

*Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra Fyziologie živočichů a vývojové biologie*



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Molekulární mechanismy chování spermie před  
oplozením u vybraných zástupců čeledi *Muridae***

Michaela Jursová

V Praze 2007

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Kateřina Hortová, PhD.

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

V Praze, 1. května 2007

  
Michaela Jursová

Vřelý dík patří především mojí školitelce RNDr. Kateřině Hortové, PhD. za její skvělé vedení, ochotu, pomoc a spousty cenných rad – nejen odborných, které mi v průběhu mého působení v laboratoři reprodukční biologie na Oddělení vývojové biologie a imunologie poskytla.

Dále děkuji RNDr. Nataše Šebkové za její vřelost a velkou trpělivost, s kterou mě zasvětila do tajů metody ELFO.

Děkuji všem dalším členům naší laboratoře, paní Marii Nohýnkové za její mateřský přístup a morální oporu, Jitce Vašinové za skvělé přátelství a spolupráci, našim laborantkám Zuzce Val'ové a Marianě Vojakové za jejich ochotu kdykoli pomoci.

Dík patří také členům výzkumné skupiny Pavla Stopky, a to především Mgr. Martinovi Šanderovi, s nímž jsem měla tu čest spolupracovat od samého počátku svého působení v laboratoři a který mi byl vždy ochoten kdykoli s čímkoli pomoci.

Děkuji i konfokálním technikům Francescovi Difato a Ondřeji Šebestovi, kteří mají nemalou zásluhu na vzniku této práce.

V neposlední řadě pak děkuji svým nejbližším, bez jejichž lásky, péče a podpory by tato práce nikdy nemohla vzniknout!

Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory z následujících zdrojů:  
GACR 204/04/P008, MSMT VC 1M06011 a MSMT VZ 0021620828

## **Molecular mechanisms of sperm behaviour prior to fertilization in selected species of family *Muridae***

Capacitation is very important event, which is pre-requisite prior to mammalian sperm can acrosome react (AR) and fertilize the oocyte. Many signal pathways are involved in capacitation and AR, and tyrosine protein phosphorylation is one of the key events. For this reason, we studied change of protein tyrosine phosphorylation pattern during capacitation *in vitro*.

Actin as the main component of microfilament and spectrin as the actin-binding protein play a very important role in mammalian cells. Both are also present in mammalian spermatozoa. In sperm head, actin is present in the cortical cytoskeleton, equatorial segment, perinuclear theca, post-acrosomal segment and neck. The localization of spectrin in mammalian sperm head is similar to that of actin. The interaction between actin and spectrin is described in somatic cells, however not yet in sperm, the unique and specialized germinal cells.

CD46 (MCP; membrane cofactor protein) is expressed in the mammalian sperm head. In man, however, CD46 is also a widely expressed as cell surface complement regulatory protein. Antibodies to the first short consensus repeat (SCR 1) ectodomain of CD46 inhibit binding and penetration of zona-free eggs by human sperm. The importance of the SCR1 domain is supported by its selective expression in spermatozoal CD46 of New World monkeys. In contrast, CD46 in rodents is solely expressed on the acrosomal membrane, and becomes surface exposed only after the AR. Surprisingly CD46 knockout mice are fertile and have an accelerated spontaneous AR rate. In this work we used a spectrum of monoclonal and polyclonal anti CD46 antibodies to tested expression CD46 on sperm in selected species of mammals especially rodents. Sperm were capacitated and the comparative rate of accelerated AR among selected rodent species was examined by PNA lectin.

**Key words:** sperm, capacitation, acrosome reaction, tyrosine phosphorylation, actin, spectrin, CD46

## **Molekulární mechanizmy chování spermie před oplozením u vybraných zástupců čeledi *Muridae***

Kapacitace je velice důležitý děj, kterým musí spermie projít před tím, než je schopna akrozomální reakce (AR) a následné fúze s oocytem. V řízení procesu kapacitace a spouštění AR je zahrnuto množství signálních molekul a drah, v nichž hraje klíčovou úlohu tyrozinová fosforylace. Z tohoto důvodu bylo sledování změn tyrozinové fosforylace během kapacitace *in vitro* předmětem našeho studia.

Aktin a spektrin, který je řazen do skupiny aktin vázajících proteinů, jsou důležitou součástí cytoskeletálních struktur somatických buněk a oba tyto proteiny byly lokalizovány i ve spermiích. Aktin byl v hlavičce savčí spermie detekován v kortikálním cytoskeletu, ekvatoriálním segmentu, perinukleární théce, postakrozomálním segmentu a krčku. Lokalizace spektrinu je ve spermiích obdobná lokalizaci aktinu. Ačkoli v somatických buňkách byla popsána vzájemná interakce těchto dvou proteinů, vztah aktinu a spektrinu ve spermiích, která je buňkou se zcela unikátními vlastnostmi, není doposud znám.

Exprese CD46 (MCP; membrane cofactor protein) byla detekována v hlavičce savčí spermie. Nicméně u člověka se tento protein nachází na všech jaderných buňkách, kde slouží jako ochrana proti působení komplementu. Použití protilátek proti SCR 1 (first short consensus repeat) ektodomény CD46 vede u spermií člověka k zablokování jejich vazby na oocyt zbarvený zony pellucidy a následně i k znemožnění fúze membrán vajíčka a spermie. Důležitost SCR 1 ektodomény CD46 v procesu oplození potvrzuje i fakt, že u opic Nového Světa dochází k její expresi pouze na spermiích. Naproti tomu, u hlodavců je protein CD46 exprimován výhradně na akrozomální membráně spermií a vnějšímu prostředí je vystaven až po AR. Překvapivě myši CD46 knock out je zjevně hyperfertilní a vykazuje zvýšený výskyt spontánní AR. V této práci jsme použili k testování exprese CD46 na spermiích vybraných druhů savců řadu monoklonálních a polyklonálních protilátek proti CD46. U spermií vybraných druhů hlodavců byla pomocí PNA lectinu v průběhu kapacitace *in vitro* vzájemně porovnána míra spontánní AR.

**Klíčová slova:** spermie, kapacitace, akrozomální reakce, tyrozinová fosforylace, aktin, spektrin, CD46

# Obsah

<b>OBSAH</b> .....	<b>6</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>8</b>
<b>1. ÚVOD (CÍLE PRÁCE)</b> .....	<b>10</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>13</b>
2.1 SPERMATOGENEZE A VNITŘNÍ STRUKTURA VARLAT .....	13
2.1.1 <i>Struktura varlat</i> .....	13
2.1.1.1 Semenotvorné kanálky.....	13
2.1.1.1.1 Somatické buňky .....	14
2.1.1.1.2 Pohlavní buňky .....	15
2.1.1.2 Intersticiium.....	18
2.1.1.2 Rete testis.....	19
2.2 SPERMIE A JEJÍ PŘÍPRAVA NA OPLOZENÍ (KAPACITACE) .....	19
2.2.1 <i>Cholesterolový efflux</i> .....	20
2.2.2 <i>Hyperpolarizace</i> .....	21
2.2.3 <i>Signální dráhy</i> .....	22
2.2.3.1 Signální dráhy řídící průběh kapacitace v hlavičce savčí spermie .....	24
2.2.3.1.1 PKA .....	24
2.2.3.1.2 MAP kináza .....	24
2.2.3.1.3 PKC .....	25
2.2.3.1.4 Protein tyrozin kinázy.....	26
2.2.3.1.5 G-proteiny .....	27
2.2.3.1.6 PLD .....	27
2.2.3.2 Signální dráhy v bičíku .....	28
2.2.4 <i>Důsledky působení signálních drah</i> .....	29
2.2.4.1 Dynamika aktinového cytoskeletu během kapacitace a akrozomální reakce .....	29
2.2.4.1.1 Aktin.....	30
2.2.4.1.2 Spektrin .....	30
2.2.4.1.3 Aktinová polymerizace .....	31
2.2.4.1.4 Aktinová depolymerizace .....	32
2.2.4.2 Akrozomální reakce .....	33
2.2.4.2.1 Akrozóm .....	33
2.2.4.2.2 Akrozomální reakce.....	36
2.2.4.2.3 Signální dráhy vedoucí k AR.....	37
2.2.4.2.4 Spontánní vs. indukovaná AR .....	41
2.2.5 <i>Stabilita membrán spermie</i> .....	42
2.2.5.1 CD46.....	43
<b>3. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>47</b>
3.1 MATERIÁL .....	47
3.1.1 <i>použitý živý materiál pro odběr spermií a varlat</i> .....	47
3.1.2 <i>Použité chemikálie (abecedně)</i> .....	47
3.1.3 <i>Použité roztoky (abecedně)</i> .....	49
3.1.4 <i>Použité přístroje</i> .....	51
3.1.5 <i>Další použitý materiál</i> .....	52
3.2 METODY .....	52
3.2.1 <i>Příprava kryorezů varlat</i> .....	52
3.2.2 <i>Příprava histologických parafinových řezů varlat</i> .....	52
3.2.3 <i>Izolace spermií a příprava jejich roztěrů</i> .....	53
3.2.4 <i>Počítání koncentrace spermií</i> .....	53
3.2.5 <i>Kapacitace in vitro</i> .....	54
3.2.6 <i>Hodnocení viability</i> .....	54
3.2.7 <i>Navození AR</i> .....	54
3.2.8 <i>Hodnocení AR</i> .....	55
3.2.9 <i>Hodnocení tyrozinové fosforylace</i> .....	55
3.2.10 <i>Sonikace</i> .....	55
3.2.11 <i>SDS - polyakrylamidová elektroforéza a imunodetekce</i> .....	56
3.2.11.1 <i>příprava vzorku</i> .....	56
3.2.11.2 <i>příprava SDS gelu a elektroforetické rozdělení vzorku</i> .....	56

3.2.11.3 detekce proteinů v polyakrylamidovém gelu .....	56
3.2.11.3.1 Barvení gelu pomocí Coomassie blue .....	56
3.2.11.3.2 Western blotting – přenos proteinu z polyakrylamidového gelu na nitrocelulózovou membránu.....	56
3.2.11.3.3 Imunoblotting – detekce proteinů přenesených na nitrocelulózovou membránu pomocí imunodetekce .....	56
3.2.12 <i>Fluorescenční metody</i> .....	57
3.2.12.1 Fixace.....	57
3.2.12.2 Přímá imunofluorescence.....	57
3.2.12.3 Nepřímá imunofluorescence .....	58
3.2.12.4 Duální imunofluorescenční barvení .....	58
3.2.12.5 FRET analýza .....	58
<b>4 VÝSLEDKY</b> .....	<b>59</b>
4.1 SPERMATOGENEZE .....	59
4.2 VLIV TYROZINOVÉ FOSFORYLACE NA POLYMERIZACI AKTINU A NÁSLEDNOU AKROZOMÁLNÍ REAKCI V HLAVIČCE SPERMIE V PRŮBĚHU KAPACITACE IN VITRO .....	61
4.2.1 <i>Tyrozínová fosforylace v průběhu kapacitace in vitro</i> .....	61
4.2.2 <i>Aktinová polymerizace během kapacitace in vitro</i> .....	63
4.2.3 <i>Stav akrozomální reakce v průběhu kapacitace in vitro</i> .....	64
4.2.4 <i>Viabilita a motilita spermií během kapacitace in vitro</i> .....	65
4.3 VZTAH AKTINU A SPEKTRINU V KORTIKÁLNÍM CYTOSKELETU HLAVIČKY SAVČÍ SPERMIE A JEJICH PŘÍPADNÁ INTERAKCE HODNOCENÁ POMOCÍ FRET ANALÝZY.....	66
4.3.1 <i>Lokalizace aktinu v hlavičce spermie potkana</i> .....	66
4.3.2 <i>Lokalizace spektrinu v hlavičce spermie potkana</i> .....	67
4.3.3 <i>Duální barvení aktinu a spektrinu v hlavičce spermie potkana</i> .....	67
4.3.4 <i>FRET analýza</i> .....	68
4.4 EXPRESE CD46 NA SPERMATOGENNÍCH BUŇKÁCH HLODAVCŮ .....	70
4.4.1 <i>Testování protilátek proti proteinu CD46</i> .....	70
4.5 ÚLOHA CD46 PŘI ZACHOVÁNÍ INTEGRITY AKROZÓMU SAVČÍ SPERMIE .....	74
4.6 VÝSLEDKY PŘI ZAVÁDĚNÍ NOVÝCH METOD .....	76
4.6.1 <i>Sonikace</i> .....	76
4.6.2 <i>SDS polyakrylamidová elektroforéza (ELFO)</i> .....	77
<b>5. DISKUZE</b> .....	<b>78</b>
5.1 VLIV TYROZINOVÉ FOSFORYLACE NA POLYMERIZACI AKTINU A NÁSLEDNOU AKROZOMÁLNÍ REAKCI V HLAVIČCE SPERMIE V PRŮBĚHU KAPACITACE IN VITRO .....	78
5.2 VZTAH AKTINU A SPEKTRINU V KORTIKÁLNÍM CYTOSKELETU HLAVIČKY SAVČÍ SPERMIE A JEJICH PŘÍPADNÁ INTERAKCE HODNOCENÁ POMOCÍ FRET ANALÝZY.....	80
5.3 EXPRESE CD46 NA SPERMATOGENNÍCH BUŇKÁCH HLODAVCŮ A ÚLOHA CD46 PŘI ZACHOVÁNÍ INTEGRITY AKROZÓMU SAVČÍ SPERMIE .....	81
5.4 SHRNUTÍ.....	83
<b>6. ZÁVĚR</b> .....	<b>84</b>
<b>7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY</b> .....	<b>85</b>

## Seznam zkratek

AKAP	A-kinase anchoring protein
AR	akrozomální reakce
ARF	ADP ribosylační faktor
BIS	N,N'methylen bis akrylamid
BSA	bovine serum albumin
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CI	calcium ionophor A-23187
CYT	cytoplazmatického konce
DAG	diacylglycerol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
EGF	epiteliální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
ELFO	SDS polyakrylamidová elektroforéza
ERK	extracelulárním signálem regulovaná kináza
FITC	fluoresceinisoithiokyanát
FRET	Förster nebo Fluorescence Resonance Energy Transfer
GABA <sub>A</sub>	kyselina gama aminomáselná(Gamma-aminobutyric acid)
GDP	guanosin difosfát
GTP	guanosin trifosfát
H1	histon 1
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IgG	imunoglobulin třídy G
IP <sub>3</sub>	inositol trifosfát
LPA	lysofosfatidylová kyselina
MAP	mitogen-activated protein
MCP	membrane cofactor protein
MEK	MAPK/ERK kináza
PBS	fyziologický roztok
PGB	primordiální germinální buňky
PI	propidium iodide
PIP <sub>2</sub>	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKA	protein kináza A
PKC	protein kináza C
PLA <sub>2</sub>	fosfolipáza A
PLC	fosfolipáza C
PLD	fosfolipáza D
PM	plazmatická membrána
PNA-lectin	peanut lectin - 110kD tetramer
PTK	protein tyrozin kináza



PTK	nereceptorové protein tyrozin kinázy
Rab	Ras like in rat brain
RTK	receptorová tyrozin kináza
SCRs	short consensus repeats
SDS	dodecyl síran sodný
SNARE	soluble (N-ethylmaleimide sensitive factor) attachment receptor
STP	serin, treonin a prolin bohaté domény
TBS	fyzilogický roztok neobsahující fosfáty
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylendiamin
TP	transmembránová doména
Tris	tris (hydromethyl) aminomethan
Tween	polyoxyethylensorbitan monolaurát
ZP	zona pellucida
ZP1, ZP2, ZP3	zona pellucida protein 1, 2, 3
ZPR	zona pellucida receptor

# 1. Úvod (cíle práce)

V posledních letech je lidská neplodnost stále diskutovanějším tématem a Světová zdravotnická organizace (WHO) eviduje 80 miliónů neplodných párů, u kterých je ve 40 % případů neplodnost zapříčiněna selháním samčích gamet. Z tohoto důvodu je snaha porozumět mechanismům probíhajících ve spermii při přípravě na oplození o to intenzivnější.

Před tím, než se savčí spermie setká s vajíčkem a dojde k samotnému splynutí gamet, prochází spermatická buňka v reprodukčním traktu samice rozsáhlou řadou biochemických změn zvanou kapacitace, jejímž vyvrcholením je receptorem řízená exocytóza apikálního akrozomálního váčku tzv. akrozomální reakce. Kapacitace je aktivním stádiem přípravy spermie na oplození a je pro schopnost splynutí gamet zásadní. Nicméně některé molekulární mechanismy, ke kterým během kapacitace v hlavičce savčí spermie dochází nejsou doposud zcela přesně známy. Mezi tyto procesy se mimo jiné řadí nárůst tyrozinové fosforylace proteinů a s tím související změny aktinového cytoskeletu.

V této práci jsme se zaměřili na výzkum molekulárních mechanismů chování savčí spermie před oplozením u vybraných zástupců čeledi *Muridae*. Snažili jsme se o komplexní přístup, který by přispěl k pochopení problematiky změn odehrávajících ve spermii. Předmětem našeho zájmu se stala výlučně hlavička spermie, která se přímo účastní fúze gamet, zatímco bičík je výhradně prostředkem k dopravení spermie na místo oplození.

## Cíle práce:

### 1. Vliv tyrozinové fosforylace na polymerizaci aktinu a následnou akrozomální reakci v hlavičce spermie v průběhu kapacitace *in vitro*.

Během kapacitace dochází v hlavičce savčí spermie k výrazným změnám cytoskeletálních struktur. Tyto změny se týkají především aktinu, který v průběhu kapacitace polymerizuje ze své G (globulární) formy na F (filamentární) formu. Na samém závěru kapacitace ovšem dochází k náhlé depolymerizaci jeho sítí, aby tak byla umožněna fúze vnější akrozomální a plazmatické membrány a mohlo tak dojít

k akrozomální reakci. Celý tento děj je řízen složitou sítí signálních drah jejichž součástí je tyrozinová fosforylace. Fosforylace je významnou posttranslační modifikací, která spermii umožňuje ovlivňovat chování jednotlivých proteinů i přesto, že její jaderná DNA je zcela inaktivována. Je známo, že nárůst tyrozinové fosforylace během kapacitace savčí spermie koreluje s nárůstem aktinové polymerizace (Brenner *et al.*, 2003). Během polymerace a depolymerace hrají nezastupitelnou roli aktin vázající proteiny. Jedním z nich by mohl být i spektrin.

## **2. Vztah aktinu a spektrinu v kortikálním cytoskeletu hlavičky savčí spermie.**

Spektrin je členem významné rodiny s aktinem asociovaných proteinů, které obsahují tzv. spektrinové repetice. V somatických buňkách se spektrin nachází v kortikálním cytoskeletu, kde je jeho úkolem napomáhat aktinu vytvářet aktinová filamenta a kotvit je na plazmatickou membránu. Aktin-spektrinové sítě pomáhají udržovat integritu plazmatické membrány a zajišťují její stabilitu a flexibilitu. Služí též k přesunu četných proteinů. Ve spermii aktinové sítě během kapacitace pomáhají při přesunu fosfolipázy C na plazmatickou membránu, kde se tento enzym účastní akrozomální reakce. V savčí spermii byla obdobně jako v somatických buňkách přítomnost spektrinu společně s aktinem detekována v kortikální cytoskeletu, což naznačuje, že i zde by tyto dva proteiny mohly být asociovány. Ovšem zda tomu tak doopravdy je doposud nebylo zjištěno.

## **3. Exprese CD46 na spermatogenních buňkách hlodavců.**

CD46 je glykoprotein v savčí spermii lokalizovaný na akrozomální membráně. U lidských spermií vede použití protilátek proti CD46 k zablokování vazby na oocyt, což naznačuje důležitost této molekuly v procesu oplození. SCR1 doména proteinu CD46 je evolučně velmi konzervována, což je dalším důkazem unikátnosti tohoto proteinu. Ačkoli u jiných živočišných druhů se CD46 nachází i na somatických buňkách u hlodavců byla zjištěna pouze na spermiích. Naším cílem bylo lokalizovat expresi CD46 na spermiích a během spermatogeneze vybraných zástupců čeledi *Muridae*. Mezi těmito zástupci byli i myšice rodu *Apodemus*, u jejichž spermií byla nalezena unikátní pohlavní strategie – tvorba tzv. vláčků.

#### **4. Úloha CD46 při zachování integrity akrozomu v savčí spermie.**

Inoque *et al.* (2003) popsali následky dalece genu pro CD46 u myší, která způsobila, že nedocházelo k expresi proteinu CD46. Z jejich výsledků vyplývá, že by CD46 mohl hrát roli ve stabilizaci akrozomální membrány. Nám se výzkumem exprese proteinu CD46 u myšic rodu *Apodemus*, podařilo zjistit, že u tohoto rodu není CD46 na akrozomální membráně spermii přítomen a že vůbec nedochází k jeho expresi. Zástupci tohoto rodu jsou tedy jakými si přirozenými knockouty. Tento poznatek nám umožnil pokusit se pochopit úlohu CD46 v hlavičce savčí spermie.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Spermatogeneze a vnitřní struktura varlat

Spermatogeneze je dlouhý a komplikovaný proces, při němž primordiální germinální buňky (PGB) prochází meiotickým dělením a dávají vznik maturovaným spermii. Tento proces zahrnuje fázi proliferační, meiotickou a diferenciační (spermatelióza).

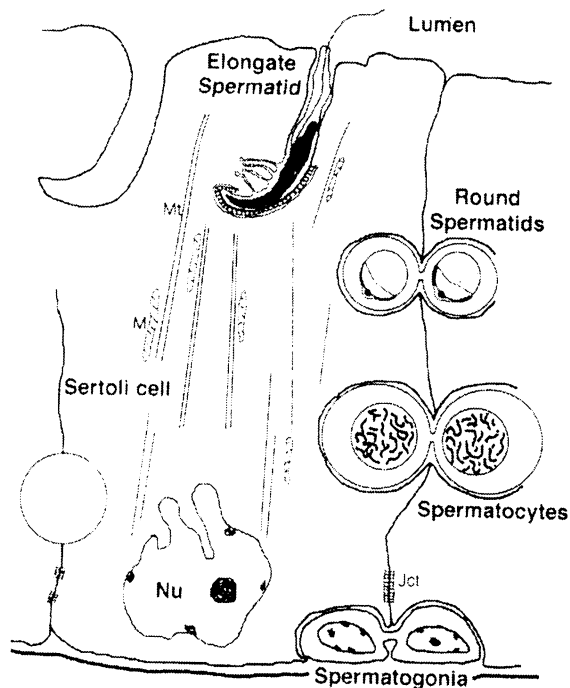
U myši dochází už 7,5 dne po oplození k migraci PGB z epiblastu do genitální rýhy embrya (CLARK a EDDY, 1975). Poté, co PGB dosáhnou genitální rýhy, začínají formovat řadu pohlavních lišt, které jsou základem pro semenotvorné kanálky testes vznikajících v období puberty. Pohlavní lišty jsou tvořeny dvěma typy buněk: PGB a podpůrnými buňkami. Podpůrné buňky se diferencují na Sertoliho buňky a PGB dávají vznik spermatogoniím.

#### 2.1.1 Struktura varlat

Povrch varlat je tvořen vazivovou membránou (*tunica albuginea*), která je vyplněna parenchymem varlete. Vazivová membrána vytváří četná septa, která varle rozdělují na množství lalůček. V parenchymu varlete nacházíme semenotvorné kanálky (*tubuli seminiferi*) a vmezeřený epitel tzv. intersticiem vyplňující prostor mezi nimi.

##### 2.1.1.1 Semenotvorné kanálky

K spermatogenezi dochází uvnitř semenotvorných kanálků varlat. Plně diferencovaná varlata obsahují 12-20 mnohonásobně stočených semenotvorných kanálků. Tyto kanálky představují hlavní složku varlat (u člověka až 62%). Semenotvorné kanálky jsou vyplněny epitelem, který je tvořen dvěma základními typy buněk – pohlavními a somatickými.



**Obr. 2.1** Semenotvorné kanálky obsahujú somatické Sertoliho buňky a germinálne buňky (převzato z EDDY, 2002)

### 2.1.1.1 Somatické buňky

Somatické buňky prítomné v semenotvorných kanálcích predstavujú peritubulárni (myoidní) buňky a Sertoliho buňky. Peritubulárni buňky u mnoha druhů vytváří na povrchu semenotvorných kanáلكů jedinou vrstvu buněk (u člověka 3-5 vrstev). Tyto buňky mají, podobně jako v cévním systému, za úkol udržovat integritu semenotvorných kanáلكů a jejich rytmické slabé kontrakce, na nichž se podílí aktinová filamenta společně s mikrotubuly, mají za následek posun vznikajících spermii ven z varlat.

Sertoliho buňky hrají klíčovou roli ve vývoji pohlavních buněk a jsou limitujícím faktorem spermatogeneze. Tyto buňky vytváří pomocí těsných mezibuněčných spojů (tzv. tight junctions) a desmozómů syncytium obklopující lumen semenotvorných kanáلكů (SIU a CHENG, 2004). Sertoliho buňky tvoří bariéru mezi krví a pohlavními buňkami, za jejichž výživu odpovídají, tzv. hematotestikulární bariéru, která mimo jiné brání průniku leukocytům ke spermatogenním buňkám a naopak. Přerušeni těsného spojení mezi jednotlivými Sertoliho buňkami vede k zhroucení celé spermatogeneze (GRISWOLD, 1995). Pohlavní buňky vázané na

Sertoliho buňky jsou společně součástí velice specifického vývojového cyklu epitelu semenotvorných kanálků (LEBLOND a CLERMONT, 1952). Spermatické buňky se na Sertoliho buňky váží pomocí N-kadherinů, které jsou přítomné na obou typech buněk a dále pomocí galaktosiltransferázy spermatických buněk, která se váže na uhlovodíkové receptory exprimované na PM Sertoliho buněk (NEWTON *et al.* 1993; PRATT *et al.* 1993). Důležitým poznatkem je, že počet Sertoliho buněk je limitním faktorem pro počet vznikajících pohlavních buněk (BERNDTSON *et al.*, 1985). V době pohlavní dospělosti organismu je celkový počet Sertoliho buněk definitivní a ty už dále neproliferují. Každá Sertoliho buňka je schopna podporovat jen omezený počet spermatických buněk, což limituje jejich množství. Počet buněk, které je schopna jedna Sertoliho buňka podporovat, je druhově specifický (RUSSEL & PETERSON, 1984)

Jádro Sertoliho buněk je nezvykle velké a má nepravidelný tvar.

V Sertoliho buňkách hlodavců je tvar a umístění jádra závislé na stádiu spermatogenetického cyklu, ve kterém se zrovna buňka nachází (KRETSER a KERR, 1994). V cytoplazmě buněk je podél jejich dlouhé osy vedoucí od bazální membrány směrem k lumen semenotvorných kanálků orientováno množství mikrotubulů a dlouhých tenkých mitochondrií, které se po tubulech pohybují. Cytoplazma obsahuje aktinová a intermediální filamenta, jež zodpovídají za změny tvaru těchto buněk během migrace zrajících pohlavních buněk od bazální membrány kanálků do jejich lumen. Golgiho aparát je rozsáhlý, stejně jako hladké endoplazmatické retikulum. To se nachází především v blízkosti vyvíjejících se akrozómů spermatid. Oproti tomu drsné endoplazmatické retikulum je poměrně malé. Sekundární lysozomy Sertoliho buněk mají za úkol degradovat reziduální cytoplazmatická tělíska nově vznikajících spermií.

