

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Kristýna Kroumanová**

**Vliv ubiquitin-proteazomálního systému na spermiogenezi u savců**

Effect of ubiquitin-proteasome system on spermiogenesis in mammals

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Aleš Petelák

Praha 2014

Ráda bych poděkovala mému školiteli Mgr. Aleši Petelákovi za pomoc a cenné rady při psaní této práce. Poděkování patří také RNDr. Ing. Vladimíru Krylovovi, Ph.D. Zároveň děkuji mé rodině za jejich podporu a trpělivost.

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, 13. 5. 2014

Kristýna Kroumanová

## **Abstrakt**

Spermiogeneze je komplikovaný proces, při kterém se haploidní spermatidy diferencují na morfologicky zralé spermie. Morfologické změny zahrnují děje jako kondenzace chromatinu a nahrazení histonů protaminy, splývání cisteren Golgiho aparátu za tvorby akrozomálního váčku, tvorba bičíku, redukce cytoplasmy a přeskupování organel. Při těchto událostech hraje důležitou roli ubiquitin-proteazomální systém. Ubiquitinace je posttranslační modifikace, která vede především ke značení intracelulárních proteinů určených k degradaci ve 26S proteazomu. Důležitost ubiquitinace při tvorbě spermií dokazuje fakt, že deficiencie ubiquitin-proteazomálního komplexu při spermiogenezi může vést k neplodnosti různého stupně. Během následné maturace spermií v epididymis dochází k extracelulárnímu značení abnormálních spermií ubiquitinem a kontrole kvality spermií. Ubiquitin-proteazomální systém hraje významnou roli i při oplození, kdy je 26S proteazom obsažený ve spermii spoluzodpovědný za penetraci zony pellucidy. Cílem této práce je popsat vliv ubiquitin-proteazomálního systému během různých fází spermiogeneze u savců.

## **Klíčová slova**

Ubiquitin, spermiogeneze, oplození, savci

## **Abstract**

Spermiogenesis is a complicated process in which the haploid spermatids differentiate into morphologically mature sperm. Morphological changes include condensation of chromatin and histone-to-protamine replacement, fusion of Golgi-derived vesicles to form acrosomal cap, flagellum formation, reduction of cytoplasmic volume and organelles rearrangement. Ubiquitin-proteasome system plays a key role in these processes. Ubiquitination is a posttranslational modification, leading to the labelling of intracellular proteins targeted for degradation by 26S proteasome. Importance of sperm ubiquitination, is supported by the fact, that deficiency of ubiquitin-proteasome system can lead to infertility at various degrees. During the subsequent sperm maturation in the epididymis extracellular ubiquitination of abnormal sperm and sperm quality control take place. Ubiquitin-proteasome system plays a key role during fertilization, when the sperm 26S proteasome is co-responsible in zona pellucida penetration. The purpose of this assay is to describe the effect of ubiquitin-proteasome system during different stages of spermiogenesis in mammals.

## **Keywords**

Ubiquitin, spermiogenesis, fertilization, mammals

# Obsah

1	Úvod .....	8
2	Ubiquitin-proteazomální systém (UPS) .....	9
2.1	Ubiquitin .....	9
2.2	Enzymatická kaskáda vedoucí k ubiquitinaci substrátu .....	9
2.3	Rozpoznání proteinů určených k degradaci .....	11
2.4	Regulace dráhy .....	11
2.5	Proteazomální komplex .....	12
2.5.1	20S proteazom .....	13
2.5.2	19S regulační partikule .....	14
2.6	Deubiquitinační enzymy .....	14
2.7	SUMO .....	14
3	Spermiogeneze .....	15
3.1	Formování akrozomálního váčku .....	16
3.2	Vznik bičíku .....	18
3.3	Kondenzace jádra .....	19
3.4	Mitochondrie .....	20
3.4.1	Tvorba mitochondriálního pouzdra .....	20
3.4.2	Ubiquitinace prohibitinu .....	21
3.5	Redukce organel a cytoplasmy .....	22
4	Funkce epididymis .....	23
4.1	Stavba epididymis .....	23
4.2	Maturace spermií .....	23
4.3	Selekce spermií a ubiquitin .....	24
4.3.1	Sekrece ubiquitinu do lumenu nadvarlete .....	24
4.3.2	Extracelulární ubiquitinace .....	25
4.3.3	Odstranění abnormálních spermií .....	26

5	Vliv UPS na oplození .....	27
6	Závěr.....	28
7	Literatura .....	29

## Seznam zkratk

MVBs	Multivesikulární tělíska (Multivesicular bodies)
TGN	Trans-Golgi systém (Trans-Golgi network)
UPP	Ubiquitin-proteazomální dráha
UPS	Ubiquitin-proteazomální systém
ZP	Zona pellucida

# 1 Úvod

Ubiquitin-proteazomální systém je nezbytný pro správné fungování všech eukaryotických organismů. Tato dráha je zásadní pro ATP-dependentní degradaci intracelulárních proteinů pomocí 26S proteazomu. Strukturně vysoce konzervovaná molekula ubiquitin se nachází ve všech eukaryotických buňkách, kde se podílí na důležitých procesech, např. degradaci a recyklaci proteinů, správném průběhu buněčného cyklu, regulaci transkripce nebo endocytóze membránových receptorů. Velmi důležitou roli hraje i při tvorbě pohlavních buněk. Během spermiogeneze dochází mimo jiné k ubiquitinaci histonů v jádře, prohibitinu ve vnitřní mitochondriální membráně a také dalších substrátů obsažených ve spermiu.

Ubiquitinace není omezena jen na intracelulární prostor, u pohlavních buněk je popsána i extracelulární vazba ubiquitinu. Defektní spermie jsou extracelulárně ubiquitovány v epididymis, což přispívá ke kontrole kvality spermií a jejich pozitivní selekci (Sutovsky *et al.*, 2001). Samičí pohlavní buňky jsou během oogeneze také extracelulárně ubiquitinovány (Zimmerman *et al.*, 2011).

Ubiquitin-proteazomální systém se uplatňuje i při samotném oplození (Zimmerman *et al.*, 2011). Je tedy patrné, že ubiquitin je zásadní nejen pro správné fungování buňky jako takové, ale také při jednotlivých krocích vedoucích k úspěšnému oplození oocyty spermií, a tím ke vzniku nového organismu.



## 2 Ubiquitin-proteazomální systém (UPS)

Ubiquitin-proteazomální dráha (UPP) je u eukaryot jedna z nejvíce konzervovaných drah a slouží k ATP-dependentní degradaci intracelulárních proteinů. Proteiny určené k degradaci jsou nejprve označeny několika molekulami ubiquitinu v kaskádě tří reakcí a následně zničeny ve 26S proteazomu. Důležitý je také proces deubiquitinace, díky kterému jsou molekuly ubiquitinu recyklovány k dalšímu použití.

UPS se podílí na degradaci většiny intracelulárních proteinů, mezi které patří mj. i denaturované nebo špatně sbalené proteiny. UPS ale hraje roli i v regulaci mnoha buněčných procesů. Mezi nejdůležitější patří regulace buněčného cyklu díky ubiquitin-dependentní degradaci cyklinů a regulace transkripce.

### 2.1 Ubiquitin

Ubiquitin je 8,5 kDa velký protein obsahující 76 aminokyselinových zbytků. Jedná se o kompaktní globulární strukturu s hydrofobním jádrem (Vijay-Kumar *et al.*, 1985).

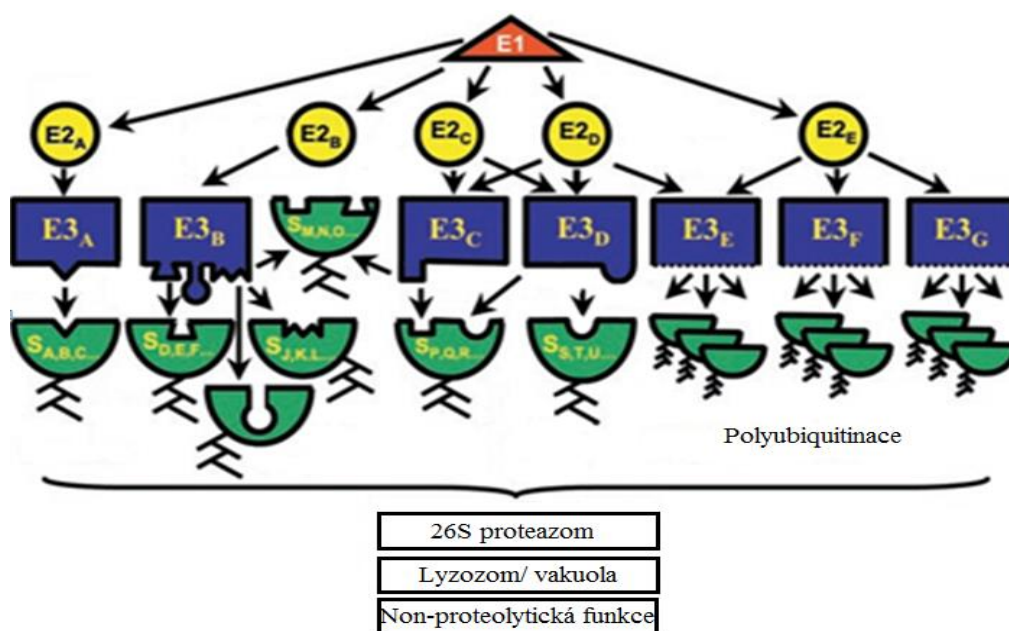
Sekvence ubiquitinu je evolučně vysoce konzervovaná a liší se jen u velmi vzdálených druhů organismů. Molekula ubiquitinu obsahuje sedm lysinových zbytků (K6, K11, K27, K29, K33, K48 a K63). Přes tyto lysinové zbytky se navzájem kovalentně vážou jednotlivé molekuly ubiquitinu a díky různým možnostem propojení lysinových zbytků mohou vzniknout strukturně odlišné polyubiquitinové řetězce. Rozdílná struktura polyubiquitinových řetězců následně určuje osud substrátu, na který jsou navázány. Například v případě proteinů směřovaných k degradaci v proteazomu se většinou jedná o propojení přes K48. Tyto proteiny musí mít polyubiquitinový řetězec obsahující minimálně čtyři lysinové zbytky. Ubiquitin neslouží jen jako značka pro proteiny určené k degradaci, ale je důležitý i v mnoha dalších dějích, které nevedou k proteolýze. Mezi nejdůležitější patří regulace endocytózy a internalizace receptorů, opravy DNA nebo regulace transkripce (shrnutí Woelk *et al.*, 2007).

