

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Proteiny AKAP a jejich zapojení během kapacitace  
kančích spermií**

**Diplomová práce**

**Bc. Veronika Forstlová  
Reprodukční biotechnologie**

**Mgr. Ing. Tereza Krejčová, Ph. D.**

© 2022 ČZU v Praze



### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Proteiny AKAP a jejich zapojení během kapacitace kančích spermií" 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

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala především paní Mgr. Ing. Tereze Krejčové, Ph. D., za vedení mé diplomové práce. Také bych tímto ráda poděkovala Ing. Zuzaně Pilsové, Ing. Anetě Pilsové a Ing. Kateřině Havlíkové za pevné nervy a metodické vedení při práci v laboratoři. Dále pak Bc. Adéle Škodové, se kterou jsem při experimentu spolupracovala. V neposlední řadě děkuji rodině za veškerou podporu po celou dobu mého studia.

# Proteiny AKAP a jejich zapojení během kapacitace kančích spermií

## Souhrn

Proteiny rodiny AKAP jsou skupinou strukturně odlišných proteinů se společnou funkcí vázat se na regulační podjednotky cAMP dependentní proteinkinázy A (PKA). Vazbou PKA na AKAP proteiny dochází k lokalizaci PKA do místa jejího katalytického působení k zajištění fosforylace cílových substrátů. Bylo popsáno již více než 20 proteinů rodiny AKAP. U lidských spermií je nejvíce zastoupeným proteinem ve spermiích protein AKAP4. Protein AKAP4 je lokalizován do fibrózní pochvy hlavní části bičíku spermie a hraje důležitou roli, jak při samotné stavbě fibrózní pochvy, tak i při regulaci motility spermií. AKAP4 protein je nezbytným pro koordinaci signální dráhy PKA a fosforylaci motorických proteinů spermie (dyneinů), čímž podporuje klouzání jednotlivých mikrotubulů v dubletu axonemy, a tak ovlivňuje samotnou motilitu spermií. U AKAP4 knockoutovaných jedinců vede absence proteinu AKAP4 k nekoordinovanému pohybu bičíku a snížení motility spermie, dále také dochází k výraznému narušení struktury samotného bičíku. U člověka je protein AKAP4 považován za vhodný marker kvality spermií. Přesná úloha proteinu AKAP4 v regulaci procesů probíhajících v kančích spermiích nebyla doposud detailně popsána.

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, že protein AKAP4 je zapojený do regulace procesů, které probíhají během kapacitace kančích spermií. K ověření této hypotézy byl protein AKAP4 detekován metodou Western blot v ejakulovaných spermiích, v kančích spermiích po *in vitro* kapacitaci a v kančích spermiích po *in vitro* indukované akrozomové reakci a byla zhodnocena změna relativní denzity signálu proteinu AKAP4.

Provedenými experimenty se podařilo detekovat protein AKAP4 u ejakulovaných kančích spermií, u kančích spermií po *in vitro* kapacitaci i u kančích spermií po *in vitro* navozené akrozomové reakci. Ve všech typech vzorků byl detekován jak protein AKAP4, tak i jeho izomer proAKAP4. Byly patrné statisticky významné rozdíly v detekci relativní denzity signálu mezi jednotlivými kanci, což může odrážet rozdíly fertility u jednotlivých kanců. U všech testovaných kanců byl nepatrný pokles relativní denzity signálu proteinu AKAP4 u vzorků spermií po *in vitro* navozené akrozomální reakci, oproti vzorkům spermií po *in vitro* kapacitaci. Tento výsledek podporuje stanovenou hypotézu, že proteiny AKAP4 jsou zapojené do regulace procesů probíhajících během kapacitace kančích spermií.

**Klíčová slova:** proAKAP4, AKAP4, kapacitace, motilita, spermie

# AKAP proteins and their involvement in capacitation of boar sperms

## Summary

AKAP family proteins are a group of structurally distinct proteins with a common function to bind to the regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase A (PKA). Binding of PKA to AKAP proteins localizes PKA to its catalytic site of action to ensure phosphorylation of target substrates. More than 20 proteins of the AKAP family have been reported. In human sperm, the most abundant protein in sperm is AKAP4 protein. AKAP4 protein is localized to the fibrous sheath of the main part of the sperm flagellum and plays an important role both in the construction of the fibrous sheath itself and in the regulation of sperm motility. The AKAP4 protein is essential for the coordination of the PKA signaling pathway and phosphorylation of sperm motor proteins (dyneins), thereby promoting the sliding of individual microtubules in the axoneme doublet and thus affecting sperm motility itself. In AKAP4 knockout individuals, the absence of AKAP4 protein leads to uncoordinated flagellar movement and reduced sperm motility, as well as a marked disruption of the flagellar structure itself. In humans, AKAP4 protein is considered a suitable marker of sperm quality. The exact role of AKAP4 protein in the regulation of processes occurring in boar spermatozoa has not yet been described in detail.

The aim of this thesis was to test the hypothesis that the AKAP4 protein is involved in the regulation of processes that take place during boar sperm capacitation. To test this hypothesis, AKAP4 protein was detected by Western blot in ejaculated sperm, in boar sperm after *in vitro* capacitation and in boar sperm after *in vitro* induced acrosome reaction and the change in the relative signal density of AKAP4 protein was evaluated.

The experiments performed were successful in detecting AKAP4 protein in ejaculated boar spermatozoa, in boar spermatozoa after *in vitro* capacitation and in boar spermatozoa after *in vitro* induced acrosome reaction. Both AKAP4 protein and its isomer proAKAP4 were detected in all sample types. Statistically significant differences in the detection of relative signal density between boars were evident, which may reflect differences in fertility between boars. In all boars tested, there was a slight decrease in the relative signal density of the AKAP4 protein in sperm samples after *in vitro* induced acrosomal reaction, compared to sperm samples after *in vitro* capacitation. This result supports the established hypothesis that AKAP4 proteins are involved in the regulation of processes occurring during boar sperm capacitation.

**Keywords:** proAKAP4, AKAP4, capacitation, motility, sperm

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce.....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Vývoj spermií.....</b>	<b>10</b>
3.1.1 Morfologie spermie.....	10
3.1.1.1 Hlavička .....	10
3.1.1.2 Bičík .....	11
3.1.2 Spermatogeneze .....	12
3.1.2.1 Spermatocytogeneze .....	13
3.1.2.2 Spermiohistogeneze .....	13
3.1.3 Kapacitace spermií.....	14
3.1.4 Hyperaktivace motility .....	15
3.1.5 Akrozomová reakce .....	15
3.1.6 Hodnocení kvality spermií.....	16
<b>3.2 Proteiny spermií .....</b>	<b>17</b>
3.2.1 AKAP proteiny .....	18
<b>4 Metodika.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Spermie.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 Příprava vzorků spermií.....</b>	<b>21</b>
4.2.1 SDS elektroforéza a Western blot.....	22
<b>5 Výsledky .....</b>	<b>24</b>
<b>5.1 Detekce proteinu AKAP4 ve spermiích kance.....</b>	<b>24</b>
<b>6 Diskuze .....</b>	<b>31</b>
<b>7 Závěr .....</b>	<b>34</b>
<b>8 Literatura .....</b>	<b>35</b>

# 1 Úvod

Spermie po uvolnění z varlat samce nejsou schopny oplodnit samičí pohlavní buňku, vajíčko. Aby spermie získaly schopnost oplození, musí projít řadou procesů. Uvnitř samičího reprodukčního ústrojí procházejí důležitým procesem kapacitace, během něhož dochází k hyperaktivaci motility a uvolnění spermií z oviduktálního rezervoáru a spermie jsou následně připraveny na kontakt s oocytem. Po navázání spermie na *zona pellucida* dojde u spermie k aktivaci akrozomové reakce, čímž dojde k uvolnění akrozomálního obsahu a následnému průniku spermie skrz *zona pellucida* k plazmatické membráně vajíčka (Florman & Fissore 2015).

Hyperaktivace motility je důležitá nejenom pro oddělení spermií od stěny oviduktálního rezervoáru, ale i pro usnadnění pohybu vejcovodem a pro průnik skrz *zona pellucida*. Proteiny rodiny AKAP se nachází ve fibrózní pochvě hlavní části bičíku. Hrají důležitou roli v regulaci motility spermií díky aktivaci cAMP – dependentní proteinkinázy A (PKA), která je aktivována cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP) (Bajpai et al. 2006). Protein AKAP4 je nejhojnější protein fibrózní pochvy bičíku a hraje hlavní roli ve struktuře bičíku spermie mnoha druhů zvířat i člověka (Blommaert et al. 2019). U prasat jeho zapojení do procesů během kapacitace nebylo doposud dostatečně objasněno.



## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem této diplomové práce je ověřit hypotézu, že proteiny AKAP rodiny jsou zapojené do regulace procesů, které probíhají během kapacitace kančích spermií.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Vývoj spermii

Spermie jsou oproti somatickým buňkám vysoce specializované buňky. Jejich hlavní funkcí je předání paternální genetické informace do oocyty samice, společně s proteiny a RNA (Champroux et al. 2016). Spermie jsou tvořeny v semenotvorných kanálcích ve varlatech, párovém pohlavním orgánu samců. Tyto kanálky obsahují zárodečné buňky, ze kterých jsou následně tvořeny samčí gamety. Proces tvorby spermii se nazývá spermatogeneze a probíhá ve dvou krocích. První fází spermatogeneze je spermatocytogeneze, na kterou navazuje druhá fáze, spermiohistogeneze (Garner & Hafez 2000).

#### 3.1.1 Morfologie spermie

Plně vyvinuté spermie jsou protáhlé buňky, které se skládají z hlavičky a bičíku. Důležitými částmi hlavičky jsou především jádro a akrozom. Samotný bičík je rozdělen na čtyři části, a to na spojovací část, střední část, hlavní část a koncovou část. Na povrchu celé spermie je plazmatická membrána tvořená dvouvrstvou fosfolipidů (Eddy & O'Brien 1994). Lipenský a kol. (2010) zjistili mimo jiné negativní vliv ročního období na morfologii spermie. V prvním pololetí roku byl výskyt abnormalit u kančích spermii 19,46 % a v druhé polovině roku tomu bylo 25,00 %. Stavba spermie viz Obrázek 1.

##### 3.1.1.1 Hlavička

Hlavička spermii u hospodářských zvířat má oválný tvar a obsahuje zploštělé jádro, které je obaleno jadernou membránou. Mimo jádro a akrozom je součástí hlavičky také malé množství cytoplazmy a dále pak cytoskeletární struktury. Jádro při vývoji spermie podléhá řadě změn, např. chromatin obsažený uvnitř jádra kondenzuje. Celá hlavička postupně získává tvar charakteristický pro každý druh. Dle Fawcetta (1975) se jedná o evoluční strategii zajišťující ochranu genomu při průchodu spermie samčím pohlavním ústrojím a také jako prostředek ke zlepšení pohyblivosti spermie. Chromatin v jádře zralé spermie se skládá z deoxyribonukleové kyseliny v komplexu se speciální třídou proteinů známých jako protaminy. Protaminy jsou malé proteiny bohaté na cystein a arginin a jsou důležité pro stabilizaci chromatinu v jádře. Haploidní sada chromozomů je výsledkem meiotického dělení buňky, ke kterému dochází při vývoji spermie (Garner & Hafez 2000).

Cytoskelet hlavičky spermie lze rozdělit do tří segmentů, a to na subakrozomový, postakrozomový a para-akrozomový. Jejich hlavní funkcí je udržovat tvar hlavičky a také pomoci spermii proniknout do vajíčka (Czaker 1985). Proteiny nacházející se v cytoskeletu hlavičky jsou například tubulin, spektrin a aktin (Kann et al. 1991).

