a oplodnění. K tomu, aby spermie mohla projít ZP a oplodnit vajíčko, musí projít AR, složitým procesem zahrnující aktivaci signálních drah a změn v intracelulárním iontovém složení spermie, vedoucí k AR, exocytóze akrozomálního váčku, který se nachází v anteriorní části hlavičky spermie. Spermie s intaktním akrozómem se váže k ZP apikální částí plazmatické membrány (Fazeli et al. 1997).

V procesu AR hraje velkou úlohu aktinový cytoskelet, který se nachází v hlavičce spermie (Brener et al. 2003). Přítomnost aktinu v bičíku souvisí s regulací motility spermie (Lin et al. 2002). Polymerace aktinu je nezbytná pro inkorporaci spermie do cytosolu vajíčka (Sanchez-Gutierrez et al. 2002), také pro dekonenzaci jádra spermie. Míra aktinové polymerace pozitivně koreluje s kapacitací spermií a to u různých druhů savců (Dvorakova et al. 2005). Proces vedoucí ke kapacitaci zahrnuje několik složek, které pravděpodobně modulují provázanost mezi vnější akrozomální membránou a plazmatickou membránou spermie. Děje související s AR jsou aktivovány vazbou spermie k ZP vajíčka. U myšovitých hlodavců ZP obsahuje tři proteiny ZP1, ZP2, ZP3 o molekulové hmotnosti 200,000 (ZP1), 120,000 (ZP2), and 83,000 (ZP3) a tyto proteiny tvoří přibližně 17% ze všech proteinů ZP (Bleil & Wassarman 1980). Protein ZP3 zprostředkovává primární vazbu spermie-vajíčko, ZP2 sekundární vazbu a ZP1 tvoří spojníky mezi ZP3 a ZP2. U většiny savců se předpokládá, že se spermie váže k ZP přes specifické receptory, vázané v anteriorní oblasti hlavičky spermie. Tato vazba aktivuje signální dráhy vedoucí k AR, při kterých dochází k fúzi vnější

akrozomální membrány a plazmatické membrány spermie (Yanagimachi 1994). Fyziologickým induktorem AR může být také progesteron (Garcia & Meizel 1999; Kirkman-Brown et al. 2002), který vazbou na receptory pro progesteron, aktivuje shodný příliv Ca^{2+} iontů do cytosolu spermie, podobně jako u indukce ZP (Garcia & Meizel 1999). ZP aktivuje signální dráhu vedoucí k AR přes receptory spojené s G proteiny (O'Toole et al. 2000), které aktivují fosfolipázu C (PLC) $\beta 1$ nebo přes receptorové fosfotyrozinkinázy aktivující PLC γ . G proteiny aktivují zejména signální dráhu cAMP/PKA, ale známé jsou také další signální dráhy vedoucí k aktivaci Ser/Thr a Tyr kináz. PKA aktivuje otevření napěťově závislých Ca^{2+} kanálů a umožňuje tok Ca^{2+} iontů z akrozomální membrány do cytosolu (obr. 2). Takto zvýšená koncentrace Ca^{2+} dále aktivuje protein kinázu C (PKC) γ (Kopf 2002; Roldan 1998). Produktem hydrolyzy fosfatidylinositol bisfosfátu (PIP₂) touto proteinkinázou je diacylglycerol (DAG) a inositol-trisfosfát (IP₃) umožňující aktivaci a translokaci PKC k plazmatické membráně. Výsledkem je otevření napěťově závislých Ca^{2+} kanálů na plazmatické membráně a tím umožnění druhého zvýšení koncentrace těchto iontů v cytosolu, související s AR (Walensky & Snyder 1995).



Obr.2. Molekulární interakce probíhající během AR (Breitbart & Naor 1999).

Fosfolipáza C (PLC), proteinkináza C (PKC), adenylátcykláza (AC), diacylglycerol (DAG), fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát (PIP₂), inositol-trifosfát (IP₃), proteinkináza A (PKA), tyrozin kináza (TK), receptor spojený s G proteinem (R, Gi).

Takto zvýšená koncentrace Ca^{2+} aktivuje aktin vázající proteiny a vede k depolymerizaci aktinového cytoskeletu a kontaktu a fúzi membrán a uvolnění obsahu akrozómu. DAG hraje ještě další roli a to v aktivaci fosfolipázy A2 (PLA2) a fosfatidylcholin specifické PLC. Produktem aktivace PLA2 je arachidonová kyselina a lysofosfolipidy, důležité látky regulující fúzi membrán. (Roldan 1998; De Blas et al. 2002). Receptory vázající ZP aktivují také otevření Na^+/H^+ výměníku vedoucí k alkalizaci cytosolu. Zvýšení pH a Ca^{2+} iontů vede k fúzi vnější akrozomální membrány a plazmatické membrány spermie a vede k AR (Kopf 2002). AR může být také indukována *in vitro*, pomocí kalcium ionoforu (CaI), který aktivuje intracelulární zvýšení Ca^{2+} iontů výměnou Ca^{2+} za 2H^+ (Spungin et al. 1995). Během takto indukované AR CaI sice obchází klasickou signální dráhu vedoucí k intracelulárnímu zvýšení Ca^{2+} , ale výsledná AR je morfologicky shodná s AR indukovanou ZP. Pokud jsou v pokusu *in vitro* G proteiny inhibovány (pertussis toxinem) je zablokována ZP indukovaná AR, ne však CaI indukovaná. Z výsledku pokusu vyplývá, že zvýšení Ca^{2+} u fyziologicky indukované AR je závislé na signální dráze vedoucí od G proteinů, nejedná se o nezávislý děj (Endo et al. 1987).

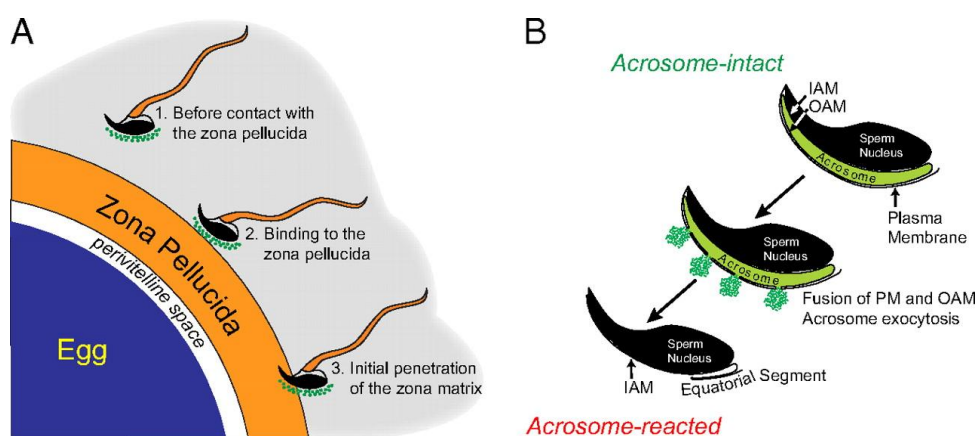
Během procesu kapacitace a AR hraje důležitou roli remodelace aktinového cytoskeletu. V průběhu kapacitace u býka, berana, myši a člověka dochází k časově závislému zvýšení aktivace polymerace aktinu, spuštění AR předchází jeho rychlá depolymerace. Faktory, které podporují kapacitaci jako například NaHCO_3 , cAMP, EGF (epidermální růstový faktor), H_2O_2 , zvyšují polymerizaci aktinu, naopak inhibice tyrozinkináz této polymerizaci zabraňují. Aktinová polymerace je proto důležitým regulátorem kapacitace, depolymerace umožňuje AR spermie (Brener 2003). Během kapacitace PKA aktivuje PKC, společně aktivují fosfolipázu D (PLD) a tím dráhu vedoucí k polymerizaci aktinu. Tato polymerace je proto přímo závislá na aktivitě PKA. Zároveň PKA aktivuje fosfatidylinositol 4-kinázu a umožňuje produkci fosfatidylinositol 4,5 bisfosfátu, kofaktoru, který umožňuje další aktivaci PLD. PKA během kapacitace zároveň inaktivuje fosfolipázu C (PLC) a tím brání další aktivaci PKC. PKA podporuje kapacitaci, zatím co časná aktivace PKC by tento proces ohrozila (Breitbart et al. 2006). Tyto děje jsou závislé na aktivaci TyrP, TyrP a polymerace aktinu jsou děje, které spolu souvisejí a společně vedou ke kapacitaci spermie a AR (obr. 1).

Specifické ZP vázající receptory (ZPBP), vázané v anteriorní oblasti havičky spermie byly u myši detekovány jako sp56 protein vázající ZP3 protein ZP (Bleil Wassarman 1990;

Bookbinder et al. 1995), podobně byly u myši detekovány ZPBP1/sp38 a jeho paralog ZPBP2. ZPBP1 knock-out myši byly sterilní, zatímco ZPBP2 knock-out samci měli sníženou plodnost. Ztráta ZP vázajících proteinů vykazovala morfologické změny akrozómu i hlavičky spermie i defekty seminiferálních tubulů. Z výsledků vyplývá, že tyto proteiny hrají důležitou roli během spermiogeneze (Lin et al. 2007).

Během fúze vnější akrozomální membrány a plazmatické membrány spermie se synchronně formují stovky fúzních míst, které zajišťují uvolnění celého obsahu akrozómu. (Barros et al. 1967; Zanetti & Mayorga 2009). Po fúzi membrán se vnějšímu prostředí otevírají nové struktury vázající se na vnitřní akrozomální membráně spermie, které se stávají přístupné molekulám plazmatické membrány vajíčka a účastní se fúze spermie s vajíčkem (Florman et al. 2008; Harper et al. 2008). V práci o roli akrozomální matrix Buffone et al. 2008 ukazují, že akrozóm se nenachází pouze ve stavu intaktním nebo uvolněném. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie lidských spermií procházejících akrozomální exocytózou identifikovali šest stádií, pouze jeden ukazoval ztrátu materiálu akrozomální matrix.

V procesu oplození, spermie neprochází pouze ZP, ale nejprve extracelulárním pláštěm vajíčka, vrstvou kumulárních buněk (*cumulus oophorus*), (obr. 3).



Obr. 3. Postup akrozomální reakce u myši (Avella & Dean 2011). Vnější akrozomální membrána (OAM), vnitřní akrozomální membrána (IAM)

V roce 1984 Kuzan et al. provedli pokus, při kterém během oplození vajíčka králíka odebrali spermie zachycené v perivitelinním prostoru, a přidali je k neoplozeným vajíčkům. 24% těchto vajíček bylo oplozeno a osm z nich dosáhlo stádia dvou buněk. Byl to první pokus úspěšného oplození *in vitro*, který ukázal možnost, že spermie po AR jsou schopny oplození vajíčka s kumulárními buňkami i s ZP. Během studia oplození u myších spermií bylo také

dokázáno, i když mnohem později, že k AR u těchto spermií dochází ještě před tím, než spermie dosáhne ZP, a to během průchodu spermií vrstvou kumulárních buněk (obr. 3). AR u myši může skutečně probíhat na ZP, ale jedná se spíše v současném světle o výjimku než pravidlo (Jin et al. 2011).

Podobný pokus jako Kuzan et al. 1984 provedli Inoue et al. 2011 na myši. Oplození u CD9-null myši není možné, protože oolema vajíčka není schopná fúze se spermii. V tomto případě spermie procházejí přes vrstvu kumulárních buněk i ZP, ale zůstávají akumulovány v perivitelním prostoru, k fúzi nedochází. Inoue et al. 2011 v pokusu ukázali, že tyto spermie izolované z perivitelního prostoru jsou schopny opět projít přes vrstvu kumulárních buněk a ZP, oplodnit vajíčko myši divokého typu (WT) a po následném embryotransferu dát zdravé a fertlní potomstvo. Pokus dokázal, že myší spermie, které projdou AR před kontaktem se ZP, jsou stále schopny projít přes ZP a oplodnit vajíčko.

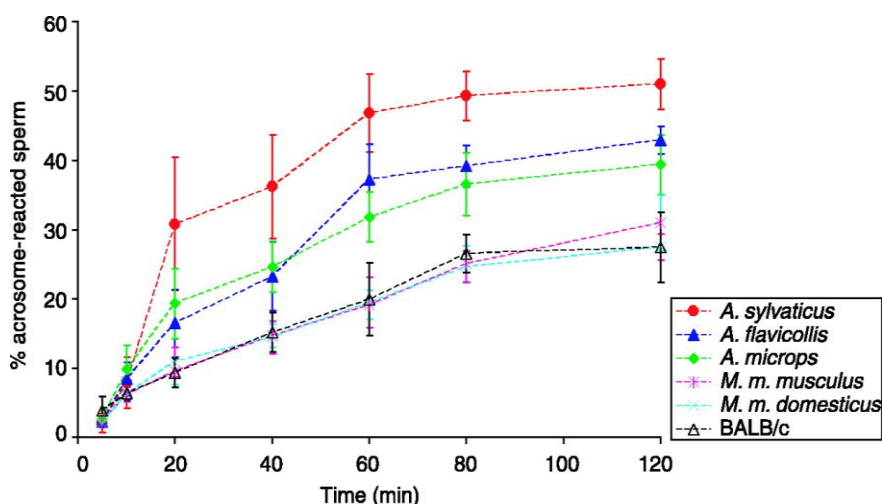
Způsob, jak jsou spermie schopny po AR projít přes kumulární buňky a ZP není dosud plně známý. Detekce akrozinu monoklonální protilátkou na ejakulovaných králičích spermiích ukázala, že akrozin zůstává na povrchu spermií po AR po dlouhou dobu a u spermií izolovaných z perivitelního prostoru je detekován v oblasti ekvatoriálního regionu a postakrozomální oblasti. Akumulace zbytku akrozinu po AR na povrchu spermie může být jedna z možností, která pomáhá spermii dostat se k oolemě vajíčka. (Valdivia & Barros 1997).

1.1.3. Spontánní akrozomální reakce

Akrozomální reakce je indukovaná nejen vazbou spermie k ZP nebo během průchodu spermií přes vrstvu kumulárních buněk, ale také může probíhat spontánně. Přesný mechanismus spontánní (rychlé) AR není dosud známý, i když byly navrženy určité teorie. Spermie po spontánní AR byly dosud považovány za defektní, neschopné oplození (Inoue et al. 2003). V roce 1992 provedli Naito et al. pokus oplození myších vajíček bez ZP. Výsledkem byl normální průběh oplození, oplozeno bylo 79% ze 151 vajíček, většina z nich se vyvinula do blastocysty. Po transferu blastocyst do recipientních matek se narodila zdravá mláďata, což znamená, že embrya vzniklá za daných experimentálních podmínek byla schopna normálního vývoje. Pokud je skutečně pro úspěšné oplození vajíčka spermií důležité, aby spermie prošla AR, z pokusu vyplývá, že došlo k oplození spermii, které prošly spontánní AR v médiu nebo na povrchu oolemy vajíčka. Tyto spermie jsou však schopny

produkovat zdravé potomstvo. Za integritu akrozómu je pravděpodobně zodpovědný CD46 (membránový proteinový kofaktor), který je exprimován na membráně akrozómu myších spermíí. Disrupcí CD46 nebyla snížena reprodukční schopnost samců těchto knock-out myší, ale naopak se rodilo více mláďat ve vrhu oproti kontrole. Jediný rozdíl, který byl u spermíí těchto CD46 knock-out myší pozorován byl, že spermie těchto samců vykazovaly zvýšenou míru spontánní AR (Inoue et al. 2003).

U zástupců myšovitých hlodavců rodu *Apodemus* (*A. sylvaticus*, *A. flavicollis* a *A. microps*) oproti myši domácí *Mus musculus* nebo laboratorního kmene myši BALB/c bylo prokázáno vysoké procento spermíí, které procházejí spontánní AR (obr. 4). U promiskuitních druhů toto procento stoupá až na 60% v 60 min kapacitace *in vitro* (Moore et al. 2002; Inoue et al. 2003; Johnson et al. 2007; Clift et al. 2009). Pravděpodobným důvodem urychlení AR u myšic je právě absence exprese CD46 proteinu.



Obr. 4. Míra spontánní AR u myšovitých hlodavců (Johnson et al. 2007). Vyšší míra spontánní AR byla detekována u tří myšic rodu *Apodemus* v porovnání s myši domácí (*Mus musculus*) a laboratorní myši BALB/c.

U myšic není CD46 exprimován ani v *testis* ani v *epididymis*. Přesto spermie těchto myší nevykazují změny ve spermatogenezi ani při úspěšnosti oplození. U myšic, nepřítomnost CD46 poskytuje strategii zvýšené konkurenční výhody jedince, která vede k rychlejšímu oplození vysoce promiskuitních myší (Johnson et al. 2007; Clift et al. 2009). CD46 knock-out BALB/c myš je tak fenotypově shodná s myšicí, kde CD46 není translatován. Z těchto výsledků vyplývá, že myši s rozdílnou expresí CD46 vykazují odlišnou rychlost AR (Johnson et al. 2007). Mechanismus urychlení této AR není však dosud známý. CD46 je lokalizován na akrozomální membráně, není to však oblast, která by se přímo

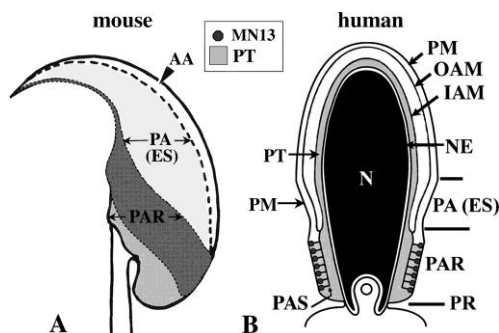
účastnila procesu AR. Chybějící CD46 v akrozomální membráně by mohl ovlivňovat distribuci membránových proteinů, které asociují s CD46 (Inoue et al. 2003). Takovými proteiny může být β 1 integrin nebo tetraspaniny, u kterých bylo dokázáno, že s CD46 asociují (Lozahic et al. 2000). Disrupce CD46 pravděpodobně mění chování iontových kanálů, dochází ke změnám iontového složení vápenatých iontů a spuštění spontánní AR. Bylo prokázáno, že CD46 asociuje s některými kinázami (Erk1/2, MAPK, které se účastní AR), buď přímo či nepřímo přes molekuly integrinů, důležitou roli může hrát také reorganizace aktinu (Zaffran et al. 2001; Almog et al. 2008). Protein CD46 se pravděpodobně účastní signální dráhy vedoucí ke spuštění AR. Selhání exprese CD46 může pozměnit intracelulární signalizaci a narušit akrozomální region. Spontánní AR může proto být děj fyziologický, ke kterému dochází přirozenou cestou v souvislosti s kapacitací spermie (Kim et al. 2001)

V současné době jsou stále hledány látky, které by pozitivně ovlivňovaly kvalitu spermií zejména u člověka. Mezi látky, které mohou regulovat kapacitaci i AR, byly prokázány: cathine, norephedrine, adrenaline a noradrenaline. Tyto látky mohou urychlovat kapacitaci, inhibovat spontánní AR spermií a tím zvyšovat jejich fertilitu (Adeoya-Osiguwa & Fraser 2004). Další zkoumanou látkou byl TCP-11 (T-complex protein 11), produkt myšního t-komplex genu, který může regulovat funkci spermie, hraje roli ve stimulaci kapacity a zároveň inhibuje spontánní AR. TCP-11 byl nalezen na povrchu maturovaných myších spermií z *cauda epididymis*, naopak chybí u spermií po AR. TCP-11 je receptorem pro FPP (fertilizaci podporující peptid; pGlu-Glu-ProNH₂), společně aktivují adenylátcykláza/cAMP signální dráhu a podporují kapacitaci (Fraser et al. 197).

1.2. Cytoskeletální funkce a organizace spermie

Spermie má vysoce specializovanou cytoskeletální organizaci, která koreluje s odlišnou povrchovou specializací spermie. Cytoskeletální proteiny v závislosti na své distribuci ovlivňují jednotlivé funkce spermie, zejména kapacitaci a AR (Brener et al. 2003). Mikroskopické studie potvrdily změnu v rozložení struktur aktinu, spektrinu a tubulinu po AR a pokusy s cytoskeletálními inhibitory tyto děje významně ovlivnily (Dvorakova et al. 2001; Brener et al. 2003). Kromě aktinového cytoskeletu jsou funkce jednotlivých složek cytoskeletu spermie velmi málo prostudované, jejich souhrnná lokalizace v hlavičce spermie v literatuře téměř zcela chybí.

Cytoskeletální struktury se v hlavičce spermie nachází zejména mezi plazmatickou membránou a vnější akrozomální membránou, v ekvatoriálním regionu i v postakrozomální oblasti (obr. 5) a patří mezi látky, které se výrazně podílí na funkci spermie (Eddy & O'Brien 1994). Další oblastí hlavičky spermie je perinukleární théka, struktura cytoskeletu která překrývá jádro samčích spermií s výjimkou úzké zóny kolem připojeného bičíku. Je tvořena dvěma různými vrstvami, subakrozomální vrstvou nebo perforatoriem, pokračující kaudálně postakrozomální pochvou.