Sertoliho buňky, obdobně jako jiné podpůrné buňky v savčím organismu, mají za úkol vyživovat a stimulovat proliferaci samčích pohlavních buněk. Dále odstraňují poškozené pohlavní buňky a reziduální cytoplazmatická tělíska odvržená vyvíjejícími se spermatickými buňkami.

### **2.1.1.1.2 Pohlavní buňky**

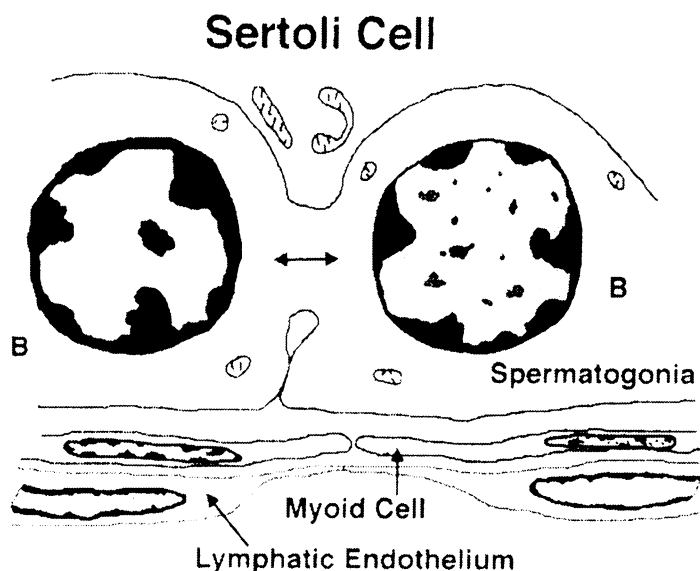
#### **Spermatogonie**

Po dosažení gonád primordiální germinální buňky diferencují na A spermatogonie.

A spermatogonie mají funkci kmenových buněk. Tyto buňky jsou menší než PGS a jsou charakteristické vejčitém jádrem obsahujícím chromatin vázaný na jadernou membránu. A spermatogonie se nachází těsně pod bazální membránou semenotvorných kanálků, ke které těsně přiléhají. Mitotickým dělením dávají A spermatogonie vzniknout dvěma typům buněk: dalším kmenovým buňkám a středním spermatogoniím (DYM, 1994; LUI *et al.*, 2002).

Mezi A spermatogonií rozlišujeme subpopulace A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub> spermatogonií, které jsou považovány za nově vznikající kmenové spermatogenní buňky a A<sub>0</sub> spermatogonie, které představují zásobní typ kmenových buněk (DYM a CLERMONT, 1970, CLERMONT, 1972; APONETE *et al.*, 2005). Všechny buňky vznikající z A<sub>0</sub> spermatogonie jsou propojeny cytoplazmatickými můstky až do vzniku spermií. Důsledkem každého nového dělení je posunutí nově vznikající spermatické buňky dále od bazální membrány směrem do lumen semenotvorných kanálků.

Střední spermatogonie jsou již diferenciované buňky jejichž mitotickým dělením vznikají pouze B spermatogonie a nejsou schopny tvořit nové kmenové buňky. B spermatogonie produkují primární spermatocyty, které vstupují do meiózy a jsou posledním stádiem vyvíjejících se samčích pohlavních buněk, které jsou schopny mitózy.



**Obr. 2.2** Spermatogonie B spojená cytoplazmatickým můstkem. Sertoliho a myoidní (peritubulární) buňky ve spermatogenním epitelu. (převzato z EDDY, 2002)



## Spermatocyty

Primární spermatocyty obsahují velké množství cytoplazmy a jsou, co se velikosti týče, největší spermatogenní buňky s největším jádrem, které se nachází v semenotvorném epitelu. Primární spermatocyty duplikují svoje chromozómy (proleptotene) a dochází u nich k výměně genetického materiálu mezi homologními páry chromozómu v procesu zvaném crossing-over (zygotene, pachytene a diplotene). Každý primární spermatocyt prochází prvním meiotickým dělením (metafáze, telofáze a anafáze), na jehož konci dává vznik dvěma sekundárním spermatocytům.

Sekundární spermatocyty jsou oproti primárním spermatocytům velmi malé buňky obsahující haploidní počet duplikovaných chromozómů. Tyto dvě buňky prochází velice krátkým obdobím interfáze a poté vstupují do druhého meiotického dělení, na jehož konci vznikají čtyři spermatidy s haploidním počtem chromozómů (CLERMONT, 1972).

## Spermatidy

Spermatidy podstupují tzv. spermateliózu. Jako spermatelióza je označován diferenciační proces, při němž se ze spermatidy stává spermie. Spermatidy se během tohoto procesu mění z kulatých buněk s kulatým jádrem v buňky s protáhlým kondenzovaným jádrem obklopeným z anteriorní strany enzymatickým váčkem – akrozómem a na posteriorní straně nově vzniklým bičíkem (CLERMONT, 1972). Konečný tvar savčí spermie se mezi jednotlivými druhy značně liší.

Během spermateliózy dochází k tvorbě nových struktur současně s redukcí či kompletní degradací vybraných organel spermatid. Tento proces vyžaduje transkripci, translaci a post translační modifikace konstitutivních genů a produktů genů specifických pro spermatické buňky během rané fáze spermateliózy (KLEENE *et al.*, 1993; EDDY, 2002; DANDOUNE *et al.*, 2004). Tvorba nových struktur zahrnuje vznik akrozómu z Golgiho aparátu (MORENO *et al.*, 2000), formaci cytoskeletálních struktur přítomných v cytosolu spermatidy do perinukleární théky – cytoskeletální struktury budoucí hlavičky spermie (OKO, 1995) a vznik bičíku s vnějšími hustými vlákny a fibrózní pochvou (OKO, 1998). Za tvarování hlavičky je odpovědná masivní dekondezace jádra savčí spermie, ke které dochází pomocí nahrazování histonů za protaminy (MEISTRICH *et al.*, 2003). Jádro v savčí spermii určuje velikost a tvar hlavičky. Dále dochází k redukcí jaderného obalu a k odstranění jaderných porů (SUTOVSKY *et al.*, 1999). Přibližně polovina mitochondrií přítomných v cytoplazmě

spermatid je degradována, zatímco druhá polovina migruje k posteriornímu konci buňky, kde se formuje nově vznikající bičík a vytváří zde helikální strukturu, tzv. mitochondriální pochvu (CATALDO *et al.*, 1996).

Během procesu spermateliózy zůstávají pohlavní buňky pomocí buněčných spojů a cytoplazmatických můstků spojeny se Sertoliho buňkami. Teprve plně diferenciované spermie přerušují tuto vazbu a uvolňují se do lumen semenotvorných kanálků, odkud dále přechází do tubuli recti, rete testis, ductuli efferentes až do ductus epididymis vedoucím skrz nadvarle. V konečné fázi spermateliózy je zbytek cytoplazmy spermatidy vyloučen jako cytoplazmatická kapka, která je ovinutá okolo krčku bičíku a zde zůstává i během transportu semenotvornými kanálky. Během maturace spermie v hlavě a těle epididymis dochází ke sklouznutí cytoplazmatické kapky po bičíku až k annulu, struktuře tvořící hranici mezi střední a hlavní částí bičíku (COOPER a YEUNG, 1993) U většiny savců dochází k odstranění cytoplazmatické kapky v caudě epididymis a nebo krátce po ejakulaci.

### **2.1.1.2 Intersticiium**

Intersticiium vyplňuje prostor mezi semenotvornými kanálky a obsahuje řídké vazivo, mezenchymatické buňky, shluky Leydigových buněk, žírné buňky, makrofágy a bohatou síť fenestrovaných krevních kapilár a mízních cév.

#### **Leydigovy buňky**

Leydigovy buňky jsou produktem mitotického dělení a následně diferenciací mezenchymálních buněk varlat. Tyto buňky mají polygonální tvar a jejich cytoplazma obsahuje velké hladké endoplazmatické retikulum, které se podílí na tvorbě *hormonů vylučovaných těmito buňkami. V cytoplazmě těchto buněk se dále nachází velké množství mitochondrií, tukových kapének, lysozómů a peroxizómů.*

Leydigovy buňky vytváří shluky různých velikostí, které se nachází v řídkém vazivu testikulárního intersticia v těsné blízkosti krevních kapilár. Tyto shluky představují hlavní endokrinní složku varlat. Leydigovy buňky uvolňují do okolního prostředí hormony zvané androgeny z nichž nejdůležitější je testosteron. Koncentrace testosteronu v bezprostřední blízkosti semenotvorných kanálků je tak 10x až 100x vyšší než v periferní krvi. Sekrece testosteronu je řízena luteinizačním hormonem (McLACHLAN *et al.*, 2002). Produkci testosteronu zajišťují enzymy lokalizované

v hladkém endoplazmatickém retikulu a mitochondiích. Testosteron je nezbytný k správnému průběhu spermatogeneze (JOHNSON *et al.*, 1990; McLACHLAN *et al.*, 2002).

### 2.1.1.2 Rete testis

Spermie jsou produkovány v semenotvorných kanálcích odkud přecházejí přes krátké přímé kanálky (*tubuli recti*) do hlavních tubulů (*rete testis*), které spermie dopravují ven z varlat do kanálků (*ductuli efferentes*) a dále do *epididymis*. *Rete testis* tvoří vysoce propojenou síť kanálků z vnější strany obklopenou kubickým epitelem. Vnitřní epitel pokrývající stěny kanálků jak *tubuli recti*, tak *rete testis* je tvořen pouze Sertoliho buňkami a neobsahuje žádné spermatogenní buňky. Sertoliho buňky zde výrazně mění svůj tvar a vytváří kubický epitel. Funkce *rete testis* doposud nebyla prozkoumána, ale je známo, že v *rete testis* jsou epiteliální buňky velmi dlouhé a mají cílie. U těchto buněk nebyla zaznamenána žádná sekreторická aktivita.

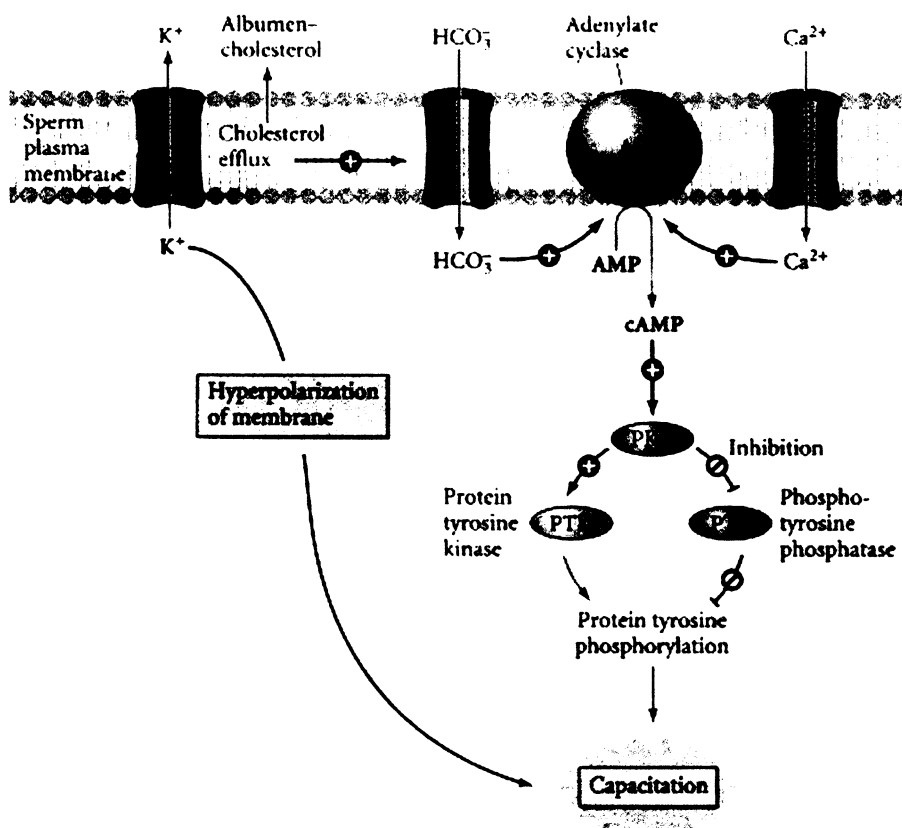
## 2.2 Spermie a její příprava na oplození (kapacitace)

Na rozdíl od spermií ostatních živočišných druhů, nejsou spermie savců schopny oplodnit vajíčko ihned po ejakulaci. Po ejakulaci jsou savčí spermie motilní a plně morfologicky zralé, ale k tomu, aby mohlo dojít k zónou pellucidou (ZP) indukované akrozomální reakci a následné fúzi membrán obou buněk, je nezbytné, aby spermatická buňka prošla řadou biochemických a fyziologických změn. Tento složitý proces byl v padesátých letech dvacátého století nazván pány CHANGEM (1951) a AUSTINEM (1951, 1952) „kapacitace.“

U spermií ejakulovaných či získaných z caudy epididymis je za určitých podmínek možné navodit kapacitaci i uměle *in vitro* a to inkubací buněk v tekutině získané z vejcovodů (YANAGIMACHI, 1994) nebo v médiu obsahujícím vápenaté ionty, NaHCO<sub>3</sub> a sérum albumin (VISCANTI *et al.*, 1995). Spermie, které neprošly kapacitací, nejsou schopny oplození, jsou zpomaleny a k vajíčku obvykle vůbec nedospějí (AUSTIN, 1960; YANAGIMACHI, 1994; BEDFORD a CROSS, 1999).

Navzdory tomu, jak dlouho je kapacitace spermií intenzivně studována, nejsou molekulární mechanizmy a signální dráhy mající podíl na tomto procesu dosud

přesně známé. Bylo zjištěno, že během kapacitace dochází v důsledku snížení koncentrace cholesterolu v plazmatické membráně k zvýšení její tekutosti. Otevírají se iontové kanály a následně se mění membránový potenciál spermie. Dále bylo zjištěno, že dochází ke ztrátě některých povrchových proteinů a uhlovodíků, k výrazným změnám v uspořádání cytoskeletálních proteinů a v neposlední řadě k fosforylaci četných proteinů navozující hyperaktivaci a akrozomální reakci (YANAGIMACHI, 1994).



Obr. 2.3 Obecné schéma dějů účastnících se kapacitace savčí spermie (převzato z GILBERT, 2000).

## 2.2.1 Cholesterolový efflux

Snížení koncentrace cholesterolu v plazmatické membráně (PM) spermie tzv. cholesterolový efflux je jedním z nejranějších dějů kapacitace. Bylo prokázáno, že už malé snížení koncentrace cholesterolu v PM spermie urychluje průběh kapacitace a indukuje tyrozinovou fosforylaci (SHADAN *et al.*, 2004). Naproti tomu bylo prokázáno, že přítomnost cholesterolu v seminální plazmě brání jeho uvolňování z PM a tím proces kapacitace inhibuje (CROSS, 1998). PM spermie se svými vlastnostmi a složením do značné míry odlišuje od plazmatické membrány většiny somatických

buněk. Unikátní je velké množství přítomného cholesterolu. Čerstvě ejakulované spermie mají vysoký poměr cholesterolu oproti fosfolipidům a tento poměr se v PM spermie během kapacitace výrazně mění (CROSS, 1998), čímž dochází ke zvýšení její tekutosti. Bylo prokázáno, že zvýšení tekutosti membrány vede k destabilizaci struktury lipidických raftů v PM spermie a následně k inicializaci tyrozinové fosforylace a nástupu kapacitace. Současně dochází k přesunu lipidických raftů PM do anteriorní části hlavičky spermie, kde společně vytváří klastry. Vytvoření klastrů v tomto místě umožňuje vznik komplexů signálních molekul, které aktivují signální dráhy vedoucí k exocytóze akrozomálního váčku (SHADAN *et al.*, 2004).

Stejně změny navozené v PM střední a hlavní části bičíku umožňují vzrůst laterálních přesunů částic PM podílejících se na udržování hyperaktivace savčí spermie (LIN a KAN, 1996). Hyperaktivace je změna pohybu savčí spermie, ke které dochází během kapacitace. Tato změna umožňuje samčí pohlavní buňce dosáhnout lineárního progresivního pohybu i ve velmi viskózním prostředí reprodukčního traktu samice (SUAREZ *et al.*, 1991, SUAREZ, 1996). Tento děj je řízen zvýšením koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v intracelulárním prostoru bičíku, jeho uvolněním ze zásobáren v reziduálním jaderném obalu (HO a SUAREZ, 2003) a cAMP aktivovaným otevřením  $\text{Ca}^{2+}$  iontových kanálů v PM bičíku (REN *et al.*, 2001).

Cholesterol je z membrány odstraňován pomocí proteinu albuminu, který se nachází v reprodukčním traktu samice. Albumin efektivně váže cholesterol, čímž brání jeho zpětnému zabudování do PM (RAVNIK *et al.*, 1992).

## 2.2.2 Hyperpolarizace

Během kapacitace dochází k výrazné hyperpolarizaci plazmatické membrány spermie. Membránový potenciál PM myší spermie klesá z  $-38$  na  $-55$  mV (DEMARCO *et al.*, 2003). Jak přesně dochází k hyperpolarizaci membrány nebylo dosud zcela objasněno. Na hyperpolarizaci PM se pravděpodobně podílí otevření draselných iontových kanálů, což způsobí náhlý únik  $\text{K}^+$  iontů z buňky a následnou změnu membránového potenciálu (BEDFORD a CROSS, 1999). Druhým iontem podílejícím se na tomto ději je  $\text{Na}^+$ . Během kapacitace bylo v intracelulárním prostoru spermie zaznamenáno značné zvýšení koncentrace  $\text{Na}^+$  iontů. Bylo prokázáno, že  $\text{Na}^+$  během kapacitace pronikají do spermie pomocí epiteliálních sodných kanálů a přispívají tak k hyperpolarizaci PM (HERNANDEZ-GONZALEZ *et al.*, 2006).

Kapacitace je proces směřující k akrozomální reakci a zdá se, že hyperpolarizace membrány, ke které během tohoto procesu dochází by mohla být jedním ze způsobů regulace pohybu vápenatých iontů během akrozomální reakce indukované zónou pellucidou (FLORMAN *et al.*, 1998). V PM spermie se nachází množství napětově ovládaných  $\text{Ca}^{2+}$  iontových kanálů, které jsou u spermii, jež ještě neprošly procesem kapacitace, v inaktivovaném stavu. Náhlá hyperpolarizace PM membrány způsobuje přechod napětově ovládaných  $\text{Ca}^{2+}$  iontových kanálů z inaktivovaného stavu do stavu aktivovaného a tím umožňuje jejich otevření iniciované setkáním spermie se zónou pellucidou vajíčka – konkrétně se ZP3 (zóna pellucida protein 3) (ARNOULT *et al.*, 1999). Průnik  $\text{Ca}^{2+}$  do intracelulárního prostoru je jedním z klíčových dějů kapacitace.  $\text{Ca}^{2+}$  ionty pronikají do cytosolu spermie nejen z vnějšího prostředí, ale i z intracelulárních zásobáren jako např. akrozómu (ROSSATO *et al.*, 2001). Bylo prokázáno, že  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{NaHCO}_3$  jsou nutné pro aktivaci produkce cAMP, které se účastní signálních drah vedoucích k akrozomální reakci (VISCONTI *et al.*, 1995b).

### 2.2.3 Signální dráhy

Maturovaná savčí spermie je zcela diferenciovaná a velice specializovaná buňka, a proto se vyznačuje mnohými vlastnostmi, které u jiných buněk nenajdeme, o čemž mimo jiné svědčí i přítomnost bičíku a akrozómu. Jednou z těchto vlastností je i unikátní struktura jádra.

Během přeměny spermatid ve spermie ztrácí jádro z karyolympfy vodu a tak se zahušťuje a zmenšuje. V procesu spermateliózy jsou histony, běžně přítomné v somatických buňkách, nahrazeny protaminy. Komplex DNA s bazickými protaminy je stabilizován pomocí kovalentních disulfidických vazeb mezi jednotlivými cysteinovými zbytky proteinů a tak nabývá v jádře spermii téměř krystalické struktury. Chromatin jádra je díky tomu vysoce kondenzovaný a DNA inaktivní. Jádro spermii nemá jadérka ani RNA, ta je během spermateliózy eliminována. Přesto i v maturovaných spermiiích zůstává určité množství histonů. Nachází se zde pro samčí gamety specifický spojovací histon H1, který hraje roli především v represi transkripce (LIN *et al.*, 2004). Zajímavé je, že H1 je přítomen i v bičíku, kde znemožňuje rozpad mikrotubulů a pomáhá tak při jejich stabilizaci (MULTIGNER *et al.*, 1992).

Z těchto informací vyplývá, že maturovaná spermie v zásadě není schopna transkripce ani translace a tudíž tvorby nových proteinů. Takže jedinou možností, jak může docházet k řízení dějů, které se ve spermiu odehrávají, je posttranslační ovlivňování chování již existujících proteinů. Fosforylace a defosforylace jsou posttranslační modifikace, které velmi výrazně mění chování proteinů a umožňují tak buňce kontrolovat a regulovat množství procesů, které se v ní odehrávají. V eukaryotických buňkách je přidávání a odebrání fosfátových skupin k serinovým, treoninovým a tyrozinovým zbytkům proteinů jedním z nejběžnějších způsobů regulace proteinové aktivity. Přítomnost nebo nepřítomnost fosfátových skupin může vyvolat u proteinů konformační změny vedoucí k jejich aktivaci či inaktivaci.

Není tedy překvapením, že během tak složitých procesů, jako je kapacitace, akrozomální reakce a hyperaktivace, je regulace pomocí proteinové fosforylace hojně využívána. Ačkoli ve spermiích se odehrávají změny ve fosforylaci jak na tyrozinových, tak i serin/treoninových zbytcích, tyrozinová fosforylace je primárním nebo dokonce výlučným ukazatelem signálních drah, probíhajících ve spermiu (NAZ a RAJESH, 2004).

Přestože je nárůst tyrozinové fosforylace v průběhu kapacitace známým faktem už delší dobu, doposud se nepodařilo objasnit, které konkrétní proteiny jsou modifikovány a jaký je přesný průběh signálních drah vedoucích k tomuto jevu. Dosud se podařilo identifikovat jen několik klíčových enzymů účastnících se těchto drah, jsou to např. protein kináza A (PKA) a protein kináza C (PKC), protein tyrozin kináza (PTK) a extracelulárním signálem regulovaná kináza (ERK) (BREITBART a NAOR, 1999; NAZ a RAJESH, 2004).

Pozorování, že ve výše definovaném médiu probíhá kapacitace spontánně *in vitro* i bez přidání biologických faktorů, naznačuje, že tento proces je skutečně řízen samotnou spermií a že jsou spermie předem programovány ke spuštění procesu kapacitace, pokud se dostanou do odpovídajícího prostředí. Tento fakt ovšem nevylučuje, že součástí reprodukčního traktu samice jsou regulační faktory, které průběh kapacitace mohou ovlivňovat (VISCONTI a KOPF, 1998). *In vivo* byl zaznamenán nárůst tyrozinové fosforylace např. po navázání spermií na buňky oviduktálního epitelu (PETRUNKINA et al., 2001).

### **2.2.3.1 Signální dráhy řídicí průběh kapacitace v hlavičce savčí spermie**

#### **2.2.3.1.1 PKA**

Jak už bylo uvedeno výše, průnik vápenatých a hydrogenuhličitanových iontů do intracelulárního prostoru spermie aktivuje adenylát cyklázu a spouští produkci cAMP. cAMP je známým tzv. druhým poslem signálních drah v somatických buňkách. Ve spermii bylo prokázáno, že cAMP ovlivňuje nárůst tyrozinové fosforylace aktivací cAMP dependentní protein kinázy A (PKA) (VISCONTI a KOPF, 1998).

PKA je tetramerický enzym skládající se ze dvou regulačních (R) a dvou katalytických (C) podjednotek. Ve spermiích jsou přítomny dvě izoformy regulačních podjednotek (RI a RII) (VISCONTI *et al.*, 1997). Aktivita PKA je závislá na přítomnosti cAMP, v jehož nepřítomnosti je komplex R<sub>2</sub>C<sub>2</sub> katalyticky neaktivní. Po navázání 4 molekul cAMP na regulační podjednotky PKA dochází k disociaci a následné aktivaci katalytických podjednotek, které fosforylují další proteiny signálních drah na jejich serin/treoninových zbytcích.

PKA hraje klíčovou roli v kapacitaci, akrozomální reakci a hyperaktivaci spermie (VISCONTI *et al.*, 1995b). Bylo prokázáno, že aktivita PKA v průběhu kapacitace roste. V případě, že je funkce PKA potlačena přidáním inhibitorů tohoto enzymu do media, dochází k zablokování, jak tyrozinové fosforylace, tak celé kapacitace. cAMP dependentní PKA řídí tyrozinovou fosforylací buď pomocí přímého, nebo nepřímého ovlivňování tyrozin kináz nebo fosfatáz (VISCONTI *et al.*, 1995b).

Bylo prokázáno, že během kapacitace lidských spermií dochází k nárůstu fosforylace proteinu p80 a p105 v místě motivu arg-X-X-(ser/thr), které je substrátem PKA. Tyto ser/thr fosforylované proteiny mohou být propojením mezi nárůstem aktivity PKA během časných stádií kapacitace a nárůstem tyrozinové fosforylace objevující se po 1-2hod od spuštění tohoto procesu (O'FLAHERTY *et al.*, 2004).

#### **2.2.3.1.2 MAP kináza**

Mitogenem aktivovaná protein kináza, známá také jako extracelulárním signálem regulovaná kináza (ERK), je serin/treonin kinázou účastnicí se signálních drah probíhajících v savčí spermii. MAP kináza je aktivována pomocí fosforylace na jejím



treoninovém a tyrozinovém zbytku. Tato fosforylace je výsledkem známé signální dráhy spouštěné GTP- vazebným proteinem Ras nebo protein kinázou C a dále vede přes kinázy Raf a MEK.

Přítomnost MAP kinázové izoformy ERK2 (LUCONI et al., 1998) a Ras kinázy (Naz et al., 1992) v hlavičce spermie naznačuje, že tato signální dráha je zde důležitou součástí kontrolních dějů vedoucích k nárůstu fosforylace četných proteinů během kapacitace. Ačkoli proteiny, které jsou pomocí MAP kinázy fosforylovány se doposud nepodařilo identifikovat, je zřejmé, že MAP kináza nepřímo ovlivňuje tyrozinovou fosforylaci. Důkazem tohoto tvrzení je pozorování, že inhibice MAP kinázy vede k zablokování tyrozinové fosforylace proteinů během kapacitace (URNER a SAKKAS, 2003; NAZ a RAJESH, 2004).

### **2.2.3.1.3 PKC**

Protein kináza C je serin/treonin kináza, přítomná v savčí spermii, (Breitbart & Naor, 1999) spojovaná s nárůstem tyrozinové fosforylace během kapacitace. PKC hraje významnou roli v regulaci motility spermie a při spouštění akrozomální reakce, ale její úloha v procesu kapacitace je velice málo prostudována. Zdá se, že zatímco při pokusech *in vitro* se PKC účastní společně s PKA aktivace fosfolipázy D (PLD), která se během kapacitace účastní regulace aktinové polymerizace, za fyziologických podmínek je tento děj regulován především PKA (COHEN *et al.*, 2004)

Po kontaktu spermie se zónou pellucidou vajíčka dochází ve spermii k aktivaci fosfolipázy C (PLC) (BREITBART a NAOR, 1999). PLC štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP<sub>2</sub>) na diacylglycerol (DAG) a inositol trifosfát (IP<sub>3</sub>). Tyto dvě molekuly jsou velice důležitými tzv. druhými posly v signalizačních dráhách somatických buněk. Ve spermii během kapacitace DAG aktivuje PKC. PKC následně otvírá kanály v PM membráně, čímž umožňuje další prostup Ca<sup>2+</sup> iontům do intracelulárního prostoru spermie a pravděpodobně se účastní i na zvýšení tyrozinové fosforylace. Zdá se, že PKC zprostředkovaná proteinová fosforylace a zvýšení koncentrace intracelulárního Ca<sup>2+</sup> může aktivovat tzv. „aktin-severing“ proteiny, které jsou zodpovědné za depolymerizaci filamentárního aktinu v kortikálním cytoskeletu hlavičky těsně před AR (BREITBART a NAOR, 1999).