Akrozom spermie je vakovitá struktura obklopená vnitřní a vnější akrozomální membránou. Název pochází z řečtiny, přičemž *acros* znamená nejvyšší a *soma* znamená tělo (Guyonnet et al. 2014). Lokalizací a tvarem může akrozom připomínat čepičku nacházející se v apikální oblasti hlavičky spermie. Akrozom spermie je modifikovaný, vysoce specializovaný lysozom původem z Golgiho aparátu (Moreno & Alvarado 2006). Vnitřní membrána akrozomu překrývá vnější jadernou membránu a vnější membrána akrozomu leží blízko povrchu plazmatické membrány (Toshimori 2009). Díky enzymům jako jsou například kyselá glykohydrolázy, proteázy, esterázy, kyselá fosfatázy, hyaluronidázy nebo akrozin, které jsou v akrozomu obsaženy, je spermie schopna proniknout skrz *zona pellucida* vajíčka a následně ho oplodnit (García-Vázquez et al. 2016). Po vazbě spermie na *zona pellucida* dochází k fúzi

vnější akrozomové membrány s plazmatickou membránou spermie a dojde k uvolnění akrozomálního obsahu (Abou-Haila & Tulsiani 2000).

### 3.1.1.2 Bičík

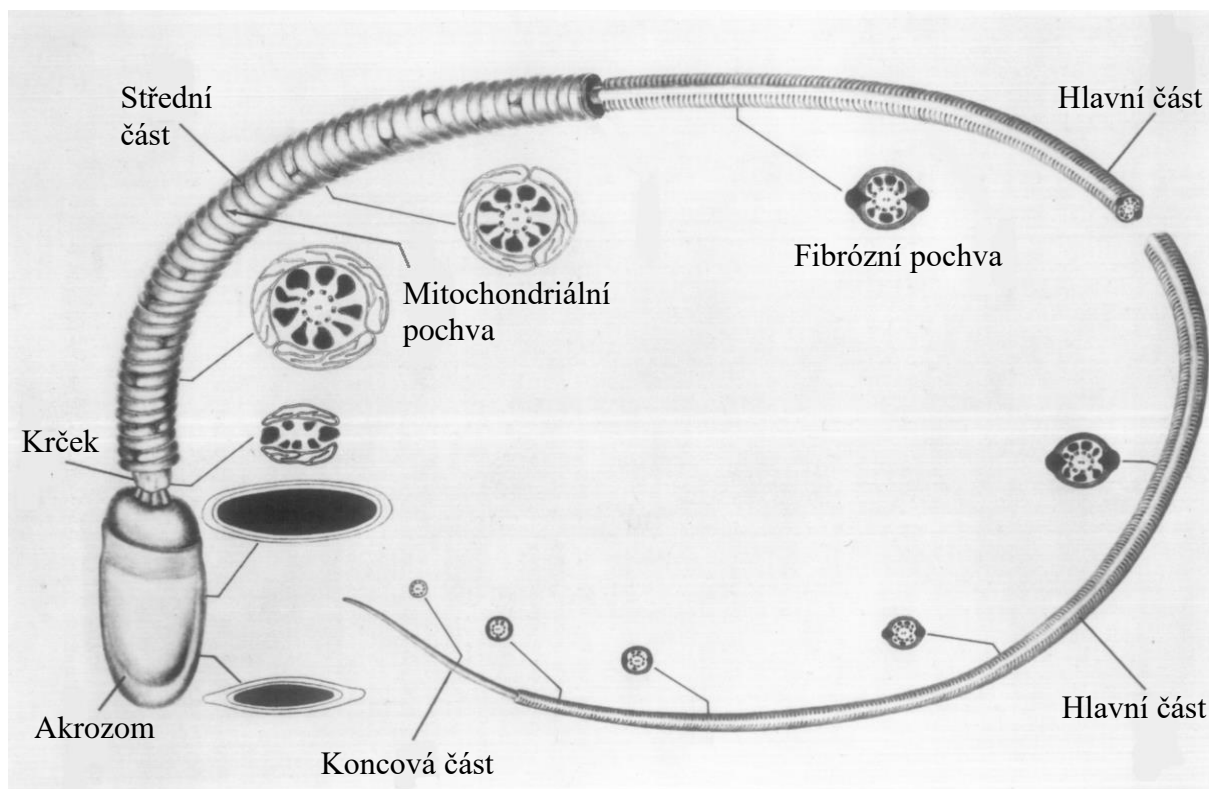
Bičík je nezbytnou součástí spermie umožňující její pohyblivost. Ultrastruktura savčího bičíku je rozdělena do čtyř hlavních částí – spojovací část, střední část, hlavní část a koncová část (viz Obrázek 1). Bezprostředně za hlavičkou spermie se nachází spojovací část zasunutá do implantační jamky jádra a tvořená proximálním a distálním centriolem. Distální centriol vytváří prstenec, na který nasedá axonema. Axonema tvoří podklad celého bičíku. (Garner & Hafez 2000).

Axonema je motorický aparát bičíku spermie, který je složen ze dvou centrálních mikrotubulů obklopených devíti dubletovými mikrotubuly. Centrální dublety jsou s devíti dublety mikrotubulů spojeny radiálními paprsky a dyneinovými rameny. Ta v axonemě slouží jako motorický aparát pro pohyb spermie (Lindemann & Lesich 2016). Dublety se skládají ze dvou podjednotek, podjednotky A, což je úplný mikrotubul a podjednotka B, který má v průřezu tvar písmene C a svými konci je připevněn k podjednotce A. K tvorbě axonemy spermií dochází již během časně spermiogeneze (Lehti & Sironen 2017).

Spojovací část bičíku je důležitá zejména k propojení hlavičky spermie s bičíkem. Tato složitá struktura má hustou, konvexní kloubní oblast nazývanou *capitulum*, která propojuje spojovací část s hlavičkou spermie spojením s implantační jamkou jádra. Jemná vlákna, procházející úzkými prostory mezi *capitulum* a bazální ploténkou jsou odpovědná právě za připojení hlavičky k bičíku. Tato část od hlavičky až k prstenci se u různých druhů zvířat svou délkou liší (Fawcett 1975). Dle Lehti a Sironen (2017) se spekulovalo o tom, že pohyblivost bičíku je také částečně regulována právě spojovací částí.

Na spojovací část navazuje střední část bičíku. Tato oblast je nejsilnější částí, a to zejména díky mitochondriím, které vytváří tzv. mitochondriální pochvu (viz Obrázek 1). Mitochondrie pokrývají axonemu a jsou uspořádány do spirály. Jsou důležité především jako zdroj energie v podobě ATP, která je nezbytná pro pohyb spermie. Mitochondrie se také podílejí na udržení homeostázy vápníku (Toshimori & Eddy 2015; Lehti & Sironen 2017).

Další částí bičíku je část hlavní, která je od střední části oddělena tzv. Jensenovým prstencem. Hlavní část bičíku není pokryta mitochondriální pochvou, ale na povrchu má ochranný plášť, nazývaný také jako fibrózní pochva. Fibrózní pochva je strukturální složka typická především pro savčí spermie, která je tvořena dvěma podélnými provazci, mezi nimiž jsou spojovací žebra. Stejně tak jako se zužuje bičík spermie směrem ke koncové části, tak i podélné provazce fibrózní pochvy se zmenšují (viz Obrázek 1). Fibrózní pochva obsahuje enzymy a je důležitá pro regulaci pohybu bičíku. Poslední částí bičíku je část koncová, která obsahuje axonemu obalenou pouze plazmatickou membránou (Chłopik & Wysokińska 2019).



Obrázek 1 - Stavba spermie. Převzato a upraveno od Fawcett (1975)

### 3.1.2 Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces buněčného dělení a buněčné diferenciace, při kterém se ve varlatech tvoří pohlavní buňky, spermie. Efektivnost spermatogeneze je ovlivněna druhovými rozdíly v počtu zárodečných buněk a v jejich životaschopnosti. Dále pak je spermatogeneze ovlivněna počtem Sertoliho buněk a množstvím hladkého endoplazmatického retikula Leydigových buněk (Sofikitis et al. 2008). Efektivnost spermatogeneze naopak není ovlivněna rozdílem ve velikosti varlat mezi jednotlivými druhy, zjišťuje se počtem produkováných spermií na gram parenchymu varlat. Je to komplexní proces zahrnující mitotické dělení buněk, meiózu a proces spermiogeneze (Johnson et al. 2000). Během spermatogeneze dochází k přeměně spermatogoniálních kmenových buněk na spermie v semenotvorných kanálcích za pomoci Sertoliho buněk. Spermatogeneze je regulována jak endokrinními, tak i parakrinními mechanismy. Endokrinní stimulace zahrnuje folikuly stimulační hormon (FSH), luteinizační hormon (LH) a dále pak testosteron, produkováný Leydigovými buňkami ve varleti. Vzhledem k tomu, že zárodečné buňky nemají receptory pro FSH a testosteron, jsou veškeré hormonální signály přenášeny přes Sertoliho buňky a peritubulární buňky. Ačkoliv jsou hormonální signály nezbytné pro dokončení spermatogeneze, existuje stále více důkazů o tom, že se na spermatogenezi podílí i velké množství růstových faktorů a cytokinů. Spermatogenezi lze rozdělit na dvě fáze, a to na spermatocytogenezi, jejíž součástí je meióza, a spermatohistogenezi. Po dokončení spermatogeneze se spermie přesouvají do nadvarlete, kde dále zrají (Berndtson 2014). Průběh spermatogeneze popisuje Obrázek 2.

### 3.1.2.1 Spermatocytogeneze

Spermatocytogeneze zahrnuje mitotické dělení zárodečných buněk za vzniku primárních spermatocytů (Johnson et al. 2000). Na počátku spermatocytogeneze jsou spermatogonie, což jsou prapohlavní samčí buňky. Počet spermatogonií se do období pohlavního dospívání nemění. Během spermatocytogeneze dochází k redukci počtu chromozomů z diploidního na haploidní (Phillips et al. 2010; Berndtson 2014). Po dosažení pohlavní dospělosti probíhá vývoj vznikajících spermií ve třech fázích, a to fáze množení, růstu a zrání (Russell et al. 1993).

Fáze množení zahrnuje několikanásobné dělení spermatogonií v bazální části semenotvorných kanálků. Dochází k mitotickému dělení zárodečných buněk, při kterém se tyto buňky rozdělí na buňky dceřiné. Z mateřské buňky vznikne dceřiná spermatogonie typu A, zatímco druhá buňka se dále dělí a vznikají spermatogonie typu B a intermediální spermatogonie (viz Obrázek 2) (França et al. 2005).

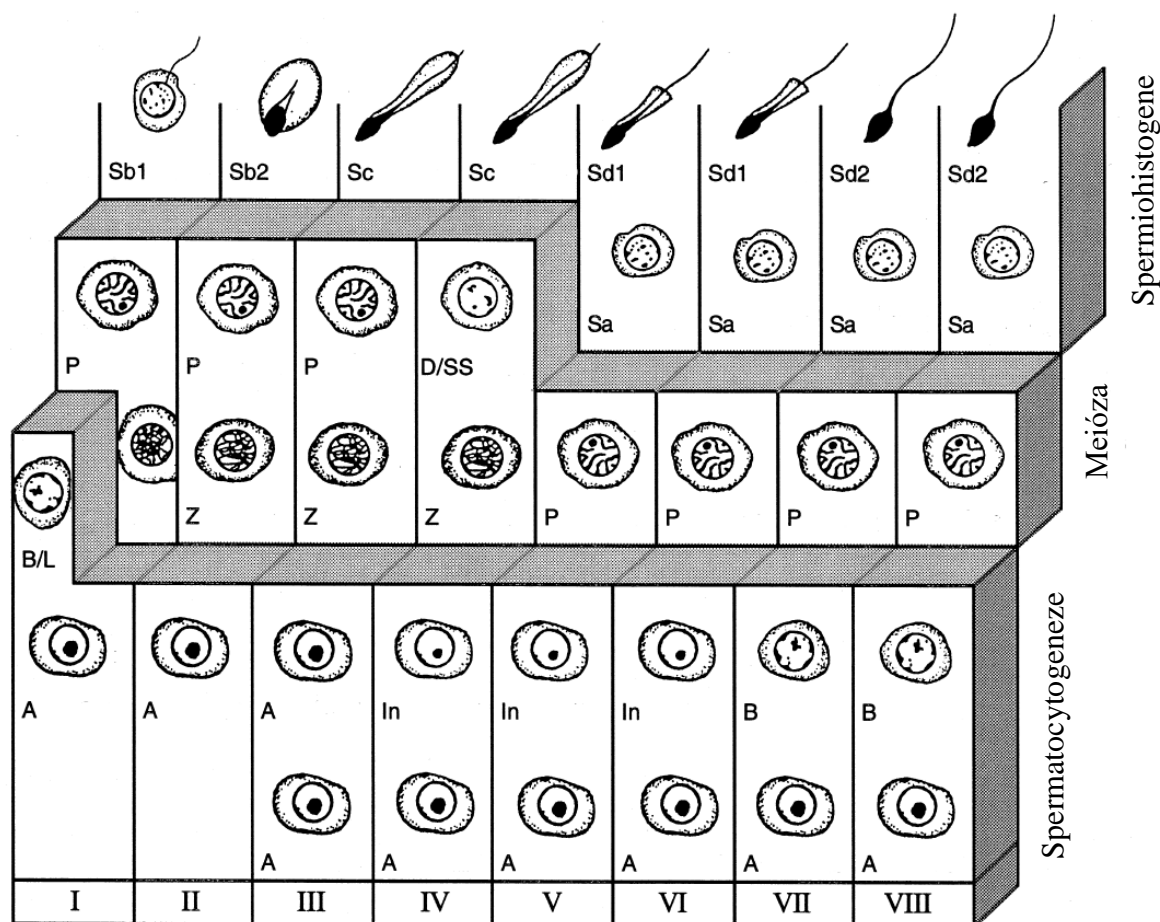
Další fází spermatocytogeneze je fáze růstu, při které dochází k růstu spermatogonií typu B a ke změnám v jádře buněk. Ze spermatogonií typu B vznikají primární spermatocyty, v jejichž jádře jsou chromozomy uspořádány do dvojic. V této fázi spermatocytogeneze dochází již k profázi meiotického dělení (França et al. 2005).