Obr. 5. Schematické znázornění lidské a myší hlavičky spermie (Ito et al. 2009). Sagitální část hlavičky spermie myši (A), frontální část hlavičky lidské spermie (B). Postakrozomální pochva (PAS) je součástí perinukleární théky (PT), postakrozomální region (PAR), anteriorní akrozóm (AA), ekvatoriální segment (ES), vnitřní akrozomální membrána (IAM), jádro (N), jaderný obal (NE), vnější akrozomální membrána (OAM), plazmatická membrána (PM), posteriorní prstenec (PR).

Aktin, cytoskeletální protein mikrofilyment, byl detekován v oblasti akrozomálního regionu, kde hraje důležitou roli zejména před a po AR, a hlavní části bičíku. Spektrin a vimentin, asociované s plazmatickou membránou se účastní stabilizace buněčného povrchu související s oplozením (Virtanen et al. 1984).

Vazba monomerních molekul aktinu (G-aktin) do vláknitých struktur (F-aktin) je kontrolována různými aktin-vázajícími proteiny. Těmito proteiny ve spermii jsou například: thymosin b10, destrin, *testis*-specific actin capping protein (Howes et al. 2001), gelsolin (de las Heras et al. 1997), protein napojující na mRNA čepičku (CP) $\beta 3$ (von Bulow et al. 1997), scinderin (Pelletier et al. 1999), calicin (von Bulow et al. 1995), CP $\alpha 3$ (Tanaka et al. 1994) a actin-related proteins Arp-T1 (Heid et al. 2002). Inhibice aktinové polymerace cytochalasinem D u kance a myši blokuje schopnost *in vitro* oplození (Brener et al. 2003). Z výsledků studií vyplývá, že remodelace aktinového cytoskeletu hraje důležitou roli v procesu kapacitace i AR spermie. Před AR signální dráhy udržují aktin ve filamentárním

stavu a tím brání fúzi vnější a vnitřní akrozomální membrány naopak jeho depolymerace hraje důležitou roli v procesu AR.

Polymerace je umožněna také za přítomnosti aktivních molekul signálních drah PKA, TyrP, PLD i PLC. Hlavním regulátorem polymerace aktinu je PLD, která může být aktivovaná jak dráhou cAMP/PKA nebo druhou cestou přes G protein vázající receptory (GPCR). Tyto signální dráhy jsou podrobněji popsány v části kapitoly o indukované AR.

Zejména oblast mezi plazmatickou membránou a vnější akrozomální membránou je bohatá na aktin, který je během kapacitace přítomen v polymerizovaném stavu. Kortikální F-aktin hraje v regulaci exocytózy dvě hlavní role. Vytváří lešení, které pomáhá udržovat PLC γ po její fosforylaci na plazmatické membráně a dále slouží jako fyzická bariéra, znemožňující fúzi obou membrán před tím, než dojde k aktivaci AR (Spungin et al. 1995). Inhibice PLC γ neomicinem inhibovala AR. Těsně před AR je tato bariéra odstraněna, F-aktin je depolymerován zvýšením koncentrace Ca²⁺ a pH, které předchází fúzi. Aktivní PLC odstraňuje také PIP 2- inhibici aktin-odstřihujících proteinů a spolu s aktivací PKC se podílí na dějích vedoucích k depolymeraci aktinu a následně AR. Depolymerace aktinu je oproti polymeraci velice rychlá. Inhibice depolymerace F-aktinu faloidinem znemožňuje AR (Spungin et al. 1995). Současně fosfolipáza A2 štěpí mastné kyseliny z fosfolipidů na lysofosfolipidy, které také podporují fúzi membrán (Roldan 1998). S polymerací aktinu souvisí TyrP. Mnoho dějů v průběhu kapacitace i AR jsou závislé na zvýšené koncentraci Ca²⁺ iontů o různé intenzitě. Aktivita PLC vyžaduje nízkou koncentraci Ca²⁺ iontů (2 μ M), vyšší koncentrace je potřebná pro depolymeraci aktinového cytoskeletu, pro aktivitu aktin odstřihujících proteinů. Koncentrace Ca²⁺ v místech fúze membrán může dosahovat hodnoty až 100 μ M (Sihra et al. 1992), která je shodná s hodnotou koncentrace potřebnou pro depolymeraci aktinového cytoskeletu (Spungin & Breitbart, 1996).

Úlohu v aktinové polymeraci hraje také EGFR, aktivován umožňuje PLD aktivaci a aktinovou polymeraci. EGFR na konci kapacitace zvyšuje intracelulární koncentraci Ca²⁺ vedoucí k depolymeraci aktinu a AR. EGFR může být přímo aktivován ligandem pro epidermální růstový faktor (ERF), nepřímo aktivací PKA nebo aktivací GPCRs (Etkovitz et al. 2009)

Aktin je přítomný kromě akrozomální, ekvatoriální a postakrozomální oblasti hlavičky spermie, ale také v oblasti bičíku (Clarke et al. 1982; Fouquet & Kann 1992). Zde hraje roli v regulaci motility spermie, iniciaci motility zejména během posttestikulární maturace (Lin et al. 2002). Polymerace aktinu v ekvatoriálním a postakrozomálním regionu prasečích spermií

během AR je důležitá zejména z důvodu hluboké inkorporace spermie do cytoplasmu vajíčka. Není však nezbytná pro fúzi membrán (Delgado-Buenrostro 2005).

Předpokládá se, že během kapacitace spermie dochází v mitochondriích k translaci proteinů původně kódovaných v jádře. Formování F-aktinu během kapacitace může být důležité právě pro translokaci jaderné mRNA do oblasti střední části bičíku (mid-piece), kde jsou lokalizované mitochondrie (Gur & Breitbart 2006; Zhao et al. 2009).

Během procesu kapacitace dochází k aktivaci tyrozinové fosforylace vedoucí k polymeraci aktinového cytoskeletu, který zabraňuje fúzi vnější a vnitřní akrozomální membrány vedoucí k AR (Brenner et al. 2003). Bylo dokázáno, že estrogeny mohou snižovat počet spermií procházející AR (Baldi et al. 2000, Vigil et al. 2008). Zvýšenou stimulací estrogenních receptorů na povrchu spermie dochází k prokapacitačním procesům zvýšením aktivace tyrozin kináz (Ded et al. 2010). Zvýšení TyrP vede pravděpodobně ke kontinuální aktivaci PLD, přetrvávající aktinové polymeraci a oddálení AR.

Přítomnost aktin vázajících proteinů se velice často v literatuře liší a závisí velmi na druhu spermií. U spermií křečka a myši nebyly spektrin ani ankyrin identifikovány v subakrozomální oblasti hlavičky spermie, která je bohatá na F-aktin. Spektrin byl detekován zejména kolem vazivové pochvy bičíku, zatímco ankyrin byl detekován pouze v oblasti krčku. U spermií králíka byl spektrin identifikován v oblasti postakrozomálního regionu, ankyrin byl opět detekován v krčku. U potkana, opice a lidských spermií tyto proteiny nebyly detekovány (Kann et al. 1993). Výsledky ukazují, že podobně jako rozložení aktinu, není lokalizace spektrinu a ankyrinu u jednotlivých druhů shodná. V jiných pokusech byl u kančích spermií spektrin identifikován v oblasti krčku a celé oblasti bičíku, α -aktinin byl lokalizován v oblasti akrozomální laminy, krčku a celé oblasti bičíku, kde byl lokalizován také aktin. Aktin byl detekován také v posteriorním kruhu v postakrozomální oblasti (Yagi & Paranko 1995). Vimentin byl u lidských spermií lokalizován v hlavičce spermie a to zejména v oblasti ekvatoriálního segmentu. Pomocí elektronového mikroskopu byla zjištěna nerovnoměrná distribuce vimentinu. Rozložení těchto struktur odpovídá funkčnímu rozlišení částí hlavičky spermie, tomu odpovídající morfologické rozlišení je patrné pouze u hlodavců (Markova et al. 2002). V nedávné studii byl filamentární aktin, ale také spektrin, myozin a kalmodulin poprvé lokalizovány také v akrozómu, kde se pravděpodobně účastní řízení uvolňování lytických enzymů během procesu AR (Zepeda-Bastida et al. 2011).

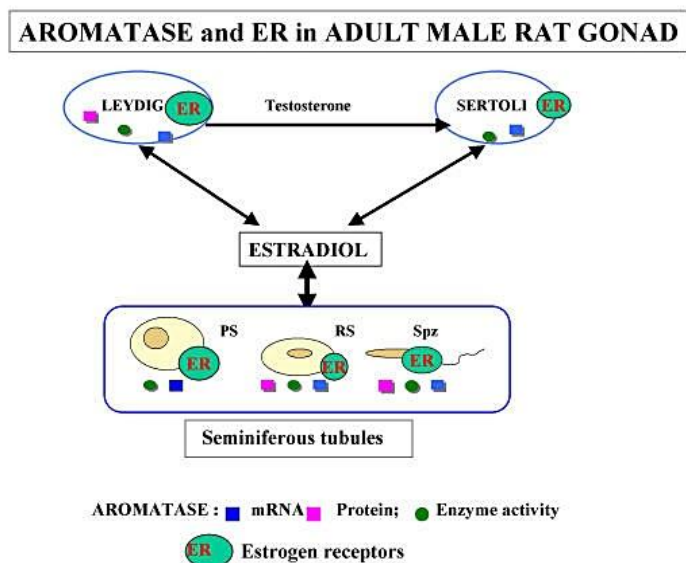
Aktin, myozin, cytokeratiny a spektrin byly také nalezeny v jaderné matrix u spermií morčete. Zde byla dokázána jejich role v udržování stability jádra spermie (Ocampo et al.

2005). Další důležitou složkou cytoskeletu, nacházející se ve spermii jsou mikrotubuly. Spolu s asociovanými proteiny přispívají zejména k motilitě buněk. Během kapacitace se mění motilita spermie z pozvolné po hyperaktivní (de Lamirande & Gagnon 1993; Goodson et al. 2011), pomáhá spermii se rychleji pohybovat a generovat sílu, která je pro oplození nezbytná (Jin et al. 2007; Amieux & McKnight 2002). Bylo dokázáno, že u člověka a myši se aktivní PLD účastní aktinové polymerace, má vliv na motilitu a hyperaktivaci spermie během kapacitace. Zablokováním aktinové polymerace za použití cytochalasinu D nebo aktivity F-aktin odstřihujících proteinů použitím PBP10 peptidu (peptid 10 vázající polyfosfoinositid) byla zablokována nejen hyperaktivace ale také celá motilita spermie. To dokazuje nejen vliv PLD, ale také vliv aktinové polymerace na hyperaktivitu spermie (Itach et al. 2012).

Mikrotubuly se nacházejí také v hlavičce spermií, zde se pravděpodobně podílí také na udržení jejího tvaru. Tubulin α a β byly detekovány v bičíku lidských spermií, β tubulin v ekvatoriální oblasti hlavičky spermie (Dráber et al. 1991). Katanin p80, evolučně konzervativní proteinový komplex řídící odstřihování mikrotubulů, ovlivňuje dynamiku mikrotubulů v hlavičce i bičíku spermie. Řídí tvorbu, funkci a disociaci mikrotubulů úzce zapojených právě v určení tvaru hlavičky spermie a bičíku. Narušená funkce tohoto komplexu u myši vede k neplodnosti samců díky snížené produkci spermií, tvorbě spermií s abnormálním tvarem hlavy a defektu v jejich pohyblivosti (O'Donnell et al. 2012).

1.3. Estrogeny a estrogení receptory

Estrogeny regulují u savců velké množství fyziologických procesů, mezi které patří také samčí a samičí reprodukční systém (Free & Jaffe 1979). Varlata savců plní dvě hlavní funkce: produkci spermií a syntézu steroidních hormonů. Aromatáza je enzym, který nereverzibilně transformuje androgeny na estrogeny a je přítomna v buňkách mnoha tkáních. Tento enzym je složený ze dvou proteinů: NADPH-cytochrom P450 reduktázy a P450 aromatázy, která obsahuje hem a vazebné místo steroidu (Simpson et al. 1994). U myši byla P450 aromatáza detekovaná také v zárodečných buňkách (Nitta et al. 1993), Leydigových buňkách a cytoplazmatické kapce připevněné k bičíku spermií (Kotula-Balak et al. 2004), zde však nebyla určena její aktivita. Aktivita P450 aromatázy byla stanovena u potkana a člověka. U potkana je P450 aromatáza aktivní v Sertoliho a Leydigových buňkách, u pachytenních spermatocytů, spermatid a v cytoplazmatické kapce spermií (Carreau et al. 2003), (obr. 6).



Obr. 6. Aromatáza a estrogenní receptory v gonádě dospělé samce potkana (Carreau et al. 2003).

Pachytenní spermatocyty (PS), kulaté spermatidy (RS), spermie (Spz). Detekce mRNA, proteinu a aktivity aromatázy, lokalizace estrogenního receptoru (ER).

Spermie myši jsou schopny syntetizovat estrogeny díky aktivitě P450 aromatázy v *ductules efferent a caput epididymis* a tato syntéza je důležitá pro proces jejich maturace. Aktivita P450 aromatázy se výrazně snižuje průchodem spermií skrz *epididymis*, v *cauda epididymis* je velice nepatrná (Janulis et al. 1996), což by mohlo souhlasit s aktivitou P450 aromatázy v postupně zanikající cytoplazmatické kapce spermie.

Ačkoliv estrogeny bývají pokládány převážně za samčí reprodukční hormony, hrají důležitou roli také v regulaci reprodukce samců. Koncentrace estrogenů se mezi samcem a samicí kvantitativně liší a je druhově specifická. U samců dosahuje v krevní plazmě hodnot 2-180 pg/ml a opět závisí na druhu (Ganjam et al. 1976; Overpecket et al. 1978). U potkana a myši, koncentrace 17β -estradiolu je 2-25 pg/ml, což je méně než v tekutině *rete testis* (250 pg/ml), (Free et al. 1979). Rozdíly koncentrací byly detekovány i u samic, kde koncentrace estrogenů v ovariální tekutině byla alespoň dvakrát vyšší ve srovnání s jejich koncentrací v krevní plazmě. U samic potkana a myši se koncentrace estrogenů mění v závislosti na období estru, u 17β -estradiolu dosahuje hodnot v rozmezí 145-2100 pg/ml (Shaikh 1971). Estrogeny jsou hojně zastoupeny také ve spermatu, koncentrace je zde také závislá na druhu a dosahuje přibližně hodnot 14 – 900 pg/ml (Eiler & Graves 1977; Claus et al. 1985).

Estrogeny regulují buněčnou funkci pomocí estrogenních receptorů (ER), ER α a ER β (Lubahn et al. 1993), které patří do rodiny ligand-aktivujících transkripčních faktorů (Evans et

al. 1987) Tyto transkripční faktory jsou lokalizované v jádře, kde regulují genovou transkripci vazbou na DNA regulační sekvence a ovlivňují tak expresi cílových genů (Hall et al. 2001). Pozdější výzkumy ukázaly, že toto není jediný mechanismus působení estrogenů. Estrogenní hormony mohou aktivovat odlišné signální dráhy a některé z nich nemusí být přímo závislé na estrogenních receptorech (ER). Některé odpovědi na estrogény mohou iniciovat mnoho rychlých negenomových signálních aktivit, které se odehrávají během sekund či minut. Modely rychlé odpovědi jsou zprostředkovány klasickými ER vázanými v plazmatické membráně, které iniciují signální kaskády asociované s membránovými strukturami jako například G proteiny, kaveoliny a receptorovými tyrozinkinázami. Kromě klasických ER se estrogény mohou vázat také na membránou asociované estrogen vázající receptory spojené s G proteiny (GPCRs) například GPR30, které také spouští rychlou intracelulární odezvu. Oba mechanismy mohou vést ke změnám genové transkripce (Thomas et al. 2005; Revankar et al. 2005). GPR30 je však odlišně lokalizován, buď na plazmatické membráně (Thomas et al. 2005), nebo na membráně endoplazmatického retikula (Revankar et al. 2005). Možnosti dimerizace tohoto receptoru a translokace GPR30 k plazmatické membráně se nevyklučují (Terrillon & Bouvier 2004). Studie ukázaly, že membránový ER a klasický ER pochází z jednoho transkriptu, subrodina receptorů steroidních hormonů má podobnou strukturu a charakteristiku s vysoce konzervovanou strukturální doménou jak DNA, tak vázajícího ligandu (Razandi et al. 2004). Na plazmatické membráně je lokalizováno více steroidních receptorů. Identifikován byl ER α , ER β , progesteronový receptor A a B a androideální receptor. Palmitoylace E domény steroidních receptorů je rozhodující modifikace pro jejich translokaci na plazmatickou membránu a funkci. Na rozdíl od translokovaných receptorů, nukleární receptory nejsou palmitoylované (Acconcia et al. 2004; Pedram et al. 2007).

Estrogenní receptory α a β byly detekovány také v samčím reprodukčním traktu (Hess 1997). Vzájemný vztah těchto dvou receptorů byl studován pomocí WT myši a ER α knock-out myši. Otázkou bylo, zda ER β bude schopný kompenzovat chybějící receptor ER α knock-out neplodných samců myši. V *testes* myši je ER β přítomen v Leydigových buňkách, v epitelu odvodných kanálků, prodlužujících spermatidách i *epididymis*. U WT kontrol, ani u ER α knock-out myši nebyl zjištěn kvantitativní rozdíl v přítomnosti tohoto receptoru. U ER α knock-out myši byl v *testes* přítomen protein ER β i mRNA, ale přítomnost tohoto receptoru nekompensuje absenci ER α v samčím reprodukčním traktu (Rosenfeld et al. 1998). Histologické studie varlat ER α knock-out ukázaly rozdíly ve vývoji seminiferního epitelu a bylo zjištěno zvýšené množství tekutiny, kumulované v seminiferních kanálcích, *rete testis a*

ductules efferent (Hess et al. 1997). ER α nereguluje koncentraci ER β , avšak ER β může vytvářet s ER α heterodimery. U ER α knock-out myši ER β není schopný udržet reprodukční funkci (Rosenfeld et al. 1998).

ER α /ER β knock-out myši ukázaly chybějící odezvu k 17 β -estradiolu i přes dokázanou přítomnost GPR30 (Pedram et al. 2006). Studium těchto knock-out myši či umlčením GPR30 nedošlo k žádné změně v regulaci signálu (Madak-Erdogan et al. 2008). Výzkumy na myších ováriích ukázaly, že ER α knock-out myši vykazovaly abnormální vývoj reprodukčního systému, myši byly sterilní, zatím co ER β knock-out myši byly buď sterilní, nebo subfertilní (Dupont et al. 2000). Důvod těchto rozdílů a případné odlišné funkce ER jsou zatím neznámé. Role GPCRs je často studována na spermatogoniích (Sirianni et al. 2008; Chimento et al. 2010; Sheng & Zhu 2011), ale receptor vázaný s G proteiny GPR30, aktivovaný nezávisle na ER a účastníci se rychlé negenomové signální dráhy dosud nebyl nalezen na spermiiích. Epididymální spermie však nejsou transkripčně aktivní, proto zde rychlá negenomová signalizace hraje hlavní roli. Estrogeny, zprostředkující rychlou intracelulární signalizaci u lidských ejakulovaných spermiií ovlivňují kapacitaci a AR aktivaci fosforylace různých proteinů. Vazbou estogenu k ER je aktivována signální dráha přes G proteiny a cAMP/PKA signalizaci (Razandi et al. 1999; Filardo et al. 2002). Aktivovaný ER iniciuje také tvorbu druhých posílů a signalizaci vedoucí přes EGF dráhu (Filardo & Thomas 2005).

Tff1 (Trefoil factor 1) gen, také známý jako *pS2* gen, kóduje expresi TFF1 proteinu, který je distribuován v celém zažívacím traktu v normálních i nemocných tkáních. TFF1 je považován za jeden z hlavních estrogen regulovaných proteinů a za ukazatele funkce ER. Transkripce *Tff1* genu je přímo kontrolována estrogeny (Park et al. 2012). Protein hraje pravděpodobně úlohu v ochraně sliznic, ve stabilizaci hlenové vrstvy, a ovlivňuje hojení epitelů. Zvýšená exprese genu *Tff1* u člověka byla detekována v karcinomu žaludku, prsních buněk, tlustého střeva, plic i karcinomu prostaty (Dunbier et al. 2010; Abdou et al. 2008; Moghanibashi et al. 2012). *Tff1* je často používán jako marker v laboratorních, občas i klinických studiích. Často bývá studován vztah mezi expresí na estrogen závislých genů na bazální hladině estogenu v ER pozitivních karcinogenních tkáních (Dunbier et al. 2010).