### 2.2 Enzymatická kaskáda vedoucí k ubiquitinaci substrátu

UPP, vedoucí k proteolytické degradaci proteinů, je hierarchická a zahrnuje několik důležitých dějů. Nejdříve E1 aktivační enzym aktivuje ubiquitin v reakci vyžadující energii z ATP. Tím vznikne vysokoenergetický thiol-esterový intermediát E1-S~Ub. V dalším kroku se ubiquitin váže thiol-esterovou vazbou na E2 konjugační enzym opět za tvorby vysokoenergetického intermediátu. Ubiquitin je poté přenesen na E3 ligázu, která zprostředkovává vlastní připojení molekuly ubiquitinu k substrátu tím, že generuje

izopeptidovou vazbu mezi  $\alpha$ -karboxylovou skupinou na C-konci glycinového zbytku na molekule ubiquitinu a  $\epsilon$ -amino skupinou postranního řetězce lysinu na značeném proteinu (shrnutí Pickart & Eddins, 2004). Neplatí to ale vždy, neboť ubiquitin je v některých případech připojován na volnou terminální  $\alpha$ -aminoskupinu proteinu (Breitschopf *et al.*, 1998; Aviel *et al.*, 2000). Polyubiquitinovaný řetězec vzniká opakovaným přidáváním aktivovaného ubiquitinu na lysinový zbytek molekuly ubiquitinu, která je na substrát již navázána.

V buňce je velké množství substrátů, které jsou degradovány pomocí UPP, a je nutné zajistit jejich specifické rozpoznání. To je umožněno exponenciálním charakterem ubiquitinační kaskády, kdy v každém následujícím kroku této dráhy narůstá počet enzymů účastnících se jednotlivých reakcí (Obrázek 1). Například lidský genom kóduje 2 aktivační enzymy E1, 37 konjugačních enzymů E2 a 600 ligáz E3 (shrnutí Komander, 2009). Obecně se tedy dá říci, že u eukaryot se dá počet enzymů vyjádřit u E1 v jednotkách, E2 v desítkách a E3 ve stovkách. Tím je zajištěna komplexita celé dráhy a specifické rozpoznání proteinů v buňce.



**Obrázek 1:** UPP. Na začátku této dráhy je většinou jeden aktivační enzym (E1), který aktivuje ubiquitin pro všechny konjugační reakce. E1 interaguje s několika konjugačními enzymy (E2) a každý z E2 následně interaguje s několika ubiquitin ligázami (E3). Ubiquitin ligáza poté rozpoznává několik druhů substrátů a naopak jeden substrát může být navázán několika ubiquitin ligázami. (převzato Glickman & Ciechanover, 2002; upraveno).

## 2.3 Rozpoznání proteinů určených k degradaci

Označení proteinu ubiquitinem zahrnuje specifické navázání proteinu na odpovídající E3 ligázu. Je několik způsobů, jak může být substrát určený k degradaci specificky rozpoznán ligázou a následně ubiquitinován. Mezi nejdůležitější patří rozpoznání nestabilních aminokyselin na NH<sub>2</sub>-terminálním konci proteinu. Důležité je tedy pravidlo N-konce, které určuje poločas života proteinu a tím i „turnover“ daného proteinu v buňce.

Například E3 $\alpha$  ligáza obsahuje celkem tři vazebná místa. Dvě z nich rozpoznávají nestabilní aminokyseliny na N- konci proteinu, tedy „N-end rule“ substráty (jedno vazebné místo rozpoznává bazické aminokyseliny a druhé místo váže proteiny, jejichž N-konec obsahuje hydrofobní aminokyseliny). Třetí vazebné místo E3 $\alpha$  ligázy rozpoznává „non-N-end rule“ substráty, mezi které patří například proteiny acetylované na N-konci (Reiss *et al.*, 1988; Kwon *et al.*, 1998).

Špatně sbalené, abnormální nebo denaturované proteiny jsou také rozpoznávány, ubiquitinovány a následně degradovány v 26S proteazomu. Mechanismus rozpoznání těchto proteinů může spočívat v odhalení hydrofobních domén poškozených proteinů, které se jinak za normálních okolností nacházejí v jádře proteinu, nebo se účastní protein-protein interakcí. Tyto odhalené hydrofobní úseky jsou pak rozpoznány E3 ligázou. K tomu, aby byl protein rozpoznán ligázou, je někdy potřeba jeho posttranslační modifikace (fosforylace) nebo vazby na pomocný protein, který zprostředkovává vazbu mezi substrátem a ligázou (shrnutí Glickman & Ciechanover, 2002).

Mezi další motivy, které jsou rozeznávané ligázou, patří destrukční boxy u cyklinů (Yamano *et al.*, 1996).

## 2.4 Regulace dráhy

Klíčovou roli v této kaskádě hraje ubiquitin ligáza, která specificky rozeznává substrát. Je tedy patrné, že regulace této dráhy se odehrává převážně na úrovni tohoto enzymu. Je několik způsobů, jak se dá ovlivnit činnost ubiquitin ligázy a tím i celé dráhy vedoucí k ubiquitinaci. Jedná se většinou o posttranslační modifikace buď substrátu nebo přímo E3 ligázy. Ty mohou způsobit inhibici nebo aktivaci ubiquitin ligázy, ale také ovlivnit rozpoznání substrátu.

Jednou z modifikací je fosforylace substrátu, což je běžná cesta k tvorbě vazebného místa pro E3 ligázu (shrnutí Woelk *et al.*, 2007). Na druhou stranu fosforylace některých proteinů může bránit jejich navázání na E3 ligázu a tím i jejich degradaci v 26S proteazomu

(Gao *et al.*, 2006). Fosforylace substrátu tedy může působení UPS regulovat pozitivně i negativně.

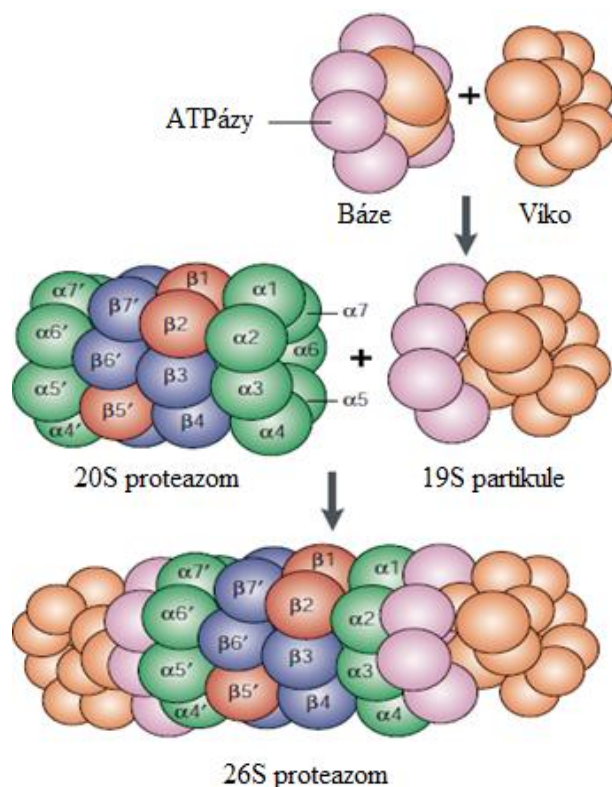
Fosforylován může být přímo E3 enzym. Tato modifikace může vést k inhibici nebo aktivaci enzymatické aktivity ligázy. Některé E3 ligázy mohou být fosforylací určitých aminokyselinových zbytků aktivovány (Gallagher *et al.*, 2006), zatímco fosforylace jiných zbytků u nich vede k inhibici aktivity (Yang *et al.*, 2006).