Třetí fází je fáze zrání, při které dochází k meióze. Meióza je charakterizována prvním zracím dělením a následně druhým zracím dělením. Během prvního zracího dělení z primárních spermatocytů vznikají spermatocyty sekundární. Při druhém zracím dělení vznikají pak ze sekundárních spermatocytů spermatidy, které již mají haploidní počet chromozomů. Profáze během prvního zracího dělení je dlouhý proces, který lze na cytologickém základě rozdělit na leptotene, zygotene, pachytene a diplotene (viz Obrázek 2) (de Kretser et al. 1998). Leptotene je fáze, ve které dochází ke kondenzaci a spiralizaci chromozomů. V zygotenním stádiu dochází k tvorbě bivalentů, kdy se k sobě dva homologní chromozomy přikládají. Ve fázi pachytenní dochází ke zkracování bivalentů a každý chromozom se rozděluje na dvě chromatidy. Každý bivalent je následně tvořen tetradami. Následuje crossing-over, při kterém dojde k výměně částí DNA mezi homologními chromozomy (Tanaka & Baba 2005). V diplotenním stádiu dochází k oddělování chromozomů, chromatidy však nadále zůstávají spojené v místě výměny genetické informace. Následně se bivalentní chromozomy zkracují a spojují se už jen v místě centromery. Poté následuje metafáze I., kdy dojde k rozpuštění jaderné membrány, jádro zaniká a dochází ke vzniku dělicího vřeténka. Chromozomy se uspořádají do ekvatoriální roviny. Následuje anafáze I., kdy se chromozomy rozcházejí k opačným pólům buňky. V telofázi I. vznikají dva spermatocyty, které mají poloviční počet chromozomů. Následuje druhé zrací dělení, během kterého dochází ke vzniku čtyř spermatid, dvou s chromozomem X a dvou s chromozomem Y (Phillips et al. 2010; Ohkura 2015).

### 3.1.2.2 Spermiohistogeneze

Během spermiohistogeneze, nebo také spermioogeneze, dochází ke změnám na spermatidě, a to zejména ke změnám biochemickým, chemickým a morfologickým. Během tohoto procesu dochází k přeměně spermatidy ve zralou spermii. V první fázi spermiohistogeneze dochází k vytváření akrozomového váčku z Golgiho komplexu. Tento váček se zvětšuje a následně se připojuje k proximální části buňky. Uvnitř akrozomového váčku jsou enzymy, proteiny a další potřebné látky. Z váčku se postupně stává akrozom a tvoří se nukleární prstenec. Pod nukleárním prstence jsou mikrotubuly, díky kterým dochází k prodlužování buňky. Oba centrioly se přesouvají k zadnímu pólu jádra. Distální centriol je důležitým centrem pro motilitu spermií. Dochází k formování bičíku a následně k tvorbě axonemy. Spermatida se zbavuje přebytečné cytoplazmy, která je pohlcena Sertoliho buňkami.

Po dokončení spermiogenezise putují buňky do nadvarlat, kde se shromažďují a dále zrají (Champroux et al. 2016).



Obrázek 2 – Klasifikace zárodečných buněk v různých vývojových stádiích během spermatogeneze. Spermatocytogeneze – spermatogonie typu A (A), intermediální spermatogonie (In), spermatogonie typu B (B), Meióza – fáze leptotene (L), fáze zygotene (Z), pachytene (P), diplotene (D), sekundární spermatocyt (SS), Spermiohistogeneze – spermatida (Sa), jednotlivé kroky diferenciacie spermií (Sb1 – Sd2). Převzato a upraveno od Johnson et al. (2000).

### 3.1.3 Kapacitace spermií

Fyziologické aspekty reprodukčního procesu závisí na sekvenci událostí, které generují fyzické i chemické podmínky umožňující oplození oocyty (Vigil et al. 2011). Aby spermie savců získaly oplozovací schopnost, musí podstoupit dva kroky posttestikulárního zrání. První probíhá v nadvarletí, kde spermie dozrávají a druhé, tzv. kapacitace, nastává po ejakulaci v samičím pohlavním traktu (Stival et al. 2016). Po ejakulaci jsou spermie díky dekapacitačním faktorům v semenné plazmě chráněny před předčasnou kapacitací. V semenné plazmě je řada proteinů, které jsou nezbytné pro výživu spermií. Nejvíce zastoupenou skupinou proteinů jsou spermadheziny, které jsou důležité zejména při vazbě spermií na epitel vejcovodu. Po ejakulaci dochází také k rozpuštění extracelulárního glykoproteinového obalu spermií a dále k modifikaci lipidů v plazmatické membráně (Zigo et al. 2020).

Kapacitace spermií je definována jako proces, při kterém spermie prochází důležitými změnami, aby mohlo dojít k hyperaktivaci motility, aby byla schopna navázat se na *zona pellucida*, podstoupit akrozomovou reakci a aby byla následně schopna fúzovat s oocytem. Ke

spuštění kapacitace dochází tehdy, kdy spermie doputují přes pohlavní trakt samice do ovidukálního rezervoáru v isthmu ve vejcovodu, k jehož vzniku dojde díky interakci mezi proteiny na povrchu spermie a glykosylovými receptory epitelu oviduktu (Bailey 2010). V ovidukálním rezervoáru také dochází k určité selekci spermií, kdy ne všechny prochází kapacitací. Po navázání spermií na epitel ovidukálního rezervoáru dochází k inhibici motility spermie a spermie díky tomu déle přežívají v pohlavním traktu samice. Samičí trakt dokáže regulovat průběh kapacitace, a to z toho důvodu, aby kapacitovaná spermie včas dorazila k ovulovanému vajíčku (Rathi et al. 2001). Na molekulární úrovni je kapacitace spojena se ztrátou cholesterolu z plazmatické membrány, zvyšuje se fluidita membrány a dochází ke změně v koncentraci intracelulárních iontů. Dále dochází k hyperpolarizaci plazmatické membrány a aktivuje se cAMP/PKA dráha (Visconti et al. 2011; Krapf et al. 2010). Epididymální tekutina obsahuje nízkou hladinu  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , a naopak vysokou hladinu  $\text{K}^+$  iontů. Nízké pH a nízká koncentrace  $\text{HCO}_3^-$  jsou nezbytné pro udržení spermií v klidovém stavu před ejakulací. V samičím pohlavním traktu je naopak pH a koncentrace  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  zvýšená a  $\text{K}^+$  snižena, což vede k aktivaci signalizačních kaskád, které vedou k aktivaci kapacitace (Pastor-Soler et al. 2005).

### 3.1.4 Hyperaktivace motility

Motilitu spermií lze podle způsobu pohybu bičíku rozdělit na dva různé typy, na progresivní motilitu a hypermotilitu. Pojmem hyperaktivace je označován typ motility spermií, ke kterému dochází během kapacitace spermií. Dochází k ní u většiny savců před akrozomovou reakcí. Hyperaktivace zvyšuje schopnost spermií oddělit se od stěny vejcovodů, pohybovat se v lumenu vejcovodu a pronikat jeho viskózní tekutinou, a nakonec proniknout skrz *zona pellucida*. Pohyb spermií po hyperaktivaci motility se může za různých fyzikálních podmínek a u různých druhů lišit, ale v zásadě se vyznačuje vysokou amplitudou a asymetrickým ohybem bičíku. Ve vejcovodu pravděpodobně existují signály, díky kterým dojde k tomuto jevu ve vhodné dobu. Taktéž funkce mitochondrií je nezbytná pro motilitu spermií. Nedostatečná funkce mitochondrií spermie ovlivňuje produkci cyklického AMP (cAMP) a ATP a může být odpovědná za nízkou motilitu (Blommaert et al. 2019). Dalšími důležitými prvky jsou ionty vápníku, které interagují s axonemou bičíku za účelem aktivace hyperaktivace (Ho & Suarez 2001).

Hyperaktivaci lze zjistit pomocí systému CASA (Computer-assisted sperm analysis) (viz Tabulka 1), kdy porovnáváme spermie inkubované za podmínek, které podporují *in vitro* fertilizaci (tj. kapacitační podmínky), se spermiemi, které byly inkubovány stejnou dobu za podmínek, kdy nejsou schopny kapacitace. Aby systém CASA identifikoval hyperaktivované spermie, musí být stanoveny prahové hodnoty, které jsou obvykle nastaveny pro minimální zakřivení trajektorie dráhy pohybu bičíku. Dále je často stanoven minimální rozsah, o který se pohybuje hlavička spermie ze strany na stranu, což je známé jako laterální amplituda posunu hlavičky (ALH). ALH však neslouží pro přímé měření bičíkového ohybu. Systém CASA dokáže získat údaje ze stovek spermií za méně než minutu. Protože většina systémů CASA může sledovat a analyzovat pouze pohyb hlavičky, pro studium pohybu bičíku se využívají jiné metody, při kterých se získávají přesné míry amplitudy a vlnění bičíku (Suarez 2008).

### 3.1.5 Akrozomová reakce

Spermie mnoha zvířat, včetně savců, obsahují sekreční váček neboli akrozom v apikální části hlavičky. Obsah akrozomu se uvolní během navázání spermie na *zona pellucida* vajíčka prostřednictvím exocytotického procesu, známého jako akrozomová reakce. Exocytóza představuje důležitý krok v procesu oplození (Zaneveld et al. 1991). Spermie musí podstoupit akrozomovou reakci, aby byla schopna penetrovat *zona pellucida* a fúzovat s plazmatickou

membránou vajíčka. Pokud však k akrozomové reakci nedojde nebo k ní dojde předčasně, k oplození nedochází. Akrozomová reakce je nevratný proces (Florman et al. 2004).

Během kapacitace spermií dochází ke změně fluidity plazmatické membrány a následně ke spuštění akrozomové reakce. Hlavním induktorem je kontakt s glykoproteiny *zona pellucida*. V *in vitro* podmínkách jsou častými induktory například progesteron, angiotenzin, inzulin, leptin, relaxin a další hormony (Breitbart 2003). Naopak například estradiol a epidermální růstový faktor patří mezi hormony, které akrozomovou reakci zpomalují. Akrozomová reakce začíná fúzí plazmatické membrány spermie s vnější akrozomovou membránou, což vede k uvolnění obsahu akrozomu a k odhalení molekul, umístěných na vnitřní membráně akrozomu (Vigil et al. 2011).

