

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Sulfan produkující enzymy u kančích spermií během
epidydimální maturace**

Diplomová práce

Bc. Aneta Pilsová

Reprodukční biotechnologie

prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Sulfan produkující enzymy u kančích spermii během epidydimální maturace " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. 4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí práce prof. Mgr. Ing. Markétě Sedmíkové, Ph. D. za odborné vedení práce a cenné rady, které mi věnovala při řešení dané problematiky. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Kateřině Havlíkové za metodické vedení praktické části práce v laboratoři, konzultantce Ing. Lence Hackerové za veškeré kontroly na mé teoretické části a své sestře Bc. Zuzaně Pilsové za veškerou pomoc a sounáležitost při psaní teoretické části a při samotné práci v laboratoři. Ráda bych poděkovala i všem pracovníkům z Katedry veterinárních disciplín za neustálou ochotu a optimismus. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu ve studiu a při psaní práce samotné.

Sulfan produkující enzymy u kančích spermii během epididymální maturace

Souhrn

Sulfan je vedle oxidu dusnatého (NO) a oxidu uhelnatého (CO) třetím prokázaným gasotransmitterem produkovaným endogenně v organismu. Společně s NO a CO patří do skupiny signálních molekul. Cílem teoretické části práce bylo shrnutí dosavadních poznatků o spermiogenezi a následujících dějů vedoucích k oplození, zaměřené především na epididymální maturaci, kapacitaci a akrozomální reakci, přičemž stěžejním oddílem byla právě epididymální maturace spermii. Dále literární rešerše pojednává o funkci, produkci a metabolismu sulfanu a podrobněji o enzymech, které tuto molekulu produkují.

Praktická část byla zaměřena na průkaz přítomnosti sulfan produkujících enzymů v kančích spermii izolovaných z caput, corpus a cauda epididymis. Mezi detekované enzymy patřila cystathionin- β -syntáza (CBS), cystathionin- γ -lyáza (CTH) a 3-merkaptopyruvat sulfurtransferáza (3-MST). Expres těchto enzymů byla sledována imunocytochemicky a poté byla hodnocena po snímání na konfokálním mikroskopu analýzou obrazu. Jako kontrolní metoda byl použit Western blot. Přítomnost sulfan produkujících enzymů byla ve všech částech kančího epididymu prokázána. Expres enzymů v epididymálních spermii v průběhu epididymální maturace klesala.

Klíčová slova: spermie, maturace, epididymus, sulfan produkující enzymy

Sulphan-producing Enzymes in Boar Sperm during epididymal maturation

Summary

Besides nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) hydrogen sulphide is the third proven endogenously produced gasotransmitter in organism. This molecule along with NO and CO belongs to the signal molecule group. The aim of theoretical part of this thesis was to summarize present knowledge of spermiogenesis and following actions leading to fertilization, particularly epididymal maturation, capacitation and acrosome reaction, whereas the main part was epididymal maturation. The literature research further follows up hydrogen sulfide function, production and metabolism and in detail enzymes which are responsible for hydrogen sulphide production.

Practical part was focused on the proof of hydrogen sulphide producing enzymes in boar sperm isolated from caput, corpus and cauda epididymis. Among detected enzymes belonged cystathionin- β -synthase (CBS), cystathionin- γ -lyase (CTH) and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST). The expression of these enzymes was observed using immunocytochemistry and it was after evaluated by the scanning confocal microscope image analysis. Western blot was used as a control method. The presence of these enzymes was proven in every part of boar epididymis. The expression of hydrogen sulphide producing enzymes was during the epididymal maturation decreasing.

Keywords: sperm, maturation, epididymus, sulphan-producing enzymes

Obsah

1 Úvod.....	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Spermatogeneze.....	11
3.1.1 Formování akrozomu	12
3.2 Epididymální maturace	17
3.2.1 Epididymální tekutina.....	17
3.2.2 Epididymosomy	19
3.2.3 Biochemické změny ve spermii v průběhu epididymální maturace	21
3.2.4 Morfologické změny a význam cytoplazmatické kapky spermie.....	23
3.3 Kapacitace a akrozomální reakce.....	25
3.4 Vliv ubiquitin-proteazomového systému ve spermiogenezi	26
3.5 Sulfan.....	28
3.5.1 Vlastnosti sulfanu	28
3.5.2 Produkce a katabolismus sulfanu.....	29
3.5.3 Molekulární cíle sulfanu v organismu	32
3.5.4 Funkce sulfanu v reprodukční soustavě.....	35
3.6 Sulfan produkující enzymy	36
3.6.1 Cystathionin β -syntáza.....	36
3.6.2 Cystathionin γ -lyáza	38
3.6.3 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza	38
4 Metodika	40
4.1 Příprava vzorků	40
4.1.1 Vlhká fixace	40
4.1.2 Lyzace vzorků.....	40
4.2 Imunolokalizace.....	41
4.2.1 Použité chemikálie a roztoky	41
4.2.2 Postup.....	41
4.3 Western blot.....	42
4.3.1 Použité chemikálie a roztoky	42

4.3.2	Postup	43
4.4	Statistické vyhodnocení	44
5	Výsledky.....	45
5.1	Cystathionin β -syntáza (CBS).....	45
5.2	Cystathionin γ -lyáza (CTH)	46
5.3	3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (3-MST).....	48
6	Diskuse	50
7	Závěr	52
8	Literatura.....	53

1 Úvod

Před několika desítkami let byl sulfan (H_2S) považován pouze za toxický plyn, který je rozpoznatelný podle charakteristického zápachu zkažených vajec. Avšak po objevu endogenní produkce oxidu dusnatého a oxidu uhelnatého v organismu a jejich účinků na různé tkáně, byly provedeny také experimenty zaměřené na detekci sulfanu v těle. První takový experiment provedli v roce 1996 Abe a Kimura, kteří prokázali přítomnost sulfanu v těle, konkrétně v nervovém systému, a poukázali na to, že sulfan má zřejmě i jiné než toxické účinky a že je součástí životně důležitých funkcí a procesů v těle. Od té doby je tato plynná molekula řazena společně s NO a CO mezi tzv. gasotransmitery. Díky mnoha výzkumům, které se této problematice věnovaly, je dnes již známo, že se sulfan podílí na velkém množství fyziologických procesů v organismu. Má vliv například na oxidační stres, který účinně tlumí, upravuje buněčný cyklus a apoptózu, dále se účastní zánětlivých procesů či vazodilatace cév. Mezi další popsané funkce sulfanu patří také regulace činnosti nervové nebo reprodukční soustavy (Reiffenstein et al. 1992; Abe & Kimura 1996; Geng et al. 2004; Wang et al. 2013; Olas 2015).

Sulfan je tedy nyní řazen do skupiny signálních molekul společně s NO a CO a působí v těle jako mediátor. Pro pochopení přesné funkce sulfanu v těle bylo stěžejní přenést pozornost především na endogenní produkci sulfanu v těle. Díky tomu byly prokázány celkem tři sulfan produkující enzymy. Mezi ně patří cystathionin- β -syntáza (CBS), cystathionin- γ -lyáza a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (3-MST), která pro produkci sulfanu potřebuje ještě cystein aminotransferázu (CAT), která je někdy uváděna jako čtvrtý sulfan produkující enzym (Hughes et al. 2009; Tanizawa 2011; Wang 2012; Olas 2014; Xu et al. 2014). Bylo zjištěno, že hlavním substrátem pro tvorbu sulfanu enzymatickou cestou, je L-cystein, ačkoliv byl prokázán i fyziologický děj, při kterém vzniká sulfan z D-cysteinu (Shibuya et al. 2013; Kimura 2014). Nicméně sulfan produkující enzymy, a potažmo cystein, nejsou jediným zdrojem sulfanu. Tato plynná molekula vzniká rovněž neenzymatickou cestou. Příkladem může být produkce H_2S mikroorganismy trávicího ústrojí, které metabolizují síru, případně jednoduchá disociace hydrogen sulfidu sodného na sulfan. Dále může být sulfan uvolněn z acidolabilní síry, která slouží jako depozitum této molekuly v těle (Searcy & Lee 1998; Furne et al. 2001; Fiorucci et al. 2006; Shibuya et al. 2013; Olson et al. 2013; Kimura 2014).

Jak bylo výše zmíněno, sulfan se rovněž ve značné míře produkuje v savčím reprodukčním traktu. Zde byl detekován jak v samčí, tak v samičí pohlavní soustavě. Mezi tkáně samce, ve kterých byly detekovány sulfan produkující enzymy, patří tkáň penisu, především kavernózní tělíska, Sertoliho i Leydigovy buňky, prostata, nebo dokonce zárodečné buňky varlete. Přítomnost enzymů byla prokázána také v hladkosvalových buňkách cév penisu a v jeho periferních nervech. Mnohé výzkumy prokázaly, že sulfan má pozitivní účinek na vyvolání erekce u samců a má tudíž velký terapeutický potenciál. Kromě pohlavních orgánů samce se tyto enzymy vyskytují rovněž ve spermích (Oi et al. 2001; Sugiura et al. 2005; Liang et al. 2006; Patel et al. 2009; Srilatha et al. 2009; d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2011; Huang et al. 2012). Sulfan byl detekován i v samičí pohlavní soustavě, a to například ve vaječnicích, oocytech, folikulárních buňkách, děloze, či placentě (Liang et al. 2006; Guzmán et al. 2006; Liang et al. 2007; Patel et al. 2009; Srilatha et al. 2009a,b). Z výsledků těchto výzkumů se předpokládá, že je sulfan důležitou molekulou hrající roli v samčí i samičí reprodukci.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

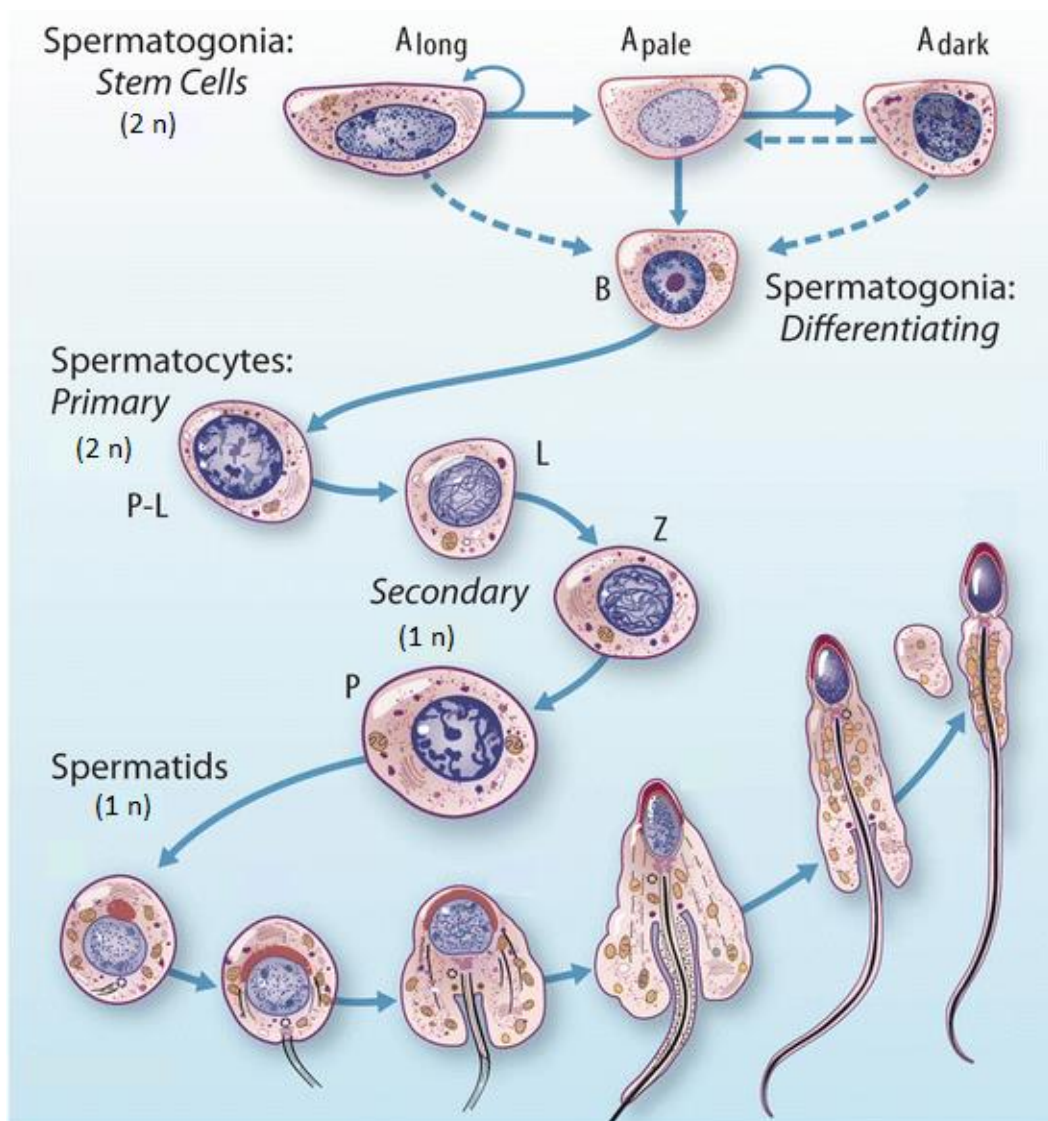
Na základě potvrzení výskytu sulfan produkujících enzymů v ejakulovaných a kapacitovaných spermii v dřívějších experimentech byla stanovena hypotéza, že se tyto enzymy vyskytují také v epididymálních spermii. Další hypotézou experimentální práce bylo, že se exprese sulfan produkujících enzymů bude s délkou epididymální maturace zvyšovat vlivem obohacení spermii epididymální tekutinou.

Cílem práce bylo shrnutí současných poznatků o epididymální maturaci spermii a roli sulfanu, potažmo sulfan produkujících enzymů, v reprodukci. Cílem experimentální části práce bylo ověření hypotézy, že se sulfan produkující enzymy vyskytují v epididymálních spermii a že se jejich exprese během epididymálního zrání zvyšuje.

3 Literární rešerše

3.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze probíhá ve varleti a je lokalizována v semenotvorných kanálcích, kde probíhají dva po sobě následující procesy - spermatocytogeneze a spermatohistogeneze (Obr. č. 1). Během spermatocytogeneze vznikají mitoticky z diploidní spermatogonie dva různé typy spermatogonie A - světlé a tmavé. Oba typy se mnohorát mitoticky dělí jednak kvůli diferenciaci, jednak kvůli sebeobnově. V procesu diferenciaci některé světlé spermatogonie A diferencují ve spermatogonie typu B (Gordon & Lamb 2007), které vstupují do prvního meiotického dělení, čímž vznikají spermatocyty I. řádu. Poté, co primární spermatocyty dokončí první meiotické dělení, vznikají sekundární spermatocyty, které jsou již haploidní. Tyto buňky následně podstupují druhé meiotické dělení, čímž vznikají kulaté haploidní spermatidy (Gordon & Lamb 2007; Nussbaum et al. 2015). Po spermatocytogenezi následuje spermatohistogeneze, která probíhá ve výběžcích Sertoliho buněk transformací postmeiotických oválných spermatid ve spermie. Tato fáze má 4 stádia - Golgiho, akrozomové čapky, stádium kaudální manžety (akrozomové) a stádium zrání. V tuto dobu probíhají na buňce důležité morfologické změny, jako například tvorba akrozomu a bičíku, kondenzace jádra a jeho elongace, eliminace cytoplazmy a také reorganizace organel, která zahrnuje například tvorbu mitochondriální pochvy ve střední části bičíku spermie (Nayernia et al. 1996; Idler & Yan 2012). V této poslední fázi také dochází k fagocytóze reziduí ze spermie Sertoliho buňkami (Sharma & Agarwal 2011). Jak se spermie postupně vyvíjí, posouvá se směrem do lumen semenotvorného kanálku, až je nakonec uvolněna. Spermie jsou dále transportovány do nadvarlete, kde podstupují epididymální maturaci (Nussbaum et al. 2015; Sharma & Agarwal 2011).

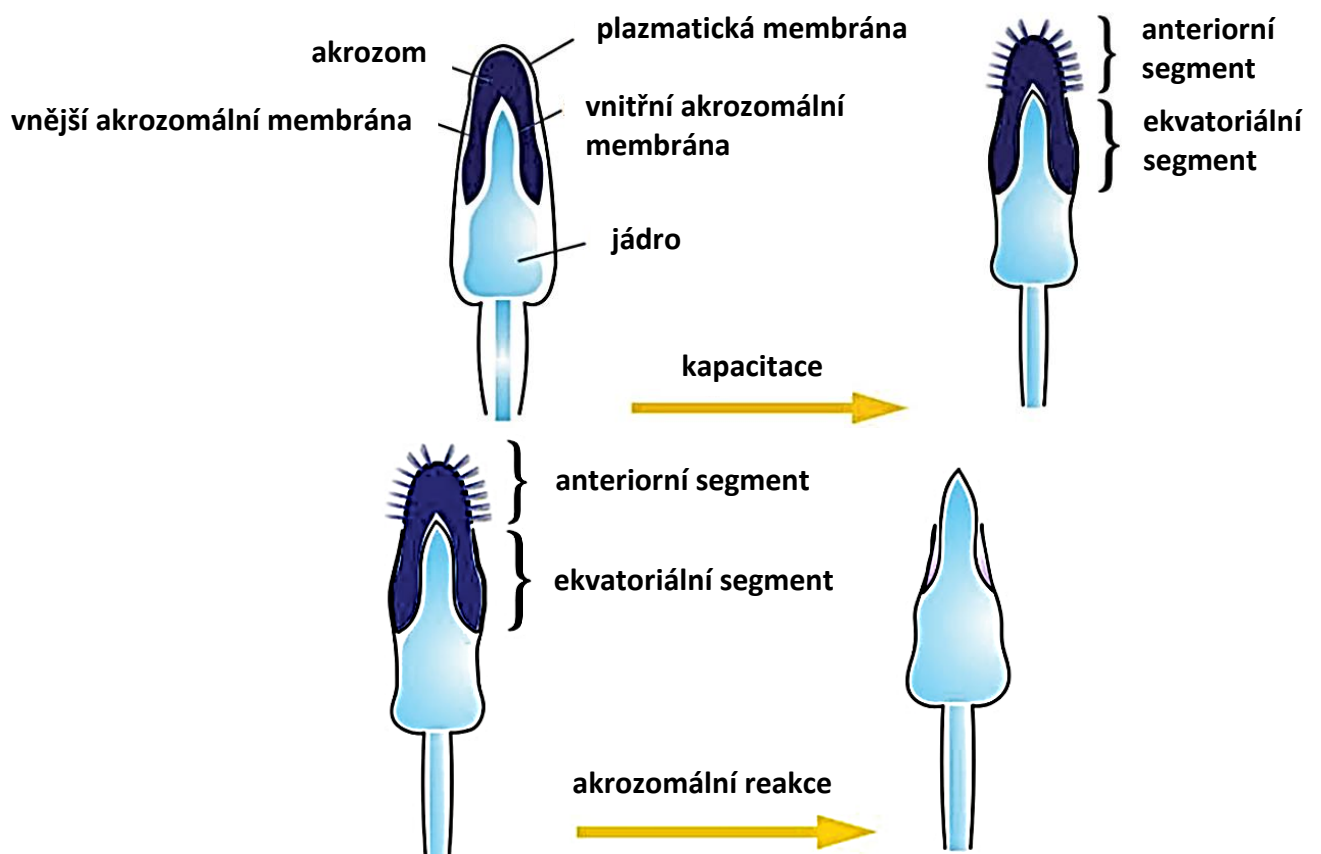


Obr. č. 1: Spermatogeneze. Z diploidní zárodečné buňky vznikají mitózou světlé a tmavé spermatogonie A. Ty se mnohokrát mitoticky dělí a dávají vznik dalším spermatogoniím typu A, přičemž některé světlé spermatogonie A se mohou rozdělit a diferencovat ve spermatogonii typu B. Tyto spermatogonie B vstupují do meiózy, čímž vzniká primární spermatocyt. Po dokončení meiózy vzniká haploidní sekundární spermatocyt, který podstupuje druhou meiózu, jež dává vznik 4 haploidním kulatým spermatidám. Následuje spermiogeneze, během které spermatidy prodělávají morfologické změny. P – pachytene; L – leptotene; Z – zygotene (zdroj: Zini, 2018).

3.1.1 Formování akrozomu

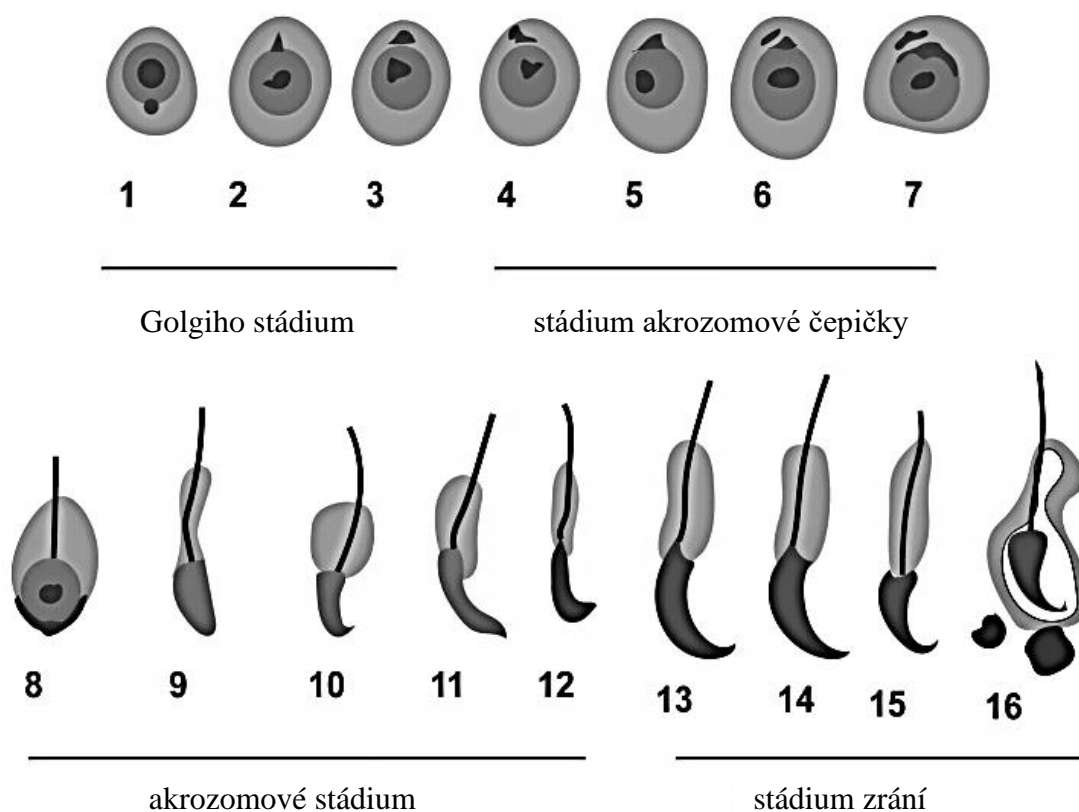
Akrozom je specifická organela, která obaluje jádro spermie. Je nezbytnou částí spermie, protože obsahuje velké množství specifických enzymů, které jsou nutné pro další děje související s reprodukci, především pro akrozomální reakci a s ní související penetraci zony pellucidy a cytoplazmatického obalu oocyty samice (Junqueira et al. 1997). Enzymy, které akrozom obsahuje, jsou například hyaluronidáza, akrozin, proakrozin, kyselá fosfatáza, proteináza a další (Buffone et al. 2008; Suryavathi et al. 2015).

Morfologie akrozomu se liší druh od druhu, ale u všech savců má dvě hlavní části. Tou první je velký anteriorní segment, který se může u různých druhů savců lišit tvarem (pádlovitý, háčkovitý, špachlovitý) nebo i velikostí (Bedford 2014). Druhý segment je menší a tenčí a snazývá se ekvatoriální (nebo také postriorní). Ekvatoriální segment se nachází ve střední části hlavičky spermie. Akrozom obaluje akrozomální membrána, která se dělí na vnitřní akrozomální membránu, jež obepíná jádro spermie, a vnější akrozomální membránu, která je lokalizována pod plazmatickou membránou spermie (Obr. č. 2) (Gerton 2002). Během akrozomální reakce dochází k fúzi vnější akrozomální membrány s plazmatickou membránou spermie (Yanagimachi 2011). Vnitřní a vnější akrozomální membrána tvoří akrozomální váček obsahující enzymy nutné pro průchod spermie glykoproteinovým obalem vajíčka a proteiny důležité pro sekundární vazbu spermie na oocyt. Obsah akrozomálního váčku je různorodý, ale může být rozdělen na rozpustný a specifický materiál. Rozpustná část je tvořena hydrolytickými enzymy, které se účastní akrozomové reakce a hydrolýzy kumulárních buněk oocyty. Specifická část je tvořena akrozomální matrix, která skeletárními proteiny zprostředkovává interakci mezi spermií a oocytem během oplození pomocí skeletárních proteinů (Buffone et al. 2008; Suryavathi et al. 2015).



Obr. č. 2: Struktura hlavičky spermie a akrozomu. Obrázek znázorňuje hlavičku spermie obsahující jádro s haploidním počtem chromozomů a sekreční organelu akrozom. Akrozom má dvě membrány – vnější a vnitřní. Obrázek znázorňuje také anteriorní a ekvatoriální segment akrozomu a změny akrozomu během akrozomální reakce (zdroj: Wassarman et al. 2004; Okabe 2013).

Biogeneze akrozomu může být rozdělena do 4 částí – formování vezikulů, jejich rozposlání na cílové místo, fúzi váčků a vazbu akrozomu k jádru. Tyto procesy jsou součástí spermiogeneze. Předchozí výzkumy u myši popsaly celkem 16 kroků v průběhu spermiogeneze, ve kterých je formování akrozomu klíčovým dějem. Spermiogeneze se tradičně dělí na 4 stádia. Tato stádia se nazývají Golgiho (1.–3. krok), stádium akrozomové čepičky (4.–7. krok), stádium kaudální manžety (nebo také akrozomové stádium, 8.–12. krok) a stádium zrání (13.–16. krok) (Obr. č. 3) (Clermont & Leblond 1955).



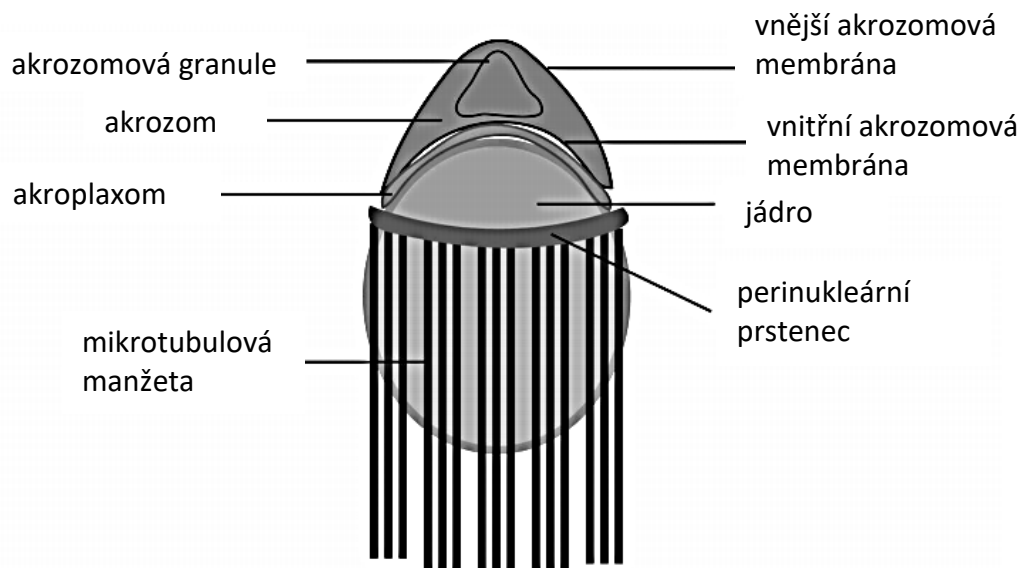
Obr. č. 3: Schéma fází akrozomové biogeneze u myši. Kulaté spermatidy se mění ve zralé spermie ve 4 stádiích a 16 krocích: Golgiho (1.–3. krok), akrozomové čepičky (4.–7. krok), akrozomové (8.–12. krok) a stádium zrání (13.–16. krok) (zdroj: Khawar et al. 2019).

První fáze se jmenuje Golgiho, protože Golgiho aparát (GA) je klíčovou organelou pro ranou spermiogenezi (Leblond & Clermont 1952; Hess 1990; Russell et al. 1993). Během této fáze je GA velmi aktivní a produkuje mnoho glykoproteinů a jeho trans systém dává vznik proakrozomálním váčkům, které jsou nezbytné pro formování zralého akrozomu. Proakrozomální váčky následně fúzí a tvoří v okolí jádra akrozomální granula. Střední část akrozomálního granula je vázána na jadernou membránu, zatímco její periferní část je asociována s perinukleární thékou. Perinukleární théka je u zralé spermie tvořena malým množstvím cytoplazmy a cytoskeletárními elementy a jejím úkolem je zřejmě propojit akrozom a postakrozomální membránu s jádrem spermie (Longo & Cook 1991).

Během stádia akrozomální čepičky zvětšují granula svůj objem, hromadí se v nich glykoproteiny a rozšiřují se po celém povrchu jádra. Tím vytvoří velmi tenkou strukturu podobnou čepičce, která postupně zakrývá jednu třetinu povrchu jádra. Zároveň se GA posouvá

k distální oblasti, kde vzniká krček. V této fázi se vyvíjí akroplaxom, což je struktura, která se nachází mezi akrozomální a jadernou membránou spermie. Součástí akroplaxomu je okrajový prstenec, který je tvořen keratinem a F-aktinem. Během elongace spermatidy dochází ke spojení prstence s rostoucí částí akrozomu a s povrchem jádra. Z toho vyplývá, že akroplaxom neváže pouze akrozom s jádrem, ale také zajišťuje, aby vyvíjející se akrozomální hlavička zůstala ukotvena k jadernému obalu během elongace (Kierszenbaum et al. 2003).