Další důležitou posttranslační modifikací, která přispívá k regulaci UPP, je ubiquitinace E3 ligázy. Může se jednat o označení ligázy polyubiquitinovým řetězcem - autoubiquitinaci, což vede k její degradaci a tím i k regulaci množství E3. Ubiquitinace ligázy E3 však nemusí vždy vést jen k její proteolýze v 26S proteazomu. Některé ligázy pomocí autoubiquitinace regulují svoji aktivitu (Ben-Saadon *et al.*, 2006).

Regulace dráhy se může odehrávat i na úrovni konjugačního kroku. Změna aktivity nebo koncentrace E2 může ovlivnit značení substrátů ubiquitinem (shrnuto Pickart & Eddins, 2004).

## 2.5 Proteazomální komplex

Konečným bodem UPP je 26S proteazom (Obrázek 2), intracelulární multikatalytická proteáza nacházející se v prokaryotech i eukaryotech. Zde probíhá vlastní ATP dependentní proteolýza. 26S proteazom se skládá z 20S jádra a dvou 19S regulačních partikulí. 19S komplex rozpoznává ubiquitinované substráty a pomocí deubiquitinační aktivity odstraňuje z proteinu polyubiquitinový řetězec. Následně rozbaluje protein a translokuje ho do 20S jádra, kde probíhá vlastní hydrolýza substrátu. Protein je v 20S proteazomu štěpen na malé peptidy o velikosti 3 - 23 aminokyselin. Produktem 26S proteazomu jsou tedy jednak malé peptidy, ale také molekuly ubiquitinu, které jsou následně recyklovány a znovu použity v UPP.



**Obrázek 2:** Znázornění podjednotek 26S proteazomu. 26S proteazom se skládá z 20S proteazomu a dvou 19S partikulí. 20S proteazom je složen ze čtyř koncentrických prstenců - 2 vnější obsahují  $\alpha$  podjednotky ( $\alpha 1$ -  $\alpha 7$ ; zeleně) a 2 vnitřní prstence jsou složeny z  $\beta$  podjednotek ( $\beta 1$ -  $\beta 7$ ; modře a červeně). Červeně znázorněné  $\beta$  podjednotky mají katalytickou aktivitu (na každém z  $\beta$  prstenců jsou tři místa s katalytickou aktivitou). 19S partikule zahrnuje dvě substruktury - bázi a víko. Báze přiléhá z obou stran 20S proteazomu na  $\alpha$  podjednotky a je složena ze šesti ATPázových podjednotek (fialově) a dvou podjednotek, které nemají ATPázovou aktivitu (oranžově). Víko obsahuje deset non-ATPázových podjednotek (oranžově); (převzato Kloetzel, 2001; upraveno).

### 2.5.1 20S proteazom

20S jádro je soudkovitá struktura skládající se ze 4 koncentrických prstenců - dva vnější  $\alpha$  a dva vnitřní  $\beta$ . Každý prstenec obsahuje sedm podjednotek ( $\alpha 1$ -7,  $\beta 1$ -7). Na každém z obou prstenců  $\beta$  jsou tři podjednotky ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  a  $\beta 5$ ), které obsahují katalytická místa. Ta se podílí na vlastním štěpení substrátu.  $\beta 1$  má aktivitu podobnou kaspázám (peptidyl-glutamyl-peptidová hydrolýza),  $\beta 2$  trypsinovou aktivitu a  $\beta 5$  chymotrypsinovou aktivitu (Groll *et al.*, 2006). Dále bylo zjištěno, že  $\beta 1$  štěpí za kyselými nebo malými hydrofobními aminokyselinami,  $\beta 2$  za bazickými nebo malými hydrofobními aminokyselinami a  $\beta 5$  za hydrofobními aminokyselinami (Dick *et al.*, 1998).

Prstence  $\alpha$  nemají katalytickou aktivitu, ale slouží ke stabilizaci vnitřních  $\beta$  prstenců a k vazbě 19S regulačních partikulí.  $\text{NH}_2$  terminální zbytky  $\alpha$  podjednotek jsou navzájem

propojené a blokují vstup do lumenu 20S proteazomu. Při translokaci proteinu do 20S proteazomu je tedy nutné zablokování těchto NH<sub>2</sub> skupin pomocí 19S regulační partikule (Groll *et al.*, 2000).

### 2.5.2 19S regulační partikule

19S partikule se mohou nacházet na obou stranách 20S jádra, kde se vážou na  $\alpha$  prstence. Regulační partikule se skládá z báze a víka a obsahuje mj. i šest ATPázových podjednotek, které se podílejí na rozbalování a translokaci proteinů do lumenu 20S proteazomu. Podjednotky báze Rpn 1 a Rpn 2 obsahují oblasti bohaté na leucin (LRR), což jsou domény zajišťující protein-protein interakce (Lupas & Baumeister, 1997). Ale i samotné ATPázy jsou schopné interagovat se substrátem a podílí se tak na vazbě proteinu (shrnuto Glickman & Ciechanover, 2002).

## 2.6 Deubiquitinační enzymy

Pro správnou funkci UPS je nezbytný i proces deubiquitinace. Ubiquitin je uvolněný ze substrátu pomocí deubiquitinačních enzymů, následně recyklován a použit v dalších buněčných procesech. Deubiquitinační enzymy můžeme rozdělit do dvou tříd: ubiquitin C-terminální hydrolázy a ubiquitin-specifické proteázy.

Některé deubiquitinační enzymy se vyskytují volně v cytoplasmě, zatímco jiné jsou vázané. Například 19S partikule obsahuje deubiquitinační domény, které se podílejí na odstraňování polyubiquitinových řetězců z proteinů před jejich degradací v proteazomu. Ubiquitin C-terminální hydroláza může být i součástí 26S proteazomálního komplexu (Eytan *et al.*, 1993).

## 2.7 SUMO

Mezi další posttranslační modifikace proteinů, přispívajících k regulaci důležitých buněčných procesů, patří sumoylace. Je zde zmíněna proto, že protein SUMO patří do skupiny „Ubiquitin-like proteins“. Zatímco sekvenční podobnost ubiquitinu a SUMO je malá (18 %), terciální struktura je velmi podobná (Bayer *et al.*, 1998).

Funkce ubiquitinu je často podmíněna tvorbou polyubiquitinových řetězců, naopak SUMO se většinou vyskytuje ve formě monomeru. Oba proteiny regulují aktivitu a lokalizaci některých proteinů, přičemž se mohou vázat na stejný substrát, ale důsledky této vazby jsou

jiné. SUMO se na rozdíl od ubiquitinu zřejmě nepodílí na značení proteinů určených k degradaci (shrnutí Gill, 2004).

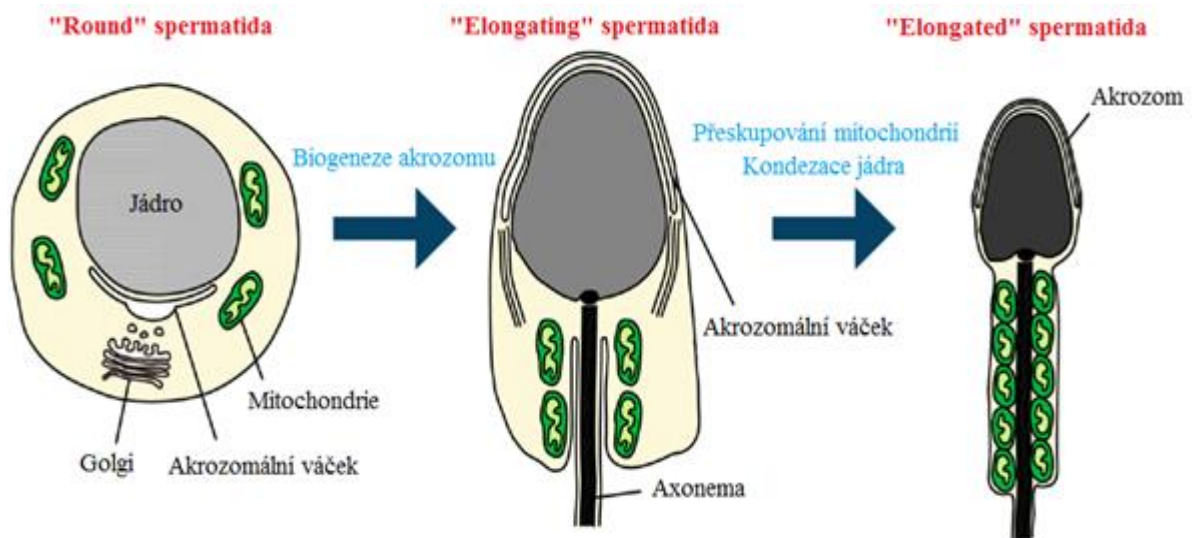
Akumulace SUMO byla potvrzena v abnormálních nebo nepohyblivých spermích (Vigodner *et al.*, 2013). Sumoylace tedy může, vedle ubiquitinu, sloužit jako přídatný marker pro defektní spermie.