#### **2.2.3.1.4 Protein tyrozin kinázy**

Jak už bylo řečeno výše tyrozinová fosforylace hraje během procesu kapacitace velice důležitou roli. Dosud však není zcela zřejmé, zda je nárůst tyrozinové fosforylace během kapacitace spermie výsledkem stimulace tyrozin kináz, inhibicí fosfotyrozin fosfatáz a nebo kombinací obou těchto dějů (BREITBART a NAOR, 1999).

Tyrozin kinázy můžeme rozdělit do dvou skupin a to na receptorové tyrozin kinázy (RTK) a nereceptorové protein tyrozin kinázy (PTK). RTK jsou transmembránové proteiny s extracelulární doménou vázající ligand a intracelulární doménou s tyrozin kinázovou aktivitou. Po navázání extracelulárního ligandu dochází k aktivaci tyrozin kinázové domény a fosforylaci tyrozinových zbytků buď přímo na RTK (autofosforylace) nebo na jiných proteinech. Po autofosforylaci RTK dochází pomocí fosforylované domény k aktivaci dalších vnitrobuněčných signalizačních proteinů např. PLC a přenosu signálu dále do buňky (URNER a SAKKAS, 2003). Přítomnost různých RTK ve spermii byla prokázána u několika savčích druhů. Nepřímým důkazem přítomnosti RTK ve spermii je PLC vázaná na PM a aktivovaná tyrozinovou fosforylací (NAZ a RAJESH, 2004).

Mezi nejvýznamnější RTK spermie patří receptor pro epidermální růstový faktor EGFR, který během kapacitace a akrozomální reakce stimuluje fosforylaci několika proteinů a aktivuje PLC (BREITBART a NAOR, 1999). Dalšími RTK identifikovanými ve spermii jsou insuline-like growth factor receptor, p190 c-met tyrozin kináza, TK-32 atd. (NAZ a RAJESH, 2004), jejich úloha v průběhu kapacitace ovšem zatím zůstává nejasná..

Nereceptorové protein tyrozin kinázy jsou v somatických buňkách přítomny v cytoplazmě, jádru nebo navázané na cytoplazmatickou stranu plazmatické membrány. Ve spermii byla přítomnost PTK detekována v hlavičce. Mezi spermatické PTK patří kináza c-yes, která je členem src rodiny a její aktivita je závislá na cAMP, což naznačuje propojení mezi nárůstem koncentrace cAMP a tyrozinové fosforylace během kapacitace (URNER a SAKKAS, 2003). PTK přítomnou v hlavičce savčí spermie je také již výše zmíněný ras protein, který je aktivován navázáním GTP a účastní se signálních kaskád vedoucích k aktivaci MAP kinázy a další.

### 2.2.3.1.5 G-proteiny

G-proteiny jsou důležitou složkou signálních kaskád všech somatických buněk. Přítomnost těchto heterotrimerických GTP-vázajících proteinů byla prokázána i v savčí spermii (KOPF *et al.*, 1986). G- proteiny se skládají ze 3 podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$ , a  $\gamma$ . V neaktivním stavu je na podjednotku  $\alpha$  navázáno GDP a v této podobě celý heterotrimer reaguje na cytosolické straně PM s neaktivovaným receptorem. V případě aktivace receptoru ligandem dochází k přenosu signálu na G-protein. GDP vázané na  $\alpha$  podjednotku je nahrazeno GTP, čímž dochází k aktivaci G-proteinu a k jeho konformačním změnám. Podjednotka  $\alpha$  se oddělí od zbývajících dvou podjednotek a naváže se na další enzym signální kaskády, obvykle adenylátcyklázu nebo fosfolipázu C, čímž aktivuje tvorbu tzv. druhých posílů a zajistí tak přenos signálu dále do nitra buňky. Během přenosu signálu z  $\alpha$  podjednotky na další proteiny dochází k hydrolýze GTP zpět na GDP. Odštěpením P z GTP se  $\alpha$  podjednotka inaktivuje a dochází k její zpětné asociaci s  $\beta$  a  $\gamma$  podjednotkou.

V myších spermích byli G-proteiny nalezeny jak na PM, tak na vnější akrozomální membráně. Bylo prokázáno, že G-proteiny se během kapacitace účastní signálních drah vedoucích k změnám intracelulárního pH a koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Po styku spermie se zónou pellucidou vajíčka dochází k aktivaci G-proteinů. ZP3 receptor je receptorem asociovaným s těmito signálními proteiny (WARD *et al.*, 1992; HINSCH *et al.*, 2005).

### 2.2.3.1.6 PLD

Součástí signálních drah aktivovaných během kapacitace savčí spermie je fosfolipáza D (PLD), která se účastní polymerizace aktinu během kapacitace savčí spermie (COHEN *et al.*, 2004). Aktivace PLD je závislá na aktivaci PKA. PKA nepřímo aktivuje fosfatidylinositol 4-kinázu a tvorbu  $\text{PIP}_2$ , který je kofaktorem aktivace PLD (BREITBAR *et al.*, 2006), stejně jako v somatických buňkách (BROWN *et al.*, 1993). Dalšími signálními molekulami podílejícími se na aktivaci PLD jsou PKC a MAP kináza (COHEN *et al.*, 2004). PLD hydrolyzuje fosfatidyl cholin a produkuje tak kyselinu fosfatidovou, která zprostředkuje polymerizaci G (globulárního) aktinu na F (filamentální) aktin (BREITBAR *et al.*, 2006).

### 2.2.3.2 Signální dráhy v bičíku

Vzhledem k tomu, že bičík je pro spermii především prostředkem k přemístění na místo setkání s oocytem, je v popředí mého zájmu především hlavička spermie a bičíku se tato diplomová práce dotýká jen okrajově. Přesto během kapacitace dochází v této organelle k natolik významným změnám a dějům, že je nelze zcela pominout.

V průběhu kapacitace dochází v bičíku spermie k četným biochemickým a biofyzikálním změnám, které mají za následek, že během přechodu z dělohy do vejcovodu savčích spermie prodělávají výrazné změny v pohybu bičíku, tento stav se nazývá hyperaktivace. Inicivace hyperaktivace spermie je řízena uvolněním vápenatých iontů ze zásobáren v reziduálním jaderném obalu do prostoru bičíku (HO a SUAREZ, 2003) a signální dráhy účastníci se řízení tohoto procesu jsou shodné se signálními dráhami aktivovanými během kapacitace v hlavičce savčí spermie.

Bičík je rovněž hlavním místem výskytu tyrozinové fosforylace ve spermatické buňce. V průběhu kapacitace dochází k postupnému nárůstu tyrozinové fosforylace nejprve v hlavní a poté ve střední (mitochondriální) části bičíku spermie a bylo zjištěno, že fosforylace hlavní části bičíku je prerekvizitou pro další postup fosforylace do střední části bičíku. Tento postup tyrozinové fosforylace je stimulován navázáním spermie na zónu pellucidu nebo oolemu vajíčka. Brzy po fúzi spermie s vajíčkem dochází k postupné defosforylaci celého bičíku spermie (URNER a SAKKAS, 2003). Nástup lineární a progresivní motility spermie během hyperaktivace velice úzce souvisí s nárůstem tyrozinové fosforylace četných proteinů přítomných v PM bičíku a tento fakt rovněž přispívá k vysvětlení, proč navázání spermie na zónu pellucidu vajíčka iniciuje zvýšení výskytu tyrozinové fosforylace po celé délce bičíku.

Nejvýznamnějším a hlavním proteinem v bičíku spermie, který je během kapacitace fosforylován na svých tyrozinových zbytcích, je A-kinase anchoring protein (AKAP). V somatických buňkách je úkolem AKAP vázat PKA na cytoskeletální proteiny nebo vnitrobuněčné organely a udržovat ji tak v těsné blízkosti jejích cílových proteinů. AKAP váže PKA pomocí jejích R podjednotek (FELICIELLO *et al.*, 2001). V savčích spermii byl AKAP lokalizován ve fibrózní pochvě bičíku (URNER a SAKKAS, 2003; NAZ a RAJESH, 2004), kde interaguje s RII podjednotkou spermatické PKA. AKAP byl objeven v souvislosti s jeho vazbou na PKA, ale později bylo prokázáno, že může vázat i jiné molekuly signální drah jako např. PKC

(FELICIELLO *et al.*, 2001). Zdá se, že AKAP hraje významnou roli při regulaci motility spermie a v případě, že je jeho funkce znemožněna pomocí použití příslušného blokátoru je motilita spermie zcela inhibována. Pomocí knockout technologie bylo prokázáno, že AKAP4 je důležitý protein udržující organizaci a integritu fibrózní pochvy. V nepřítomnosti AKAP4 dochází k úplné ztrátě motility spermie, protože není umožněna asociace signálních a glykolytických enzymů na fibrózní pochvu bičíku savčí spermie (NAZ a RAJESH, 2004).

Za zmínku stojí, že přítomnost AKAP byla prokázána také v akrozomální oblasti hlavičky spermie (VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 1999) a ekvatoriálním segmentu hlavičky kančí spermie (KYSELOVÁ A PĚKNICOVÁ, osobní sdělení).

## **2.2.4 Důsledky působení signálních drah**

### **2.2.4.1 Dynamika aktinového cytoskeletu během kapacitace a akrozomální reakce**

Cytoskelet tvořený složitou sítí proteinových vláken je nedílnou součástí cytoplazmy eukaryotické buňky. Tato síť je nesmírně dynamickou strukturou, která je neustále reorganizována. Cytoskelet slouží jako vnitřní opora buňky, podílí se na uspořádání organel, vnitrobuněčných pohybech i na pohybu celé buňky, hraje nezastupitelnou roli v buněčném cyklu a mnoha dalších procesech. Cytoskeletální struktury zahrnují tři typy proteinových vláken: mikrotubuly, intermediární filamenta a mikrofilamenta. Každý z těchto tří typů vláken vytváří své struktury v cytoplazmě a je vystavěn z jiného typu proteinů.

Ve spermích savců byly identifikovány zástupci všech tří výše uvedených typů cytoskeletálních proteinů a všechny zde mají nezastupitelnou úlohu. Popsání lokalizace jednotlivých cytoskeletálních proteinů a jejich funkce v savčí spermii bylo součástí mé seminární práce (JURSOVÁ, 2005). Tato diplomová práce se proto věnuje především aktinu a s ním asociovaným proteinům, a to z důvodu, že aktin hraje nezastupitelnou roli během kapacitace a následné akrozomální reakce a je nedílnou součástí signálních drah regulujících tyto dva klíčové děje.

V maturovaných spermích se aktin nachází v monomerické G- (globulární) i F- (filamentální) formě. Jeho přítomnost byla popsána jak v hlavičce

spermie, kde se účastní dějů spojených s kapacitací a akrozomální reakcí, tak v bičíku spermie, kde se pravděpodobně podílí na regulaci motility.

#### **2.2.4.1.1 Aktin**

V hlavičce spermie je aktin součástí perinukleární théky (DE LOUDREZ JUAREZ MOSQUEDA a MUJICA, 1999). Mnohé studie dokumentují lokalizaci aktinu v kortikálním cytoskeletu akrozomální oblasti hlavičky spermie např. ve spermiích býka (HOWES *et al.*, 2001), kance (PETERSON *et al.*, 1990; PALECEK *et al.*, 1999; DVORAKOVA *et al.*, 2001), člověka (PALECEK *et al.*, 1999; DVORAKOVA *et al.*, 2005), morčete (HERNANDEZ-GONZALEZ *et al.*, 2000), veverky, křečka a potkana (FLAHERTY *et al.*, 1988; VOGL *et al.*, 1993; DVORAKOVA *et al.*, 2005). Aktin byl detekován jako součást postakrozomální oblasti hlavičky spermií myši, potkana (VOGL *et al.*, 1993; PARANKO *et al.*, 1994), morčete (DELGADO-BUENROSTRO *et al.*, 2005), králíka (FLAHERTY *et al.*, 1988), býka (FLAHERTY *et al.*, 1988; YAGI a PARANKO, 1995), kance (PALECEK *et al.*, 1999; DVORAKOVA *et al.*, 2001) a člověka (PALECEK *et al.*, 1999). V subakrozomálním cytoskeletu spermie byla také prokázána lokalizace aktinu a to u myši, potkana (PARANKO *et al.*, 1994) a křečka (DVORAKOVA *et al.*, 2005).

Aktin byl rovněž lokalizován v bičíku spermie. Tento cytoskeletální protein je součástí krčku spermií myši, potkana (PARANKO *et al.*, 1994), křečka, králíka (FLAHERTY *et al.*, 1988) býka (FLAHERTY *et al.*, 1988; YAGI a PARANKO, 1995), kance (PALECEK *et al.*, 1999; DVORAKOVA *et al.*, 2001) a člověka (FLAHERTY *et al.*, 1988; PALECEK *et al.*, 1999). Dále byl aktin prokázán ve střední části bičíku spermií kance (PALECEK *et al.*, 1999; DVORAKOVA *et al.*, 2001) a v hlavní části bičíku spermií býka (YAGI & PARANKO, 1995), kance (PALECEK *et al.*, 1999; DVORAKOVA *et al.*, 2001), křečka (FOQUET *et al.*, 1991) a člověka (FLAHERTY *et al.*, 1988; VIRTANEN *et al.*, 1984).

#### **2.2.4.1.2 Spektrin**

Aktin je asociován s velkým množstvím aktin vázajících proteinů, které mají za úkol pomáhat při jeho polymerizaci a depolymerizaci, vazbě na jiné buněčné

komponenty, umožňují aktinem zprostředkovaný pohyb atd. Mezi tyto proteiny patří i spektrin, který byl předmětem našeho studia.

Spektrin je velice důležitou součástí cytoskeletu buněk všech mnohobuněčných eukaryot, kde slouží jako protein pomáhající aktinu udržovat filamentární formu (actin-bundling protein) a zároveň ho váže na plazmatickou membránu (actin anchoring protein) (BRODERIC a WINDER, 2005). V somatických buňkách se spektrin nachází na cytosolické straně plazmatické membrány, kde váže aktinová filamenta a vytváří jejich křížení v sítích kortikálního cytoskeletu. Kortikální cytoskelet je odpovědný za stabilitu, pevnost a flexibilitu plazmatické membrány a tím celé buňky (ELGSEATER et al. 1986).

V savčí spermii byl spektrin lokalizován v kortikálním cytoskeletu, ekvatoriálním segmentu a krčku (VIRTANEN *et al.*, 1984; YAGI a PARANKO, 1995; PALECEK *et al.*, 1999; HERNANDEZ-GONZALEZ *et al.*, 2000; DVORAKOVA *et al.*, 2005). Lokalizace aktinu a spektrinu je tedy v hlavičce savčí spermie obdobná a je tedy možné, že zde dochází k interakci těchto dvou proteinů. Vzhledem k důležitosti účasti aktinových sítí na procesech probíhajících ve spermii před oplozením je nutné pochopit úlohu jednotlivých aktin vázajících proteinů během těchto dějů.

#### **2.2.4.1.3 Aktinová polymerizace**

Bylo prokázáno, že během kapacitace dochází k nárůstu polymerace G-aktinu na F-aktin a to nejprve ve střední části bičíku a později i v hlavičce savčí spermie. V případě, že dojde kablokování procesu kapacitace, k polymeraci aktinu nedochází. F-aktin se v hlavičce spermie během kapacitace polymeruje mezi vnější akrozomální membránou a PM, kde brání přiblížení a fúzi těchto dvou membrán před zahájením AR a kde se účastní přesunu fosfolipázy C z cytosolu na PM spermie.

Aktinová polymerizace během kapacitace savčí spermie je řízena pomocí tyrozinové fosforylace, jejíž nárůst během tohoto procesu koreluje s nárůstem výskytu F-aktinu (BRENER *et al.*, 2003). Zdá se, že na řízení aktinové polymerizace se podílí signální dráha zahrnující PKA a PKC a  $Ca^{2+}$  dependentní protein tyrozin kinázu nebo kinázy (BREITBART *et al.*, 2005). Jak již bylo zmíněno, během kapacitace savčí spermie se řízení aktinové polymerace účastní další signální molekula - fosfolipáza D (PLD). PLD byla v savčí spermii lokalizována především v akrozomální oblasti hlavičky, kdeablokování její funkce vede k prokazatelnémuablokování celé aktinové

polymerace. Dále bylo prokázáno, že k nárůstu aktivity PLD dochází před počátkem polymerizace G-aktinu na F-aktin. Aktivace PKA nebo PKC navozuje během 10-20min relativně rychlý nárůst aktivity PLD a aktinové polymerace (COHEN *et al.*, 2004). Pokud kdykoli v průběhu kapacitace dojde k inhibici funkce PKA, dojde k úplnému zablokování aktinové polymerizace, zatímco inhibice PKC způsobí pouze částečné snížení počtu polymerovaného aktinu (COHEN *et al.*, 2004).

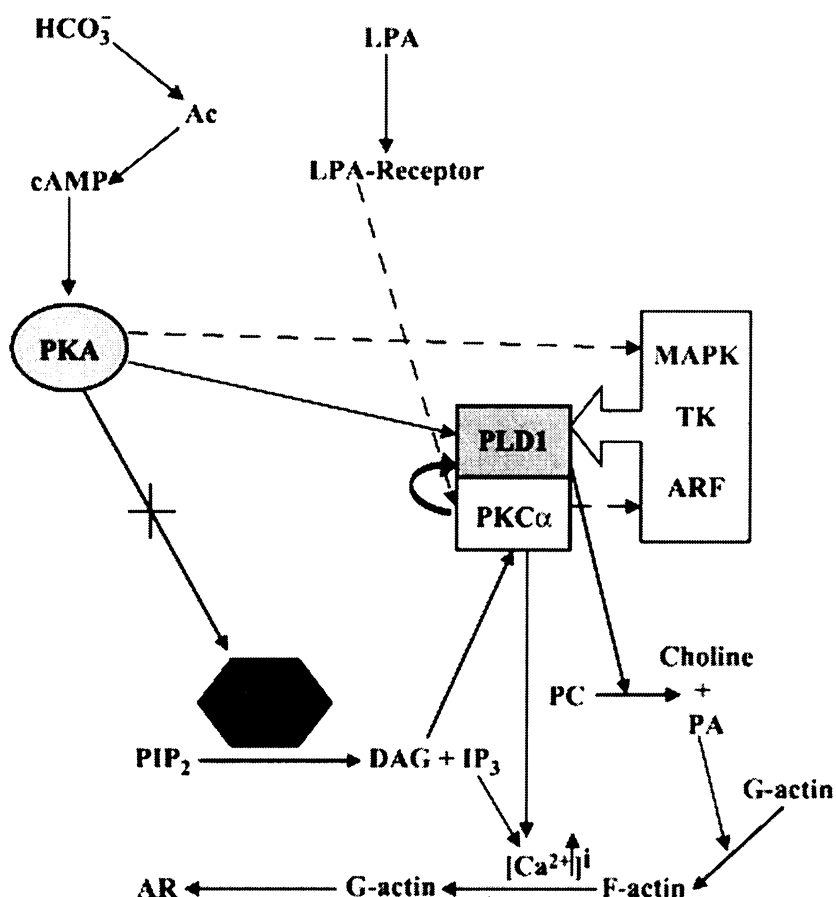
Regulace aktinové polymerizace se dále účastní EGF, který je přítomen v samičím reprodukčním traktu. Navázání EGF na spermii má za následek zvýšení tyrozinové fosforylace a aktinové polymerizace. EGF během kapacitace stimuluje rychlé navázání aktinových filament a PLC na plazmatickou membránu spermie (BRENER *et al.*, 2002).

#### **2.2.4.1.4 Aktinová depolymerizace**

Po kontaktu spermie se zónou pellucidou vajíčka dochází k iniciaci akrozomální reakce. Při této receptorem řízené exocytóze dochází ke splynutí vnější akrozomální a plazmatické membrány. K tomu, aby toto splynutí bylo možné, je nutné odstranit F-aktinové sítě kortikálního cytoskeletu nacházející se mezi vnější akrozomální a plazmatickou membránou, které vznikly v průběhu kapacitace spermie a které slouží jako fyzická bariéra bránící exocytóze. V případě, že je rozpad F-aktinu znemožněn, dochází k zablokování AR (BRENER *et al.*, 2002).

Signálem vedoucím k depolymerizaci F-aktinových sítí je náhlé zvýšení intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$  iontů a aktivace PLC. Bylo zaznamenáno, že během iniciace akrozomální reakce dochází k četným defosforylacím tyrozin fosforylovaných proteinů. Zdá se, že na konci kapacitace dochází k aktivaci jedné nebo více fosfatáz, které defosforylují a tak aktivují některé aktin-odděluující proteiny (actin severing proteins) (BRENER *et al.*, 2002).





Obr. 2.4 Signální dráhy vedoucí ke změnám v aktinovém cytoskeletu během kapacitace  
(převzato z BREITBART *et al.*, 2005)

Aktinová polymerizace je řízena přes aktivaci PLD cestou  $\text{HCO}_3^-/\text{cAMP}/\text{PKA}$  a nebo přes G-proteiny vázané na LPA receptor (LPA – lysofosfatidylková kyselina). Aktivace PLD se účastní MAP kináza (MAPK), tyrozin kinázy a ADP ribosylační faktor (ARF). Aktivace PLD vede ke štěpení fosfatidylcholinu na cholin a kyselinu fosfatidovou, která řídí polymerizaci aktinu.

## 2.2.4.2 Akrozomální reakce

### 2.2.4.2.1 Akrozóm

Akrozóm je syntetizován v pozdní fázi spermatogeneze ze struktur Golgiho aparátu a obsahuje hydrolytické enzymy nezbytné k proniknutí spermie obaly obklopujícími vajíčko. Mnohé akrozomální proteiny se později účastní fúze membrán spermie a vajíčka a pomáhají při vaječné exocytóze kortikálních granul bránící polyspermii. Tento váček se nachází v anteriorní části hlavičky spermie a jeho vnitřní membrána pokrývá jednu až dvě třetiny povrchu spermatického jádra. Vnitřní akrozomální membrána je výrazně zoubkována.

## Struktura akrozómu

Membránu vymezující prostor akrozomálního váčku rozlišujeme na vnější akrozomální membránu, která leží v těsném kontaktu s plazmatickou membránou anteriorní části spermatické hlavičky, a na vnitřní akrozomální membránu, která obklopuje anteriorní část vnější membrány jádra. Samotný akrozóm se pak skládá z akrozomální čepičky (anteriorní část) a z ekvatoriálního segmentu (posteriorní část). Oblast akrozomální čepičky vedoucí po anteriorní hraně jádra označujeme jako tzv. apikální část (apical segment) a oblast obklopující jádro jako tzv. hlavní část (principal segment). Během akrozomální reakce vnější akrozomální membrána splývá s membránou plazmatickou a obsah váčku je tak uvolněn do vnějšího prostředí. Oproti tomu vnitřní akrozomální membrána zůstává společně s ekvatoriálním segmentem zachována až do doby fúze spermií s vajíčkem (YANAGIMACHI, 1994).

Tvar a velikost akrozómu se mezidruhově liší a z toho vyplývá odlišná poloha jednotlivých struktur v hlavičce. U spermií s kulatou či oválnou hlavičkou se nachází ekvatoriální segment přibližně ve střední části, zatímco u spermií falciformních obvykle pokrývá téměř celý laterální povrch hlavičky. Konečný tvar akrozómu je ovlivňován vnější silou cytoskeletu spermatid, cytoplazmy Sertoliho buněk a vnitřní silou a tvarem jádra. Jak lze očekávat, významnou roli při tvarování akrozómu mají také genetické faktory. Obsah akrozómu často není v tomto váčku rozmístěn rovnoměrně, jeho vnitřní část obsahuje jak lamelární tak krystalické struktury. Membrána, zejména v ekvatoriálním segmentu, obsahuje proteiny, které vytváří klastry a dávají jí tak velmi pravidelně zrnitý vzhled. Vnější akrozomální membrána je během akrozomální reakce velice křehká a lehce poškoditelná. Její vnitřní povrch však pokrývá elektron-denzní vrstva díky níž vypadá hustší. Tento vnitřní plášť vnější akrozomální membrány se skládá především z glykoproteinů. Tři nejčtenější z nich mají molekulové hmotnosti 290kDa, 280kDa a 260kDa. Předpokládá se, že glykosilované molekuly by na tomto místě mohly sloužit ke stabilizaci membrány nebo hrát roli v membránové fúzi probíhající během akrozomální reakce (OLSON *et al.*, 1985). V nedávné době se podařilo zjistit, že jedním z těchto proteinů, které mohou hrát roli při stabilizaci akrozomální membrány, je protein CD46. CD46 se ve spermiích nachází výhradně na akrozomální membráně a jeho absence způsobuje nárůst spontánní akrozomální reakce (INOUE *et al.*, 2003).

## Obsah akrozómu

Akrozóm je specializovaným lysozómem, a proto v něm nacházíme množství hydrolytických enzymů běžně přítomných v lysozómech somatických buněk. Na rozdíl od nich ovšem akrozóm spermií nemá schopnost fagocytózy ani autofagocytózy a jeho enzymy jsou určeny k plnění extracelulárních funkcí. Akrozóm je současně charakterizován také jako vápníkem regulovaný sekretorický váček, jehož obsah je exocytózou uvolněn během akrozomální reakce. Uvolnění a aktivace akrozomálních enzymů lze blokovat inhibitory proteáz.

Akrozomální váček mimo jiné obsahuje také enzymy zcela unikátní a pro něj charakteristické. Mezi tyto proteiny patří akrozin a hyaluronidáza. Funkční akrozin o molekulové hmotnosti 25-60kDa vzniká během spermatogeneze štěpením jeho většího prekurzoru nazývaného proakrozin. Proakrozin patří do serin proteázové superrodiny, která je exprimována pouze ve spermatogenních buňkách. Proakrozin se nachází zejména v anteriorní části akrozómu a je přeměňován na svou aktivní formu akrozin ještě před uvolněním z akrozomálního váčku během akrozomální reakce. Aktivaci enzymu mohou ovlivňovat některé další molekuly přítomné spolu s ním v akrozómu, ale i v seminální plazmě.