Spermie je na *zona pellucida* vázána přes specifické receptory. Tyto receptory se nachází v apikální oblasti hlavičky a vážou se na glykoprotein *zona pellucida* ZP3. Díky vazbě spermie na ZP3 oocyty dojde k aktivaci G – proteinu a dojde k intracelulárnímu zvýšení hladiny  $Ca^{2+}$  a zvýšení pH. Po odhalení vnitřní akrozomální membrány dochází k expozici důležitého proteinu IZUMO1, který komunikuje s glykoproteinovým receptorem JUNO nacházejícím se na oocyty. Díky jejich komunikaci dochází k rozpoznání mezi spermií a vajíčkem a následně k fúzi gamet (Gervasi & Visconti 2016). Dalším důležitým proteinem je cyritestin na vnitřní akrozomální membráně, který také interaguje s oocytem. Za zmínku také stojí skupina lipidů tzv. seminolipidy, které jsou schopny interagovat se SLIP proteinem membrány oocyty a mají vliv na fúzi spermie s oocytem (Vigil et al. 2011).

### 3.1.6 Hodnocení kvality spermií

Kvalita spermií je založena na tzv. parametrech spermií. Hlavní parametry pro hodnocení kvality spermatu jsou koncentrace, morfologie a pohyblivost spermií. Tyto vlastnosti jsou manuálně hodnoceny pomocí světelného mikroskopu nebo pomocí spektrofotometrie (viz Tabulka 1). Vzhledem k tomu, že manuální analýza je časově náročnější a ne tak přesná, využívá se počítačově asistovaná analýza spermií CASA. Průtoková cytometrie byla navržena pro hodnocení kvality spermatu, protože na rozdíl od CASA systému umožňuje studovat širší populace spermií. Průtoková cytometrie umožňuje paralelní funkční analýzu, jako je analýza struktury chromatinu spermií, měření úrovně oxidace a integrity membrány včetně akrozomálního a mitochondriálního stavu a životaschopnosti. Tato metoda je však časově náročná a obtížná. Pro hodnocení funkcí spermií byly vyvinuty testy, jako jsou analýzy morfologie spermií, test penetrace cervikálního hlenu a interakce spermie se *zona pellucida*. Jako velmi nadějně se ukazují metabolická hodnocení vlastností spermií nebo analýza reaktivních forem kyslíku, u kterých bylo prokázáno, že negativně ovlivňují přežití spermií a jejich oplozeníschopnost prostřednictvím jejich působení na struktury lipidové membrány. I když se jedná o tzv. testy fertility, posuzují se výchozí hodnoty, které ovlivňují funkčnost spermií jako je akrozomová reakce, kapacitace, či interakce s oocytem. Zatím však nepředpovídají fertilitu. V neposlední řadě dochází k vyšetřování proteomických markerů ve spermiích, díky kterým lze spolehlivě předpovědět plodnost zvířete před rozmnožováním (Sergeant et al. 2019).



Tabulka 1 – Srovnání metod hodnocení kvality spermií. Převzato a upraveno od Sergeant et al. (2019).

Metoda	Počet analyzovaných buněk	Hodnocené parametry	Trvání testu
Makroskopické hodnocení	1 ejakulát	barva, objem, viskozita ejakulátu, morfologie spermií	Méně než 5 minut
Spektrofotometrie	10 – 100 mld.	koncentrace	Méně než 5 minut
CASA	100 – 1000 buněk	motilita, koncentrace, morfologie, vitalita spermií	10 minut
Průtoková cytometrie	10 000 – 20 000 buněk	koncentrace, morfologie spermií, subpopulace	20 minut až 1 hod (barvení)
Mikroskopie	10 – 100 buněk	motilita, subpopulace, morfologie spermií	Méně než 5 minut až 1 hod (barvení)

### 3.2 Proteiny spermií

Aby došlo k úspěšnému oplození, musí spermie projít řadou důležitých procesů. Tyto procesy souvisí se změnami v expresi proteinů, které obklopují membránu spermií a interagují s membránovými strukturálními proteiny během epididymálního zrání a ejakulace. Proteiny spermií slouží především k ochraně před oxidačním stresem při průchodu nadvarletem a samičím pohlavním traktem, mají vliv na motilitu spermií, metabolismus energie, integritu plazmatické membrány, kapacitaci, akrozomovou reakci či na schopnost spermie fúzovat s oocytem (De Lazari et al. 2020).

Na povrchu spermií se nachází mnoho proteinů, které mají různou funkci. Jejich funkce je ovlivněna prostředím, ve kterém se spermie nachází. Nejvíce zastoupenou skupinou povrchových proteinů spermie jsou spermadheziny. Spermadheziny jsou sekreční proteiny, které se během epididymální maturace a ejakulace vážou na povrch spermií. Jsou to multifunkční proteiny, podílející se na různých fázích oplození. Bylo dokázáno, že diferenciací ve funkčních vlastnostech spermadhezínů je dána posttranslačními modifikacemi, zejména glykosylací. U kance patří většina proteinů semenné plazmy do rodiny spermadhezínů a jsou syntetizovány především ve varleti a nadvarleti. Mezi spermadheziny semenné plazmy u kanců patří PSP-I, PSP-II, AQN-1, AQN-2, AQN-3, AWN a DQH. Všechny zmíněné spermadheziny, kromě PSP-I, vykazují vazbu na heparin. Jejich hlavním úkolem je napomoci spermii navázat se na *zona pellucida* oocytu (Strzezek et al. 2005).

Je spousta dalších proteinů, které se nacházejí v různých částech spermie, či v semenné plazmě a epididymální tekutině. Proteiny epididymální tekutiny mohou měnit složení a vlastnosti membrány spermií například výměnou proteinu či lipidů nebo modifikovat již přítomné proteiny. Nejintenzivněji vylučovaným proteinem v nadvarleti kance je clusterin, který představuje 25-30 % a je důležitý pro ochranu spermie. Dalším důležitým proteinem je akrozin, který je uvolňován z akrozomu během akrozomové reakce. Ve spermatidách se akrozin nachází v neaktivní formě jako proakrozin. V plazmatické membráně se nachází protein

zonadhezin, jehož nepřítomnost spermiím umožňuje vázat se na *zona pellucida* jiných druhů (Dacheux et al. 2005). Další důležitou funkcí proteinů spermií je eliminace nepotřebných proteinů a také schopnost zbavovat se vadných spermií. Tuto funkci má například protein ubiquitin (Sutovsky et al. 2001). Více proteinů a jejich funkce viz Tabulka 2.

Tabulka 2 – Proteiny spermií kance a jejich funkce (Kamada et al. 1998; Dacheux et al. 2005; Casas et al. 2009; Gervasi & Visconti 2016; Zigo et al. 2020)

Název	Funkce
Lactoferrin	Antimikrobiální účinky
AQN1	Vazba spermie na oviduktální epitel a na ZP
Proteiny z rodiny ADAM	Uvolnění spermií z oviduktálního epitelu
MSMB	Inhibitor motility spermií
p47	Vazba na oviduktální epitel
$\beta$ 1, 4- galaktosyltransferáza	Vazba spermie na ZP
tubulin	Protein cytoskeletu
HSP90AA1	Ochrana před tepelným šokem, pohyblivost spermií
AWN	Vazba na oviduktální epitel a na ZP
Sp32	Vazba akrozinu

### 3.2.1 AKAP proteiny

Adaptorové proteiny jsou heterotetramerní proteinové komplexy, které zprostředkovávají třídění membránových proteinů v sekrečních a endocytárních drahách (Wong & Scott 2004). Tyto proteiny nemají enzymatickou aktivitu a slouží pouze k tomu, aby se dané enzymy dostaly do vzájemné blízkosti a tím se usnadnil průběh enzymatické reakce. Pro tyto proteiny je typické, že mají dvě vazebná místa, na která se enzymy vážou. Mezi tyto proteiny se řadí skupina tzv. kotvících proteinů, mezi které patří, mimo jiné, AKAP proteiny (Park & Guo 2014).

Byly provedeny rozsáhlé studie k identifikaci proteinů, které tvoří fibrózní pochvu bičíku. Fibrózní pochva je unikátní cytoskeletární struktura, umístěná v hlavní části bičíku spermie (viz Obrázek 1). AKAP proteiny jsou skupina strukturně odlišných proteinů nacházejících se ve fibrózní pochvě, které mají společnou funkci vázat se k regulační podjednotce PAK (cAMP – dependentní proteinkináza A) (viz Obrázek 3). PKA je vystavena cAMP (cyklický adenosinmonofosfát), což umožňuje účinnou katalytickou aktivaci a přesnou volbu substrátu (Frayne & Hall 2002). Bylo popsáno více jak 20 AKAP proteinů (Michel & Scott 2002). Cyklické AMP-dependentní proteinkinázy jsou zajištěny ve specifických cytoplazmatických doménách kotvícími proteiny AKAP, přičemž nejhojnějším proteinem ve fibrózní pochvě je AKAP4. Hrají důležitou roli při regulaci motility spermií prostřednictvím aktivace PKA (Bajpai et al. 2006). Bylo zjištěno, že AKAP4 váže proteiny, specifické pro spermatogenní buňky, a to FSIP1 a FSIP2. Transkripce AKAP4, AKAP3 a FSIP1 začíná v časném vývoji spermatid, zatímco transkripce FSIP2 začíná v pozdním vývoji spermatocytů. AKAP3 je syntetizován ve spermatidách a do fibrózní pochvy je začleněn společně s tvorbou prekurzorů

spojovacích žebber (Gabrovsek et al. 2017). AKAP4 je syntetizován a začleněn do fibrózní pochvy až v pozdějším vývoji spermatid. Pouze zralá forma AKAP4 váže AKAP3. AKAP3 se podílí na organizaci základní struktury fibrózní pochvy a AKAP4 má hlavní roli při jeho kompletaci (Brown et al. 2003).

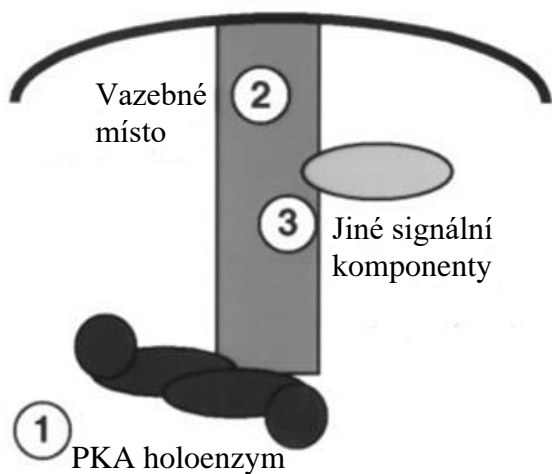
Do přenosu signálu za hormony a neurotransmitery jsou zapojeny sekundární messengery včetně cAMP. Podílí se na mnoha buněčných procesech, včetně růstu, diferenciaci a přežití buněk. cAMP je syntetizován z ATP rodinou adenylát cykláz, které jsou regulovány heterotrimerními G-proteiny nebo  $Ca^{2+}$ /kalmulinem v reakci na signalizaci buněčných povrchových receptorů. Aktivace cAMP je zprostředkována dvěma faktory, PKA nebo proteinem Epac (Liu et al. 2020). Aktivace PKA je jednou z nejlépe charakterizovaných signálních drah. PKA je serin/threonin kináza, která je složená z dvou katalytických podjednotek udržovaných v neaktivním stavu asociací s dvěma regulačními podjednotkami. Katalytické podjednotky jsou kódovány třemi různými geny, Ca, Cp a Cy, zatímco regulační podjednotky jsou exprimovány čtyřmi různými geny, RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$  a RII $\beta$ . Regulační podjednotka je polypeptid, který obsahuje N-terminální dimerizační oblast, autofosforylační místo, které slouží jako hlavní kontaktní místo pro katalytickou podjednotku a dvě vazebná místa cAMP. Aktivaci PKA provádí výhradně hlavní difúzní sekundární messenger cAMP. Vazba dvou cAMP molekul ke každé regulační podjednotce uvolňuje PKA, což umožňuje katalytickým podjednotkám disociovat a vést k fosforylaci přítomných cílových substrátů. Existují dvě formy heterotetramerního PKA holoenzymu, a to typ I (RI $\alpha$ , RI $\beta$ ) a typ II (RII $\alpha$ , RII $\beta$ ). PKA typu I je převážně cytoplazmatická a citlivější k cAMP než typ II. PKA typu II se spojuje se specifickými buněčnými strukturami a organelami (Michel & Scott 2002).