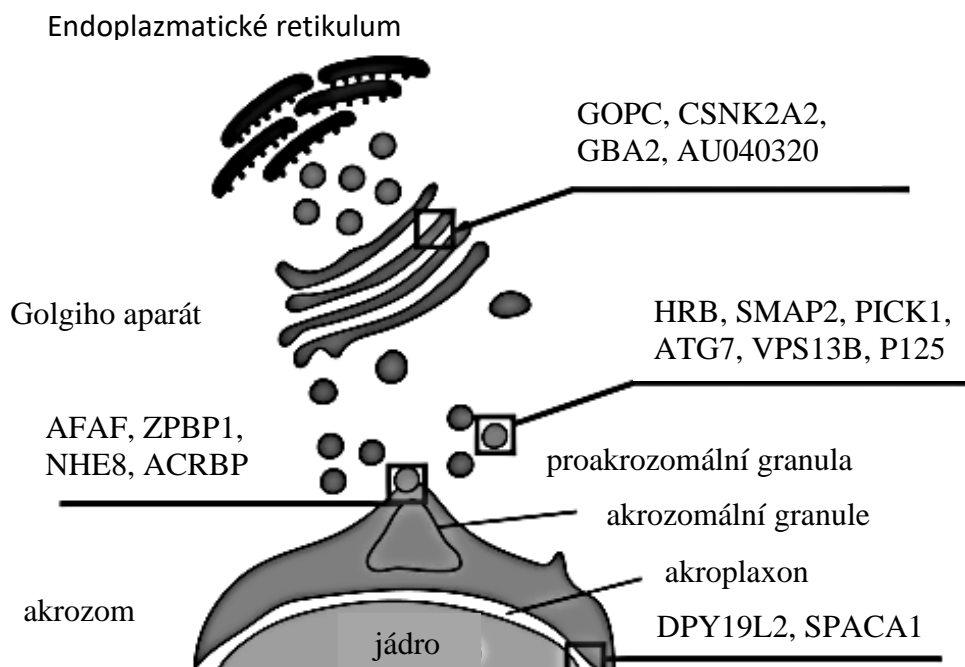
V další fázi se akrozom posouvá k ventrálnímu povrchu jádra spermatidy (Hess & de Franca 2008). V tuto chvíli se akrozom kondenzuje a váže se k vnitřní akrozomální membráně. Zároveň i v jádře dochází k intenzivní kondenzaci, tentokrát chromatinu. Velmi důležitou roli v uspořádání akrozomu hrají mnohé cytoskeletární proteiny – například kalmodulin (Camatini et al. 1992), aktin (Talbot & Kleve 1978) nebo α -spektrin-like antigeny (Virtanen et al. 1984). U elongujících spermatid může být pozorován vznik manžety tvořené mikrotubuly v blízkosti perinukleárního prstence (Obr. č. 4).



Obr. č. 4: Hlavička elongující spermatidy. Vyvíjející se spermatida má prodlužující se jádro obklopené perinukleárním prstencem a manžetou tvořenou mikrotubuly. Akrozom je umístěn nad jádrem a je k němu ukotven pomocí akroplaxomu (zdroj: Khawar et al. 2019).

Poslední fáze zahrnuje několik morfologických změn v jádře a posun samotného akrozomu. Pokračuje kondenzace jádra, dochází k rozprostření akrozomálních granul po celé akrozomální membráně, čímž se akrozom rozděluje na anteriorní a posteriorní segment. Anteriorní segment se stává vrcholem akrozomu, zatímco zbytek akrozomu kryje celý povrch jádra kromě části připojené na bičík spermie (Russell et al. 1993; Khawar et al. 2019). Zároveň dochází k likvidaci nadbytečné cytoplazmy včetně jejích součástí (například lipidů) a mnohých nežádoucích organel, jako jsou například mitochondrie, vezikuly nebo ribozomy. Všechny tyto struktury jsou odstraněny ve formě cytoplazmatických kapiček před samotnou spermiací (Hess et al. 1993; Russell et al. 1993; De Franca et al. 1995). Vzniklá rezidua jsou pohlcena Sertoliho buňkami.

Akrozomální biogeneze se účastní mnoho proteinů asociovaných s endoplazmatickým retikulem (ER) či GA (Obr. č. 5). V buňce je ER hlavním místem syntézy proteinů (Vitale et al. 1993), zatímco GA je zodpovědný za glykosylaci, zpracování a rozřídění nově syntetizovaných proteinů vzniklých v ER. Tvorba některých proteinů specifických pro akrozom- jako je například akrozin - začíná během meiozy ve fázi pachytene a pokračuje, dokud spermatida nevstoupí do elongačního stádia (Anakwe & Gerton 1990; Kashiwabara et al. 1990; Escalier et al. 1991). Tyto proteiny jsou exocytovány a transportovány do své cílové oblasti ve formě proakrozomálních granul, která vznikají v GA. Přítomnost těchto proakrozomálních granul v pachytene byla potvrzena mnoha výzkumy (Nicander & Ploen 1969; Fawcett 1975; Anakwe & Gerton 1990; Suarez-Quian et al. 1991; Ramalho-Santos et al. 2002). V akrozomu byla také detekována přítomnost mnoha proteinů spojených s ER, jako je například O-mannosyltransferáza 1 (Prados et al. 2007) a 2 (Willer et al. 2002) a kalretikulin (Nakamura et al. 1993). Bylo prokázáno, že genová mutace některých proteinů spojených s ER může vést ke globulárním hlavičkám (protein HSP90B1) (Asquith et al. 2005; Yang & Li 2005), nebo abnormálně prodloužených hlavičkám a k absenci akrozomu (protein β -glukosidáza 2) (Yildiz et al. 2006). Také proteiny asociované s GA jsou nadměrně důležité pro správnou funkci akrozomu a mnoho z nich bylo nalezeno v akrozomálních membránách. Bylo například popsáno, že β -COP a klathrin se účastní antero i retrográdního transportu váčků během formace akrozomu (Martínez-Menárguez et al. 1996; Moreno et al. 2000; Ramalho-Santos et al. 2001). Role GA v lokalizaci váčků zahrnuje formaci těchto vezikulů, jejich rozposlání na určené místo a fúzi.



Obr. č. 5: Znázornění různých proteinů zahrnutých do akrozomové biogeneze. Mnoho proteinů hraje důležitou roli v celém procesu biogeneze, ta může být rozdělena do těchto 4 procesů: vezikulární formace, vezikulární rozčleňování, vezikulární fúze a akrozomová vazba na jádro. Čtverečky znázorňují hlavní úkol proteinů (zdroj: Khawar et al. 2019).

Dříve byl akrozom popisován jako přímý derivát GA (Friend & Fawcett 1974; Tang et al. 1982; Aguas & Pinto da Silva 1985; Anakwe & Gerton 1990; Moreno & Schatten 2000). Tato myšlenka je podpořena výzkumy, které potvrdily, že některé akrozomální proteiny byly nalezeny v GA spermatocytech, které ještě akrozom nemají. Bylo prokázáno, že se tyto proteiny později transportují do akrozomu (Anakwe & Gerton 1990; Escalier et al. 1991). Nicméně existují i data, která jsou v rozporu s tím, že je akrozom přímo odvozen z GA. Například fakt, že GA se během stádia akrozomální čapky oddělí od akrozomu a pohybuje se v opačném směru (Cherry & Hsu 1984; Moreno & Schatten 2000). Dále byla tato myšlenka vyvracována níže uvedenými experimenty.

V akrozomu byly nalezeny malé GTP-ázy (Ramalho-Santos et al. 2001), které vedly vědce k názoru, že tato jedinečná organela by mohla být vzhledem k obsahu serinových proteináz považována také za sekreční granuli nebo sekreční lysozom (Moreno 2003). Následně bylo zavrženo, že by akrozom měl lysozomální původ, protože ve svých membránách neobsahuje 2 hlavní markery lysozomů - lysozomální membránový glykoprotein 120 (Igp) a myši Lamp-1 a Lamp-2. Navíc akrozomální i proakrozomální váčky neobsahují ani další 2 důležité endosomální markery - kation dependentní a independentní manóza-6-fosfátový receptor (Martínez-Menárguez et al. 2017).

Byl také předložen návrh, že vzhledem ke kyselému pH akrozomu, proteázové aktivitě (především akrozinu) a přítomnosti hyaluronidázy a dalších enzymů, by tato organela mohla být brána jako specializovaný lysozom (Hartree & Srivastava 1965; Allison & Hartree 1970). Z tohoto hlediska se zkoumal především akrozin a jeho funkce při oplození. Nicméně tvrzení, že akrozom je speciálně modifikovaný lysozom bylo zavrženo v momentě, kdy bylo prokázáno, že akrozin není pro oplodnění nezbytný (Baba et al. 1994) a akrozom má tudíž i jinou funkci než pouze enzymatickou lýzu. Novější studie předpokládají, že akrozom je organela lysozomu příbuzná (Berruti et al. 2010; Berruti & Paiardi 2011; Berruti & Paiardi 2015).

Nicméně i přes výzkumy, které jsou v rozporu s původní myšlenkou, se většinou akrozom považuje za derivát GA.

3.2 Epididymální maturace

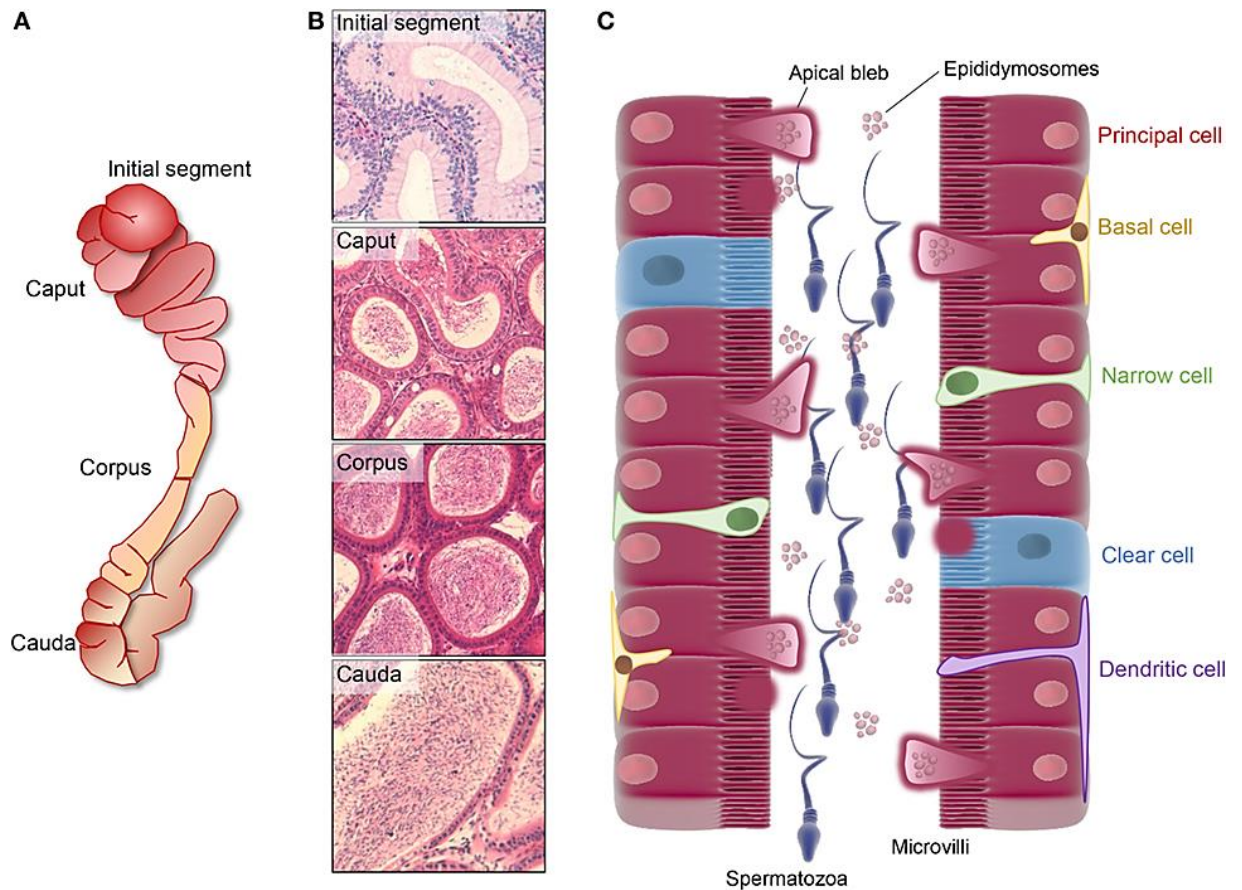
Poté, co spermie opustí prostředí varlečních kanálků, není ještě schopna progresivního pohybu ani oplození vajíčka. Aby spermie získala tyto schopnosti, musí nejprve podstoupit epididymální maturaci a kapacitaci. Epididymální maturace je děj, který se odehrává v nadvarlečních kanálkách. Spermie zde podstupují mnohé biochemické a morfologické změny (Shevchenko et al. 2006; Bindea et al. 2009). Nadvarleční kanálky poté vedou do chámovodu, prostřednictvím kterého je sperma během ejakulace transportováno do močové trubice a následně skrz penis mimo tělo.

3.2.1 Epididymální tekutina

Epididymální maturace probíhá po celou dobu, co se spermie v nadvarletí nachází. Nadvarle má 3 části: hlavu, tělo a ocas. Není však jasné, jestli je některá z těchto částí klíčovou pro většinu modifikací, které zde spermie podstupují. Nicméně je prokázáno, že spermie v ocasu nadvarlete jsou již pohyblivé a oplození schopné. Při průchodu epididymem spermie interagují se sekrety epididymálního lumen, které aktivně produkují epiteliální buňky

v kanálcích (Obr. č. 6). Dochází k absorpci malých molekul (například cukrů, elektrolytů) a makromolekul (proteinů, glykoproteinů). V každé části epididymu jsou exprimovány jiné geny, a proto se epididymální tekutina v těchto částech mírně liší. Obecně se ale dá říci, že epididymální tekutina obsahuje ionty (například Na^+ , K^+ , Cl^- , $(\text{CO}_3)^{2-}$) (Levine & Marsh 1971; Morton et al. 1978; Jones & Clulow 1987; Jenkins et al. 1980), enzymy (glykosidázy, glykosyltransferázy, glutathionin peroxidázy, atd.) rozličné proteiny a glykoproteiny (transferin, albumin, clusterin, metalloproteiny, atd.), ale také sloučeniny jako L-karnitin, taurin, glutamát nebo laktát (Girouard et al. 2011; Sullivan 2015). Tento epididymální sekret poskytuje speciální prostředí, ve kterém funkční spermie prodělávají mnoho změn (Nesvizhskii et al. 2003; Shevchenko et al. 2006; Reimand et al. 2007). Fyziologický význam změn v iontovém prostředí (nižší pH, odlišné koncentrace iontů) spočívá hlavně v udržení spermií v anabióze během epididymální maturace (Shum et al. 2011; Breton et al. 2016). Co se týče proteinů epididymu, u myši bylo identifikováno 1536 proteinů v hlavě 1720 v těle a 1234 v ocasu nadvarlete. V celém epididymu bylo prokázáno na 2221 odlišných proteinů, ale pouze 765 proteinů bylo společných pro všechny segmenty epididymu. Z toho plyne, že značné množství proteinů bylo buď přidáno, nebo odstraněno během epididymálního transportu (Skerget et al. 2015). Zároveň proběhly i experimenty zaměřené na proteinový profil spermií v různých částech nadvarlete, a také zde bylo potvrzeno, že proteinový profil spermií se v různých segmentech epididymu velmi liší (Baker et al. 2005; Kameshwari et al. 2010; Ijiri et al. 2011).

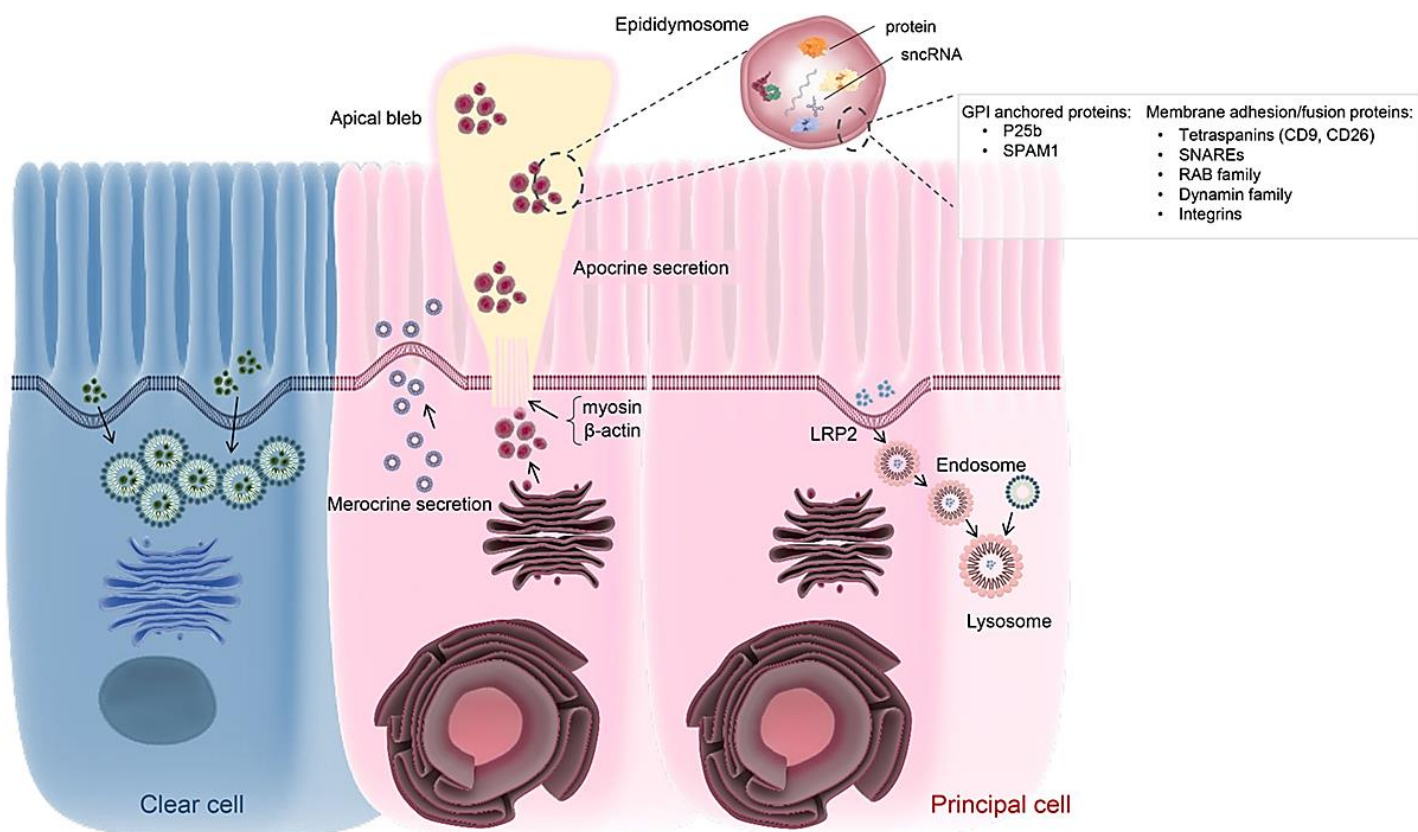
I přes to, že je prokázáno, že v průběhu maturace spermie vlivem tohoto prostředí získává motilitu i oplození schopnost, není zcela jasné, jak proces začlenění proteinů do spermie funguje (Aitken et al. 2007). Existují 3 hypotézy, které danou problematiku vysvětlují. První z nich předpokládá, že spermie absorbuje proteiny rozpustné v sekretu tvořeného epitelem epididymu (Cuasnicu et al. 2002). Druhý mechanismus, který by danou problematiku vysvětloval, je epididymální transport pomocí membránových váčků zvaných epididymosomy (Sullivan et al. 2007). Třetí teorie předpokládá, že transfer proteinů může být způsoben velmi těsným kontaktem mezi spermií a apikálním koncem epididymálního epitelu (Paunescu et al. 2014). Ačkoliv přesný mechanismus nebyl popsán, předpokládá se, že molekuly mohou být z epididymu přímo transportovány do spermií.



Obr. č. 6: Epididymus. Znázornění rozdělení epididymu na iniciální segment, hlavu, tělo a ocas a jejich histologické řezy. Vpravo schéma průchodu spermií lumen epididymu a jejich kontakt s epididymosomy vylučovanými hlavními buňkami epitelu epididymu. Na obrázku jsou patrné apikální výčnělky uvolňované z hlavních buněk obsahující epididymosomy (zdroj: Zhou et al. 2018).

3.2.2 Epididymosomy

Největší pozornost z výše uvedených teorií byla doposud věnována epididymosomům, jež jsou secernovány epididymálním epitelem (Sullivan et al. 2005). Epididymální epitel se skládá z různých typů buněk, přičemž každý tento typ má svou specifickou strukturu a funkci, která se liší na základě toho, v jaké části epididymu se nachází (Herms & Robaire 2002; Breton et al. 2016). Komunikace mezi těmito odlišnými typy buněk vytváří vhodné lumenální mikroprostředí pro maturaci spermií a jejich skladování v nadvarletí (Shum et al. 2011). Hlavní buňky produkují do lumen proteiny merokrinní a apokrinní sekrecí (Herms & Robaire 2002). Merokrinní sekrece zahrnuje fúzi mezi váčky vzniklé z GA a buněčnou PM, což umožní uvolnění obsahu váček do extracelulárního prostředí (Farkaš 2015). Naopak apokrinní sekrece zahrnuje uvolnění apikálních výčnělků buňky do lumen kanálku. Tyto výčnělky obsahují cytoplazmu a sekreční materiál, který může být zabalen do váček, nebo může být rozptýlen v cytoplazmě (Farkaš 2015). Předpokládá se, že epididymosomy vznikají právě apokrinní sekrecí hlavních buněk epitelu epididymu (Obr. č. 7) (Sullivan et al. 2007).



Obr. č. 7: Schéma tvorby a uvolnění epididymosomů v hlavních buňkách epididymálního epitelu (zdroj: Zhou et al. 2018).

Epididymosomy jsou malé váčky s membránou (25-300 nm v průměru), které obsahují různé proteiny, lipidy a nekódující RNA (Belleannée et al. 2013; Sullivan & Saez 2013; Martin-DeLeon 2015). Tyto komponenty mohou být transportovány do spermií v různých částech epididymu (Sullivan & Saez 2013; Belleannée 2015; Sharma et al. 2016). Bylo dokázáno, že epididymosomy získané z epididymálního lumen obsahovaly mnoho proteinů, které byly identifikovány rovněž jako komponenty spermie. Epididymosomy získané z různých částí epididymu jsou vysoce heterogenní ve velikosti i obsahu (Rejraji et al. 2006), což by mohlo vysvětlovat rozdílný proteinový transfer do spermií v průběhu maturace. Proteiny transportované epididymosomy do spermií mohou být zabudovány buď do PM spermie (Kirchhoff & Hale 1996), nebo do intracelulárních struktur (Eickhoff et al. 2001; Frenette et al. 2005). Nicméně přesný mechanismus transportu proteinů z epididymosomů do spermií není znám (Sullivan & Saez 2013). Bylo prokázáno, že existuje mnoho proteinů s různou funkcí, které byly do spermie transportovány pomocí epididymosomů. Některé z těchto proteinů jsou zahrnuty v různých fázích vývoje spermie a jiné v dějích, jako je například rozvoj motility spermie (Eickhoff et al. 2001; Frenette et al. 2003; Eickhoff 2004; Frenette et al. 2004; Murta et al. 2016), kapacitace spermie (Krapf et al. 2012), akrozomální reakce (Joshi et al. 2013), interakce spermie se zonou pellucidou (Frenette & Sullivan 2001) a samotné oplození (Oh et al. 2005; Gibbs et al. 2010; Caballero et al. 2012). Další proteiny, jako například ubiquitin (Sutovsky et al. 2001) nebo epididymální sperm binding protein (ELSPBP1) (D'Amours et al. 2012), jsou zodpovědné za označení patologických spermií. U těchto proteinů se předpokládá, že jsou transportovány do abnormálních nebo mrtvých spermií během pobytu spermie

v nadvarletí. Nedávno bylo také prokázáno, že epididymosomy mohou být součástí mechanismu odstraňujícího proteiny. Exprese proteinu dikarboxyl L-xylulózové reductázy je vyšší v epididymosomech ocasu nadvarlete než v hlavně nadvarlete, takže je možné, že je tento protein během maturace ze spermií epididymosomy odstraněn (Akintayo et al. 2015). Kromě proteinů dodávají epididymosomy do savčích spermií také fragmenty tRNA (Sharma et al. 2016), které ovlivňují metabolismus potomků a jsou pravděpodobně zahrnuty v epigenetické dědivosti po otci (Chen et al. 2016; Sharma et al. 2016). Zajímavé je, že vyšší hodnoty tRNA mají spermiie v ocasu nadvarlete než nezralé spermiie v hlavě epididymu (Sharma et al. 2016).

3.2.3 Biochemické změny ve spermiích v průběhu epididymální maturace

Během epididymálního transportu dochází ve spermiích ke změnám ve složení jejich proteinů, lipidů i sacharidů. Vzhledem k translační inaktivitě spermií jsou změny ve složení jejich proteinů dány maturací. Proteiny jsou zřejmě syntetizovány epididymálním epitelem a následně začleněny do spermií. B průběhu maturace dochází především ke změnám v proteinech a glykoproteinech na plazmatické membráně (PM), v jádře, v akrozomu a v bičíku spermiie (Cao et al. 2006; Stein et al. 2006).

PM je nezbytně důležitá komponenta spermiie, protože zprostředkovává mnoho dějů, vedoucích k oplození. Komponenty PM, které jsou exprimovány v diploidních buňkách, jsou během vývoje spermiie ve varletí a poté během maturace v epididymu neustále modifikovány. Mnoho povrchových molekul PM je syntetizováno ve formě vysoko molekulárního prekurzoru, který následně podstupuje proteolytické změny ve varletí i v epididymu (Sullivan et al. 2007). K mnohým změnám v epididymu dochází především na glykanovém řetězci glykoproteinů PM, a to vlivem interakce těchto glykoproteinů s molekulami luminální tekutiny epididymu. Změny na antigenech spermiie mohou být způsobeny adsorpcí či asociací makromolekul z luminální tekutiny k PM spermiie, nebo vystavením dříve maskovaných glykanových řetězců již existujících glykoproteinů, či modifikací glykoproteinů PM pomocí různých enzymů – glykohydroláz, glykosyltransferáz, nebo proteináz (Skerget et al. 2015). Příkladem takovéto molekuly může být glykokonjugát o velikosti 135–150 kDa, který se ztratí z hlavičky spermiie, když gameta doputuje do ocasu nadvarlete (Jelinsky et al. 2007; Reimand et al. 2011). Ztráta tohoto antigenu může být způsobena modifikací glykanového řetězce (Gal- β -1,3-GalNAc-vázaný) nalezeného u O-vázaného glykoproteinu odstraněním terminálního galaktosylového zbytku pomocí β -D-galaktosidáz nalezených v luminální tekutině (de Mateo et al. 2001; Lundgren et al. 2014), popřípadě zamaskováním tohoto zbytku pomocí luminálních glykosyltransferáz (Magin et al. 2007). Byly ale popsány proteiny, které byly během epididymální maturace na spermiích přidány. Jde například o CRISP 1, ADAM7, GPX5, nebo SPAM1 (Rejraji et al. 2002; Zhang et al. 2004; Roberts et al. 2008; Oh et al. 2009).

Nemusí se však jednat jen o proteiny, ale i o sacharidy nebo lipidy PM. Mezi další změny během maturace spermiie patří změny v lektin vázajících schopnostech. Lektiny jsou vysoce specifické makromolekuly, které se vážou na specifické sacharidové řetězce. Experimenty prokázaly, že epididymální maturace je spojená se zvýšením nebo snížením přístupnosti specifických lektinů ke glykokalyxu spermiie (Nicolson et al. 1977; Magargee et al. 1988; Srivastava & Olson 1991). Epididymální tekutina obsahuje vysoké koncentrace rozpustných

glykohydroláz a glykosyltransferáz, které by se mohly podílet na změně povrchových glykokonjugátů spermií (Tulsiani 2006).

Kromě glykoproteinových změn dochází na PM spermie v epididymu také k extenzivnímu přestavění a redistribuci antigenů. Ku příkladu u morčete je během spermatogeneze syntetizován fertilin jako heterodimer obsahující α a β podjednotky. Podjednotka α je zpracována v průběhu spermatogeneze, zatímco zpracování β podjednotky je pozdrženo, dokud se spermie nedostane do distální části hlavy nadvarlete (Zimmerman & Sutovsky 2009). Výsledkem je snížení velikosti tohoto proteinového dimeru z 90 kDa na 80 kDa. Podobně je tomu i u povrchového proteinu zonadhezinu u kančích spermií. Zonadhezin je molekula homologní jak k von Willebrandovu faktoru, tak k mucinům, a je poprvé exprimována v zárodečných buňkách ve varleti. Následně je zonadhezin proteolyticky upraven na heterodimer, který obsahuje 105 kDa podjednotku a 45 kDa podjednotku (Zimmerman et al. 2011).

Změny během epididymální maturace nejsou však omezeny pouze na povrchové molekuly spermie. Dochází také k mnohým změnám uvnitř akrozomu. Jeho jednotlivé komponenty jsou upravovány během spermatogeneze i epididymální maturace. Upravovány jsou například β -D-galaktosidáza (Hirano et al. 2005), α -L-fukosidáza (Tanaka 2009), akrozin (Rechsteiner & Hill 2005), SP-10 (Ustrell 2002) a akrogranin (Khor et al. 2006). Některé komponenty je možné nalézt jak uvnitř akrozomu, tak na povrchu spermie. Je to například proakrozin nebo trypsin-like serinová proteáza. Proakrozin (který je enzymaticky inaktivní), byl lokalizován na vnitřní i vnější akrozomální membráně stejně jako v akrozomální matrix (Murata et al. 2009). Tento vysoce molekulární prekurzor podléhá proteolytickým změnám u spermií mnoha druhů, které vedou ke snížení velikosti této molekuly (Whitby et al. 2000; Rechsteiner & Hill 2005; Dorus et al. 2012). Například u morčete je snížení velikosti proakrozinu přisuzováno změnám na jeho glykanových řetězcích (Khor et al. 2006).

Pomocí genové ontologie bylo také zjištěno, že během maturace dochází ke změnám i na některých proteinech, které jsou spojené s imunitní odpovědí. Proteiny spojené s imunitním procesem byly identifikovány například v ocasu nadvarlete a patří mezi ně CD46, CD55 a CD59b (Skerget et al. 2015). Tyto proteiny by mohly hrát roli v modifikaci imunitní odpovědi v samičím reprodukčním traktu. Dále byl u dozrálých spermií popsán například 26S proteazom, imunoproteazom a proteazomový aktivátor (Skerget et al. 2015). Bylo prokázáno, že epididymální maturace je spojena také s post-translačními modifikacemi proteinů, jako je fosforylace nebo oxidace thiolových skupin. Byl vysloven předpoklad, že oxidace thiolových skupin proteinů výrazně stabilizuje spermii, konkrétně jádro a bičík, pomocí tvorby disulfidických můstků. Následně byla potvrzena přítomnost immobilinu v krysích spermiích, který především v hlavě nadvarlete zabraňuje pohybu spermií a zpevňuje jejich bičík (Calvin & Bedford 1971; Bedford & Calvin 1974). U krysy a koně byly prokázány i další, které během maturace zvyšovaly tvorbu disulfidických můstků v bičíku spermie (Dias et al. 2014; Ijiri et al. 2014).