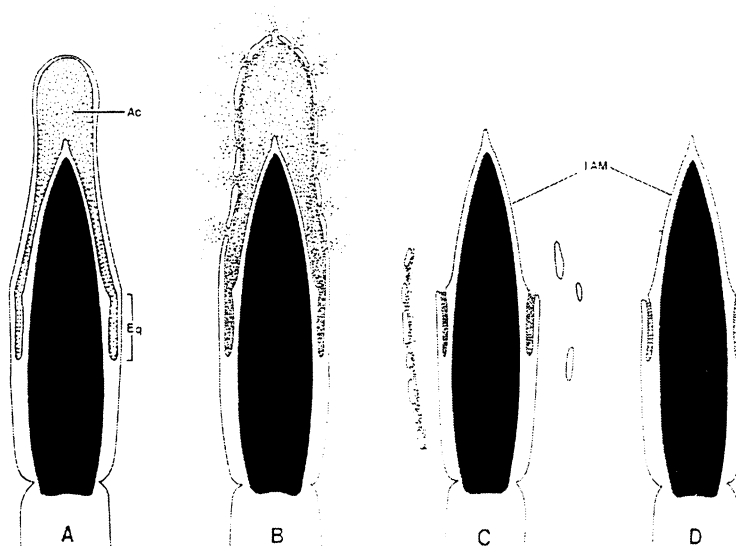
Druhým pro akrozóm specifickým enzymem je výše zmíněná hyaluronidáza štěpící kyselinu hyaluronovou, která je součástí mezibuněčné hmoty. Tato glykosidáza se v akrozómu nachází ve velkém nadbytku a je lokalizována zejména v hlavní části akrozómu. Nicméně to, že je zde po akrozomální reakci detekována ještě zhruba polovina původního množství enzymu, dokazuje jeho částečnou vazbu na vnitřní akrozomální membránu, kde se účastní fúze spermie na vajíčko (MEYERS, 2001). Hyaluronidáza vytváří četné oligomerní formy, které vznikají spojováním  $\alpha$  a  $\beta$  monomerů pomocí cysteinových můstků. Monomery se vzájemně liší stupněm glykosilace. Molekulová hmotnost tohoto enzymu se u savců pohybuje v rozmezí 60-70kDa.

Akrozóm obsahuje veliké množství dalších enzymů, mezi něž patří fosfatáza,  $\beta$ -N-acetylglukozaminidáza, arylamidáza, arylsulfatáza A, fosfolipázy, kolagenázy, množství esteráz a mnoho dalších enzymů nezbytných pro průnik spermie do vajíčka (YANAGIMACHI, 1994).

#### **2.2.4.2.2 Akrozomální reakce**

Akrozomální reakce je z vnějšího prostředí regulovaná exocytóza, která je za fyziologických podmínek spouštěna navázáním spermie na extracelulární obal vajíčka – zónu pellucidu. Navázání zóna pellucida proteinu 3 (ZP3) na ZP3 receptory spermie, které se nacházející v anteriorní části hlavičky, má za následek mnohočetné fúze mezi vnější akrozomální membránou a plazmatickou membránou, jež se po depolymerizaci aktinu dostává do její těsné blízkosti. Tato fúze vede k uvolnění akrozomálních enzymů do extracelulárního prostředí spermie a k odkrytí molekul vázaných na vnitřní akrozomální membránu. Proteiny vázané na vnitřní akrozomální membránu hrají důležitou roli mimo jiné v navázání spermie na oolemu – plazmatickou membránu vajíčka. Pouze spermie, které prošly AR jsou schopné oplození vajíčka. Je nutné zmínit, že jen plně kapacitované spermie jsou schopné projít fyziologicky aktivovanou akrozomální reakcí. Z toho vyplývá, že tyto dva děje, kapacitace a akrozomální reakce, jsou časově a funkčně závislé a některé signální dráhy vedoucí k AR jsou modifikovány již během kapacitace. AR je tedy vyvrcholením kapacitace.

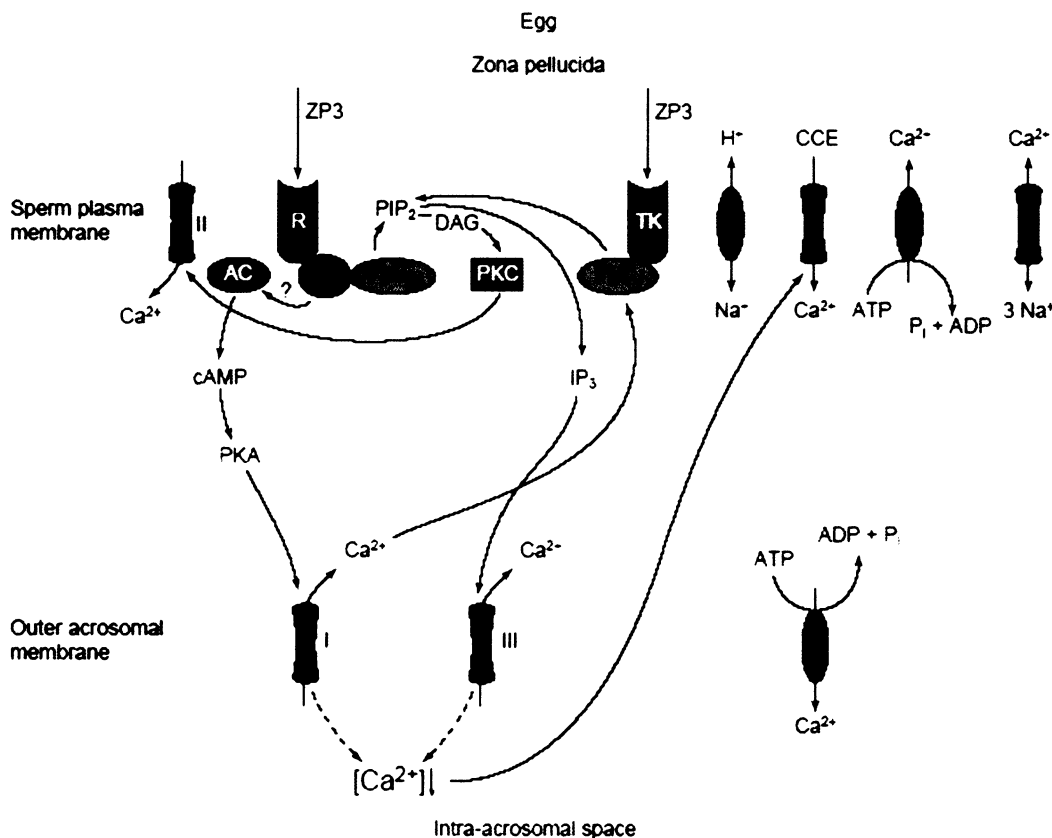
Zóna pellucida je glykoproteinový obal produkovaný rostoucím vajíčkem a skládá se ze tří hlavních zóna pellucida proteinů označovaných jako ZP1, ZP2 a ZP3. Tyto proteiny jsou post-translačně modifikovány pomocí glykosilace, sulface a specifické proteolýzy. ZP2 a ZP3 vytváří dlouhá vlákna, která jsou pomocí ZP1 propojena do trojrozměrné sítě se zřetelnými strukturálními repeticemi. Studie na myších spermích prokázali, že ZP3 je zodpovědný za primární vazbu spermie pomocí receptorů přítomných na PM na ZP vajíčka a iniciaci AR a ZP2 je zodpovědný za sekundární vazbu spermie pomocí receptorů přítomných na vnitřní akrozomální membráně na ZP vajíčka po AR (YANAGIMACHI, 1994).



**Obr. 2.5** Diagram znázorňující průběh akrozomální reakce. (A) před AR; (B) právě probíhající AR; (C) a (D) po AR. Ac – akrozóm; Eq – equatoriální segment; IAM – vnitřní akrozomální membrána. (převzato z YANAGIMACHI, 1994)

#### 2.2.4.2.3 Signální dráhy vedoucí k AR

Sekrece akrozomálního váčku se účastní některé signální molekuly, které řídí i exocytózu v somatických buňkách např. G-proteiny, IP3, IP3 receptor, fosfolipáza C,  $\text{Ca}^{2+}$  ionty a napět'ově ovládané  $\text{Ca}^{2+}$  kanály. Dalšími důležitými signálními molekulami AR jsou PKA a PKC. Rab3A GTPáza a SNAREs, dvě velice důležité molekuly nezbytné pro membránovou fúzi v somatických buňkách, byli detekováni v savčí spermii a mohou se tedy podílet i na membránové fúzi odehrávající se během AR (WASSARMAN, 2002; DE BLAS *et al.*, 2005).



Obr. 2.7 Signální dráhy vedoucí k AR (převzato z BREITBART a NAOR, 1999)

### Ligandy spouštějící AR

Během průchodu spermie skrze cumulus oophorus obklopující oocyt dochází k navazování progesteronu na jeho receptory přítomné na spermatické hlavičce a k prvním změnám vedoucím k iniciaci akrozomální reakce. Progesteron působí na GABA<sub>A</sub> receptory a iniciuje tak tvorbu vnitrobuněčných druhých posílů jako např. DAG (BREITBART a SPUNGIN, 1997). Tento receptor je unikátním komplexem steroidního receptoru a Cl<sup>-</sup> iontového kanálu. Pod vlivem progesteronu dochází k alkalizaci cytosolu hlavičky spermie a změnám intracelulární koncentrace Ca<sup>2+</sup> iontů. Bylo zjištěno, že progesteron není *in vivo* schopen sám navodit akrozomální reakci, ale že jeho přítomnost zvyšuje schopnost spermií projít akrozomální reakcí indukovanou navázáním na ZP (BENOFF, 1998).

K iniciaci fyziologické akrozomální reakce dochází po kontaktu spermie se zónou pellucidou oocytu a jejím navázáním na ZP3, který je hlavním a nejdůležitějším ligandem spouštějícím AR. Za vazbu ZP3 na receptory přítomné na povrchu hlavičky

spermie je zodpovědná glykanová složka tohoto proteinu. Vazebná aktivita ZP3 je situována na C-konci tohoto glykoproteinu. Ačkoliv u mnoha druhů savců byla prokázána klíčová úloha cukerné složky ZP3 ve vazbě spermie na ZP, přesná oligosacharidová sekvence pro tuto vazbu není podstatná a u jednotlivých druhů se liší (YANAGIMACHI, 1994; BENOFF, 1998). Bylo prokázáno, že volné monosacharidy, polysacharidy a oligosacharidy, které způsobují inhibici vazby spermie na ZP, nejsou schopné iniciovat AR reakci. Tyto poznatky naznačují, že k spuštění signálních drah vedoucích k AR je nutná agregace povrchových receptorů spermie, která je umožněna mnohočetnou vazbou těchto receptorů na ZP (BENOFF, 1998).

### **Role G-proteinů**

G-proteiny jsou důležitým druhým poslem v signálních drahách vedoucích k AR (KOPF, 1990). Typ guanin vázajících proteinů  $G_i$ , přítomný v savčí spermii, je inhibován pertusis toxinem. Tento toxin je získáván z bakterie *Bordetella pertusis* způsobující černý kašel. Pertusis toxin specificky ribosyluje  $\alpha$  podjednotku G – proteinů a tím je funkčně inaktivuje. Bylo prokázáno, že pertusis toxin inhibuje ZP3 indukovanou AR, ale nemá vliv na AR vyvolanou přidáním kalcium ionoforu do kapacitačního média. Z těchto poznatků vyplývá, že G-proteiny hrají úlohu ve zvýšení intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$  iontů (BREINTBART a SPUNGIN, 1997). Po navázání ZP3 na receptor dochází k aktivaci G-proteinů, které způsobí na iontové kanály přítomné v PM spermie a umožní tak průnik kationů, zejména  $H^+$ , do nitra buňky. Tímto dochází k alkalizaci (zvýšení pH) intracelulárního prostoru spermie a membránové depolarizaci. Tyto změny mají za následek otevření napětově ovládaných  $Ca^{2+}$  iontových kanálů a následné zvýšení vnitrobuněčné koncentrace  $Ca^{2+}$  iontů (FLORMAN *et al.*, 1998).

### **Role tyrozinové fosforylace**

Na PM savčí spermie je přítomen 95kDa protein, který byl identifikován jako receptor ZP3 s tyrozin kinázovou aktivitou (ZPR) (LEYTON a SALING, 1989). Ze somatických buněk je známo, že agregace některých receptorů vede k autofosforylaci těchto proteinů. Stejný mechanismus byl popsán i v případě ZP3 receptoru savčí spermie, kdy agregace receptorů vede k tyrozinové fosforylaci 95kDa proteinu PM (LEYTON a SALING, 1989). Bylo prokázáno, že tento receptor aktivuje  $Na^+/H^+$  pumpu, která zvyšuje vnitrobuněčnou alkalizaci, což způsobuje depolarizaci PM

a aktivaci  $\text{Ca}^{2+}$  iontových kanálů (BREINTBART a SPUNGIN, 1997). ZPR by dále mohl být zodpovědný za aktivaci fosfolipázy C, která vede k tvorbě fúzogenních lipidů. Aktivace fosfolipázy C pomocí ZPR se děje buď přímo pomocí tyrozinové fosforylace, nebo nepřímo aktivací napět'ově ovládaných  $\text{Ca}^{2+}$  iontových kanálů, která má za následek zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a zpětnou regulaci fosfolipázy C (TOMES et al., 1996).

### **Role protein kináz**

Součástí signálních drah podílejících se na řízení průběhu akrozomální reakce je kromě tyrozin kináz i několik serin treonin kináz jako např. PKA a PKC.

Přestože je zřejmé, že signální dráha adenylát cykláza/cAMP/PKA hraje během AR důležitou úlohu, její přesný význam nebyl doposud zcela objasněn. Během AR byl zaznamenán nárůst intracelulární koncentrace cAMP, který vypovídá o aktivaci adenylát cyklázy během tohoto děje. Bylo prokázáno, že inhibitory cAMP dependentní PKA inhibují AR (BREINTBART a SPUNGIN, 1997) a že adenylát cykláza vázaná na PM membránu spermie je aktivována vazbou spermie na ZP vajíčka. Dále byli na vnější akrozomální membráně nalezeny cAMP a PKA ovládané  $\text{Ca}^{2+}$  iontové kanály. PKA pravděpodobně aktivuje tyto napět'ově ovládané kanály, což způsobí uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$  iontů z lumen akrozómu do cytosolu spermie. Tento první a relativně malý nárůst v koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytosolu je signálem, který aktivuje PLC (BREINTBART a SPUNGIN, 1997).

PCL štěpí  $\text{PIP}_2$  na  $\text{IP}_3$  a DAG, který řídí přesun PKC na PM a její aktivaci (FLORMAN *et al.*, 1998; KOPF, 1990; WASSARMAN, 2002). Zdá se, že PKC má v průběhu AR dvě úlohy. První je aktivace vápenatých kanálů v PM spermie, která vede k jejich otevření a ke druhému, tentokrát většímu nárůstu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytosolu spermie během AR. Tato úloha PKC byla pozorována i v somatických buňkách (BREINTBART a SPUNGIN, 1997). Druhá možná úloha PKC během AR je v aktivaci fosfolipázy  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ), která hydrolyticky štěpí fosfolipidy PM (LAX *et al.*, 1990).

### **Role $\text{Ca}^{2+}$ iontů během akrozomální reakce**

Vápenaté ionty hrají klíčovou roli v receptorové odpovědi a fúzi membrán během akrozomální reakce spermie (YANAGIMACHI, 1994). Zahájení průniku vápníku do cytosolu spermie je jednou z nejranějších odpovědí po indukci AR.



Zablokování kanálů pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty vede k inhibici AR.  $\text{Ca}^{2+}$  ionty pronikají do cytosolu spermie přes napětově ovládané  $\text{Ca}^{2+}$  iontové kanály a zdá se, že  $\text{Ca}^{2+}$  ionty se zde účastní dvou důležitých dějů.

První významnou úlohou  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytosolu spermie je aktivace aktin severing proteinů, které mají za úkol odstranit sítě F-aktinu nacházející se mezi vnější akrozomální membránou a jí obklopující PM apikální části hlavičky savčí spermie. V somatických buňkách byla prokázána aktivace aktin severing proteinů podílejících se na depolymerizaci aktinu vysokou koncentrací intracelulárního vápníku a jejich účast na buněčné exocytóze (JAMNEY, 1994).

Druhou funkcí zvýšení koncentrace vápenatých iontů je spuštění fúze vnější akrozomální a plazmatické membrány (YANAGIMACHI, 1994). Tento děj ovlivňují  $\text{Ca}^{2+}$  ionty buď přímo podporou změn v lipidovém složení PM (BENOFF, 1998) tím, že neutralizují negativní náboj membrány (YANAGIMACHI, 1994), nebo nepřímo aktivací  $\text{PLA}_2$  (BREINTBART a SPUNGIN, 1997).  $\text{PLA}_2$  štěpí fosfatidyl cholin na lysofosfatidyl cholin a kyselinu arachidonovou. Obě tyto molekuly jsou známé jako vysoce fúzogenní. Současně fosfolipáza D štěpí fosfatidyl cholin na další dvě velmi fúzogenní látky a to cholin a kyselinu fosfatidovou (YANAGIMACHI, 1994).  $\text{Ca}^{2+}$  ionty ovlivňují i funkci proteinů SNAREs a synaptotagminu, které se přímo účastní fúze membrán (DE BLAS *et al.*, 2005).

#### **2.2.4.2.4 Spontánní vs. indukovaná AR**

Jak už bylo uvedeno výše, akrozomální reakce je spouštěna navázáním ligandu (např. ZP3 či progesteronu) na receptor přítomný na PM hlavičky spermie. Je však známo, že spermie většiny savčích druhů jsou schopné projít akrozomální reakcí bez stimulace ZP nebo jiným ligandem. Pokud dojde u motilních spermií v kapacitačním médiu k akrozomální reakci bez přítomnosti jakéhokoli stimulačního činidla, je tento jev nazýván spontánní akrozomální reakcí. Výskyt spontánní akrozomální reakce je závislý na mnoha okolnostech jako např. na příslušnosti k živočišnému druhu, složení media nebo míře maturace spermie (YANAGIMACHI, 1994).

Naproti tomu akrozomální reakce může být indukována *in vitro* buď přidáním fyziologických ligandů do kapacitačního média, jako solubilizovaná zona pellucida či progesteron, , nebo nefyziologickými induktory AR *in vitro* tzv. ionofory,

mezi které patří např. kalcium ionofor A23187, který způsobuje výměnu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů za  $2\text{H}^+$  ionty. Bylo zjištěno, že thapsigargin způsobuje nárůst koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytosolu spermie a indukuje AR (BREINTBART a SPUNGIN, 1997). Thapsigargin, který je získáván z rostlin rodu *Thapsia*, byl původně popsán jako blokátor  $\text{Ca}^{2+}$  pump endoplazmatického retikula (THASTRUP *et al.*, 1990). V případě použití nefyziologických induktorů AR dochází k vynechání části signálních drah podílejících se na fyziologické AR, ovšem výsledná AR je morfologicky nerozlišitelná od AR indukované ZP (BREINTBART a SPUNGIN, 1997).

Využití vápníku jako druhého posla vyžaduje přísnou regulaci jeho koncentrace v cytosolu spermie. Arnoult *et al.* (1997) prokázali, že fosforylace napětově ovládaných  $\text{Ca}^{2+}$  iontových kanálů, vede k zužování průchodu těmito kanály a že jejich defosforylace má opačný efekt. Na základě těchto poznatků lze usuzovat, že napětově ovládané  $\text{Ca}^{2+}$  iontové kanály nebo molekuly řídící jejich aktivitu by mohly být během kapacitace substrátem tyrozin kináz a jejich tyrozinová fosforylace by mohla sloužit jako ochrana před předčasným průnikem  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do intracelulárního prostoru spermie a tudíž bránit zahájení spontánní akrozomální reakce (FLORMAN *et al.*, 1998).

### 2.2.5 Stabilita membrán spermie

Je všeobecně známo, že plazmatická membrána spermie je velice specializovaná a že se do značné míry odlišuje svou organizací od plazmatické membrány somatických buněk. PM spermie je unikátní především svým rozdělením na jednotlivé velmi dobře rozeznatelné povrchové domény, které se navzájem od sebe odlišují jak stavbou, tak funkcí. Tyto domény jsou dynamické struktury a během života buňky prochází četnými změnami v uspořádání a obsahu (BEARER a FRIEND, 1990).

Na rozdíl od membrány většiny somatických buněk, kde je lipidům více méně dovolená „volná difúze“, je v membráně spermie 30 – 50% lipidů ukotveno. Příčinou tohoto ukotvení je pravděpodobně nutnost fúze plazmatické a vnější akrozomální membrány a dále pak fúze membrán vajíčka a spermie. Ve srovnání se somatickými buňkami obsahuje spermatická membrána neobvykle vysokou koncentraci dlouhých alifatických nenasycených mastných kyselin. Jsou zde také hojně zastoupeny glykolipidy, fosfolipidy a steroly, zejména pak cholesterol, který výrazně ovlivňuje fluiditu membrán (MARTINEZ a MORROS, 1996).

Složení membrány prochází dramatickými změnami během transportu v epididymis a později v reprodukčním traktu samice během kapacity. Během maturace spermií v epididymis jsou do plazmatické membrány postupně z vnějšího prostředí zabudovány četné lipidy, hlavně cholesterol, a množství glykoproteinů. Cholesterol a mnohé z těchto glykoproteinů jsou během kapacity v reprodukčním traktu samice zase odstraněny. Je známo, že část glykoproteinů má za úkol stabilizovat PM a bránit předčasné AR (YANAGIMACHI *et al.*, 1994; BENOFF, 1997).

K tomu, aby nedocházelo k předčasné AR, je ovšem nutné stabilizovat nejen PM, ale je nutné zachovat i integritu akrozomální membrány. Vlastnosti akrozomální membrány jsou obdobné vlastnostem PM, především v tom směru, že i zde nacházíme rozdělení do funkčních domén, které se liší svým složením. Jak už bylo uvedeno výše, ve stabilizaci akrozomální membrány hrají pravděpodobně důležitou roli, stejně jako u PM, četné glykoproteiny (OLSON *et al.*, 1985). Zdá se, že mezi glykoproteiny stabilizující akrozomální membránu patří i protein CD46 (INOUE *et al.*, 2003), který byl předmětem našeho studia.

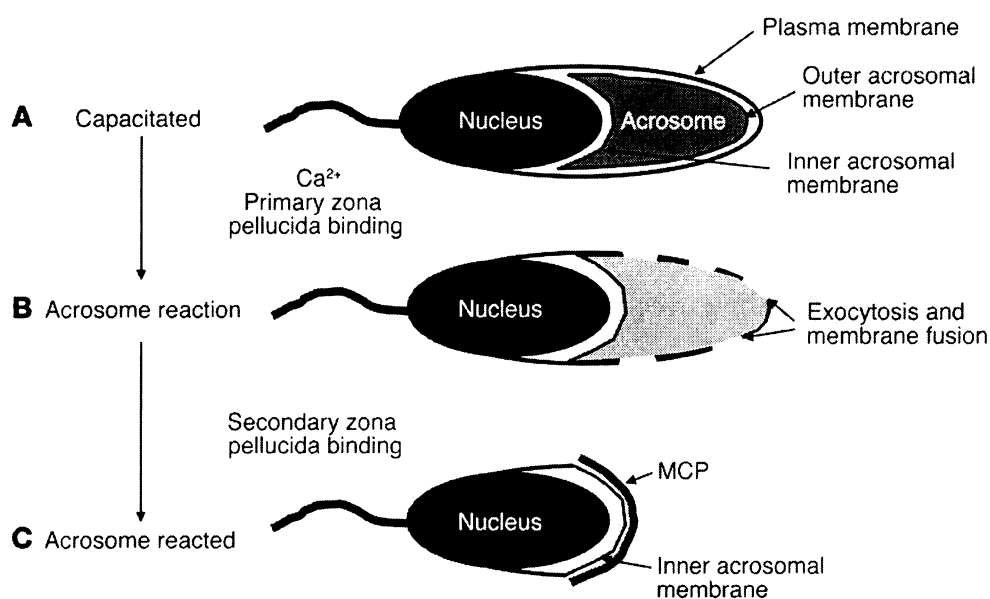
### 2.2.5.1 CD46

CD46 neboli MCP (membrane cofactor protein) je membránově vázaný glykoprotein, jehož exprese byla prokázána na buňkách člověka a dalších savců. V somatických buňkách CD46 inhibuje vytvoření aktivní C3 konvertázy a chrání tak buňky před působením komplementu (LISZEWSKI *et al.*, 1991; LISZEWSKI a ATKINSON, 1992). Prostřednictvím CD46 dochází k aktivaci vnitrobuněčných signálních drah v mnoha buněčných typech včetně T-lymfocytů (WANG *et al.*, 2000; WONG *et al.*, 1997; LISZEWSKI *et al.*, 2005). Některé patogeny jako virus spalniček, lidský herpesvirus – 6, skupina B a D adenovirů, skupina A streptokoků a neisseria využívají CD46 jako receptor umožňující vstup do buněk (DORIG *et al.*, 1993; NANICHE *et al.*, 1993; SANTORO *et al.*, 1999; KALLSTROM *et al.*, 1997; OKADA *et al.*, 1995; GAGGAR *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2004).

V lidském organizmu byla přítomnost CD46 prokázána na všech buňkách obsahujících jádro. Lidský CD46 se vyskytuje ve 4 různých izoformách: BC1, BC2, C1 a C2, které jsou produktem alternativního splicingu jediného genu. (LISZEWSKI *et al.*, 1994). Všechny tyto izoformy se skládají ze 4 extracelulárních

domén, nazývaných SCRs (short consensus repeats), na serin, treonin a prolin bohaté domény (STP), transmembránových domén (TP) a cytoplazmatického konce (CYT). STP doména je kódována třemi krátkými exony, které pomocí alternativního splicingu dávají vznik mnoha izoformám proteinu CD46 (LISZEWSKI a ATKINSON, 1992). STP doména je místem intenzivní O-glykosilace a skládá ze 14 nebo 29 aminokyselinových zbytků v závislosti na tom, zda je přítomen, nebo vystřižen STP exon B. Přítomnost popř. nepřítomnost STP B rozhoduje o vzniku vysoko nebo nízkomolekulární izoformy proteinu CD46. Alternativním splicingem vznikají i dvě rozdílné formy cytoplazmatické domény: CYT-1 tvořená 16 aminokyselinovými zbytky a CYT-2 skládající se z 23 aminokyselinových zbytků (LISZEWSKI *et al.*, 1991, Post *et al.*, 1991).

Zcela unikátní forma CD46 je exprimována na savčích spermiiích. Jedná se o velmi neobvyklou nízkomolekulární hypoglykosylovanou izoformu přítomnou v oblasti akrozomální čepičky. CD46 je ve spermiiích vystaven extracelulárnímu prostředí pouze po akrozomální reakci, kdy je jeho přítomnost detekována na vnitřní akrozomální membráně a tudíž se stal markerem úspěšné AR (ANDERSON *et al.*, 1989; RILEY *et al.*, 2002a). To, že je CD46 přítomno na vnitřní akrozomální membráně, ale ne na plazmatické membráně, naznačuje, že zde jeho hlavní role není ochrana spermie před poškozením komplementem přítomným v reprodukčním traktu samice. Savčí spermie je před komplementem chráněna pomocí jiných proteinů přítomných na PM jako např. CD55 a CD59.



Obr. 2.8 Místo detekce MPC na spermii po AR (převzato z RILEY-VARGAS *et al.*, 2005)

CD46 a především jeho SCR1 ektodoména hraje během oplození významnou roli. Důležitost SCR1 domény potvrzuje fakt, že opice nového světa exprimují izoformu CD46 bez přítomnosti SCR1 ektodomény na všech buňkách, kromě spermií (RILEY *et al.*, 2002b). Použití monoklonálních protilátek proti SCR1 ektodoměně CD46 *in vitro* blokuje vazbu lidských spermií na oocyty zbavené ZP (ANDERSON *et al.*, 1989; OKABE *et al.*, 1990; ANDERSON *et al.*, 1993; TAYLOR *et al.*, 1994; D'CRUZ *et al.*, 1997). Tento poznatek vedl k domněnce, že CD46 je možným kandidátem na molekulu vázající se na vaječný povrchový protein CD9 a umožňuje tak vazbu spermie na vajíčko. Nicméně např. u potkana použití anti-CD46 protilátek *in vivo* oplození neblokuje (MIZUNO *et al.*, 2007). Nicméně následující pokusy tuto domněnku vyvrátily a INOUE *et al.* (2005) opublikovali výsledky, které prokazují, že molekulou zodpovědnou za vazbu na vaječný CD9 a fúzi oocyty a spermie je protein IZUMO.