Lokalizace PKA typu II v buňce je dána především asociací regulační podjednotky s neenzymatickými proteiny AKAP. Všechny obsahují amfipatickou šroubovici 14 až 18 zbytků, na kterou se váže N-konec dimeru PKA-RII. AKAP spojují neaktivní holoenzym PKA na definovaných místech v buňce, kde jsou připraveny fosforylovat substrát v reakci na aktivaci cAMP (Michel & Scott 2002).

Protein AKAP4 je vůbec nejhojnějším proteinem fibrózní pochvy v hlavní části bičíku spermií savců. Gen AKAP4 je exprimován pouze v postmeiotické fázi spermatogeneze a produkuje dva transkripty, ze kterých jeden kóduje protein, který je na N-konci o devět aminokyselin delší než ten druhý. Jeho exprese je omezena na zárodečné buňky od stádia kulatých spermatid až do zralé spermie (Jumeau et al. 2018). Protein AKAP4 hraje hlavní roli ve struktuře bičíku spermie, jeho pohyblivosti a během kapacitace. Je fosforylován tyrozinkinázou, která spouští kaskádu fosforylace proteinů, které jsou zapojeny do motility spermie. Je syntetizován jako prekurzor, tzv. proAKAP4, který se postupně štěpí na zralý AKAP4 během tvorby fibrózní pochvy. ProAKAP4 je využíván jako marker kvality spermií u lidí a u kanců (Blommaert et al. 2019).

ProAKAP4 je exprimován pouze ve spermatidách a nebyl nalezen v ranějších stádiích spermie ani v semenné plazmě. ProAKAP4 v každé spermii je vytvořena již před ejakulací, kdy jsou spermie transkripčně neaktivní. Naproti tomu množství AKAP4 je modulováno podle počáteční zásoby proAKAP4 a jeho metabolického stavu. Jakýkoliv defekt během spermatogeneze ovlivní expresi prekurzoru proAKAP4. Terapeutická léčba, jako je podávání antibiotik, či specifické vakcíny mohou mít vliv na spermatogenezi a metabolismus spermií a tím ovlivnit hladinu proAKAP4 (Sergeant et al. 2019).

AKAP4 je nezbytný pro koordinaci signální transdukce PKA na motorické proteiny, jako jsou dyneiny, a tak podporuje klouzání mikrotubulových dubletů axonemy. Jakákoliv změna exprese nebo metabolismu proAKAP4 bude mít vliv na motilitu spermií a následně na plodnost. Bylo dokázáno, že slabá exprese proAKAP4 a AKAP4 je spojena se sníženou pohyblivostí spermií a s dysplazií fibrózní pochvy. AKAP4 také hraje roli při kapacitaci spermií (Rahamim et al. 2016).



Obrázek 3 – Funkční motiv AKAP proteinů. Vazebné místo (1) interaguje s povrchem AKAP proteinu na dimeru regulační podjednotky PKA. (2) Unikátní cílové domény směřují signální komplexy AKAP do rozdílných intracelulárních míst. (3) Další vazebná místa pro další signalizační složky např. kinázy, fosfatázy. Převzato a upraveno od Michel & Scott (2002).

## 4 Metodika

### 4.1 Spermie

Během experimentu byl použit ejakulát od šesti kanců z inseminační stanice ve Skršíně (LIPRA PORK a.s.). Ejakulát byl na pracoviště KVD dopraven v termoboxu při teplotě 17 °C v podobě nativního ejakulátu. Ejakulát byl po odběru dopraven do laboratoře a ihned zpracován.

### 4.2 Příprava vzorků spermií

Pro SDS elektroforézu a pro Western blot byly spermie rozděleny do tří skupin, a to na ejakulované, spermie po *in vitro* kapacitaci a spermie po *in vitro* navozené akrozomové reakci. Kvalita ejakulátu byla posouzena mikroskopicky prostřednictvím mikroskopu Nikon EclipseE200 při zvětšení 100x. Spermie byly odděleny od semenné plazmy stočením na centrifuze (LC-8 5000, Benchmark Scientific Inc., USA; 10 minut, 250 x g) při laboratorní teplotě. Po dokončení centrifugace byl odstraněn supernatant a získaná peleta spermií byla 3x promyta v PBS (Phosphate-buffered saline; 0,01 M fosfátový pufr, 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA) a následně opět zcentrifugována (10 minut, 250 x g) při laboratorní teplotě. Poté bylo k části vzorku spermií přidáno kapacitační médium (složení kapacitačního média viz Tabulka 3) po dobu 1,5 hodiny při teplotě 38 °C s 5% CO<sub>2</sub>. Po dokončení kapacitace byl do části vzorku kapacitovaných spermií přidán 5 μM kalcium ionofor (A23187; Sigma-Aldrich, USA) pro aktivaci akrozomové reakce. Spermie byly takto inkubovány v termostatu po dobu 1 hodiny při teplotě 38 °C s 5% CO<sub>2</sub>. Po uplynutí doby inkubace s kalcium ionoforem byla suspenze 3x promyta v PBS a stočena na centrifuze (10 minut, 250 x g) za laboratorní teploty. Pro extrakci proteinů byl do vzorku ejakulovaných, *in vitro* kapacitovaných a spermií po *in vitro* akrozomové reakci přidán redukující pufr v poměru 1:2. Vzorky byly následně ponechány v ledu po dobu 30 minut a každých 5 minut protřepány na vortexu. Poté byly vzorky povařeny při teplotě 100 °C po dobu 5 minut a následně stočeny na centrifuze (2 minuty, 10 000 x g) při teplotě 4 °C a poté byly odebrány supernatanty, který dále sloužily jako vlastní vzorky pro SDS elektroforézu.

Tabulka 3 – Složení kapacitačního média. Kapacitační médium bylo nejdříve přefiltrováno skrz filtrační papír a následně byl přidán pyruvát sodný, BSA a glukóza.

Složka	Množství
NaCl	3,331 g
KCl	0,1193 g
laktát sodný	0,70 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,02 g
HEPES	1,192 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,051 g
PVA	0,05 g
Sorbitol	1,093 g
gentamicin	0,013 ml
penicilin	0,033 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,084 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,147 g
*pyruvát sodný	0,011 g
*BSA	1 g
*glukóza	0,099 g

#### 4.2.1 SDS elektroforéza a Western blot

Během SDS elektroforézy byla použita sestava pro vertikální elektroforézu. Mezi skla byl nalit 12% separační gel (3,5 ml destilované vody; 2,5 ml 1,5 M Tris HCl (Bio-Rad, USA), pH 8,8; 4,0 ml 30% AA, bis AA (Bio-Rad, USA); 100 µl, 10% SDS (Bio-Rad, USA); 4,5 µl TEMED (Pharmacia Biotech, Švédsko); 35 µl 10% APS (Amersham Biosciences, Švédsko). Po nalití mezi skla byl gel následně převrstven destilovanou vodou. Po ztuhnutí separačního gelu byla destilovaná voda odlita a na ztuhlý separační gel se nalil 4% gel zaostřovací (1,52 ml destilované vody; 625 µl 0,5 M Tris HCL, pH 6,8; 325 µl 30% AA, bis AA; 25 µl 10% SDS; 3,8 µl TEMED a 35 µl 10% roztoku APS, popřípadě bromfenolová modř pro zvýraznění jamek). Do zaostřovacího gelu byl následně zasunut jamkový hřeben. Po zatuhnutí byla skla vložena do sestavy na elektroforézu. Mezi skla se nalil 5x koncentrovaný elektrodový pufr (15 g TRIS, 72 g glycin, 5 g SDS, to vše rozpuštěno v poměru 1:4 v 1 l destilované vody) a poté došlo k vyjmutí jamkového hřebenu. Do jamek byl pomocí mikrostríkačky Hamilton nanesen standard (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; Bio-Rad, USA) společně se vzorky. Vzorky bylo nutné nejdříve nechat roztát a následně zvortexovat. Po nanesení vzorků byla puštěna elektroforéza, nejdříve 30 minut při 80 V a poté na 1 hodinu při 140 V.

Po dokončení elektroforézy byla skla ze sestavy vyjmuta a gel byl přenesen na nitrocelulózovou membránu a vložen do sestavy pro elektropřenos proteinů složené ze 4 listů chromatografického papíru Whatman (GE Healthcare, USA) a 2 houbiček. Celá sestava včetně nitrocelulózové membrány byla předem namáčena po dobu 10 minut v transferovém pufru (3,03 g Tris (Sigma-Aldrich, USA), 14,4 g glycin (Sigma-Aldrich, USA), 200 ml metanolu a 800 ml destilované vody). Celá sestava byla poté vložena do kazety pro elektropřenos, umístěna do elektrodové aparatury a zalita transferovým pufrem. Blotování probíhalo po dobu 1 hodiny při 0,5 A. Po dokončení byla membrána po vyjmutí z kazety barvena barvou Ponceau (Sigma-Aldrich, USA) po dobu 1 minuty. Díky Ponceau došlo k vizualizaci proteinů. Poté došlo k promytí membrány destilovanou vodou a PBS s 0,5% Tweenem. Poté bylo potřeba

deaktivovat vazebná místa na membráně pomocí 5% sušeného mléka (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad, USA; 1 g sušeného mléka, 20 ml PBS). Membrána byla s mlékem inkubována při teplotě 4 °C přes noc.

Membrána byla poté 2x po 5 minutách promyta v PBS s Tweenem pro odstranění nespecifických interakcí a následně byla inkubována s primární králičí polyklonální anti-AKAP4 protilátkou (MBS9602907; MyBioSource, USA) v koncentraci 1:1000 v PBS po dobu 1,5 hodiny. Pro kontrolu proteinové koncentrace ve vzorcích byla provedena imunodetekce  $\alpha$ -tubulinu pomocí primární myší monoklonální anti- $\alpha$ -tubulin protilátky (DM1A; Sigma-Aldrich, USA) v koncentraci 1:1000 v PBS po dobu 1,5 hodiny. Po uplynutí doporučené doby inkubace byla membrána 3x po 10 minutách promyta v PBS s Tweenem a následně byla přidána sekundární protilátka (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) resp. Goat Anti-Mouse IgG (L+H); Bio-Rad, USA) Inkubace v sekundární protilátce trvala 1 hodinu. Membrána byla opět promyta v PBS s Tweenem 4x po 5 minutách a následně 2x po 5 minutách v PBS. Poté byla provedena vizualizace specifické detekce proteinu v přístroji Azure c300 Gel Imaging System (Azure Biosystems, USA) pomocí chemiluminiscenčního substrátu (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific, USA). Byla provedena denzitometrická analýza detekovaných proteinů v programu Image Studio Digit (LI-COR Biosciences, USA) a výsledky byly statisticky zhodnoceny pomocí programu Statistica.

## 5 Výsledky

### 5.1 Detekce proteinu AKAP4 ve spermiích kance

Pro detekci proteinu AKAP4 v kančích spermiích byla použita SDS elektroforéza a proteiny byly následně přeneseny na membránu pomocí metody Western blot. Membrána byla inkubována s primární polyklonální králičí protilátkou proti AKAP4 a pro normalizaci optické denzity proteinu AKAP4 byla provedena kontrolní detekce  $\alpha$ -tubulinu. Detekce proteinu AKAP4 byla provedena v extraktech ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií a spermií po *in vitro* navozené akrozomové reakci u šesti kanců.