Kromě změn v rozmístění intramembránových proteinů a glykoproteinů pocházejících z varlat na PM a jejich následné transformaci či nahrazení jiným proteinem dochází na spermiích během epididymální maturace k dalším změnám. Vlivem změn na membránových proteinech spermie se také vytváří receptory pro interakci spermie s vajíčkem. Další důležitou součástí je získání schopnosti motility. Mění se také fyzikální a chemické vlastnosti membránových lipidů

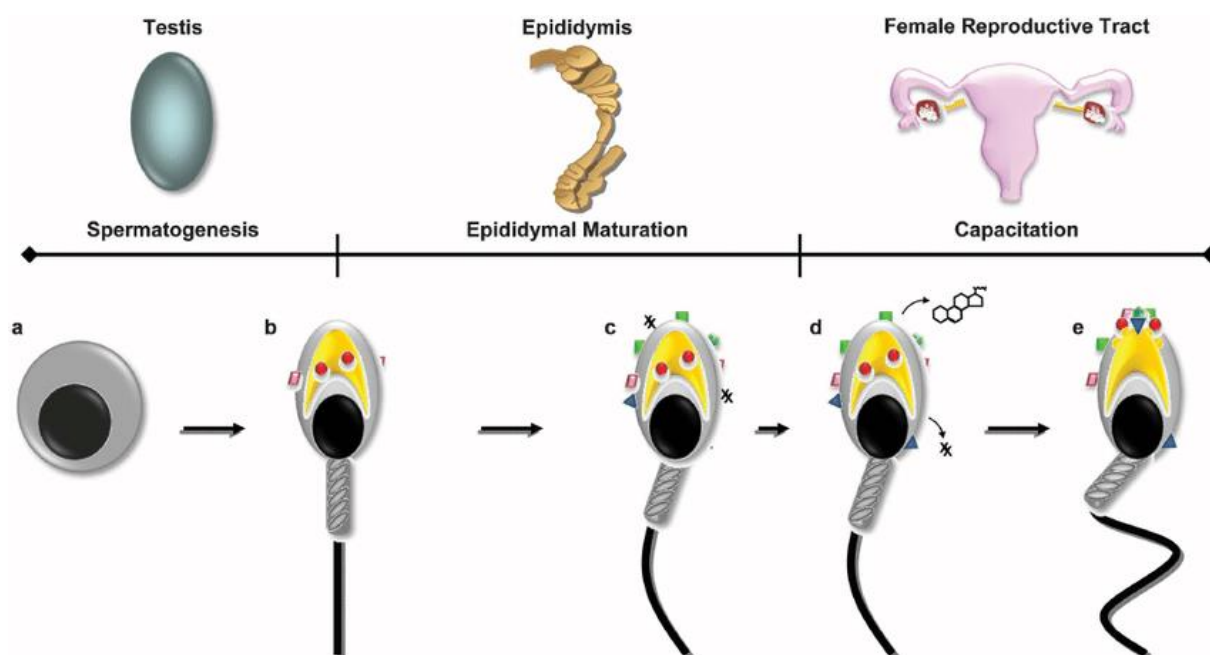
spermie a roste záporný náboj na povrchu spermie (Bedford 1965; Yanagimachi et al. 1972). To je zřejmě způsobeno změnami na sacharidových řetězcích, konkrétně zabudováním negativní kyseliny sialové do řetězců (Holt 1980; Calvo et al. 2000). Bylo potvrzeno, že v ocasu nadvarlete jsou mnohem vyšší koncentrace této sloučeniny než v hlavě nadvarlete (Yanagimachi et al. 1972; Singh et al. 2009b). Během maturace také dochází ke změnám lipidů v PM spermie. V epididymu dochází k poměrně rychlé syntéze cholesterolu, který je poté zabudován do PM spermií, čímž membránu stabilizuje. U většiny druhů však v průběhu transportu epididymem dochází ke snížení cholesterolu v PM spermie, což vede ke snížení poměru cholesterol:fosfolipid (Cross 1998; Jones 2002; Saez et al. 2010). Ztráta cholesterolu se projevuje zvýšenou fluiditou PM a zvýšenou motilitou spermie (Christova et al. 2002; Jones 2002; Christova et al. 2004). K dalšímu snížení cholesterolu dochází v samičím pohlavním traktu během kapacitace, kde jako akceptor cholesterolu figuruje albumin (Haidl & Opper 1997). Další experimenty prokázaly zvýšení poměru polynenasycených mastných kyselin ku nasyceným (Nikolopoulou et al. 1985; Parks & Hammerstedt 1985; Hall et al. 1991; Awano et al. 1993; Haidl & Opper 1997; Rejraji et al. 2006; Pyttel et al. 2014). Společně s cholesterolem a fosfolipidy ovlivňují tyto nenasycené mastné kyseliny fluiditu membrány a činí gamety více náchylné vůči oxidativnímu stresu (Wathes et al. 2007). Experiment s myšimi modely prokázal, že pokud mají spermie málo polynenasycených mastných kyselin ve své PM, dochází nejen k lámání krčků spermií, ale také je snížena schopnost oplodnit oocyt, čímž se samec stává sterilním (Björkgren et al. 2014).

Zatímco spermie z ocasu nadvarlete vykazují progresivní motilitu, spermie z varlat nebo z hlavy nadvarlete nikoliv. V hlavě nadvarlete bylo pozorováno pouze neefektivní kmitání bičíku. Nicméně na experimentech s nevyzrálými spermii bez membrány bylo prokázáno, že tyto spermie již mají funkční flagelární mechanismus. Tyto spermie se za působení detergentu Tritonu X-100 a reaktivace pomocí ATB a cAMP staly motilními, ačkoliv pohyb bičíku spermie byl odlišný od normálních spermií, které získaly motilitu až v ocasu nadvarlete (Yeung 1984; Vadnais et al. 2013). V epididymální tekutině býka byl navíc v ocasním regionu identifikován forward motility protein, který vyvolává zvýšení cAMP, čímž indukuje motilitu a tím i progresivní pohyb spermie vpřed (Acott & Hoskins 1981). I přesto není úplně jasné, k jakým biochemickým změnám zodpovědných za progresivní motilitu v průběhu transportu epididymem dochází.

3.2.4 Morfologické změny a význam cytoplazmatické kapky spermie

Mezi jednu z nejpatrnějších morfologických změn, které spermie během epididymální maturace prodělává, je posun cytoplazmatické kapky z krčku spermie distálním směrem (Cooper 2010). Cytoplazmatická kapka je tvořena cytoplazmou zárodečné buňky, jež zůstala ve spermii přítomna ještě ze spermiogeneze. Dnešní výzkumy prokázaly, že spermie a konkrétně její cytoplazmatická kapka interaguje v epididymu s obklopujícím epitelem a jeho váčkům podobným strukturám, které by mohly korespondovat s epididymosomy (Paunescu et al. 2014). U některých zvířat může spermie ztratit svou cytoplazmatickou kapku před ejakulací. Není však známo, jestli má zachování cytoplazmatické kapky u vyzrálé spermie nějakou funkční roli (Cooper 2010). U býka a kance je retence cytoplazmatické kapky spojována se sníženou fertilitou (Sutovsky et al. 2012). V nedávné studii však bylo prokázáno, že spermie,

keré si zachovaly cytoplazmatickou kapku až do ocasu nadvarlete, měly vyšší motilitu než spermie bez této organely (Yuan et al. 2013). Proteomické analýzy prokázaly u cytoplazmatické kapky myších spermií mnoho enzymů spojených s energetickým metabolismem (Yuan et al. 2013; Au et al. 2015). V cytoplazmatické kapce byl nalezen také protein TEX101, který je nezbytný pro úpravu metaloproteinu ADAM3, jenž je nutný pro transport spermie skrz děložní ústí vejcovodu a pro oplození samotné (Yamaguchi et al. 2009). Myši modely s knockoutovaným genem pro TEX101 byly infertilní, protože neměly ve své PM spermií právě ADAM3 a nebyly schopné projít děložním ústím vejcovodu (Fujihara et al. 2013). Zda má ale TEX101 vliv na maturaci spermie, není zatím známo. Dále bylo prokázáno, že cytoplazmatická kapka reguluje homeostázu spermie. Obsahuje totiž K^+ a Cl^- kanály (Cooper 2010), které mají zřejmě vliv na regulaci objemu spermie během transportu různých částí epididymu s jinou osmolaritou než má spermie. Vzhledem k tomu, že se v cytoplazmatické kapce nachází vysoká koncentrace Ca^{2+} (Ecroyd et al. 2004), je diskutováno, zda právě vysoká koncentrace Ca^{2+} v cytoplazmatické kapce nebrání tyrosinové fosforylaci v hlavě nadvarlete nezralých spermií. Tato hypotéza je v souladu se zjištěním, že Ca^{2+} mají dvoufázovou roli v kontrole fosforylace ve spermií (Navarrete et al. 2015). Cytoplazmatická kapka byla zkoumána i z hlediska měření kanálů na spermií pomocí elektrofyziologických metod. Bylo zjištěno, že cytoplazmatická kapka může na kanálky spermií působit jako „záplata“ a to od hlavy nadvarlete zřejmě až k ocasu nadvarlete (Kirichok et al. 2006; Lishko et al. 2010; Strünker et al. 2011; Figueiras-Fierro et al. 2013; Lishko et al. 2013). Výše uvedené změny na PM spermie a uvnitř akrozomu během epididymální maturace jsou nezbytné proto, aby spermie mohly podstoupit nadcházející kapacitaci v samičím reprodukčním traktu, interagovat se zonou pellucidou a oplodnit vajíčko (Obr. č. 8).



Obr. č. 8: Schéma znázorňující změny na povrchu PM spermie v průběhu spermatogeneze, epididymální maturace a kapacity. a – kulovitá spermatogonie; b – morfologicky vyzrálá spermie, na jejíž PM jsou zabudované proteiny, které jsou zřejmě zahrnuty v interakci spermie se zonou pellucidou; c – epididymální maturace, při které dochází k zabudování dalších proteinů na PM nutných k fertilizaci; d – kapacitace a cholesterolový eflux; e – kapacitace a remodelace PM, která je nutná kvůli interakci se zonou pellucidou (zdroj: Reid et al. 2010).

3.3 Kapacitace a akrozomální reakce

Přestože jsou spermie po epididymální maturaci potenciálně schopné oplodnit oocyt, je tato schopnost pozastavena až do doby, kdy se spermie uvolní z oviduktálního rezervoáru. Než spermie získají schopnost oplodnit vajíčko, musí strávit určitou dobu v samičím pohlavním traktu a podstoupit kapacitaci (Austin 1951; Chang 1951). Během tohoto procesu prodělávají spermie mnoho biochemických a fyziologických změn. Mění se povrchové vlastnosti PM, dochází k desorpci periferních proteinů PM nebo k redistribuci integrálních proteinů, mění se složení lipidů a transmembránových fosfolipidů v PM, dochází ke ztrátě cholesterolu a reorganizaci domén (Visconti et al. 2011). Také se zrychluje metabolismus, zvyšuje se pH spermie (Zeng et al. 1996; Chávez et al. 2020; Matamoros-Volante & Treviño 2020) a intracelulární aktivita vápenatých (Singh et al. 1978; Ruknudin & Silver 1990) a dalších iontů – například Zn^{2+} (Kerns et al. 2018). Výsledkem je silná hyperpolarizace membránového potenciálu spermie a získání negativního náboje (Zeng et al. 1995; Demarco et al. 2003; Baro Graf et al. 2019). Vlivem zvýšené aktivity adenylyl cyklázy ADCY 10 a cAMP (Buck et al. 1999) skrze regulaci protein kináz a fosfatáz dojde k proteinové fosforylaci (Visconti et al. 1995a; Visconti et al. 1995b; Florman & Fissore 2015). Všechny tyto děje jsou na sobě nezávislé a dějí se jak na hlavičce, tak na bičíku spermie (Yanagimachi 1994; Tulsiani et al. 1997). Kapacitované spermie se vyznačují hyperaktivací bičíku, dále dochází ve spermiích k aktivaci signálních drah vedoucích k odpovědi na chemoatraktanty obsažené v oviduktální

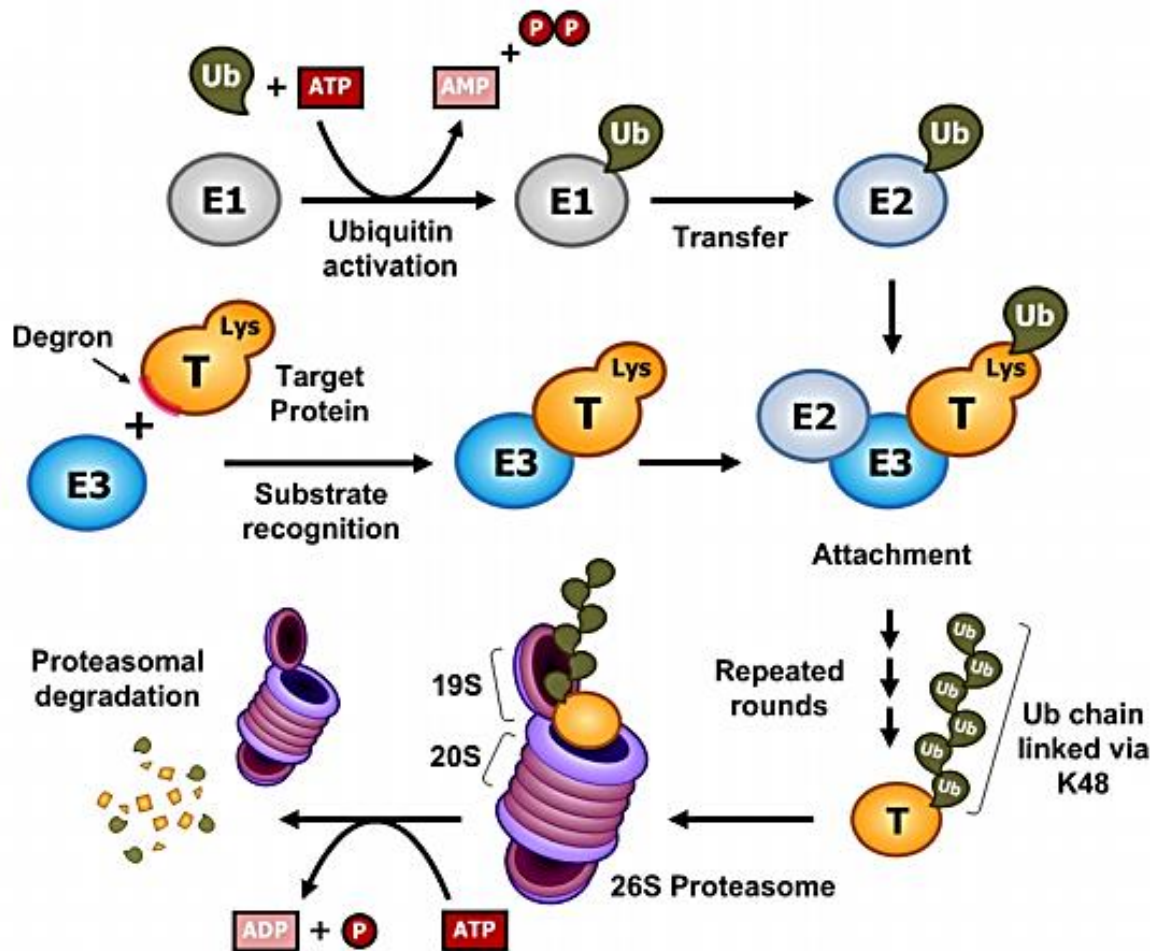
tekutině. Spermie tím získává schopnost podstoupit akrozomální reakci a interagovat s vajíčkem (Zigo et al. 2020).

Aby byly spermie schopné úspěšně oplodnit vajíčko, je nutné, aby nejprve podstoupily akrozomální reakci, která probíhá po prvotní interakci spermie se zonou pellucidou (primární vazba) (Yanagimachi 1994; Hart 1990; Hirohashi & Vacquier 2003). Během akrozomální reakce dochází k mnohonásobné fúzi PM spermie a vnější akrozomální membrány (Vigil, 1989; Tsai, 2010), která vede ke vzniku vezikulů obsahujících materiál jak PM, tak vnější akrozomální membrány. Po této reakci dojde k vystavení vnitřní akrozomální membrány a odkrytí struktur, které jsou schopny vázat se na oolemu (sekundární vazba) a umožnit tak fúzi gamet (Yanagimachi 1994; Kim & Gerton 2003; Vjugina 2008;). Ke splynutí membrán dochází díky mechanismu SNARE proteinů, který umožní přiblížení a spojení PM spermie a vnější akrozomální membrány (Mayorga, 2007). Tento mechanismus je závislý a Ca^{2+} iontech (Darszon, 2011; Beltrán, 2016) a vede mimo jiné k exocytóze obsahu akrozomu, ve kterém jsou přítomny například enzymy modifikující membránové komponenty a extracelulární matrix, nebo hydrolytické enzymy (Yanagimachi, 1994). Během exocytózy dochází k přemístění specifických proteinů spermie nutných pro fúzi gamet (Buffone, 2014; Okabe, 2016). Předpokladem pro spuštění akrozomové reakce je kromě zvýšení koncentrace Ca^{2+} také zvýšení pH uvnitř spermie a produkce fúzogenních látek.

3.4 Vliv ubiquitin-proteazomového systému ve spermiogenezi

Všudypřítomný ubiquitin-proteázomový systém (UPS) je ATP dependentní enzymatický aparát, který slouží k označení proteinového substrátu, jenž má být degradován. Proteinová ubiquitinace je post-translační modifikace, během které mohou být substrátové proteiny degradovány 26S proteasomem, lysozomem nebo autofagozomem (Cohen-Kaplan et al. 2016). UPS se skládá ze 76 aminokyselin (Wilkinson 1988) a je zodpovědný za substrátově specifickou proteolýzu zhruba 75 % všech eukaryotních proteinů (Sutovsky 2011). Ubiquitin je malý chaperonový protein, který se kovalentně váže na jiné proteiny a tím je označen k degradaci. Ubiquitinace vyžaduje ATP a několik specifických enzymů. Nejprve dojde k aktivaci jednotlivých ubiquitinových molekul pomocí aktivačního enzymu E1. Aktivovaný ubiquitin projde skrz několik transportních enzymů (E2) a je připojen k lyzinovému zbytku konkrétního proteinu substrátově specifickým ligázovým enzymem (E3) (Obr. č. 9). Takto může být na daný substrát pomocí E3 připojeno více ubiquitinových molekul, čehož se můžou účastnit elongační enzymy (E4) (Hershko & Ciechanover 1998; Rivett 1999; Ciechanover & Masucci 2002). Polyubiquitinovaný protein je následně degradován 26S proteasomem, který je složen z několika podjednotek. Jde o 20S proteolytické jádro přikryté 19S proteasomovým regulačním komplexem zodpovědným za rozpoznání a deubiquitinaci polyubiquitinového řetězce a za připravení substrátového proteinu k transportu do 20S jádra, kde dojde k rozložení substrátového proteinu na malé peptidy, které jsou následně uvolněny (Obr. č. 9) (Coux et al. 1996; Tanaka 1998; Zwickl & Baumeister 2002). Kromě této tradiční funkce je UPS pravděpodobně zahrnut ve všech krocích reprodukčního procesu od gametogeneze, přes kapacitaci, fertilizaci, až po raný embryonální vývoj a implantaci (Sutovsky 2003). Nedávné

výzkumy například prokázaly význam extracelulárního ubiquitinu v kontrole kvality spermií a degradaci paternálních mitochondrií (Sutovsky et al. 1999) v oplodněném oocytu, či během spermatogeneze (Tokumoto 1998; Baarends et al. 2000; Bebington 2001).



Obr. č. 9: Ubiquitin-proteazomový systém. Aktivace ubiquitinů enzymem E1 za využití energie v podobě ATP, následný transfer ubiquitinů enzymem E2 a navázání ubiquitinů na substrát díky ligázovému enzymu E3. E3 je substrátově specifický protein, který váže substrát na základě rozpoznání konkrétního proteinu. Následuje polyubiquitinace a ATP dependentní degradace proteinu v 26S proteasomu, kde dochází zároveň k deubiquitinaci proteinu 19S podjednotkou a „recyklaci“ ubiquitinů pro další ubiquitinaci (zdroj: Lee et al. 2015).

Pro úspěšnou reprodukci je důležité, aby docházelo k eliminaci abnormálních spermií během spermatogeneze. Mechanismus kontroly kvality spermií nebyl nicméně dlouho znám. Poměrně nedávno bylo objeveno, že v kontrole kvality spermií hraje roli ubiquitinace v epididymu (Sutovsky et al. 2001; Cooper et al. 2002). Na základě experimentů založených na imunofluorescenci bylo zjištěno, že ejakulované spermie býka, které byly abnormální (2 hlavičky, 2 bičíky apod.), byly ubiquitinované (Sutovsky et al. 2001). Když se měřil podíl ubiquitinovaných spermií ve varleti a v každé části epididymu (hlava, tělo, ocas) pomocí anti-ubiquitinových protilátek, zjistilo se, že ve varleti dochází k ubiquitinaci velmi zřídka. Naproti

tomu v hlavě nadvarlete bylo nalezeno kolem 5 % ubiquitinovaných spermií, v těle 3–4 % a v ocasu nadvarlete méně než 1 %. Tyto výsledky naznačují, že k eliminaci abnormálních spermií pravděpodobně dochází v průběhu transportu samčím pohlavním traktem (Sutovsky et al. 2001). Dále bylo prokázáno, že epididymální buňky pravděpodobně produkují ubiquitin, čímž dochází k ubiquitinaci patologických spermií. K fagocytóze ubiquitinovaných spermií dochází zřejmě epididymálními buňkami (Sutovsky et al. 2001). Funkce UPS byla prokázána také během kapacitace, akrozomové reakce (Morales et al. 1994; Tipler 1997; Wojcik et al. 2000; Kerns et al. 2016) a během penetrace oocyту spermií (Sawada & Yokosawa 2001; Sawada 2002; Sakai et al. 2004; Zimmerman & Sutovsky 2009). UPS hraje roli v deagregaci spermadhesinu a DQH/BSP1 během kapacitace spermií kanců a je důležitým krokem v odpoutání spermií z oviduktálního epitelu (Zigo et al. 2019a). Důležitý je také v rozčlenění dalších proteinů, jako je lactadherin MFGE8, disintegrin ADAM5 a protein akrozomální matrix ACRBP (Zigo et al. 2019b). Přítomnost proteazomů byla prokázána i na akrozomu spermií (Morales et al. 2004; Sutovsky et al. 2004; Pasten et al. 2005; Yi et al. 2009). Proteasomy jsou pravděpodobně spojeny s vnější i vnitřní akrozomální membránou během akrozomové biogeneze (Rivkin et al. 2009). Zdá se, že proteasomy jsou vystaveny na povrchu akrozomu, aby mohly přímo interagovat se zónou pellucidou během oplození (Sutovsky et al. 2004; Yi et al. 2007; Yi et al. 2009; Yi et al. 2010). Je tedy více než pravděpodobné, že úloha UPS ve spermiogenezi je velmi důležitá a nezbytná.

3.5 Sulfan

3.5.1 Vlastnosti sulfanu

Sulfan (H_2S) je bezbarvý plyn se silným zápachem po zkažených vejcích, který byl přes 300 let byl považován za jedovatou látku (Beauchamp et al. 1984). Vystavení silným koncentracím (> 500 ppm) tohoto plynu může způsobit u člověka smrt (Reiffenstein et al. 1992). Otrava zmíněnou molekulou spočívá především v potlačení některých životně důležitých enzymů, jako jsou například cytochrom c oxidáza (Reiffenstein et al. 1992), Na^+/K^+ ATP-áza (Reiffenstein et al. 1992), karboanhydráza (Nicholson et al. 1998) nebo monoaminoxidáza (Warenycia et al. 1989). Nicméně myšlenka, že je sulfan pouze jedovatý plyn, je dnes překonána. Nyní je po oxidu dusnatém (NO) a oxidu uhelnatém (CO) považován za třetí gasotransmitter. Fyziologický význam H_2S spočívá v jeho endogenní produkci savčími buňkami po celém těle (Erickson et al. 1990; Roper & Kraus 1992; Swaroop et al. 1992). Poprvé byla jeho endogenní produkce prokázána v roce 1996 (Abe & Kimura 1996) v centrálním nervovém systému, kde působí jako endogenní modulátor. Následně byl prokázán fyziologický význam sulfanu v kardiovaskulárním (Geng et al. 2004), vylučovacím (Tripatara et al. 2008), reprodukčním (Wang et al. 2013), dýchacím (Fu et al. 2008) a trávicím systému (Distrutti et al. 2005).

Kromě toho, že je sulfan bezbarvý zapáchající plyn, je také hořlavý. Je snadno rozpustný ve vodě (Kabil & Banerjee 2010) a v této formě působí jako slabá kyselina. Je poměrně nestálý, rychle disociuje na $H_2S/HS^-/S^{2-}$ ionty. Odhaduje se, že zhruba 14 % této molekuly je v plazmě ve formě molekuly H_2S a 86 % je disociováno na HS^- (Whitfield et al. 2008). Protože je sulfan nízkomolekulární lipofilní plynná molekula, může snadno procházet přes PM buněk, aniž by

k tomu potřeboval specifický kanál nebo pumpu (Hughes et al. 2009; Mathai et al. 2009). Cílem H₂S může být organické železo, konkrétně kovová centra různých proteinů (Nagy 2015). V posledních letech byly provedeny experimenty zaměřené na persulfidaci, kde sulfan reaguje s thiolovou skupinou a tvoří proteinové persulfidy, které mohou způsobit funkční změny u cílových proteinů (Mustafa et al. 2009). Nedávno bylo také navrženo, že by sulfan mohl působit během redukce disulfidických můstků (Pálinkás et al. 2015; Vasas et al. 2015), nicméně v tomto ohledu je nutné provést více experimentů. Mnohé studie potvrdily cytoprotektivní (antinekrotické či antiapoptotické) účinky sulfanu, a to především u sulfanu získaného ze sulfidu sodného v *in vitro* podmínkách. Sulfan má schopnost reagovat a neutralizovat kyslíkaté (ROS) či dusíkaté radiály (NOS) (Whiteman et al. 2004; Whiteman et al. 2005; Whiteman et al. 2006) nebo kyselinu chlornou (Whiteman et al. 2005). Další experimenty také prokázaly, že nízké koncentrace sulfanu mohou podpořit antioxidační systém (Yang et al. 2004). Inhibice produkce endogenního sulfanu vede ke zvýšení cytotoxického účinku exogenního H₂S, což poukazuje na cytoprotektivní účinek nízké (a zároveň fyziologické) koncentrace endogenního sulfidu (Yang et al. 2004).

Odhaduje se, že koncentrace sulfanu je přes 35 μM v plazmě a 50-160 μM v mozku (Goodwin et al. 1989; Savage & Gould 1990; Zhao et al. 2003; Zhu et al. 2007). Tyto hodnoty však byly naměřeny metodou methylenové modři a vzhledem k tomu, že v přítomnosti silné kyseliny dochází k uvolnění H₂S z acidolabilní síry, mohou být touto metodou naměřeny vyšší hodnoty (Whitfield et al. 2008; Ishigami et al. 2009). Po odstranění silné kyseliny byly pomocí monobromobimanové analýzy (MBA) naměřeny hodnoty 0,7-3 μM v krevní plazmě (Hulbert & Yakubu 1983; Togawa et al. 1992; Wintner et al. 2010; Shen et al. 2011). V nedávné době byla koncentrace sulfanu v plazmě měřena metodou plynové chromatografie, kdy hodnoty dosáhly 15 μM. Dá se říct, že koncentrace tohoto plynu se v krevní plazmě pohybují v rámci několika jednotek či desítek μM. Ačkoliv jsou hodnoty koncentrace sulfanu poměrně nízké, mohou být značně zvýšeny určitým mikroprostředím. To se může stát 3 způsoby. Zaprvé může dojít k uvolnění H₂S ze sulfan vázající síry. Bylo například prokázáno, že aktivací neuronů dojde k uvolnění sulfidu ze sulfan vázající síry v blízkosti astrocytů, což vede ke stimulaci Na⁺/HCO₃⁻ symportu, čímž se alalinizují astrocyty (Ishigami et al. 2009). Vzhledem k rozšíření sulfan vázající síry v organismu je možné, že i další orgány a tkáně využívají podobný mechanismus jako mozek. Zadruhé jde o zvýšení biosyntézy sulfanu, což bylo prokázáno například v prostředí podobnému při diabetu způsobenému streptozotocinem (Yusuf et al. 2005). V takovýchto podmínkách se předpokládá, že sulfan bude dočasně koncentrován v těsné blízkosti sulfan produkujících enzymů před jeho difuzí nebo oxidací. Poslední možností je suprese katabolismu sulfanu. Během hypoxie vede snížení koncentrace O₂ k supresi oxidace sulfanu a následné akumulaci H₂S, což bylo prokázáno například v krevních kapilárách nebo v ledvinách (Bełtowski 2010; Calvert et al. 2010; Bir et al. 2012).

3.5.2 Produkce a katabolismus sulfanu

Sulfan může být v těle produkován enzymatickou i neenzymatickou cestou. Enzymy mohou přesně regulovat produkci H₂S v těle a v důsledku toho sulfan působí jako endogenní signální molekula. Mezi sulfan produkující enzymy vyskytující se v cytosolu buněk patří cystathionin β-syntáza (CBS), cystathionin γ-lyáza (CTH) a pyridoxal 5'-fosfát (PLP). Dalším

takovým enzymem je 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (3-MST), která se nachází především v mitochondriích. Nicméně například při hypoxii může dojít k translokaci CBS a CTH do mitochondrií (Fu et al. 2012; Teng et al. 2013). Oba tyto enzymy využívají jako substrát pro tvorbu H₂S L-cystein, který může organismus získat z potravy, nebo může být uvolněn z endogenních proteinů. Další možností vzniku L-cysteinu je transsulfurace L-methioninu, přičemž jako meziprodukt této reakce vzniká homocystein (Wang 2002; Fiorucci et al. 2006). Produkce sulfanu sulfan produkujícími enzymy je popsána níže v kapitole 3.4. Produkce H₂S je možná také neenzymatickou cestou, kdy je endogenní sulfan odvozen ze sulfanu vázající síry skrz neenzymatickou redukci. Obecně tento proces potřebuje redukční činidlo, jako například NADPH nebo NADH (Searcy & Lee 1998), které jsou dodávány oxidací během glykolýzy. V přítomnosti těchto faktorů reaktivní sírné atomy v persulfidech, thiosíranech a polysulfidech mohou být redukovány na H₂S a další metabolity (Obr. č. 14) (Olson et al. 2013). V podstatě všechny komponenty této neenzymatické cesty jsou v organismu dostupné, což poukazuje na význam syntézy sulfanu v organismu. Navíc bylo prokázáno, že hyperglykémie zvyšuje tvorbu sulfanu touto neenzymatickou cestou (Wang 2002). Dalším zdrojem sulfanu je enterobakteriální flóra (Furne et al. 2001; Fiorucci et al. 2006).