### 3 Spermioogeneze

Tvorba samčích pohlavních buněk - spermii zahrnuje procesy spermatogenezi a spermioogenezi ve varlatech a poté maturaci v epididymis. Při spermatogenezi vznikají ze spermatogonií haploidní spermatidy. Tento děj zahrnuje dvě meiotická dělení. Haploidní spermatidy poté podstupují řadu morfologických změn v procesu spermioogeneze. Výsledkem spermioogeneze jsou tedy morfologicky zralé spermie - spermatozoa, které jsou však nepohyblivé a neschopné oplodnit oocyt. Dalším důležitým krokem v tvorbě spermii je proto jejich maturace v epididymis, díky které jsou spermie kompetentní k oplození.

Na začátku spermioogeneze je kulatá spermatida, která musí dramaticky změnit tvar, aby dosáhla výsledné podoby spermie (Obrázek 3). Mezi morfologické změny, které jsou k tomu nezbytné, patří: formování akrozomálního váčku, vznik bičíku, tvorba mitochondriálního pouzdra v „midpiece oblasti“ a redukce cytoplasmy a organel. Důležitá je také kondenzace jádra, která zahrnuje výměnu histonů za protaminy. Spermioogenezi u savců můžeme rozdělit do čtyř fází: Golgi, „cap“, akrozomální fáze a maturační fáze.

Spermioogeneze je komplikovaný diferenační proces, při kterém vznikají nové struktury. Na druhou stranu jsou ze spermatidy odstraňovány nadbytečné organely a cytosol ve formě tzv. residual bodies. Dochází také k degradaci špatně sbalených, abnormálních nebo nadbytečných proteinů v UPP. UPS je tedy důležitý ve všech fázích spermioogeneze. Při deficienci nebo abnormální produkci ubiquitinu a enzymů UPS mohou vzniknout poškozené spermie nebo je spermatogeneze zcela blokována, což vede k různým stupňům neplodnosti (shrnutí Hou & Yang, 2013).



**Obrázek 3:** Tento obrázek znázorňuje biogenezi organel a morfologické změny během spermiogeneze. Ve fázi „round“ spermatidy se začíná formovat akrozomální váček a zvětšuje se díky fúzím s proakrozomálními váčky. V „elongating“ spermatidě se akrozomální váček zplošťuje a začne pokrývat anteriorní polovinu jádra. V jádře probíhá histon-protaminová výměna, díky které dochází ke kondenzaci jádra. Mitochondrie jsou transportovány do midpiece oblasti vyvíjejícího se bičíku, kde tvoří mitochondriální pouzdro (převzato Nakamura, 2013, upraveno).

### 3.1 Formování akrozomálního váčku

V časných fázích spermiogeneze začíná biogeneze akrozomálního váčku. Ten obsahuje lytické enzymy a je nezbytný pro penetraci zony pellucidy během oplození. Prvním krokem tvorby akrozomu je uvolňování proakrozomálních váčků z Golgiho komplexu a jejich plnění akrozomálními proteiny a enzymy syntetizovanými v *trans*-Golgi (TGN). K tvorbě akrozomálního váčku zřejmě přispívá i retrográdní transport váčků z plazmatické membrány a endosomu. Splýváním proakrozomálních váčků vzniká jediný akrozomální váček, který je v kontaktu s jadernou obálkou. Asociaci mezi akrozomem a jadernou obálkou zajišťuje subakrozomální vrstva (acroplaxome). Během „cap“ fáze spermiogeneze se akrozomální váček zvětšuje díky fúzím s dalšími proakrozomálními váčky. Akrozom se zároveň začne zplošťovat a postupně pokrývá anteriorní polovinu jádra. K dalším modifikacím akrozomu dochází během maturace spermií v epididymis. Mezi tyto změny patří např. remodelace akrozomální membrány (Phillips *et al.*, 1991).

S biogenezí akrozomálního váčku je asociováno několik enzymů UPS. Jedním z příkladů je Golgi-asociovaný protein TMF/ARA160. Tento protein se účastní transportu váčků odvozených z Golgi, ale vykazuje také E3 ligázovou aktivitu. Exprese proteinu TMF/ARA160 je zvýšená ve varlatech a jeho přítomnost byla prokázána ve spermatocytech a

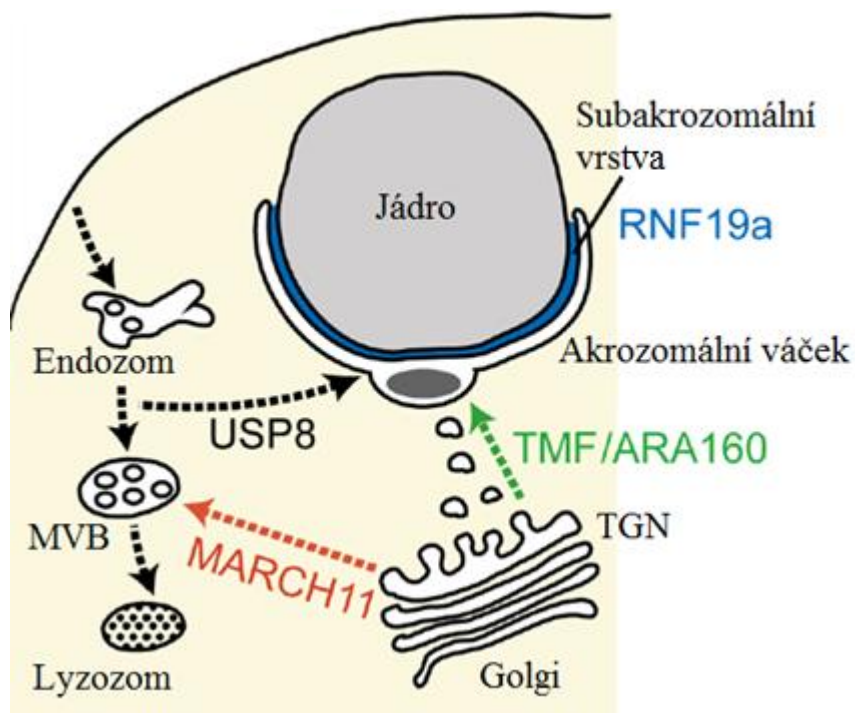


spermatidách. Tam je tento protein lokalizován vedle vyvíjejícího se akrozomu. Není tedy integrální součástí akrozomálního váčku, ale může hrát roli v jeho formování. Ligázová aktivita TMF/ARA160 se může podílet i na odstraňování nadbytečné cytoplazmy ve vyvíjející se spermatidě. (Lerer-Goldshtein *et al.*, 2010; shrnuto Nakamura, 2013).

UPS se při biogenezi akrozomálního váčku podílí také na kontrole kvality proteinů. V následujících odstavcích bude popsáno několik příkladů enzymů UPS, které jsou důležité při kontrole kvality spermií v různých krocích biogeneze akrozomu. Prvním ze zmíněných enzymů je ubiquitin ligáza Rnf19a, která je součástí proakrozomálních váčků, vnější membrány akrozomálního váčku a subakrozomální vrstvy. Rnf19a interaguje s komponentou 26S proteazomu Psmc3, která tvoří jednu ze šesti ATPázových podjednotek na 19S partikuli (Rivkin *et al.*, 2009). Rnf19a tedy zprostředkovává protezomální degradaci abnormálních nebo špatně sbalených proteinů v akrozomu a subakrozomální vrstvě a přispívá tak k biogenezi akrozomu (shrnuto Nakamura, 2013).

Dalším z příkladů je ubiquitin ligáza MARCH11, která je exprimována hlavně v „round“ spermatidě. Je lokalizovaná ve váčcích odvozených z *trans*-Golgi a v tzv. „multivesicular bodies“ (MVBs), které jsou součástí endosomálního systému. Ubiquitin ligáza MARCH11 hraje roli v ubiquitin-zprostředkovaném třídění proteinů v TGN-MVB transportní dráze, a může tak přispívat k akrozomální formaci (Morokuma *et al.*, 2007; shrnuto Hou & Yang, 2013). Bylo ukázáno, že MARCH11 asociuje s ubiquitinovanými glykoproteiny obsahujícími fukózu a transportuje je do MVB během akrozomální formace (Morokuma *et al.*, 2007; shrnuto Nakamura, 2013).

Kontroly kvality proteinů se při biogenezi akrozomu účastní i deubiquitinační enzymy. Jedním z nich je enzym USP8, který kontroluje kvalitu proteinů v retrogradní dráze směřující z endosomu do budoucího akrozomu. Díky deubiquitinační aktivitě reguluje množství ubiquitinace proteinů určených k degradaci (shrnuto Nakamura, 2013). Na obrázku 4 je schematické znázornění výše zmíněných enzymů UPS, které se podílejí na formování akrozomálního váčku.



**Obrázek 4:** Schématické znázornění transportních drah účastnících se akrozomální formace. Obrázek také znázorňuje enzymy UPS, které se účastní regulace těchto drah během biogeneze akrozomu. Anterográdní biosyntetická dráha je znázorněna zeleně, retrográdní dráha černě, TGN- MVB červeně. Ubiquitin ligázy obsažené v subakrozomální vrstvě jsou označeny modře (převzato Nakamura 2013, upraveno).