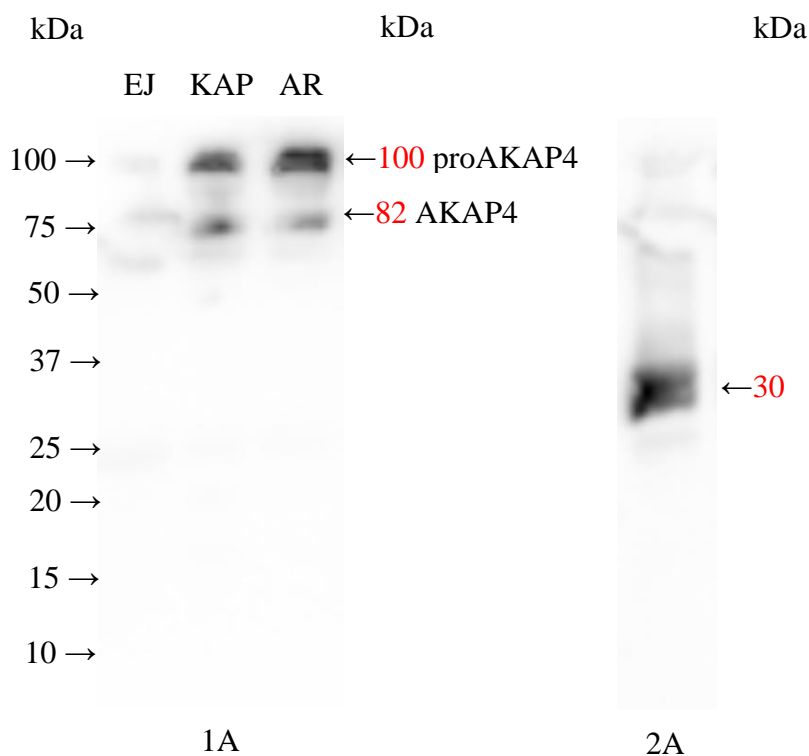
Membrána se separovanými proteiny je zobrazena na obrázcích 4-9 (1A-1F). Patrné byly dva proteinové proužky o molekulových hmotnostech přibližně 82 kDa a 100 kDa. Molekulová hmotnost 100 kDa odpovídá izomeru proAKAP4 a molekulová hmotnost 82 kDa odpovídá AKAP4. Na obrázku 4-9 (2A-2F) je zobrazena kontrola detekcí  $\alpha$ -tubulinu.

Na grafech 1-6 je zobrazeno množství proAKAP4 a AKAP4 v proteinových extraktech spermií u jednotlivých kanců. Grafy zobrazují výsledky denzitometrické analýzy a ukazují hodnoty signálu protilátky proti proAKAP4 a AKAP4 vztaženého k signálu protilátky proti  $\alpha$ -tubulinu. Nejnižší množství proAKAP4 u ejakulovaných spermií bylo naměřeno u kance **A**, a naopak nejvyšší množství u kance **E**. U *in vitro* kapacitovaných spermií byly nejnižší hodnoty naměřeny u kance **B** a nejvyšší u kance **F**. Nejnižší hodnoty proAKAP4 u spermií po *in vitro* akrozomové reakci byly naměřeny u kance **B** a nejvyšší u kance **C**.

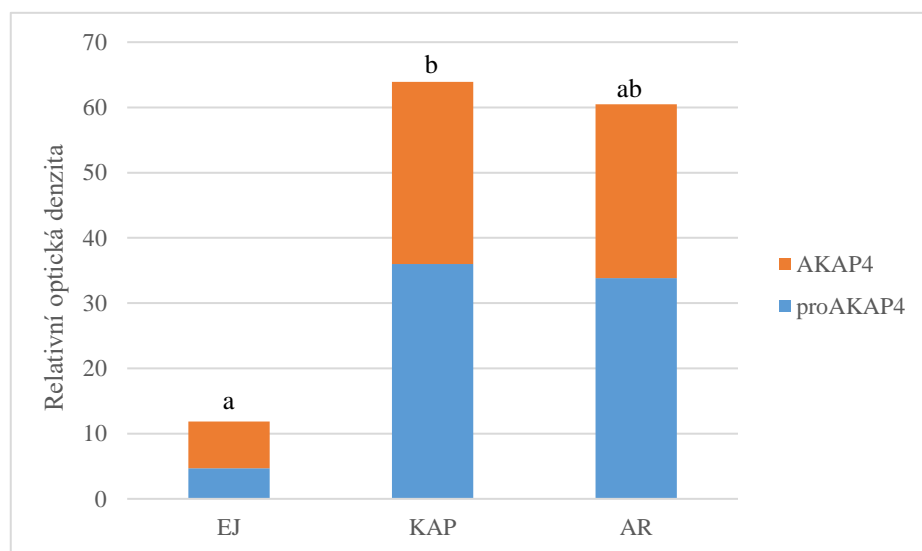
Co se týče AKAP4, nejnižší hodnoty u ejakulovaných spermií byly naměřeny u kance **B** a nejvyšší u kance **C**. U *in vitro* kapacitovaných spermií je nejnižší množství AKAP4 u kance **C** a nejvyšší u kance **A**. U spermií po *in vitro* akrozomové reakci je nejnižší hodnota u kance **C** a nejvyšší u kance **A**. Mezi jednotlivými kanci je statisticky významný rozdíl.

Nejvyšší průměrná hodnota proAKAP4 byla naměřena u *in vitro* kapacitovaných spermií a nejnižší u ejakulovaných spermií. U AKAP4 byla nejvyšší průměrná hodnota u spermií po *in vitro* kapacitaci a nejnižší u spermií ejakulovaných.

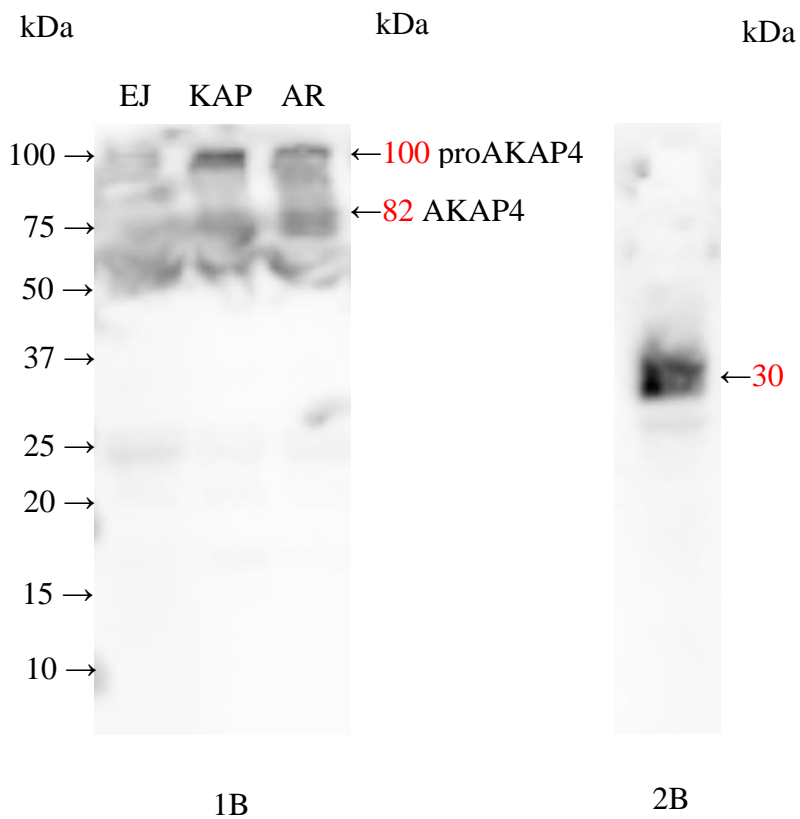




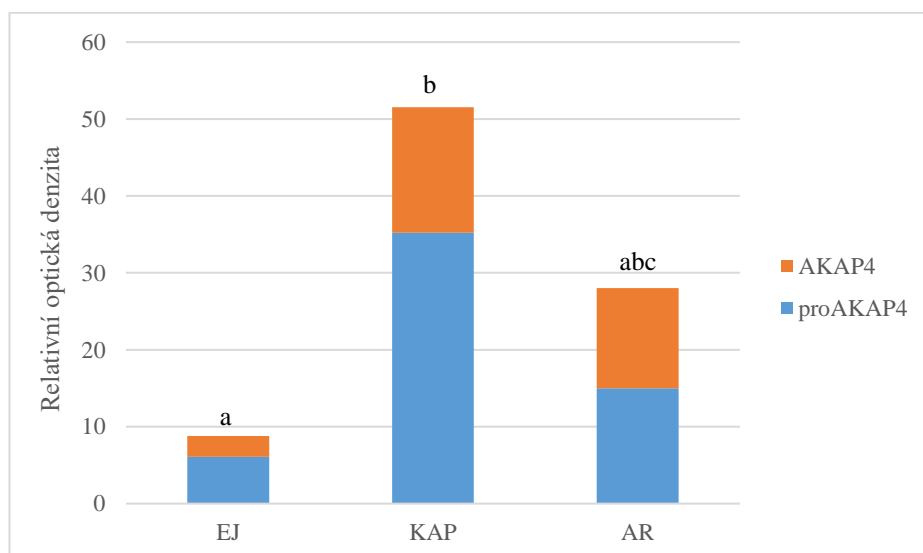
Obrázek 4 – Imunodetekce proteinu AKAP4 pomocí králičí polyklonální anti-AKAP4 protilátky u kance A. Detekce AKAP4 králičí protilátkou anti-AKAP4 (1A), detekce  $\alpha$ -tubulinu (2A). EJ – ejakulované spermie, KAP – *in vitro* kapacitované spermie, AR – spermie po *in vitro* akrozomové reakci.



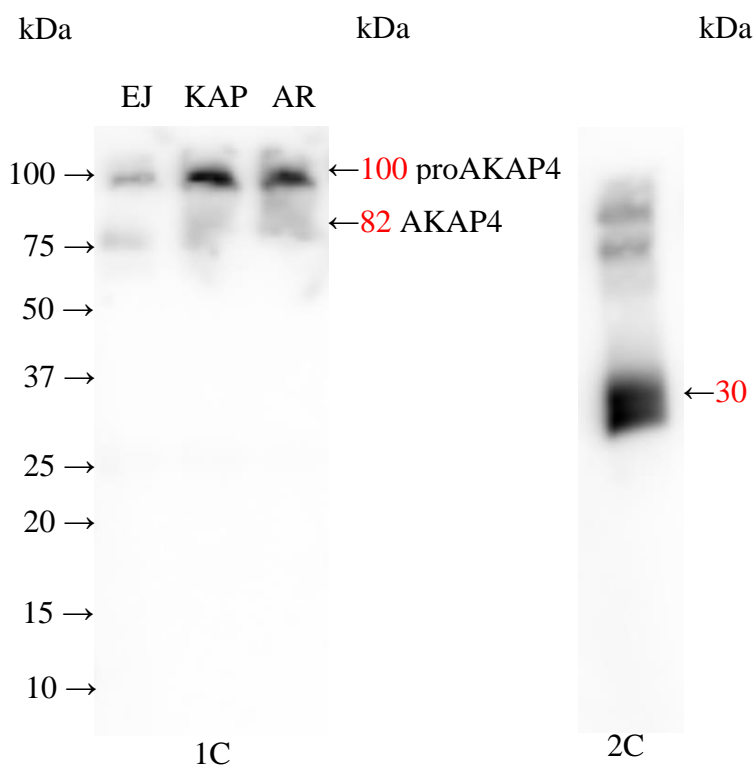
Graf 1 – Detekce proAKAP4 a AKAP4 ve spermích kance A. Statisticky významné rozdíly jsou vyznačeny rozdílnými znaky (a,b,c). EJ – ejakulované spermie, KAP – *in vitro* kapacitované spermie, AR – spermie po *in vitro* akrozomové reakci.



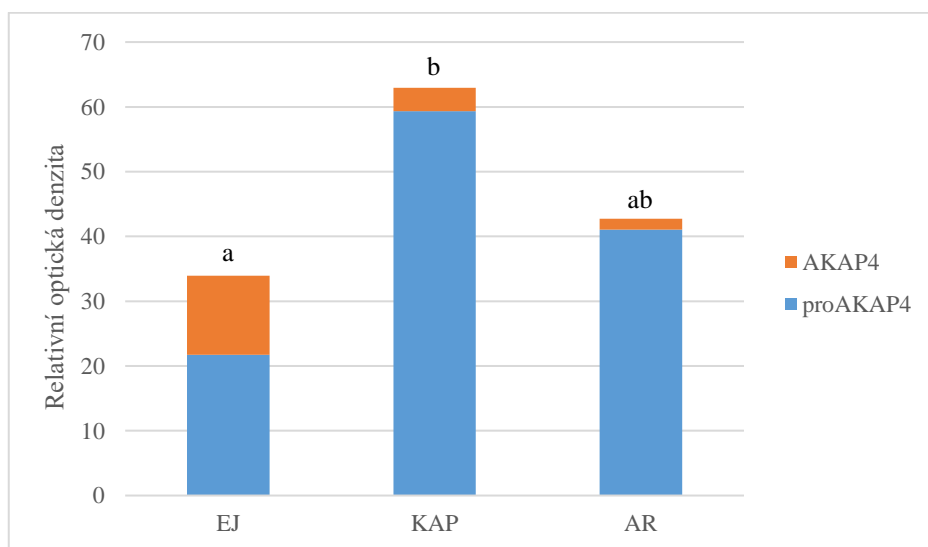
Obrázek 5 – Imunodetekce proteinu AKAP4 pomocí králičí polyklonální anti-AKAP4 protilátky u kance **B**. Detekce AKAP4 králičí protilátkou anti-AKAP4 (1B), detekce  $\alpha$ -tubulinu (2B). EJ – ejakulované spermie, KAP – *in vitro* kapacitované spermie, AR – spermie po *in vitro* akrozomové reakci.