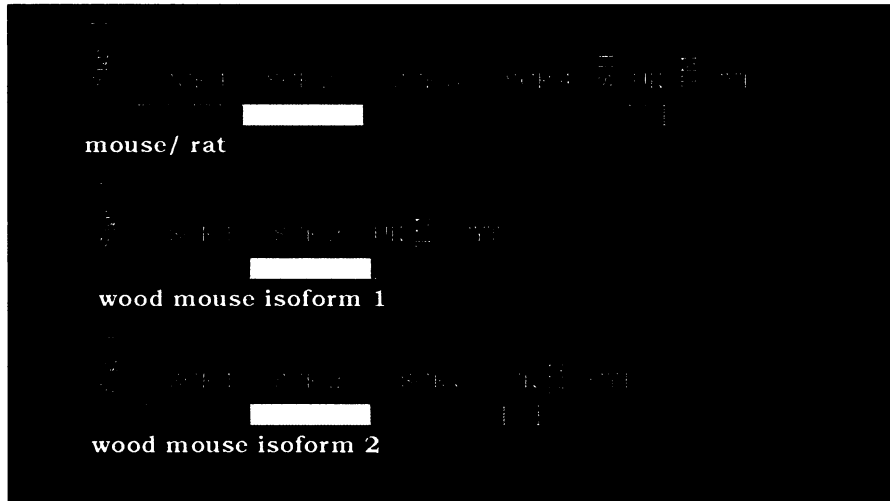
INOUE *et al.* (2003) popsali následky delece v genu pro CD46 u myši. Zjistili, že CD46 negativní samci myši vykazovali zvýšený výskyt spontánní akrozomální reakce, byli zjevně hyperfertilní a produkovali signifikantně více potomků než kontrolní jedinci. Tyto překvapivé poznatky jako první naznačili, že by CD46 mohlo hrát roli ve stabilizaci a udržování integrity akrozómu.

MIZUNO *et al.* (2004) prokázali, že u hlodavců je CD46 exprimován pouze na akrozomální membráně ve spermiích a v jejich prekurzorech ve varlatech s aktivní spermatogenezi, avšak u potkana použití anti-CD46 protilátek *in vivo* oplození neblokuje (MIZUNO *et al.*, 2006). Roli ochrany buněk před působením komplementu u hlodavců přebírá protein Crry, pro hlodavce specifický membránový regulátor aktivace komplementu (HOSOKAWA *et al.*, 1996; MOLINA, 2002). Gen kódující CD46 u hlodavců obsahuje pouze 11 funkčních exonů, oproti lidským 14, a jediný exon kódující STP. Alternativní splicing transmembránového CD46 nebyl dosud popsán.

Poznatky publikované INOUE *et al.* (2003), MIZUNO *et al.* (2004) a zjištěné JOHNSON *et al.*, (submitted *Reproduction*) byly podnětem k našemu studiu CD46 u vybraných zástupců myšic rodu *Apodemus* a nárůstu spontánní akrozomální reakce v porovnání s jedinci myši rodu *Mus* a laboratorní BALB/c.

Společně s univerzitou v Liverpoolu jsme se zaměřili na intenzivní výzkum role CD46 ve spermiích hlodavců. Ukázalo se, že u myšice (*Apodemus*) nedochází k expresi proteinu CD46 a že se tedy jedná o jakéhosi přirozeného knockoutu. Ačkoli gen pro CD46 je v genomu myšice přítomen, nedochází k jeho

translaci a tudíž ani expresi. Bylo zjištěno, že u myšice dochází pomocí alternativního splicingu k produkci dvou unikátních izoform transkriptu, kdy u jedné chybí exony 5-7 a u druhé 5 a 6. To má za následek znemožnění translace testikulární mRNA pro CD46. JOHNSON *et al.* (submitted *Reproduction*) předpokládá, že pokud by *in vivo* k translaci docházelo, protein CD46 u myšice by byl exprimován bez SCR3 (jen u izoformy 1), SCR4 a STP domény.



**Obr. 2.9** Srovnání struktury proteinu CD46 myši, krysy a předpokládané struktury proteinu CD46 myšice.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Materiál

##### 3.1.1 použitý živý materiál pro odběr spermií a varlat

divoká myš domácí (*Mus musculus musculus*, volná příroda - okolí Buškovic, ČR;

*M. m. domesticus*, volná příroda - okolí Straasu, Německo)

křeček zlatý (*Mesocricetus auratus*, Zverimex)

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

myšice křovinná, temnopásá, lesní, malooká (*Apodemus sylvaticus*, *A. agrarius*, *A. flavicollis*, *A. microps*, volná příroda – střední Čechy a jižní Morava).

laboratorní potkan (outbrední SPF, Velaz)

lidské spermie získané od dárců ve spolupráci s IVF centrem Iscare.

##### 3.1.2 Použité chemikálie (abecedně)

Amonium persulfate (A-3678, Sigma)

BSA-bovine serum albumin (fraction V,  $\geq 96\%$ , A9647, Sigma)

Calcimycin (C 7522, Sigma)

##### ELFO primární protilátky:

protilátka	ředění
Rabbit polyclonal anti Human Spectrin (S1515, Sigma)	1:900
Rabbit anti actin (A2668, Sigma)	1:600
Monoklonal anti $\alpha$ -tubulin (mouse IgG1 isotyp) (T9026, Sigma)	1:700

##### ELFO sekundární protilátky:

protilátka	ředění
Anti rabbit IgG (whole molecule) peroxidase conjugate (A0545, Sigma)	1:160000
Anti mouse IgG (Fc specific) peroxidase conjugate (A0168, Sigma)	1:80000

Glycine (G-8898,)

Goat serum (G 9023, Sigma)

Haematoxylin Harris (IP517, Sigma)

HEPES Buffer 1M (H0887, Sigma)

Hoechst - bisbenzimid (H33258, Sigma)

**Chemiluminiscenční sada:** Immun-star™ chemiluminiscent protein detection systems  
(170-5018, BioRad)

### Primární protilátky pro imunodetekci:

<b>protilátka</b>	<b>ředění</b>	<b>blokace</b>
Mouse $\alpha$ -rat-CD46 IgG1 clone 5F	1: 40	3% BSA
Mouse $\alpha$ -rat-CD46 IgG1 clone 9H	1:400	3% BSA
TRA.2.10 mouse $\alpha$ -human CD46	1:200	3% BSA
GB24 mouse $\alpha$ -human CD46	1:200	3% BSA
E4.3 mouse $\alpha$ -human CD46	1:200	3% BSA
H316 mouse $\alpha$ -human CD46	1:200	3% BSA
pAb Rabbit $\alpha$ -human CD46	1:100	10% BSA
MM2 mouse $\alpha$ -rat CD46-SCR1	-	1% BSA
MM3 mouse $\alpha$ -rat CD46-SCR1	-	1% BSA
MM5 mouse $\alpha$ -rat CD46-SCR1	-	1% BSA
MM9 mouse $\alpha$ -rat CD46-SCR1	-	1% BSA
pAb Mouse $\alpha$ -rat CD46-SCR1 blood	1:1600	10%BSA
Rabbit $\alpha$ -bovine CD46 IS	1:1000	-
Rabb. $\alpha$ -bovine CD46 PS	1:1000	-
Rat $\alpha$ -mouse Crry/p65	1:50	3% BSA
3D5 rat $\alpha$ -mouse CD55	1:10	1% BSA
RDII 24 mouse $\alpha$ -rat CD55 (DAF)	1:600	10% BSA
Mouse $\alpha$ -rat MM2	1:1500	3% BSA
Rabbit $\alpha$ -wood mouse CD46 IS	1:5	5% kozí sérum
Rabbit $\alpha$ -wood mouse CD46 PS	1:5	5% kozí sérum
Rat $\alpha$ -rat CD46 pAb	1:5	-
Rabbit polyclonal anti-Human Spectrin (S1515, Sigma)	1:400	3% BSA
Mouse monoclonal anti phosphotyrosine clone PT-66 (P 3300, Sigma)	1:320	10% BSA
Phallotoxin Alexa Fluor 488 (A12379, Molecule Probes)	2,5 $\mu$ l do 100 $\mu$ l	-
Phallotoxin Alexa Fluor 568 (A12380, Molecule Probes)	2,5 $\mu$ l do 100 $\mu$ l	-

### Sekundární protilátky pro imunodetekci:

<b>protilátka</b>	<b>ředění</b>
Goat anti rabbit IgG Alexa Fluor 488 (A11008, Molecule Probes)	1:1000
Goat anti mouse IgG Alexa Fluor 488 (A11001, Molecule Probes)	1:1000
Goat anti rat IgG Alexa Fluor 488(A11006, Molekule Probes)	1:1000
Sheep anti mouse IgG (whole molecule) FITC conjugate (F6257,Sigma)	1:150
Sheep anti rabbit IgG (whole molecule) FITC conjugate (F7512,Sigma)	1:1200

Lektin PNA conjugates Alexa Fluor 488 (L 21409, Molecule Probes) LIVE/DEATH

LIVE/DEATH Sperm Viability Kit (L-7011, Molecule Probes)

M2 medium (M7167, Sigma)



Paraffinöl (8904.1, Roth)

Paraplast – tissue embedding medium (8888501006, Kendall tyco healing care)

Percoll (P1644, Sigma)

**standardy:** Precision protein™ standarts prestaind, broad range Hamble (161-0372, BioRad)

Tissue Freezing Medium Jung for Frozen Tissue Specimens (0201 06926, Leica Microsystems Nussloch GmbH )

Tetramethylethylenediamine (T7024-25ML, Sigma)

Triton X – 100 (Sigma)

Vectashield mounting medium (H1000, Vector)

Vectashield mounting medium with DAPI (H1500, Vector)

Vectashield mounting medium with PI (H1300, Vector)

**vzorkový pufr:** 4x koncentrovaný neredukující vzorkový pufr – XT sample buffer 4x (161-0791, BioRad)

### **3.1.3 Použité roztoky (abecedně)**

#### **ELFO Barvicí lázeň:**

450ml metanolu

100ml kyseliny octové

450ml H<sub>2</sub>O

500mg Coomassie blue

**ELFO Elektrodotový pufr** – 3g Tris, 144g glycinu + 10g SDS doplněno do celkového objemu 1000ml destilovanou H<sub>2</sub>O.

#### **ELFO Odbarvující lázeň:**

250ml ethanolu

100ml kyseliny octové

650ml H<sub>2</sub>O

#### **ELFO roztoky**

**Roztok A** – 30g akrylamid + 0,8g BIS doplněno do celkového objemu 100ml destilovanou H<sub>2</sub>O

**Roztok B** – 10g SDS doplněno do celkového objemu 100ml destilovanou H<sub>2</sub>O

**Roztok C** – 22,75g Tris doplněno do celkového objemu 250ml destilovanou H<sub>2</sub>O; pH 8,8 upraveno pomocí HCl

**Roztok D** – 3g Tris doplněno do celkového objemu 100ml destilovanou H<sub>2</sub>O; pH 6,8 upraveno pomocí HCl

**Roztok G** – 10% persíran amonný (0,1g/1ml)

### **3,7% formaldehyd**

Byl použit 36 – 38% formaldehyd, který byl naředěn v PBS a pH upraveno na 7,36.

### **15mmol NH<sub>4</sub>Cl**

0,4g NH<sub>4</sub>Cl bylo rozpuštěno v 0,5l PBS

### **PBS (10x koncentovaný)**

1l destilované H<sub>2</sub>O

8g NaCl

0,2g KCl

2,685g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pro 12 H<sub>2</sub>O)

0,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### **PBS - Tween 0,05%**

1l PBS + 500μl Tween

### **TBS (10x koncentrovaný)**

100ml destilované H<sub>2</sub>O

8g NaCl

100ml TRIS

### **Pufn na blot**

3g Tris

14,4g glycinu

200ml metanolu

Doplněno do celkového objemu 1000ml destilovanou H<sub>2</sub>O.

**Redukující vzorkový pufr:** 0,1M Tris/HCl (pH 6,8); 3,3% SDS; 16,7% glycerol; 1,2 %DTT; 0,167% bromfenolová modř (1mg/6ml)

**Roztok na ředění komponenty B - LIVE/DEATH Sperm Viability Kit**

0,1g BSA + 1ml 150mM NaCl, tímto roztokem naředit HEPES na 10mM a výsledným roztokem ředit komponentu B 1:10

**5% zaostřovací gel**

1ml A

3ml D

2ml destilované H<sub>2</sub>O

100μl B

6μl TEMED

150μl G

**10% separační gel**

5ml A

7,5ml C

2,5ml destilované H<sub>2</sub>O

150μl B

7μl TEMED

90μl G

**0,1% TRITON**

ředěn v PBS

**3.1.4 Použité přístroje**

**blotter:** Semi-dry blotter TE77XP (Hoeffer Scientific)

Centrifuga MiniSpin® (Eppendorf)

**ELFO sestava:** Mini vertical gel electrophoresis unit (SE 260, Hoefer Scientific)

**ELFO sestava na nalévání gelů:** Dual gel caster (SE 245, Hoefer Scientific)

**fluorescenční mikroskop:** Olympus BX-40

**konfokální mikroskop:** Leica DM IRE2 High-speed confocal/two photon system for Live Cell Imaging and Dynamics.

**sonikátor:** Ultrasonic processor for manual operation with stand, 50 watts, frequency 30KHz automatic frequency scanning systém (UP50H, Dr. Heischer)

**zdroj:** Power Pac Basic (014BR, BioRad)

### **3.1.5 Další použitý materiál**

Chromatografický papír 3mm (3030-861, Whatman)

**membrána na blot:** Trans – blot – transfer medium (0,2 $\mu$ m) (BR 162-0150, BioRad)

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

**rentgenový film:** MEDIX medical X – ray film XBU (Foma)

## **3.2 Metody**

### **3.2.1. Příprava kryořezů varlat**

Varle vyjmuté ze šourku se co nejrychleji umístilo do alobalového kalíšku s Tissue Freezing Mediem. Alobalový kalíšek byl umístěn v nádobě s petroletherem, která byla celá ponořena do tekutého dusíku. takto zmražená tkáň byla krájena na kryotomu při -35°C na 5 $\mu$ m silné řezy. Řezy umístěné na podložních sklíčkách byli následně 10min fixovány v acetonu při -20°C a jednotlivě zabalené do alobalu uchovávány v mrazáku při teplotě -20°C.

### **3.2.2 Příprava histologických parafinových řezů varlat**

#### **a) fixace**

Varlata byla po vyjmutí z šourku vložena do 4% formaldehydu a fixována po 48h.

#### **b) vypírání fixáže**

Po fixaci byla tkáň několik hodin vypírána ve vodovodní vodě.

### c) zalití objektu do parafínu

Tkáň byla odvodněna vzestupnou alkoholovou řadou (70%, 80%, 96%). Poté byla tkáň přenesena do lázně benzenu na dobu 3x 10-15 minut dokud se postupně neprojasnila. Tkáň byla nejprve prosycována 30min v benzenu s parafínem a pak přenesena do čistého parafínu, kde byla ponechána po dobu 1-2h. Nakonec byla tkáň zalita v termostatu při 56°C do čistého parafínu do zalévací misky. Tkáň byla řezána pomocí mikrotonu.

### d) Odparafinování histologických řezů

- 3x 10min toluen
- 10 min 100% etanol
- 10 min 96% etanol
- 10 min 80% etanol
- 10 min 70% etanol
- 10 min aceton

## 3.2.3 Izolace spermií a příprava jejich roztěrů

Byly používány spermie a varlata dospělých samců. Po usmrcení zvířete byla vyjmuta *cauda epididymis* a vložena do 250μl TBS vytemperovaného na 37°C. Spermie byly uvolňovány po dobu 5min v inkubátoru vytemperovaném na 37°C a za přítomnosti 5% CO<sub>2</sub>. Poté byla pinzetou vyjmuta tkáň a suspenze 2x promyta v TBS. Motilita a koncentrace buněk byla kontrolována pod světelným mikroskopem. Po dosažení vhodné koncentrace buněk pomocí ředění v TBS byla suspenze rozetřena na podložní sklíčka. Po zaschnutí na vzduchu byly buňky fixovány.

## 3.2.4 Počítání koncentrace spermií

K počítání koncentrace spermií byla využita Bürkrova komůrka. Spermie byly z *caudy epididymis* uvolněny do 200μl M2 media a odtud bylo odebráno 10μl suspenze, která byla 10x naředěna pomocí PBS. Před nanášením do komůrky byly buňky důkladně resuspendovány. Na každou stranu komůrky bylo nanášeno 10μl suspenze a

přikryto krycím sklem. Počítán byl obsah buněk v 16ti čtvercích obsažených v jedné jednotce (ohraničena trojitou čarou).

Výsledná koncentrace počtu buněk na ml byla vypočtena dle následujícího vzorce:

$$E = (\Sigma \text{ buněk ve čtvercích} / 16) \times 10 \text{ (faktor ředění)} \times 250 \times 10^3$$

### **3.2.5 Kapacitace *in vitro***

Spermie byly po dobu 10min uvolňovány z distální části *caudy epididymis* do 200μl kapky M2 media umístěné v petriho misce pod parafinovým olejem a vytemperované na 37°C za přítomnosti 5% CO<sub>2</sub>. Poté bylo z této zásoby odebráno 5μl M2 média s uvolněnými buňkami a přeneseno do připravené misky se 100μl kapkou M2 média, aby se tak docílilo přibližné koncentrace buněk 5 x 10<sup>6</sup> /ml. V těchto podmínkách byly spermie inkubovány po dobu 2hod. V průběhu této inkubace byly odebírány vzorky buněk (v čase 30, 60 a 90min), které byly podrobovány různým druhům hodnocení postupu kapacitace.

### **3.2.6 Hodnocení viability**

Viabilita neboli životnost spermií v průběhu pokusu byla kontrolována pomocí live-death sperm viability kit (L-7011, Molecular Probes). Do petriho misky se suspenzí spermií ve 100μl M2 byl přidán 1μl složky A a složky 1:10 ředěné složky B, poté bylo v průběhu pokusu odebíráno, vždy po důkladné resuspendaci, 10μl suspenze a spočítáno nejméně 100 buněk.

### **3.2.7 Navození AR**

Akrozomální reakce byla indukována v 60, 120 a 180min pomocí calcium ionoforu A-23187 (CI) o výsledné koncentraci 5μM. Buňky byly působení ionoforu vystaveny vždy po dobu 1h při teplotě 37°C za přítomnosti 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2.8 Hodnocení AR

V daném čase bylo M2 medium se suspenzí buněk ovlivněných CI odebráno do 500 $\mu$ l TBS a stočeno na 3000rpm po dobu 5min. Po centrifugaci byla většina supernatantu až přibližně na 20 $\mu$ l odstraněna. Peleta buněk byla resuspendována a po 5 $\mu$ l rozetřena na podložní sklíčka. Po zaschnutí byl vzorek inkubován s 2,5 $\mu$ M PNA a 1 $\mu$ M hoechstem po dobu 5min a poté spočítáno 2x nejméně 100 buněk.

### 3.2.9 Hodnocení tyrozinové fosforylace

Spermie rozetřené na podložním sklíčku a fixované pomocí formaldehydu byly blokovány 10% BSA a poté značeny pomocí nepřímé imunofluorescence primární protilátkou proti fosfotyrozinu (P3300, Sigma) a sekundární protilátkou s navázanou Alexa Fluor 488 (Molecule probes). Pod mikroskopem bylo 2x počítáno více jak 100 buněk z každé skupiny odebrané v průběhu kapacitace.

### 3.2.10 Sonikace

Spermie byly uvolněny do 250 $\mu$ l TBS a 2x promyty po dobu 5min. Dále byli stočeny na 3000rpm. Poté byly spermie v objemu 500 $\mu$ l 3x5s sonikovány na max. výkon (mezi jednotlivými pulzy 5s pauza). Po sonikaci byla suspenze stočena na 4300rpm (1000x g) po dobu 10min. Byl připraven zásobní roztok Percollu ( 9díů Percoll + 1 díl 1,5M NaCl), ten je dále brán jako 100% roztok. 100% roztok byl naředěn na 40% a 90% roztok. V mikroskopu byl vytvořen vzestupný gradient pomocí 250 $\mu$ l 40% a 250 $\mu$ l 90% roztoku Percollu. Tento gradient byl stočen na 1702rpm (400x g) po dobu 20min. Na dno mikroskopu s Percollovým gradientem byla přidána peleta buněk po sonikaci a stočena po dobu 20min na 15000rpm (max. centrifugy přibližně 3525x g). Poté byla odebrána horní frakce (250 $\mu$ l) a hlavičky stočeny stejným způsobem znovu. Percoll byl odmyt pomocí TBS stočením 3x 10min na 851rpm (200x g).

## **3.2.11 SDS - polyakrylamidová elektroforéza a imunodetekce**

### **3.2.11.1 příprava vzorku**

Suspenze spermií ( $5 \times 10^6$ ) byla smíchána v poměru 3:1 s 4x koncentrovaným neredukujícím vzorkovým pufrům, nebo 1:1 s 2x koncentrovaným redukujícím vzorkovým pufrům a 2min vařena při 100°C.

### **3.2.11.2 příprava SDS gelu a elektroforetické rozdělení vzorku**

10% separační gel byl po úplné polymeraci převrstven 5% zaostřovacím gelem, který za pomoci hřebenu vloženého mezi skla vytvořil jamky pro vzorky. Po úplné polymeraci tohoto gelu byl hřeben vyjmut a skla s gelem vložena do elektroforetického přístroje. Přístroj byl zaplněn elektrodovým pufrům a do jamek gelu bylo nanášeno vždy do každé 15μl vzorku nebo 10μl standartu. Přístroj byl zapnut na 110V. Když vzorky dosáhly separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 140V.

### **3.2.11.3 detekce proteinů v polyakrylamidovém gelu**

#### ***3.2.11.3.1 Barvení gelu pomocí Coomassie blue***

Gel byl nejméně na 24h ponořen do barvicí lázně a poté přemístěn do odbarvovací lázně. Po odbarvení pozadí byl gel ponořen do inkubačního roztoku.

#### ***3.2.11.3.2 Western blotting – přenos proteinu z polyakrylamidového gelu na nitrocelulózovou membránu***

Do aparatury pro westernblotting byly postupně vloženy: 4 chromatografické papíry Wattman navlhčené v blotovacím pufru, nitrocelulózová membrána, gel a opět 4 chromatografické papíry Wattman navlhčené v blotovacím. Přenos probíhal při 0,8mA na 1cm<sup>2</sup> nitrocelulózové membrány po dobu 1,5h.

#### ***3.2.11.3.3 Imunoblotting – detekce proteinů přenesených na nitrocelulózovou membránu pomocí imunodetekce***

Membrána byla 15min zavodněna v roztoku PBS-Tween 0,05%. Dále byla na dobu 1h přenesena do blokačního roztoku - 5% mléko (10g mléka na 200ml



PBS- Tween 0,05%). Poté byla vložena do roztoku primární protilátky a 1% mléka v PBS-Tween 0,05% a inkubována po dobu 1,5h. Primární protilátka byla odmyta 6x5min v PBS- Tween 0,05%. Následovala inkubace se sekundární protilátkou ředěnou v 1% mléku ředěném v PBS-Tween 0,05%. Sekundární protilátka byla odmyta 5x5min v PBS-Tween 0,05%. Proteiny značené sekundární protilátkou byly detekovány na RTG filmu pomocí chemiluminiscenční sady.

### **3.2.12 Fluorescenční metody**

#### **3.2.12.1 Fixace**

##### **Metanol – acetone**

Suchý preparát byl dán na 10min do kyvety s vychlazeným metanolem (-20°C) a poté na 8min do kyvety s vychlazeným acetone (-20°C).

##### **Formaldehyd – triton**

Suchý preparát byl v kyvetě zalit

- 10min 3,7% formaldehydem
- promyt 3x 5min v PBS
- 5min v 15mmol NH<sub>4</sub>Cl
- promyt 3x 5 min v PBS
- max. 3 min 0,1% TRITON
- promyt 3x 5min v PBS

##### **Permeabilizace acetone**

Preparát byl na 10min ponořen do kyvety s vychlazeným acetone (-20°C).

#### **3.2.12.2 Přímá imunofluorescence**

Preparáty byly zavodněny 5 minut v PBS. Poté byla nanášena protilátka s navázaným fluoroforem a 0,5 hodiny inkubována při pokojové teplotě. Protilátka byla jemně odmyta v PBS. Preparát byl zamontován do média Vectashield mounting medium nebo do Vectashield mounting medium s DAPI, pro zvýraznění jader.

Preparáty byly nejprve analyzovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus a poté pomocí konfokálního mikroskopu Leica.

### **3.2.12.3 Nepřímá imunofluorescence**

Skříčka s fixovanými spermiemi byla zavodněna v PBS a poté byla po dobu jedné hodiny blokována při pokojové teplotě pomocí 1%, 3%, 10% BSA v PBS a nebo 5% koziho séra v PBS (dle použité protilátky. Následovala 1,5 - 2 hod inkubace při pokojové teplotě s primární protilátkou. Primární protilátka byla odmyta 5x5 minut v PBS. Poté následovala inkubace se sekundární protilátkou, která trvala 1 hodinu. Sekundární protilátka byla odmyta 3x5 minut v PBS. Preparát byl zamontován do média Vectashield mounting medium nebo do Vectashield mounting medium s DAPI či PI, pro zvýraznění jader. Preparáty byly nejprve analyzovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus a poté pomocí konfokálního mikroskopu Leica.

### **3.2.12.4 Duální imunofluorescenční barvení**

Postup práce při přípravě duálního barvení byl shodný s postupem při přípravě nepřímého imunofluorescenčního barvení. Po odmytí sekundární protilátky byla nanášena protilátka s navázaným fluoroforem a inkubována po dobu 30 min při pokojové teplotě. poté byla protilátka jemně odmyta v PBS a vzorek zamontován do média Vectashield mounting medium nebo do Vectashield mounting medium s DAPI či PI, pro zvýraznění jader.