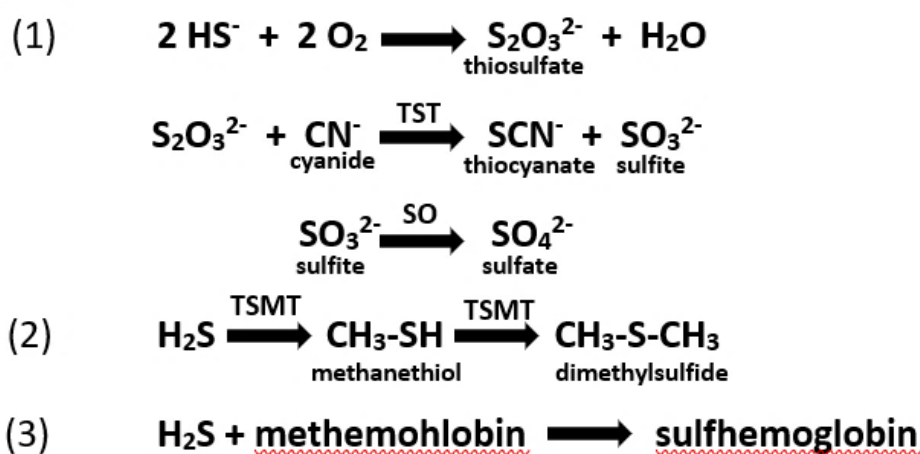
Vzhledem k tomu, že se H₂S tvoří de facto v celém organismu a že jsou jeho vysoké koncentrace toxické, je logické, že také musí docházet k jeho odbourávání. Bohužel katabolismus tohoto gasotransmiteru není tak dobře prostudován jako jeho biosyntéza, proto byla většina výsledků zjištěna na základě experimentů s exogenním H₂S. U savců byly potvrzeny celkem 3 katabolické cesty sulfanu – oxidace, methylace a expirace. Je třeba zmínit, že H₂S reaguje také s hemoglobinem, čímž vzniká sulfhemoglobin (Cerdeña-Colón et al. 1998), který ale slouží spíše jako zásoba sulfidu než jako jeho odbourání.

První katabolickou cestou je tedy oxidace. Velká část sulfanu je vyloučena ledvinami ve formě síranů. Při tvorbě síranů dochází k oxidaci sulfanu, který se poté sloučí s další molekulou H₂S a vytvoří v mitochondriích jednu molekulu thiosíranu. Pro tento krok není nutný žádný enzym (Bartholomew et al. 1980; Libiad et al. 2014). Thiosíran je poté přeměněn na siřičitan za přítomnosti sulfid detoxikačních enzymů, jako je například rhodanáza (Picton et al. 2002), které slouží k přenosu molekuly síry z thiosíranu na kyanid, případně další akceptory. Následně je siřičitan zoxidován na finální produkt – síran – za pomoci siřičitan oxidázy (Picton et al. 2002). Dále může být sulfan oxidován v mitochondriích za přítomnosti enzymu SQOR (z angl. sulfide quinone oxidoreductase), čímž vzniká persulfid, který je následně katalyzován rhodanázou na thiosíran (Jackson et al. 2012; Jackson et al. 2015). Nedávno bylo objeveno, že ferrihemoglobin je schopný také oxidovat sulfid na thiosíran, ačkoliv není znám fyziologický význam této reakce (Bostelaar et al. 2016). Síran je pak vyloučen močí jako hlavní produkt katabolismu sulfanu. Je třeba ale zmínit, že koncentrace síranů v moči neslouží jako přesný marker úrovně endogenního sulfanu v těle, protože sírany v moči mohou také vznikat z přímé oxidace L-cysteinu (Krijgsheld et al. 1981; Li & Moore 2008). Ačkoliv může oxidace sulfanu probíhat v každé savčí buňce, převažuje v buňkách ledvin (Furne et al. 2001).

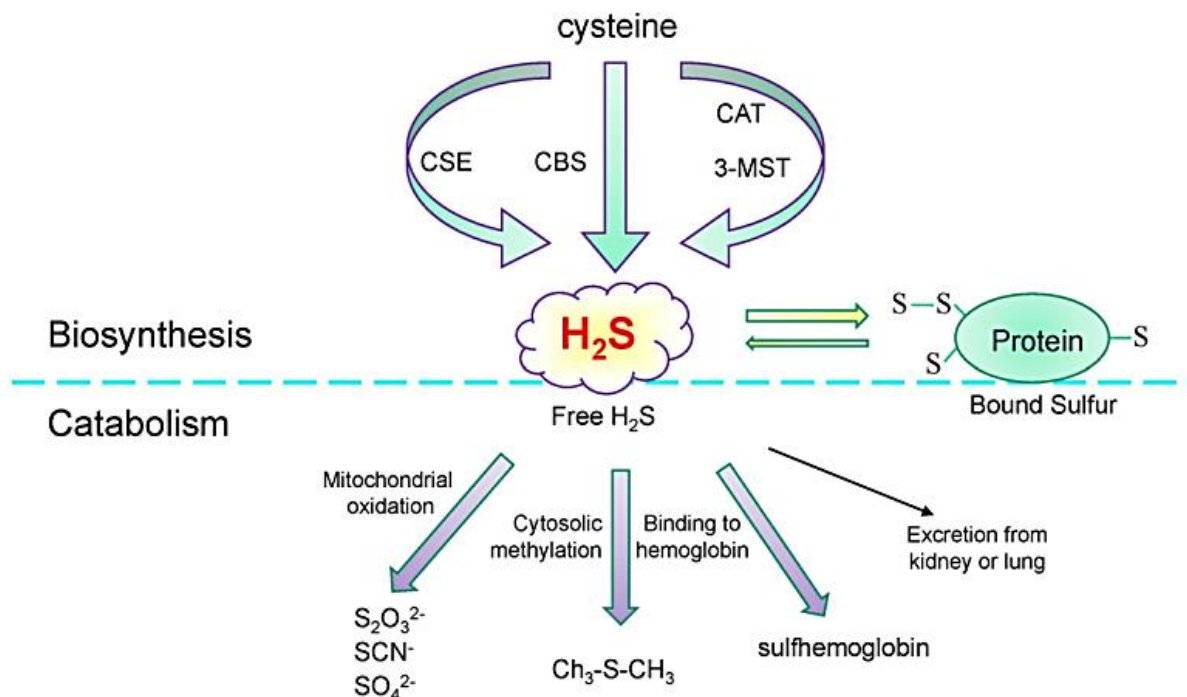
Druhou cestou odbourání sulfanu je methylace, která na rozdíl od oxidace neprobíhá v mitochondriích, ale v cytosolu buněk. V tomto případě je H₂S methylován na methanthiol,

který může být dále methylován na netoxický dimethylsulfid pomocí thiol S-methyltransferázy (Weisiger et al. 1980).

Poslední cestou je expirace, protože sulfan může odcházet ze savčích plic (Insko et al. 2009; Polhemus & Lefer 2014). Zdá se, že tato cesta odstranění sulfanu z těla je důležitá při vysoké produkci tohoto gasotransmiteru. Vydechování sulfanu bylo také detekováno za patologických podmínek, jako je septický šok, hemorrhagický šok nebo chronická obstrukční plicní nemoc, během kterých je H₂S nadměrně produkován (Hui et al. 2003; Mok et al. 2004; Sun et al. 2013). Nicméně není známo, kolik sulfanu se vydechováním vyloučí za fyziologických podmínek, ale vzhledem k tomu, že koncentrace volného sulfanu v krvi je v savčí krvi velmi nízká (Furne et al. 2008; Olson 2009), odstranění sulfanu touto cestou bude zřejmě minimální. Shrnutí katabolických reakcí a vyloučení sulfanu z těla z znázorněno na Obr. č. 10 a Obr. č. 11.



Obr. č. 10: Katabolismus sulfanu. (1) oxidace sulfanu v mitochondriích; (2) methylace v cytosolu; (3) navázání na hemoglobin. SO – siřičitan oxidáza, TSMT – thiol S-methyltransferáza, TST – kyanid sulfurtransferáza (rhodanáza) (zdroj: Łowicka & Beltowski 2007).



Obr. č. 11: Schéma biosyntézy a katabolismu sulfanu. Sulfan je v těle produkován třemi enzymy – CTH, CBS a 3-MST za přítomnosti CAT. Sulfan může být katabolizován oxidací v mitochondriích, metylací v cytosolu, navázáním na hemoglobin, případně může dojít k odstranění sulfanu exkrecí ledvinami či plicemi. CBS – cystathionin β -syntáza; CSE – cystathionin γ -lyáza; $S_2O_3^{2-}$ – thiosíran; SCN^- – thiokyanatan; SO_4^{2-} – síran; CH_3-S-CH_3 – dimethylsulfid (zdroj: Tan et al. 2010).

3.5.3 Molekulární cíle sulfanu v organismu

Od objevení sulfanu jakožto signální molekuly bylo prokázáno velké množství cílových míst pro tento gasotransmíter. Mezi cílové skupiny sulfanu patří například iontové kanály a receptory, cytochrom c oxidáza v mitochondriích, transkripční faktory a v poslední řadě mnohé proteiny (Li et al. 2011). Působení sulfanu na tato cílová místa je znázorněno na Obr. č. 12.

Prvním objeveným cílem sulfanu byla již zmíněná cytochrom c oxidáza, dalším pak byly K_{ATP} kanály (Zhao et al. 2003). Sulfan je například schopný otevřít K_{ATP} kanály hladkého svalstva tepen, což následně vede k dilataci cév (Hosoki et al. 1997; Zhao 2001; Cheng et al. 2004; Fiorucci et al. 2005; Li et al. 2008). Stejně tak působí H_2S na atriální a ventrikulární myocyty (Zhong et al. 2010), nebo hladké svalstvo tračnicku (Distritti et al. 2005), či oka (Monjok et al. 2008). Jak přesně aktivuje sulfan K_{ATP} kanály však ještě není známo. H_2S také působí na další kanály, například inhibuje BK_{Ca} kanály (BK z angl. big conductance) v embryonálních buňkách ledvin (Telezhkin et al. 2009), opačný efekt na tyto kanály má například v hypofyzárních buňkách (Sitdikova et al. 2010). Dále sulfan inhibuje L typ Ca^{2+} kanálů v kardiomyocytech (Sun et al. 2008), T typ Ca^{2+} kanálů zprostředkovávajících viscerální bolest u myši (Matsunami et al. 2009), nebo také intracelulární chloridové kanály v krysích lysozomálních vezikulech srdce (Malekova et al. 2009). Na druhou stranu aktivuje TRPV kanály v močovém traktu (Streng et al. 2008) a v hladkém svalstvu dýchacích cest (Trevisani

et al. 2005). Biologický význam působení tohoto plynu na iontové kanály není však stále zcela znám.

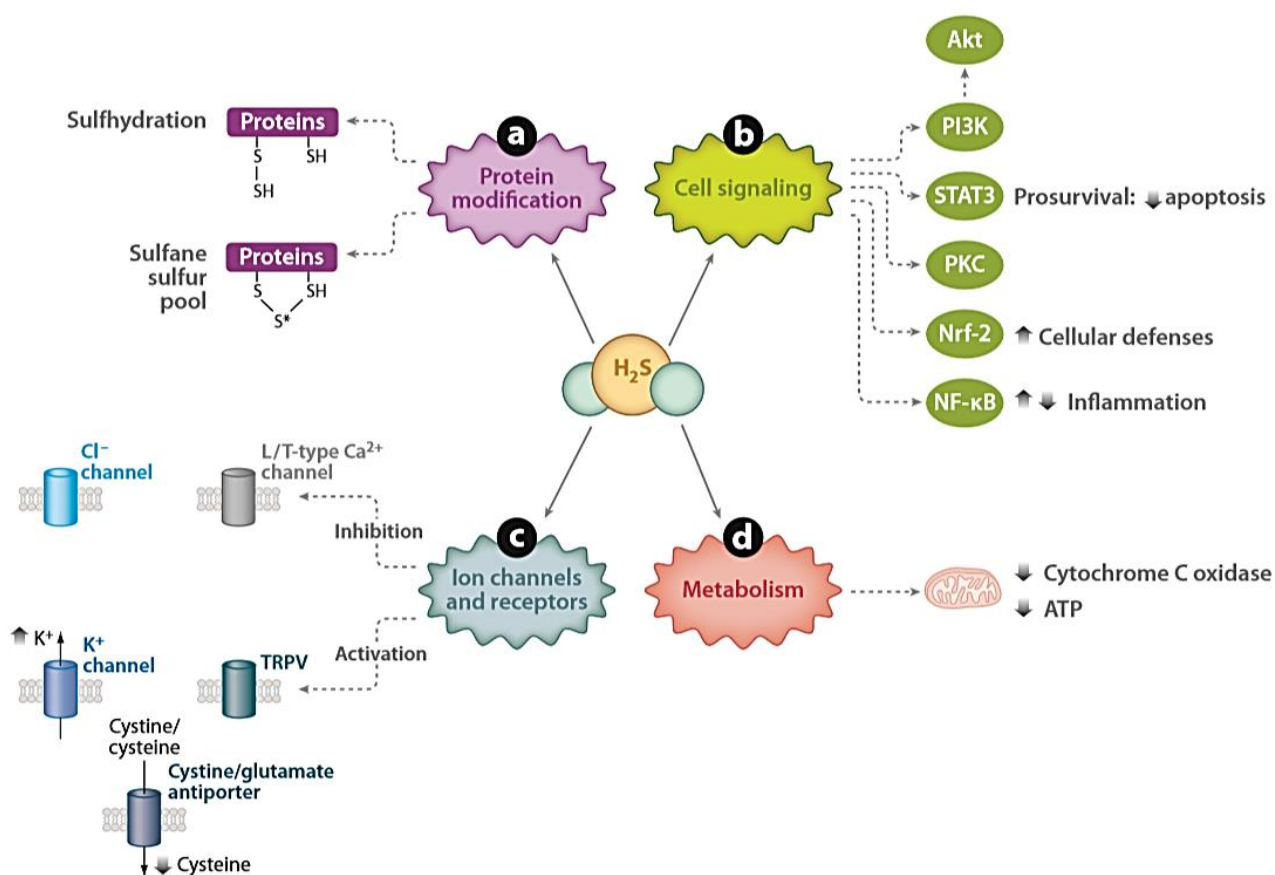
Dalšími molekulami, které mohou být ovlivněny sulfanem, jsou transkripční faktory. Interakce H₂S s transkripčními faktory byla pozorována například při zánětlivých procesech. Bylo prokázáno, že donor sulfanu NaHS inhibuje LPS indukovanou aktivaci jaderného faktoru kappa B (NF- κ B). NaHS zamezuje I κ B- α (inhibitor nukleárního faktoru kappa B) degradaci, a tudíž translokaci NF- κ B do jádra (Oh et al. 2006). Kromě NaHS byly studovány účinky také jiných donorů sulfanu na transkripční faktory, a to například S-diklofenak, který vedl ke snížení zánětu u krysa skrz inhibici aktivace NF- κ B v játrech (Li et al. 2007). Bylo také prokázáno, že i molekuly obsažené v česneku, jako například diallyl sulfid (také donor H₂S), rovněž potlačují aktivaci NF- κ B (Benavides et al. 2007). Tento mechanismus potvrzuje již známé protizánětlivé účinky česneku. Zajímavé je, že sulfan může mít za určitých podmínek také prozánětlivé účinky tím, že zvýší degradaci I κ B- α , čímž dojde ke zvýšení aktivace NF- κ B. Tento jev byl pozorován například u některých monocytárních buněk (Zhi et al. 2007) nebo v synoviocytech (Stuhlmeier et al. 2009). Zdá se tedy, že je vícero možností, jak NF- κ B reaguje na přítomnost sulfanu. Může to být způsobeno například odlišnostmi v buněčných typech či tkáních. Jelikož je aktivace NF- κ B potřebná nejen v brzkých stádiích zánětlivého procesu, kdy vyvolává prozánětlivý efekt působením na několik prozánětlivých genů, ale také v pozdějších fázích, kdy vede k aktivaci protizánětlivých faktorů, jako je například TGF- β (Li et al. 2011). Z toho plyne, že sulfan může inhibovat nebo aktivovat NF- κ B v závislosti na konkrétním stádiu zánětlivého procesu a může mít jak pro, tak protizánětlivé účinky. H₂S působí také na mnoho dalších transkripčních faktorů. Působením na některé z nich může sulfan zprostředkovat například proliferaci nebo angiogenezi (Aggarwal et al. 2009).

Jako další buněčný cíl sulfanu byly popsány kinázy. Jednou z kináz, která byla z tohoto hlediska zkoumána, byla MAPK. Stejně jako u transkripčních faktorů byla popsána jak inhibice MAPK aktivity, a to například u krysích hladkosvalových buněk aorty (Du et al. 2004), tak zvýšení aktivity v endoteliálních buňkách pupečnickové žíly člověka (Papapetropoulos et al. 2009). Dále byl popsán antiapoptotický účinek sulfanu na polymorfonukleární leukocyty, který je zřejmě spojen s inhibicí MAPK aktivity (Rinaldi et al. 2006). Mezi další cílové kinázy sulfanu patří ERK, která je v přítomnosti H₂S fosforylována v HEK-293 buňkách (Yang et al. 2004), nebo hladkosvalových buňkách cév u krysy (Jeong et al. 2006), případně u rakovinných buněk tračníku člověka (Cai et al. 2007). Sulfan aktivuje PKB (protein kináza B) v endoteliálních buňkách (Cai et al. 2007) nebo v rakovinných buňkách tračníku (Jeong et al. 2006). Vystavení kardiomyocytů NaHS dále vedlo k podpoření PKB a PKC aktivity (Yong et al. 2008). Celkově se zdá, že účinek sulfanu na různé druhy kináz je aktivační.

Další zajímavou cílovou molekulou sulfanu je glutathionin (Kimura & Kimura 2004). Bylo prokázáno, že sulfan zvyšuje intracelulární koncentrace glutathioninu, což vede k potlačení oxidativního stresu v mitochondriích (Kimura et al. 2010). Tento výsledek podporuje experimenty, které prokazují přítomnost 3-MST v mitochondriích (viz kapitola 3.4).

Jedním z velmi důležitých cílů sulfanu jsou buněčné proteiny, sulfan totiž způsobuje jejich S-sulfhydrataci (Mustafa et al. 2009). Mechanismus S-sulfhydratace spočívá v tom, že síra (odvozená z H₂S) je dodána do thiolové skupiny cysteinových zbytků, což vede ke vzniku hydropersulfidové skupiny (-SSH) (Li et al. 2011). Tyto -SSH cysteiny jsou mnohem více reaktivní než cysteiny obsahující pouze thiolovou skupinu. Zvýšená reaktivita těchto

molekul zvyšuje rovněž jejich biologickou aktivitu. Například S-sulhydratovaný GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza) vykazuje vyšší aktivitu, než nemodifikovaný enzym (Li et al. 2011). Nebylo ještě prokázáno, že S-sulhydratace má stejný účinek na všechny enzymy, proto je nezbytné provést další experimenty. Zajímavé je, že působením jiného gasotransmiteru NO dochází k S-nitrosylaci a následně ke snížení aktivity GAPDH (Li et al. 2011). Dalo by se tedy předpokládat, že NO a H₂S společně regulují buněčnou signalizaci. Zdá se, že S-sulhydratace patří v buňkách mezi běžné posttranslační modifikace, protože 10–25 % všech myších jaterních proteinů se vyskytuje v tomto stavu (Mustafa et al. 2009). Nicméně proces S-sulhydratace je zatím stále velmi neprozkoumaná oblast ve zvířecí i lidské fyziologii, proto je třeba provést nespočet dalších experimentů.



Obr. č. 12: Cílová místa sulfanu. Tato místa mohou být rozdělena do následujících skupin: a) modifikace proteinů, konkrétně thiolových míst cysteinu; b) intracelulární signální proteiny a transkripční faktory účastníci se především zánětlivých a ochranných reakcí buněk; c) iontové kanály zprostředkovávající hlavně odpovědi cévních, srdečních a nervových buněk; d) metabolismus a účinek sulfanu na cytochrom c oxidázu. Akt – PKB, protein kináza B; ATP – adenosin trifosfát; NF- κB – jaderný faktor kappa B; Nrf-2 – NF-E2 odvozený faktor 2; PI3K – fosfatidylinositol 3-kináza; PKC – protein kináza C; -SH – thiol; -SSH – hydropersulfid, STAT3 – signální transduktor a aktivátor transkripce; TRPV – dočasný potenciální vanilloidový receptor (zdroj: Li et al. 2011).

3.5.4 Funkce sulfanu v reprodukční soustavě

Dříve nebylo zcela jasné, zda má na reprodukční soustavu sulfan nějaký vliv, nicméně později byla detekována exprese sulfanu produkujících enzymů jak v samčím, tak v samičím traktu u mnoha savčích druhů (Sugiura et al. 2005; Liang et al. 2006; d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2009; Patel et al. 2009; Srilatha et al. 2009a). Jednou z nejzásadnějších rolí sulfanu v samčím pohlavním ústrojí je usnadnění erekce. Bylo prokázáno, že injekce NaHS jako donoru sulfanu do kavernózní tkáně primátů vede k prodloužení penisu a zvýšení intrakavernózního tlaku (Srilatha et al. 2006). Proerektální relaxační účinky sulfanu jsou však závislé na koncentraci této molekuly (Srilatha et al. 2007). Po vystavení inhibitoru CTH DL-propargylglycinu u krys byla při nervové stimulaci erekce znemožněna. Stejně účinky byly pozorovány u králíků (Srilatha et al. 2007). Bylo zjištěno, že CBS a CTH jsou exprimovány také v lidské tkáni penisu. Produkce CTH je lokalizována do trabekulární svalové tkáně, hladkosvalových buněk kapilár a periferních nervů penisu, zatímco CBS je lokalizován především v trabekulární svalové tkáni (d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2009), byl však rovněž detekován v hladkosvalových buňkách cév (d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2011). Exogenní H₂S, případně L-cystein, způsobují relaxaci lidských kavernózních tělísek, přičemž míra relaxace je dána dávkou těchto molekul. V případě přítomnosti CTH a CBS inhibitorů došlo ke kontrakci tkáně penisu. Tyto výzkumy naznačují, že účinek sulfanu v této tkáni může mít terapeutický účinek při léčbě erektilní dysfunkce. Přítomnost CTH a CBS byla detekována také ve varlatech u krysy (Sugiura et al. 2005). Expresce CTH probíhá například v Sertoliho buňkách a nezralých zárodečných buňkách, CBS byl lokalizován v Leydigových, Sertoliho i zárodečných buňkách (Sugiura et al. 2005).

Zdá se, že sulfan může hrát důležitou roli při regulaci funkce varlat, protože bylo prokázáno, že podávání česneku, v němž se vyskytují donory sulfanu, zvýšilo produkci testosteronu ve varlatech (Oi et al. 2001). Byla rovněž pozorována sub a infertilita u jedinců, kteří měli utlumenou expresi CBS ve spermiích (Wang et al. 2018). Po dodání exogenního sulfanu došlo ke zvýšení pohyblivosti spermií u jedinců s knockoutovaným genem pro CBS (Wang et al. 2018). CBS a potažmo sulfan má pozitivní účinek také na spermatogenezi a udržení hematotestikulární bariéry. Sulfan má totiž protizánětlivé a antioxidační účinky, které pomáhají spermiím a jejímu okolí zvládat oxidativní stres a zánět (Wang et al. 2018).

Mezi další části samčí pohlavní soustavy s produkcí sulfanu patří prostata. Zatímco její stromální buňky produkují CTH, v periferní části nebyly CBS ani CTH téměř detekovány (Guo et al. 2012). Ve tkáni prostaty se však kromě těchto dvou enzymů vyskytuje také 3-MST (Gai et al. 2013). Po knockoutu genu pro CTH ve tkáni prostaty došlo ke snížení produkce sulfanu až o 80 %, proto se předpokládá, že hlavním sulfan produkujícím enzymem v tomto orgánu je CTH (Liu et al. 2016). Další experimenty potvrdily pozitivní účinek sulfanu při rakovině prostaty (Zhao et al. 2014; Duan et al. 2015).

Zdá se, že v samičím pohlavním ústrojí mají CTH a CBS odlišné role, protože například CTH knockoutované myši porodily fyziologicky (Yang et al. 2008), ale samičí potomci myši s knockoutovaným genem pro CBS měly sníženou fertilitu, zatímco samčí potomci byli plodní (Watanabe et al. 1995). CBS zřejmě hraje v samičí reprodukci důležitou roli. CBS může být detekován například ve vaječnicích, jeho největší koncentrace byly pozorovány ve folikulárních buňkách všech stádií. Není však exprimován v oocytech (Liang et al. 2006). Myš s narušenou

expresí CBS má snížený počet folikulů, zkrácený a nepravidelný pohlavní cyklus a sníženou dobu estru a diestru v porovnání s normální myší (Liang et al. 2006). CBS je rovněž exprimován v děloze, kdy při knockoutu genu pro CBS dochází nejen ke značnému snížení velikosti dělohy, ale také ke sníženému přežívání plodů. Pokud byly CBS deficientní vaječníky transplantovány do normální nebo heterozygotní příjemkyně, došlo ke kompletní obnově fertility (Guzmán et al. 2006). Zdá se tedy, že za infertilitu způsobenou nedostatkem CBS u samic je zodpovědná děloha, ne však dysfunkce ovarií. Přesto další výzkumy prokázaly význam CBS v granulóznicích buňkách, kde hraje důležitou roli při maturaci oocytů, protože při deficitu CBS dochází k inhibici zrání oocytu (Liang et al. 2007). Dále byly CBS a CTH detekovány v pochvě, placentě a plodových obalech (Patel et al. 2009; Srilatha et al. 2009b). Bylo zjištěno, že hypoxie placenty vede ke značnému zvýšení produkce sulfanu v lidské placentě (Patel et al. 2009). Jelikož je hypoxie zřejmě jedním z faktorů způsobujících preeklampsii (Soleymanlou et al. 2005), bylo by vhodné zjistit, zda je také H₂S zahrnut mezi faktory vedoucí k tomuto stavu.

Mnoho studií již potvrdilo vazodilatační účinky sulfanu na různé typy cév, včetně aorty, mezenterických, plicních, interrenálních a koronárních tepen (Bhatia 2005). Bylo však potvrzeno, že tentýž účinek má sulfan na pupečnickové tepny a žíly (Zhu et al. 2011). CBS a CTH byly dokonce v endotelu a hladkém svalstvu lidských pupečnickových tepen a žil detekovány (Zhu et al. 2011). Mezi další z účinků H₂S v samičí reprodukční soustavě patří zmírnění kontraktilní odpovědi dělohy krysa na oxytocin, což vede k oddálení porodu (Hayden et al. 1989). Sulfan má tedy na hladkosvalové buňky samičího reprodukčního traktu relaxační účinek. Výzkumy prokázaly, že při podání donoru sulfanu dochází k inhibici spontánní kontraktility svaloviny dělohy, proto by sulfan mohl fungovat tokolyticky (Sidhu et al. 2001). Po vystavení sulfanu dochází u krysy taktéž k relaxaci vaginální tkáně a kavernózních tělísek (Srilatha et al. 2009b).

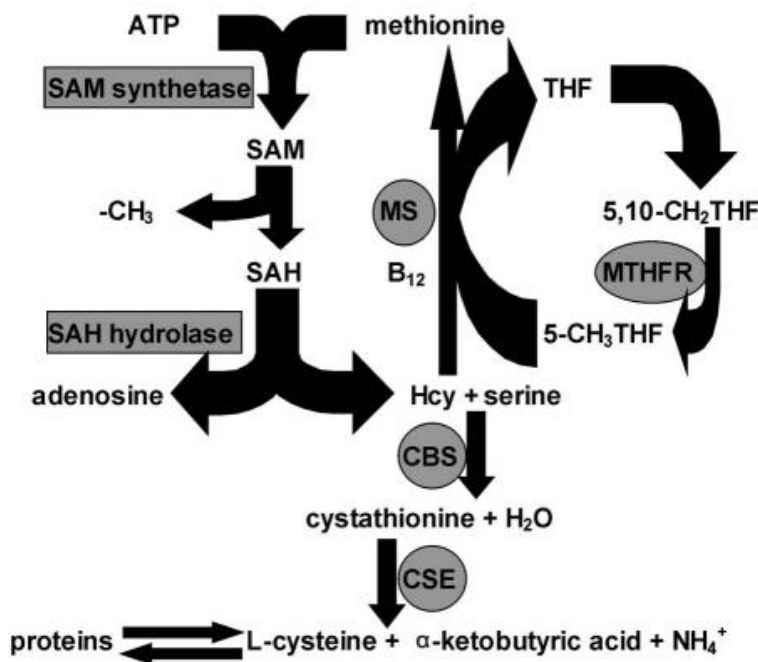
3.6 Sulfan produkující enzymy

3.6.1 Cystathionin β-syntáza

Přítomnost CBS byla poprvé prokázána v roce 1969 (Braunstein et al. 1969) a později bylo zjištěno, jakým způsobem dochází k produkci sulfanu prostřednictvím CBS. Substrátem pro vznik sulfanu pomocí CBS je L-homocystein, který je odvozen od methioninu za působení kaskády enzymů (Obr. č. 13). Z L-homocysteinu poté může vznikat sulfan dvěma způsoby. Jedna možnost je katalýza L-homocysteinu s L-cysteinem, při které vzniká L-cystathionin a sulfan (Braunstein et al. 1971). Druhý způsob spočívá v kondenzaci L-homocysteinu s L-serinem v přítomnosti CBS a vzniku cystathioninu, který je dále metabolizován pomocí CTH na L-cystein (Jhee & Kruger 2005). Ten může být substrátem pro vznik sulfanu CBS i CTH cestou (Obr. č. 14). V přítomnosti L-cysteinu produkuje CBS sulfan a L-serin (Obr. č. 14). Pokud je k dispozici L-homocystein, je produkce H₂S mnohem vyšší než ze samotného L-cysteinu (Singh et al. 2009a). Aktivita CBS je regulována na 3 místech proteinu. Je to hemová skupina na N konci, dále S-adenosyl-L-methionin (SAM) vázající doména na C konci a nakonec S-glutathionylační místo na cysteinu (Zhou et al. 2017). Druhá dvě místa vedou k aktivaci CBS a ke zvýšené produkci H₂S (Shan et al. 2001; Niu et al. 2015). Dále bylo

prokázáno, že purifikovaný CBS protein může být *in vitro* označen SUMO proteinem a sumoylace CBS vede k snížení aktivity tohoto sulfan produkujícího enzymu (Agrawal et al. 2008), ačkoliv v savčích buňkách tato reakce zatím nebyla prokázána. Nicméně tyto modulace mohou umožnit rychlé změny v koncentraci endogenního sulfanu v těle. Aktivita CBS je také pravděpodobně regulována koncentrací glukokortikoidů a cAMP. CBS je přímo inhibován oxidem dusnatým (NO) a oxidem uhelnatým (CO) (Puranik et al. 2006). Dále může být aktivován nitroprusidem sodíku – donorem NO, reakcí, která paradoxně NO nezahrnuje, ale jejíž součástí je chemická modifikace enzymu (Eto & Kimura 2002).