### 3.2 Vznik bičíku

K tomu, aby byla spermie schopná oplodnit oocyt, je potřeba, aby byla pohyblivá. Motilitu spermie zajišťuje bičík, který se formuje během spermiogeneze. Ve fázi „round“ spermatidy vytvoří distální centriola základ pro axonemu. Ta se skládá z centrálního páru mikrotubulů a devíti párů mikrotubulů, které ho obklopují. Paralelně k vnějším párům mikrotubulů jsou vnější denzní vlákna, která zajišťují flexibilitu a pevnou oporu bičíku. Hlavní část bičíku je navíc pokryta vláknitým pouzdem.

Byla zjištěna přítomnost ubiquitin ligázy Rnf19a ve vyvíjejícím se bičíku spermie. Uspořádání vnějších denzních vláken a vláknitého pouzdra kolem axonemy při vývoji bičíku může vyžadovat účast ubiquitin ligázy Rnf19a. Rivkin *et al.* (2009) zároveň předpokládá, že Rnf19a společně s 26S proteazomem mohou zajišťovat správné uspořádání proteinů a jejich transport ve vyvíjejícím se bičíku spermie. Rnf19a je výše již zmíněna a podílí se na formaci akrozomálního váčku.

### 3.3 Kondenzace jádra

Spermiogeneze zahrnuje dramatické změny v chromatinové struktuře, a to na úrovni molekulární i funkční. V jádře „round“ spermatidy je chromatin tvořen komplexy DNA s histony a je transkripčně aktivní. Základní stavební jednotkou chromatinu je nukleosom. Jedná se o 146 bp dlouhou DNA navinutou na oktamer histonů, skládající se z podjednotek H2A, H2B, H3 a H4, přičemž každá je zde obsažena dvakrát. Jednotlivé nukleosomy jsou propojeny tzv. linker DNA, na kterou jsou navázány histony H1. Hlavní funkcí histonů H1 je stabilizace struktury solenoidu.

Histony mohou být posttranslačně modifikovány. Mezi hlavní modifikace histonů patří acetylace, metylace, fosforylace a ubiquitinace. Kombinací těchto posttranslačních modifikací mohou vznikat různé signály, které ovlivňují strukturu a funkci chromatinových domén včetně transkripční aktivity.

Během prodlužování spermatidy dochází ke kondenzaci chromatinu. Jedním z důvodů těsnějšího uspořádání chromatinu je ochrana DNA před poškozením nukleázami a mutacemi během skladování spermií a jejich následné cesty v samičím pohlavním traktu. Dalším důvodem kondenzace chromatinu je nutnost zmenšení jádra při formování hlavičky spermie. První fáze kondenzace chromatinu zahrnuje výměnu histonů transičními proteiny (TP1, TP2 a TP4). Ty jsou v další fázi nahrazeny malými bazickými proteiny protaminy, které jsou bohaté na arginin. Protaminy se vážou do malého žlábků DNA, a to tak, že kladné argininové zbytky interagují se zápornými fosfátovými skupinami DNA, čímž neutralizují její záporný náboj. Důsledkem interakce mezi protaminy a DNA je kondenzace chromatinu a inaktivace transkripce.

Při kondenzaci chromatinu, tedy při histon-protaminové výměně, hraje důležitou roli ubiquitinace histonů. Tato modifikace destabilizuje nukleosom a přispívá tak k relaxaci této struktury. Histony mohou být poté odstraněny z nukleosomu, nahrazeny transičními proteiny a následně i protaminy. Ve fázi prodlužování spermatidy se v jádře nacházejí ubiquitinované formy histonů H2A i H2B i H3. Ubiquitinace histonů H3 je zřejmě specifická pouze pro „elongating“ spermatidy ve varlatech. Množství ubiquitinovaných histonů H3 se v této fázi vývoje spermatid pohybuje okolo 2% (Chen *et al.*, 1998). Na druhou stranu ubiquitinované formy histonů H2A (uH2A) a H2B (uH2B) se nacházejí v mnoha buněčných typech. U buněk myši bylo zjištěno, že se v jejich jádře nachází 11% histonů H2A ve formě uH2A a asi 1% histonů H2B je ve formě uH2B (West & Bonner, 1980). Množství ubiquitinovaných histonů

H2A v průběhu spermiogeneze klesá. V „elongating“ spermatidách je tedy procento uH2A nejnižší (Chen *et al.*, 1998).

Na ubiquitinaci histonů se podílí enzymy UPS. Je tedy zřejmé, že při jejich deficienci nebo defektu v UPP může docházet k abnormalitám v morfologii spermie a ke sterilitě. Jedním z příkladů může být deficience ubiquitin ligázy RNF8, která se podílí na ubiquitinaci histonů H2A a H2B. RNF8-deficientní myši jsou neplodné a jejich spermie vykazují abnormální kulaté hlavičky a nižší pohyblivost (Lu *et al.*, 2010). Dalším příkladem je konjugační enzym HR6B, jehož mutace mohou způsobit mužskou neplodnost (Roest *et al.*, 1996). U HR6B “knockoutovaného“ samce myši je vážně porušený vývoj spermatid ve fázi prodlužování (Baarends *et al.*, 1999).

Kondenzaci chromatinové struktury zřejmě podporují i další posttranslační modifikace histonů. Qian *et al.* (2013) ukázali, že jako signál pro rozpoznání histonů určených k degradaci neslouží ubiquitinace, ale acetylace. Proteazomální aktivátor PA200, který je navázán na 20S proteazom, rozpoznává acetylované histony a směřuje je k degradaci v proteazomu. U myši bylo zjištěno, že deficience PA200 vede k omezené plodnosti (Khor *et al.*, 2006). Byl prokázán také úzký vztah mezi ubiquitinací histonu H2A a acetylací histonu H4 (Lu *et al.*, 2010).

## **3.4 Mitochondrie**

### **3.4.1 Tvorba mitochondriálního pouzdra**

Během spermiogeneze dochází k redukci mitochondrií. Přibližně polovina mitochondrií je odstraněna spolu s nadbytečnou cytoplasmou ve formě „residual bodies“. Druhá polovina mitochondrií získá vyztuženou membránu (mitochondriální kapsli) a migruje do tzv. midpiece oblasti nacházející se na bázi vyvíjejícího se bičíku spermie. Tam jsou mitochondrie uspořádány do spirálovitého mitochondriálního pouzdra, které obaluje kontraktilní elementy bičíku. Během maturační fáze spermiogeneze pak dochází ke kondenzaci a utahování šroubovité struktury mitochondrií. Mitochondrie následně zajišťují energii pro motilitu bičíku.

Mitochondrie neustále fúzí nebo se naopak dělí a tvoří tak dynamickou strukturu. K udržování dynamiky je potřeba několika proteinů. U savců zajišťují fúzi mitochondrií proteiny mitofusin 1 a mitofusin 2 (Mfn1, Mfn2), které patří do rodiny GTPáz. Naopak dělení je řízeno GTPázou Drp1, která interaguje s proteinem vnější mitochondriální membrány

hFis1. Rovnováha mezi fúzováním a dělením určuje distribuci a morfologii mitochondrií, což je důležité i během spermiogeneze při transportu mitochondrií do „midpiece“ oblasti. Tato rovnováha je udržována díky regulaci poměru proteinů Mfn1, Mfn2 a Drp1, a to jejich ubiquitinací a následnou degradací. Na ubiquitinaci těchto substrátů se podílí E3 ligáza MITOL nacházející se ve vnější mitochondriální membráně (shrnutí Park *et al.*, 2010). Bylo zjištěno, že v „round“ a „elongating“ spermatidách je zvýšená exprese Mfn2 a Drp1, což ukazuje na zvýšenou frekvenci fúzí a dělení mitochondrií během spermiogeneze (Honda & Hirose, 2003). UPS hraje tedy klíčovou roli i při tvorbě mitochondriálního pouzdra.

### 3.4.2 Ubiquitinace prohibitinu

U savců se mitochondrie dědí maternálně, zatímco mitochondrie obsažené ve spermii jsou selektivně degradovány už v časně fázi embryogeneze. Důvod maternální dědičnosti mitochondrií může být evoluční (výběr nejvhodnějšího mitochondriálního genomu během oogeneze díky „bottleneck“ efektu) nebo vývojový (výhoda eliminace spermií náchylných na mutace mitochondriální DNA); (shrnutí Ankel-Simons & Cummins, 1996).

Počet kopií mitochondriální DNA ve spermii je mnohem nižší ve srovnání s počtem kopií mitochondriální DNA obsažených v oocytu. Ve spermii se počet kopií pohybuje v rozmezí desítek až tisíců, zatímco oocyt může obsahovat 100 000 - 1000 000 kopií mitochondriální DNA (shrnutí Nakamura, 2013).

Sutovsky *et al.* (2000) předpokládají, že paternální mitochondrie jsou ještě před oplozením ubiquitinovány a po proniknutí do oocytu zničeny v lyzozomu nebo proteazomu. Degradace je však pouze druhově specifická (Sutovsky *et al.*, 2000). Zdá se, že prohibitin, protein vnitřní mitochondriální membrány je jedním ze substrátů, které jsou v mitochondriích značeny ubiquitinem a hraje tak důležitou roli v maternální dědičnosti mitochondrií (Sutovsky *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2003).