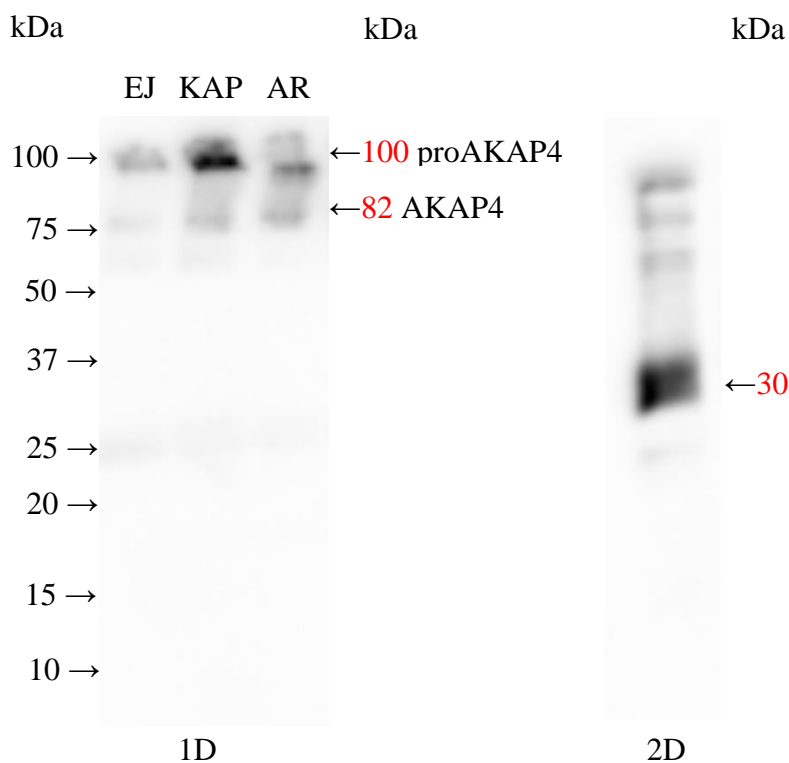
Graf 2 – Detekce proAKAP4 a AKAP4 ve spermích kance **B**. Statisticky významné rozdíly jsou vyznačeny rozdílnými znaky (a,b,c). EJ – ejakulované spermie, KAP – *in vitro* kapacitované spermie, AR – spermie po *in vitro* akrozomové reakci.



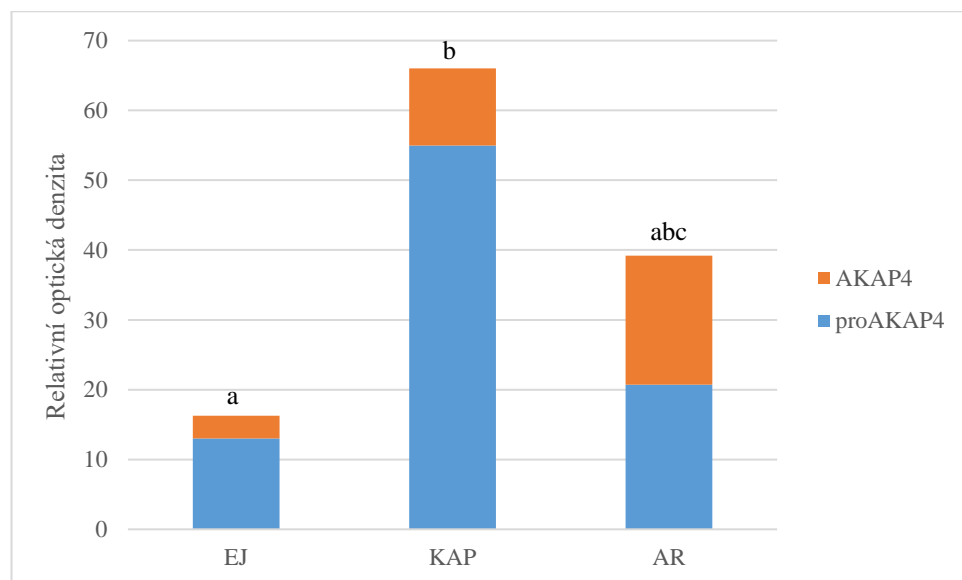
Obrázek 6 – Imunodetekce proteinu AKAP4 pomocí králičí polyklonální anti-AKAP4 protilátky u kance C. Detekce AKAP4 králičí protilátkou anti-AKAP4 (1C), detekce  $\alpha$ -tubulinu (2C). EJ – ejakulované spermie, KAP – *in vitro* kapacitované spermie, AR – spermie po *in vitro* akrozomové reakci.



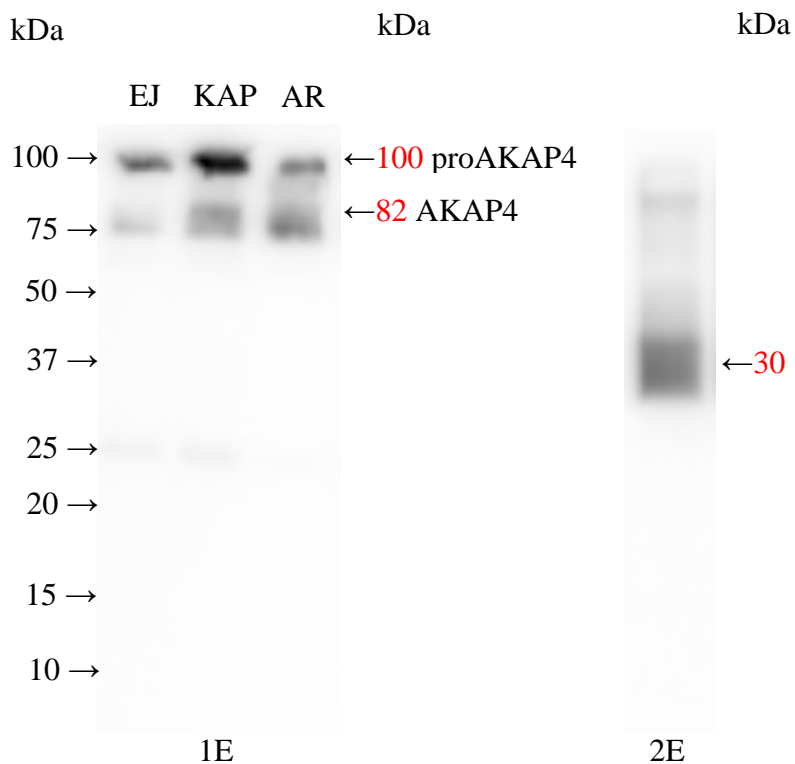
Graf 3 – Detekce proAKAP4 a AKAP4 ve spermích kance C. Statisticky významné rozdíly jsou vyznačeny rozdílnými znaky (a,b,c). EJ – ejakulované spermie, KAP – *in vitro* kapacitované spermie, AR – spermie po *in vitro* akrozomové reakci.



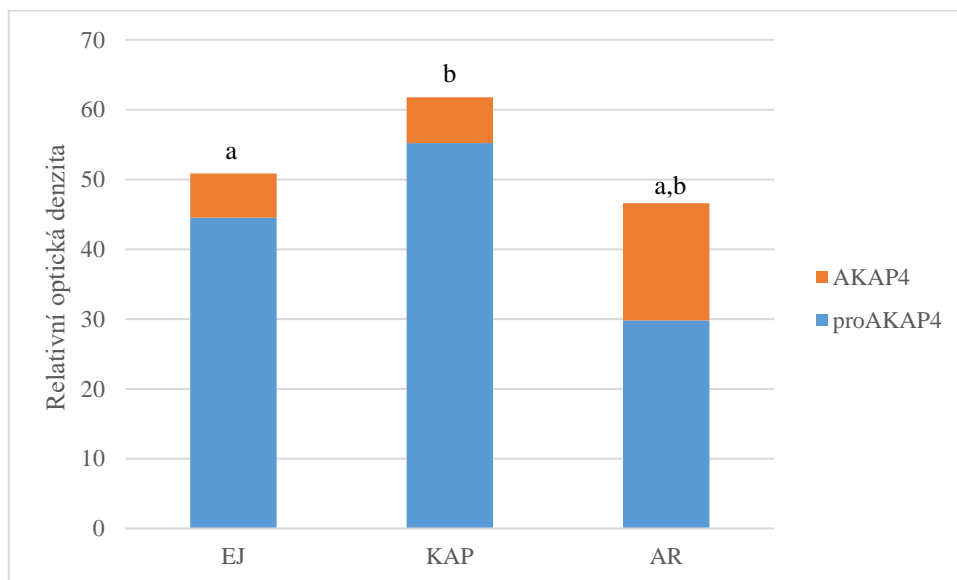
Obrázek 7 – Imunodetekce proteinu AKAP4 pomocí králičí polyklonální anti-AKAP4 protilátky u kance **D**. Detekce AKAP4 králičí protilátkou anti-AKAP4 (1D), detekce  $\alpha$ -tubulinu (2D). EJ – ejakulované spermie, KAP – *in vitro* kapacitované spermie, AR – spermie po *in vitro* akrozomové reakci.



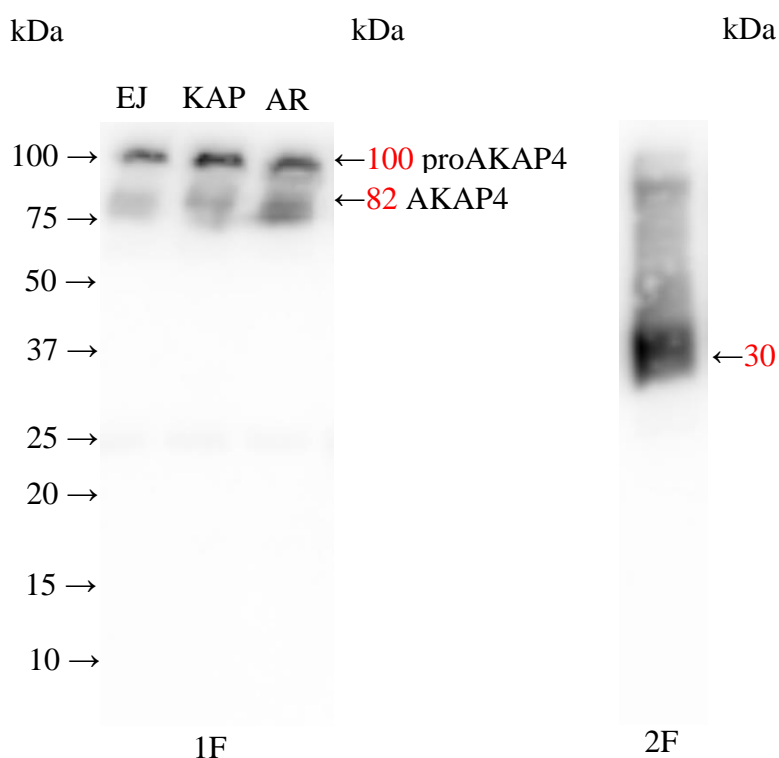
Graf 4 – Detekce proAKAP4 a AKAP4 ve spermích kance **D**. Statisticky významné rozdíly jsou vyznačeny rozdílnými znaky (a,b,c). EJ – ejakulované spermie, KAP – *in vitro* kapacitované spermie, AR – spermie po *in vitro* akrozomové reakci.