### **3.2.12.5 FRET analýza**

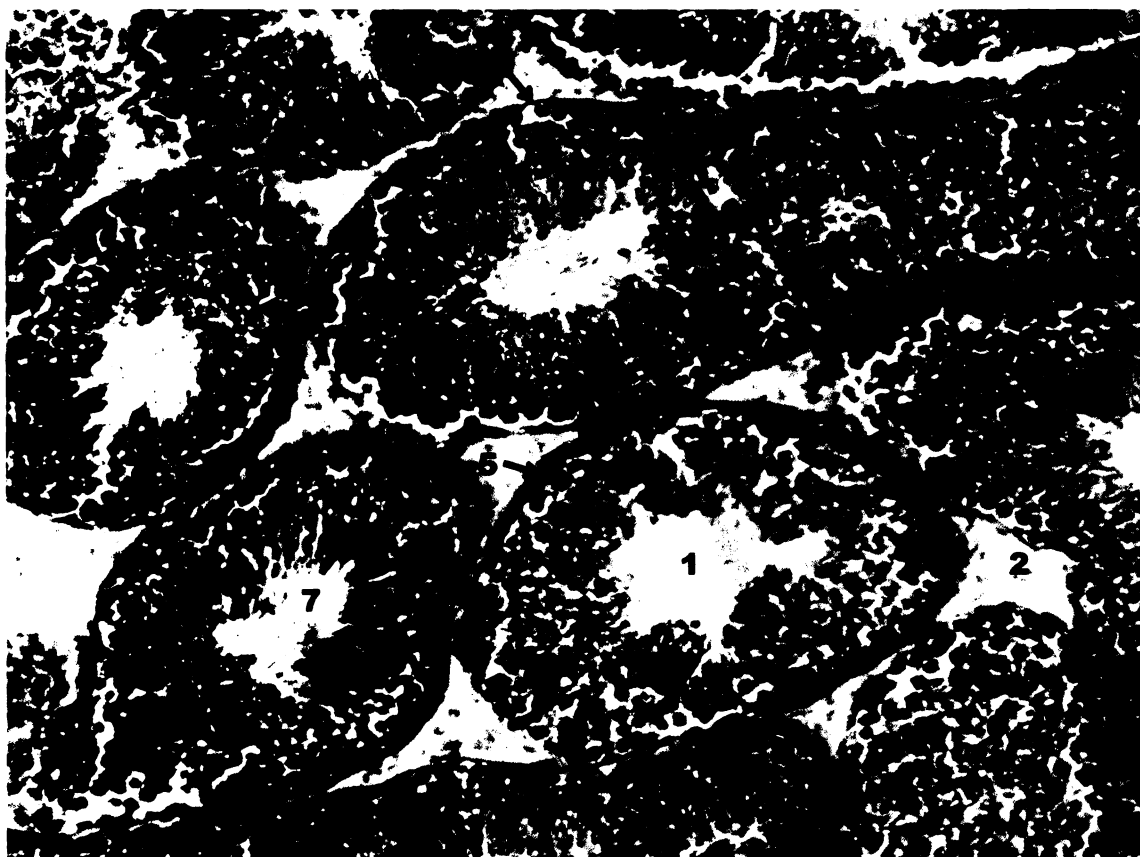
Postup práce byl shodný s postupem práce při duálním imunofluorescenčním barvení. Vzorek spermií byl označen protilátkou proti spektrinu a sekundární protilátkou s navázaným zeleným fluoroforem Alexa fluor 488. Poté byl použit k označení aktinu phalloidin nesoucí červený fluorofor 568. Místo zalévacího média byl použit čistý glycerol.

Vzorek byl analyzován na konfokálním mikroskopu Leica. Kde byla nejprve změřena intenzita záření akceptoru (Alexa fluor 488) a donoru (Alexa fluor 568). Poté byl pomocí fotobleachingu zničen donor a opět byli změřeny hodnoty záření akceptoru i donoru. Z těchto naměřených hodnot byla vypočítána účinnost FRET tzv. FRET efficiency.

## 4 Výsledky

### 4.1 Spermatogeneze

V rámci výzkumu prováděném na proteinu CD46 bylo nutné, abych se prakticky naučila pracovat s histologickými řezy a kryořezy varlat a rozlišovat na nich jednotlivé buňky přítomné ve varlatech.



obr. 4.1 Histologický řez varlat s popisem jednotlivých buněk

- 1 – lumen semenotvorných kanálků se spermiemi
- 2 – Leydigovy buňky v intersticiu
- 3 – peritubulární buňky na povrchu semenotvorného kanálku
- 4 – Sertoliho buňka
- 5 – spermatogonie
- 6 – spermatocyt
- 7 - spermatidy



**Obr. 4.2** Histologické řezy varlat

**Červeně** – phalloidin Alexa Fluor 568 (F-aktin) **Modře** – DAPI (jádra buněk)

## **4.2 Vliv tyrozinové fosforylace na polymerizaci aktinu a následnou akrozomální reakci v hlavičce spermie v průběhu kapacitace *in vitro***

### **4.2.1 Tyrozinová fosforylace v průběhu kapacitace *in vitro***

Vzorky spermií byly odebírány v průběhu kapacitace v časech 30, 60, 120 a 180min. Po nepřímém imunofluorescenčním barvení byla na spermiích, ve kterých právě docházelo k tyrozinové fosforylaci proteinů jasně označená akrozomální oblast hlavičky a střední a hlavní část bičíku. Pro usnadnění počítání buněk a lepší zviditelnění spermií neoznačených protilátkou proti fosfotyrozinu byla jádra obarvena pomocí propidium jodidu.

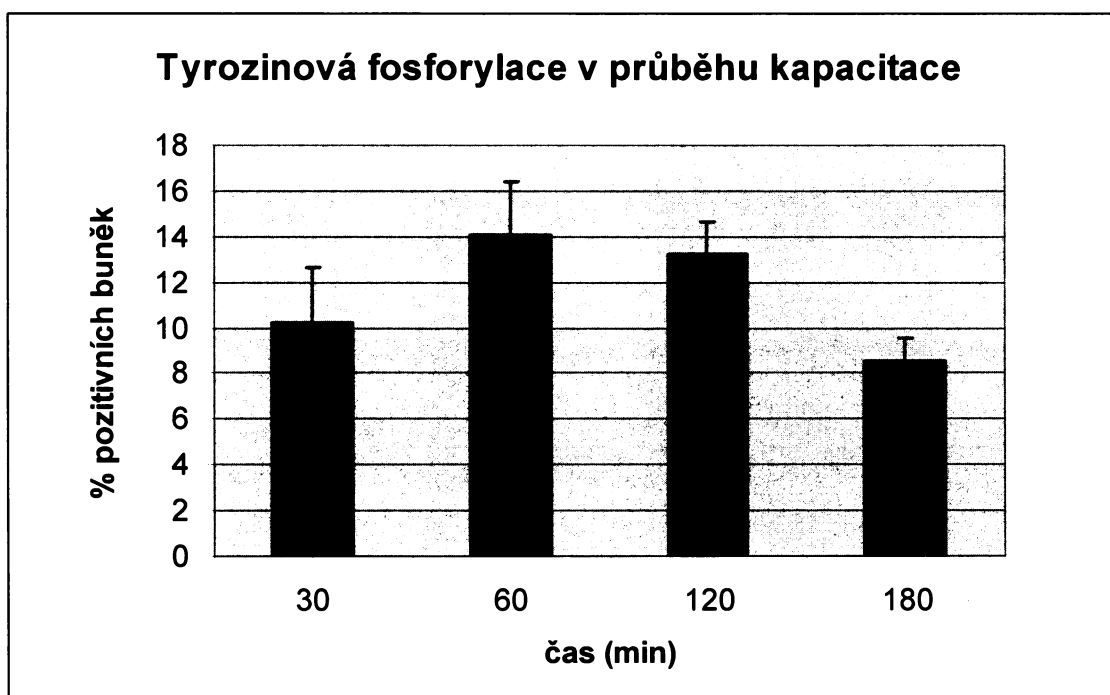


**Obr. 4.3**

**Zeleně – tyrozinová fosforylace, Červeně – propidium jodid (jádro)**

Označené i neoznačené buňky byly počítány pod fluorescenčním mikroskopem v duplikátech, a to vždy minimálně 100 buněk pro každý čas kapacity. Ze získaných dat byla vypočítána průměrná hodnota procenta buněk s právě probíhající tyrozinovou fosforylací v hlavičce spermie v jednotlivém stupni kapacity a jejich směrodatná odchylka (viz obr. 4.4).

Ze získaných hodnot vyplývá, že v čase 30min je proces kapacity zahájen. Tyrozinová fosforylace byla v čase 30min zaznamenána v průměru u 10% buněk. Mezi časem 30 a 60min došlo k nárůstu procenta pozitivních buněk, a to v průměru o 4%. Mezi 60-120min průměrně 14% populace spermií mělo pozitivní tyrozinovou fosforylací v akrozomální oblasti hlavičky. Mezi 120 -180min nastal pokles ve výskytu tyrozinové fosforylace přibližně o 5%. Tyto výsledky korelují s přípravou spermie na AR, které předchází pokles tyrozinové fosforylace.



Obr. 4.4 graf průběhu tyrozinové fosforylace při kapacitaci *in vitro*

#### Statistické zhodnocení získaných výsledků sledování výskytu tyrozinové fosforylace

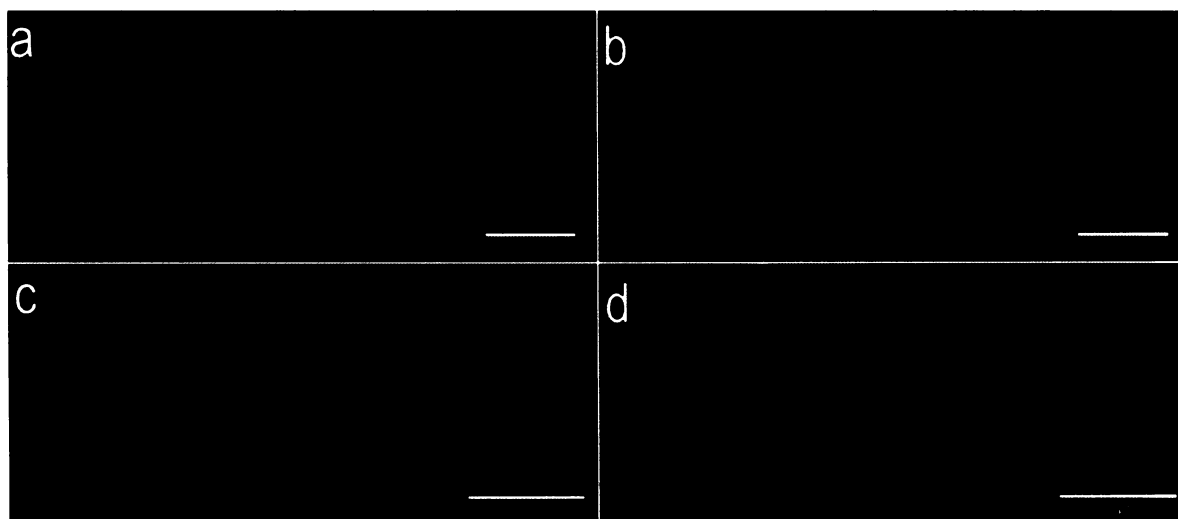
Na základě analýzy rozptylu bylo prokázáno, že v průběhu kapacity *in vitro* dochází ke změnám ve výskytu tyrozinové fosforylace v hlavičce spermie. Mezi časy 30 a 60min kapacity dochází k statisticky významnému nárůstu procenta buněk s právě probíhající tyrozinovou fosforylací v hlavičce. Mezi časy 60 a 120min nebyl

zaznamenán žádný statisticky signifikantní rozdíl. Mezi 120-180min kapacitace došlo ke statisticky významnému poklesu.

#### 4.2.2 Aktinová polymerizace během kapacitace in vitro

Vzorky spermií byly hodnoceny v čase 0 a 90min kapacitace. Přímé imunofluorescenční značení ukázalo, že v čase 0 se G-aktin v hlavičce spermie nachází jak v kortikálním cytoskeletu, tak postakrozomálním segmentu. Naproti tomu F-aktin byl v kortikálním cytoskeletu detekován minimálně a jeho slabé značení bylo zaznamenáno pouze v postakrozomálním segmentu. Opačný případ nastal v čase 90min, kdy byl zaznamenán výrazný pokles v intenzitě značení G aktinu jak v kortikálním cytoskeletu, tak v postakrozomálním segmentu. Naproti tomu v 90min došlo k výraznému nárůstu intenzity signálu F aktinu v kortikálním cytoskeletu i postakrozomálním segmentu hlavičky spermie. Polymerizace G aktinu na F aktin odpovídá progresi kapacitace a aktinová polymerizace tak rovněž odráží míru nárůstu tyrozinové fosforylace.

Po celou dobu pokusu byla pozorována přítomnost G i F aktinu ve střední části bičíku, kde se jeho zastoupení v průběhu kapacitace nijak významně neměnilo.

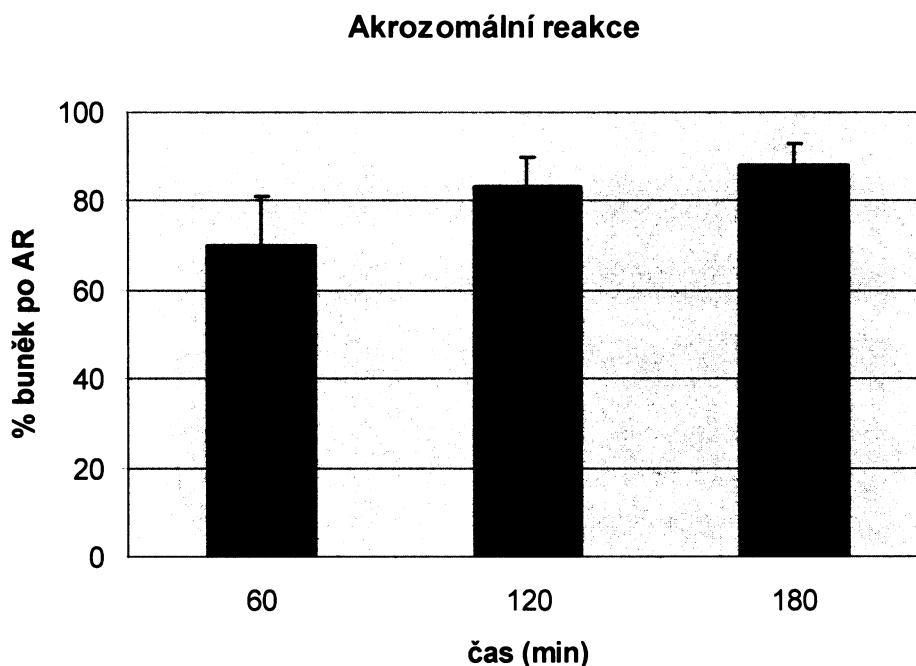


Obr. 4.5

- a) G aktin v čase kapacitace 0 min
- b) G aktin v čase kapacitace 90min
- c) F aktin v čase kapacitace 0min
- d) F aktin v čase kapacitace 90min

### 4.2.3 Stav akrozomální reakce v průběhu kapacitace *in vitro*

V průběhu kapacitace *in vitro* byla pomocí kalcium ionoforu v časech 60, 120 a 180min indukována akrozomální reakce. Stav akrozómu kapacitovaných spermií byl hodnocen pomocí PNA lektinu, který se specificky váže na tuto organelu a je tedy markerem její přítomnosti. Vzorky byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu. Ze získaných dat byla vypočítána průměrná hodnota procenta buněk po akrozomální reakci v daném čase. V průběhu kapacitace docházelo k nárůstu počtu buněk po AR. V čase 60min byla průměrná hodnota buněk po AR přibližně 70% v čase 120min 83% a v čase 180min 88%. Tento stav plně odpovídá tomu, že s postupující dobou trvání kapacitace dochází k nárůstu schopnosti spermií projít indukovanou AR.



Obr. 4.6 graf akrozomální reakce

#### Statistické zhodnocení získaných výsledků sledování indukované akrozomální reakce *in vitro*

Na základě analýzy rozptylu bylo prokázáno, že v průběhu kapacitace *in vitro* dochází mezi 60 a 120min k signifikantnímu nárůstu procenta buněk po indukované akrozomální reakci. Nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl v nárůstu počtu buněk po indukované akrozomální reakci mezi 120 a 180min pokusu.



#### **4.2.4 Viabilita a motilita spermií během kapacitace *in vitro***

Během celého pokusu byla pod mikroskopem v pravidelných časových intervalech kontrolována viabilita a motilita buněk. Stav spermií byl standardní pro daný čas probíhající kapacitace po celou dobu pokusu.

### **4.3 Vztah aktinu a spektrinu v kortikálním cytoskeletu hlavičky savčí spermie a jejich případná interakce hodnocená pomocí FRET analýzy**

#### **4.3.1 Lokalizace aktinu v hlavičce spermie potkana**

Ve spermii potkana se nám pomocí imunofluorescenčního značení podařilo lokalizovat přítomnost F-aktinu jak v hlavičce, tak v bičíku. V hlavičce byl aktin detekován v apikální části akrozomální oblasti, ekvatoriálním segmentu a post-akrozomální části. V bičíku bylo silné značení F-aktinu zaznamenáno především v oblasti krčku spermie. Tyto výsledky potvrzují již dříve publikované poznatky o lokalizaci aktinu v hlavičce savčí spermie.



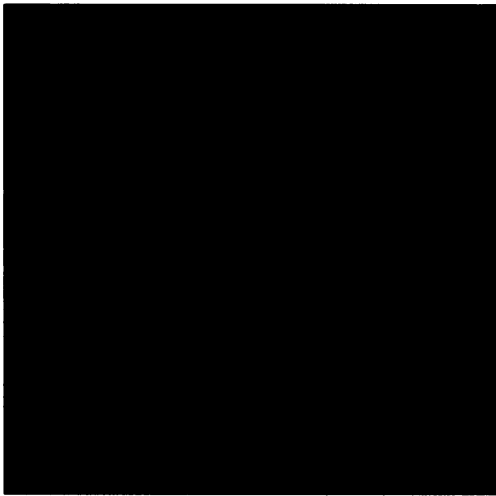
**Obr. 4.6** Spermie potkana  
Zeleně – F-aktin



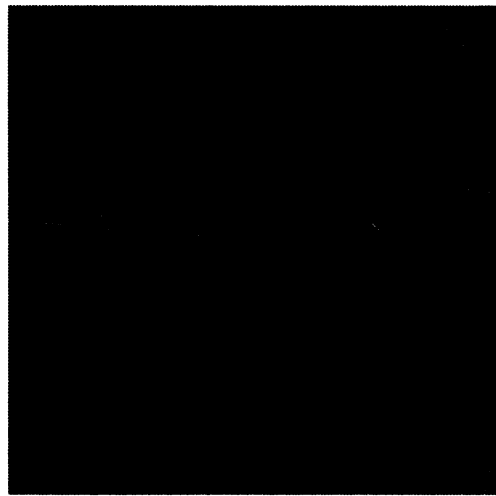
**Obr. 4.7** Spermie potkana  
Nomarski kontrast

### 4.3.2 Lokalizace spektrinu v hlavičce spermie potkana

Spektrin byl pomocí imunofluorescenčního značení lokalizován v hlavičce spermie potkana v kortikálním cytoskeletu, v oblasti paraakrozomálního cytoskeletu a ekvatoriálním segmentu. V bičíku byla přítomnost spektrinu detekována v krčku spermie. Tyto výsledky potvrzují již dříve publikované poznatky o lokalizaci spektrinu v hlavičce savčí spermie.



**Obr. 4.8** Spermie potkana  
Zeleně – spektrin



**Obr. 4.9** Spermie potkana  
Nomarski kontrast

### 4.3.3 Duální barvení aktinu a spektrinu v hlavičce spermie potkana

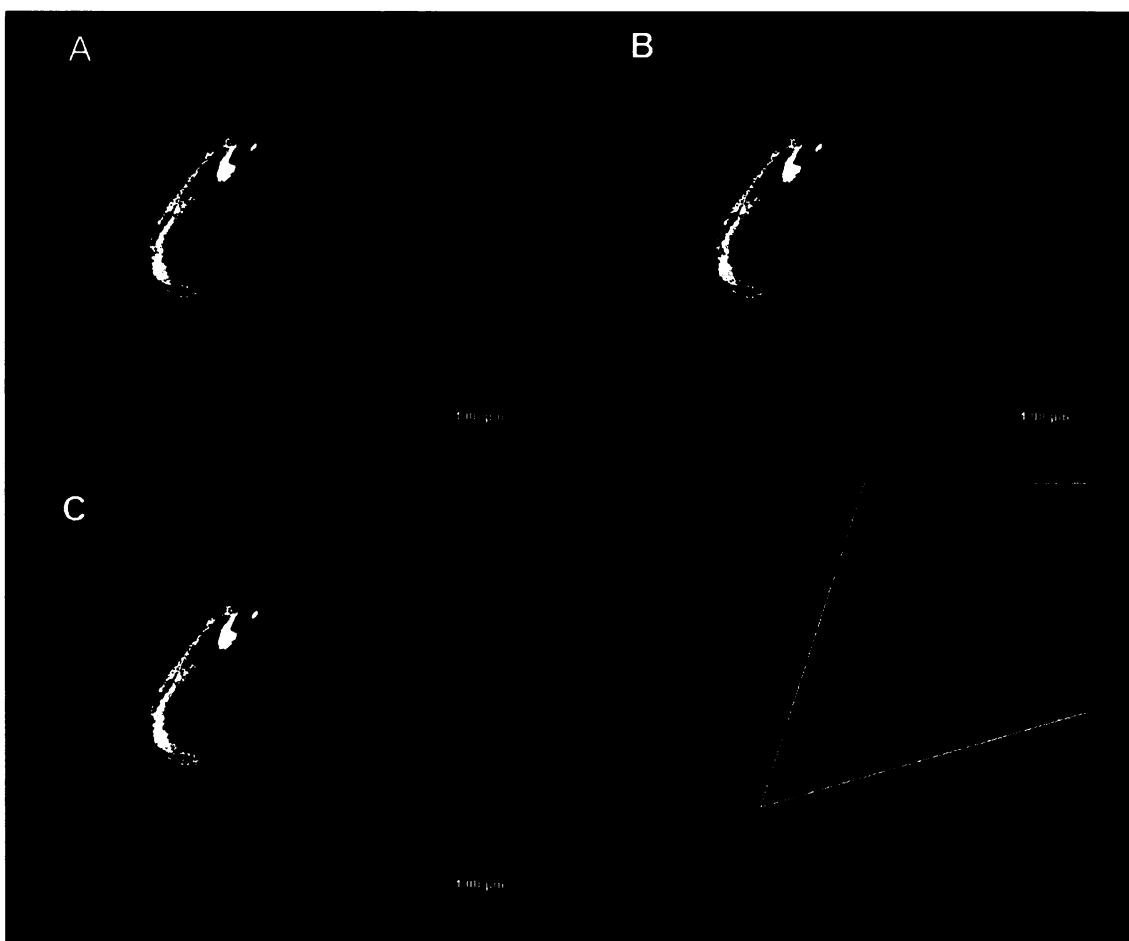
Pomocí duálního barvení byla zvýrazněna místa lokalizace aktinu a spektrinu a detekována místa vzájemné kolokalizace těchto dvou proteinů v hlavičce spermie potkana (viz obr. 4.10)

Obrázek A: zobrazena hlavička spermie se zeleně označenými místy výskytu spektrinu a bíle označenými místy jeho kolokalizace s aktinem.

Na obrázku B: červeně značena místa lokalizace aktinu a bíle místa kolokalizace se spektrinem.

Obrázek C: složen z obrázku A a B a zobrazuje místa pouze výskytu aktinu (červeně), pouze spektrinu (zeleně) a místa kolokalizace obou proteinů (bíle).

Výsledky z obrázku C jsou přeneseny do grafu, ve kterém jsou body kolokalizace obou proteinů zvýrazněny výsečí. Duální barvení tedy prokázalo vzájemnou kolokalizaci F-aktinu a spektrinu v apikální části hlavičky a krčku spermie potkana.



Obr. 4.10 Kolokalizace aktinu a spektrinu v hlavičce potkana

#### 4.3.4 FRET analýza

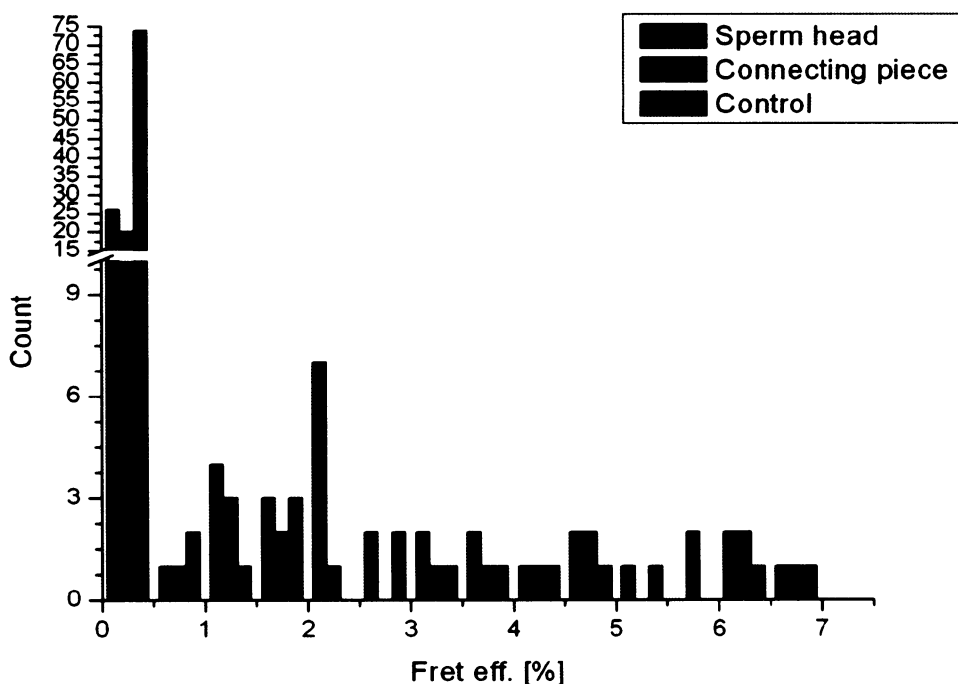
Vzorky spermií označené pomocí metody duálního barvení byly podrobeny FRET analýze. Donorem byl v tomto případě aktin označený phalloidinem s navázaným fluoroforem Alexa fluor 568. Akceptorem byla sekundární protilátka proti králíčimu IgG nesoucí fluorofor Alexa Fluor 488 vázaná na anti-spektrinovou protilátku. Účinnost FRETu (FRET efficiency) byla měřena ve dvou místech hlavičky spermie potkana, a to v krčku (connecting piece) a v apikální části hlavičky (sperm head). Nejprve byla měřena intenzita emisního záření obou fluoroforů – tzn. donoru i akceptoru. Poté byl akceptor pomocí silného osvětlení laserem fotovybělen (tzv. fotobleaching) a opět změřena intenzita emisního záření. Ve více jak 50% případech došlo ve vzorcích po fotovybělení (fotobleachingu) akceptoru k zvýšení hodnot emisního záření donoru a byla tak naměřena nenulová hodnota FRET eff. Ta byla počítána

pomocí následujícího vzorce, kde  $D_{post}$  značí intenzitu záření donoru po fotovybělení a  $D_{pre}$  intenzitu záření donoru před fotovybělením:

$$FRET_{eff} = \frac{D_{post} - D_{pre}}{D_{post}} \quad \text{for all } D_{post} > D_{pre}$$

U kontrolních vzorků bylo dvakrát prováděno opakované měření intenzity emisního záření donoru bez fotobleachingu akceptoru a byla vypočítána FRET eff. podle předcházejícího vzorce. 75% měření kontrolních vzorků byla FRET eff. nulová (viz obr. 4.11).

Z těchto výsledků vyplývá, že aktin a spektrin jsou v hlavičce spermie v těsné blízkosti a že spolu s největší pravděpodobností interagují.



Obr. 4.11 graf FRET efficiency

## 4.4 Exprese CD46 na spermatogenních buňkách hlodavců

### 4.4.1 Testování protilátek proti proteinu CD46

Exprese proteinu CD46 byla testována na spermiích potkana, laboratorní myši BALB/c, myšice a člověka. K prokázání exprese bylo využito nepřímého imunofluorescenčního barvení pomocí protilátek získaných ve spolupráci se skupinou prof. Johnsona z Univerzity v Liverpoolu. V následující tabulce je seznam testovaných protilátek a výsledků imunofluorescenčního značení. Případy, kdy byl v akrozomální oblasti pozitivní signál jsou označeny symbolem „+“. Naopak případy, kdy žádné značení nebylo pozorováno jsou v tabulce označeny symbolem „-“. Ve všech případech se jednalo o specifické značení v oblasti akrozómu. V případě, že u některé protilátky bylo zaznamenáno značení i jinde je toto v tabulce uvedeno v poznámce. U žádné z níže uvedených použitých protilátek nebylo zaznamenáno značení u spermií myšice. Tyto výsledky dokazují, že u myšic nedochází k expresi CD46.