Prohibitin, 30 kDa velký konzervovaný protein, je produkován Leydigovými a Sertoliho buňkami ve varlatech. Ukázalo se, že prohibitin blokuje syntézu DNA, čímž působí jako inhibitor mitózy a meiózy při spermatogenezi a zároveň má antiproliferační vlastnosti (Nuell *et al.*, 1991; Choongkittaworn *et al.*, 1993). Ubiquitinace prohibitinu může mít tedy i další funkci. Prohibitin za normálních okolností brání vstupu buňky do S-fáze buněčného cyklu (Nuell *et al.*, 1991). Když jsou ale mitochondrie nesoucí prohibitin po vstupu spermie do oocytu degradovány, embryo se může normálně vyvíjet (Sutovsky *et al.*, 2000).

K ubiquitinaci prohibitinu může docházet ve varlatech, při maturaci v epididymis i v samotné cytoplasmě oocyty. Co se týká spermiogeneze, ubiquitinová značka je k prohibitinu připojena ve fázi „round“ spermatidy (Thompson *et al.*, 2003). Mechanismus ubiquitinace však není dosud jasný. Jedním z možných vysvětlení je, že dojde k apoptóze vnější mitochondriální membrány, čímž se odhalí vnitřní membrána obsahující mj. i prohibitin. Ten pak může být označen ubiquitinem (Martinou *et al.*, 1999; Sutovsky *et al.*, 2001). Ubiquitované prohibitiny jsou během průchodu epididymis maskovány díky zesíťování pomocí disulfidických vazeb a „objeví se“ znovu až po vniknutí spermie do oocyty díky redukčnímu prostředí cytoplasmy oocyty (Sutovsky *et al.*, 2000). Poté jsou degradovány v lyzozomu nebo proteazomu oocyty.

Prohibitin může hrát i roli chaperonu jiných mitochondriálních membránových proteinů při jejich degradaci proteolýzou (shrnutí Arnold & Langer, 2002).

### **3.5 Redukce organel a cytoplasmy**

V procesu spermiogeneze jsou ze spermatidy odstraněny některé organely nebo buněčné struktury. Mezi ty patří Golgi, endoplasmatické retikulum a asi polovina mitochondrií. Dále dochází k úplnému odstranění nebo redukci centrozomu a odstranění nukleárních pórů (shrnutí Sutovsky, 2003).

Během prodlužování spermatidy dochází také k dramatické redukci cytoplasmy. Nadbytečná cytoplasmata a některé organely jsou ze spermatidy odvrženy ve formě „residual bodies“. Ty jsou poté fagocytovány Sertoliho buňkami. Na krčku spermie zůstanou malé zbytky cytoplasmy - cytoplasmatické kapky, které při průchodu epididymis migrují podél bičíku (Nicander & Glover, 1973).

## 4 Funkce epididymis

Spermie, které vzniknou při spermiogenezi, jsou sice morfologicky zralé, ale ještě nejsou schopné oplodnit oocyt. Když tyto spermie opustí varlata, dostanou se do epididymis (nadvarlata), kde dochází k jejich maturaci. Výsledkem maturace jsou motilní spermie kompetentní k tomu, aby mohly oplodnit oocyt. Další důležitou funkcí epididymis je skladování zralých spermií a jejich udržování v životaschopném stavu, dokud nejsou ejakulovány.

V epididymis dochází také k selekci spermií. Defektní nebo abnormální spermie jsou extracelulárně ubiquitinovány (Sutovsky *et al.*, 2001) a následně fagocytovány epiteliálními buňkami epididymis. Jedná se o jeden z mechanismů kontroly kvality spermií během spermatogeneze.

### 4.1 Stavba epididymis

Epididymis se skládá ze tří částí: hlava (cauda), tělo (corpus) a ocas (caput), který pokračuje v chámovod. Epididymis můžeme rozdělit i ultrastrukturálně na jednotlivé regiony. Každá část epididymis plní jinou funkci při zrání, výživě, transportu a skladování spermií. Cauda a corpus se podílí především na maturačních procesech, zatímco caput slouží hlavně ke skladování zralých spermií.

Pro řízení maturačních procesů probíhajících v epididymis je důležité prostředí v jeho lumenu. Složení epididymální tekutiny se mění v rámci jednotlivých částí epididymis a ovlivňuje tak posloupnost změn probíhajících v rámci maturace (shrnutí Axner, 2006; shrnutí Cornwall, 2009).

Epitel epididymis obsahuje mnoho druhů buněk, které zastávají různé funkce. Nejdůležitější roli při maturačních, ale i ubiquitinačních procesech hrají tzv. principal cells, které plní absorpční a sekreční funkci. Mezi další buňky epitelu patří apikální buňky, které sekretují H<sup>+</sup> do lumenu epididymis a tím ho okyselují, nebo „clear cells“ endocytující proteiny a částice z lumenu. Jiné buňky epitelu mají ochrannou nebo imunitní funkci (shrnutí Cornwall 2009).

### 4.2 Maturace spermií

Proces maturace zahrnuje morfologické, biochemické i fyziologické změny spermií. Při průchodu spermie epididymis dochází k tvorbě disulfidických můstků mezi protaminy, což přispívá ke stabilizaci jádra. Zároveň se mění složení membrány a dochází ke změnám

akrozomálního váčku (shrnutí Axner, 2006). Výsledkem těchto dějů je zralá a pohyblivá spermie.

Maturace spermií je ovlivněna rozdílnou sekrecí proteinů v jednotlivých segmentech epididymis, ale také dalšími faktory, mezi které patří mj. pH lumenu (Yeung *et al.*, 2004).

### 4.3 Selekce spermií a ubiquitin

Pro úspěšné oplození je nezbytné, aby byly obě gamety (samčí i samičí) plně funkční. Během spermatogeneze však mohou vzniknout i spermie, které jsou defektní nebo abnormální a nejsou schopné oplodnit oocyt. Je tedy nezbytná kontrola kvality spermií zahrnující mj. rozpoznání a označení abnormálních spermií ubiquitinem při jejich průchodu epididymis a jejich následné odstranění (Sutovsky *et al.*, 2001). Zatímco k ubiquitinaci většinou dochází v jádře nebo cytosolu, v tomto případě se jedná o extracelulární ubiquitinaci.

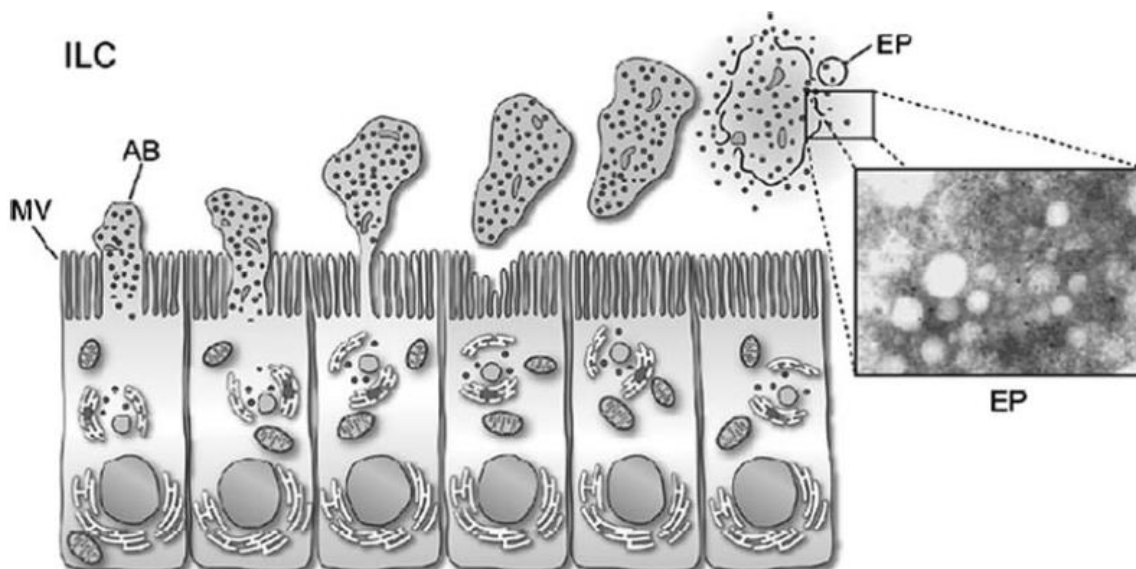
Mezi mírou ubiquitinace a kvalitou spermií je nepřímá úměrnost, přičemž míra ubiquitinace koreluje s mírou poškození struktury DNA (Sutovsky *et al.*, 2002). Ubiquitin tedy může sloužit jako marker kvality spermií (Sutovsky *et al.*, 2001).

#### 4.3.1 Sekrece ubiquitinu do lumenu nadvarlete

Ubiquitin a enzymy UPS jsou do lumenu epididymis sekretovány tzv. principal cells epitelu (Obrázek 5). Jedná se o apokrinní sekreční mechanismus. Malé membránou uzavřené partikule epididymosomy přenášejí proteiny (integrální membránové proteiny a cytosolické proteiny sekretované epididymis) na membránu spermie (Frenette & Sullivan, 2001).