V přírodním prostředí dochází neustále ke zvyšování množství látek, které mají negativní dopad na samčí i samičí reprodukční parametry. Mezi tyto látky patří zejména přírodní (17 β estradiol, estrone, estriol) a syntetické estrogeny (17 α ethynylestradiol), látky nesteroidní povahy vykazující estrogenní hormonální aktivitu (ftaláty, p,p'-DDE (dichlorodifenylchloroetylen), vinclozolin, procymidon bisfenol A) ale také látky, které

znečišťují životní prostředí (tetrabrombisfenol, polybromované bisfenoly), (Ded et al. 2010; Gray et al. 1999a,b; Zatecka et al. 2013). Tyto látky, nazývané endogenní disruptory, mohou narušit fyziologickou funkci estrogenních hormonů a ovlivnit reprodukční vývoj a funkci organismů (Colborn et al. 1993). Dalšími látkami ovlivňující reprodukční schopnosti organismů jsou rostoucí koncentrace fluoridů, vytvářející v přítomnosti hliníkových iontů komplexy, které jako analogy fosfátové skupiny mohou aktivovat G proteiny či některé ATPázy, které jsou součástí signálních drah vedoucí například ke zrání spermií (Dvoráková-Hortová et al. 2008). V poslední době se v literatuře často objevují práce, zabývající se pozitivní korelací mezi zvyšováním koncentrace estrogenu v přírodním prostředí a různými abnormalitami reprodukce (Storgaard et al. 2006; Soares et al. 2009; Wolf et al. 2010).

1.4. Molekulární mechanismy interakce spermie-vajíčko

Interakce spermie-vajíčko je komplexní molekulární proces vedoucí k fúzi gamet, který je zprostředkován řadou molekulárních interakcí.

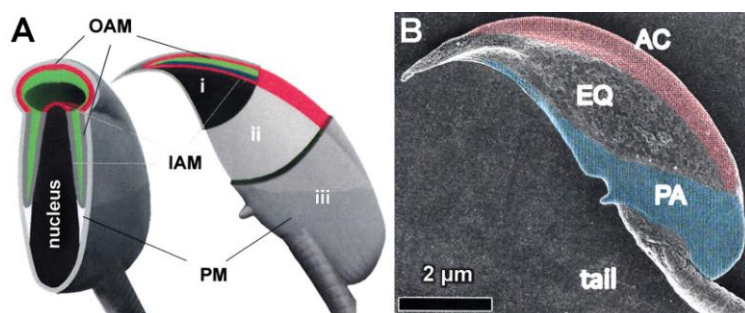
Na cestě k vajíčku mohou být spermie v oviduktu zachyceny a drženy v oviduktálním rezervoáru, kde se spermie přechodně váží na povrch epitelu (Suarez 1987). Uskladnění spermií v rezervoáru udržuje jejich plodnost do ovulace, snižuje také možnost polyspermie, proto jen málo spermií v určité době dosáhne k vajíčku. V rezervoáru spermie přechodně zpomalí metabolismus, po ovulaci spermie dokončují kapacitaci a dochází k hyperaktivaci jejich motility.

K vajíčku jsou spermie naváděny kombinací chemotaxe a termotaxe (Suarez & Pacey 2006; Eisenbach 1999). Pro úspěšné oplození musí spermie projít vrstvou kumulárních buněk, glykoproteinovým obalem vajíčka a fúzovat s oolemou vajíčka. Molekulární mechanismy interakce spermie s oolemou nejsou zcela známé. Po AR dojde k odkrytí vnitřní akrozomální membrány a je modifikováno membránové složení ekvatoriálního a post-akrozomálního regionu spermie. Studií vnitřní akrozomální membrány byl identifikován proteinový plášť, jehož nejvýznamnější složkou je protein vnitřní akrozomální membrány IAM38 (ekvivalent prasečímu Sp38) (Yu et al. 2005), který zprostředkovává sekundární vazbu k ZP (Mori et al. 1993). Spermie se váže na membránu vajíčka v oblasti mikrovilli svým ekvatoriálním segmentem (Yanagimachi 1994). Jedním z proteinů nacházejících se v ekvatoriální oblasti je ekvatorin, antigen MN9 (Manandhar & Toshimori 2001), blokováním ekvatorinu protilátkou

bylo zabráněno oplození, spermie nebyla schopná fúze s oolemou vajíčka (Toshimori et al. 1998; Yoshida et al. 2010).

1.4.1. Izumo

Prokázaným esenciálním proteinem fúze spermie s vajíčkem je protein Izumo, který byl poprvé detekován myší monoklonální protilátkou OBF13 (Okabe et al. 1987). Izumo je membránový protein s extracelulární imunoglobulinovou doménou s konzervativní N-glykosylovanou oblastí (Asn 204), patří do imunoglobulinové rodiny proteinů typu I (Inoue et al. 2005). Pomocí transgenní myší linie s expresí neglykosylovaného Izumo (N204Q-Izumo) proteinu bylo zjištěno, že tato N-glykosylace není esenciální pro správný průběh fúze zprostředkované Izumo, její hlavní funkcí je pravděpodobně ochrana Izumo před jeho fragmentací způsobené akrozomálními proteázami během maturace spermií v *cauda epididymis* (Inoue et al. 2008). Protein Izumo byl detekován u myši i člověka o molekulové hmotnosti 56,4 kDa (myš) a 37,2 kDa (člověk). Izumo nebyl nalezen na povrchu spermií, což dokazuje, že savčí spermie po ejakulaci jsou schopné oplození pouze po uskutečnění AR. Izumo je možné detekovat na povrchu spermie po AR (Inoue et al. 2005), protože je lokalizován na akrozomální membráně, skrytý pod plazmatickou membránou a je proto přístupný až po AR, podobně jako protein CD46 (obr. 7A).



Obr. 7. Schematické znázornění lokalizace Izumo1 a tří rozdílných oblastí hlavičky spermie myši (Satouh et al. 2012). Izumo1 (červená) je lokalizován na vnitřní (IAM) a vnější (OAM) akrozomální membráně, oblast akrozómu je značena zeleně (A). Hlavička spermie znázorněná pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu (B). Akrozomální čepička (AC), ekvatoriální segment (EQ), postakrozomální region (PA).

Pokusy *in vitro* ukázaly, že Izumo knock-out myši byly zdraví, ale samci byli neplodní. Produkovali však normální spermie, které se byly schopné vázat a projít přes ZP,

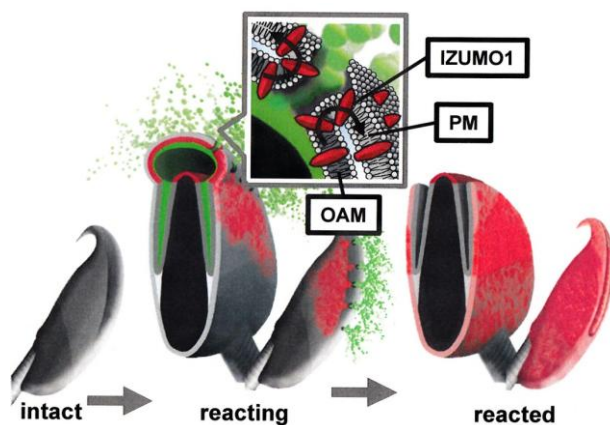
avšak nebyly schopné fúze s vajíčkem. Na druhou stranu disrupce Izumo nezpůsobuje žádné defekty v migraci spermií do oviduktu, a také nedochází ke snížení jejich motility (Inoue et al. 2005).

Později byly detekovány proteiny s N-terminální doménou s významnou homologií s N-terminální doménou proteinu Izumo. Tato oblast byla nazvána Izumo doména a detekované proteiny nazvány Izumo 2, Izumo 3, Izumo 4 a původní Izumo 1 byly poprvé popsány jako proteinová rodina (Ellerman et al. 2009). Izumo 1-3 patří mezi transmembránové proteiny exprimované v *testis*, Izumo 4 postrádá transmembránovou doménu, je to protein rozpustný a jeho exprese je specifická ne jen v *testis*, ale i jiných tkáních. Izumo 1 asociuje s jinými ne-Izumo proteiny a předpokládá se, že je součástí multiproteinového membránového komplexu. Ukazuje se možnost, že Izumo 1 hraje důležitou roli ve fúzi gamet díky organizaci a stabilizaci tohoto molekulárního komplexu na vnitřní akrozomální membráně spermie, jeho absence ruší tuto stabilizaci, která je pro fúzi spermie-vajíčko nezbytná (Ellerman et al. 2009). U myši byl protein Izumo 1 detekován nejen o molekulové hmotnosti 56 kDa, ale také 60 kDa, která byla identifikována jako fosforylovaná forma 56 kDa Izumo 1. Izumo 3 a 4 byly detekovány ve dvou různých formách. Předpokládá se, že tyto dvě formy představují různé varianty sestříhu. Detekce exprese Izumo proteinů ukázala, že po AR zůstávají v nezměněné formě zastoupeny obě formy Izumo 3 a Izumo 1 (56 kDa), ale u Izumo 4 a Izumo 1 (60 kDa) bylo detekováno snížení jejich exprese. Ztráta exprese 60 kDa Izumo 1 je vysvětlována odloučením vnější akrozomální membrány během AR.

Uvolnění cholesterolu z plazmatické membrány spermie může ovlivnit rozlohu i pohyb mikrodomén lipidových raftů na povrchu spermie (Shadan et al. 2004; Sleight et al. 2005; Bou Khail et al. 2006). Mezi proteiny asociované s rafty byl identifikován také Izumo a to v akrozomální čepičce spolu s proteiny kalveolin 2 a flotillin 2. Imunofluorescenční detekce ukázala, že po AR je naopak Izumo 1 detekován podél celé hlavičky spermie, dosahující post a para-akrozomální oblasti (Miranda et al. 2009).

Po úspěšně proběhlé AR je modifikováno proteinové složení ekvatoriálního segmentu a postakrozomálního regionu hlavičky spermie. Předpokládá se, že k dynamické relokizaci proteinů dochází na konci kapacitace a během AR (Sosnik et al. 2009), (obr.8). Aby mohlo dojít k úspěšné fúzi spermie s vajíčkem, protein Izumo musí být relokizován z oblasti akrozomální membrány do oblasti ekvatoriálního segmentu a postakrozomálního regionu hlavičky spermie (Inoue et al. 2005; Sosnik et al. 2009), (obr 7B). Změna pozice Izumo byla

již dříve pozorována, ale nikdy nebyla dána do souvislosti s relokací probíhající během AR (Okabe et al. 1987; Inoue et al. 2005).



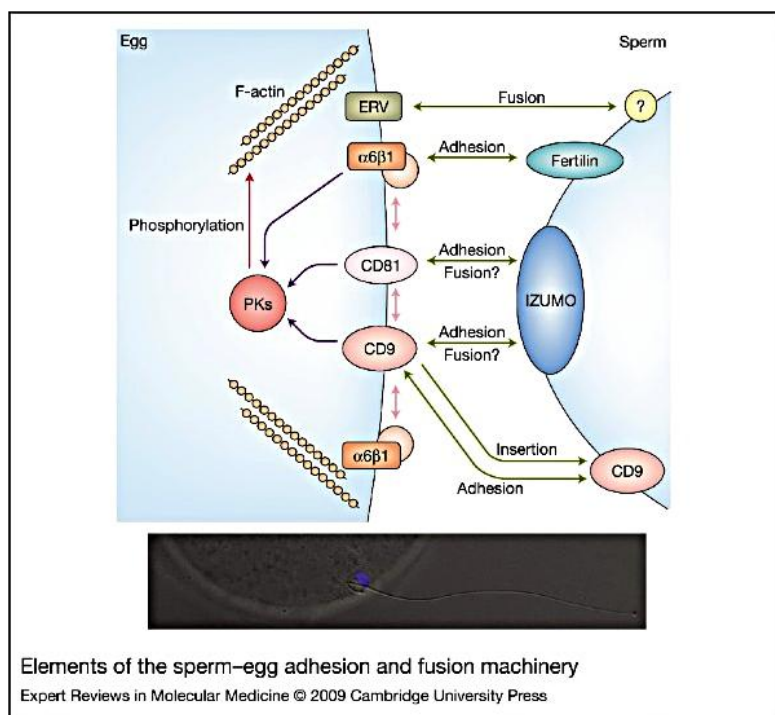
Obr. 8. Schematické znázornění relokace Izumo z vnější akrozomální membrány do plazmatické membrány hlavičky spermie myši (Satouh et al. 2012). Izumo 1 (červená), oblast akrozómu (zelená).

Jednou z kináz, které se účastní diferenciací zárodečných buněk v *testis* a ovlivňuje také funkci spermie je rodina *testis* specifických kináz (Tssk), (Bielke et al. 1994; Visconti et al. 2001). Členem Tssk rodiny proteinů je Tssk6, která je exprimována postmeioticky v samčích zárodečných buňkách. Spermie Tssk6 knock-out samců u myši vykazovali defekt v oplození, nebyly schopné fúze s oolemou vajíčka. Zároveň Izumo, protein nezbytný pro fúzi gamet, nebyl schopen změnit svou lokalizaci po AR, zůstal lokalizován v anteriorní oblasti hlavičky spermie (Sosnik et al. 2009). Jak je psáno výše, aktinová polymerace koreluje s kapacitací a depolymerace aktinu je nezbytná pro AR. Aktinová polymerace hraje důležitou roli také pro uskutečnění relokace Izumo během AR. Pokud byla provedena inhibice polymerace aktinu, došlo k porušení relokace Izumo související s AR, což znamená, že relokace Izumo je zprostředkována pomocí aktinového cytoskeletu a je závislá na aktivitě Tssk6 kinázy. Z výsledků vyplývá, že Tssk6 je nezbytná pro udržení strukturální integrity spermie a hraje roli v regulaci dynamiky aktinového cytoskeletu. Tssk se účastní přímo i nepřímo redistribuce Izumo a tato relokace může být potřebná pro fúzi spermie s vajíčkem. Tssk6 a aktinový cytoskelet hrají hlavní úlohu v relokaci Izumo do fúzogenní oblasti hlavičky spermie (Sosnik et al. 2009). Předpokládá se, že v závislosti na druhu, spermie fúzují s vajíčkem oblastí ekvatoriálního segmentu a/nebo postakrozomálního regionu (Yanagimachi 1994). Relokace Izumo proteinu do těchto oblastí hlavičky spermie myši je pro fúzi gamet

nezbytná (Inoue et al. 2011). Do oblasti ekvatoriálního segmentu je relokalizováno více proteinů, jejich lokalizace ale nedosahuje postakrozomálního segmentu (Rochwerger & Cuasnicu 1992) a žádný z těchto proteinů nebyl nalezen jako esenciální pro fúzi gamet.

1.4.2. CD9, CD81

Interakce a fúze spermie s vajíčkem se účastní více proteinů či proteinových komplexů, avšak kromě možného zapojení dvou pro fúzi esenciálních proteinů CD9 na vajíčku a Izumo na spermii, tento mechanismus fúze zůstává stále neznámý (obr. 9). Jedním z dalších potenciálních receptorů spermie účastnících se fúze, je CD9 tetraspanin, který interaguje s ostatními tetraspaniny a integriny. Monoklonální protilátka proti CD9 inhibuje vazbu spermie k plazmatické membráně vajíčka, a také fúzi. CD9 interaguje s $\beta 1$ i s $\alpha 6\beta 1$ integriny na membráně vajíčka. Tato vazba je během fúze podporovaná β fertilinem (ADAM 2) a $\alpha 6\beta 1$ integriny (Chen et al. 1999), (obr. 9). Studie ukázaly, že CD9 knock-out samice myši byly zdravé, ale byly sterilní, vajíčka nebyly schopny fúze se spermii. CD9 se tak stal zásadním proteinem pro fúzi spermie-vajíčko, a v tomto procesu je pravděpodobně navíc asociován s $\alpha 6\beta 1$ integriny (Miyado et al. 2000; Kaji et al. 2000; Le Naour et al. 2000).



Obr. 9. Pravděpodobný mechanismus adheze a fúze spermie s vajíčkem (Sutovsky 2009).

Během oplození vajíček CD9 knock-out samice, spermie po průchodu ZP zůstávají akumulovány v perivitellinním prostoru, k fúzi nedochází (Inoue et al. 2007). Recentní studie ukazují, že CD9 je při fúzi gamet transklovován na povrch spermie což vysvětluje Miyado et al. 2008 tím, že fúze spermie s vajíčkem je zprostředkována vezikly, obsahující CD9, které jsou před oplozením uvolňovány z vajíčka, interagují se spermií v perivitellinním prostoru a usnadňují schopnost fúze. Vajíčko CD9 knock-out není schopný fúze, pokud však k tomuto vajíčku bylo přidáno vajíčko WT myši, fúze byla možná, a to zřejmě právě díky vezikulům obsahující CD9 z WT oocyty (Miyado et al. 2008).

CD9 je schopný se vázat přímo ke glykoproteinu PSG17 (glykoprotein specifický pro těhotenství), členu imunoglobulinové nadrodiny (IgSF) shodně jako IZUMO, proto existuje domněnka, že se může vázat i s ostatními členy IgSF spermie (Ellerman et al. 2003). Vzhledem k tomu, že Izumo má Ig doménu je možné, že by se mohl přímo vázat na CD9. Tato přímá vazba zatím, ale nebyla potvrzena a možný zprostředkovatel této vazby, či jiný Izumo vázající receptor na povrchu oolemy je stále předmětem výzkumu.

Další z rodiny tetraspaninů, který je přítomný na povrchu oocyty je tetraspanin CD81. Delece genu CD81 u myši způsobilo 40% redukci plodnosti, způsobené částečnou neschopností vajíčka fúzovat se spermií. Myši s dvojitým knock-out CD9 a CD81 vykazovaly plnou neplodnost ukazující, že CD9 i CD81 hrají komplementární roli v procesu fúze spermie s vajíčkem (Rubinstein et al. 2006).

Do molekulárního procesu vedoucí k fúzi gamet nejsou zapojeny pouze tetraspaniny a integriny, ale také fertiliny, členové ADAMs (proteinová doména obsahující disintegrin a metalloproteinázu) rodiny. Zástupci této rodiny hrají důležitou roli v buněčné adhezi, migraci, proteolýze i signalizaci. Předpokládá se, že se fertilin váže s integriny $\alpha V\beta 3$ nebo $\alpha 6\beta 1$ na povrchu myších vajíček a je nezbytným předpokladem vedoucím k membránové fúzi (Almeida et al. 1995). Dalšími proteiny na povrchu spermie, které během oplození interagují s oolemou jsou na cystein bohaté sekreční proteiny (CRISPs) (Cohen et al. 2007). CRISP1 (sekreční protein 1 bohatý na cystein) knock-out myši jsou fertilní, ale *in vitro* pokusy ukázaly sníženou schopnost průchodu spermií přes ZP a menší procento fúze spermií s oolemou vajíčka (Da Ros et al. 2008).

2 Cíle práce

- Porovnat distribuci cytoskeletu v hlavičce spermie člověka, potkana, křečka a veverky před a po AR.
- Zjistit, zda na myších spermích z *cauda epididymis* je přítomný specifický estrogení receptor β .
- Detekovat účinek přírodních estrogenů (estronu, 17 β -estradiolu, estriolu) a syntetického estrogenu (17 α -ethynylestradiolu) na míru proteinové TyrP v hlavičce spermií myši během kapacitace *in vitro*.
- Použitím SDS-PAGE elektroforézy a Western blotu detekovat množství proteinů prošlých TyrP v lyzátu vzorků celých spermií, které byly ovlivněny vybranými estrogeny.
- Detekovat vliv estrogenních hormonů na schopnost spermií projít CaI indukovanou AR.
- Zjistit *in vivo* efekt vlivu 17 β -estradiolu na schopnost spermií kapacitovat, sledováním hodnot proteinové TyrP v hlavičce spermie z *cauda epididymis*.
- Vyhodnotit změny v kalciové homeostáze související s kapacitací spermií během expozice spermií 17 β -estradiolem.
- Sledovat rozdíly mezi proteinovou TyrP jakož to indikátorem stavu kapacitace a dalšími fyziologickými parametry: hodnotou hladiny 17 β -estradiolu v séru a expresí *Tff1* genu v testikulární tkáni myši.
- Zjistit, zda výsledky *in vitro* pokusů korelují s výsledkem *in vivo* účinků estrogenů na reprodukční schopnost myši a míru proteinové TyrP u spermií.
- Zhodnotit, zda relokalizace Izumo probíhá během kapacitace ještě před uskutečněním AR.
- Detekovat, zda k relokalizaci Izumo dochází během spontánní AR a jak vypadá časové rozvržení procesu této relokalizaci v průběhu kapacitace spermií.
- Zhodnotit, zda existuje souvislost mezi relokalizací Izumo a promiskuitním chováním myši vzhledem k míře spontánní AR u příslušných druhů.
- Zjistit, zda jsou detekovatelné rozdíly mezi skupinou spermií schopných projít pouze spontánní AR a skupinou, která je ovlivněna přidáním vnějších induktorů AR, CaI nebo progesteronu.
- Statisticky zhodnotit proces relokalizace Izumo v různých časech kapacitace.