Vybrané protilátky byly dále testovány na divokých myších odchycených ve volné přírodě (*Mus musculus domesticus*, *M. m. musculus*) a na třech druzích myšic (*Apodemus sylvaticus*, *A. micorps*, *A. flavicollis*). Výsledek těchto pokusů byl shodný – exprese CD46 byla zaznamenána pouze v akrozomální oblasti zástupců rodu *Mus* nikoliv u zástupců rodu *Apodemus*.

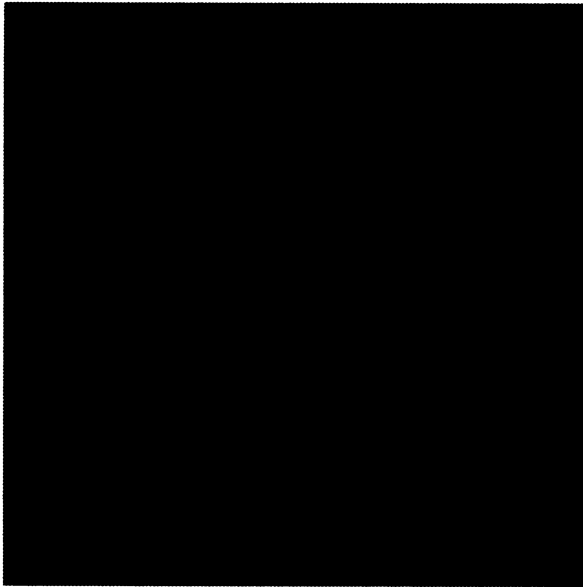
Z tohoto důvodu byly vybrané protilátky použity na kryorezy varlat s cílem zjistit, zda k expresi CD46 u vybraných zástupců rodu *Apodemus* nedochází alespoň v průběhu spermatogeneze a následně k jeho případné degradaci na maturovaných spermiích. Výsledky získané z imunofluorescenčního barvení řezů varlat ukázaly, že u zástupců rodu *Mus* dochází ve varlatech k expresi CD46 na spermiích a spermatidách v pozdní fázi spermateliózy. U řezů varlat vybraných zástupců rodu *Apodemus* nebyl zaznamenán žádný pozitivní signál dokazující přítomnost CD46 proteinu na spermatogenní buňkách.

Obr. 4.12 tabulka protilátek

Nepřímé imunofluorescenční značení akrozomální oblasti hlavičky spermií					
Testované protilátky	Potkan	BALB/c	myšice	člověk	poznámky
Mouse $\alpha$ -rat-CD46 IgG1 clone 5F	+	-	-	-	
Mouse $\alpha$ -rat-CD46 IgG1 clone 9H	+	-	-	-	
TRA.2.10 mouse $\alpha$ -human CD46	-	-	-	+	
GB24 mouse $\alpha$ -human CD46	-	-	-	+	AR + ES
E4.3 mouse $\alpha$ -human CD46	-	-	-	+	
H316 mouse $\alpha$ -human CD46	-	-	-	+	pozadí
pAb Rabbit $\alpha$ -human CD46	+	-	-	+	*
MM2 mouse $\alpha$ -rat CD46-SCR1	+	-	-	netestováno	
MM3 mouse $\alpha$ -rat CD46-SCR1	+	-	-	netestováno	
MM5 mouse $\alpha$ -rat CD46-SCR1	+	-	-	netestováno	
MM9 mouse $\alpha$ -rat CD46-SCR1	+	-	-	netestováno	
pAb Mouse $\alpha$ -rat CD46-SCR1 blood	-	-	-	netestováno	**
Rabbit $\alpha$ -bovine CD46 IS	-	-	-	netestováno	
Rabb. $\alpha$ -bovine CD46 PS	-	+	-	netestováno	
Rat $\alpha$ -mouse Crry/p65	-	-	-	-	
3D5 rat $\alpha$ -mouse CD55	-	-	-	netestováno	precipitace
RDII 24 mouse $\alpha$ -rat CD55 (DAF)	+	-	-	netestováno	*** precipitace
Mouse $\alpha$ -rat MM2	+	-	-	netestováno	
Rabbit $\alpha$ -wood mouse CD46 IS	+	+	-	netestováno	****
Rabbit $\alpha$ -wood mouse CD46 PS	-	-	-	netestováno	
<b>Rat <math>\alpha</math>-rat CD46 pAb</b>	+	+	-	netestováno	

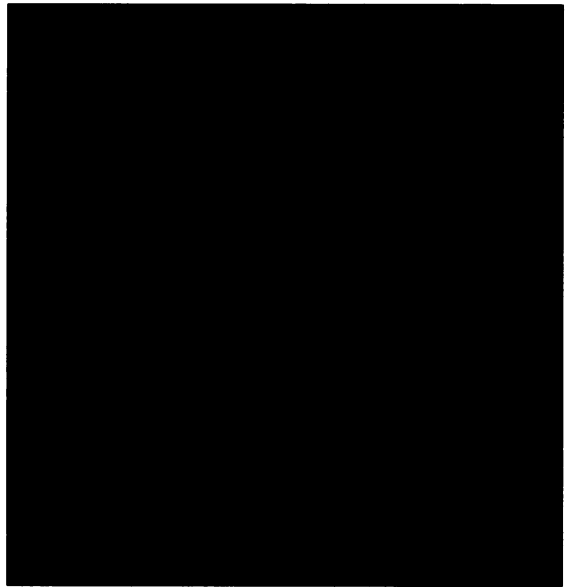
AR – Akrozomální oblast, ES – Equatorialní segment, IS – imunní sérum,  
PS – preimunní sérum

- \* spermie člověka a 30% spermií myšice - značení plazmatické membrány hlavičky spermie
- \*\* Spermie potkana – označená plazmatická membrána hlavičky a bičík
- \*\*\* Spermie potkana – označený bičík a ventrální strana apikálního háčku hlavičky  
Spermie BALB/c – označená střední část bičíku
- \*\*\*\* Spermie BALB/c a myšice – označená hlavní část bičíku



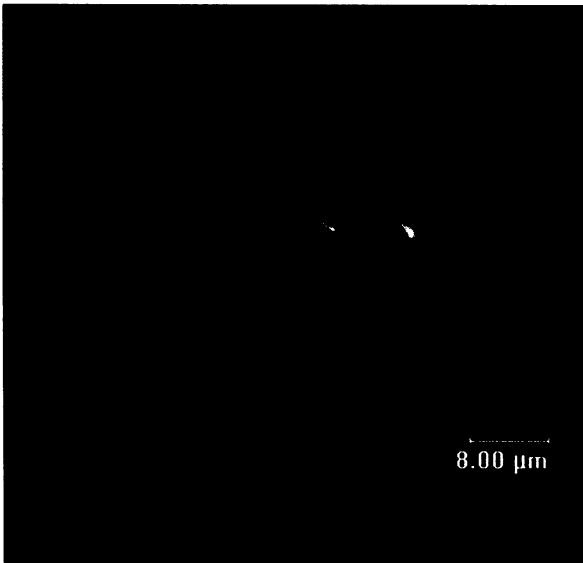
**Obr. 4.13** Spermie člověka

Zeleně – CD46  
Červeně – jádra



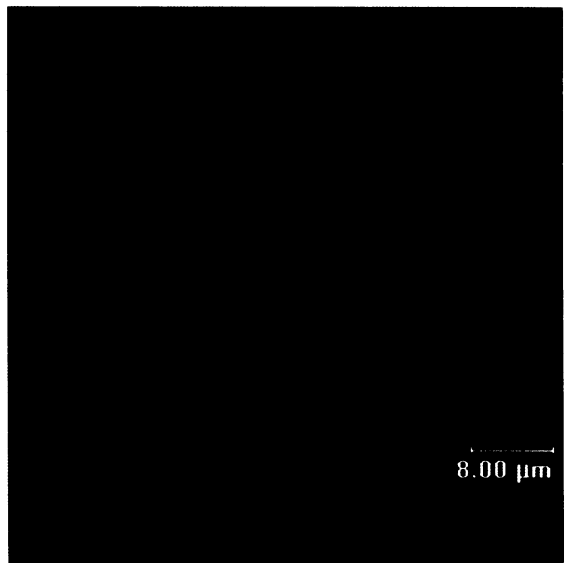
**Obr. 4.14** Spermie potkana

Zeleně – CD46  
Modře - jádro



**Obr. 4.15** Spermie myši

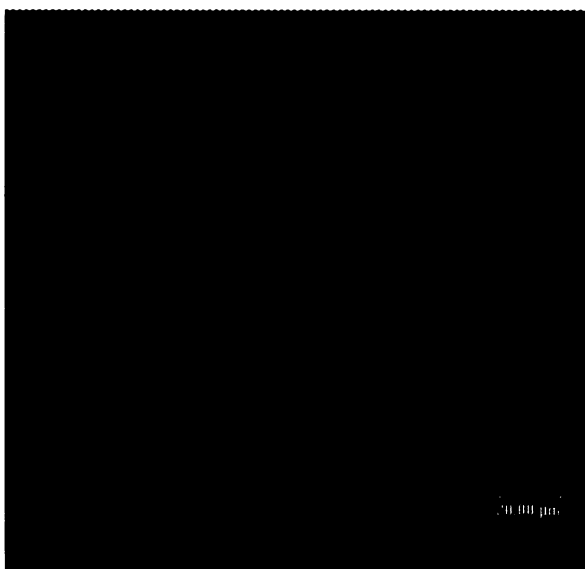
Zeleně – CD46  
Červeně – jádra



**Obr. 4.16** Spermie myši:

Červeně – jádra





**Obr. 4.17** Řez varlaty myši

**Zeleně** – CD46  
**Červeně** – jádra



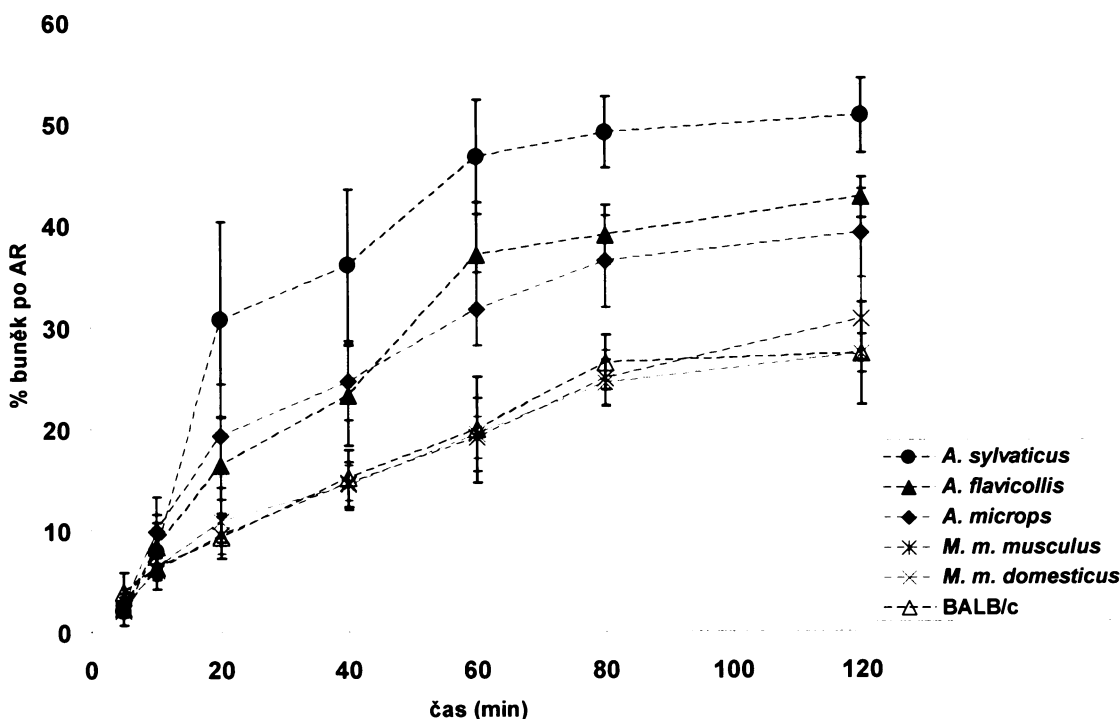
**Obr. 4.18** Řez varlaty myšice

**Červeně** – jádra

## 4.5 Úloha CD46 při zachování integrity akrozómu savčí spermie

Vzhledem k tomu, že u myšic rodu *Apodemus* nedochází k expresi proteinu CD46 jsou myšice fenotypově shodné s CD46 knock outem, u kterého byl prokázán zvýšený výskyt spontánní akrozomální reakce (INOUE *et al.*, 2003). Z tohoto důvodu jsme se rozhodli porovnat výskyt spontánní akrozomální reakce u námi studovaných zástupců rodu *Mus* a laboratorní myši BALB/c, kteří CD46 exprimují, s vybranými myšicemi rodu *Apodemus*, u kterých k expresi CD46 nedochází.

Spermie odebrané z distální části caudy epididymis byly inkubovány v kapacitačním médiu. V průběhu pokusu byly ve vybraných časech 0, 20, 40, 60, 80, 100 a 120min odebrány vzorky spermií, u nichž byl pomocí PNA lektinu hodnocen stav akrozómu. Pod fluorescenčním mikroskopem bylo vždy spočítáno 2x nejméně 100 buněk a získané údaje byly zpracovány a vyneseny do grafu. Tyto pokusy prokázaly, že u rodu *Apodemus* v porovnání s rodem *Mus* dochází ke statisticky významnému nárůstu neindukované akrozomální reakce.



Obr. 4.19 graf nárůstu spontánní akrozomální reakce

### **Statistické zhodnocení získaných výsledků sledování výskytu spontánní akrozomální reakce**

Úroveň výskytu akrozomální reakce je druhově specifická (ANOVA,  $F=52,6$ ,  $p<0.000001$ ). Post hoc Tukey test ukázal, že vybraní zástupci rodu *Mus* mají signifikantně nižší výskyt akrozomální reakce v porovnání s vybranými zástupci rodu *Apodemus* (*A. microps*  $p=0.02$ , *A. flavicollis*  $p=0.0004$ , *A. sylvaticus*  $p=0.0001$ , *A. agrarius*  $p=0.0001$ ). Dále nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl ve výskytu akrozomální reakce mezi *Mus m. musculus*, *M. m. domesticus* a BALB/c ( $p>0.71$ ). Stejně tak nebyl zaznamenán žádný rozdíl mezi *A. microps* a *A. flavicollis* ( $p=0.79$ ).

## 4.6 Výsledky při zavádění nových metod

### 4.6.1 Sonikace

Jak již bylo uvedeno dříve v rámci výzkumu prováděném v naší laboratoři se zabýváme studiem změn tyrozinové fosforylace v průběhu kapacitace, které se odehrávají jak v hlavičce, tak bičíku. Náš výzkum je zaměřen výlučně na hlavičku savčí spermie, která se přímo účastní fúze gamet, zatímco bičík je prostředkem pro dopravení spermie na místo oplození. Z tohoto důvodu bylo nutné zavést metodu sonikace, při níž dochází k oddělení hlaviček od bičíků a jejich následnému rozdělení pomocí centrifugace na percollovém gradientu na frakci bičíků a hlaviček. To nám umožňuje k některým pokusům jako např. gelové elektroforéze využít pouze jednu z těchto dvou frakcí a studovat tak proteinové složení či změny v tyrozinové fosforylaci v průběhu kapacitace pouze v hlavičce či pouze v bičíku.



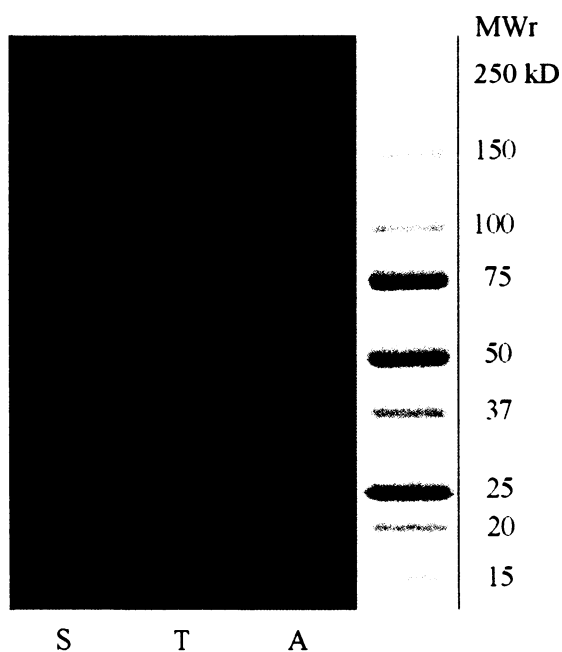
Obr. 4.20 vzorek spermií po sonikaci

- a) vzorek těsně po sonikaci – směs bičíků a hlaviček
- b) frakce hlaviček po rozdělení na percollovém gradientu
- c) frakce bičíků po rozdělení na percollovém gradientu

#### 4.6.2 SDS polyakrylamidová elektroforéza (ELFO)

V rámci studia změn tyrozinové fosforylace v průběhu kapacitace v naší laboratoři do budoucna plánujeme využívat metody ELFO. Ta by měla přispět k průkaznější kvantifikaci změn tyrozinové fosforylace v hlavičce spermie za využití sonikace.

V rámci studia této metody se mně podařilo získat některé dílčí výsledky a informace o výskytu cytoskeletálních proteinů v savčí spermii.



**Obr. 4.21** Výsledek imunoblottingu

S – spektrin, T – alfa-tubulin, A – aktin, MWr - standardy molekulových vah

## 5. Diskuze

### **5.1 Vliv tyrozinové fosforylace na polymerizaci aktinu a následnou akrozomální reakci v hlavičce spermie v průběhu kapacitace *in vitro***

Tyrozinová fosforylace hraje během kapacitace velice důležitou úlohu a je nezbytnou prekvizitou k tomu, aby savčí spermie byla schopná akrozomální reakce a splynutí s oocytem (VISCONTI *et al.*, 1995a). Naše výsledky ukazují, že během prvních 60min kapacitace *in vitro* dochází v hlavičce spermie k nárůstu tyrozinové fosforylace společně s nárůstem aktinové fosforylace. Tyto poznatky korelují s výsledky BRENER *et al.* (2003), kteří prokázali, že míra tyrozinové fosforylace během kapacitace plně odráží míru aktinové polymerizace.

S přibývajícím dobou kapacitace dochází k postupnému nárůstu výskytu tyrozinové fosforylace v hlavičce savčí spermie, nicméně těsně před akrozomální reakcí byla zaznamenána náhlá defosforylace tyrozin fosforylovaných proteinů. Tento pokles umožňuje aktivaci tzv. aktin severing proteinů, které zprostředkují depolymerizaci F aktinu na G aktin, čímž je umožněno přiblížení vnější akrozomální a plazmatické membrány a jejich fúze během AR (BRENER *et al.*, 2003). Tato zjištění potvrzují i naše výsledky, kdy jsme během pozdější doby kapacitace (více než 120min kapacitace *in vitro*) zaznamenali pokles ve výskytu tyrozinové fosforylace. Pokles tyrozinové fosforylace odráží mimo jiné i to, že během kapacitace vzrůstá schopnost spermií projít indukovanou akrozomální reakcí *in vitro*.

V našich pokusech byla tyrozinová fosforylace pozorována pouze u necelých 20% buněk. Tyto poznatky korelují s pozorováními NIXON *et al.* (2006), kteří v čase 90min kapacitace *in vitro* detekovali tyrozinovou fosforylaci v hlavičce spermie u 10 – 15% kapacitovaných spermií. Nicméně tyrozinová fosforylace byla zaznamenána téměř u všech spermií vázajících se na zonu pellucidu, ale pouze u necelých 15% buněk pohybujících se volně v médiu (ASQUITH *et al.*, 2004). Z těchto pozorování, lze usuzovat, že selekční tlak na kvalitu spermií během kapacitace je tak velký, že pouhých 15% buněk je schopno tyto nároky splnit a dosahuje takové kvality, že je schopno se vázat na zonu pellucidu vajíčka.

Během kapacitace dochází k postupné polymerizaci G-aktinu na F-aktin především v oblasti kortikálního cytoskeletu hlavičky spermie. Aktinové sítě, zde slouží jako fyzická bariéra mezi vnější akrozomální a plazmatickou membránou bránící jejich fúzi a účastní se zde přesunu fosfolipázy C z cytosolu spermie na plazmatickou membránu. Aktinová polymerizace je během kapacitace řízena pomocí tyrozinové fosforylace, jejíž nárůst je přímo úměrný nárůstu výskytu F-aktinu v kortikálním cytoskeletu hlavičky spermie (BRENER *et al.*, 2003). Tuto skutečnost plně potvrzují naše výsledky, kdy jsme zaznamenali mezi 0-90min kapacitace nárůst výskytu jak tyrozinové fosforylace tak polymerizace aktinu. Těsně před akrozomální reakcí, dochází k náhlému poklesu ve výskytu tyrozinové fosforylace a depolymerizaci F-aktinu zpět na G-aktin, čímž je umožněno přiblížení a fúze membrán během tohoto procesu. Během pozdních fází kapacitace jsme během našich pokusů zaznamenali pokles výskytu tyrozinové fosforylace a depolymerizaci aktinu, což je v souladu s dříve publikovanými prací BRENER *et al.*, (2003).

Kapacitace spermie a nárůst tyrozinové fosforylace během tohoto procesu jsou nezbytným předpokladem k tomu, aby spermie byla schopna projít akrozomální reakcí. V případě, že je tyrozinová fosforylace zablokována spermie nejsou schopné akrozomální reakci podstoupit (LEYTON *et al.*, 1992; PUKAZHENTHI *et al.*, 1998). V průběhu našeho experimentu jsme pozorovali, že během kapacitace dochází k nárůstu schopnosti spermií projít indukovanou akrozomální reakcí. Tyto výsledky plně korelují s našimi výsledky získanými z pokusů zaměřených na pozorování změn tyrozinové fosforylace a aktinového cytoskeletu během kapacitace *in vitro*. Nicméně mezi časy 120-180min se nám nepodařilo naměřit statisticky významný nárůst procenta buněk po akrozomální reakci. Důvodem může být, že kalcium ionofor není fyziologickým induktorem tohoto procesu. Do budoucna by proto bylo přínosné použít jako induktor AR *in vitro* solubilizovanou zonu pellucidu a porovnat rozdíly ve výskytu AR v případě použití fyziologického a nefyziologického induktory akrozomální reakce *in vitro*.

## **5.2 Vztah aktinu a spektrinu v kortikálním cytoskeletu hlavičky savčí spermie a jejich případná interakce hodnocená pomocí FRET analýzy**

Aktin tvořící mikrofilamenta je jedním z hlavních cytoskeletálních proteinů všech savčích buněk, kde hraje klíčovou roli v jejich tvarování, migraci a interakci s extracelulární matrix (WATT, 1986; COOPER, 1991). Přítomnost aktinu byla detekována rovněž ve spermiích, kde se účastní tak důležitých procesů jako je spermatelióza, kapacitace a akrozomální reakce. Aktin v buňkách interaguje s velkým množstvím tzv. aktin vázajících proteinů, které mu umožňují a pomáhají plnit jeho základní funkce. Mezi tyto proteiny je řazen i spektrin, jehož úkolem v somatických buňkách je udržovat aktin ve filamentálním stavu a kotvit ho na plazmatickou membránu (BRODERIC a WINDER, 2005). Aktin společně se spektrinem jsou v somatických buňkách důležitou součástí kortikálního cytoskeletu nacházejícího se těsně pod plazmatickou membránou, jehož hlavní funkcí je udržovat integritu a flexibilitu PM a tím celé buňky (ELGSEATER *et al.*, 1986). Ačkoli přítomnost spektrinu ve spermiích byla rovněž detekována, jeho vztah s aktinem v těchto zcela unikátních buňkách, nesoucích řadu specifických vlastností, nebyl doposud objasněn.

Pro náš výzkum vztahu aktinu se spektrinem v hlavičce savčí spermie jsme si zvolili jako modelový organizmus laboratorního potkana. Z dříve publikovaných prací vyplývalo, že lokalizace aktinu a spektrinu je v hlavičce savčí spermie velmi obdobná (VIRTANEN *et al.*, 1984; YAGI a PARANKO, 1995; PALECEK *et al.*, 1995; HERNENDEZ-GONZALEZ *et al.*, 2000; DVORAKOVA *et al.*, 2005).

Nejprve jsme se rozhodli potvrdit vzájemnou kolokalizaci aktinu a spektrinu v hlavičce spermie potkana pomocí duálního imunofluorescenčního značení. Výsledky našich pokusů ukazují, že v hlavičce spermie potkana dochází ke kolokalizaci aktinu a spektrinu v kortikálním cytoskeletu a krčku.

K prokázání vzájemné interakce aktinu a spektrinu jsme využili pokročilou konfokální techniku tzv. FRET (Förster nebo Fluorescence Resonance Energy Transfer) analýzy, díky níž se nám u více než padesáti procent vzorků podařilo prokázat vzájemnou interakci těchto dvou proteinů.

FRET analýza je technika mimo jiné používaná k měření interakce mezi dvěma molekulami s navázanými dvěma odlišnými fluorofory - donorem a akceptorem (BERNEY a DANUSER, 2003). Förster resonance energy transfer (FRET) je proces při



němž dochází k přenosu energie z donoru v excitovaném stavu na sousední molekulu akceptoru. Nositelem přenášené energie v tomto případě není elektromagnetické záření, ale jedná se o specifický druh interakce mezi dvěma dipóly (Förster, 1948). K tomu aby se přenos mohl uskutečnit musí být molekuly donoru a akceptoru v těsné blízkosti tzn. ve vzdálenosti mezi 0,002-0,01 $\mu$ m. Z čehož vyplývá, že pokud k FRET dochází, jsou proteiny vázající protilátky nesoucí donor a akceptor natolik blízko, že spolu interagují.

Ačkoli se nám podařilo prokázat vzájemnou interakci aktinu a spektrinu v hlavičce savčí spermie u více než 50% měřených vzorků, nenašli jsme žádnou konkrétní hodnotu FRET efficiency, ze které by šlo vypočítat přesnou vzdálenost těchto dvou cytoskeletálních proteinů. Nekonzistentnost výsledků je pravděpodobně způsobena několika faktory. Hlavním důvodem je především fyzikální podstata této metody. Výsledky jsou velmi ovlivněny rovinou zaostření, ve které je měření prováděno. To se u každé buňky nastavuje nové a proto není a ani nemůže být shodné. Dalším problémem je vzdálenost epitopů, na které se protilátky nesoucí fluorofor váží a samotná konformace proteinů. Tyto dva faktory mohou způsobit, že ačkoli jsou oba studované proteiny v naprosté blízkosti fluorofory jsou od sebe natolik vzdáleny, že je výsledná hodnota FRET eff. velice nízká. Posledním vysvětlením je, že spektrinu okolo aktinu může vytvářet klastry, čímž je znemožněno správně zaměřit laser na oba fluorofory a naměřit správnou hodnotu FRET eff. Tvorba spektrinových klastrů okolo filament aktinu byla prokázána v pokusech *in vitro* skupinou RAAE *et al.* (2003).

Do budoucna plánujeme výsledky ukazující na existenci interakce aktinu a spektrinu v hlavičce savčí spermie získané z FRET analýzy potvrdit pomocí imunoprecipitace.