CBS je považovaný za hlavní sulfan produkující enzym v CNS, byl však také prokázán v ledvinách, játrech, lymfocytech, děloze, placentě, tenkém střevě nebo v ostrůvcích slinivky břišní (Abe & Kimura 1996; Fiorucci et al. 2006; Kaneko et al. 2006; Patel et al. 2009). Zajímavé je, že koncentrace sulfanu v experimentech s CBS-knockoutovanými myšmi modely byly stejné, jako u myši bez knockoutu (Shibuya et al. 2009a). Předpokládá se, že tento kontroverzní výsledek může být způsoben kompenzační expresí H₂S pomocí 3-MST, která udrží koncentrace sulfanu nutné pro přežití nervových buněk.



Obr. č. 13: Metabolismus homocysteinu a syntéza cysteinu. Homocystein je odvozen od methioninu, který je nejprve transformován na S-adenosylmethionin (SAM). SAM je donorem methylových skupin v mnoha methylačních reakcích. Během těchto reakcí je SAM transformován na S-adenosylhomocystein (SAH), který je poté rozložen na homocystein (Hcy) za působení SAH hydrolázy. Hcy může být remetylován na methionin díky methionin syntáze (MS), která využívá vitaminu B₁₂ jako kofaktoru a 5-methyltetrahydrofolátu (5-CH₃THF) jako donoru methylové skupiny. 5-CH₃THF vzniká z 5, 10-methylenetetrahydrofolátu (5, 10-CH₂THF) pomocí methylenetetrahydrofolát reduktázy (MTHFR). Hcy je dále metabolizován na cystein nejprve za působení cystathionin β-syntázy (CBS) za vzniku cystathioninu a následně cystathionine γ-lyázy (CSE) (zdroj: Łowicka & Bełtowski 2007).

3.6.2 Cystathionin γ -lyáza

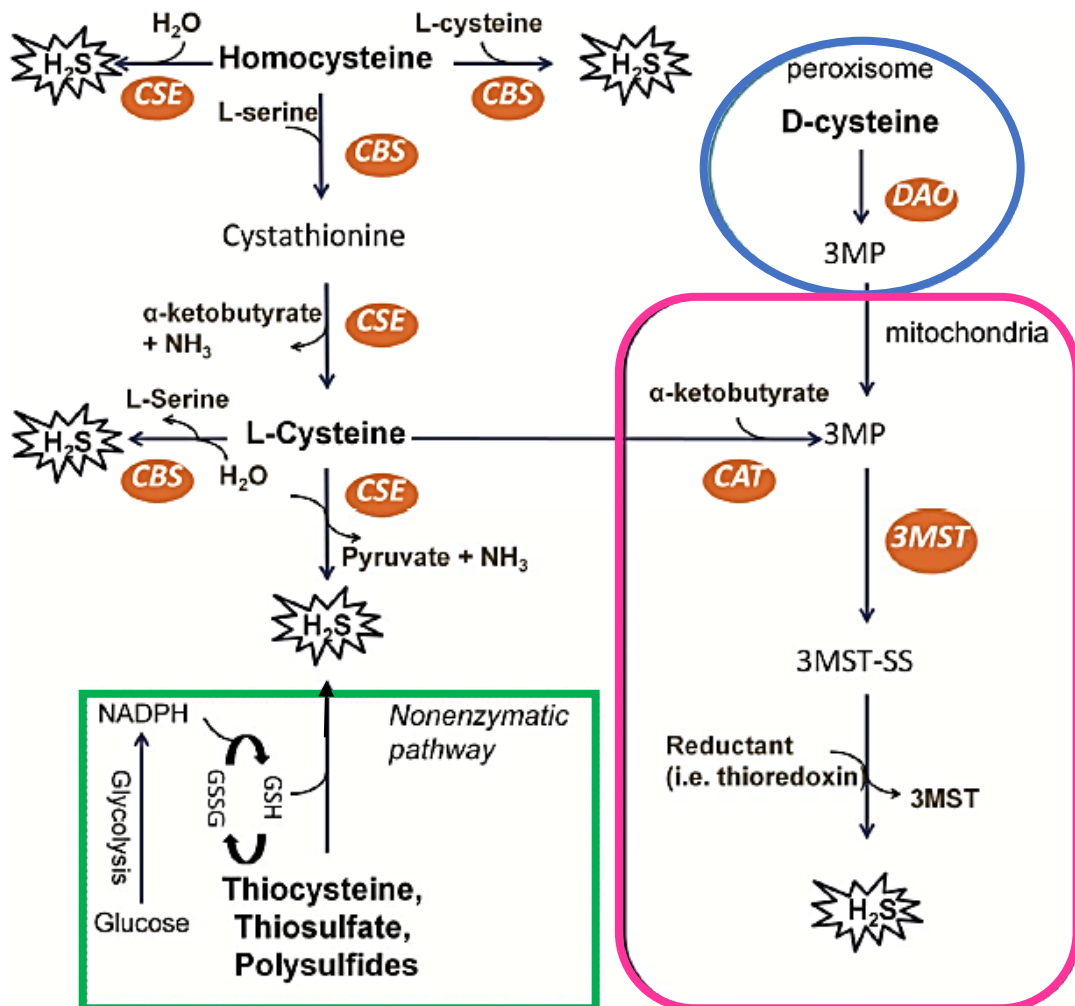
CTH stejně jako CBS používá homocystein jako substrát pro tvorbu sulfanu. Během této reakce vzniká také α -ketobutyryát a amoniak. Dále může CTH katalyzovat přeměnu L-cysteinu na H_2S a vedlejší produkty, kterými může být například pyruvát nebo amoniak (Obr. č. 14). Regulace CTH je obecně méně prozkoumaná než u CBS. Bylo ale zjištěno, že aktivita CTH může být ovlivněna intracelulárními koncentracemi Ca^{2+} (Zhao et al. 2003; Mikami et al. 2013). Nízké hladiny intracelulárního Ca^{2+} podporují produkci sulfanu, zatímco vysoké hladiny tuto reakci potlačují. Další výzkumy prokázaly, že tato regulace není závislá na kalmodulinu, protože ani kalmodulin, ani jeho inhibitor produkci sulfanu vlivem CTH nezměnily (Mikami et al. 2013). Dále bylo pozorováno, že myeloidní zinkový prst 1 (MZF1) a transkripční faktor SP1 hrají roli v transkripční aktivitě CTH (Ishii et al. 2004). Transkripční aktivita CTH může být případně zvýšena bakteriálním endotoxinem (Ishii et al. 2004; Miles & Kraus 2004).

Ve srovnání s CBS je CTH v savčích tkáních mnohem více rozšířen. Je hojně exprimován v kardiovaskulárním a dýchacím systému (Hosoki et al. 1997; Zhao et al. 2001). CTH může být také hlavním sulfan produkujícím enzymem v játrech, ledvinách, děloze a v pankreatu (Zhao et al. 2001; Yang et al. 2004; Kimura et al. 2012). Určitá úroveň CTH byla detekována i v mozku (Erickson et al. 1990; Geng et al. 2004), nicméně zdá se, že zde není CTH spojen s produkcí sulfanu, protože při použití inhibitorů CTH nedochází v mozku ke změnám produkce H_2S (Abe & Kimura 1996).

3.6.3 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza

3-MST je nejdéle objevený sulfan produkující enzym (Shibuya et al. 2009b). Aby touto cestou vznikl sulfan, musí nejprve dojít ke konverzi L-cysteinu na 3-merkaptopyruvát (3MP) pomocí cystein aminotransferázy (CAT). Poté 3-MST přemístí atom síry z 3MP na sebe, což vede ke vzniku persulfidu. Následně je za přítomnosti redukčního činidla (například thioredoxinu) z tohoto persulfidu uvolněn H_2S (Nagahara et al. 1998; Shatalin et al. 2011; Yadav et al. 2013). Nedávno byl také objeven další substrát pro vznik 3MP, a sice D-cystein (Shibuya et al. 2013). D-cystein je přeměněn na 3MP pomocí D-amino oxidázy (DAO), která se nachází v peroxizomech (Obr. č. 14). Metabolickými výměnami mezi peroxisomy a mitochondriemi může dojít k transportu 3MP do mitochondrií, kde je 3MP katalyzován 3-MST za vzniku H_2S (Shibuya et al. 2013). Protože se DAO vyskytuje výhradně v mozku a v ledvinách, tato cesta pravděpodobně existuje pouze v těchto dvou orgánech. Na rozdíl od CBS a CTH je 3-MST regulován svým redox stavem spíše než nějakou interakcí s dalšími faktory. Na aktivním místě tohoto enzymu byly identifikovány 3 cysteiny citlivé k redox reakcím (Cys154, Cys247, Cys263). V souladu s tímto se zdá, že oxidační stres značně potlačuje aktivitu 3-MST tím, že dochází k oxidaci thiolů na těchto cysteinech (Calvert et al. 2010; Kimura 2010). Dále může ovlivnit tvorbu sulfanu pomocí 3-MST modulace aktivity CAT nebo DAO. Bylo například prokázáno, že aspartát, což je inhibitor CAT, silně inhibuje biosyntézu H_2S pomocí 3-MST (Akagi 1982; Shibuya et al. 2009a; Shibuya et al. 2009b). Také zvýšené hladiny intracelulárního Ca^{2+} vedly ke snížení aktivity CAT a tím pádem k produkci H_2S syntézy, opět nezávisle na kalmodulinu (Kimura 2011; Mikami et al. 2011). Přesný mechanismus však není znám.

3-MST je stejně jako CBS i CTH produkován v mnoha tkáních, především pak v kardiomyocytech, hepatocytech a v epitelu proximálních tubulů ledvin (Shibuya et al. 2009a; Shibuya et al. 2009b; Wiliński et al. 2011). Nedávné výzkumy prokázaly, že 3-MST by také mohl být zásadní pro biosyntézu sulfanu v mozku (viz výše) (Shibuya et al. 2009b). 3-MST se vyskytuje hlavně v mitochondriích savčích buněk, nicméně určitá hladina tohoto enzymu může být detekována také v cytoplasmě (Kimura 2011). Přesto se předpokládá, že produkce H₂S pomocí 3-MST probíhá v mitochondriích, protože koncentrace L-cysteinu jsou zde 3x vyšší než v cytoplasmě (Nagahara et al. 1998).



Obr. č. 14: Enzymatická i neenzymatická endogenní produkce H₂S u savců. Existují celkem 4 enzymatické cesty produkce sulfanu zahrnující CBS, CTH, 3-MST spojenou s CAT a 3-MST spojenou s DAO. První 3 cesty využívají jako substrát pro tvorbu sulfanu L-cystein, zatímco DAO lokalizovaný v peroxisomech (modrý kruh) může katalyzovat D-cystein na 3-MP, které může být dále transformováno na H₂S pomocí 3-MST. CBS a CTH produkují sulfan v cytosolu buněk, zatímco 3-MST hlavně v mitochondriích (růžový obdélník). Malá část endogenního sulfanu je odvozena z neenzymatické redukce za přítomnosti redukčních činidel jako NADPH a NADH, což vede k redukci persulfidů, thiosíranů a polysulfidů na H₂S a vedlejší produkty (zelený obdélník) (zdroj: Cao et al. 2018).

4 Metodika

4.1 Příprava vzorků

Kančí epididymis byl získán z ročního kance plemene Duroc z inseminační stanice Skršín. Pro izolaci spermií z nadvarlete byly obnaženy kanálky z caput, corpus i cauda epididymis. Z těchto částí byly následně odstříhnuty kratší úseky (zhruba 0,5x0,5 cm) tkáně obsahující nadvarletní kanálky, které byly následně inkubovány ve zkumavce s PBS v termostatu po dobu 30 minut. Během této doby došlo k vyplavání spermií do roztoku PBS, proto byla tekutina posléze odlita přes gázu do nových zkumavek, aby se eliminovala přítomnost jiných tkání. Pro dokonalejší odstranění nadbytečné tkáně byly vzorky následně 2x centrifugovány po dobu 5 minut při 50 xg (použita centrifuga MIKRO22, Hettich Zentrifugen, Německo). Poté byl odsán supernatant obsahující spermie. Pro důkaz enzymů využívající Western blot byla část supernatantu použita pro lyzaci, pro potřeby imunolokalizace byla provedena vlhká fixace.

4.1.1 Vlhká fixace

Pro zafixování spermií byl použito 3×10 ml supernatantu obsahujícího epididymální spermie z příslušných částí nadvarlete. Všechny tři typy zkumavek (se spermii z caput, corpus, cauda) byly centrifugovány při 300 xg po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Následně byl odsán supernatant a objem byl doplněn PBS do 10 ml, čímž došlo ke zředění suspenze spermií. Tytéž kroky byly zopakovány ještě 2×. Po posledním zředění PBS byly vzorky resuspendovány a následně zředěny až do koncentrace 5×10⁷ spermií/ml, která byla zkontrolována

ve světelném mikroskopu (Nikon YS100; Nikon, Japonsko) v Bürkerově komůrce.

Po dosažení požadované koncentrace bylo na sklíčka nanášeno 20 µl vzorku, ke kterým se následně přikápllo 50 µl aceton : metanolu (ředění 1:1). Před samotnou aplikací suspenze spermií byla na sklíčka nakreslena 2 kolečka pomocí PAP Pen (Sigma-Aldrich s.r.o., USA). Vzorky se nechaly inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Následně byly omyty v PBS a nechaly se zaschnout. Takto připravené vzorky epididymálních spermií z caput, corpus a cauda epididymis byly pro potřeby imunolokalizace uchovávány v lednici.

4.1.2 Lyzace vzorků

Supernatant obsahující epididymální spermie byl použit také pro lyzaci vzorků. Všechny 3 zkumavky obsahující 10 ml příslušného typu epididymálních spermií byly 3x centrifugovány při 300×g po dobu 10 minut. Po každé centrifugaci byl odsán supernatant a objem byl doplněn PBS do původních 10 ml. Po poslední centrifugaci byly vzorky resuspendovány a rozpipetovány do Eppendorfových zkumavek. Každá zkumavka obsahovala 1 ml suspenze spermií buď z caput, corpus nebo cauda. Vzorky byly následně centrifugovány 3× při 300×g po dobu 5 minut. Po první a druhé centrifugaci byl odsán supernatant a přikápnut PBS do objemu 1 ml. Po třetí centrifugaci byl pouze odsán supernatant. Pro přípravu vzorků na Western blot bylo k těmto vzorkům přikápnuto 100 µl neredukujícího vzorkového pufru. Poté byly vzorky vždy po 5 minutách hodinu vortexovány a mezi každým vortexováním byly uchovávány

v ledu. Po uplynutí této doby byly vzorky nejprve po dobu 5 minut povařeny a následně 5 minut centrifugovány při 10 000×g. Takto připravené vzorky byly uskladněny v mrazáku.

4.2 Imunolokalizace

4.2.1 Použité chemikálie a roztoky

Použité protilátky (všechny ThermoFisher Scientific, USA):

- **králičí primární protilátka anti-CBS** – CBS Polyclonal Antibody # PA5-22273
- **králičí primární protilátka anti-3-MST** – MPST Polyclonal Antibody # PA5-51548
- **myší primární protilátka anti-CTH** – CTH Monoclonal Antibody # MA5-38251
- **anti-rabbit sekundární protilátka** – Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-adsorbed Secondary Antibody # A-11008, konjugovaná s Alexa Fluor 488
- **anti-mouse sekundární protilátka** – Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody # A-11001, konjugovaná s Alexa Fluor 488

Další použité chemikálie:

- **PBS** – 0,01 M fosfátový pufr, Sigma-Aldrich, USA
- **SuperBlock** – ThermoFisher Scientific, USA
- **PNA s rhodaminem** – Rhodamine Peanut Agglutinin, Vector Laboratories, USA
- **Vectashield s DAPI** – Vector Laboratories, USA

4.2.2 Postup

Pro imunolokalizaci sulfan produkujících enzymů CBS, CTH a 3-MST byly použity vzorky spermií z caput, corpus a cauda epididymis, které byly připraveny vlhkou fixací. Vzorky byly nejprve omyty v PBS a poté byly na 10 minut vloženy do kyvety s vymraženým acetonem. Po dalším promytí vzorků PBS bylo na kontrolní i pokusné vzorky aplikováno 150 µl SuperBlocku, se kterým byly vzorky inkubovány po dobu 30 minut. Od této chvíle byly vzorky uchovávány ve vlhké komůrce, aby nedocházelo k jejich vysychání. Po uplynutí doby inkubace se SuperBlockem byly vzorky znovu omyty v PBS. Následně bylo na pokusné vzorky nanášeno 100 µl primární protilátky proti sulfan produkujícím enzymům. Primární protilátka proti CBS byla ředěna s PBS v poměru 1:100, anti-3-MST v poměru 1:200 a anti-CTH v poměru 1:700. Na kontrolní vzorky bylo nanášeno PBS, aby nedocházelo k jejich vysychání. Takto byly vzorky inkubovány přes noc v lednici při teplotě 4 °C. Druhý den byly vzorky omyty v PBS a následně bylo na kontrolní i pokusné vzorky nanášeno 100 µl odpovídající sekundární protilátky (anti-rabbit na CBS a 3-MST a anti-mouse na CTH) s konjugovanou fluorescenční barvou AlexaFluor 488 a ředěnou v poměru 1:300 s PBS. Od této chvíle bylo vždy použito tmavé víko vlhké komůrky, aby nedocházelo k vysvícení fluorochromů. Následovala hodinová inkubace se sekundární protilátkou a omytí nejprve PBS a následně destilovanou vodou. Pro obarvení akrozomů bylo na všechny vzorky aplikováno 100 µl PNA s Rhodaminem, které bylo ředěno s PBS v poměru 1:700. Vzorky byly opět inkubovány, tentokrát 30 minut, a následně omyty PBS a 3× destilovanou vodou. Jako poslední krok bylo aplikováno 10 µl montovacího média Vectashieldu s DAPI.

Vzorky byly poté snímány na konfokální mikroskopu (Ziss LSM 800, Německo) při zvětšení 630x. Intenzita signálu byla měřena analýzou obrazu NIS-Elements AR 4.30.01 (Nicon, Japonsko).

4.3 Western blot

4.3.1 Použité chemikálie a roztoky

Použité protilátky:

- **králičí primární protilátka anti-CBS** – CBS Polyclonal Antibody # PA5-22273, ThermoFisher Scientific, USA
- **králičí primární protilátka anti-3-MST** – MPST Polyclonal Antibody # PA5-51548, ThermoFisher Scientific, USA
- **myší primární protilátka anti-CTH** – CTH Monoclonal Antibody # MA5-38251, ThermoFisher Scientific, USA
- **anti-rabbit sekundární protilátka** – IgM Antibody Goat anti Rabbit IgM 402001, konjugovaná s křenovou peroxidázou, Bio-Rad Laboratories, USA
- **anti-mouse sekundární protilátka** – IgM Antibody Goat anti Mouse IgM 102001, konjugovaná s křenovou peroxidázou, Bio-Rad Laboratories, USA

Další použité chemikálie:

- **PBS** – 0,01 M fosfátový pufr, Sigma-Aldrich, USA
- **neredukující vzorkový pufr** - 2 ml glycerol, 4 ml 10% SDS, 1,6 ml 0,5 M TRIS.HCL, pH 6,8, 0,5 mg bromfenolové modři
- **pufr B** – 1,5 M Tris, Bio-Rad Laboratories, USA
- **10% SDS** – 10% dodecylsírán sodný, Bio-Rad Laboratories, USA
- **TEMED** – PlusOne, USA
- **roztok A** – 30% roztok akrylamidu, Sigma-Aldrich, USA
- **proteinový molekulový standard** – Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad Laboratories, USA
- **sušené mléko** – Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad Laboratories, USA
- **10% APS** – 1 g persíranu amonného, 10 ml destilované vody
- **pufr C** – 0,5 M Tris, Bio-Rad Laboratories, USA
- **ELFO pufr** – 15 g Tris, 72 g glycin, 5 g SDS, 1 l destilovaná voda, ředění 1:4
- **blotovací pufr** – 3,03 g Tris, 14,4 g glycin, 800 ml destilovaná voda, 200 ml metanol
- **Ponceau S solution** – Sigma-Aldrich, USA
- **PBS s 0,1% Tweenem** – Tween 20, Sigma-Aldrich, USA
- **chemiluminiscenční substrát** – SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, ThermoFisher Scientific, USA
- **alfa-tubulin** – Sigma-Aldrich, USA

4.3.2 Postup

Nejprve byl připraven 15 % separační gel. Pro jeho přípravu bylo použito 2,5 ml destilované vody, 2,5 ml pufru B, 5 ml roztoku A, 100 μ l 10% SDS, 4,5 μ l TEMED a 70 μ l 10% APS. Pro přípravu 1 gelu bylo použito 5 ml tohoto roztoku. Po naplnění skel roztokem byl separační gel převrstven destilovanou vodou a po 20 minutách došlo ke ztuhnutí gelu. Následně byl připraven zaostřovací gel, pro jehož přípravu bylo použito 1,52 ml vody, 0,625 ml pufru C, 0,325 ml roztoku A, 0,025 ml 10% SDS, kapka bromfenolové modři, 3,8 μ l TEMED a 50 μ l 10% APS. Destilovaná voda ze ztuhlých gelů byla vylita a nahrazena separačním gelem, do kterého byly aplikovány hřebínky s 15 žlábků. Po 15minutové polymeraci gelu byly hřebínky vysunuty a skla s gely byla přesunuta do soupravy na elektroforézu (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Celá souprava byla následně zalita ELFO pufrem. Do prvního žlábků byly Hamiltonovou pipetou nanášeny 4 μ l proteinového molekulového standardu, do druhého 10 μ l vzorku z caput epididymis, do třetího 10 μ l vzorku z corpus epididymis a do čtvrtého 10 μ l vzorku z cauda epididymis. Jako poslední bylo do pátého žlábků nanášeno 10 μ l vzorku neredukujícího vzorkového pufru. Těchto 5 žlábků bylo použito pro důkaz 1 enzymu a stejným postupem byly připraveny žlábků pro další 2 enzymy. Následovala elektroforéza. Parametry pro elektroforézu byly následující: elektrické napětí velikosti 80 V po dobu 20 minut, dalších 60 minut o velikosti 120 V.

Mezitím byla připravena souprava pro elektroblotting, která byla 15 minut před použitím namočená do blotovacího pufru. Z gelu byl po elektroforéze odstraněn zaostřovací gel a separační gel byl přenesen do blotovací kazety v tomto sestavení: kazeta, houbička, 2 filtrační papíry Whatman (Chromatography paper, GE Healthcare), gel, PVDF membrána (ThermoFisher Scientific, USA), 2 filtrační papíry Whatman (Chromatography paper; GE Healthcare, USA), kazeta. Celá sestava se vložila do blotovacího rámu a ten do vaničky s blotovacím pufrem. Vanička byla obložena ledem, aby docházelo ke chlazení soustavy během elektroblottingu. Elektroblotting probíhal po dobu 60 minut při 500 mA. Poté byla membrána opláchnuta destilovanou vodou a obarvena Ponceau pro vizualizaci proteinů přenesených na membránu.

Po vizualizaci byla membrána opláchnuta v PBS a vložena do rozmíchaného 5% roztoku sušeného mléka pro vyblokování nespecifických vazeb. Inkubace v mléce probíhala 1 hodinu. Poté byla membrána 2 \times promývána v PBS s 0,1% Tweenem po dobu 5 minut a následovala aplikace 2 ml ředěné primární protilátky. Všechny primární protilátky byly ředěny v poměru 1:1000 s PBS. Inkubace v primární protilátce trvala 90 minut, poté byla membrána promyta 3 \times po 10 minutách v PBS s 0,1% Tweenem a následovala aplikace 2 ml sekundární protilátky s ředěním 1:3000 s PBS. Po 60minutové inkubaci se sekundární protilátkou byla membrána 4 \times omývána v PBS s 0,1% Tweenem a 2 \times v PBS, to vše po dobu 5 minut. Všechny inkubace probíhaly na rotační třepačce (DLAB, MX-T6-Pro).

Následovala vizualizace detekce sulfan produkujících enzymů. Na každou membránu byl nanášen 1 ml chemiluminiscenčního substrátu. K vizualizaci byl použit AZURE c600 (Azure Biosystems, USA).

4.4 Statistické vyhodnocení

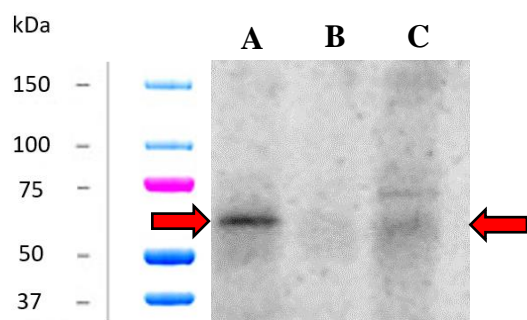
Experimenty byly 3x zopakovány. Pomocí analýzy obrazu byly stanoveny průměrné intenzity signálu u každé varianty vzorků (CBS - caput, corpus, cauda; CTH - caput, corpus, cauda; 3-MST - caput, corpus, cauda). Rozdíly mezi pokusnými skupinami byly vyhodnoceny v programu Statistica 12 (StatSoft CR, Česká republika) jednofaktorovou ANOVou při hladině statistické významnosti $p < 0,05$. Jako kontrolní metoda byl proveden Western blot. Výsledky z této metody byly denzitometricky zpracovány v programu Image Studio Lite Verze 5.2. (LI-COR Biosciences, USA).

5 Výsledky

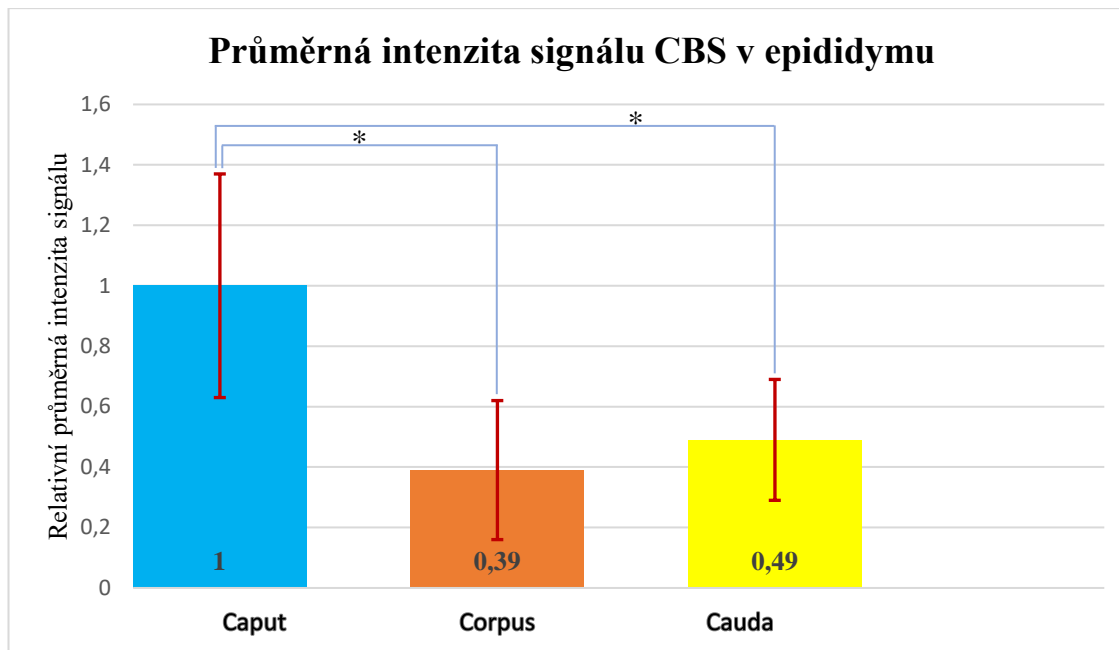
Imunolokalizační metodou byly v caput, corpus a cauda epididymis sledovány celkem 3 sulfan produkující enzymy (CBS, CTH a 3-MST). Ve všech částech kančího epididymu byly prokázány všechny hledané sulfan produkující enzymy, nicméně intenzita signálu se v rámci jednotlivých enzymů v různých částech epididymu lišila. Obecně lze říci, že nejvyšší průměrnou intenzitu signálu vykazovaly sulfan produkující enzymy v caput epididymis a nejmenší v cauda epididymis (Obr. č. 16, 19, 22). Sulfan produkující enzymy se vyskytovaly především v bičíku a krčku epididymálních spermií, oproti tomu u hlaviček spermií nebyl signál zaznamenán (Obr. č. 17, 20, 23). Kontrolní metoda (Western blot) výskyt sulfan produkujících enzymů ve všech částech epididymu sice potvrdila, ale jednotlivé vzorky neobsahovaly stejné množství proteinů. Western blotem byly prokázány enzymy o molekulové hmotnosti 63 kDa (odpovídající CBS), 44 kDa (CTH) a 33 kDa (3-MST) (Obr. č. 15, 18, 21).

5.1 Cystathionin β -syntáza (CBS)

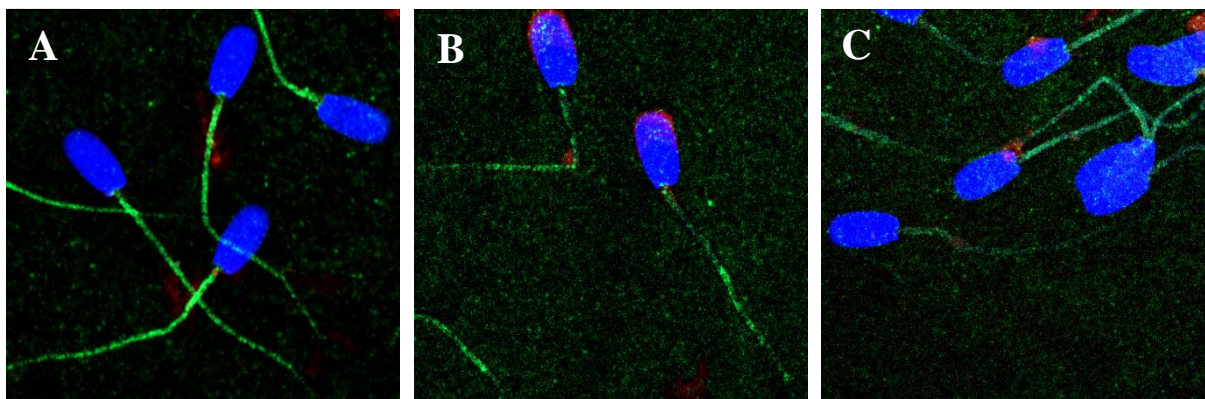
CBS byl u epididymálních spermií detekován ve všech částech nadvarlete (Obr. č. 15), přičemž se zdá, že v průběhu epididymální maturace dochází ke snižování výskytu tohoto enzymu v epididymálních spermiích (Obr. č. 16, 17). Byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi pokusnou skupinou z caput a corpus epididymis, kde došlo ke snížení průměrné intenzity signálů o 61 %, a poté mezi caput a cauda epididymis, kde byla průměrná intenzita signálu nižší o 51 %. Rozdíl v intenzitě signálu mezi corpus a cauda epididymis nebyl signifikantní (Obr. č. 16). Na Obr. č. 17 je patrné, že CBS je lokalizován především v krčku a bičíku epididymálních spermií.