Na přenosu proteinů v lumen epididymis se ale mohou podílet i „apical blebs“ (Hermo & Jacks, 2002), které byly dříve mylně považovány pouze za artefakt vzniklý fixací tkáně. Později se ale ukázalo, že se jedná o unikátní sekretorickou apokrinní dráhu. „Apical blebs“ jsou velké váčky, které se oddělují od apikálního povrchu epididymálních epitelálních buněk a obsahují sekretované proteiny. Akumulace ubiquitinu i proteazomů byla prokázána v „apical blebs“ u člověka i jiných savců (Baska *et al.*, 2008).





**Obrázek 5:** Schématické znázornění apokrinní sekrece v principiálních buňkách v epididymis. Detail, fotografie z elektronového mikroskopu, znázorňuje epididymosomy. AB- „apical blebs“, EP- epididymosomy, ILC- intraluminální kompartment, MV- mikrovilli (převzato Sullivan *et al.*, 2007).

### 4.3.2 Extracelulární ubiquitinace

Extracelulární ubiquitinace v epididymis zřejmě přispívá k degradaci abnormálních spermií, ale zároveň může chránit reprodukční systém před autoimunní neplodností. Ubiquitinace defektních komponentů na povrchu spermie může sloužit také jako prevence před imunitní reakcí způsobenou právě těmito vadnými částmi (shrnutí Baska *et al.*, 2008).

Mechanismus selektivního rozpoznání abnormálních spermií není dosud jasný. V defektních spermích byl nalezen Fas-ligand, který patří mezi apoptotické antigeny (Sakkas *et al.*, 1999). Je tedy možné, že ubiquitinace v epididymis je mezikrokem nebo koncovým bodem apoptotických mechanismů probíhajících v epididymis, které rozpoznávají poškození DNA nebo jiných struktur. Denaturované nebo špatně sbalené povrchové antigeny na spermii mohou být také důvodem k ubiquitinaci (Sutovsky *et al.*, 2001).

Analýza ubiquitin-pozitivních spermií odhalila přítomnost poškozené DNA a řadu morfologických defektů (Sutovsky *et al.*, 2002). Mezi ně patří zkroucený bičík (coiled tail, tzv. „Dag effect“), zdvojený bičík, zdvojená nebo abnormální hlava spermie nebo abnormální střední část bičíku. Zároveň Sutovsky *et al.* (2002) zjistili, že defektní spermie jsou častěji ubiquitinovány na bičíku než na hlavičce a hlavička a bičík se od sebe mohou oddělit. Byla

prokázána také vysoká míra ubiquitinace cytoplasmatických kapek (cytoplasmic droplets) kolem bičíku spermie (Sutovsky *et al.*, 2001).

### **4.3.3 Odstranění abnormálních spermií**

Během průchodu epididymis klesá procento ubiquitinovaných spermií mezi caputem a caudou (Sutovsky *et al.*, 2001), tedy spermií, které jsou defektní. To nasvědčuje tomu, že jsou ubiquitinované spermie v epididymis odstraňovány, a to několika možnými cestami.

Ubiquitinované spermie mohou být fagocytovány a degradovány proteolýzou (Sutovsky *et al.*, 2001). Některé vadné spermie ale uniknou degradačním mechanismům a můžeme je najít v ejakulátu.

Na fagocytóze defektních spermií se podílí epiteliální buňky a makrofágy (shrnutí Axnér, 2006). Crabo *et al.*, (1971) ukázali, že jsou spermie s abnormálními hlavičkami fagocytovány epiteliálními buňkami v ductus efferentes (kanálek spojující varle s iniciálním segmentem epididymis). Cytoplasmatické kapky jsou fagocytovány „clear cells“ epitelu v caputu epididymis (Herms *et al.*, 1988).

Ubiquitinace abnormálních spermií a cytoplasmatických kapek může usnadnit fagocytózu. Princip je ten, že ubiquitinované částice určené k degradaci se shlukují dohromady díky kladným nábojům na lysinových zbytcích ubiquitinu, čímž přispívají k zahájení internalizace při fagocytóze (Sutovsky, 2003).

## 5 Vliv UPS na oplození

Posledním dějem, kde se uplatňuje UPS spermie, je penetrace zony pellucidy při oplození. Aby mohlo dojít k úspěšnému oplození oocytu, musí po navázání spermie dojít k akrozomální reakci. Nedávno se ale ukázalo, že při průchodu spermie zónou pellucidou (ZP) hraje významnou roli i UPS (Zimmerman *et al.*, 2011).

ZP je glykoproteinová vrstva, která obklopuje plazmatickou membránu savčích oocytů. Hlavní funkcí ZP je ochrana oocytu před mechanickým poškozením, ale je důležitá i pro specifickou vazbu spermií při oplození. ZP po oplození zaniká až ve stadiu blastocysty a brání tak předčasnému uhnízdění oocytu ve vejcovodech.

ZP se skládá ze tří hlavních glykoproteinů ZP1, ZP2 a ZP3, ale u některých savců může obsahovat i glykoprotein ZP4. Glykoproteiny ZP jsou extracelulárně ubiquitinovány, přičemž Zimmerman *et al.* (2011) dokázali přítomnost ubiquitinu u ZP1, ZP2 i ZP3. K ubiquitinaci glykoproteinů u savců dochází během oogeneze a jsou dva různé názory na mechanismus ubiquitinace. Prvním z nich je, že glykoproteiny ZP jsou ubiquitinovány už v sekreční dráze, uniknou degradaci v endoplasmatickém retikulu a poté se zabudují do ZP oocytu. Druhý názor je ten, že glykoproteiny jsou ubiquitinovány až po lokalizaci do ZP (shrnutí Zimmerman *et al.*, 2011), což podporuje i vysoká koncentrace volného ubiquitinu ve folikulární tekutině (Einspanier *et al.*, 1993).

Zimmerman *et al.* (2011) ukázali, že 26S proteazom nacházející se v akrozomu spermie rozpoznává a degraduje ubiquitinované proteiny ZP a je tak klíčovým faktorem při oplození u savců. Mechanismem je degradace ubiquitinovaných proteinů ZP, především ZP3 (plní funkci receptoru pro spermii). To pravděpodobně vede k rozvolnění struktury ZP, což přispívá k mechanickému průniku spermie přes ZP. Také se zdá, že 26S proteazom spermie degraduje proteiny asociované s akrozomální membránou, a tím napomáhá akrozomální exocytóze (Zimmerman *et al.*, 2011).

Je tedy zřejmé, že UPS hraje důležitou roli i během samotného oplození. Nicméně na spoustu otázek ještě není známá odpověď, např. jak je 26S proteazom integrován do akrozomální struktury během spermiogeneze nebo jaký je vztah mezi plodností u mužů a enzymatickou aktivitou asociovanou s 26S proteazomem spermie. Tyto otázky budou předmětem budoucích výzkumů (shrnutí Sutovsky, 2011).

## 6 Závěr

Cílem této práce bylo popsat vliv UPS na spermiogenezi u savců. Z dostupných prací zabývajících se touto problematikou vyplývá, že UPS je nezbytný jak pro tvorbu samčích pohlavních buněk během spermiogeneze, tak i pro samotné oplození. Během maturace v epididymis jsou defektní spermie extracelulárně značeny ubiquitinem, přičemž míra ubiquitinace koreluje s mírou poškození. V klinické praxi tedy ubiquitin může sloužit jako marker kvality spermií. Je zřejmé, že UPS hraje důležitou roli v procesech vedoucích k tvorbě spermií. Nicméně spousta otázek zůstává doposud nezodpovězena, např. mechanismus selektivního rozpoznání abnormálních spermií v epididymis, mechanismus ubiquitinace mitochondrií nebo konkrétní funkce UPS ve vyvíjejícím se bičíku. Tyto nejasnosti budou předmětem budoucích výzkumů.

## 7 Literatura

- Ankel-Simons, F. & Cummins, J.M. 1996. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 13859–13863.
- Arnold, I. & Langer, T. 2002. Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**: 89–96.
- Aviel, S., Winberg, G., Massucci, M. & Ciechanover, A. 2000. Degradation of epstein-barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J. Biol. Chem.* **275**: 23491–23499.
- Axnér, E. 2006. Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology* **66**: 14–24.
- Baarends, W.M., Hoogerbrugge, J.W., Roest, H.P., Ooms, M., Vreeburg, J., Hoeijmakers, J.H., *et al.* 1999. Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev. Biol.* **207**: 322–333.
- Baska, K.M., Manandhar, G., Feng, D., Agca, Y., Tengowski, M.W., Sutovsky, M., *et al.* 2008. Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *J. Cell. Physiol.* **215**: 684–696.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., *et al.* 1998. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J. Mol. Biol.* **280**: 275–286.
- Ben-Saadon, R., Zaaroor, D., Ziv, T. & Ciechanover, A. 2006. The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its in vitro histone H2A ligase activity. *Mol. Cell* **24**: 701–711.
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A & Ciechanover, A. 1998. A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J.* **17**: 5964–5973.