3 Diskuse k publikacím

Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization.

Dvorakova K, Moore HD, Sebkova N & Palecek J. Reproduction. 2005 130, 61-9. doi: 10.1530/rep.1.00549. IF: 3,136

Cytoskeletální proteiny ovlivňují funkci hlavičky i bičíku spermie související s procesem kapacitace, AR i fúze spermie s oolemou vajíčka. Práce studovala pomocí fluorescenční detekce lokalizaci hlavních tří komponent cytoskeletu (aktinu, tubulinu a spektrinu) v hlavičce savčích spermií před a po AR. Pro práci byly vybrány spermie lidské a spermie tří hlodavců (křečka, potkana a veverky) reprezentující odlišnou morfologii hlavičky savčí spermie.

Morfologie hlaviček savčích spermií se výrazně liší jejich tvarem a základními znaky (Eddy & O'Brien 1994). Tvar a velikost hlavičky spermie se může lišit, přesto vždy zůstávají shodně přítomné základní funkční části hlavičky spermie, jako je apikální akrozóm, ekvatoriální segment i postakrozomální region. Cytoskelet spermie tvoří jak stabilní struktury, tak dynamické struktury. Zejména aktinový cytoskelet se podílí na signálních drahách závislých na TyrP specifických proteinů, regulující například proces AR (Brener et al. 2003; Breitbart et al. 2005; Bernabò et al. 2011) i přípravu spermie k oplození, kde se aktinový cytoskelet účastní procesu relokace proteinu Izumo, nezbytného proteinu pro fúzi spermie s vajíčkem (Sosnik et al. 2009).

Vybrané druhy spermií byly značeny protilátkami proti G a F-aktinu, spektrinu a α -tubulinu před a po AR, která byla indukovaná pomocí CaI. Oblast akrozómu byla značena PNA lektinem (lektin z podzemnice olejné). Výsledky pokusu prokázaly změny v lokalizaci vybraných proteinů cytoskeletu během AR a to zejména v oblasti apikálního akrozómu, ekvatoriálním segmentu i v postakrozomálním regionu hlavičky spermie.

Detekce aktinu, ukazovala před AR velké podobnosti ve značení tohoto proteinu u všech vybraných zástupců. Před AR byl u hlaviček spermií všech zástupců G i F-aktin detekován v celé oblasti apikálního akrozómu, a to i mezi plazmatickou a vnější akrozomální membránou, ale také mezi vnitřní akrozomální membránou a jadernou membránou. Avšak na rozdíl od detekce pouze F-aktinu, který byl detekován pomocí faloidinu, byl signál jasně omezen na oblast akrozómu. Tento rozdíl lze vysvětlit zásobou G-aktinu lokalizované mezi

plazmatickou membránou a akrozomální membránou, která není faloidinem detekovaná. Tento G-aktin je v průběhu kapacitace polymerizován.

Slabý signál byl detekován také v oblasti ekvatoriálního segmentu a postakrozomálního regionu, silnější však u spermie veverky. Po AR došlo u všech zástupců k výraznému snížení či zániku signálu v oblasti apikálního akrozómu. Aktin zůstává nebo je silněji detekován v ekvatoriální a postakrozomální oblasti, nejsilněji však u spermie člověka a veverky, zároveň zůstává lokalizován pod vnitřní akrozomální membránou. Výsledky získané z detekce pomocí polyklonální protilátky proti G a F-aktinu a faloidinu se i zde nepatrně lišily. Detekce pomocí faloidinu, značící specificky pouze F-aktin ukázala, že distribuce aktinu byla u spermií lidských a křečka v oblasti postakrozomálního regionu před AR mnohem slabší než po AR. V postakrozomální oblasti nebyl na rozdíl od ostatních druhů spermií F-aktin silněji detekován u spermií hlodavců. V oblasti mezi plazmatickou a vnější akrozomální membránou je F-aktin velice důležitou bariérou bránící předčasné AR, jeho depolymerace vede k AR. Tyto změny jsou nejlépe vidět díky masivnímu akrozómu u spermie veverky. Celkové výsledky ukazují, že aktin neslouží pouze jako cytoskeletální protein určující tvar hlavičky spermie, ale hraje také důležitou roli v procesech před oplozením. Tyto předchozí domněnky se později skutečně potvrdily, aktin je nezbytný pro proces AR a pro relokizaci proteinů, které se účastní fúze spermie s vajíčkem, do fúzogenních oblastí hlavičky spermie.

Detekce spektrinu ukázala, že tento protein byl u vzorků kontrol i po AR lokalizovaný podobně jako aktin, s výjimkou lidských spermií před AR, kde byl detekován shodný signál pouze v oblasti ekvatoriálního segmentu a apikální perinukleární théky. U všech zástupců s výjimkou spermie veverky, lokalizace spektrinu byla po AR podobná lokalizaci aktinu, spektrin byl detekován silně v ekvatoriální oblasti a velmi silně také v postakrozomálním regionu hlavičky spermie. U kontrolních vzorků spermie veverky byl na rozdíl od aktinu detekován pouze slabý pás v ekvatoriální oblasti, po AR byla lokalizována také postakrozomální oblast. Paraakrozomální oblast byla u potkana a křečka výrazně značena před i po AR. Relokizace spektrinu po AR souvisí pravděpodobně s jeho rolí ve stabilizaci ekvatoriálního segmentu, předpokládá se také jeho role během fúze spermie s vajíčkem (Yagi & Paranko 1995). Může se účastnit také procesu kapacitace a AR v komplexu s kalmodulinem (Virtanen et al. 1984). V průběhu pokusu byla také zjišťována vzájemná kolokalizace spektrinu a F-aktinu. Použitím dvojitého imunofluorescenčního barvení byla provedena detekce kolokalizace na spermiích všech vybraných druhů. Pokus potvrdil

vzájemnou lokalizaci spektrinu a F-aktinu. Detekce na lidských spermiích potvrdila kolokalizaci spektrinu a F-aktinu před AR v ekvatoriálním segmentu a v oblasti apikální perinukleární théky. V akrozomální oblasti nebyl spektrin detekován, proto zde nebyla ani pozitivní kolokalizace. Kolokalizace spektrinu a F-aktinu byla potvrzena také u kontrolních spermií potkana, kde byla pozitivní ve všech částech hlavičky spermie.

I když byla přítomnost tubulinu ve zralých spermiích již popsána (Dvorakova et al. 2001; Peknicova et al. 2001), vzhledem k rozmanitosti tubulinové rodiny dosud chybí pokrytí změn v lokalizaci proteinu po AR související s oplozením. V lokalizaci α -tubulinu byly mezi jednotlivými zástupci spermií detekovány zjevné rozdíly oproti ostatním cytoskeletálním proteinům, což naznačuje, že tyto rozdíly mohou mít vztah k morfologii i funkci spermií. U kontrolních vzorků spermií křečka a veverky byla detekce α -tubulinu nejvíce podobná lokalizaci aktinu i spektrinu. U těchto spermií byl před AR α -tubulin nejvíce lokalizován v apikální akrozomální oblasti. Po AR zůstala pozitivní pouze postakrozomální oblast. Tubulin v kortikální oblasti může vytvářet síť, která byla detekována v kortexu spermatocytů, kde pomáhá tvorbě akrozómu z jednotlivých váček Golgiho komplexu (Moreno & Schatten 2000). Tyto mikrotubuly zde patrně přetrvávají i ve zralých spermiích. Odlišná lokalizace v porovnání s ostatními cytoskeletálními proteiny byla zjištěna u lidských kontrolních spermií a spermií potkana, kde nebyla detekována oblast akrozómu. U kontrolních lidských spermií vykazovala detekce pozitivní efekt v oblasti ekvatoriálního segmentu i postakrozomálního regionu, mnohem silnější než po AR. U spermií potkana a zejména křečka byl α -tubulin po AR lokalizován v postakrozomálním regionu, zde byla dobře patrná dorzální a ventrální lokalizace tohoto proteinu. Oblast ekvatoriálního segmentu zůstala beze změny u všech zástupců, po AR bylo pouze vidět její o trochu silnější detekce.

Pro pokus byly vybrány skupiny organismů, jejichž hlavičky spermie se morfologicky liší. Cílem této práce bylo zjistit, jak se liší lokalizace vybraných cytoskeletálních proteinů mezi jednotlivými funkčními strukturami hlavičky spermie a zda se budou ve výsledku výrazně lišit zástupci spermií s jejich odlišnou morfologií. Funkce cytoskeletálních složek zůstává stále nejasná, nejlépe prozkoumaná je funkce aktinového cytoskeletu. Je známá především důležitá funkce F-aktinu během procesu kapacitace, kde působí jako ochranná bariéra proti předčasné fúzi vnější akrozomální membrány a plazmatické membrány. Přeměna F-aktinu v G-aktin je naopak jedním z nezbytných kroků pro uskutečnění AR (Brener et al. 2003; Breitbart et al. 2005). Detekci v kortikální paraakrozomální oblasti falciformních (háčkovitých) hlaviček spermie potvrdily také tyto pokusy. F-aktin hraje nezbytnou úlohu

v relokizaci proteinu Izumo do oblasti hlavičky spermie, kde probíhá fúze spermie s vajíčkem a pro tuto fúzi je zde nezbytný (Sosnik et al. 2009). Detekovaná lokalizace aktinového cytoskeletu skutečně ukazuje možnost jeho funkce jak v oblasti akrozomální, tak i v ekvatoriální a postakrozomální. Při studiu obsahu akrozómu morčete byly detekovány cytoskeletální proteiny F-aktin, spektrin, myozin, kalmodulin, a gelsolin (Zepeda-Bastida et al. 2011). Akrozomální matrix je vysoce organizovaný a řízené uvolňování lytických enzymů je organizováno právě pomocí těchto cytoskeletálních struktur.

Detekce vybraných cytoskeletálních proteinů byla často mezi různými typy hlaviček spermii odlišná, avšak jejich lokalizace ukazuje také četné shody, zejména v průběhu AR. Tyto výsledky podpořily možnost jejich funkce pro proces oplození, které byly také později dokázané (Sosnik et al. 2009). Cytoskeletální proteiny hrají stěžejní roli v procesu AR, ale také při přípravě spermie na oplození, a nikoliv pouze v udržování specifické morfologie hlavičky. Funkce tubulinu byla dokázané také detekcí β -tubulinu u lidských spermii, jehož změny v detekci vykazovaly spermie s patologickým spermioqramem (Peknicova et al. 2007).

The slower the better: how sperm capacitation and acrosome reaction is modified in the presence of estrogens.

Sebkova N, Cerna M, Ded L, Peknicova J & Dvorakova-Hortova K.

Reproduction. 2012 143, 297-307. doi: 10.1530/REP-11-0326. IF: 3,090

Tato studie řeší otázku, zda zvýšené koncentrace vybraných estrogenů mají vliv na kapacitaci a AR myších spermií, a tedy zda mohou být rizikem a ovlivnit mechanismy vedoucí ke schopnosti spermií oplodnit vajíčko.

Povrchové vody jsou rezervoárem mnoha chemikálií, které jsou výsledkem produkce člověka. Zejména farmaceutické produkty mohou být nebezpečným zdrojem látek, které negativně působí na živé organismy. Tyto látky se nacházejí také v pitné vodě v koncentracích sice velice malých (ng/l, lokálně i mnohem více), avšak při dlouhodobé expozici dochází k rozdílným negativním vlivům na životní prostředí, na organismy i na člověka. Tyto látky, které mohou ovlivňovat životní funkce organismů, jsou nazývány endogenními disruptory a patří mezi ně přírodní či syntetické estrogeny, které se dostávají do povrchových vod a dále do čističek vod, kde se pouze částečně zachycují v čistírenských kalech, a proto část zůstává v pitné vodě. Dosud používané technologie čištění odpadních vod nejsou dostatečně účinné a nezabraňují další kontaminaci vod (Kusk et al. 2011). Vzhledem k tomu, že se kaly často používají zejména v zemědělství, i zde představují další riziko pro přírodní prostředí. Estrogeny se zde váží na jílovité částičky půdy i na organickou část půdy a mohou být uvolněny opět do povrchových, ale i podzemních zásob vod. Negativní vliv rostoucí koncentrace estrogenů v přírodním prostředí je patrný zejména na zvýšení reprodukčních abnormalit i při extrémně nízké koncentraci ng/l (Storgaard et al. 2006). Bylo prokázáno, že tyto látky mohou působit na reprodukční parametry jak v samčím, tak v samičím organismu (Kilian et al. 2007; Mandrup et al. 2012; Quignot et al. 2012).

Estrogeny byly dlouho považovány pouze za samičí hormony, hrají však důležitou roli také v samčím reprodukčním traktu. Je dokázáno, že testosteron a androstenedione jsou v *testis* prekurzory pro syntézu 17 β -estradiolu a estronu, která je umožněna díky přítomnosti enzymu cytochrom P450 aromatáza. Další změny estrogenů probíhají v játrech, kde dochází k přeměně estronu na estriol. Tyto estrogeny jsou tedy produkovány také u samců a podílejí se na regulaci jejich reprodukčních parametrů (Broeder et al. 2000).

Většina koncentrací estrogenů, které byly použity v práci, odpovídají fyziologickým hodnotám koncentrací estrogenů u myši. Nejnižší koncentrace je shodná s koncentrací estrogenů v krevní plasmě, druhá odpovídá koncentraci v *rete testis* a třetí koncentraci se shoduje s koncentrací estrogenů v ovariální tekutině. Pro účely pokusu jsme zvolili dále dvě vyšší koncentrace, než jsou maximální koncentrace estrogenů, které byly naměřeny u myši.

Jak již bylo zmíněno v úvodu, estrogeny aktivují estrogení receptory zejména na plazmatické membráně spermie a tím spouštějí celou řadu signálních drah vedoucích ke kapacitaci a schopnosti spermie oplodnit vajíčko. ER α i ER β byly nalezeny u mnoha druhů organismů. Přítomnost ER β byla potvrzena u spermií člověka (Aquila et al. 2004), kance (Mutembei et al. 2004), králíka (Kwon et al. 1995) i potkana (Pellettier et al. 2000). Použitím imunofluorescenčního značení monoklonální protilátkou byl v této práci poprvé detekován ER β i na myších spermiích (BALB/c). Receptor byl lokalizován v apikální oblasti hlavičky spermie v podobě tenkého srpku. Zároveň tato specifická imunofluorescence pokrývá i oblast apikálního háčku. Přítomnost ER β na myších spermiích byla dále potvrzena pomocí chemiluminiscenční detekce za použití celého lyzátu spermií z *cauda epididymis*. ER β byl označen jako protein o molekulové hmotnosti 64 kDa.

Dalším úkolem této práce bylo detekovat vliv vybraných estrogenů na průběh kapacitace a indukované AR myších spermií. Spermie odebrané z *cauda epididymis* byly ponechány kapacitovat v přítomnosti různých koncentrací (0,02; 0,2; 2; 20; 200 ng/ml) přírodních estrogenů - estronu, 17 β -estradiolu, estriolu a syntetického estrogenu - 17 α -ethynylestradiolu v kapacitačním médiu po dobu 0, 30, 60, 90 a 120 minut. Odebrané spermie byly analyzovány pomocí monoklonální protilátky na přítomnost TyrP v hlavičce spermie. TyrP byla detekována jako kompaktní imunofluorescenční signál lokalizovaný v apikální oblasti akrozomálního regionu hlavičky spermie. Data počtu spermií procházejících TyrP v hlavičce spermie a AR byla statisticky vyhodnocena.

Z výsledků vyplývá, že všechny výše zmíněné estrogeny zvyšují počet spermií pozitivních na TyrP v hlavičce spermie během procesu kapacitace. Toto zvýšení se projevuje jak v počátečních časech kapacitace 30 a 60 min, tak i v časech 90 a 120 minut. Rozdíl mezi vybranými estrogeny je patrný také odlišným vlivem jejich koncentrací. Vyšší koncentrace, zejména 200 a 20 ng/ml estronu, 17 β -estradiolu a 17 α -ethynylestradiolu výrazně zvyšují míru TyrP. Odlišně působí estriol, který vykazuje zvýšení TyrP zejména při nízkých koncentracích 0,02; 0,2 a 2 ng/ml.

Se zvyšující se koncentrací 17 β -estradiolu oproti kontrolním vzorkům vzrůstá procento spermií pozitivních na TyrP v hlavičce spermie. Koncentrace 0,2 a 2 ng/ml zvyšuje TyrP zejména ve 30 minutách kapacitace, u koncentrací 20 a 200 ng/ml je výrazně zvýšena míra TyrP zejména od času 30 minut až po 90 minut kapacitace. Téměř shodný vliv vykazuje také působení estronu. Zejména obě nejvyšší koncentrace 20 a 200 ng/ml 17 α -ethynylestradiolu výrazně ovlivnily dráhy vedoucí ke kapacitaci v časech od 30 minut až do 120 minut kapacitace. Tento estrogen nejdéle ovlivňoval procesy v hlavičce spermie. Proces TyrP a kapacitace spermií neprobíhá synchronně (Stewart-Savage 1993), proto také počet spermií pozitivních na TyrP během inkubace náhle neroste, ale zůstává poměrně nízký a stálý.

Procento kontrolních spermií pozitivních na TyrP v hlavičce spermie v tomto experimentu dosahuje hodnot 8-12%, oproti experimentální skupině spermií, kde TyrP stoupá na hodnoty 18%. Tyto výsledky korelují s nedávnými studiemi, které ukazují procenta TyrP v hlavičkách spermií během kapacitace a dosahují hodnot 9% (Asquith et al. 2004). Celková TyrP populace spermií je menší než 15%. Avšak 90-100% těchto spermií mají schopnost vazby k ZP. Pouze tyto spermie (15%) jsou určeny k rozpoznání a vazbě ZP (Asquith et al. 2004).

Zvýšené hodnoty TyrP po ovlivnění spermií estrogeny, byly detekovány také pomocí SDS-PAGE elektroforézy a následným western blotem a chemiluminiscenční detekcí. Pro detekci byl použit lyzát celých spermií, které byly předem inkubovány v přítomnosti stejných koncentrací estrogenů a po stejnou dobu jako v předchozím pokusu. Výsledky ukazují časově závislé zvýšení TyrP proteinů o molekulové hmotnosti 40 až 120 kDa. TyrP dosahuje maximálních hodnot kolem 90-120 minut kapacitace. V tomto čase inkubované spermie procházejí kompletním procesem kapacitace a tyto spermie jsou schopné projít AR a oplodnit vajíčko. Z výsledků je patrné, že se zvyšující se koncentrací estrogenů dochází ke zvýšení počtu proteinů, které jsou fosforylované na tyrozinových postranních zbytcích. Počet těchto proteinů je zvýšen také u nižších koncentrací (0,02 a 0,2 ng/ml), zejména u 17 β -estradiolu, estronu a estriolu. Hodnoty TyrP zde nezobrazují pouze TyrP v hlavičce spermie, ale také TyrP v oblasti bičíku, která koreluje se stavem hyperaktivace spermie, nezbytné pro oplození vajíčka.

Za účelem pozorování účinku vybraných estrogenů na kapacitaci spermií, byla studována jejich schopnost projít indukovanou AR pomocí CaI. Vzhledem k získaným výsledkům z ovlivnění TyrP bylo očekáváno také zvýšení počtu spermií procházející AR.

Výsledky tohoto pokusu však ukázaly, že estrogény výrazně snížily procento spermií, které byly schopné podstoupit AR. Přírodní estrogény estriol, estron a 17 β -estradiol vykazovaly velice podobný efekt ovlivnění AR spermií. Tyto estrogény výrazně snížily procento spermií procházející AR v čase 30 minut kapacitace s navazující inkubací s CaI 5 minut. Koncentracemi, způsobující tento efekt se některé tyto estrony lišily. Zejména tři nejvyšší koncentrace 200; 20 a 2 ng/ml u 17 β -estradiolu a estronu ovlivňovaly AR, u estriolu tři nižší koncentrace 0,02; 0,2 a 2 ng/ml. Tři největší koncentrace 17 α -ethynylestradiolu snižovaly indukovanou AR zejména v časech 30 a 60 min kapacitace po následné indukci AR 60 minut. Uvedené výsledky ukazují, že estrogény zvyšují TyrP spermií, nicméně každý estrogen může vyvolat odezvu různé síly s ohledem na jeho koncentraci a také čas kapacitace. Rozdílná estrogení odpověď může být způsobena tím, že estrogény aktivují různé typy nebo části signálních drah nebo mohou vázat a aktivovat různé receptory, které spouští dráhy vedoucí k proteinové TyrP spermií během procesu kapacitace. Každý z estrogenů se pravděpodobně chová odlišně, jejich účinek není shodný.