Obr. č. 15: CBS v extraktech kančích epididymálních spermií. A – spermie z caput epididymis; B – spermie z corpus epididymis; C – spermie z cauda epididymis. Šipky značí bandy odpovídající CBS (63 kDa).



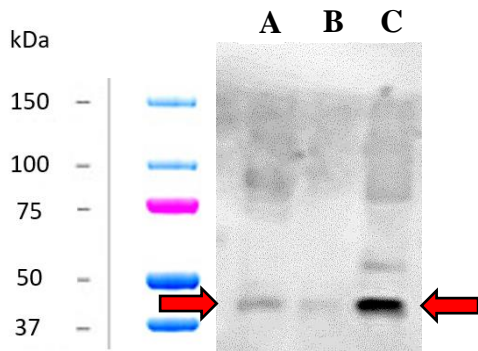
Obr. č. 16: Relativní průměrná intenzita signálu CBS v caput, corpus a cauda epididymis. CBS – cystathionin- β -syntáza. Hvězdičky (*) znázorňují statisticky významný rozdíl, červené úsečky značí směrodatné odchylky.



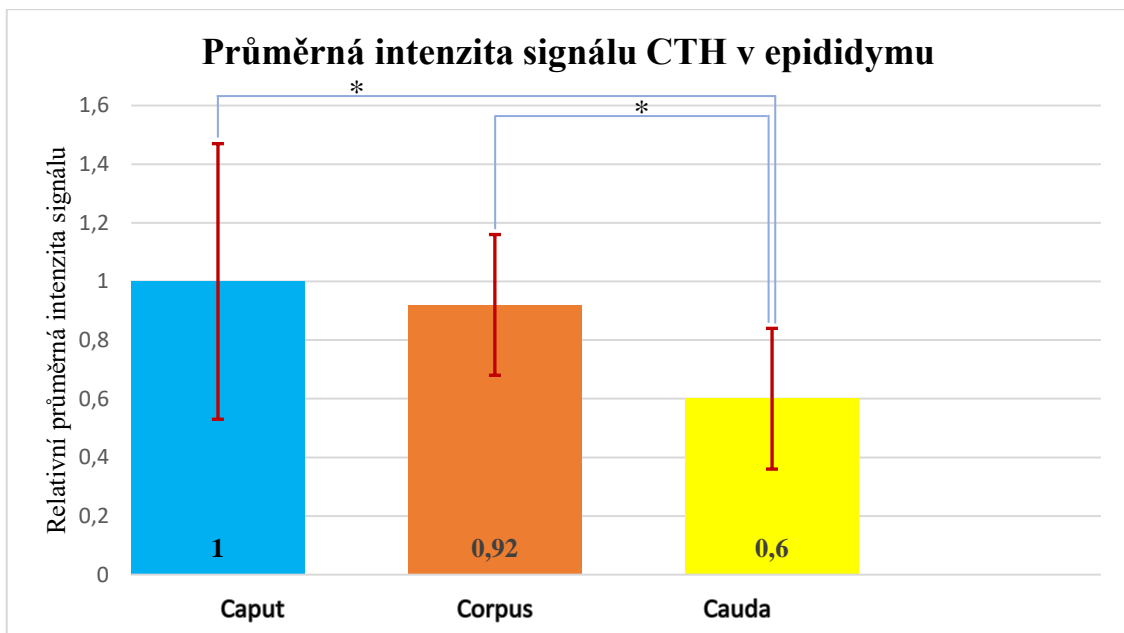
Obr. č. 17: CBS v caput (A), corpus (B) a cauda (C) epididymis. Modře chromatin (DAPI), zeleně CBS (Alexa Fluor 488), červeně akrozom (PNA). Zvětšení 630x.

5.2 Cystathionin γ -lyáza (CTH)

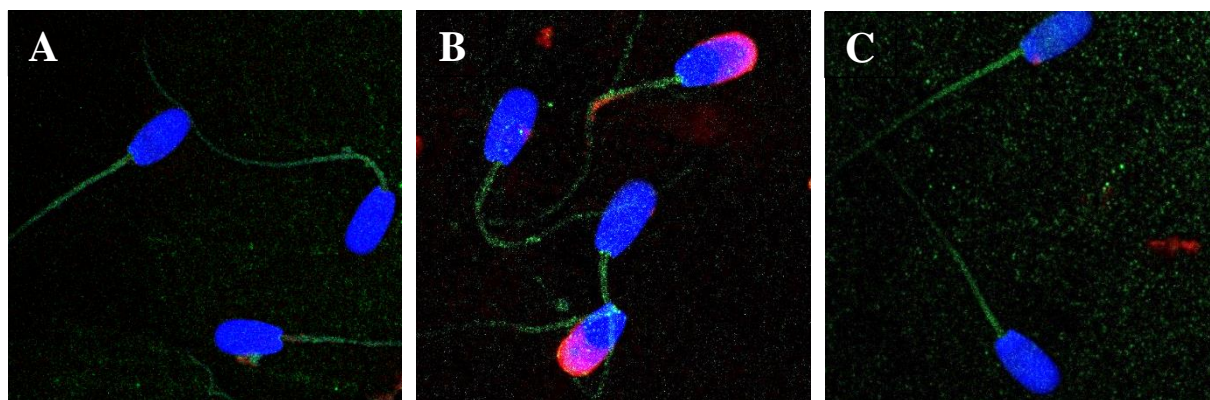
Ve všech částech epididymu byl také prokázán enzym CTH (Obr. č. 18). U tohoto enzymu byly nejvyšší průměrné intenzity naměřeny v caput a corpus epididymis, mezi nimiž nebyl statisticky významný rozdíl. Nejmenší průměrná intenzita byla naměřena v cauda epididymis. Rozdíl mezi průměrnou intenzitou v cauda a caput epididymis a také mezi cauda a corpus epididymis statisticky významný. Zde došlo ke snížení průměrné intenzity signálu o 51 % (Obr. č. 19, 20). Také CTH je lokalizován hlavně v bičíku a krčku spermií (Obr. č. 20).



Obr. č. 18: CTH v extraktech kančích epididymálních spermíí. A – spermie z caput epididymis; B – spermie z corpus epididymis; C – spermie z cauda epididymis. Šípky značí bandy odpovídající CTH (44 kDa).



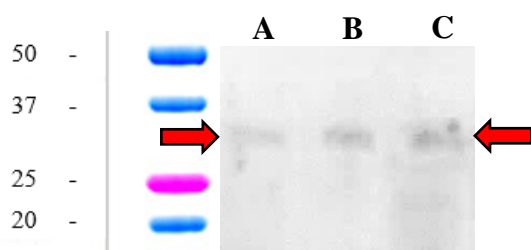
Obr. č. 19: Relativní průměrná intenzita signálu CTH v caput, corpus a cauda epididymis. CTH – cystathionin- γ -lyáza. Hvězdičky (*) znázorňují statisticky významný rozdíl, červené úsečky značí směrodatné odchylky.



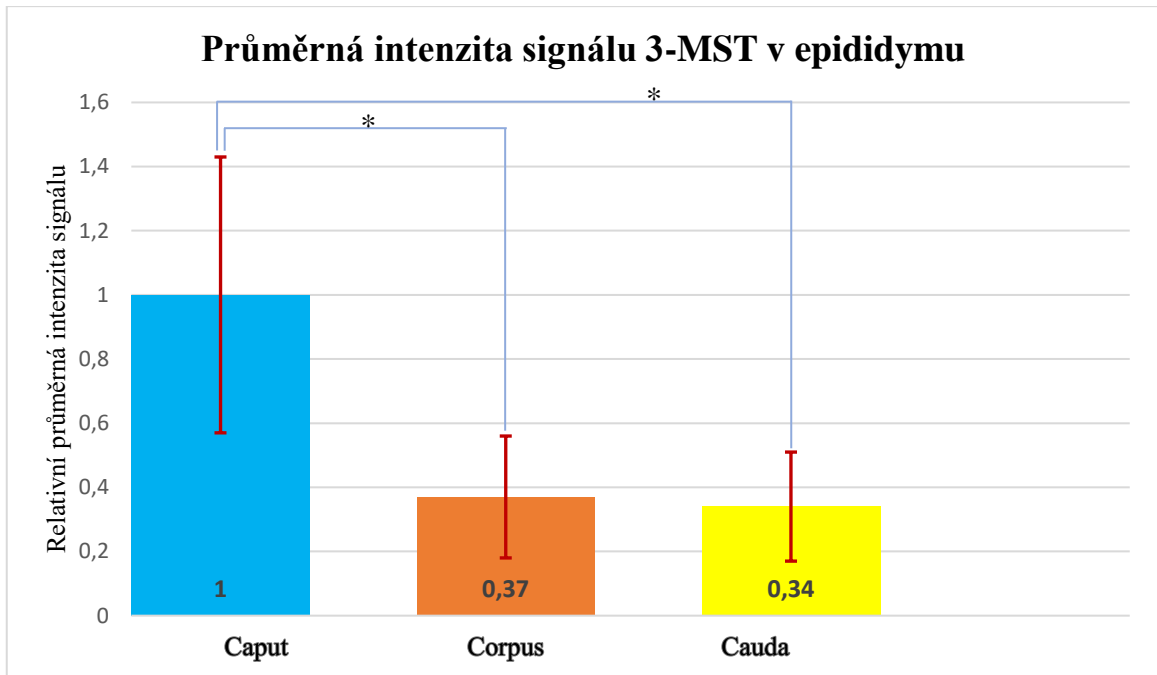
Obr. č. 20: CTH v caput (A), corpus (B) a cauda (C) epididymis. Modře chromatin (DAPI), zeleně CBS (Alexa Fluor 488), červeně akrozom (PNA). Zvětšení 630x.

5.3 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (3-MST)

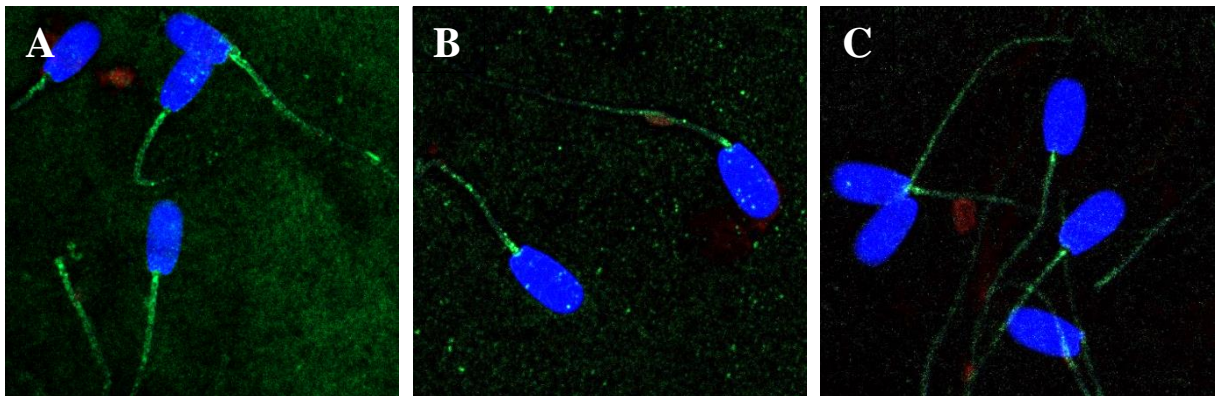
Posledním sledovaným enzymem byl 3-MST, který byl taktéž ve všech částech nadvarlete prokázán (Obr. č. 21). Nejvyšší průměrná intenzita signálu tohoto enzymu byla naměřena v caput epididymis, nejmenší v cauda epididymis (Obr. č. 22). Mezi variantami z corpus a cauda epididymis nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl. Nicméně mezi corpus a caput epididymis a cauda a caput epididymis byl rozdíl signifikantní. Došlo zde ke snížení průměrné intenzity signálu o 63 %, resp. o 66 % (Obr. č. 22). Také na fotkách z konfokálního mikroskopu je patrné snížení intenzity signálu 3-MST v corpus a cauda oproti caput epididymis (Obr. č. 23). Na Obr. č. 23 je patrné, že hlavní místo výskytu tohoto enzymu je na bičíku a krčku epididymálních spermií.



Obr. č. 21: 3-MST v extraktech kančích epididymálních spermií. A – spermie z caput epididymis; B – spermie z corpus epididymis; C – spermie z cauda epididymis. Šipky značí bandy odpovídající 3-MST (33 kDa).



Obr. č. 22: Relativní průměrná intenzita signálu 3-MST v caput, corpus a cauda epididymis. 3-MST – 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza. Hvězdičky (*) znázorňují statisticky významný rozdíl, červené úsečky značí směrodatné odchylky.



Obr. č. 23: 3-MST v caput (A), corpus (B) a cauda (C) epididymis. Modře chromatin (DAPI), zeleně CBS (Alexa Fluor 488). Zvětšení 630x.

6 Diskuse

Cílem práce bylo prokázat sulfan produkující enzymy ve spermiích v caput, corpus a cauda epididymis a tím přiblížit funkci a vliv sulfanu na spermie v průběhu epididymální maturace. Naše výsledky přítomnost sulfan produkujících enzymů v kančích epididymálních spermiích potvrdily, nicméně přítomnost sulfan produkujících enzymů se oproti předpokladu v průběhu epididymální maturace snižovala. Dalším zajímavým zjištěním bylo to, že oproti CBS a 3-MST nedošlo u CTH k významnému snížení výskytu v corpus, ale až v cauda epididymis. Zatím neexistují studie, které by se tímto enzymem v souvislosti s epididymální maturací u spermií zabývaly, nicméně je možné, že CTH je hlavním sulfan produkujícím enzymem v corpus epididymis.

I přesto, že byla přítomnost sulfan produkujících enzymů popsána v ejakulovaných a kapacitovaných spermiích (Pilsová 2019; Pilsová 2019; Zelinková 2019), není mnoho studií zabývajících se expresí enzymů ve spermiích v jednotlivých úsecích epididymu. Zajímavé jsou však výsledky experimentu, který provedl Gao et al. (2019), jenž se zaměřil na produkci CBS a CTH přímo v epididymální tkáni u myši. Z výsledků bylo zřejmé, že se CBS i CTH v průběhu epididymální maturace v epididymální tkáni zvyšují. Z výše uvedeného výzkumu ještě vyplývá funkce sulfanu v epididymu. Již dříve bylo zjištěno, že sulfan má vliv na K_{ATP} a BK_{CA} kanály (d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2009, Li et al. 2012), které jsou zodpovědné za zvýšenou sekreci K^+ v epididymální tekutině. V předchozích výzkumech bylo u myši potvrzeno postupné zvyšování koncentrace tohoto iontu od caput směrem ke cauda epididymis (Hinton et Palladino 1995), K^+ je mimo jiné částečně zodpovědný za udržení dormantního stavu spermií před ejakulací (Gao et al. 2019). Všechny tyto poznatky naznačují, že zvyšující se koncentrace sulfanu pozitivně ovlivňuje sekreci K^+ působením na K_{ATP} a BK_{CA} kanály, a to směrem od caput po cauda epididymis. Gao et al. (2019) toto potvrdil a jeho výsledky zároveň naznačují, že K^+ je důležitým faktorem přispívajícím k anabióze spermií před jejich ejakulací, a to nezávisle na sníženém pH, které je taktéž pro tento stav potřebné.

Sulfan by k anabióze mohl nicméně přispívat i tím, jak působí na motilitu spermií. Mnohými studiemi bylo potvrzeno, že vysoké koncentrace sulfanu snižují motilitu spermií (Hammoud et al. 2010; Birdsall 2015; Fathi et al. 2015; Wijesekara et al. 2015; Centola et al. 2016). Některé výzkumy však potvrzují, že sulfan má na motilitu asthenozoospermií pozitivní vliv (Wang et al. 2018). Další studie, které pracovaly s donory sulfanu (Na_2S a GYY4137) prokázaly, že vliv sulfanu na motilitu spermií závisí na rychlosti uvolňování této molekuly. Na_2S (vede k rychlému uvolnění sulfanu) snižoval motilitu (Zhao et al. 2016), zatímco GYY4137 (pomalé uvolňování sulfanu) podporoval signální dráhu vedoucí ke zvýšení motility spermií (Xia et al. 2019). Je tedy možné, že nižší koncentrace sulfan produkujících enzymů vyskytujících se v tkáni caput epididymis mohou podporovat zrání spermií ve smyslu rozvoje motility spermií, zatímco vyšší koncentrace sulfanu v cauda epididymis motilitu snižují a společně s K^+ navozují dormantní stav spermií.

Vzhledem k tomu, že v našich experimentech docházelo ke snižování sulfan produkujících enzymů v průběhu epididymální maturace, bylo by třeba objasnit, proč se přítomnost těchto enzymů ve spermiích oproti předpokladu snižoval. Odpovědí by mohl být ubiquitin-proteazomový systém, jehož přítomnost byla v epididymu prokázána (Sutovsky et al. 2001; Cooper et al. 2002). V průběhu epididymální maturace dochází k odbourávání různých

proteinů pomocí UPS, a to dokonce mnohem více, než například ve varleti (Sutovsky et al. 2001). Je tedy možné že by spermie transportované z varlete do caput epididymis obsahovaly nejvíce sulfan produkujících enzymů, jenž by byly v průběhu epididymální maturace odstraněny právě pomocí UPS, což by vysvětlovalo nejnižší průměrné intenzity signálu sulfan produkujících enzymů v cauda epididymis. Bylo také prokázáno, že u patologických spermií dochází k častější ubiquitinaci a degradaci gamet (Sutovsky et al. 2001). Vzhledem k tomu, že námi získané epididymální spermie pocházely od kance s 20% podílem morfologicky špatných spermií, je možné, že došlo k výraznější ubiquitinaci spermií, čímž mohly být výsledky zkresleny.

Pokud by opravdu docházelo ke snižování sulfan produkujících enzymů tímto způsobem, bylo by vhodné provést podobné experimenty v inhibovaném UPS v epididymálních spermiích získaných od kance s kvalitním ejakulátem a tyto výsledky porovnat. Další experimenty by také mohly být zaměřeny na průkaz sulfan produkujících enzymů přímo v tkáni kančího nadvarlete. Je totiž možné, že hlavním producentem sulfanu jsou v epididymu epiteliální a hladkosvalové buňky nadvarletních kanálků, jak naznačuje Gao et al. (2019), a ne sulfan produkující enzymy přítomné ve spermiích. V neposlední řadě by bylo třeba objasnit rozdílnou expresi a funkci CTH oproti zbylým dvěma sulfan produkujícím enzymům v corpus epididymis, a to například u zvířat s knockoutovaným genem pro CTH. Z dosavadních výsledků však vyplývá, že by sulfan mohl ovlivňovat metabolismus epididymálních spermií a přispět k jejich udržení v dormantním stádiu.

7 Závěr

Sulfan produkující enzymy CBS, CTH a 3-MST byly prokázány ve spermiích všech částí kančího epididymu, čímž byla potvrzena první stanovená hypotéza. Druhá hypotéza byla však vyvrácena, protože se výskyt všech sulfan produkujících enzymů v epididymálních spermiích snižoval. Intenzita signálu byla u všech pozorovaných enzymů nejvyšší v caput epididymis, u CBS a 3-MST byl pozorován statisticky významný rozdíl v intenzitách signálu mezi spermiemi z caput a corpus epididymis a také mezi caput a cauda epididymis. U CTH byl statisticky významný rozdíl zjištěn mezi caput a cauda epididymis a na rozdíl od CBS a 3-MST také mezi corpus a cauda epididymis. Rozdíl mezi caput a corpus epididymis nebyl u CTH pozorován. Z uvedených výsledků se zdá, že CBS a 3-MST jsou sulfan produkující enzymy exprimované především v caput epididymis a následně jejich produkce klesá. Oproti tomu CTH je zřejmě hlavním sulfan produkujícím enzymem v corpus epididymis. Všechny enzymy byly lokalizovány v bičíku a krčku epididymálních spermií. Uvedené výsledky naznačují, že sulfan produkující enzymy hrají v průběhu epididymální maturace svou roli, nicméně bylo by vhodné výsledky potvrdit dalšími experimenty. V dalších výzkumech by bylo vhodné se zaměřit na expresi těchto enzymů ve tkáni všech třech částech epididymu a tím ověřit podíl nadvarleční tkáně a sulfanu samotného na regulaci metabolismu spermií v průběhu epididymální maturace.

8 Literatura

- Abe K, Kimura H. 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of Neuroscience* **16**:1066-1071.
- Acott T, Hoskins D. 1981. Bovine Sperm Forward Motility Protein: Binding to Epididymal Spermatozoa. *Biology of Reproduction* **24**:234-240.
- Aggarwal B, Kunnumakkara A, Harikumar K, Gupta S, Tharakan S, Koca C, Dey, Sung B. 2009. Signal Transducer and Activator of Transcription-3, Inflammation, and Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1171**:59-76.
- Agrawal N, Banerjee R, Cobine P. 2008. Human Polycomb 2 Protein Is a SUMO E3 Ligase and Alleviates Substrate-Induced Inhibition of Cystathionine β -Synthase Sumoylation. *PLoS ONE* **3**:e4032.
- Aguas A, Pinto da Silva P. 1985. The acrosomal membrane of boar sperm: a Golgi-derived membrane poor in glycoconjugates. *Journal of Cell Biology* **100**:528-534.
- Aitken R, Nixon B, Lin M, Koppers A, Lee Y, Baker M. 2007. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian Journal of Andrology* **9**:554-564.
- Akagi R. 1982. Purification and characterization of cysteine aminotransferase from rat liver cytosol. *Acta medica Okayama* **36**:187-197.
- Akintayo A, Légaré C, Sullivan R, Lobaccaro J. 2015. Dicarboxyl L-Xylulose Reductase (DCXR), a “Moonlighting Protein” in the Bovine Epididymis. *PLOS ONE* **10**:e0120869.
- Allison AC, Hartree EF. 1970. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *Reproduction* **21**:501-515.
- Anakwe O, Gerton G. 1990. Acrosome biogenesis begins during meiosis - evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea-pig spermatogenesis. *Biology of Reproduction* **42**:317 - 328.
- Asquith K, Harman A, McLaughlin E, Nixon B, Aitken R. 2005. Localization and Significance of Molecular Chaperones, Heat Shock Protein 1, and Tumor Rejection Antigen gp96 in the Male Reproductive Tract and During Capacitation and Acrosome Reaction1. *Biology of Reproduction* **72**:328-337.
- Au C et al. 2015. Compartmentalization of membrane trafficking, glucose transport, glycolysis, actin, tubulin and the proteasome in the cytoplasmic droplet/Hermes body of epididymal sperm. *Open Biology* **5**.
- Austin C. 1951. Observations on the Penetration of the Sperm into the Mammalian Egg. *Australian Journal of Biological Sciences* **4**:581-596.
- Awano M, Kawaguchi A, Mohri H. 1993. Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. *Reproduction* **99**:375-383.

- Baarends W, van der Laan R, Grootegoed J. 2000. Specific aspects of the ubiquitin system in spermatogenesis. *Journal of Endocrinological Investigation* **23**:597-604.
- Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, Toyoda Y. 1994. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *Journal of Biological Chemistry* **269**:31845 - 31849.
- Baker M, Witherdin R, Hetherington L, Cunningham-Smith K, Aitken R. 2005. Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **5**:1003-1012.
- Baro Graf C, Ritagliati C, Stival C, Balestrini P, Buffone M, Krapf D. 2019. Determination of a Robust Assay for Human Sperm Membrane Potential Analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **7**.
- Bartholomew T, Powell. G, Dodgson K, Curtis C. 1980. Oxidation of sodium sulphide by rat liver, lungs and kidney. *Biochemical Pharmacology* **29**:2431-2437.
- Beauchamp R, Bus J, Popp J, Boreiko C, Andjelkovich D. 1984. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* **13**:25 - 97.
- Bebington C. 2001. The possible biological and reproductive functions of ubiquitin. *Human Reproduction Update* **7**:102-111.
- Bedford J. 2014. Singular features of fertilization and their impact on the male reproductive system in eutherian mammals. *Reproduction* **147**:R43-R52.
- Bedford J. 1965. Changes in fine structure of the rabbit sperm head during passage through the epididymis. *Journal of Anatomy* **99**:891-906.
- Bedford J, Calvin H. 1974. Changes in -S-S- linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observations in sub-mammalian species. *Journal of Experimental Zoology* **187**:181-203.
- Belleannée C. 2015. Extracellular microRNAs from the epididymis as potential mediators of cell-to-cell communication. *Asian Journal of Andrology* **0**:730-736.
- Belleannée C, Calvo É, Caballero J, Sullivan R. 2013. Epididymosomes Convey Different Repertoires of MicroRNAs Throughout the Bovine Epididymis1. *Biology of Reproduction* **89**:30.
- Bełtowski J. 2010. Hypoxia in the Renal Medulla: Implications for Hydrogen Sulfide Signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **334**:358-363.
- Beltrán C, Treviño C, Mata-Martínez E, Chávez J, Sánchez-Cárdenas C, Baker M, Darszon A. 2016. Role of Ion Channels in the Sperm Acrosome Reaction. Pages 35-69 in M. Buffone, editor. *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*, 1 edition. Springer International Publishing, Cham.
- Benavides G, Squadrito G, Mills R, Patel H, Isbell T, Patel R, Darley-USmar V, Doeller J, Kraus D. 2007. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**:17977-17982.

- Berruti G, Paiardi C. 2011. Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis* **1**:95 - 98.
- Berruti G, Paiardi C. 2015. USP8/UBPy-regulated sorting and the development of sperm acrosome: the recruitment of Met. *Reproduction* **149**:633-644.
- Berruti G, Ripolone M, Ceriani M. 2010. USP8, a Regulator of Endosomal Sorting, Is Involved in Mouse Acrosome Biogenesis Through Interaction with the Spermatid ESCRT-0 Complex and Microtubules1. *Biology of Reproduction* **82**:930-939.
- Bhatia M. 2005. Hydrogen sulfide as a vasodilator. *IUBMB Life* **57**:603-606.
- Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman W, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J. 2009. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* **25**:1091-1093.
- Bir S, Kolluru G, McCarthy P, Shen X, Pardue S, Pattillo C, Kevil C. 2012. Hydrogen Sulfide Stimulates Ischemic Vascular Remodeling Through Nitric Oxide Synthase and Nitrite Reduction Activity Regulating Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Vascular Endothelial Growth Factor–Dependent Angiogenesis. *Journal of the American Heart Association* **1**:e004093.
- Birdsall MA. 2015. Sperm quality in New Zealand: Is the downward trend continuing? *New Zealand Medical Journal* **128**:50-56.
- Björkgren I, Gylling H, Turunen H, Huhtaniemi I, Strauss L, Poutanen M, Sipilä P. 2014. Imbalanced lipid homeostasis in the conditional Dicer1 knockout mouse epididymis causes instability of the sperm membrane. *The FASEB Journal* **29**:433-442.
- Bostelaar T, Vitvitsky V, Kumutima J, Lewis B, Yadav P, Brunold T, Filipovic M, Lehnert N, Stemmler T, Banerjee R. 2016. Hydrogen Sulfide Oxidation by Myoglobin. *Journal of the American Chemical Society* **138**:8476-8488.
- Braunstein A, Goryachenkova E, Lac N. 1969. Reactions catalysed by serine sulfhydryase from chicken liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **171**:366-368.
- Braunstein A, Goryachenkova E, Tolosa E, Willhardt I, Yefremova L. 1971. Specificity and some other properties of liver serine sulphhydryase: Evidence for its identity with cystathionine β -synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **242**:247-260.
- Breton S, Ruan Y, Park Y, Kim B. 2016. Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis. *Asian Journal of Andrology* **18**:3-9.
- Buck J, Sinclair M, Schapal L, Cann M, Levin L. 1999. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**:79-84.
- Buffone M, Foster J, Gerton G. 2008. The role of the acrosomal matrix in fertilization. *The International Journal of Developmental Biology* **52**:511-522.
- Buffone M, Hirohashi N, Gerton G. 2014. Unresolved Questions Concerning Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis1. *Biology of Reproduction* **90**:1-8.

- Caballero J, Frenette G, D'Amours O, Belleannée C, Lacroix-Pepin N, Robert C, Sullivan R. 2012. Bovine sperm raft membrane associated Glioma Pathogenesis-Related 1-like protein 1 (GliPr1L1) is modified during the epididymal transit and is potentially involved in sperm binding to the zona pellucida. *Journal of Cellular Physiology* **vol. 227**:3876-3886.
- Cai W, Wang M, Moore P, Jin H, Yao T, Zhu Y. 2007. The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation. *Cardiovascular Research* **76**:29-40.
- Calvert J, Coetzee W, Lefer D. 2010. Novel Insights Into Hydrogen Sulfide–Mediated Cytoprotection. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**:1203-1217.
- Calvin H, Bedford J. 1971. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **13**:65-75.
- Calvo A, Pastor L, Bonet S, Pinart E, Ventura M. 2000. Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis. *Reproduction* **120**:325-335.
- Camatini M, Colombo A, Bonfanti P. 1992. Cytoskeletal elements in mammalian spermiogenesis and spermatozoa. *Microscopy Research and Technique* **20**:232-250.
- Cao W, Gerton G, Moss S. 2006. Proteomic Profiling of Accessory Structures from the Mouse Sperm Flagellum. *Molecular & Cellular Proteomics* **5**:801-810.
- Cao X, Wu Z, Xiong S, Cao L, Sethi G, Bian J. 2018. The role of hydrogen sulfide in cyclic nucleotide signaling. *Biochemical Pharmacology* **149**:20-28.
- Centola GM, Blanchard A, Demick J, Li S, Eisenberg ML. 2016. Decline in sperm count and motility in young adult men from 2003 to 2013: observations from a U.S. sperm bank. *Andrology* **4**:270-276.
- Cerda-Colón J, Silfa E, López-Garriga J. 1998. Unusual Rocking Freedom of the Heme in the Hydrogen Sulfide-Binding Hemoglobin from *Lucina pectinata*. *Journal of the American Chemical Society* **120**:9312-9317.
- Ciechanover A, Masucci M. 2002. *The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic System: From Classical Biochemistry to Human Diseases*, 1 edition. World Scientific Publishing Company, Singapore.
- Clermont Y, Leblond C. 1955. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the 'periodic acid-schiff' technique. *American Journal of Anatomy* **96**:229-253.
- Cohen-Kaplan V, Livneh I, Avni N, Cohen-Rosenzweig C, Ciechanover A. 2016. The ubiquitin-proteasome system and autophagy: Coordinated and independent activities. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **79**:403-418.
- Cooper T, Yeung C, Jones R, Orgebin-Crist M. 2002. Rebuttal of a role for the epididymis in sperm quality control by phagocytosis of defective sperm. *Journal of Cell Biology* **115**:5-7.