### **5.3 Exprese CD46 na spermatogenních buňkách hlodavců a úloha CD46 při zachování integrity akrozómu savčí spermie**

Exprese CD46 (MCP; membrane cofactor protein) byla detekována v hlavičce savčí spermie. Nicméně u člověka se tento protein nachází na všech jaderných buňkách, kde slouží jako ochrana proti působení komplementu. Vzhledem k tomu, že u spermií dochází k expresi unikátní izoformy CD46 na akrozomální membráně, CD46 epitop je vystaven vnějšímu prostředí reprodukčního traktu samice až po úspěšně proběhlé akrozomální reakci, zdá se, že v procesu oplození bude úloha tohoto proteinu jiná než u somatických buněk.

Použití protilátek proti SCR 1 (first short consensus repeat) ektodoméně CD46 vede u spermií člověka kablokování jejich vazby na oocyt zbažený zony pellucidy a následně i k znemožnění fúze membrán vajíčka a spermie. Tyto poznatky vedly k domněnce, že je CD46 protein kandidátní molekulou na vazbu s vaječným povrchovým proteinem CD9, který je zodpovědný za vazbu spermie na vajíčko. Z toho důvodu se pozornost mnoha vědeckých týmů zaměřila právě na tento protein.

Způsobem, jak prokázat nepostradatelnost CD46 v procesu oplození bylo vytvořit myši CD46 knock out, u něž by nedocházelo k expresy tohoto proteinu. To se podařilo skupině prof. Okabe (INOQUE *et al.*, 2003). Překvapivě se ukázalo, že CD46 knock out není sterilní, ale naopak vykazuje zvýšenou fertilitu v porovnání s normálními jedinci svého druhu. Dále byl u CD46 knock out zaznamenán nárůst spontánní akrozomální reakce.

Hodnoty výskytu spontánní akrozomální reakce u CD46 knock out velice úzce korelovaly s hodnotami výskytu spontánní akrozomální reakce u myšice rodu *Apodemus*, který v té době byl předmětem intenzivního studia naší skupiny (MOORE *et al.*, 2002). Toto zjištění bylo podnětem k zahájení studia exprese proteinu CD46 v naší laboratoři ve spolupráci s univerzitou v Liverpoolu.

Pomocí testování série různých protilátek se nám podařilo zjistit, že u námi testovaných myšic rodu *Apodemus* nedochází na epididymálních spermích k expresi CD46. Naproti tomu na epididymálních spermích myši rodu *Mus* k expresi proteinu CD46 dochází. Skupina prof. Johnsona z univerzity v Liverpoolu prokázala, že u myšic (*Apodemus*) je gen pro CD46 přítomen, ale nedochází k jeho translaci a tudíž ani expresi. Bylo zjištěno, že u těchto myšic dochází k alternativnímu splicingu transkriptu pro CD46 a vznikají tak dvě jeho izoformy. U jedné z těchto izoform chybí exony 5-7 a u druhé 5 a 6. To má za následek znemožnění translace testikulární mRNA pro CD46 (submitted Reproduction).

Pomocí nepřímé imunofluorence jsme testovali přítomnost CD46 ve varlatech myšic a myši (*Mus*). Cílem těchto pokusů bylo ověřit, zda k expresi CD46 u myšic opravdu nedochází, nebo zda je CD46 exprimován, ale v průběhu spermatogeneze dochází k jeho degradaci. Podařilo se nám prokázat, že u myšic k expresi CD46 ve varlatech nedochází a že u myši se na spermatogenních buňkách protein CD46 objevuje až v pozdní fázi spermateliózy pravděpodobně v době, kdy dochází k formování akrozómu.

Testování výskytu akrozomální reakce v průběhu kapacitace ukázalo, že u myšic dochází k výraznému nárůstu neindukované akrozomální reakce v porovnání se zástupci myši. Z těchto poznatků vyplývá, že by protein CD46 mohl v hlavičce savčí spermie hrát důležitou roli v udržování integrity akrozómu. Způsob jakým přítomnost CD46 přispívá ke stabilitě akrozómu není zřejmá. Zdá se, že stimulace CD46 by mohla vést k aktivaci protein kináz, jež má za následek zahájení reorganizace aktinového cytoskeletu (WONG *et al.*, 1997). Další možností je, že se CD46 v hlavičce savčí spermie váže na beta1 integriny, přes které je nepřímo asociován s kortikálním cytoskeletem obklopujícím akrozóm (LOZAHIC *et al.*, 2000; KURITA-TANIGUCHI *et al.*, 2002; REZCALLAH *et al.*, 2005).

Zodpovědět otázku jakým způsobem dochází pomocí CD46 ke stabilizaci akrozomální membrány je cílem našeho budoucího výzkumu.

## **5.4 Shrnutí**

Cílem této práce bylo přispět k pochopení molekulárních mechanismů chování spermie před oplozením. Jako modelové organizmy byli zvoleni zástupci čeledi *Muridae*. Snažili jsme se o komplexní přístup, který by shrnoval klíčové děje odehrávající se ve spermii před fúzí s oocytem. Středem našeho zájmu byla výhradně hlavička, jako část spermie, která se přímo účastní oplození oocyty a je nositelem genetické informace této unikátní buňky. Mezi děje hrající zásadní roli v průběhu kapacitace patří změny ve výskytu tyrozinové fosforylace během tohoto procesu. Pomocí tyrozinové fosforylace jsou řízeny děje jako remodelace aktinového cytoskeletu a akrozomální reakce. Dynamiky změn aktinového cytoskeletu během kapacitace se účastní množství aktin vázajících proteinů. Z tohoto důvodu je porozumění vztahu aktinu a spektrinu, které tvoří součást kortikálního cytoskeletu hlavičky spermie, velice důležité. Integrita akrozomálního váčku je přímo závislá na uspořádání aktinového cytoskeletu pomocí vazeb na transmembránové proteiny akrozomální membrány. CD46 je kandidátem na jeden z těchto vazebných proteinů. Pochopení role CD46 v procesu oplození je proto důležité pro porozumění molekulárních mechanismů stabilizace akrozomálního váčku, akrozomální reakce a oplození.

## 6. Závěr

### *Ad 1. Vliv tyrozinové fosforylace na polymerizaci aktinu a následnou akrozomální reakci v hlavičce spermie v průběhu kapacitace in vitro*

- Během prvních 60 min kapacitace *in vitro* dochází k nárůstu tyrozinové fosforylace a následně k jejímu poklesu, což koreluje s přípravou spermie na AR
- Aktinová polymerizace v průběhu kapacitace *in vitro* plně odráží míru tyrozinové fosforylace
- S přibývajícím dobou kapacitace *in vitro* vzrůstá schopnost spermií projít indukovanou AR

### *Ad 2. Vztah aktinu a spektrinu v kortikálním cytoskeletu hlavičky savčí spermie a jejich případná interakce hodnocená pomocí FRET analýzy*

- F-aktin je lokalizován v apikálním kortikálním cytoskeletu hlavičky spermie, v ekvatoriálním segmentu, post-akrozomální části a v krčku spermie
- Dvojití značení prokázalo vzájemnou kolokalizaci F-aktinu a spektrinu v apikální části hlavičky a krčku spermie potkana
- Interakce těchto dvou proteinů v hlavičce spermie potkana měřená pomocí FRET analýzy byla prokázána u více než 50% vzorků

### *Ad 3 a 4. Exprese CD46 na spermatogenních buňkách hlodavců a úloha CD46 při zachování integrity akrozómu savčí spermie*

- Lokalizovali jsme CD46 ve spermatidách a spermiích myši (BALB/c, *Mus musculus musculus*, *M. m. domesticus*)
- Zjistili jsme nepřítomnost CD46 ve spermatidách a spermiích myšice rodu *Apodemus* (*A. sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. microps*)
- Absence CD46 koreluje s nárůstem akcelerované akrozomální reakce z čehož vyplývá, že CD46 se pravděpodobně podílí na udržení integrity akrozómu.

## 7. Seznam citované literatury

- Anderson, D.J., Michaelson, J.S., Johnson, P.M. (1989): Trophoblast/leukocyte-common antigen is expressed by human testicular germ cells and appears on the surface of acrosome-reacted sperm. *Biol. Reprod.* 41: 285-293.
- Anderson, D.J., Abbott, A.F., Jack, R.M. (1993): The role of complement component C3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10051-10055.
- Aponte P.M., van Bragt M.P., de Rooij D.G., van Pelt A.M. (2005) Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS*. 113(11-12):727-42. Review.
- Arnoult C, Lemos J.R., Florman H.M. (1997) Voltage-dependent modulation of T-type Ca<sub>v</sub>2.1 channels by protein tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 16:1593–1599.
- Arnoult C, Kazam I.G., Visconti P.E., Kopf G.S., Villaz M., Florman H.M. (1999) Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(12):6757-62.
- Austin C.R. (1952) The “capacitation” of mammalian sperm. *Nature* 170:326.
- Austin C.R. (1951) Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)*. 4(4):581-96.
- Austin CR (1960) Capacitation and the release of hyaluronidase. *J Reprod Fertil* 1:310-311.
- Baldi E., Luconi M., Bonaccorsi L., Muratori M., Forti G. (2000) Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci.* 5:E110-23. Review.
- Bearer EL, Friend DS 1990 Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. *J Electron Microscop Tech* 16(4):281-97.
- Bedford JM, Cross NL (1999) Sperm Capacitation. In *Encyclopedia of Reproduction*, end 1, pp 597-602 Academic Press.
- Benoff S. (1997) Carbohydrates and fertilization: an overview *Molecular Human Reproduction* 3(7): 599–637.
- Benoff S. (1998) Modelling human sperm–egg interactions in vitro: signal transduction pathways regulating the acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction* 4(5): 453–471.

- Berndtson W.E., Igboeli G., Pickett B.W. (1987) Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. *J Anim Sci*; 64:241-246.
- Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S (2005) Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reprod* 129(3) 263-8.
- Breitbart H., Naor Z. (1999) Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Rev Reprod*. 4(3):151-9.
- Breitbart H., Rubinstein S., Etkovitz N. (2006) Sperm capacitation is regulated by the crosstalk between protein kinase A and C. *Mol Cell Endocrinol*. 252(1-2):247-9.
- 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. *Biol Reprod* 68(3): 837-45.
- Broderic MJ, Winder SJ (2005) Spectrin, alpha-actinin, and dystrophin. *Adv Protein Chem*. 70: 203-46.
- Brown H.A., Gutowski S., Moomaw C.R., Slaughter C., Sternweis P.C. (1993) ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell*. 75(6):1137-44.
- Cataldo L., Baig K., Oko R., Mastrangelo M.A., Kleene K.C. (1996) Developmental expression, intracellular localization, and selenium content of the cysteine-rich protein associated with the mitochondrial capsules of mouse sperm. *Mol Reprod Dev*. 45(3):320-31.
- Clark JM, Eddy EM. (1975) Fine structural observations on the origin and associations of primordial germ cells of the mouse. *Dev Biol*. 47(1):136-55.
- Clermont Y. (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*. 52(1):198-236.
- 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. *Dev Biol*. 267(1):230-41.
- Cross N.L. (1998) Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod*. 59(1):7-11.
- Dadoune J.P., Siffroi J.P., Alfonsi M.F. (2004) Transcription in haploid male germ cells. *Int Rev Cytol*. 237:1-56. Review.
- De Blas G.A., Roggero C.M., Tomes C.N., Mayorga L.S. (2005) Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS Biol*. 3(10):e323.
- D’Cruz O.J., Lambert H., Haas G.G. Jr. (1997) Expression of CD15 (Lewisx) antigen on human sperm and its role in sperm-egg interaction. *Am. J. Reprod. Immunol*. 37, 172-183.

Delgado-Buenrostro N.L., Hernandez-Gonzalez E.O., Segura-Nieto M., Mujica A. (2005) Actin polymerization in the equatorial and postacrosomal regions of guinea pig spermatozoa during the acrosome reaction is regulated by G proteins. *Mol Reprod Dev.* 70(2):198-210.

Demarco I.A., Espinosa F., Edwards J., Sosnik J., De La Vega-Beltran J.L., Hockensmith J.W., Kopf G.S., Darszon A., Visconti P.E. (2003) Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem.* 28;278(9):7001-9.

Dorig R.E., Marcil A., Chopra A., Richardson C.D. (1993) The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell.* 1993 Oct 22;75(2):295-305.

Dvorakova K., Moor H.D.M., Sebkova N., Palecek J. (2005) Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction.* 130(1):61-9.

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 Biol (Praha)* 47(1):18-27.

Dym M., Clermont Y. (1970) Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. *Am J Anat.* 128(3):265-82.

Eddy E.M. (2002) Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res.* 57:103-28. Review.

Elgseater A., Stokke B.T., Mikkelsen A., Branton D. (1986) The molecular basis of erythrocyte shape. *Science* 234:1217-1222.

Feliciello A., Gottesman M.E., Avvedimento E.V. (2001) The biological functions of A-kinase anchor proteins. *J Mol Biol.* 308(2):99-114.

Florman H.M., Arnoult C., Kazam I.G., Li C., O'Toole C.M. (1998) A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod.* 59(1):12-6. Review.

Fouquet J.P., Fraile B., Kann M.L. (1991) Sperm actin and calmodulin during fertilization in the hamster: an immune electron microscopic study. *Anat Rec.* Nov;231(3):316-23.

Gaggar A., Shayakhmetov D.M., Lieber A. (2003) CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med.* 9(11):1408-12.

Gilbert S.F. (2000): *Developmental Biology.* 6th ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.

Griswold M.D. (1995) Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod.* 52(2):211-6. Review.

Hernandez-Gonzalez E.O., Lecona-Valera A.N., Escobar-Herrera J., Mujica A. (2000) Involvement of an F-actin skeleton on the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Cell Motil Cytoskeleton* 46(1):43-58.

Hinsch E., Aires V.A., Hedrich F., Oehninger S., Hinsch K.D. (2005) A synthetic decapeptide from a conserved ZP3 protein domain induces the G protein-regulated acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 63(6):1682-94.

Ho H.C.H., Suarez S.S. (2003) Characterization of intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Bio of Rep* 68:1590-1596.

Hosokawa M., Nonaka M., Okada N., Nonaka M., Okade, H. (1996) Molecular cloning of guinea pig membrane cofactor protein: preferential expression in testis. *J. Immunol.* 157:4946-4952.

Howes E.A., Hurst S.M., 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. *J Androl* 22(1):62-72.

Chang M.C. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 168(4277):697-8.

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. *Mol Cell Biol*. 23(7):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(7030):234-8.

Jamney, P.A. (1994) Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Ann. Rev. Physiol.* 56:169–191.

Johnson L., Grumbles J.S., Chastain S., Goss H.F. Jr., Petty C.S. (1990) Leydig cell cytoplasmic content is related to daily sperm production in men. *J Androl*. 11(2):155-60.

Jursová M. (2005) Stavba a funkce savčí spermie. Seminární práce

Kallstrom H., Liszewski M.K., Atkinson J.P., Jonsson AB. (1997) Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol*. 25(4):639-47.

Kleene K.C. (1993) Multiple controls over the efficiency of translation of the mRNAs encoding transition proteins, protamines, and the mitochondrial capsule selenoprotein in late spermatids in mice. *Dev Biol*. 159(2):720-31.

Kopf G.S. (1990) Zona pellucida-mediated signal transduction in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*. 42:33-49. Review.



- Kopf G.S., Woolkalis M.J., Gerton G.L. (1986) Evidence for a guanine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm. Identification by islet-activating protein-catalyzed ADP-ribosylation and immunochemical methods. *J Biol Chem.* 261(16):7327-31.
- Lax Y., Grossman S., Rubinstein S., Magid N., Breitbart H. (1990) Role of lipoygenase in the mechanism of acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Biochim Biophys Acta.* 1043(1):12-8.
- Leblond C.P., Clermont Y. (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann NY Acad Sci;* 55:548-573.
- Leyton L, LeGuen P, Bunch D, Saling PM. (1992) Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(24):11692-5.
- Leyton, L. and Saling, P. (1989) 95 kDa Sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell,* 57, 1123–1130.
- Lin Q., Inselman A., Han X., Xu H., Zhang W., Handel M.A., Skoultchi A.I. (2004) Reductions in linker histone levels are tolerated in developing spermatocytes but cause changes in specific gene expression. *J Biol Chem* 279(22):23525-35.
- Lin Y., Kan F.W. (1996) Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol Reprod* 55(5): 1133-46.
- Liszewski MK and Atkinson JP (1992) Membrane cofactor protein. *Curr Top Microbiol Immunol.* 178:45-60. Review.
- Liszewski, M.K., Kemper, C., Price, J.D., Atkinson, J.P. (2005) Emerging roles and new functions of CD46. *Springer Semin. Immunol.* 27:345-358.
- Liszewski M.K., Post T.W., Atkinson J.P. (1991) Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol.* 9:431-55. Review.
- Liszewski M.K., Tejda I., Atkinson J.P.(1994) Membrane cofactor protein (CD46) of complement. Processing differences related to alternatively spliced cytoplasmic domains. *J Biol Chem.* 269(14):10776-9.
- Luconi M., Krausz C., Barni T., Vannelli G.B., Forti G., Baldi E. (1998) Progesterone stimulates p42 extracellular signal-regulated kinase (p42erk) in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 4(3):251-8.
- Lui W.Y., Mruk D., Lee W.M., Cheng C.Y. (2003) Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod.* 68(4):1087-97.
- de Lourdes Juarez-Mosqueda M, Mujica A (1999) A perinuclear theca substructure is formed during epididymal guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *J Struct Biol* 128(3):225-36.

Martinez P, Morros A (1996) Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front biosci* 1:d103-117.

McLachlan R.I., O'Donnell L., Meachem S.J., Stanton P.G., de Kretser D.M., Pratis K., Robertson D.M. (2002) Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res.* 57:149-79. Review.

Meyers SA. (2001) Equine sperm-oocyte interaction: the role of sperm surface hyaluronidase. *Anim Reprod Sci.* 68(3-4):291-303.

Meistrich M.L., Mohapatra B., Shirley C.R., Zhao M. (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma.* 111(8):483-8. Review.

Mizuno M., Harris C.L., Johnson P.M., Morgan B.P. (2004) Rat membrane cofactor protein (MCP; CD46) is expressed only in the acrosome of developing and mature spermatozoa and mediates binding to immobilized activated C3. *Biol. Reprod.* 71, 1374-1383

Mizuno M., Harris C.L., Morgan B.P. (2007) Immunization with autologous CD46 generates a strong autoantibody response in rats that targets spermatozoa. *J Reprod Immunol.* 73(2):135-47.

Molina H. (2002) The murine complement regulator Crry: new insights into the immunobiology of complement regulation. *Cell Mol Life Sci* 59(2):220-9. Review.

Moreno R.D., Ramalho-Santos J., Sutovsky P., Chan E.K., Schatten G. (2000) Vesicular traffic and golgi apparatus dynamics during mammalian spermatogenesis: implications for acrosome architecture. *Biol Reprod Jul* 63(1):89-98.

Multigner L., Gagnon J., Van Dorselaer A., Job D. (1992) Stabilization of sea urchin flagellar microtubules by histone H1. *Nature.* 360(6399):33-9.

Naniche D., Varior-Krishnan G., Cervoni F., Wild T.F., Rossi B., Roubourdin-Combe C., Gerlier D. (1993) Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol.* Oct;67(10):6025-32.

Naz R.K., Ahmad K., Kaplan P. (1992) Expression and function of ras proto-oncogene proteins in human sperm cells. *J Cell Sci.* 102 ( Pt 3):487-94.

Naz RK, Rajesh PB (2004) Role of tyrosin phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reprod biol and endocrinol* 2(1):75.

Newton S.C., Blaschuk O.W., Millette C.F. (1993) N-cadherin mediates Sertoli cell-spermatogenic cell adhesion. *Dev Dyn.* 197(1):1-13.

O'Flaherty C., de Lamirande E., Gagnon C. (2004) Phosphorylation of the Arginine-X-X-(Serine/Threonine) motif in human sperm proteins during capacitation: modulation and protein kinase A dependency. *Mol Hum Reprod.* 10(5):355-63.

- Okabe M., Nagira M., Kawai Y., Matzno S., Mimura T., Mayumi T. (1990) A human sperm antigen possibly involved in binding and/or fusion with zona-free hamster eggs. *Fertil Steril.* 54(6):1121-6.
- Okada N., Liszewski M.K., Atkinson J.P., Caparon M. (1995) Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(7):2489-93.
- Oko R.J. (1995) Developmental expression and possible role of perinuclear theca proteins in mammalian spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 7(4):777-97. Review.
- Oko R. (1998) Occurrence and formation of cytoskeletal proteins in mammalian spermatozoa. *Andrologia.* 30(4-5):193-206.
- Olson G.E., Winfrey V.P., Garbers D.L., Noland T.D. (1985) Isolation and characterization of a macromolecular complex associated with the outer acrosomal membrane of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 33(3):761-79.
- Palecek J., Peknicova J., Vitu M. (1999) Changes in immunochemical localization of cytoskeletal proteins in human and boar spermatozoa before and after acrosome reaction. *Folia Biol (Praha)* 45(1):13-20.
- Paranko J., Yagi A., Kuusisto M. (1994) Immunocytochemical detection of actin and 53 kDa polypeptide in the epididymal spermatozoa of rat and mouse. *Anat Rec* 240(4):516-27.
- Peterson R.N., Bozzola J.J., Hunt W.P., Darabi A. (1990) Characterization of membrane-associated actin in boar spermatozoa. *J Exp Zool.* 253(2):202-14.
- Petrunkina A.M., Friedrich J., Drommer W., Bicker G., Waberski D., Topfer-Petersen E. (2001) Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. *Reproduction.* 122(3):469-80.
- Post T.W., Liszewski M.K., Adams E.M., Tedja I., Miller E.A., Atkinson J.P. (1991) Membrane cofactor protein of the complement system: alternative splicing of serine/threonine/proline-rich exons and cytoplasmic tails produces multiple isoforms that correlate with protein phenotype. *J Exp Med.* 174(1):93-102.
- Pratt S.A., Scully N.F., Shur B.D. (1993) Cell surface beta 1,4 galactosyltransferase on primary spermatocytes facilitates their initial adhesion to Sertoli cells in vitro. *Biol Reprod.* 49(3):470-82.
- Pukazhenthil BS, Wildt DE, Ottinger MA, Howard J. (1998) Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors. *Mol Reprod Dev.* 49(1):48-57.
- Ravnik S.E., Zarutskie P.W., Muller C.H. (1993) Purification and characterization of a human follicular fluid lipid transfer protein that stimulates human sperm capacitation. *Biol Reprod* 48(1):214.

- Ren D., Navarro B., Perez G., Jackson A.C., Hsu S., Shi Q., Tilly J.L., Clapham D.E. (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*. 413(6856):603-9.
- Riley R.C., Kemper C., Leung M., Atkinson, J.P. (2002) Characterization of human membrane cofactor protein (MCP; CD46) on spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 62:534-546
- Riley R.C., Tannenbaum P.L., Abbott D.H., Atkinson J.P. (2002) Inhibiting measles virus infection but promoting reproduction: an explanation for splicing and tissue-specific expression of CD46. *J. Immunol.* 169:5405-5409
- Riley-Vargas R.C., Lanzendorf S., Atkinson J.P. (2005) Targeted and restricted complement activation on acrosome-reacted spermatozoa. *J Clin Invest.* 115(5):1241-9.
- Rossato M., Di Virgilio F., Rizzuto R., Galeazzi C., Foresta C. (2001) Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: role of calcium and plasma membrane potential. *Mol Hum Reprod.* 7(2):119-28.
- Russell L.D., Peterson R.N. (1984) Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J Reprod Fertil* 70:635-641
- Santoro F., Kennedy P.E., Locatelli G., Malnati M.S., Berger E.A., Lusso P. (1999) CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell.* 99(7):817-27.
- Shadan S., James P.S., Howes E.A., Jones R. (2004) Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol Reprod.* 71(1):253-65.
- Siu M.K., Cheng C.Y. (2004) Extracellular matrix: recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Biol Reprod.* 71(2):375-91. Review
- Suarez S.S. (1996) Hyperactivated motility in sperm. *J Androl* 17(4) 331-5.
- Suarez S.S., Katz D.F., Owen D.H., Andrew J.B., Powell R.L. (1991) Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod* 44(2):375-81.
- Sutovsky P., Ramalho-Santos J., Moreno R.D., Oko R., Hewitson L., Schatten G. (1999) On-stage selection of single round spermatids using a vital, mitochondrion-specific fluorescent probe MitoTracker(TM) and high resolution differential interference contrast microscopy. *Hum Reprod.* 14(9):2301-12.
- Taylor, C.T., Biljan, M.M., Kingsland, C.R., Johnson, P.M. (1994) Inhibition of human spermatozoon-oocyte interaction *in vitro* by monoclonal antibodies to CD46 (membrane cofactor protein). *Hum. Reprod.* 9:907-911.

- Thastrup O., Cullen P.J., Drobak B.K., Hanley M.R., Dawson A.P. (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(7):2466-70.
- Tomes C.N., McMaster C.R., Saling, P.M. (1996) Activation of mouse sperm phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate-phospholipase C by zona pellucida is modulated by tyrosine phosphorylation. *Mol. Reprod. Dev.*, 43:196–204.
- Urner F., Sakkas D. (2003) Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction*. 125(1):17-26.
- Vijayaraghavan S., Liberty G.A., Mohan J., Winfrey V.P., Olson G.E., Carr D.W. (1999) Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-specific protein kinase A-anchoring protein. *Mol Endocrinol*. 13(5):705-17.
- Virtanen I., Badley R.A., Paasivuo R., Lehto V.P. (1984) Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J Cell Biol* 99(3):1083-91.
- Visconti P.E., Bailey J.L., Moore G.D., Pan D., Olds-Clarke P., Kopf G.S. (1995a) Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 121(4):1129-37.
- Visconti P.E., Moore G.D., Bailey J.L., Leclerc P., Connors S.A., Pan D., Olds-Clarke P., Kopf G.S. (1995b) Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*. 121(4):1139-50.
- Visconti P.E., Johnson L.R., Oyaski M., Fornes M., Moss S.B., Gerton G.L., Kopf G.S. (1997) Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. *Dev Biol*. 192(2):351-63.
- Visconti P.E., Kopf G.S. (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod*. 59:1-6.
- Vogl A.W., Genereux K., Pfeiffer D.C. (1993) Filamentous actin detected in rat spermatozoa. *Tissue Cell*. 25(1):33-48.
- Wang G., Liszewski M.K., Chan A.C., Atkinson, J.P. (2000) Membrane cofactor protein (MCP; CD46): isoform-specific tyrosine phosphorylation. *J. Immunol*. 164, 1839-1846.
- Ward C.R., Storey B.T., Kopf G.S. (1992) Activation of a Gi protein in mouse sperm membranes by solubilized proteins of the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J Biol Chem*. 267(20):14061-7.
- Wassarman P.M. (2002) Sperm receptors and fertilization in mammals. *Mt Sinai J Med*. 69(3):148-55. Review.

Wong T.C., Yant S., Harder B.J., Korte-Sarfai, J., Hirano A. (1997) The cytoplasmic domains of complement regulatory protein CD46 interact with multiple kinases in macrophages. *J. Leuk. Biol.* 62, 892-900.

Wu E., Trauger S.A., Pache L., Mullen T.M., von Seggern D.J., Siuzdak G., Nemerow G.R. (2004) Membrane cofactor protein is a receptor for adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. *J Virol.* 78(8):3897-905.

Yagi A., Paranko J. (1995) Actin, alpha-actinin, and spectrin with specific associations with the postacrosomal and acrosomal domains of bovine spermatozoa. *Anat Rec* 241(1):77-87.

Yanagimachi R. (1994) Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, edn 2, pp189-317. Eds E Knobil and JD Neill. New York: Raven Press.