Signální dráhy vedou od TyrP k aktivaci aktinové polymerace, která zabraňuje předčasné fúzi plazmatické membrány s vnější akrozomální membránou, vedoucí k AR. Pokud působením estrogenů dojde ke zvýšení TyrP, dochází pravděpodobně k silnější stimulaci aktinové polymerace, výsledkem je neschopnost aktinových filament depolymerace a dochází k blokování AR (Brener et al. 2003). Pokud jsou nadměrným množstvím estrogenů estrogení receptory hyperstimulovány, je zvýšena aktivita tyrozinkináz, TyrP zůstává spuštěna. Tím dochází k dlouhodobé aktivaci PLD a polymeraci aktinu (Breitbart et al. 2005). Během AR, aktivita PLC zvyšuje koncentraci intracelulárních Ca²⁺, vedoucí k depolymeraci aktinu. Pokud však PLD zůstane aktivována přetrvávající stimulací estrogeních receptorů a tyrozinkináz, aktivita PKC může být zpožděna a depolymerace aktinu zpomalena. Jako podstatné se proto jeví načasování všech na sobě závislých dějů vedoucích ke kapacitaci a AR, ovlivnění po sobě jdoucích událostí může vést ke snížení, či ztrátě schopnosti oplození. Porovnáním výsledků je zřejmé, že každý z vybraných estrogenů ovlivňuje hlavní znaky kapacitace, kterými jsou TyrP a navazující proces AR. Zvyšující se koncentrace estrogenů v životním prostředí může měnit mechanismy, které vedou ke schopnosti spermie oplodnit vajíčko, a tím představují možné riziko pro reprodukci organismů.

Na druhé straně, je nicméně možné posuzovat výsledky těchto pokusů ne pouze z hlediska jejich vlivu na životní prostředí, ale také ze strany hormonálních dějů v organismu samotném. Spermie se cestou přes reprodukční trakt samice setkává s různou koncentrací

estrogenů, podobné těm, které byly vybrány v tomto *in vitro* experimentu, a to v závislosti na fázi cyklu. Koncentrace estrogenů je nízká během pre-ovulačních fází, kdy 17β -estradiol je spojený s dlouhověkostí spermií (Mbizvo et al. 1990). Situace se ale mění v době ovulace, kdy koncentrace estrogenů stoupá s uvolňováním folikulární tekutiny (Shaikh 1971). V korelaci s výsledkem pokusu, kapacitace a AR jsou modulovány vyššími koncentracemi estrogenů a ty mohou sloužit jako specifická selekční bariéra spermií, kde inhibiční vliv estrogenů na indukovanou AR může mít fyziologický význam (Vigil et al. 2008). Výsledky experimentu ukazují, že fyziologické koncentrace estrogenů stimulují proces kapacitace, ale na druhou stranu inhibují indukovanou AR. Toto zjištění je možné vysvětlit hypotézou, že estrogeny mohou představovat další mechanismus pro samičí specifický výběr nejlepších spermií pro oplození. Všechna data ukazují průměr hodnot z pěti nezávislých pokusů.

In vivo exposure to 17B-estradiol triggers premature sperm capacitation in cauda epididymis.

Ded L, Sebkova N, Cerna M, Elzeinova F, Dostalova P, Peknicova J & Dvorakova-Hortova K.

Reproduction. 2013 Jan 14, In press, doi: 10.1530/REP-12-0472 IF: 3,090

Vzhledem k tomu, že *in vitro* studie ukázaly výrazný prokapacitační efekt vybraných estrogenů (Sebkova et al. 2012), pro potvrzení tohoto efektu byly provedeny pokusy *in vivo*. Vliv nižších i vyšších koncentrací estrogenů na reprodukční schopnost některých organismů byl prokázán mnoha *in vitro* pokusy (Adeoya-Osiguwa et al. 2003; Ded et al. 2010; Sebkova et al. 2012). Estrogeny mají vliv na signální dráhy spermie, vedoucí k procesu kapacitace a následně k procesům, které vedou k fúzi vnější plazmatické membrány s vnější akrozomální membránou při AR, rovněž umožňují kontakt spermie s kumulárními buňkami či ZP a fúzi s oolemou vajíčka.

Studie ukazují, že vystavení organismů xenoestrogeny (bisphenol-A, diethylstilbestrol, vinclozolin) či fytoestrogeny (genistein, resveratrol), které jsou kumulované v přírodním prostředí, může vést k ovlivnění schopnosti spermií oplození (Akingbemi 2005; Peknicova et al. 2002; Kyselova et al. 2003, 2004; Elzeinova et al. 2008; Gong & Han 2006; Nakamura et al. 2010). Negativní účinky mohou mít látky, které používá člověk k ochraně rostlin, jako například pesticidy i herbicidy (Pina-Guzman et al. 2009; Victor-Costa et al. 2010), které podobně jako estrogeny mohou ovlivňovat morfologii a funkci *testis*, tím ovlivňovat spermatogenezi a oplození. Tyto látky působí přes estrogení receptory a ovlivňují negenomově aktivované signální dráhy.

Tato práce se zabývá *in vivo* efektem 17 β -estradiolu na průběh kapacitace, zejména sledováním vlivu tohoto estrogenu na stimulaci TyrP. Byl sledován také vliv tohoto estrogenu na změny v *Tff1* genové expresi, který je znakem aktivity ER α .

V celém pokusu bylo použito 24 inbredních myší, v každé experimentální skupině byly analyzovány spermie získané z 16 *cauda epididymis* (celkem 8 jedinců). Jedna skupina samců byla vystavena vybrané koncentraci 20 ng/ml 17 β -estradiolu v období během puberty od 4. do 7. týdne věku (Pubertální skupina). Druhá skupina samců byla vystavena kontinuálnímu ovlivnění 17 β -estradiolem (shodné koncentrace 20 ng/ml) v čase od narození do 12. týdne věku (Kontinuální skupina). Zároveň byla připravena kontrolní skupina samců,

kteří nebyli vystaveni vlivu estrogenu. Této skupině bylo podáváno krmivo a voda bez přítomnosti estrogenů. Pro následné analýzy byly použity tkáně a spermie samců ve věku 12. týdnů, kdy všechna experimentální zvířata byla usmrcena.

Spermie, používané pro detekci TyrP byly odebírány v průběhu kapacitace v časech 0; 30; 60; 90 a 120 minut. Počet spermií pozitivních na TyrP byl vyšší oproti kontrolní skupině u obou experimentálních skupin. Největší rozdíl v míře TyrP oproti kontrolní skupině samečů vykazovala Kontinuální skupina, u které byl naměřen statisticky největší rozdíl v hodnotách v porovnání s dalšími skupinami. Pubertální skupina vykazovala také vyšší míru TyrP oproti kontrolní skupině, nižší však oproti skupině Kontinuální. Nevyšších hodnot TyrP vykazovaly skupiny v čase 90 minut kapacitace. Rozdíl mezi experimentálními skupinami byl patrný již v minimálním čase inkubace spermií, v dalších časech inkubace se tento rozdíl nepatrně zvyšoval, trend nárůstu TyrP zůstává. Hodnoty TyrP byly detekovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy a western blotu a chemiluminiscenční detekce. Výsledky ukazují rozdíly v proteinové detekci TyrP mezi kontrolní skupinou a experimentálními skupinami. Největší rozdíly vykazovala opět skupina Kontinuální s největším množstvím proteinů pozitivních na TyrP, a to zejména ve skupině proteinů molekulové hmotnosti od 45 kDa do 68 kDa. Kontrolní skupina vykazovala nejnižší množství detekovaných proteinů na TyrP. Detekce dosahovala nejvyšších hodnot v čase 90 a 120 minut, kdy kapacitace těchto spermií dosáhla maxima a byla ukončena.

V průběhu kapacitace jsou aktivovány signální dráhy, které zahrnují, mezi jinými, zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Ke stanovení míry TyrP, byl proto proveden další pokus, ve kterém spermie myši byly použity pro chlortetracyklinové (CTC) stanovení množství Ca^{2+} související s kapacitací během které dochází ke změnám hodnot intracelulární koncentrace těchto iontů. Z výsledků byl patrný podobný prokapacitační efekt stanovení CTC jako u detekce míry TyrP. Počet CTC značených spermií byl největší u Kontinuální skupiny, a to ne jen v porovnání s kontrolní skupinou, ale také s Pubertální skupinou. Počet spermií Pubertální skupiny vykazoval rozdíly také oproti kontrolní skupině, i když na rozdíl od Kontinuální skupiny nebyl tak vysoký.

Dalším stanovením, které indikuje změny stavu kapacitace a také vliv estrogenu na probíhající kapacitaci, byla detekce na estrogenu závislé exprese *Tff1* genu. Zároveň byla stanovena míra koncentrace 17β -estradiolu v myším séru. Výsledky ukazují, že míra TyrP, hodnoty koncentrace 17β -estradiolu v séru i míra exprese *Tff1* genu vzájemně korelují. Rozdíl koncentrací estrogenu mezi kontrolní skupinou a Pubertální skupinou nebyl výrazně odlišný,

hodnoty Pubertální skupiny byly sice vyšší, avšak tento rozdíl nebyl statisticky významný. Statisticky rozdílné byly hodnoty koncentrací Kontinuální skupiny oproti ostatním skupinám. Míra exprese *Tff1* genu vykazovala mezi skupinami rozdíly a korelovala také s množstvím spermií pozitivních na TyrP. Na druhou stranu nebyl zjištěn rozdíl v TyrP v hlavičkách spermií v *testis* a *epididymis*.

Pro studie stavu kapacitace je často vybírán přírodní estrogen 17 β -estradiol, jehož účinky byly zjišťovány také v této práci. Stimulační prokapacitační účinek tohoto estrogenu byl detekován *in vitro* také v nedávných studiích (Ded et al. 2010; Sebkova et al. 2012). Výsledky *in vitro* experimentů však nemusí vždy dokazovat naprosto shodný účinek *in vivo*. Z tohoto důvodu byl připraven tento experiment, ve kterém některé postupy jsou provedeny stejně (detekce TyrP), jako v *in vitro* pokusech. Důležitý je také fakt, že kromě experimentálně použité koncentrace estrogenu v tomto pokusu jsou spermie vystaveny také shodným koncentracím estrogenu v *rete testis* i v reprodukčním traktu samice a může v tomto případě docházet k dalším ovlivněním a molekulárním změnám. Tato souvislost je patrná z výše zmíněných experimentů, kdy molekulární změny související s mírou TyrP a CTC korelují s hodnotami 17 β -estradiolu v séru, podobná korelace hodnot byla detekovaná u *Tff1* exprese. Hodnoty TyrP jsou v maximálních časech inkubace nižší, než v předchozím čase, což ukazuje, že molekulární změny v průběhu kapacitace nejsou trvalé a pokud jsou spermie dále vystaveny pouze nižším hodnotám estrogenů, mohou se blížit hodnotám kontrolním. Přes to, že se hodnoty TyrP mezi kontrolní skupinou a Pubertální skupinou významně liší, hodnota 17 β -estradiolu v séru mezi těmito skupinami zůstává stejná. Tento rozdíl je možné vysvětlit tím, že u Pubertální skupiny je hodnota estrogenu shodná, ale může přetrvávat její vyšší koncentrace v reprodukčním traktu a silněji tak ovlivnit proces kapacitace. Tuto teorii potvrzují hodnoty exprese genu *Tff1* Pubertální skupiny.

Jak ukazují výsledky této i nedávné práce (Sebkova et al. 2012), u spermií z *cauda epididymis* estrogeny ovlivňují procesy kapacitace vedoucí k TyrP. Hodnoty TyrP nebyly však v *testis* zvýšené, což ukazuje, že největším změnám podléhá právě příprava spermie k oplození a také možné další ovlivnění spermií v reprodukčním traktu včetně jejich zachycení v reservoáru. Změny ve varlatech týkající se ovlivnění spermatogeneze však nelze vyloučit a může k nim docházet podobně, jako v nedávné studii Miyaso et al. 2012. Změny během kapacitace spermie vedoucí k hyperaktivaci tyrozinkináz vedou však ke snížení schopnosti projít indukovanou AR (Sebkova et al. 2012), mají proto vliv na další osud spermie a mohou vést až ke ztrátě schopnosti k oplození. Na druhé straně, detekce CTC

ukazuje, že tok Ca^{2+} do buňky není porušený, a že spermie je schopna projít AR. Pokud by efekt zvýšené TyrP nebyl trvalý, ale přechodný, spermie by byla schopna oplození. Otázkou zůstává, zda zvýšená koncentrace těchto iontů není předčasná a zda proto špatné načasování procesů vedoucích k přípravě na oplození nemá na schopnost tohoto oplození negativní vliv. Proces zrání spermií i kapacitace není u celé populace spermií synchronní, a proto estrogenní hormony mohou pravděpodobně nerovnoměrně ovlivňovat schopnost přípravy spermie k oplození.

Estrogeny a látky s estrogenní aktivitou ovlivňují více či méně reprodukční parametry spermií. Je však potřeba se na tuto problematiku také podívat komplexně. V životním prostředí se zvyšuje výskyt látek, které mají negativní vliv na organismy i na jejich reprodukční schopnost. I kdyby každá tato látka měla nízký negativní dopad, jejich vysoký počet představuje pro organismy značnou zátěž a současně riziko snížení jejich plodnosti. Jednou z těchto látek je 17β -estradiol, který představuje negativní vliv na reprodukční schopnost spermie, a to zejména prokapacitačním účinkem, předčasným zvýšením TyrP a intracelulární koncentrace vápenatých iontů.

Progress of sperm Izumo relocation during spontaneous acrosome reaction.

Sebkova N, Ded L, Vesela K & Dvorakova-Hortova K

Submitted in PloS One 2013, IF: 4,092

Protein Izumo je transmembránový protein, který je lokalizován na akrozomální membráně hlavičky spermie (Inoue et al. 2005). Během procesu AR je z této membrány relokalizován pomocí aktinového cytoskeletu do celé oblasti hlavičky spermie (Sosnik et al. 2009). Tato relokalizace je nezbytná pro proces oplození (Inoue et al. 2011).

Cílem této práce bylo zjistit, zda k relokalizaci Izumo dochází během fyziologické spontánní AR i myši, či zda k této relokalizaci dochází pouze během indukované AR, u které byla dosud detekovaná. Práce ukazuje, jak vypadá časová závislost této relokalizace v průběhu kapacitace spermií a její vztah k promiskuitnímu chování myši.

V tomto pokusu byly použity spermie myšice malooké (*Apodemus microps*), která se vyznačuje fakultativně promiskuitním chováním (40%), (Bryja & Stopka 2005) a myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) s vysoce promiskuitním chováním (100%), (Bryja et al. 2008). Oba tyto druhy se vyznačují vysokou mírou spontánní AR v porovnání s laboratorním kmenem myši BALB/c (Johnson et al. 2007), který byl použit jako kontrola. Časový průběh změny lokalizace Izumo byl sledován v jednotlivých časech inkubace spermií v kapacitačním médiu (0; 5; 10; 20; 40; 60; 80 a 90 minut). Pro sledování stavu akrozómu, bylo použito jeho značení PNA lektinem. V průběhu pokusu byly hodnoceny spermie, které procházely jednotlivými stádii lokalizace Izumo.

Výsledky pokusů ukazují, že k relokalizaci proteinu Izumo dochází během spontánní AR srovnatelně s AR indukovanou. Před AR zůstává Izumo zakotven v akrozomální membráně. V průběhu a po uskutečnění AR je Izumo postupně relokalizován z oblasti akrozomální membrány přes celou oblast ekvatoriálního segmentu (WES) do oblasti post-akrozomálního regionu a v této finální fázi relokaloizace se Izumo dostává do celé oblasti hlavičky spermie (WSH).

Pokud byly spermie ponechány volně inkubovat v kapacitačním médiu, první známky počátku Izumo relokalizace do oblasti apikálního ekvatoriálního segmentu (AES) byly u spermií myši rodu *Apodemus* detekovány až o 20-30 minut dříve než u BALB/c. V tomto čase bylo občas PNA ještě detekováno, i když často se známkami slabšího rozdisociovaného barvení, značící průběh AR. Do oblasti WES se Izumo dostalo shodně u BALB/c i A.

microps, pouze u *A. sylvaticus* byla relokalizace rychlejší. Finální průběh Izumo relokalizace, jeho přesun až do postakrozomálního segmentu a tedy do celé oblasti hlavičky spermie byl u *A. sylvaticus* detekován dříve než u ostatních druhů. Z výsledků je patrné, že u spermií promiskuitních myší rodu *Apodemus* dochází k mnohem rychlejšímu nástupu procesu relokalizace Izumo než u kontrolního kmene BALB/c. Konečný proces relokalizace však nevykazuje velké časové rozdíly.

Průchodem přes samičí reprodukční trakt jsou spermie vystaveny působením látek (estrogenů, progesteronu, Ca^{2+}), které ovlivňují jejich kapacitační procesy. K dalším změnám dochází během průchodu spermií přes kumulární buňky vajíčka, kde jsou spermie vystaveny působením progesteronu, který kumulární buňky vylučují (Therien & Manjunath 2003) a který zde iniciuje jejich AR (Jin et al. 2011). Během provádění experimentů se může stát, že dojde k oddělení procesů, které nejsou v přirozeném fyziologickém prostředí odděleny, jako jsou spontánní a indukovaná AR. Oba tyto děje mohou ve spermii probíhat současně, ale také odděleně.

Z tohoto důvodu byly v průběhu pokusu spermie postupně vystavovány také induktorům AR, CaI a progesteronu. Také v tomto pokusu byly hodnoceny ty spermie, které nejdříve procházely relokalicí Izumo do stanovených oblastí hlavičky spermie. Pokusy ukázaly, že spermie BALB/c, *A. microps* i *A. sylvaticus*, které byly ovlivněny CaI v průběhu *in vitro* inkubace, vykazovaly shodný průběh relokalizace Izumo do všech částí hlavičky spermie jako ty spermie, které procházely spontánní AR bez jejich dalšího ovlivnění, s výjimkou spermií *A. microps*, do WSH se Izumo dostalo o dříve než u spontánní AR. Změny nastaly až během inkubace spermií v přítomnosti progesteronu. U spermií všech druhů myší bylo Izumo relokalizováno do všech oblastí hlavičky spermie výrazně rychleji, než během spontánní AR. Časy relokalizace se lišily s mírou promiskuity, spermie *A. sylvaticus* vykazovaly nejrychlejší postup relokalizace.

Progesteron tak výrazně urychlil relokalicí Izumo proteinu do oblastí hlavičky spermie, ve kterých dochází k fúzi spermie s vajíčkem (Inoue et al. 2005). Přítomnost CaI nemá téměř žádný výrazný vliv na relokalicí proteinu Izumo, zatímco progesteron podporuje relokalicí Izumo u všech zástupců, nejsilněji u *A. sylvaticus*. Data počtu spermií procházejících jednotlivými fázemi Izumo relokalizace byla statisticky hodnocena.

V průběhu pokusu byla v každém čase inkubace sledována heterogenita celé populace spermií. Pro statistické hodnocení bylo u spermií BALB/c myší detekováno 6 různých vzorů PNA a Izumo barvení, které bylo během inkubace pozorováno. Kromě výše popsaných stadií

relokalizace Izumo, bylo statisticky hodnoceno také zastoupení spermií, u kterých bylo pozorováno společné barvení Izumo a PNA v oblasti akrozómu, pouze detekce PNA, spermie po AR bez Izumo relokalizace, Izumo s relokalizací do oblasti AES s dosud detekovaným PNA, či spermie neobarvené. V každém čase inkubace spermií tvořily spermie s PNA/Izumo detekcí v oblasti akrozómu a spermie, u kterých docházelo k relokalizaci Izumo, většinu ze všech zastoupených vzorů. Ze všech spermií, které prošly AR, spermie procházející relokalizací Izumo tvořily majoritní skupinu.