- Cornwall, G. a. 2009. New insights into epididymal biology and function. *Hum. Reprod. Update* **15**: 213–227.
- Crabo, B., Gustafsson, B., Nicander, L. & Rao, A. 1971. Subnormal testicular function in a bull concealed by phagocytosis of abnormal spermatozoa in the efferent ductules. *J. Reprod. Fertil.* **26**: 393–396.
- Dick, T.P., Nussbaum, A.K., Deeg, M., Heinemeyer, W., Groll, M., Schirle, M., *et al.* 1998. Contribution of proteasomal  $\beta$ -Subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J. Biol. Chem.* **273**: 25637–25646.
- Einspanier, R., Schuster, H. & Schams, D. 1993. A comparison of hormone levels in follicle-lutein-cysts and in normal bovine ovarian follicles. *Theriogenology* **40**: 181–188.
- Eytan, E., Armon, T., Heller, H., Beck, S. & Hershko, A. 1993. Ubiquitin C-terminal hydrolase activity associated with the 26 S protease complex. *J. Biol. Chem.* **268**: 4668–4674.
- Frenette, G. & Sullivan, R. 2001. Protasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Mol. Reprod. Dev.* **59**: 115–121.
- Gallagher, E., Gao, M., Liu, Y.-C. & Karin, M. 2006. Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 1717–1722.
- Gao, B., Lee, S.-M. & Fang, D. 2006. The tyrosine kinase c-Abl protects c-Jun from ubiquitination-mediated degradation in T cells. *J. Biol. Chem.* **281**: 29711–29718.
- Gill, G. 2004. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev.* **18**: 2046–2059.
- Glickman, M.H. & Ciechanover, A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**: 373–428.
- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D., Huber, R., *et al.* 2000. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 1062–1067.

- Groll, M., Berkers, C.R., Ploegh, H.L. & Ovaas, H. 2006. Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome. *Structure* **14**: 451–456.
- Hermo, L., Dworkin, J. & Oko, R. 1988. Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *Am. J. Anat.* **183**: 107–124.
- Hermo, L. & Jacks, D. 2002. Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Mol. Reprod. Dev.* **63**: 394–410.
- Honda, S. & Hirose, S. 2003. Stage-specific enhanced expression of mitochondrial fusion and fission factors during spermatogenesis in rat testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**: 424–432.
- Hou, C.-C. & Yang, W.-X. 2013. New insights to the ubiquitin-proteasome pathway (UPP) mechanism during spermatogenesis. *Mol. Biol. Rep.* **40**: 3213–3230.
- Chen, H.Y., Sun, J., Zhang, Y., Davie, J.R. & Meistrich, M.L. 1998. Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J. Biol. Chem.* **273**: 13165–13169.
- Choongkittaworn, N.M., Kim, K.H., Danner, D.B. & Griswold, M.D. 1993. Expression of prohibitin in rat seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* **49**: 300–310.
- Khor, B., Bredemeyer, A.L., Huang, C., Turnbull, I.R., Evans, R., Maggi, L.B., *et al.* 2006. Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 2999–3007.
- Kloetzel, P. 2001. Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* **2**: 179–187.
- Komander, D. 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* **37**: 937–953.
- Kwon, Y.T., Reiss, Y., Fried, V. a, Hershko, a, Yoon, J.K., Gonda, D.K., *et al.* 1998. The mouse and human genes encoding the recognition component of the N-end rule pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 7898–7903.

- Lerer-Goldshtein, T., Bel, S., Shpungin, S., Pery, E., Motro, B., Goldstein, R.S., *et al.* 2010. TMF/ARA160: A key regulator of sperm development. *Dev. Biol.* **348**: 12–21.
- Lu, L.-Y., Wu, J., Ye, L., Gavrilina, G.B., Saunders, T.L. & Yu, X. 2010. RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev. Cell* **18**: 371–384.
- Lupas, A. & Baumeister, W. 1997. A repetitive sequence in subunits of the 26S proteasome and 20S cyclosome (anaphase-promoting complex). *Trends Biochem. Sci.* **22**: 195–196.
- Martinou, I., Desagher, S., Eskes, R., Antonsson, B., André, E., Fakan, S., *et al.* 1999. The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. *J. Cell Biol.* **144**: 883–889.
- Morokuma, Y., Nakamura, N., Kato, A., Notoya, M., Yamamoto, Y., Sakai, Y., *et al.* 2007. MARCH-XI, a novel transmembrane ubiquitin ligase implicated in ubiquitin-dependent protein sorting in developing spermatids. *J. Biol. Chem.* **282**: 24806–24815.
- Nakamura, N. 2013. Ubiquitination regulates the morphogenesis and function of sperm organelles. *Cells* **2**: 732–750.
- Nicander, L., Glover T.D. 1973. Regional histology and fine structure of the epididymal duct in the golden hamster ( *Mesocricetus auratus* ). *J. Anat.* **114**: 347–364.
- Nuell, M., Stewart, D.A., Walker, L., Friedman, V., Wood, C.M., Owens, G.A., *et al.* 1991. Prohibitin , an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 1372–1381.
- Park, Y.-Y., Lee, S., Karbowski, M., Neutzner, A., Youle, R.J. & Cho, H. 2010. Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1. *J. Cell Sci.* **123**: 619–626.
- Phillips, D., Jones, R. & Shalgi, R. 1991. Alterations in distribution of surface and intracellular antigens during epididymal maturation of rat spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **29**: 347–356.



- Pickart, C.M. & Eddins, M.J. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1695**: 55–72.
- Qian, M.-X., Pang, Y., Liu, C.H., Haratake, K., Du, B.-Y., Ji, D.-Y., *et al.* 2013. Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell* **153**: 1012–1024.
- Reiss, Y., Kaim, D. & Hershko, A. 1988. Specificity of binding of NH<sub>2</sub>-terminal residue of proteins to ubiquitin-protein ligase. *J. Biol. Chem.* **263**: 2693–2698.
- Rivkin, E., Kierszenbaum, A.L., Gil, M. & Tres, L.L. 2009. Rnf19a, a ubiquitin protein ligase, and Psmc3, a component of the 26S proteasome, tether to the acrosome membranes and the head-tail coupling apparatus during rat spermatid development. *Dev. Dyn.* **238**: 1851–1861.
- Roest, H.P., van Klaveren, J., de Wit, J., van Gurp, C.G., Koken, M.H., Vermey, M., *et al.* 1996. Inactivation of the HR6B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. *Cell* **86**: 799–810.
- Sakkas, D., Mariethoz, E. & St John, J.C. 1999. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp. Cell Res.* **251**: 350–355.
- Sullivan, R., Frenette, G. & Girouard, J. 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J. Androl.* **9**: 483–491.
- Sutovsky, P. 2011. Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction* **142**: 1–14.
- Sutovsky, P. 2003. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone. *Microsc. Res. Tech.* **61**: 88–102.
- Sutovsky, P., Moreno, R., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Thompson, W.E. & Schatten, G. 2001. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J. Cell Sci.* **114**: 1665–1675.

- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. & Schatten, G. 2000. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol. Reprod.* **63**: 582–590.
- Sutovsky, P., Neuber, E. & Schatten, G. 2002. Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay. *Mol. Reprod. Dev.* **61**: 406–413.
- Thompson, W.E., Ramalho-Santos, J. & Sutovsky, P. 2003. Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biol. Reprod.* **69**: 254–260.
- Vigodner, M., Shrivastava, V., Gutstein, L.E., Schneider, J., Nieves, E., Goldstein, M., *et al.* 2013. Localization and identification of sumoylated proteins in human sperm: excessive sumoylation is a marker of defective spermatozoa. *Hum. Reprod.* **28**: 210–223.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C., Wilkinson, K. & Cook, W. 1985. Three-dimensional structure of ubiquitin at 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 3582–3585.
- West, M. & Bonner, W. 1980. Histone 2B can be modified by the attachment of ubiquitin. *Nucleic Acids Res.* **8**: 4671–4680.
- Woelk, T., Sigismund, S., Penengo, L. & Polo, S. 2007. The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div.* **2**: 11.
- Yamano, H., Gannon, J., Hunt, T. 1996. The role of proteolysis in cell cycle progression in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **15**: 5268–5279.
- Yang, C., Zhou, W., Jeon, M.-S., Demydenko, D., Harada, Y., Zhou, H., *et al.* 2006. Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase itch via Fyn-mediated tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell* **21**: 135–141.
- Yeung, C.-H., Breton, S., Setiawan, I., Xu, Y., Lang, F. & Cooper, T.G. 2004. Increased luminal pH in the epididymis of infertile c-ros knockout mice and the expression of sodium-hydrogen exchangers and vacuolar proton pump H<sup>+</sup>-ATPase. *Mol. Reprod. Dev.* **68**: 159–168.

Zimmerman, S.W., Manandhar, G., Yi, Y.-J., Gupta, S.K., Sutovsky, M., Odhiambo, J.F., *et al.* 2011. Sperm proteasomes degrade sperm receptor on the egg zona pellucida during mammalian fertilization. *PLoS One* **6**: e17256.