- Cooper T. 2010. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian Journal of Andrology* **13**:130-138.
- Coux O, Tanaka K, Goldberg A. 1996. Structure and Functions of the 20S and 26S Proteasomes. *Annual Review of Biochemistry* **65**:801-847.
- Cross N. 1998. Role of Cholesterol in Sperm Capacitation1. *Biology of Reproduction* **59**:7-11.
- Cuasnicu P, Cohen C, Ellerman D, Busso D, Da Ros V, Morgenfel M. 2002. Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation. Pages 389-403 in *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*, 1 edition.. Springer, Boston, MA, Boston.
- D'Amours O, Frenette G, Bordeleau L, Allard N, Leclerc P, Blondin P, Sullivan R. 2012. Epididymosomes Transfer Epididymal Sperm Binding Protein 1 (ELSPBP1) to Dead Spermatozoa During Epididymal Transit in Bovine1. *Biology of Reproduction* **87**:94.
- Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Treviño C. 2011. Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiological Reviews* **91**:1305-1355.
- De Franca L, Ye S, Ying L, Sandberg M, Russell L. 1995. Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. *The Anatomical Record* **241**:181-204.
- de Mateo S, Castillo J, Estanyol J, Ballescà J, Oliva R. 2011. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. *Proteomics* **11**:2714-2726.
- Demarco I, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, de la Vega-Beltrán J, Hockensmith J, Kopf G, Darszon A, Visconti P. 2003. Involvement of a Na⁺/HCO⁻ Cotransporter in Mouse Sperm Capacitation. *Journal of Biological Chemistry* **278**:7001-7009.
- d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Maffia P, Mirone V, Imbimbo C, Fusco F, De Palma R, Ignarro L, Cirino G. 2009. Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:4513-4518.
- d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Mirone V, Cirino G. 2011. Hydrogen sulfide and erectile function: a novel therapeutic target. *Nature Reviews Urology* **8**:286 - 289.
- Dias G, López M, Ferreira A, Chapeaurouge D, Rodrigues A, Perales J, Retamal C. 2014. Thiol-disulfide proteins of stallion epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **145**:29-39.
- Distrutti E et al. 2005. Evidence That Hydrogen Sulfide Exerts Antinociceptive Effects in the Gastrointestinal Tract by Activating K⁺ ATP Channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **316**:325-335.
- Dorus S, Skerget S, Karr T. 2012. Proteomic discovery of diverse immunity molecules in mammalian spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **58**:218-228.
- Duan F, Li Y, Chen L, Zhou X, Chen J, Chen H, Li R. 2015. Sulfur inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer in vivo. *Oncology Letters* **9**:437 - 441.

- Du J, Hui Y, Cheung Y, Bin G, Jiang H, Chen X, Tang C. 2004. The possible role of hydrogen sulfide as a smooth muscle cell proliferation inhibitor in rat cultured cells. *Heart and Vessels* **19**:75-80.
- Ecroyd H, Asquith K, Jones R, Aitken R. 2004. The development of signal transduction pathways during epididymal maturation is calcium dependent. *Developmental Biology* **268**:53-63.
- Eickhoff R. 2004. Influence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) on the zinc content and redox state of protein-bound sulphhydryl groups in rat sperm: indications for a new role of MIF in sperm maturation. *Molecular Human Reproduction* **10**:605-611.
- Eickhoff R, Wilhelm B, Renneberg H, Wennemuth G, Bacher M, Linder D, Bucala R, Seitz J, Meinhardt A. 2001. Purification and Characterization of Macrophage Migration Inhibitory Factor as a Secretory Protein from Rat Epididymis: Evidences for Alternative Release and Transfer to Spermatozoa. *Molecular Medicine* **7**:27-35.
- Erickson P, Maxwell I, Su L, Baumann M, Glode L. 1990. Sequence of cDNA for rat cystathionine γ -lyase and comparison of deduced amino acid sequence with related *Escherichia coli* enzymes. *Biochemical Journal* **269**:335-340.
- Escalier D, Gallo J, Albert M, Meduri G, Bermudez D, David G. 1991. Human acrosome biogenesis: immunodetection of proacrosin in primary spermatocytes and of its partitioning pattern during meiosis. *Development* **113**:779-788.
- Eto K, Kimura H. 2002. A Novel Enhancing Mechanism for Hydrogen Sulfide-producing Activity of Cystathionine β -Synthase. *Journal of Biological Chemistry* **277**:42680-42685.
- Fathi Najafi T, Latifnejad Roudsari R, Namvar F, Ghavami Ghanbarabadi V, Hadizadeh Talasaz Z, Esmaeli M. 2015. Air Pollution and Quality of Sperm: A Meta-Analysis. *Iranian Red Crescent Medical Journal* **17**:e26930.
- Farkaš R. 2015. Apocrine secretion: New insights into an old phenomenon. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1850**:1740-1750.
- Fawcett D. 1975. Gametogenesis in the Male: Prospects for its Control. *The Developmental Biology of Reproduction*:25-53.
- Figueiras-Fierro D, Acevedo J, Martínez-López P, Escoffier J, Sepúlveda F, Balderas E, Orta G, Visconti P, Darszon A. 2013. Electrophysiological evidence for the presence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in mouse sperm. *Journal of Cellular Physiology* **228**:590-601.
- Fiorucci S, Antonelli E, Mencarelli A, Orlandi S, Renga B, Rizzo G, Distrutti E, Shah V, Morelli A. 2005. The third gas: H₂S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis. *Hepatology* **42**:539-548.
- Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace J. 2006. The Emerging Roles of Hydrogen Sulfide in the Gastrointestinal Tract and Liver. *Gastroenterology* **131**:259-271.
- Florman H, Fissore R. 2015. Fertilization in mammals. Pages 149-196 in Knobil and Neill's physiology of reproduction, 1 edition.. Academic Press, New York.

- Frenette G, Légaré C, Saez F, Sullivan R. 2005. Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. *MHR: Basic science of reproductive medicine* **11**:575-582.
- Frenette G, Lessard C, Madore E, Fortier M, Sullivan R. 2003. Aldose Reductase and Macrophage Migration Inhibitory Factor Are Associated with Epididymosomes and Spermatozoa in the Bovine Epididymis. *Biology of Reproduction* **69**:1586-1592.
- Frenette G, Lessard C, Sullivan R. 2004. Polyol pathway along the bovine epididymis. *Molecular Reproduction and Development* **69**:448-456.
- Frenette G, Sullivan R. 2001. Prostate-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Molecular Reproduction and Development* **59**:115-121.
- Friend DS, Fawcett DW. 1974. Membrane differentiations in freeze-fractured mammalian sperm. *The Journal of Cell Biology* **63**:641-664.
- Fujihara Y, Tokuhira K, Muro Y, Kondoh G, Araki Y, Ikawa M, Okabe M. 2013. Expression of TEX101, regulated by ACE, is essential for the production of fertile mouse spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**:8111-8116.
- Fu M, Zhang W, Wu L, Yang G, Li H, Wang R. 2012. Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**:2943-2948.
- Furne J, Springfield J, Koenig T, DeMaster E, Levitt M. 2001. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochemical Pharmacology* **62**:255-259.
- Furne J, Saeed A, Levitt M. 2008. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **295**:R1479-R1485.
- Fu Z, Liu X, Geng B, Fang L, Tang C. 2008. Hydrogen sulfide protects rat lung from ischemia-reperfusion injury. *Life Sciences* **82**.
- Gai J, Wahafu W, Guo H, Liu M, Wang X, Xiao Y, Zhang L, Xin Z, Jin J. 2013. Further evidence of endogenous hydrogen sulphide as a mediator of relaxation in human and rat bladder. *Asian Journal of Andrology* **15**:692 - 696.
- Gao D-D et al. 2019. Cellular Mechanism Underlying Hydrogen Sulfide Mediated Epithelial K⁺ Secretion in Rat Epididymis. *Frontiers in Physiology* **9**.
- Geng B, Yang J, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C. 2004. H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**:362-368.
- Gerton G. 2002. Function of the sperm acrosome. Pages 265 - 302 in *Fertilization* edition.. Academic Press, San Diego.
- Gibbs G, Lo J, Nixon B, Jamsai D, O'Connor A, Rijal S, Sanchez-Partida L, Hearn M, Bianco D, O'Bryan M. 2010. Glioma Pathogenesis-Related 1-Like 1 Is Testis Enriched, Dynamically

- Modified, and Redistributed during Male Germ Cell Maturation and Has a Potential Role in Sperm-Oocyte Binding. *Endocrinology* **151**:2331-2342.
- Girouard J, Frenette G, Sullivan R. 2011. Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis. *International Journal of Andrology* **34**:e475-e486.
- Goodwin L, Francom D, Dieken F, Taylor J, Warenycia M, Reiffenstein R, Dowling G. 1989. Determination of Sulfide in Brain Tissue by Gas Dialysis/Ion Chromatography: Postmortem Studies and Two Case Reports. *Journal of Analytical Toxicology* **13**:105-109.
- Gordon F, Lamb D. 2007. DNA Repair Genes and Genomic Instability in Severe Male Factor Infertility. Pages 145-163 in D. Carrell, editor. *The Genetics of Male Infertility*, 1 edition. Humana Press, Totowa, NJ.
- Guo H, Gai J, Wang Y, Jin H, Du J, Jin J. 2012. Characterization of hydrogen sulfide and its synthases, cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase, in human prostatic tissue and cells. *Urology* **79**:483.
- Guzmán M et al. 2006. Cystathionine beta-synthase is essential for female reproductive function. *Human Molecular Genetics* **15**:3168 - 3176.
- Haidl G, Opper C. 1997. Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. *Human Reproduction* **12**:2720-2723.
- Hall J, Hadley J, Doman T. 1991. Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation. *Journal of Andrology* **12**:76-87.
- Hammoud A, Carrell DT, Gibson M, Sanderson M, Parker-Jones K, Peterson CM. 2010. Decreased sperm motility is associated with air pollution in Salt Lake City. *Fertility and Sterility* **93**:1875-1879.
- Hart N. 1990. Fertilization in Teleost Fishes: Mechanisms of Sperm-Egg Interactions. *International Review of Cytology* **121**:1-66.
- Hartree E, Srivastava P. 1965. Chemical compositions of the acrosomes of ram spermatozoa. *Reproduction* **9**:47-60.
- Hayden L, Franklin K, Roth S, Moore G. 1989. Inhibition of oxytocin-induced but not angiotensin-induced rat uterine contractions following exposure to sodium sulfide. *Life Sciences* **45**:2557 - 2560.
- Hermo L, Robaire B. 2002. Epididymal Cell Types and Their Functions. Pages 81-102 in B. Robaire and B. Hinton, editors. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*, 1 edition.. Springer US, Boston, MA.
- Hershko A, Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* **67**:425-479.
- Hess R, de Franca L. 2008. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* **636**:1-15.

- Hess R. 1990. Quantitative and Qualitative Characteristics of the Stages and Transitions in the Cycle of the Rat Seminiferous Epithelium: Light Microscopic Observations of Perfusion-Fixed and Plastic-Embedded Testes1. *Biology of Reproduction* **43**:525-542.
- Hess R, Miller L, Kirby J, Margoliash E, Goldberg E. 1993. Immunoelectron Microscopic Localization of Testicular and Somatic Cytochromes c in the Seminiferous Epithelium of the Rat1. *Biology of Reproduction* **48**:1299-1308.
- Hinton BT, Palladino MA. 1995. Epididymal epithelium: Its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microscopy Research and Technique* **30**:67-81.
- Hirano Y, Hendil K, Yashiroda H, Iemura S, Nagane R, Hioki Y, Natsume T, Tanaka K, Murata S. 2005. A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* **437**:1381-1385.
- Hirohashi N, Vacquier V. 2003. Store-operated calcium channels trigger exocytosis of the sea urchin sperm acrosomal vesicle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**:285-292.
- Holt W. 1980. Surface-Bound Sialic Acid on Ram and Bull Spermatozoa: Deposition During Epididymal Transit and Stability During Washing. *Biology of Reproduction* **23**:847-857.
- Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. 1997. The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Smooth Muscle Relaxant in Synergy with Nitric Oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **237**:527-531.
- Huang Y, Cheng X, Jiang R. 2012. Hydrogen sulfide and penile erection. *National Journal of Andrology* **18**:823 - 826.
- Hughes M, Centelles M, Moore K. 2009. Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radical Biology and Medicine* **47**:1346-1353.
- Hui Y, Du J, Tang C, Bin G, Jiang H. 2003. Changes in arterial hydrogen sulfide (H₂S) content during septic shock and endotoxin shock in rats. *Journal of Infection* **47**:155-160.
- Hulbert P, Yakubu S. 1983. Monobromobimane: a substrate for the fluorimetric assay of glutathione transferase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **35**:384-386.
- Chang M. 1951. Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature* **168**:697-698.
- Chávez J, Darszon A, Treviño C, Nishigaki T. 2020. Quantitative Intracellular pH Determinations in Single Live Mammalian Spermatozoa Using the Ratiometric Dye SNARF-5F. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **7**.
- Cheng Y, Ndisang J, Tang G, Cao K, Wang R. 2004. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **287**:H2316-H2323.
- Chen Q et al. 2016. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science* **351**:397-400.

- Cherry L, Hsu T. 1984. Antitubulin immunofluorescence studies of spermatogenesis in the mouse. *Chromosoma* **90**:265-274.
- Christova Y, James P, Cooper T, Jones R. 2002. Lipid Diffusion in the Plasma Membrane of Mouse Spermatozoa: Changes During Epididymal Maturation, Effects of pH, Osmotic Pressure, and Knockout of the c-ros Gene. *Journal of Andrology* **23**:384-392.
- Christova Y, James P, Mackie A, Cooper T, Jones R. 2004. Molecular diffusion in sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology* **216**:41-46.
- Idler R, Yan W. 2012. Control of Messenger RNA Fate by RNA-Binding Proteins: An Emphasis on Mammalian Spermatogenesis. *Journal of Andrology* **33**:309-337.
- Ijiri T, Vadnais M, Huang A, Lin A, Levin L, Buck J, Gerton G. 2014. Thiol changes during epididymal maturation: a link to flagellar angulation in mouse spermatozoa?. *Andrology* **2**:65-75.
- Ijiri T, Merdiushev T, Cao W, Gerton G. 2011. Identification and validation of mouse sperm proteins correlated with epididymal maturation. *Proteomics* **11**:4047-4062.
- Insko M, Deckwerth T, Hill P, Toombs C, Szabo C. 2009. Detection of exhaled hydrogen sulphide gas in rats exposed to intravenous sodium sulphide. *British Journal of Pharmacology* **157**:944-951.
- Ishigami M, Hiraki K, Umemura K, Ogasawara Y, Ishii K, Kimura H. 2009. A Source of Hydrogen Sulfide and a Mechanism of Its Release in the Brain. *Antioxidants & Redox Signaling* **11**:205-214.
- Ishii I, Akahoshi N, Yu X, Kobayaschi Y, Namekata K, Komaki G, Kimura H. 2004. Murine cystathionine γ -lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochemical Journal* **381**:113-123.
- Jackson M, Melideo S, Jorns M. 2015. Chapter Fourteen - Role of Human Sulfide: Quinone Oxidoreductase in H₂S Metabolism. *Methods in enzymology* **554**:255-270.
- Jackson M, Melideo S, Jorns M. 2012. Human Sulfide: Quinone Oxidoreductase Catalyzes the First Step in Hydrogen Sulfide Metabolism and Produces a Sulfane Sulfur Metabolite. *Biochemistry* **51**:6804-6815.
- Jelinsky S, Turner T, Bang H, Finger J, Solarz M, Wilson E, Brown E, Kopf G, Johnston D. 2007. The Rat Epididymal Transcriptome: Comparison of Segmental Gene Expression in the Rat and Mouse Epididymides1. *Biology of Reproduction* **76**:561-570.
- Jenkins A, Lechene C, Howards S. 1980. Concentrations of Seven Elements in the Intraluminal Fluids of the Rat Seminiferous Tubules, Rete Testis, and Epididymis1. *Biology of Reproduction* **23**:981-987.
- Jeong S, Pae H, Oh G, Jeong G, Lee B, Lee S, Kim D, Rhew H, Lee K, Chung H. 2006. Hydrogen sulfide potentiates interleukin-1 β -induced nitric oxide production via enhancement of extracellular signal-regulated kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **345**:938-944.

- Jhee K, Kruger W. 2005. The Role of Cystathionine β -Synthase in Homocysteine Metabolism. *Antioxidants & Redox Signaling* **7**:813-822.
- Jones R, Clulow J. 1987. Regulation of the elemental composition of the epididymal fluids in the tammar, *Macropus eugenii*. *Reproduction* **81**:583-590.
- Jones R. 2002. Plasma Membrane Composition and Organisation During Maturation of Spermatozoa in the Epididymis. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*:405-416. Springer US, Boston, MA.
- Joshi C, Suryawanshi A, Khan S, Balasinor N, Khole V. 2013. Liprin α 3: a putative estrogen regulated acrosomal protein. *Histochemistry and Cell Biology* **139**:535-548.
- Junqueira L, Carneiro J, Kelley R. 1997. *Základy histologie*, 1 edition. H+H, Jinočany.
- Kabil O, Banerjee R. 2010. Redox Biochemistry of Hydrogen Sulfide. *Journal of Biological Chemistry* **285**:21903-21907.
- Kameshwari D, Bhande S, Sundaram C, Kota V, Siva A, Shivaji S. 2010. Glucose-regulated protein precursor (GRP78) and tumor rejection antigen (GP96) are unique to hamster caput epididymal spermatozoa.. *Asian Journal of Andrology* **12**:344-355.
- Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I. 2006. L-Cysteine Inhibits Insulin Release From the Pancreatic beta-Cell: Possible Involvement of Metabolic Production of Hydrogen Sulfide, a Novel Gasotransmitter. *Diabetes* **55**:1391-1397.
- Kashiwabara S, Arai Y, Kodaira K, Baba T. 1990. Acrosin biosynthesis in meiotic and postmeiotic spermatogenic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **173**:240-245.
- Kerns K, Morales P, Sutovsky P. 2016. Regulation of Sperm Capacitation by the 26S Proteasome: An Emerging New Paradigm in Spermatology1. *Biology of Reproduction* **94**:117.
- Kerns K, Zigo M, Drobnis E, Sutovsky M, Sutovsky P. 2018. Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation. *Nature Communications* **9**:2061.
- Khawar M, Gao H, Li W. 2019. Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **7**:1-12.
- Khor B et al. 2006. Proteasome Activator PA200 Is Required for Normal Spermatogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **26**:2999-3007.
- Kierszenbaum A, Rivkin E, Tres L. 2003. Acroplaxome, an F-Actin–Keratin-containing Plate, Anchors the Acrosome to the Nucleus during Shaping of the Spermatid Head. *Molecular Biology of the Cell* **14**:4329 - 4743.
- Kim K, Gerton G. 2003. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm☆. *Developmental Biology* **264**:141-152.
- Kimura H. 2014. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide* **41**:4 - 10.
- Kimura H. 2010. Hydrogen Sulfide: From Brain to Gut. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**:1111-1123.

- Kimura H. 2011. Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino Acids* **41**:113-121.
- Kimura H, Shibuya N, Kimura Y. 2012. Hydrogen Sulfide Is a Signaling Molecule and a Cytoprotectant. *Antioxidants & Redox Signaling* **17**:45-57.
- Kimura Y, Goto Y, Kimura H. 2010. Hydrogen Sulfide Increases Glutathione Production and Suppresses Oxidative Stress in Mitochondria. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**:1-13.
- Kimura Y, Kimura H. 2004. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *The FASEB Journal* **18**:1165-1167.
- Kirchhoff C, Hale G. 1996. Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Molecular Human Reproduction* **2**:177-184.
- Kirichok Y, Navarro B, Clapham D. 2006. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature* **439**:737-740.
- Krapf D, Chun Ruan Y, Wertheimer E, Battistone M, Pawlak J, Sanjay A, Pilder S, Cuasnicu P, Breton S, Visconti P. 2012. cSrc is necessary for epididymal development and is incorporated into sperm during epididymal transit. *Developmental Biology* **369**:43-53.
- Krijgsheld K, Glazenburg E, Sscholtens E, Mulder G. 1981. The oxidation of L- and D-cysteine to inorganic sulfate and taurine in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **677**:7-12.
- Leblond C, Clermont Y. 1952. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the 'periodic acid-fuchsin sulfurous acid' technique. *American Journal of Anatomy* **90**:167-215.
- Lee D, Kim M, Cho K. 2015. A design principle underlying the paradoxical roles of E3 ubiquitin ligases. *Scientific Reports* **4**:5573.
- Levine N, Marsh D. 1971. Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *The Journal of Physiology* **213**:557-570.
- Liang R, Yu W, Du J, Yang L, Yang J, Xu J, Shang M, Guo J. 2007. Cystathionine β synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive Toxicology* **24**:89-96.
- Liang R, Yu W, Du J, Yang L, Shang M, Guo J. 2006. Localization of cystathionine β synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chinese Medical Journal* **119**:1877-1883.
- Libiad M, Yadav P, Vitvitsky V, Martinov M, Banerjee R. 2014. Organization of the Human Mitochondrial Hydrogen Sulfide Oxidation Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **289**:30901-30910.
- Li L, Moore P. 2008. Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air?. *Trends in Pharmacological Sciences* **29**:84-90.

- Li L, Rose P, Moore P. 2011. Hydrogen Sulfide and Cell Signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **51**:169-187.
- Li L, Rossoni G, Sparatore A, Lee L, Del Soldato P, Moore P. 2007. Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. *Free Radical Biology and Medicine* **42**:706-719.
- Li L, Whiteman M, Guan Y, Neo K, Cheng Y, Lee S, Zhao Y, Baskar R, Tan C, Moore P. 2008. Characterization of a Novel, Water-Soluble Hydrogen Sulfide-Releasing Molecule (GYY4137). *Circulation* **117**:2351-2360.
- Li Y, Zang Y, Fu S, Zhang H, Gao L, Li J. 2012. H₂S Relaxes Vas Deferens Smooth Muscle by Modulating the Large Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ (BKCa) Channels via a Redox Mechanism. *The Journal of Sexual Medicine* **9**:2806-2813.
- Lishko P, Botchkina I, Fedorenko A, Kirichok Y. 2010. Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel. *Cell* **140**:327-337.
- Lishko P, Clapham D, Navarro B, Kirichok Y. 2013. Sperm Patch-Clamp. *Cilia, Part B* **525**:59-83. . Elsevier.
- Liu M, Wu L, Montaut S, Yang G. 2016. Hydrogen Sulfide Signaling Axis as a Target for Prostate Cancer Therapeutics. *Prostate Cancer* **2016**:1-9.
- Longo F, Cook S. 1991. Formation of the perinuclear theca in spermatozoa of diverse mammalian species: Relationship of the manchette and multiple band polypeptides. *Molecular Reproduction and Development* **28**:380-393.
- Łowicka E, Bełtowski J. 2007. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports* **59**:4 - 24.
- Lundgren D, Hwang S, Wu L, Han D. 2014. Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Review of Proteomics* **7**:39-53.
- Magargee S, Kunze E, Hammerstedt R. 1988. Changes in Lectin-Binding Features of Ram Sperm Surfaces Associated with Epididymal Maturation and Ejaculation1. *Biology of Reproduction* **38**:667-685.
- Magin T, Vijayaraj P, Leube R. 2007. Structural and regulatory functions of keratins. *Experimental Cell Research* **313**:2021-2032.
- Malekova L, Krizanova O, Ondrias K. 2009. H₂S and HS– donor NaHS inhibits intracellular chloride channels. *General Physiology and Biophysics* **28**:190-194.
- Martin-DeLeon P. 2015. Epididymosomes: Transfer of Fertility-modulating Proteins to the Sperm Surface. *Asian Journal of Andrology* **0**:720-725.
- Martínez-Menárguez J, Geuze H, Ballesta J. 2017. Evidence for a nonlysosomal origin of the acrosome. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **44**:313-320.
- Martínez-Menárguez J, Geuze H, Ballesta J. 1996. Identification of two types of beta-COP vesicles in the Golgi complex of rat spermatids. *European Journal of Cell Biology* **71**:137-143.

- Matamoros-Volante A, Treviño C. 2020. Capacitation-associated alkalization in human sperm is differentially controlled at the subcellular level. *Journal of Cell Science* **133**:jcs238816.
- Mathai J, Missner A, Kugler P, Saparov S, Zeidel M, Lee J, Pohl P. 2009. No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:16633-16638.
- Matsunami M, Tarui T, Mitani K, Nagasawa K, Fukushima O, Okubo K, Yoshida S, Takemura M, Kawabata A. 2009. Luminal hydrogen sulfide plays a pronociceptive role in mouse colon. *Gut* **58**:751-761.
- Mayorga L, Tomes C, Belmonte S. 2007. Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life* **59**:286-292.
- Mikami Y, Shibuya N, Kimura Y, Nagahara N, Yamada M, Kimura H. 2011. Hydrogen Sulfide Protects the Retina from Light-induced Degeneration by the Modulation of Ca²⁺ Influx. *Journal of Biological Chemistry* **286**:39379-39386.
- Mikami Y, Shibuya N, Ogasawara Y, Kimura H. 2013. Hydrogen sulfide is produced by cystathionine γ -lyase at the steady-state low intracellular Ca²⁺ concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **431**:131-135.
- Miles E, Kraus J. 2004. Cystathionine β -Synthase: Structure, Function, Regulation, and Location of Homocystinuria-causing Mutations. *Journal of Biological Chemistry* **279**:29871-29874.
- Mok Y, Mohammed Atan M, Ping C, Jing W, Bhatia M, Mochhala S, Moore P. 2004. Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis. *British Journal of Pharmacology* **143**:881-889.
- Monjok E, Kulkarni K, Kouamou G, McKoy M, Opere C, Bongmba O, Njie Y, Ohia S. 2008. Inhibitory action of hydrogen sulfide on muscarinic receptor-induced contraction of isolated porcine irides. *Experimental Eye Research* **87**:612-616.
- Morales P, Pizarro E, Kong M, Jara M. 2004. Extracellular localization of proteasomes in human sperm. *Molecular Reproduction and Development* **68**:115-124.
- Morales P, Socias T, Cortez J, Llanos M. 1994. Evidences for the presence of chymotrypsin-like activity in human spermatozoa with a role in the acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development* **38**:222-230.
- Moreno R, Schatten G. 2000. Microtubule configurations and post-translational α -tubulin modifications during mammalian spermatogenesis. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **46**:235-246.
- Moreno R. 2003. Differential expression of lysosomal associated membrane protein (LAMP-1) during mammalian spermiogenesis. *Molecular Reproduction and Development* **66**:202-209.
- Moreno R, Ramalho-Santos J, Sutovsky P, Chan E, Schatten G. 2000. Vesicular Traffic and Golgi Apparatus Dynamics During Mammalian Spermatogenesis: Implications for Acrosome Architecture1. *Biology of Reproduction* **63**:89-98.

- Morton B, Sagadraca R, Fraser C. 1978. Sperm Motility within the Mammalian Epididymis: Species Variation and Correlation with Free Calcium Levels in Epididymal Plasma. *Fertility and Sterility* **29**:695-698.
- Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. 2009. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**:104-115.
- Murta D, Batista M, Silva E, Trindade A, Henrique D, Duarte A, Lopes-da-Costa L. 2016. Notch signaling in the epididymal epithelium regulates sperm motility and is transferred at a distance within epididymosomes. *Andrology* **4**:314-327.
- Mustafa A, Gadalla M, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi S, Barrow R, Yang G, Wang R, Snyder S. 2009. H₂S Signals Through Protein S-Sulfhydration. *Science Signaling* **2**:ra72-ra72.
- Nagahara N, Ito T, Kitamura H, Nishino T. 1998. Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochemistry and Cell Biology* **110**:243-250.
- Nagy P. 2015. Mechanistic chemical perspective of hydrogen sulfide signaling. *Methods Enzymol* **554**:3-29.
- Nakamura M, Moriya M, Baba T, Michikawa Y, Yamanobe T, Arai K, Okinaga S, Kobayashi T. 1993. An Endoplasmic Reticulum Protein, Calreticulin, Is Transported into the Acrosome of Rat Sperm. *Experimental Cell Research* **205**:101-110.
- Navarrete F, García-Vázquez F, Alvau A, Escoffier J, Krapf D, Sánchez-Cárdenas C, Salicioni A, Darszon A, Visconti P. 2015. Biphasic Role of Calcium in Mouse Sperm Capacitation Signaling Pathways. *Journal of Cellular Physiology* **230**:1758-1769.
- Nayernia K, Adham I, Kremling H, Reim K, Schlicker M, Schlüter G, Engel W. 1996. Stage and developmental specific gene expression during mammalian spermatogenesis. *The International Journal of Developmental Biology* **40**:379-383.
- Nesvizhskii A, Keller A, Kolker E, Aebersold R. 2003. A Statistical Model for Identifying Proteins by Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **75**:4646-4658.
- Nicander L, Ploen L. 1969. Fine structure of spermatogonia and primary spermatocytes in rabbits. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **99**:221-234.
- Nicolson G, Usui N, Yanagimachi R, Yanagimachi H, JR S. 1977. Lectin-binding sites on the plasma membranes of rabbit spermatozoa: Changes in surface receptors during epididymal maturation and after ejaculation. *The Journal of Cell Biology* **74**:950-962.
- Nicholson R, Zhang A, Zheng J, Brookes J, Skrajny B, Bennington R. 1998. Inhibition of respiratory and bioenergetic mechanisms by hydrogen sulfide in mammalian brain. *Journal of Toxicology and Environmental Health, A* **54**:491-507.
- Nikolopoulou M, Soucek D, Vary J. 1985. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **815**:486-498.