Z výsledků postupu relokalizace Izumo vyplývá, že u spermií vysoce promiskuitních druhů myší dochází k relokalizaci do oblasti ekvatoriálního segmentu (oblast fúze spermie s oolemou vajíčka) po velmi krátké době inkubace. Otázkou zůstává, zda tyto spermie po spontánní AR, prošly před touto relokalizací také kompletním a tedy i rychlejším procesem kapacitace, anebo pouze částečným procesem kapacitace, který je dostatečný pro uskutečnění relokalizace Izumo a vede ke schopnosti k oplození. Vysokou míru spontánní AR vykazují zástupci rodu *Apodemus*, kde dosahuje hodnot více než 50% (Moore et al. 2002; Johnson et al. 2007; Clift et al. 2009). Není však známo, zda tyto spermie, i když se vyskytují ve vysokém procentu u těchto myší, procházejí procesem kapacitace a jsou schopny oplození. U spermií myší rodu *Apodemus* nedochází k translaci CD46, díky tomu vykazují nízkou akrozomální stabilitu, a na druhé straně vysokou míru plodnosti. Míra spontánní AR stoupá s mírou promiskuity (Johnson et al. 2007), a jak vyplývá z výsledků pokusů, také rychlost Izumo relokalizace stoupá s mírou promiskuity. Procesy molekulárních změn, ke kterým dochází před oplozením tak začínají u promiskuitních druhů mnohem dříve. Spermie těchto zástupců procházejí relokalizací o 20 až 30 minut dříve než u BALB/c. To by mohlo představovat určitou selektivní výhodu pro spermie samců během vnitrodruhové kompetice spermií. Čas, který je potřebný pro kompletní proces relokalizace je rychlejší pouze u vysoce promiskuitního druhu *A. sylvaticus*, ve srovnání s fakultativně promiskuitním druhem *A. microps* a kontrolním kmenem BALB/c. Velké rozdíly vykazuje Izumo relokalizace v počátečních časech, avšak časové rozdíly kompletního procesu relokalizace nejsou mezi druhy tak výrazné a závisí pravděpodobně na mnoha faktorech, kdy není vyloučena také možnost postupného dokončení kapacitace.

Tyto pokusy dokázaly, že u spermií procházející spontánní AR dochází k relokalizaci Izumo do oblastí fúze spermie s vajíčkem. Počátek relokalizace byl detekován v některých případech ještě s přítomností značeného PNA, avšak počátek AR nelze u tohoto značení akrozómu přesně detekovat. Spermie s EGFP (posílený zelený fluorescenční protein)

značeným akrozinem ukazuje ztrátu signálu ihned po iniciaci AR, zatímco značený akrozóm PNA lektinem nevykazuje v tomto čase ještě žádné změny (Jin et al. 2011).

Aby byla spermie schopná oplodnit vajíčko, musí dojít také k molekulárním změnám v bičíku spermie, vedoucí k progresivní motilitě tzv. hyperaktivaci (Urner et al. 2001), která je nezbytná pro průchod spermie kumulárními buňkami, ZP a fúzi s oolemou vajíčka. Znakem hyperaktivace je zvýšená míra TyrP v bičíku spermie. Z tohoto důvodu bylo u výše zmíněných spermií také sledováno fluorescenční značení bičíku TyrP, pro detekci spontánní AR byl akrozóm opět značen pomocí PNA lektinu. Znakem kapacitace a hyperaktivace spermie byl stanoven signál TyrP v oblasti střední části (mid-piece) bičíku spermie (Urner et al. 2001). Během inkubace spermií bylo detekováno určité procento morfologicky neporušených spermií, které vykazovaly pozitivní signál TyrP bičíku spermie a zároveň proběhlou AR. Tato data pozitivně korelují s počtem spermií, které u těchto druhů myši procházejí spontánní AR. Tyto výsledky odrážejí skutečnost, že spermie, které procházejí spontánní AR, vykazují rovněž hyperaktivaci, znak typický pro dokončení kapacitace spermií. Z tohoto důvodu spermie, procházející rychlejším procesem relokace Izumo, procházejí pravděpodobně také rychlejším procesem kapacitace. Spermie po spontánní AR s relokací proteinu Izumo do oblastí fúze spermie s oolemou vajíčka, se zdají mít stejný fertilizační potenciál, jako spermie, které procházejí kumulárními buňkami či ZP indukovanou AR.

Mechanismus spontánní AR není zcela objasněn. Otázkou zůstává, zda tyto spermie mají schopnost projít přes ZP a oplodnit vajíčko. Nedávno bylo prokázáno, že spermie myši, které projdou ZP indukovanou AR, jsou schopné projít opět přes ZP a oplodnit vajíčko (Inoue et al. 2011). Skupina Jin et al. 2011 ukázala, že spermie prochází ZP velice krátkou dobu na to, aby zde mohla probíhat ZP indukovaná AR, a že spermie myši iniciuje AR již během průchodu přes vrstvu kumulárních buněk. Jak se uvádí v práci (Jin et al. 2011) AR u myších spermií může být iniciována ZP, ale je to spíše výjimka než pravidlo. Pokud spermie po AR je schopna projít ZP, potom spermie po spontánní AR, u které proběhne relokace Izumo do fúzních oblastí hlavičky spermie, má časovou výhodu v procesu oplození oproti ostatním spermiím. U zástupců rodu *Apodemus* vysoká míra spontánní AR tak může představovat velkou konkurenční výhodu.

4 Závěr

- Lokalizace aktinového cytoskeletu nevykazovala výrazné rozdíly mezi spermii lidskými, potkana, křečka a veverky, a před AR byl detekován nejsilnější signál v oblasti akrozómu
 - Po AR došlo ke snížení množství aktinu v oblasti akrozómu, naopak ke zvýšení signálu došlo v oblasti ekvatoriálního segmentu
 - Spektrin byl u spermii potkana, křečka a veverky detekován před AR nejsilněji v oblasti akrozómu, lidské spermie zde vykazovaly negativní signál.
 - Po AR ani u jednoho zástupce spermii nebyl spektrin v oblasti akrozómu lokalizován, nacházel se pouze v ekvatoriální a postakrozomální oblasti
 - Detekce α -tubulinu ukázala největší rozdíly mezi spermii jednotlivých zástupců před i po AR
 - Akrozomální oblast byla pozitivní na α -tubulin před AR pouze u křečka a veverky, po AR byl α -tubulin lokalizován zejména do oblasti postakrozomálního segmentu
 - Cytoskelet v hlavičce spermie plní převážně funkci během AR a procesu oplození a nepodílí se pouze výhradně na udržování specifického tvaru hlavičky spermie
-
- Estrogeny stimulují prokapacitační efekt myších spermii *in vitro*
 - Počet spermii, jejichž proteiny mají pozitivní TyrP v hlavičce spermie, stejně jako celková TyrP, byly v porovnání s kontrolou vyšší
 - Estrogeny výrazně stimulují proces kapacitace v závislosti na jejich koncentraci
 - Estrogeny snižují počet spermii procházející akrozomální reakcí, která byla indukovaná CaI
 - Rychlejší proces kapacitace s ohledem na vyšší TyrP detekované v hlavičkách spermii, vede k snížení počtu spermii, které procházejí CaI indukovanou AR
 - Rostoucí koncentrace estrogenů v přírodním prostředí může ovlivňovat či měnit mechanismy přispívající ke schopnosti spermie oplodnit vajíčko
 - U myších spermii získaných z *cauda epididymis* byl detekován estrogenní receptor β
 - Estrogeny mohou plnit úlohu specifické selekční bariéry uvnitř organismu, kde inhibiční efekt estrogenů na indukovanou AR může mít fyziologický význam
 - Estrogeny mohou představovat jeden z mnoha mechanismů samice, který slouží k výběru nejlepší spermie pro vlastní oplození

- *In vivo* vystavení spermií 17 β -estradiolu vede k předčasnému rychlejšímu procesu kapacitace myších spermií získaných z *cauda epididymis*, s dalším možným negativním dopadem na způsobilost spermie k oplození v samčím reprodukčním traktu
 - 17 β -estradiol vede ke zvýšení TyrP proteinů v hlavičce myších spermií a také k předčasnému přílivu vápenatých iontů do cytoplazmy spermie
 - Naměřené hodnoty 17 β -estradiolu v krevním séru myši korelují s mírou TyrP a také s mírou exprese genu *Tff1 in vivo*
 - Naměřené hodnoty míry TyrP, CTC i exprese genu *Tff1* ukázaly, že největší rozdíly vykazovala skupina myši vystavená působení 17 β -estradiolu kontinuálně od narození do doby pohlavní zralosti
 - Výsledky pokusů *in vivo* ovlivnění TyrP spermií 17 β -estradiolem korelují s podobnými pokusy provedenými *in vitro*
 - *In vivo* vystavení myších spermií 17 β -estradiolu může vést ke snížené schopnosti těchto spermií k oplození
-
- V průběhu procesu kapacitace spermií dochází k postupné relokaci proteinu Izumo z akrozomální membrány přes ekvatoriální segment směrem k postakrozomálnímu regionu hlavičky spermie
 - K procesu relokace Izumo proteinu dochází u spermií procházejících spontánní AR
 - První známky Izumo relokace do oblasti apikálního ekvatoriálního segmentu byly u *A. microps* a *A. sylvaticus* rychlejší než u kontrolního kmene BALB/c
 - Celkový čas potřebný pro kompletní proces relokace IZUMO byl kratší pouze u vysoce promiskuitního druhu *A. sylvaticus*
 - Rozdíl mezi druhy myších spermií v kompletním procesu relokace Izumo není příliš odlišný, může však záviset na čase, který je potřebný spíše pro dokončení procesu kapacitace než AR
 - U volně žijících druhů rodu *Apodemus* čas relokace Izumo pozitivně koreluje s mírou jejich promiskuity a negativně se stabilitou jejich akrozómu
 - Nebyl pozorován výrazný rozdíl mezi relokací Izumo během spontánní AR a CaI indukované AR
 - Relokace Izumo u myších spermií byla urychlena během indukce AR progesteronem

- Spermie, které prochází spontánní AR, mají stejný fertilizační potenciál jako spermie po indukované AR
- Spontánní AR může představovat unikátní mechanismus urychlení procesu oplození ve vysoce promiskuitním prostředí

5 Souhrnná diskuse

K úspěšně proběhlé AR spermie vede mnoho kroků. AR předchází složitý průběh procesu kapacitace, zahrnující aktivaci signálních drah zajišťující aktivaci a deaktivaci proteinů pomocí fosforylace. Tyto kaskády zahrnují odstranění cholesterolu z plazmatické membrány spermie, zvýšení membránové permeability a fluidity, změny intracelulární koncentrace iontů, hyperpolarizaci plazmatické membrány, zvýšenou aktivitu proteinkináz a v neposlední řadě zvýšení tyrozinové fosforylace. Během cesty spermie reprodukčním traktem samice je spermie ovlivněna extracelulárními faktory, jako je například albumin, vápenaté ionty i steroidní hormony, ovlivňující signální procesy vedoucí ke kapacitaci a remodelující povrch spermie nezbytný pro proces oplození (Jones 1989; Jimenez-Gonzalez et al. 2006).

Významnou roli během kapacitace a pro uskutečnění AR hraje aktinový cytoskelet. Role cytoskeletu v hlavičce spermie není dosud zcela známá. Nejprostudovanější je role aktinu, který se nachází zejména v apikální oblasti akrozómu, v oblasti ekvatoriálního segmentu i postakrozomálního regionu. Míra polymerace aktinu koreluje s kapacitací spermie různých druhů savců. Před a po AR dochází k procesům remodelace aktinového cytoskeletu. V průběhu procesu kapacitace, před aktivací AR, dochází k polymeraci aktinového cytoskeletu v apikální oblasti akrozómu, která je regulovaná signálními drahami vedoucí k aktivaci tyrozinkináz a dále k aktivitě PLD. Zde byl také při studiu cytoskeletu aktin nejsilněji detekován. Pro uskutečnění AR musí dojít v oblasti mezi plazmatickou membránou a vnější akrozomální membránou k depolymeraci aktinu (Breitbart et al. 2005; Sosnik et al. 2010). V tomto čase iniciace, v průběhu a dále po AR je aktinový cytoskelet nezbytný pro relokaci zejména fúzního proteinu Izumo do ekvatoriální a postakrozomální oblasti hlavičky spermie. Fluorescenční detekce aktinu skutečně dokázala, že po AR je aktin silněji lokalizován v těchto oblastech hlavičky spermie. Tyto výsledky korelují s nedávnými studii relokace Izumo, které dokazují její závislost na aktinovém cytoskeletu (Sosnik et al. 2009). Relokace Izumo je zároveň závislá na správném průběhu signálních drah

vedoucích k TyrP a tím pravděpodobně i k aktivní Tssk kináze, která hraje roli v regulaci aktinového cytoskeletu a na něm závislé změně lokalizace proteinu Izumo (Sosnik et al. 2009). Cesta k vedoucí aktivaci Tssk však není dosud definovaná.

Změna lokalizace fúzogenního proteinu Izumo před a po AR byla již popsána v několika nedávných publikacích (Inoue et al, 2005; Marcello and Evans 2010; Sosnik et al. 2010; Miranda et al. 2009; Ellerman et al. 2009), dosud však nebyl znám podrobný postup této relokalizace v průběhu celého procesu kapacitace spermie. Protože však není možné označovat stav spermie pouze dvěma oddělenými stavy před a po AR, cílem našeho výzkumu bylo detekovat časové rozvržení změny v lokalizaci proteinu Izumo, a také to, zda k této relokalizaci dochází u těch spermií, které procházejí spontánní AR. Z výsledků studia spermií procházející spontánní AR vyplývá, že se nejedná o děj náhlý, aktivovaný těsně před AR, ale že dochází k časově postupné relokalizaci Izumo v průběhu celého procesu kapacitace spermie a následné AR z oblasti akrozomální membrány do místa fúze spermie s vajíčkem. Ve finálním procesu relokalizace je Izumo detekováno v celé oblasti hlavičky spermie. Vzhledem k tomu, že je změna lokalizace Izumo do těchto oblastí nezbytná pro fúzi spermie s oocytou vajíčka (Inoue et al. 2011) možnost, že by u spermie procházející spontánní AR docházelo ke stejné relokalizaci Izumo do těchto oblastí hlavičky spermie by znamenala, že i tyto spermie by měly být schopny oplození.

Spermie procházejí spontánní AR v době průběhu kapacitace, kdy spermie uvolňuje obsah akrozómu a otevírá se vnitřní akrozomální membrána a to dříve, než spermie dosáhne k oocytu. Otázkou zůstává, zda tyto spermie prošly kompletním procesem kapacitace či nikoli. Tyto spermie byly vždy považovány za neschopné projít ZP a tedy i oplodnit oocyt. Pozornost výzkumu se v nedávné době věnovala zejména procesu AR, vazby spermie k ZP a schopnost spermie fúzovat s oocytou vajíčka. Nedávné pokusy ukázaly, že u myších spermií, které projdou reprodukčním traktem samice, není AR iniciována vazbou k ZP, ale že tato iniciace probíhá již mnohem dříve a to při průchodu kumulárními buňkami (Jin et al. 2011; Inoue et al. 2011). Na povrchu těchto spermií byl detekován zbytek akrosinu, který pravděpodobně může být dostatečný pro následný průchod přes ZP. Vše podporuje fakt, že tyto spermie nejsou na ZP vázány před penetrací dlouhou dobu (Jin et al. 2011). Pokud spermie prošle AR ještě před vazbou na ZP mohou oplodnit oocyt, mohou i spermie po spontánní AR být schopny oplození. Jedna z podmínek však je relokalizace Izumo do fúzních oblastí hlavičky spermie. Ukázalo se, že u spermií rodu *Apodemus* procházející vysokou mírou spontánní AR dochází k urychlení procesu relokalizace Izumo zejména v počátečních

fázích relokalizace a tato je ještě urychlena progesteronem, který je produkován kumulárními buňkami. Otázkou zůstává, zda spermie, která projde rychlejším procesem relokalizace Izumo do fúzních oblastí, je připravena na oplození. Tyto spermie buď procházejí rychlejším procesem kapacitace nebo nezbytné děje důležité pro proces oplození jsou dokončovány po AR, v průběhu pokračující relokalizace Izumo. Je možné, že spermie mohou kapacitační procesy iniciovat dříve v reprodukčním traktu samice a uvolněním akrozómu před dosažením oocyty může být spuštěna relokalizace již plně kapacitované spermie. Součástí procesu kapacitace je také příprava spermie na AR, zahrnující celou řadu signálních dějů, které jsou aktivovány před i v průběhu AR. Je možné, že spermie po spontánní AR nemusí procházet přípravou na AR, proces kapacitace může tak být zkrácený. Z tohoto důvodu zrychlení procesu relokalizace Izumo může znamenat, že tyto spermie jsou plně připravené pro proces oplození. Typickým znakem dokazujícím, že spermie prošla kapacitací je aktivace tyrozinkináz vedoucí k TyrP jejíž nárůst byl skutečně detekován u spermií, které prošly spontánní AR.

Estrogeny nejsou produkovány pouze u samic, ale také u samců, kde mohou zde ovlivňovat reprodukční parametry zejména jejich vazbou na ER (Aquila et al. 2004). ER β byl poprvé detekován na povrchu myších spermií a předpokládá se jeho role při aktivaci rychlých negenomových signálních drah vedoucích k přípravě spermie na oplození. Důležitým indikátorem průběhu těchto signálních drah je TyrP (Visconti et al. 2002). Během *in vitro* i *in vivo* ovlivnění spermií estrogeny, byla detekována zvýšená míra TyrP, která u *in vitro* pokusů vede ke snížení počtu spermií, které procházely AR. Studium estrogenů ukázalo, že 17 β -estradiol, estrone, estriol i 17 α -ethynylestradiol stimulují kapacitační procesy spermií z *cauda epididymis* v závislosti na jejich koncentraci. Odlišnou sílu jejich účinku je možné vysvětlit aktivací různých receptorů a různých signálních drah vedoucích k reprodukční schopnosti spermie. Podobné prokapacitační účinky 17 β -estradiolu byly prokázány ve studiích *in vitro*. Prokapacitační efekt vykazovaly hodnoty nejen TyrP, ale také dalších znaků procesu kapacitace, koncentrace vápenatých iontů, hladiny estrogenu v séru i exprese na estrogenu závislém genu *Tff1*. *In vitro* vliv estrogenů na děje vedoucí k AR dokonce snížilo v počátečních časech inkubace počet spermií procházející AR pod hodnotu počtu spermií prošlých spontánní AR. Pokud signální dráhy vedoucí k TyrP ovlivňují remodelaci aktinového cytoskeletu a tím také průběh AR, může docházet také k ovlivnění relokalizace Izumo a tím schopnost spermie k oplození. Pokud by k relokalizaci Izumo docházelo ještě před iniciací AR, bylo by toto ovlivnění možné. I když v práci byla v některých případech při

počátku relokalizace Izumo ještě detekována oblast akrozómu pomocí PNA, k iniciaci relokalizace dochází až během spuštění AR (Satouh et al. 2012). Zvýšením TyrP je časově posouván pouze průběh AR a tedy pravděpodobně i počátek relokalizace Izumo.

Z výsledků je patrné, že přesné načasování dějů vedoucích ke kapacitaci a AR je pro úspěšnost oplození velice důležitý. Z velké populace spermií pouze malé procento projde reprodukčním traktem až k vajíčku, pouze jedna spermie vajíčko úspěšně oplodní. Předčasná kapacitace, špatné načasování AR a na ní závislé relokalizace fúzogenního proteinu Izumo vlivem působení endogenních disruptorů v přírodním prostředí tato procenta výrazně snižují. Působením látek s estrogení aktivitou v závislosti na jejich koncentraci dochází k ovlivnění těchto dějů vedoucí ke snížení plodnosti organismů. AR, která není indukovaná ZP nebo kumulárními buňkami, se nazývá spontánní. Je však nutné oddělovat jednotlivé typy AR? Je pravděpodobné, že u myši je proces spontánní AR fyziologický děj, aktivovaný dosud neznámým induktorem jak extracelulárním tak intracelulárním. Je známo, že ne všechny spermie procházejí kapacitací ve shodnou dobu. Lze tedy spekulovat, že spontánní AR může být spuštěna u spermií, které dříve dokončily proces kapacitace a mohou tedy i dříve uvolnit obsah akrozómu. Detailní odpovědi přinese až další výzkum, avšak lze předpokládat, že spermie po spontánní AR jsou schopny oplození, a tyto spermie mohou představovat populaci spermií schopnou rychlejšího oplození v případě silné vnitrodruhové kompetice.

Tato disertační práce se věnuje aktuálním procesům vedoucí k oplození a sleduje mechanismy možných molekulárních změn v souvislosti se zhoršujícím se životním prostředím. Proces kapacitace spermií v reprodukčním traktu samice je děj zásadní pro oplození a jak dokládá i tato práce, signální dráhy vedoucí k úspěšné přípravě spermie na oplození mohou být změnou přírodních podmínek snadno ovlivněny a vedou ke snížení reprodukční schopnosti organismů. Molekulární mechanismy související s procesem kapacitace, AR a oplození jsou podrobně mapovány, avšak jak dokládá nedávná práce Inoue et al. 2011 zabývající se průběhem AR u myši, je stále mnoho nezodpovězených otázek a nové výsledky mohou překvapit. Klíčovým krokem vedoucí k oplození je také interakce spermie s vajíčkem, která umožňuje fúzi dvou gamet a vytvoření zygoty. Mechanismus vazby a fúze spermie s vajíčkem není však dosud ještě plně objasněn. Pokrok v této oblasti reprodukční biologie pomáhá a je každým krokem blíže k rozpoznání a léčbě vzrůstající neplodnosti, diagnostice a uvědomění si nebezpečí znečišťování životního prostředí pro reprodukci nejen člověka.

6 Literatura

Abdou AG, Aiad HA & Sultan SM (2008) pS2 (TFF1) expression in prostate carcinoma: correlation with steroid receptor status. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* **116**, 961-71.

Abou-haila A & Tulsiani DR (2009) Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **485**, 72-81.

Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, Visca P & Marino M (2004) Palmitoylation-dependent estrogen receptor α membrane localization regulation by 17- β -estradiol. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 231–237.

Adeoya-Osiguwa SA & Fraser LR (2005) Cathine and norephedrine, both phenylpropanolamines, accelerate capacitation and then inhibit spontaneous acrosome loss. *Human Reproduction* **20**, 198-207.

Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW & Van Duin M (1995) Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Journal of Cell Science* **108**, 2017-2025.

Akingbemi BT (2005) Estrogen regulation of testicular function. *Reproductive Biology and Endocrinology* **273**, 51.

Almeida EA, Huovila AP, Sutherland AE, Stephens LE, Calarco PG, Shaw LM, Mercurio AM, Sonnenberg A, Primakoff P, Myles DG & White JM (1995) Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell* **81**, 1095–104.

Almog T, Lazar S, Reiss N, Etkovitz N, Milch E, Rahamim N, Dobkin-Bekman M, Rotem R, Kalina M, Ramon J, Raziell A, Breitbart H, Seger R & Naor Z (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. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 14479-14489.

Amieux PS & McKnight GS (2002) The essential role of RI alpha in the maintenance of regulated PKA activity. *Annals of the New York Academy of Sciences* **968**, 75–95.

Aquila S, Sisci D, Gentile M, Middea E, Catalano S, Carpino A, Rago V & Andò S (2004) Estrogen receptor (ER) alpha and ER beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**, 1443-1451.

Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M & Florman HM (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.

Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B & Aitken RJ (2004) Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *The Journal of Cell Science* **117**, 3645-3657.

Austin CR (1952) The 'capacitation' of the mammalian sperm. *Nature* **170**, 326.

Avella MA & Dean J (2011) Fertilization with acrosome-reacted mouse sperm: implications for the site of exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 19843-4.

- Baldi E**, Luconi M, Muratori M & Forti G (2000) A novel functional estrogen receptor on human sperm membrane interferes with progesterone effects. *Molecular and Cellular Endocrinology* **161**, 31-35.
- Barros C**, Bedford JM, Franklin LE & Austin CR (1967) Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *The Journal of Cell Biology* **34**, C1- C5.
- Bernabò N**, Berardinelli P, Mauro A, Russo V, Lucidi P, Mattioli M & Barboni B (2011) The role of actin in capacitation-related signaling: an in silico and in vitro study. *BMC Systems Biology* **5**, 47.
- Bielke W**, Blaschke RJ, Miescher GC, Zurcher G, Andres AC & Ziemiecki A (1994). Characterization of a novel murine testis-specific serine/threonine kinase. *Gene* **139**, 235-239.
- Bleil JD** & Wassarman PM (1983) Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Developmental Biology* **95**, 317-24.
- Bleil JD** & Wassarman PM (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.
- Bleil JD** & Wassarman PM (1990) Identification of a ZP3 binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 5563-7.
- Bocchinfuso WP**, Lindzey JK, Hewitt SC, Clark JA, Myers PH, Cooper R, Korach KS (2000) Induction of mammary gland development in estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology* **141**, 2982–2994.
- Bookbinder LH**, Cheng A & Bleil JD (1995) Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Science* **269**, 86-89.
- Bou Khalil M**, Chakrabandhu K, Xu H, Weerachatanukul W, Buhr M, Berger T, Carmona E, Vuong N, Kumarathasan P, Wong PT, Carrier D, Tanphaichitr N (2006) Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylgly-cerolipid. *Developmental Biology* **290**, 220–235.
- Breitbart H** & Naor Z (1999) Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reviews of Reproduction* **4**, 151-9.
- Breitbart H**, Cohen G & Rubinstein S (2005) Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* **129**, 263-8.
- Breitbart H**, Rubinstein S & Etkovitz N (2006) Sperm capacitation is regulated by the crosstalk between protein kinase A and C. *Molecular and Cellular Endocrinology* **252**, 247-9.
- Breitbart H** & Nir Etkovitz (2011) Role and regulation of EGFR in actin remodeling in sperm capacitation and the acrosome reaction. *Asian Journal of Andrology* **13**,106-10.
- Brener E**, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J & Breitbart H (2003) Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction* **68**,837-45.
- Broeder CE**, Quindry J, Brittingham K, Panton L, Thomson J, Appakondur S, Breuel K, Byrd R, Douglas J, Earnest C, Mitchell C, Olson M, Roy T & Yarlagadda C (2000) The Andro Project: physiological and hormonal influences of androstenedione supplementation in men 35 to 65 years old participating in a high-intensity resistance training program. *Archives of Internal Medicine* **160**, 3093–3104.
- Bryja J.** & Stopka P (2005) Facultative promiscuity in a presumably monogamous mouse *Apodemus microps*. *Acta Theriologica* **50**, 189-196.

- Bryja J**, Patzenhauerova H, Albrecht T, Mosansky L, Stanko M & Stopka P (2008) Varying levels of female promiscuity in four Apodemus mice species. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **63**, 251-260.
- Buffone MG**, Foster JA & Gerton GL (2008) The role of the acrosomal matrix in fertilization. *The International Journal of Developmental Biology* **52**, 511-522.
- Carreau S**, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B & Bourguiba S (2003) Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* **11**, 1-35.
- Chang MC** (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* **168**, 697-698.
- Chen MS**, Tung KS, Coonrod SA, Takahashi Y, Bigler D, Chang A, Yamashita Y, Kincade PW, Herr JC & White JM (1999) Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha β 1: implications for murine fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 11830-11835.
- Chimento A**, Sirrianni R, Delalande C, Silandre D, Bois C, Andò S, Maggiolini M, Carreau S & Pezzi V (2010) 17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha. *Molecular and Cellular Endocrinology* **320**,136-144.
- Clarke GN**, Clarke FM & Wilson S (1982) Actin in human spermatozoa. *Biology of Reproduction* **26**, 319–327.
- Claus R**, Schopper D & Hoang-Vu C (1985) Contribution of individual compartments of the genital tract to oestrogen and testosterone concentrations in ejaculates of the boar. *Acta Endocrinologica* **109**, 281-288.
- Clift LE**, Andriikova P, Frolikova M, Stopka P, Bryja J, Flanagan BF, Johnson PM & Dvorakova-Hortova K (2009) Absence of spermatozoal CD46 protein expression and associated rapid acrosome reaction rate in striped field mice (*Apodemus agrarius*). *Reproductive Biology and Endocrinology* **16**, 7-29.
- Cohen G**, Rubinstein S, Gur Y & Breitbart H (2004) Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation. *Developmental Biology* **267**, 230–241.
- Cohen DJ**, Da Ros VG, Busso D, Ellerman DA, Maldera JA, Goldweic N & Cuasnicú PS (2007) Participation of epididymal cysteine-rich secretory proteins in sperm-egg fusion and their potential use for male fertility regulation. *Asian Journal of Andrology* **9**, 528-32.
- Colborn T**, vom Saal FS & Soto AM (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* **101**, 378-84.
- Cross NL** (1996) Effect of cholesterol and other sterols on human sperm acrosomal responsiveness. *Molecular Reproduction and Development* **45**, 212-7.
- Da Ros VG**, Maldera JA, Willis WD, Cohen DJ, Goulding EH, Gelman DM, Rubinstein M, Eddy EM & Cuasnicu PS (2008) Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). *Developmental Biology* **320**,12-8.
- Davis BK** (1976) Inhibitory effect of synthetic phospholipid vesicles containing cholesterol on the fertilizing ability of rabbit spermatozoa. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **152**, 257-261.
- Davis BK** (1980) Interactions of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. *Archives of Andrology* **5**, 249-254.
- Ded L**, Dostalova P, Dorosh A, Dvorakova-Hortova K & Peknicova J (2010) Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology* **8**, 87.

- De Blas G**, Michaut M, Treviño CL, Tomes CN, Yunes R, Darszon A & Mayorga LS (2002) The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 49326-31.
- de Lamirande E** & Gagnon C (1993) Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radical Biology and Medicine* **14**, 157–166.
- de las Heras MA**, Valcarcel A & Perez LJ (1997) In vitro capacitating effect of gamma-aminobutyric acid in ram spermatozoa. *Biology of Reproduction* **56**:964–968.
- Delgado-Buenrostro NL**, Hernández-González EO, Segura-Nieto M & Mújica A (2005) Actin polymerization in the equatorial and postacrosomal regions of guinea pig spermatozoa during the acrosome reaction is regulated by G proteins. *Molecular Reproduction and Development* **70**, 198-210.
- Dunbier AK**, Anderson H, Ghazoui Z, Folkerd EJ, A'hern R, Crowder RJ, Hoog J, Smith IE, Osin P, Nerurkar A, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ & Dowsett M (2010) Relationship between plasma estradiol levels and estrogen-responsive gene expression in estrogen receptor-positive breast cancer in postmenopausal women. *Journal of Clinical Oncology*. **28**, 1161-7.
- Dupont S**, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P & Mark M (2000) Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* **127**: 4277– 4291.
- Dvorakova K**, Palecek J & Peknicova J (2001) Changes in immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins in boar spermatozoa after acrosome reaction induced by specific cytoskeletal inhibitors. *Folia Biologica* **47**, 8-27.
- Dvorakova K**, Moore HD, Sebkova N & Palecek J (2005) Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction* **130**, 61-69.
- Dvoráková-Hortová K**, Sandera M, Jursová M, Vasinová J & Peknicová J (2008) The influence of fluorides on mouse sperm capacitation. *Animal Reproduction Science* **108**, 157-70.
- Draber P**, Draberova E & Viklicky V (1991) Immunostaining of human spermatozoa with tubulin domain-specific monoclonal antibodies. Recognition of a unique beta-tubulin epitope in the sperm head. *Histochemistry* **95**, 519–524.
- Ecroyd H**, Jones RC & Aitken RJ (2003) Tyrosine phosphorylation of HSP-90 during mammalian sperm capacitation. *Biology of Reproduction* **69**, 1801-7.
- Eiler H** & Graves CN (1977) Oestrogen content of semen and the effect of exogenous oestradiol-17a on the oestrogen and androgen concentration in semen and blood plasma of bulls. *Journal of Reproduction and Fertility* **50**, 17-21.
- Eddy EM** & O'Brien DA (1994) The spermatozoon. In *The Physiology of Reproduction*, edn 5, pp 29–77. Eds E Knobil & JD Neill. New York: Raven Press.
- Eisenbach M** (1999) Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Developmental Genetics* **25**, 87-94.
- Ellerman DA**, Ha C, Primakoff P, Myles DG & Dveksler GS (2003) Direct binding of the ligand PSG17 to CD9 requires a CD9 site essential for sperm-egg fusion. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 5098–5103.
- Ellerman DA**, Pei J, Gupta S, Snell WJ, Myles D & Primakoff P (2009) Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. *Molecular Reproduction and Development* **76**, 1188-99.
- Elzeinova F**, Novakova V, Buckiova D, Kubatova A & Peknicova J (2008) Effect of low dose of vinclozolin on reproductive tract development and sperm parameters in CD1 outbred mice. *Reproductive Toxicology* **26**, 231-238.

- Emiliozzi C** & Fenichel P (1997) Protein Tyrosine Phosphorylation Is Associated with Capacitation of Human Sperm *In Vitro* but Is Not Sufficient for Its Completion. *Biology of Reproduction* **56**, 674-679
- Endo Y**, Lee MA & Kopf GS (1987) Evidence for the role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the zona pellucida induced mouse sperm acrosome reaction. *Developmental Biology* **119**, 210-216.
- Etkovitz N**, Tirosh Y, Chazan R, Jaldety Y, Daniel L, Rubinstein S & Breitbart H (2009) Bovine sperm acrosome reaction induced by G protein-coupled receptor agonists is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation. *Developmental Biology* **334**, 447
- Evans MI**, O'Malley PJ, Krust A & Burch JB (1987) Developmental regulation of the estrogen receptor and the estrogen responsiveness of five yolk protein genes in the avian liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 8493-8497.
- Exton JH** (1999) Regulation of phospholipase D. *Biochimica et Biophysica Acta* **1439**, 121-133.
- Fazeli A**, Hage WJ, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Bevers MM & Colenbrander B (1997) Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida *in vitro*. *Biology of Reproduction* **56**, 430-438.
- Ficarro S**, Chertihin O, Westbrook VA, White F, Jayes F, Kalab P, Marto JA, Shabanowitz J, Herr JC, Hunt DF & Visconti PE (2003) Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 11579-89.
- Filardo EJ**, Quinn JA, Frackelton AR Jr & Bland KI (2002) Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Molecular Endocrinology* **16**, 70-84.
- Filardo EJ** & Thomas P (2005) GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **16**, 362-367.
- Fisher HM**, Brewis IA, Barratt CL, Cooke ID & Moore HD (1998) Phosphoinositide 3-kinase is involved in the induction of the human sperm acrosome reaction downstream of tyrosine phosphorylation. *Molecular Human Reproduction* **4**, 849-855.
- Flesch FM**, Wijnand E, van de Lest CH, Colenbrander B, van Golde LM & Gadella BM (2001) Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. *Molecular Reproduction and Development* **60**, 107-15.
- Florman HM**, Jungnickel MK & Sutton KA (2008) Regulating the acrosome reaction. *The International Journal of Developmental Biology* **52**, 503-510.
- Fouquet JP** & Kann ML (1992) Species-specific localization of actin in mammalian spermatozoa: fact or artifact? *Microscopy Research and Technique* **20**, 251-258.
- Fraser LR** (1979) Accelerated mouse sperm penetration *in vitro* in the presence of caffeine. *Journal of Reproduction and Fertility* **57**, 377-384.
- Fraser LR** (1981) Dibutyryl cyclic AMP decreases capacitation time *in vitro* in mouse spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* **62**, 63-72.
- Fraser LR** (1987) Minimum and maximum extracellular Ca²⁺ requirements during mouse sperm capacitation and fertilization *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* **81**, 77-89.
- Fraser LR** (1989) Sperm capacitation and its modulation. In: Bavister BD, Cummings J, Roldan ERS (eds.), *Fertilization in Mammals*. Norwell, MA: Serono Symposia, USA; 1989: 141-153.

- Fraser LR** & Monks NJ (1990) Cyclic nucleotides and mammalian sperm capacitation. *Journal of reproduction and fertility Supplement* **42**, 9-21.
- Fraser LR**, Hosseini R, Hanyalogou A, Talmor A & Dudley RK (1997) TCP-11, the product of a mouse t-complex gene, plays a role in stimulation of capacitation and inhibition of the spontaneous acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development* **48**, 375-82.
- Free MJ** & Jaffe RA (1979) Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation. *Biology of Reproduction* **20**, 269-278.
- Ganjam VK** & Amann RP (1976) Steroids in fluids and sperm entering and leaving the bovine epididymis, epididymal tissue, and accessory sex gland secretions. *Endocrinology* **99**, 1618-30.
- Garcia MA** & Meizel S (1999) Progesterone-mediated calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa: pharmacological investigation of T-type calcium channels. *Biology of Reproduction* **60**, 102-109.
- Goodson SG**, Zhang Z, Tsuruta JK, Wang W & O'Brien DA (2011) Classification of mouse sperm motility patterns using an automated multiclass support vector machines model. *Biology of Reproduction* **84**, 1207-1215.
- Gong Y** & Han XD (2006) Effect of nonylphenol on steroidogenesis of rat Leydig cells. *Journal of Environmental Science and Health B* **41**, 705-15.
- Gray LE, Jr** Ostby J, Monosson E & Kelce WR (1999a) Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicology and Industrial Health* **15**, 48-64.
- Gray LE, Jr** Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL & Ostby J (1999b) Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolate, p, p'-DDE and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethan sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicology and Industrial Health* **15**, 94-118.
- Gur Y** & Breitbart H (2006) Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes & Development* **20**, 411-6.
- Hall JM**, Couse JF & Korach KS 2001 The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 36869-36872.
- Harper CV**, Cummerson JA, White MR, Publicover SJ & Johnson PM (2008) Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *The Journal of Cell Science* **121**, 2130-2135.
- Heid HW**, Figge U, Winter S, Kuhn R, Zimbelmann R & Franke WW (2002) Novel actin-related proteins Arp-T1 and Arp-T2 as components of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Experimental Cell Research* **279**, 177-187.
- Hess RA**, Bunick D & Bahr JM (1995) Sperm, a source of estrogen. *Environmental Health Perspectives* **103**, 59-62.
- Hess RA**, Bunick D, Lee K-H, Bahr J, Taylor JA, Korach KS & Lubahn DB (1997) A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* **390**, 509-512
- Holt WV** & Harrison RA (2002) Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. *Journal of Andrology* **23**, 557-565.
- Howes EA**, Hurst SM & Jones R (2001) Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. *Journal of Andrology* **22**, 62-72.
- Hyne RV** & Garbers DL (1979) Regulation of guinea pig sperm adenylate cyclase by calcium. *Biology of Reproduction* **21**, 1135-1142.

- Inoue N**, Ikawa M, Nakanishi T, Matsumoto M, Nomura M, Seya T & Okabe M (2003) Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 2614-22.
- Inoue N**, Ikawa M, Isotani A & Okabe M (2005) The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* **434**, 234-8.
- Inoue N**, Yamaguchi R, Ikawa M & Okabe M (2007) Sperm-egg interaction and gene manipulated animals. *Society for Reproduction and Fertility* **65**, 363-71.
- Inoue N**, Ikawa M & Okabe M (2008) Putative sperm fusion protein IZUMO and the role of N-glycosylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **377**, 910-4.
- Inoue N**, Satouh Y, Ikawa M, Okabe M & Yanagimachi R (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**, 20008-11.
- Itach SB**, Finklestein M, Etkovitz N & Breitbart H (2012) Hyper-activated motility in sperm capacitation is mediated by phospholipase D-dependent actin polymerization. *Developmental Biology* **362**, 154-61.
- Janulis L**, Hess RA, Bunick D, Nitta H, Janssen S, Asawa Y & Bahr JM (1996) Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase which decreases as sperm traverse the epididymis. *Journal of Andrology* **17**, 111-6.
- Jimenez-Gonzalez C**, Michelangeli F, Harper CV, Barratt CL & Publicover SJ (2006) Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. *Human Reproduction Update* **12**, 253-67.
- Jin J**, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM & Yan W (2007) Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biology of Reproduction* **77**, 37-44.
- Jin M**, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K & Hirohashi N (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 PM**, Clift LE, Andriikova P, Jursova M, Flanagan BF, Cummerson JA, Stopka P & Dvorakova-Hortova K (2007) Rapid sperm acrosome reaction in the absence of acrosomal CD46 expression in promiscuous field mice (Apodemus). *Reproduction* **134**, 739-47.
- Jones R** (1989) Membrane remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Oxford Reviews of Reproductive Biology* **11**, 285-337.
- Kaji K**, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S & Kudo A (2000) The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nature Genetics* **24**, 279-82.
- Kann ML**, Pradel LA & Fouquet JP (1993) Spectrin and ankyrin like proteins in spermatids and spermatozoa of the hamster and some other mammals. *Reproduction Nutrition Development* **33**, 51-61.
- Katz DF** & Drobnis EZ (1990) Analysis and interpretation of the forces generated by spermatozoa. *Fertilization in mammals* *Bavister B.D, Cummins J.M, Roldan E.R.S.* 125-137. *Eds. Norwell, MA: Sero Sponosia.*
- Kawano N**, Yoshida K, Miyado K & Yoshida M (2011) Lipid rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis. *Journal of Lipids* 264706.
- Kilian E**, Delpont R, Bornman MS & de Jager C (2007) Simultaneous exposure to low concentrations of dichlorodiphenyltrichloroethane, deltamethrin, nonylphenol and phytoestrogens has, negative effects on the reproductive parameters in male Sprague-Dawley rats. *Andrologia* **39**, 128-35.