- Niu W, Yadav P, Adamec J, Banerjee R. 2015. S-Glutathionylation Enhances Human Cystathionine β -Synthase Activity Under Oxidative Stress Conditions. *Antioxidants & Redox Signaling* **22**:350-361.
- Nussbaum R, Molnnes R, Willard H. 2015. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine Elsevier eBook, 8 edition.. Elsevier Health Sciences.*
- Oh G, Pae H, Lee B, Kim B, Kim J, Kim H, Jeon S, Jeon W, Chae H, Chung H. 2006. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor- κ B via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radical Biology and Medicine* **41**:106-119.
- Oh J, Han C, Cho C. 2009. ADAM7 is associated with epididymosomes and integrated into sperm plasma membrane. *Molecules and Cells* **28**:441-446.
- Oh J, Woo J, Choi E, Kim T, Cho B, Park Z, Kim Y, Kim D, Cho C. 2005. Molecular, biochemical, and cellular characterization of epididymal ADAMs, ADAM7 and ADAM28. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **331**:1374-1383.
- Oi Y, Imafuku M, Shishido C, Kominato Y, Nishimura S, Iwai K. 2001. Garlic supplementation increases testicular testosterone and decreases plasma corticosterone in rats fed a high protein diet. *Journal of Nutrition* **131**:2150 - 2156.
- Okabe M. 2013. The cell biology of mammalian fertilization. *Development* **140**:4471 - 4479.
- Okabe M. 2016. The acrosome reaction: a historical perspective. Pages 1-13 in *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*, 1 edition. Springer, New York.
- Olas B. 2014. Hydrogen sulfide in hemostasis: Friend or foe?. *Chemico-Biological Interactions* **217**:49 - 56.
- Olas B. 2015. Hydrogen sulfide in signaling pathways. *Clinica Chimica Acta* **439**:212 - 218.
- Olson K. 2009. Is hydrogen sulfide a circulating “gasotransmitter” in vertebrate blood?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1787**:856-863.
- Olson K, DeLeon E, Gao Y, Hurley K, Sadauskas V, Batz C, Stoy G. 2013. Thiosulfate: a readily accessible source of hydrogen sulfide in oxygen sensing. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **305**:R592-R603.
- Pálinkás Z, Furtmüller P, Nagy A, Jakopitsch C, Pirker K, Magierowski M, Jasnos K, Wallace J, Obinger C, Nagy P. 2015. Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase. *British Journal of Pharmacology* **172**:1516-1532.
- Papapetropoulos A et al. 2009. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:21972-21977.
- Parks J, Hammerstedt R. 1985. Developmental Changes Occurring in the Lipids of Ram Epididymal Spermatozoa Plasma Membrane 1. *Biology of Reproduction* **32**:653-668.
- Pasten C, Morales P, Kong M. 2005. Role of the sperm proteasome during fertilization and gamete interaction in the mouse. *Molecular Reproduction and Development* **71**:209-219.

- Patel P, Vatish M, Heptinstall J, Wang R, Carson R. 2009. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology* **7**:10.
- Paunescu T, Shum W, Huynh C, Lechner L, Goetze B, Brown D, Breton S. 2014. High-resolution helium ion microscopy of epididymal epithelial cells and their interaction with spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* **20**:929-937.
- Picton R, Eggo M, Merrill G, Langmann M, Singh S. 2002. Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. *Gut* **50**:201 - 205.
- Pilsová A. 2019. Sulfan produkující enzymy v kančích spermiích [BSc. Thesis]. Czech University of Life Sciences Prague, Prague.
- Pilsová Z. 2019. Sulfan produkující enzymy v kančích spermiích [BSc. Thesis]. Czech University of Life Sciences Prague, Prague.
- Polhemus D, Lefer D. 2014. Emergence of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Gaseous Signaling Molecule in Cardiovascular Disease. *Circulation Research* **114**:730-737.
- Prados B, Peña A, Cotarelo R, Valero M, Cruces J. 2007. Expression of the Murine Pomt1 Gene in Both the Developing Brain and Adult Muscle Tissues and Its Relationship with Clinical Aspects of Walker-Warburg Syndrome. *The American Journal of Pathology* **170**:1659-1668.
- Puranik M, Weeks C, Lahaye D, Kabil Ö, Taoka S, Nielsen S, Groves J, Banerjee R, Spiro T. 2006. Dynamics of Carbon Monoxide Binding to Cystathionine β -Synthase. *Journal of Biological Chemistry* **281**:13433-13438.
- Pyttel S, Nimptsch A, Böttger J, Zschörnig K, Jakop U, Wegener J, Müller K, Paasch U, Schiller J. 2014. Changes of murine sperm phospholipid composition during epididymal maturation determined by MALDI-TOF mass spectrometry. *Theriogenology* **82**:396-402.
- Ramalho-Santos J, Moreno R, Wessel G, Chan E, Schatten G. 2001. Membrane Trafficking Machinery Components Associated with the Mammalian Acrosome during Spermiogenesis. *Experimental Cell Research* **267**:45-60.
- Ramalho-Santos J, Schatten G, Moreno R. 2002. Control of Membrane Fusion During Spermiogenesis and the Acrosome Reaction1. *Biology of Reproduction* **67**:1043-1051.
- Rechsteiner M, Hill C. 2005. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends in Cell Biology* **15**:27-33.
- Reid A, Redgrove K, Aitken R, Nixon B. 2010. Cellular mechanisms regulating sperm–zona pellucida interaction. *Asian Journal of Andrology* **13**:88-96.
- Reiffenstein R, Hulbert W, Roth S. 1992. Toxicology of Hydrogen Sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **32**:109-134.
- Reimand J, Arak T, Vilo J. 2011. g: Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2011 update). *Nucleic Acids Research* **39**:W307-W315.

- Reimand J, Kull M, Peterson H, Hansen J, Vilo J. 2007. g: Profiler—a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Research* **35**:W193-W200.
- Rejraji H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, Frenoux J, Vericel E, Grizard G, Vernet P, Drevet J. 2006. Lipid Remodeling of Murine Epididymosomes and Spermatozoa During Epididymal Maturation1. *Biology of Reproduction* **74**:1104-1113.
- Rejraji H, Vernet P, Drevet J. 2002. GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Molecular Reproduction and Development* **63**:96-103.
- Rinaldi L, Gobbi G, Pambianco M, Micheloni C, Mirandola P, Vitale M. 2006. Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3. *Laboratory Investigation* **86**:391-397.
- Rivett A. 1999. Ubiquitin and the biology of the cell, edited by J.-M. Peters, J.R. Harris, and D. Finley. 1998. New York. *Protein Science* **8**:460-461.
- Rivkin E, Kierszenbaum A, Gil M, Tres L. 2009. Rnf19a, a ubiquitin protein ligase, and Psmc3, a component of the 26S proteasome, Tether to the acrosome membranes and the head-tail coupling apparatus during rat spermatid development. *Developmental Dynamics* **238**:1851-1861.
- Roberts K, Ensrud-Bowlin K, Piehl L, Parent K, Bernhardt M, Hamilton D. 2008. Association of the Protein D and Protein E Forms of Rat CRISP1 with Epididymal Sperm1. *Biology of Reproduction* **79**:1046-1053.
- Roper M, Kraus J. 1992. Rat cystathionine β -synthase: Expression of four alternatively spliced isoforms in transfected cultured cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **298**:514-521.
- Ruknudin A, Silver I. 1990. Ca²⁺ uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on Ca²⁺ uptake. *Molecular Reproduction and Development* **26**:63-68.
- Russell L, Ettlin R, Hikim A, Clegg E. 1993. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *International Journal of Andrology* **16**:83-83.
- Saez F, Ouvrier A, Drevet J. 2010. Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian Journal of Andrology* **13**:11-17.
- Sakai N, Sawada M, Sawada H. 2004. Non-traditional roles of ubiquitin–proteasome system in fertilization and gametogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**:776-784.
- Savage J, Gould D. 1990. Determination of sulfide in brain tissue and rumen fluid by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **526**:540-545.
- Sawada H, Yokosawa H. 2001. Self-nonsel recognition and lysin system in fertilization of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Pages 18-23 in *The biology of ascidians*, 1 edition. Springer-Verlag, Tokyo.

- Sawada H. 2002. Ascidian Sperm Lysin System. *Zoological Science* **19**:139-151.
- Searcy D, Lee S. 1998. Sulfur reduction by human erythrocytes. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **282**:310-322.
- Shan X, Dunbrack Jr R, Christopher S, Kruger W. 2001. Mutations in the regulatory domain of cystathionine beta-synthase can functionally suppress patient-derived mutations in cis. *Human Molecular Genetics* **10**:635-643.
- Sharma R, Agarwal A. 2011. Spermatogenesis: An Overview. Pages 19-44 in A. Zini and A. Agarwal, editors. *Sperm Chromatin*, 1 edition. Springer New York, New York, NY.
- Sharma U et al. 2016. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science* **351**:391-396.
- Shatalin K, Shatalina E, Mironov A, Nudler E. 2011. H₂S: A Universal Defense Against Antibiotics in Bacteria. *Science* **334**:986-990.
- Shen X, Pattillo C, Pardue S, Bir S, Wang R, Kevil C. 2011. Measurement of plasma hydrogen sulfide in vivo and in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* **50**:1021-1031.
- Shevchenko A, Tomas H, Havli J, Olsen J, Mann M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* **1**:2856-2860.
- Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Ogasawara Y, Fukui K, Nagahara N, Kimura H. 2013. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nature Communications* **4**.
- Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. 2009a. Vascular Endothelium Expresses 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase and Produces Hydrogen Sulfide. *Journal of Biochemistry* **146**:623-626.
- Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Kimura Y, Ogasawara Y, Fukui K, Nagahara N, Kimura H. 2013. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nature Communications* **4**:1366.
- Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K, Kimura H. 2009b. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces Hydrogen Sulfide and Bound Sulfane Sulfur in the Brain. *Antioxidants & Redox Signaling* **11**:703-714.
- Shum W, Ruan Y, Da Silva N, Breton S. 2011. Establishment of Cell-Cell Cross Talk in the Epididymis: Control of Luminal Acidification. *Journal of Andrology* **32**:576-586.
- Sidhu R, Singh M, Samir G, Carson R. 2001. L-cysteine and sodium hydrosulphide inhibit spontaneous contractility in isolated pregnant rat uterine strips in vitro. *Pharmacology & Toxicology* **88**:198 - 203.
- Singh J, Babcock D, Lardy H. 1978. Increased calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. *Biochemical Journal* **172**:549-556.
- Singh S, Padovani D, Leslie R, Chiku T, Banerjee R. 2009a. Relative Contributions of Cystathionine β -Synthase and γ -Cystathionase to H₂S Biogenesis via Alternative Trans-sulfuration Reactions. *Journal of Biological Chemistry* **284**:22457-22466.

- Singh S, Malini T, Rengarajan S, Balasubramanian K. 2009b. Impact of experimental diabetes and insulin replacement on epididymal secretory products and sperm maturation in albino rats. *Journal of Cellular Biochemistry* **108**:1094-1101.
- Sitdikova G, Weiger T, Hermann A. 2010. Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **459**:389-397.
- Skerget S, Rosenow M, Petritis K, Karr T, Baltz J. 2015. Sperm Proteome Maturation in the Mouse Epididymis. *Plos One* **10**:1-23.
- Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, Ietta F, Zhang X, Zamudio S, Post M, Caniggia I. 2005. Molecular Evidence of Placental Hypoxia in Preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **90**:4299-4308.
- Srilatha B, Adaikan P, Moore P. 2007. Hydrogen sulphide: a novel endogenous gasotransmitter facilitates erectile function. *The Journal of Sexual Medicine* **4**:1304 - 1311.
- Srilatha B, Adaikan P, Moore P. 2006. Possible role for the novel gasotransmitter hydrogen sulphide in erectile dysfunction—a pilot study. *European Journal of Pharmacology* **535**:280-282.
- Srilatha B, Hu L, Adaikan G, Moore P. 2009a. Initial Characterization of Hydrogen Sulfide Effects in Female Sexual Function. *The Journal of Sexual Medicine* **6**:1875-1884.
- Srilatha B, Hu L, Moore P. 2009b. Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. *The Journal of Sexual Medicine* **6**:1875 - 1884.
- Srivastava A, Olson G. 1991. Glycoprotein changes in the rat sperm plasma membrane during maturation in the epididymis. *Molecular Reproduction and Development* **29**:357-364.
- Stein K, Go J, Lane W, Primakoff P, Myles D. 2006. Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions. *Proteomics* **6**:3533-3543.
- Streng T, Axelsson H, Hedlund P, Andersson D, Jordt S, Bevan S, Andersson K, Högestätt E, Zygmunt P. 2008. Distribution and Function of the Hydrogen Sulfide–Sensitive TRPA1 Ion Channel in Rat Urinary Bladder. *European Urology* **53**:391-400.
- Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar N, Weyand I, Seifert R, Kaupp U. 2011. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* **471**:382-386.
- Stuhlmeier K, Bröll J, Iliev B. 2009. NF-KappaB Independent Activation of a Series of Proinflammatory Genes by Hydrogen Sulfide. *Experimental Biology and Medicine* **234**:1327-1338.
- Suarez-Quian C, An Q, Jelesoff N, Dym M. 1991. The Golgi apparatus of rat pachytene spermatocytes during spermatogenesis. *The Anatomical Record* **229**:16-26.
- Sugiura Y, Kashiba M, Maruyama K, Hoshikawa K, Sasaki R, Saito K, Kimura H, Goda N, Suematsu M. 2005. Cadmium Exposure Alters Metabolomics of Sulfur-Containing Amino Acids in Rat Testes. *Antioxidants & Redox Signaling* **7**:781-787.

- Sullivan R, Frenette G, Girouard J. 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian Journal of Andrology* **9**:483 - 491.
- Sullivan R. 2015. Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. *Asian Journal of Andrology* **0**:726-729.
- Sullivan R, Saez F. 2013. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction* **146**:R21-R35.
- Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **35**:1-10.
- Sun Y, Cao Y, Wang W, Ma S, Yao T, Zhu Y. 2008. Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* **79**:632-641.
- Sun Y, Wang X, Chen Y, Zhu R, Liao C. 2013. Exhaled hydrogen sulfide in patients with chronic obstructive pulmonary disease and its correlation with exhaled nitric oxide. *Chinese Medical Journal* **126**:3240-3244.
- Suryavathi V, Panneerdoss S, Wolkowicz M, Shetty J, Sherman N, Flickinger C, Herr J. 2015. Dynamic Changes in Equatorial Segment Protein 1 (SPESP1) Glycosylation During Mouse Spermiogenesis I. *Biology of Reproduction* **92**:121-116.
- Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson W, Schatten G. 2001. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *Journal of Cell Science* **114**:1665-1675.
- Sutovsky P. 2003. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: Killing three birds with one stone. *Microscopy Research and Technique* **61**:88-102.
- Sutovsky P. 2011. Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction* **142**:1 - 14.
- Sutovsky P, Manandhar G, McCauley T, Caamaño J, Sutovsky M, Thompson W, Day B. 2004. Proteasomal Interference Prevents Zona Pellucida Penetration and Fertilization in Mammals I. *Biology of Reproduction* **71**:1625-1637.
- Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. 1999. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* **vol. 402**:371-372.
- Sutovsky P, Lovercamp K, Lucy M, Pate J, Smith M, Spencer T. 2012. Molecular markers of sperm quality. Pages 247-256 in M. Lucy, J. Pate, M. Smith and T. Spencer, editors. *Reproduction in Domestic Ruminants VII*, 1 edition. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Swaroop M, Bradley K, Ohura T, Tahara T, Roper M, Rosenberg L, Kraus J. 1992. Rat cystathionine beta-synthase. Gene organization and alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry* **267**:11455-11461.

- Talbot P, Kleve M. 1978. Hamster sperm cross react with antiactin. *Journal of Experimental Zoology* **204**:131-136.
- Tanaka K. 1998. Proteasomes: Structure and Biology. *Journal of Biochemistry* **123**:195-204.
- Tanaka K. 2009. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **85**:12-36.
- Tan B, Wong P, Bian J. 2010. Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the central nervous system. *Neurochemistry International* **56**:3 - 10.
- Tang X, Lalli M, Clermont Y. 1982. A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *American Journal of Anatomy* **163**:283-294.
- Tanizawa K. 2011. Production of H₂S by 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase. *Journal of Biochemistry* **149**:357 - 359.
- Telezhkin V, Brazier S, Cayzac S, Müller C, Riccardi D, Kemp P. 2009. Hydrogen Sulfide Inhibits Human BKCa Channels. *Arterial Chemoreceptors* **648**:65-72.
- Teng H, Wu B, Zhao K, Yang G, Wu L, Wang R. 2013. Oxygen-sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine γ -synthase mediated by Lon protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**:12679-12684.
- Tipler C. 1997. Purification and characterization of 26S proteasomes from human and mouse spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* **3**:1053-1060.
- Togawa T, Ogawa M, Nawata M, Ogasawara Y, Kawanabe K, Tanabe S. 1992. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Bound Sulfide and Sulfite and Thiosulfate at Their Low Levels in Human Serum by Pre-column Fluorescence Derivatization with Monobromobimane. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **40**:3000-3004.
- Tokumoto T. 1998. Nature and Role of Proteasomes in Maturation of Fish Oocytes. *International Review of Cytology* **186**:261-294.
- Trevisani M, Patacchini R, Nicoletti P, Gatti R, Gazzieri D, Lissi N, Zagli G, Creminon C, Geppetti P, Harrison S. 2005. Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. *British Journal of Pharmacology* **145**:1123-1131.
- Tripatara P et al. 2008. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine γ -lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. *Laboratory Investigation* **88**:1038-1048.
- Tsai P, Garcia-Gil N, van Haefen T, Gadella B, Delprato A. 2010. How Pig Sperm Prepares to Fertilize: Stable Acrosome Docking to the Plasma Membrane. *Plos One* **5**:e11204.
- Tulsiani D, Yoshida-Komiya H, Araki Y. 1997. Mammalian Fertilization: A Carbohydrate-Mediated Event. *Biology of Reproduction* **57**:487-494.
- Tulsiani D. 2006. Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology* **250**:58-65.

- Ustrell V. 2002. PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *The EMBO Journal* **21**:3516-3525.
- Vadnais M, Aghajanian H, Lin A, Gerton G. 2013. Signaling in Sperm: Toward a Molecular Understanding of the Acquisition of Sperm Motility in the Mouse Epididymis¹. *Biology of Reproduction* **89**:127.
- Vasas A, Dóka É, Fábián I, Nagy P. 2015. Kinetic and thermodynamic studies on the disulfide-bond reducing potential of hydrogen sulfide. *Nitric Oxide* **46**:93-101.
- Vigil P. 1989. Gamete membrane fusion in hamster spermatozoa with reacted equatorial segment. *Gamete Research* **23**:203-213.
- Virtanen I, Badley R, Paasivuo R, Lehto V. 1984. Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *The Journal of Cell Biology* **99**:1083-1091.
- Visconti P, Bailey J, Moore G, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf G. 1995a. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121**:1129-1137.
- Visconti P, Moore G, Bailey J, Leclerc P, Connors S, Pan P, Olds-Clarke P, Kopf G. 1995b. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* **121**:1139-1150.
- Visconti P, Krapf D, de la Vega-Beltrán J, Acevedo J, Darszon A. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian Journal of Andrology* **13**:395-405.
- Vitale A, Ceriotti A, Denecke J. 1993. The Role of the Endoplasmic Reticulum in Protein Synthesis, Modification and Intracellular Transport. *Journal of Experimental Botany* **44**:1417-1444.
- Vjugina U. 2008. New insights into the molecular basis of mammalian sperm-egg membrane interactions. *Frontiers in Bioscience* **13**:462-476.
- Wang J et al. 2018. Hydrogen sulfide as a potential target in preventing spermatogenic failure and testicular dysfunction. *Antioxidants & Redox Signaling* **28**:1447 - 1462.
- Wang K et al. 2013. Dysregulation of Hydrogen Sulfide Producing Enzyme Cystathionine γ -lyase Contributes to Maternal Hypertension and Placental Abnormalities in Preeclampsia. *Circulation* **127**:2514-2522.
- Wang R. 2012. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological Reviews* **92**:791 - 896.
- Wang R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?. *The FASEB Journal* **16**:1792-1798.
- Warenycia M, Smith K, Blashko C, Kombian S, Reiffenstein R. 1989. Monoamine oxidase inhibition as a sequel of hydrogen sulfide intoxication: increases in brain catecholamine and 5-hydroxytryptamine levels. *Archives of Toxicology* **63**:131-136.

- Wassarman P, Jovine L, Litscher E, Qi H, Williams Z. 2004. Egg-sperm interactions at fertilization in mammals. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **115**:557 - 560.
- Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow M, Maeda N. 1995. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**:1585-1589.
- Wathes D, Abayasekara D, Aitken R. 2007. Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction I. *Biology of Reproduction* **77**:190-201.
- Weisiger R, Pinkus L, Jakoby W. 1980. Thiol S-methyltransferase: suggested role in detoxication of intestinal hydrogen sulfide. *Biochemical Pharmacology* **29**:2885-2887.
- Whitby F, Masters E, Kramer L, Knowlton J, Yao Y, Wang C, Hill C. 2000. Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* **408**:115-120.
- Whiteman M, Armstrong J, Chu S, Jia-Ling S, Wong B, Cheung N, Halliwell B, Moore P. 2004. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'?. *Journal of Neurochemistry* **90**:765-768.
- Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu S, Siau J, Bhatia M, Moore P. 2006. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **343**:303-310.
- Whiteman M, Cheung N, Zhu Y, Chu S, Siau J, Wong B, Armstrong J, Moore P. 2005. Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain?. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **326**:794-798.
- Whitfield N, Kreimier E, Verdial F, Skovgaard N, Olson K. 2008. Reappraisal of H₂S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **294**:R1930-R1937.
- Wijsekara GUS, Fernando DMS, Wijerathna S, Bandara N. 2015. Environmental and occupational exposures as a cause of male infertility: A caveat. *Ceylon Medical Journal* **60**:52-56.
- Wiliński B, Wiliński J, Somogyi E, Piotrowska J, Górska M. 2011. Atorvastatin affects the tissue concentration of hydrogen sulfide in mouse kidneys and other organs*. *Pharmacological Reports* **63**:184-188.
- Wilkinson K. 1988. Purification and structural properties of ubiquitin. Pages 5-38 in *Ubiquitin*, 1 edition. Plenum Press, New York; London.
- Willer T, Amselgruber W, Deutzmann R, Strahl S. 2002. Characterization of POMT2, a novel member of the PMT protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids. *Glycobiology* **12**:771-783.
- Wintner E et al. 2010. A monobromobimane-based assay to measure the pharmacokinetic profile of reactive sulphide species in blood. *British Journal of Pharmacology* **160**:941-957.

- Wojcik C, Benchaib M, Lornage J, Czyba J, Guerin J. 2000. Proteasomes in human spermatozoa. *International Journal of Andrology* **23**:169-177.
- Xia YQ, Ning JZ, Cheng F, Yu WM, Rao T, Ruan Y, Yuan R, Du Y. 2019. GYY4137 a H₂S donor attenuates ipsilateral epididymis injury in experimentally varicocele-induced rats via activation of the PI3K/Akt pathway. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* **22**: 729–735.
- Xu S, Liz Z, Liu P. 2014. Targeting hydrogen sulfide as a promising therapeutic strategy for atherosclerosis. *International Journal of Cardiology* **172**:313 - 317.
- Yadav P, Yamada K, Chiku T, Koutmos M, Banerjee R. 2013. Structure and Kinetic Analysis of H₂S Production by Human Mercaptopyruvate Sulfurtransferase. *Journal of Biological Chemistry* **288**:20002-20013.
- Yamaguchi R, Muro Y, Isotani A, Tokuhiko K, Takumi K, Adham I, Ikawa M, Okabe M. 2009. Disruption of ADAM3 Impairs the Migration of Sperm into Oviduct in Mouse1. *Biology of Reproduction* **81**:142-146.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian Fertilization. Pages Pages 189 - 317 in Neill JD, Knobil E, editors. *Physiology of Reproduction* edition.. Academic Press, Cambridge.
- Yanagimachi R, Noda Y, Fujimoto M, Nicolson G. 1972. The distribution of negative surface charges on mammalian spermatozoa. *American Journal of Anatomy* **135**:497-519.
- Yanagimachi R. 2011. Mammalian Sperm Acrosome Reaction: Where Does It Begin Before Fertilization?. *Biology of Reproduction* **85**:4-5.
- Yang G et al. 2008. H₂S as a Physiologic Vasorelaxant: Hypertension in Mice with Deletion of Cystathionine Gamma-Lyase. *Science* **322**:587-590.
- Yang G, Cao K, Wu L, Wang R. 2004. Cystathionine γ -Lyase Overexpression Inhibits Cell Proliferation via a H₂S-dependent Modulation of ERK1/2 Phosphorylation and p21Cip/WAK-1. *Journal of Biological Chemistry* **279**:49199-49205.
- Yang G, Sun X, Wang R. 2004. Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *The FASEB Journal* **18**:1782-1784.
- Yang Y, Li Z. 2005. Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function?. *Molecular Cell* **20**:173-182.
- Yeung C. 1984. Effects of cyclic AMP on the motility of mature and immature hamster epididymal spermatozoa studied by reactivation of the demembrated cells. *Gamete Research* **9**:99-114.
- Yildiz Y, Matern H, Thompson B, Allegood J, Warren R, Ramirez D, Hammer R, Hamra F, Matern S, Russell D. 2006. Mutation of β -glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *Journal of Clinical Investigation* **116**:2985-2994.

- Yi Y, Manandhar G, Sutovsky M, Jonáková V, Park C, Sutovsky P. 2010. Inhibition of 19S proteasomal regulatory complex subunit PSMD8 increases polyspermy during porcine fertilization in vitro. *Journal of Reproductive Immunology* **84**:154-163.
- Yi Y, Manandhar G, Sutovsky M, Li R, Jonáková V, Oko R, Park C, Prather R, Sutovsky P. 2007. Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-Activity Is Involved in Sperm Acrosomal Function and Anti-Polyspermy Defense During Porcine Fertilization1. *Biology of Reproduction* **77**:780-793.
- Yi Y, Park C, Kim E, Song E, Jeong J, Sutovsky P. 2009. Sperm-Surface ATP in Boar Spermatozoa is Required for Fertilization: Relevance to Sperm Proteasomal Function. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **55**:85-96.
- Yong Q, Lee S, Foo C, Neo K, Chen X, Bian J. 2008. Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **295**:H1330-H1340.
- Yuan S, Zheng H, Zheng Z, Yan W, Gallyas F. 2013. Proteomic Analyses Reveal a Role of Cytoplasmic Droplets as an Energy Source during Epididymal Sperm Maturation. *Plos One* **8**:e77466.
- Yusuf M, Kwong Huat B, Hsu A, Whiteman M, Bhatia M, Moore P. 2005. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **333**:1146-1152.
- Zelinková P. 2019. Sulfan produkující enzymy a jejich funkce v kančích spermích [MSc. Thesis]. Czech University of Life Sciences Prague, Prague.
- Zeng Y, Clark E, Florman H. 1995. Sperm Membrane Potential: Hyperpolarization during Capacitation Regulates Zona Pellucida-Dependent Acrosomal Secretion. *Developmental Biology* **171**:554-563.
- Zeng Y, Oberdorf J, Florman H. 1996. pH Regulation in Mouse Sperm: Identification of Na⁺, Cl⁻, and HCO₃⁻ Dependent and Arylamino benzoate-Dependent Regulatory Mechanisms and Characterization of Their Roles in Sperm Capacitation. *Developmental Biology* **173**:510-520.
- Zhang H, Jones R, Martin-DeLeon P. 2004. Expression and secretion of rat SPAM1(2B1 or PH-20) in the epididymis: role of testicular lumicrine factors. *Matrix Biology* **22**:653-661.
- Zhao K, Li S, Wu L, Lai C, Yang G. 2014. Hydrogen Sulfide Represses Androgen Receptor Transactivation by Targeting at the Second Zinc Finger Module. *Journal of Biological Chemistry* **289**:20824 - 20835.
- Zhao W. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *The EMBO Journal* **20**:6008-6016.
- Zhao W, Ndisang J, Wang R. 2003. Modulation of endogenous production of H₂S in rat tissues. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **81**:848-853.
- Zhao W, Zhang J, Wang R. 2001. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *The EMBO Journal* **20**:6008 - 6016.

- Zhao Y et al. 2016. Hydrogen Sulfide and/or Ammonia Reduces Spermatozoa Motility through AMPK/AKT Related Pathways. *Scientific Reports* **6**: 37884.
- Zhi L, Ang A, Zhang H, Moore P, Bhatia M. 2007. Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF- κ B pathway. *Journal of Leukocyte Biology* **81**:1322-1332.
- Zhong G, Li Y, Liu X, Guo L, Chen M, Yang X. 2010. Hydrogen Sulfide Opens the K ATP Channel on Rat Atrial and Ventricular Myocytes. *Cardiology* **115**:120-126.
- Zhou H, Ding L, Wu Z, Cao X, Zhang Q, Lin L, Bian J. 2017. Hydrogen sulfide reduces RAGE toxicity through inhibition of its dimer formation. *Free Radical Biology and Medicine* **104**:262-271.
- Zhou W, De Iuliis G, Dun M, Nixon B. 2018. Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. *Frontiers in Endocrinology* **9**:1-13.
- Zhu X, Gu H, Ni X. 2011. Hydrogen sulfide in the endocrine and reproductive systems. *Expert Reviews* **4**:75 - 82.
- Zhu Y, Wang Z, Ho P, Loke Y, Zhu Y, Huang S, Tan C, Whiteman M, Lu J, Moore P. 2007. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats. *Journal of Applied Physiology* **102**:261-268.
- Zigo M, Jonakova V, Manaskova-Postlerova P, Kerns K, Sutovsky P. 2019a. Ubiquitin-proteasome system participates in the de-aggregation of spermadhesins and DQH protein during boar sperm capacitation. *Reproduction* **157**:283-295.
- Zigo M, Manaskova-Postlerova P, Jonakova V, Kerns K, Sutovsky P. 2019b. Compartmentalization of the proteasome-interacting proteins during sperm capacitation. *Scientific Reports* **9**:12583.
- Zigo M, Maňásková-Postlerová P, Zuidema D, Kerns K, Jonáková V, Tůmová L, Bubeníčková F, Sutovsky P. 2020. Porcine model for the study of sperm capacitation, fertilization and male fertility. *Cell and Tissue Research* **380**:237-262.
- Zimmerman S, Manandhar G, Yi Y, Gupta S, Sutovsky M, Odhiambo J, Powell M, Miller D, Sutovsky P, Uversky V. 2011. Sperm Proteasomes Degrade Sperm Receptor on the Egg Zona Pellucida during Mammalian Fertilization. *Plos One* **6**:e17256.
- Zimmerman S, Sutovsky P. 2009. The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization. *Journal of Reproductive Immunology* **83**:19-25.
- Zini A, Agarwal A. 2018. Defective Spermatogenesis and Sperm DNA Damage. Pages 229-261 in *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*, 1 edition. Springer International Publishing, New York.
- Zwickl P, Baumeister W. 2002. *The proteasome-ubiquitin protein degradation pathway*, 1 edition. Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg; New York.