- Kim KS**, Foster JA & Gerton GL (2001) Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biology of Reproduction* **64**, 148–156.
- Kirkman-Brown JC**, Punt EL, Barratt CL & Publicover SJ (2002) Zona pellucida and progesterone-induced Ca²⁺ signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *Journal of Andrology* **23**, 306-15.
- Kopf GS** (2002) Signal transduction mechanisms regulating sperm acrosomal exocytosis. In: Hardy DM (ed.), Fertilization. San Diego: Academic Press; 181–223
- Kotula-Balak M**, Grzmil P, Styrna J & Bilińska B (2004) Immunodetection of aromatase in mice with a partial deletion in the long arm of the Y chromosome. *Acta Histochemica* **106**, 55-64.
- Kusk KO**, Krüger T, Long M, Taxvig C, Lykkesfeldt AE, Frederiksen H, Andersson AM, Andersen HR, Hansen KM, Nellemann C & Bonefeld-Jørgensen EC (2011) Endocrine potency of wastewater: contents of endocrine disrupting chemicals and effects measured by in vivo and in vitro assays. *Environmental Toxicology and Chemistry* **30**, 413-426.
- Kuzan FB**, Fleming AD & Seidel GE Jr. (1984) Successful fertilization in vitro of fresh intact oocytes by perivitelline (acrosome-reacted) spermatozoa of the rabbit. *Fertility and Sterility* **41**, 766–770.
- Kyselova V**, Peknicova J, Buckiova D & Boubelik M (2003) Effect of p-nonylphenol and resveratrol on in vivo fertility and different body parameters in outbred mice CD1. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1**, 30.
- Kyselova V**, Peknicova J, Boubelik M & Buckiova D (2004) Body and organ weight, sperm acrosomal status and reproduction after genistein and diethylstilbestrol treatment of CD1 mice in a multigenerational study. *Theriogenology* **61**, 1307-1325.
- Kwon S**, Hess RA, Bunick D, Nitta H, Janulis L, Osawa Y, Bahr JM (1995) Rooster testicular germ cells and epididymal sperm contain P450 aromatase. *Biology of Reproduction* **53**, 1259-1264.
- Pelletier G**, Labrie C, Labrie F (2000) Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *Journal of Endocrinology* **165**, 359-370.
- Lin M**, Hess R & Aitken JR (2002) Induction of sperm maturation invitro 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.
- Lin YN**, Roy A, Yan W, Burns KH & Matzuk MM (2007) Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 6794-805.
- Lozahic S**, Christiansen D, Manie S, Gerlier D, Billard M, Boucheix C & Rubinstein E (2000) CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *European Journal of Immunology* **30**, 900–907.
- Lu Q**, Sun QY, Breitbart H & Chen DY (1999) Expression and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases during spermatogenesis and epididymal sperm maturation in mice. *Archives of Andrology* **43**, 55–66.
- Lubahn DB**, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS & Smithies O (1993) Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 11162-11166.
- Luconi M**, Barni T, Vannelli GB, Krausz C, Marra F, Benedetti PA, Evangelista V, Francavilla S, Properzi G, Forti G & Baldi E (1998) Extracellular signal-regulated kinases modulate capacitation of human spermatozoa. *Biology of Reproduction* **58**, 1476–1489.

- Madak-Erdogan Z**, Kieser KJ, Kim SH, Komm B, Katzenellenbogen JA & Katzenellenbogen BS (2008) Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors. *Molecular Endocrinology* **22**, 2116-27.
- Manandhar G** & Toshimori K (2001) Exposure of sperm head equatorin after acrosome reaction and its fate after fertilization in mice. *Biology of Reproduction* **65**, 1425-1436.
- Mandrup KR**, Hass U, Christiansen S & Boberg J (2012) Perinatal ethinyl oestradiol alters mammary gland development in male and female Wistar rats. *International Journal of Andrology* **35**, 385-96.
- Marcello MR** & Evans JP (2010) Multivariate analysis of male reproductive function in Inpp5b^{-/-} mice reveals heterogeneity in defects in fertility, sperm-egg membrane interaction and proteolytic cleavage of sperm ADAMs. *Molecular Human Reproduction* **16**, 492-505.
- Mariappa D**, Siva AB, Shivaji S & Seshagiri PB (2006) Tyrphostin-A47 inhibitable tyrosine phosphorylation of flagellar proteins is associated with distinct alteration of motility pattern in hamster spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* **73**, 215-225
- Markova MD**, Marinova TT & Vatev IT (2002) Asymmetric vimentin distribution in human spermatozoa. *Folia Biologica* **48**, 160-2.
- Mbizvo MT**, Thomas S, Fulgham DL & Alexander NJ (1990) Serum hormone levels affect sperm function. *Fertility and Sterility* **54**, 113-120.
- Miranda PV**, Allaire A, Sosnik J & Visconti PE (2009) Localization of low-density detergent-resistant membrane proteins in intact and acrosome-reacted mouse sperm. *Biology of Reproduction* **80**, 897-904.
- Miyado K**, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M & Mekada E (2000) Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* **287**, 321-324.
- Miyado K**, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E & Umezawa A (2008) The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 12921-6.
- Miyaso H**, Nakamura N, Matsuno Y, Kawashiro Y, Komiyama M & Mori C (2012) Postnatal exposure to low-dose decabromodiphenyl ether adversely affects mouse testes by increasing tyrosine phosphorylation level of cortactin. *Journal of Toxicological Sciences* **37**, 987-999.
- Moghanibashi M**, Mohamadynejad P, Rasekhi M, Ghaderi A & Mohammadianpanah M (2012) Polymorphism of estrogen response element in TFF1 gene promoter is associated with an increased susceptibility to gastric cancer. *Gene*. **492**, 100-3.
- Moore H**, Dvorakova K, Jenkins N & Breed W (2002) Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. *Nature* **418**, 174-177.
- Moreno RD** & Schatten G (2000) Microtubule configurations and post-translational alpha-tubulin modification during mammalian spermatogenesis. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **46**, 235-246.
- Mori E**, Baba T, Iwamatsu A & Mori T (1993) Purification and characterization of a 38-kDa protein, sp38, with zona pellucida-binding property from porcine epididymal sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **196**, 196-202.
- Mutembei HM**, Pesch S, Schuler G & Hoffmann B (2005) Expression of oestrogen receptors alpha and beta and aromatase in the testis of immature and mature boars. *Reproduction in Domestic Animals* **40**, 228-236.
- Naito K**, Toyoda Y & Yanagimachi R (1992) Production of normal mice from oocytes fertilized and developed without zona pellucida. *Human Reproduction* **2**, 281-285.

- Nakamura D**, Yanagiba Y, Duan Z, Ito Y, Okamura A, Asaeda N, Tagawa Y, Li C, Taya K, Zhang SY, Naito H, Ramdhan DH, Kamijima M & Nakajima T (2010) Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicology Letters* **194**, 16–25.
- Naz RK** & Ahmad K (1992) Presence of expression products of c-erbB- 1 and c-erbB-2/HER2 genes on mammalian sperm cell, and effects of their regulation on fertilization. *Journal of Reproductive Immunology* **21**, 223-239.
- Neill JM** & Olds-Clarke P (1987) A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Research* **18**, 121-140.
- Nitta H**, Bunick D, Hess R, Janulis L, Newton S, Millette C, Osawa Y, Shizuta Y, Toda K & Bahr I (1993) Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology* **132**, 1396-1401.
- Nixon B**, MacIntyre DA, Mitchell LA, Gibbs GM, O'Bryan M & Aitken RJ (2006) The identification of mouse sperm-surface-associated proteins and characterization of their ability to act as decapacitation factors. *Biology of Reproduction* **74**, 275-87.
- Nixon B**, Bielanowicz A, Anderson AL, Walsh A, Hall T, Mccloghry A & Aitken RJ (2010) Elucidation of the signaling pathways that underpin capacitation-associated surface phosphotyrosine expression in mouse spermatozoa. *Journal of Cellular Physiology* **224**, 71-83.
- Ocampo J**, Mondragón R, Roa-Espitia AL, Chiquete-Félix N, Salgado ZO & Mújica A (2005) Actin, myosin, cytokeratins and spectrin are components of the Guinea pig sperm nuclear matrix. *Tissue and Cell* **37**, 293-308.
- O'Donnell L**, Rhodes D, Smith SJ, Merriner DJ, Clark BJ, Borg C, Whittle B, O'Connor AE, Smith LB, McNally FJ, de Kretser DM, Goodnow CC, Ormandy CJ, Jamsai D & O'Bryan MK (2012) An essential role for katanin p80 and microtubule severing in male gamete production. *PLoS Genetics* **8**, e1002698.
- Okabe M**, Adachi T, Takada K, Oda H, Yagasaki M, Kohama Y & Mimura T (1987) Capacitation-related changes in antigen distribution on mouse sperm heads and its relation to fertilization rate in vitro. *Journal of Reproductive Immunology* **11**, 91-100.
- Okamura N**, Tajima Y & Sugita Y (1988) Decrease in bicarbonate transport activities during epididymal maturation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **157**, 1280-1287.
- Olds-Clarke P** (1990) Variation in the quality of sperm motility and its relationship to capacitation. In *Fertilization in Mammals*, (ed. B. Bavister, J. Cummins and E. Roldan), pp. 91-99. Norwell, MA: Serono Symposia USA.
- O'Toole CM**, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA & Florman HM (2000) Entry through Store-operated Channels in Mouse Sperm Is Initiated by Egg ZP3 and Drives the Acrosome Reaction. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 1571–1584.
- Overpeck JG**, Colson SH, Hohmann JR, Applestine MS & Reilly JF (1978) Concentrations of circulating steroids in normal prepubertal and adult male and female humans, chimpanzees, rhesus monkeys, rats, mice, and hamsters: a literature survey. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **4**, 785-803.
- Park JW**, Lee JC, Ha SW, Bang SY, Park EK, Yi SA, Lee MG, Kim DS, Nam KH, Yoo JH, Kwon SH & Han JW (2012) Requirement of protein l-isoaspartyl O-methyltransferase for transcriptional activation of trefoil factor 1 (TFF1) gene by estrogen receptor alpha. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **420**, 223-9.
- Pedram A**, Razandi M & Levin ER (2006) Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Molecular Endocrinology* **20**, 1996 –2006.

- Pedram A**, Razandi M, Sainson RCA, Kim JK, Hughes CC & Levin ER (2007) A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 22278–22288.
- Peknicova J**, Kubatova A, Sulimenko V, Draberova E, Viklicky V, Hozak P & Draber P (2001) Differential subcellular distribution of tubulin epitopes in boar spermatozoa: recognition of class III b-tubulin epitope in sperm tail. *Biology of Reproduction* **65**, 672–679.
- Peknicová J**, Kyselova V, Buckiova D & Boubelik M (2002) Effect of endocrine disruptor on mammalian fertility. Application of monoclonal antibodies against sperm proteins as markers for testing sperm damage. *American Journal of Reproductive Immunology* **47**, 311-318.
- Peknicova J**, Pexidrova M, Kubatova A, Koubek P, Tepla O, Sulimenko T & Draber P (2007) Expression of beta-tubulin epitope in human sperm with pathological spermiogram. *Fertility and Sterility* **88**, 1120-8.
- Pelletier R**, Trifaro JM, Carbajal ME, Okawara Y & Vitale ML (1999) Calcium- dependent actin filament-severing protein scinderin levels and localization in bovine testis, epididymis, and spermatozoa. *Biology of Reproduction* **60**, 1128–1136.
- Pina-Guzman B**, Sanchez-Gutierrez M, Marchetti F, Hernandez-Ochoa I, Solis-Heredia MJ & Quintanilla-Vega B (2009) Methyl-parathion decreases sperm function and fertilization capacity after targeting spermatocytes and maturing spermatozoa. *Toxicology and Applied Pharmacology* **238**, 141–9.
- Quignot N**, Arnaud M, Robidel F, Lecomte A, Tournier M, Cren-Olivé C, Barouki R & Lemazurier E (2012) Characterization of endocrine-disrupting chemicals based on hormonal balance disruption in male and female adult rats. *Reproductive Toxicology* **33**, 339-52.
- Razandi M**, Pedram A, Greene GL & Levin ER (1999) Cell membrane and nuclear estrogen receptors derive from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in CHO cells. *Molecular Endocrinology* **13**, 307–319.
- Revankar CM**, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB & Prossnitz ER (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 307, 1625-30.
- Rochwerger L** & Cuasnicu PS (1992) Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vitro and in vivo capacitation. *Molecular Reproduction and Development* **31**, 34-41.
- Roldan ERS** (1998) Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. *Frontiers in Bioscience* **3**, 1109–1119.
- Rosenfeld CS**, Ganjam VK, Taylor JA, Yuan X, Stiehr JR, Hardy MP & Lubahn DB (1998) Transcription and translation of estrogen receptor-beta in the male reproductive tract of estrogen receptor-alpha knock-out and wild-type mice. *Endocrinology* **139**, 2982-7.
- Rubinstein E**, Ziyat A, Prenant M, Wrobel E, Wolf JP, Levy S, Le Naour F & Boucheix C (2006) Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Developmental Biology* **290**, 351-8.
- Sanchez-Gutierrez M**, Contreras RG & Mujica A (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.
- Satouh Y**, Inoue N, Ikawa M & Okabe M (2012) Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *Journal of Cell Sciences* **125**, 4985-90
- Shadan S**, James PS, Howes EA & Jones R (2004) Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biology of Reproduction* **71**, 253–265.
- Shaikh AA** (1971) Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. *Biology of Reproduction* **5**, 297–307.

- Sheng ZG** & Zhu BZ (2011) Low concentrations of bisphenol A induce mouse spermatogonial cell proliferation by G protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor- α . *Environmental Health Perspectives* **119**, 1775-1780.
- Si Y** & Okuno M (1999) Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biology of Reproduction* **61**, 240–246.
- Singh JP, Babcock DF** & Lardy HA (1978) Increased calcium ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. *Biochemical Journal* **172**, 549- 556.
- Sihra TS, Bogonez E** & Nicholls DG (1992) Localized Ca²⁺ entry preferentially affects protein dephosphorylation, phosphorylation and glutamate release. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 1983–1989.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR & Bulun SE** (1994) Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews* **15**, 342-355.
- Sirianni R, Chimento A, Ruggiero C, De Luca A, Lappano R, Andò S, Maggiolini M & Pezzi V** (2008) The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. *Endocrinology* **149**, 5043-51.
- Sleight SB, Miranda PV, Plaskett NW, Maier B, Lysiak J, Scrable H, Herr JC & Visconti PE** (2005) Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation. *Biology of Reproduction* **73**, 721–729.
- Soares J, Coimbra AM, Reis-Henriques MA, Monteiro NM, Vieira MN, Oliveira JM, Guedes-Dias P, Fontáinhas-Fernandes A, Parra SS, Carvalho AP, Castro LF & Santos MM** (2009) Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development after full life-cycle parental exposure to low levels of ethinylestradiol. *Aquatic Toxicology* **95**, 330-8.
- Solakidi S, Psarra AM, Nikolaropoulos S & Sekeris CE** (2005) Estrogen receptors α and β (ER α and ER β) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER β and AR in mitochondria of the midpiece. *Human Reproduction* **20**, 3481–3487.
- Sosnik J, Miranda PV, Spiridonov NA, Yoon SY, Fissore RA, Johnson GR & Visconti PE** (2009) Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *The Journal of Cell Science* **122**, 2741-9.
- Spungin B, Margalit I & Breitbart H** (1995) Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *The Journal of Cell Science* **108**, 2525–2535.
- Spungin B & Breitbart H** (1996) Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *The Journal of Cell Science* **109**, 1947–1955.
- Stewart-Savage J** (1993) Effect of bovine serum albumin concentration and source on sperm capacitation in the golden hamster. *Biology of Reproduction* **49**, 74–81.
- Storgaard L, Bonde JP & Olsen J** (2006) Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure. A review of published epidemiological studies. *Reproductive Toxicology* **21** 4-15.
- Suarez SS & Osman RA** (1987) Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biology of Reproduction* **36**, 1191–1198.
- Suarez SS & Pacey AA** (2005) Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*. **12**, 23-37.
- Tanaka H, Yoshimura Y, Nishina Y, Nozaki M, Nojima H & Nishimune Y** (1994) Isolation and characterization of cDNA clones specifically expressed in testicular germ cells. *FEBS Letters* **355**, 4–10.

- Tash JS** & Means AR (1983) Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod.* **28**, 75-104.
- Terrillon S** & Bouvier M (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Reports* **5**, 30-4.
- Therien I** & Manjunath P (2003) Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction* **69**, 1408-1415.
- Thomas P**, Pang Y, Filardo EJ & Dong J (2005) Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* **146**, 624-32.
- Toshimori K**, Saxena DK, Tanii I & Yoshinaga K (1998) An MN9 antigenic molecule, equatorin, is required for successful sperm-oocyte fusion in mice. *Biology of Reproduction* **59**, 22-9.
- Urner F**, Leppens-Luisier G & Sakkas D (2001) Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse. *Biology of Reproduction* **64**, 1350-1357.
- Valdivia M** & Barros C (1997) The participation of acrosin in sperm penetration through the zona pellucida in rabbits. *Biology of Reproduction* **56**, 164.
- Victor-Costa AB**, Bandeira SM, Oliveira AG, Mahecha GA & Oliveira CA (2010) Changes in testicular morphology and steroidogenesis in adult rats exposed to Atrazine. *Reproductive Toxicology* **29**, 323-31.
- Vigil P**, Toro A & Godoy A (2008) Physiological action of oestradiol on the acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrologia* **40**, 146-151.
- Vijayaraghavan S**, Trautman KD, Goueli SA & Carr DW (1997) A tyrosine-phosphorylated 55-kilodalton motility-associated bovine sperm protein is regulated by cyclic adenosine 3',5'-monophosphates and calcium. *Biology of Reproduction* **56**, 1450-1457.
- Virtanen I**, Badley RA, Paasivuo R & Lehto VP (1984) Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *Journal of Cell Biology* **99**, 1083-1091.
- Visconti PE**, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P & Kopf GS (1995) Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121**, 1129-37.
- Visconti PE**, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P & Kopf GS (1995) Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* **121**, 1139-50.
- Visconti PE**, Ning X, Fornés MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA & Kopf GS (1999) Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Developmental Biology* **214**, 429-43.
- Visconti PE**, Hao Z, Purdon MA, Stein P, Balsara BR, Testa JR, Herr JC, Moss SB & Kopf GS (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 PE**, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S & Diekman AB (2002) Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of Reproductive Immunology* **53**, 133-150.
- von Bulow M**, Heid H, Hess H & Franke WW (1995) Molecular nature of calicin, a major basic protein of the mammalian sperm head cytoskeleton. *Experimental Cell Research* **219**, 407-413.
- von Bulow M**, Rackwitz HR, Zimbelmann R & Franke WW (1997) CP beta3, a novel isoform of an actin-binding protein, is a component of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Experimental Cell Research* **233**, 216-224.
- Walensky LD** & Snyder SH (1995) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *The Journal of Cell Biology* **130**, 857-869.

- Wang C**, Dehghani B, Magrisso J, Rick EA, Bonhomme E, Cody DB, Elenich LA, Subramanian S, Murphy SJ, Kelly MJ, Rosenbaum JS, Vendenbark AA & Offner H (2008) GPR30 contributes to estrogen-induced thymic atrophy. *Molecular Endocrinology* **22**, 636–648.
- Wolf JC**, Lutz I, Kloas W, Springer TA, Holden LR, Krueger HO & Hosmer AJ (2010) Effects of 17 beta-estradiol exposure on *Xenopus laevis* gonadal histopathology. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**, 1091-105.
- Yagi A** & Paranko J (1995) Actin, a-actinin, and spectrin with specific associations with the postacrosomal and acrosomal domain of bovine spermatozoa. *Anatomical Record* **241**, 77–87.
- Yanagimachi R** (1994) Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction* (ed. E. Knobil and J. D. Neill), pp. 189-317. New York: Raven Press.
- Yoshida K**, Ito C, Yamatoya K, Maekawa M, Toyama Y, Suzuki-Toyota F & Toshimori K (2010) A model of the acrosome reaction progression via the acrosomal membrane-anchored protein equatorin. *Reproduction* **139**, 533-44.
- Yu Y**, Xu W, Yi YJ, Sutovsky P & Oko R (2006) The extracellular protein coat of the inner acrosomal membrane is involved in zona pellucida binding and penetration during fertilization: characterization of its most prominent polypeptide (IAM38). *Developmental Biology* **290**, 32-43.
- Zaffran Y**, Destaing O, Roux A, Ory S, Nheu T, Jurdic P, Rabourdin-Combe C & Astier AL (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**, 6780-5.
- Zanetti N** & Mayorga LS (2009) Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. *Biology of Reproduction* **2**, 396-405.
- Zatecka E**, Ded L, Elzeinova F, Kubatova A, Dorosh A, Margaryan H, Dostalova P & Peknicova J (2013) Effect of tetrabromobisphenol A on induction of apoptosis in the testes and changes in expression of selected testicular genes in CD1 mice. *Reproductive Toxicology* **35**, 32-9.
- Zepeda-Bastida A**, Chiquete-Felix N, Uribe-Carvajal S & Mujica A (2011) The acrosomal matrix from guinea pig sperm contains structural proteins, suggesting the presence of an actin skeleton. *Journal of Andrology* **32**, 411-9.
- Zhao C**, Guo XJ, Shi ZH, Wang FQ, Huang XY, Huo R, Zhu H, Wang XR, Liu JY, Zhou ZM & Sha JH (2009) Role of translation by mitochondrialtype ribosomes during sperm capacitation: an analysis based on a proteomic approach. *Proteomics* **9**, 1385–99.

7 Přehled publikací