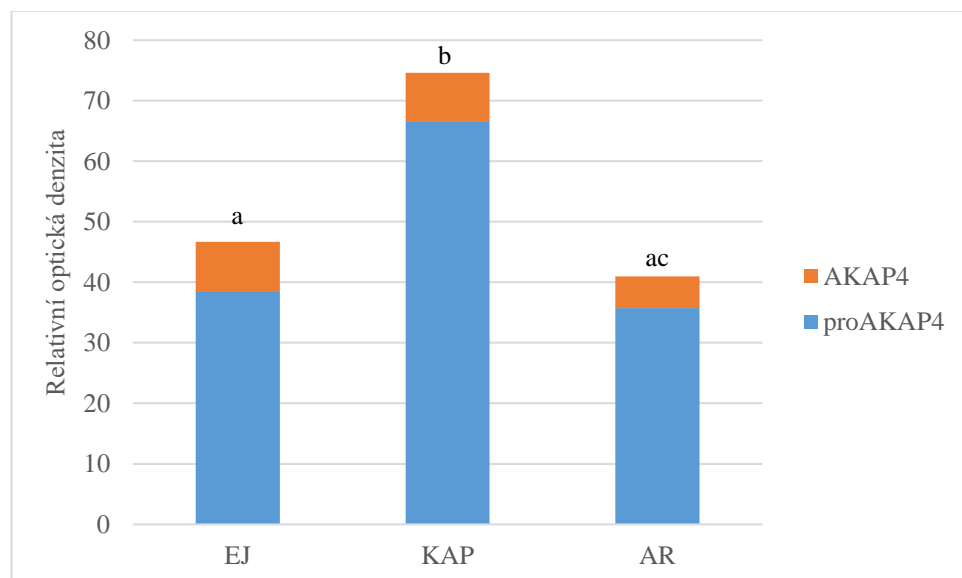
Obrázek 8 – Imunodetekce proteinu AKAP4 pomocí králičí polyklonální anti-AKAP4 protilátky u kance **E**. Detekce AKAP4 králičí protilátkou anti-AKAP4 (1E), detekce  $\alpha$ -tubulinu (2E). EJ – ejakulované spermie, KAP – *in vitro* kapacitované spermie, AR – spermie po *in vitro* akrozomové reakci.



Graf 5 – Detekce proAKAP4 a AKAP4 ve spermích kance **E**. Statisticky významné rozdíly jsou vyznačeny rozdílnými znaky (a,b,c). EJ – ejakulované spermie, KAP – *in vitro* kapacitované spermie, AR – spermie po *in vitro* akrozomové reakci.



Obrázek 9 – Imunodetekce proteinu AKAP4 pomocí králičí polyklonální anti-AKAP4 protilátky u kance **F**. Detekce AKAP4 králičí protilátkou anti-AKAP4 (1F), detekce α-tubulinu (2F). EJ – ejakulované spermie, KAP – *in vitro* kapacitované spermie, AR – spermie po *in vitro* akrozomové reakci.



Graf 6 – Detekce proAKAP4 a AKAP4 ve spermích kance **F**. Statisticky významné rozdíly jsou vyznačeny rozdílnými znaky (a,b,c). EJ – ejakulované spermie, KAP – *in vitro* kapacitované spermie, AR – spermie po *in vitro* akrozomové reakci.

## 6 Diskuze

Spermie savců bezprostředně po ejakulaci nejsou schopny oplodnit oocyt samice. Aby tuto schopnost získaly, musí po omezenou dobu pobýt v reprodukčním traktu samice a projít řadou změn. Molekulární, biochemické a fyziologické změny, ke kterým u spermií v reprodukčním traktu samice dochází, jsou souhrnně označovány jako kapacitace. Během kapacitace dochází ke změnám v membráně spermií, k aktivaci enzymů a k hyperaktivaci motility, což způsobuje to, že spermie reagují na podněty, které indukují akrozomovou reakci a připravují spermie na fúzi s oocytem (Salicioni et al. 2007).

Během hyperaktivace motility spermií dochází ke změně charakteru pohybu bičíku, konkrétně ke zvýšení amplitudy a jeho asymetrickému ohybu. Hyperaktivace motility je nezbytná především pro oddělení spermií od stěny vejcovodu, dále napomáhá k usnadnění pohybu spermií v lumen vejcovodu a je také důležitá pro proniknutí spermií skrz *zona pellucida*. Ve vejcovodu jsou přítomny signály k zahájení hyperaktivace ve vhodný čas. Řada fyziologických faktorů, jako je hladina  $Ca^{2+}$  a cAMP, je zásadní pro zahájení a udržení hyperaktivace motility u spermií (Suarez & Ho 2003). Adaptorové proteiny jsou proteiny bez enzymatické aktivity a slouží pouze jako přenašeči (Bajpai et al. 2006). Proteiny AKAP jsou skupinou strukturně odlišných proteinů se společnou funkcí vázat se na regulační podjednotky cAMP dependentní proteinkinázy A (PKA). Vazbou PKA na AKAP proteiny dochází k lokalizaci PKA do místa působení a k zajištění fosforylace cílových substrátů (Luconi et al. 2011).

V této práci jsme se zaměřili na detekci proAKAP4 a AKAP4 v různých stádiích post-testikulárního vývoje kančích spermií. Pomocí polyklonální králičí anti-AKAP4 protilátky jsme detekovali proAKAP4 a AKAP4 ve spermiích ejakulovaných, *in vitro* kapacitovaných a u spermií po *in vitro* navozené akrozomové reakci. Pomocí imunodetekce se nám podařilo získat dva proteinové proužky o molekulové hmotnosti přibližně 100 kDa a 82 kDa. Teijeiro a Marini (2012) taktéž detekovali ve svém výzkumu dva proteinové proužky o molekulové hmotnosti přibližně 97 kDa a 80 kDa. V našich experimentech odpovídá proteinový proužek o molekulové hmotnosti 82 kDa proteinu AKAP4 a proužek o molekulové hmotnosti 100 kDa odpovídá jeho izomeru proAKAP4.

Z našich výsledků vyplývá, že množství proAKAP4 a AKAP4 se u různých kančů liší. Dle grafů 1 až 6 je zřejmé, že nejnížší detekce proAKAP4 je ve spermiích ejakulovaných, následně dochází k výraznému zvýšení hladiny proAKAP4 a AKAP4 během *in vitro* kapacitace a po *in vitro* akrozomové reakci hladina proAKAP4 opět prudce klesla. Nejnížší hladina proteinu AKAP4 byla rovněž naměřena u spermií ejakulovaných a nejvyšší u spermií *in vitro* kapacitovaných s nepatrným rozdílem od spermií po *in vitro* akrozomové reakci. Castillo et al. (2019) provedl výzkum u tří jedinců, kdy zkoumal množství proteinů podílejících se na motilitě spermií v ejakulovaných, *in vitro* kapacitovaných a u spermií po *in vitro* akrozomové reakci. Zjistil, že u ejakulovaných spermií bylo množství těchto proteinů nižší a následně po přidání kapacitačního média došlo k výraznému zvýšení hladiny proteinů. U spermií po *in vitro* akrozomové reakci byl opět zaznamenán pokles hladiny proteinu AKAP4. Pokles během akrozomové reakce přisuzuje tomu, že mohlo dojít k přemístění proteinů či k jejich uvolnění. Naše výsledky korespondují s výsledky Castillo et al. (2019).

Moretti et al. (2007) provedl výzkum, jehož cílem bylo provést screening týkající se proteinu AKAP4 a tubulinových proteinů ve spermích s výrazně sníženou pohyblivostí za účelem zjištění stavu fibrózní pochvy a struktury axonemy. Provedl imunocytochemickou studii tubulinu, který použil jako kontrolu a AKAP4 za účelem detekce v různých vzorcích spermí. Morfologické charakteristiky spermí studoval pomocí elektronového mikroskopu. Výsledky jeho studia ukázaly značné rozdíly mezi jedinci, a tak rozdělil vzorky do několika skupin. Ve skupině I. byla zjištěna nepřítomnost AKAP4 i tubulinu, ve skupině II. bylo zaznamenáno silné značení AKAP4 i tubulinu a ve skupině III. zaznamenal jen slabé značení AKAP4 i tubulinu. Skupina I. vykazovala úplnou imobilitu spermí, u skupiny II. byla i přes vysoké značení AKAP4 motilita značně snižena. Ve skupině III. byla taktéž zaznamenána snížená motilita a zároveň i dezorganizace fibrózní pochvy. Úloha proteinu AKAP4 během motility spermí je stále nejasná, ale stále více studií poukazuje na jeho spojitost s chybějící či se sníženou pohyblivostí spermí.

Při porovnání hodnot mezi jednotlivými kanci lze usoudit, že je mezi nimi statisticky významný rozdíl. Pokud porovnáme hodnoty signální denzity kanců s nejvyššími hodnotami s kanci s nejnižšími hodnotami, hodnota signální denzity izomeru proAKAP4 u ejakulovaných spermí u kance s nejnižší hodnotou v porovnání s kancem s nejvyšší hodnotou byla 8x nižší. U *in vitro* kapacitovaných a u spermí po *in vitro* navození akrozomové reakci není rozdíl tak výrazný, nejnižší hodnoty byly v porovnání s nejvyššími naměřenými jen 2x až 2,5x nižší. U proteinu AKAP4 u ejakulovaných spermí byly nejnižší hodnoty oproti nejvyšším 4x nižší a u *in vitro* kapacitovaných 7,5x nižší. U spermí po *in vitro* navození akrozomové reakci je vidět výrazný rozdíl v hodnotách AKAP4 mezi kancem s nejvyšší signální denzitou a kancem s nejnižší denzitou, kdy byla nejnižší hodnota až 15x nižší v porovnání s nejvyšší. Tyto rozdíly v hodnotách mezi jednotlivými kanci mohou značit rozdíly ve fertilitě.

Jak ve svém výzkumu zmínil Sergeant et al. (2019) jakékoliv defektní události během spermatogeneze ovlivní expresi proAKAP4 a následně i expresi proteinu AKAP4. Uvedl rovněž faktory jako věk, prostředí, terapeutická léčba či stres, které mají také vliv na kvalitu ejakulátu. Tímto bychom mohli vysvětlit statisticky významný rozdíl v hodnotách proAKAP4 a AKAP4 mezi spermii ejakulovanými, *in vitro* kapacitovanými a u spermí po navození *in vitro* akrozomové reakce mezi jednotlivými kanci.

Dle výsledků studií zde zmíněných a výsledků z našich vlastních experimentů lze s jistotou říci, že AKAP4 hraje roli během kapacitace spermí a během procesů, ke kterým během kapacitace dochází. Nelze však s jistotou říci, zda je pro tyto procesy klíčový.

Studiem proteinu AKAP4 a jeho úlohou v kančích spermích se zabývá spousta studií, avšak jeho funkce a zastoupení ve spermích kance není zcela ujasněna. Individuální rozdíly můžeme přisuzovat, jak zmínil Sergeant et al. (2019), defektním událostem, tudíž můžeme předpokládat, že každý z kanců byl vystaven jiným podmínkám. Pro další výzkum by bylo vhodné využít i jiné metody kromě SDS elektroforézy



a metody Western blot a bylo by také dobré využít více vzorků, popřípadě u každého ze vzorků provést více opakování.

## 7 Závěr

V této diplomové práci jsme měli potvrdit hypotézu, zda jsou proteiny rodiny AKAP zapojené do procesu kapacitace a zda souvisí s motilitou kančích spermií. Cílem práce bylo lokalizovat proAKAP4 a AKAP4 na spermiích kance polyklonální králičí protilátkou proti AKAP4.

ProAKAP4 i AKAP4 byl detekován v extraktech ejakulovaných, *in vitro* kapacitovaných a u spermií po *in vitro* idnukované akrozomové reakci, proAKAP4 o molekulové hmotnosti 100 kDa a AKAP4 o molekulové hmotnosti 82 kDa. Nejnižší množství proAKAP4 i AKAP4 bylo naměřeno u spermií ejakulovaných a nejvyšší u spermií *in vitro* kapacitovaných. Během *in vitro* akrozomové reakce množství proAKAP4 prudce kleslo, zatímco u proteinu AKAP4 došlo po *in vitro* aktivaci akrozomové reakce pouze k nepatrnému snížení. Mezi jednotlivými kanci byly taktéž statisticky významné rozdíly, což může odrážet rozdíly ve fertilitě kanců.

Z našich výsledků vyplývá, že hypotéza o zapojení proteinu AKAP4 během kapacitace byla potvrzena a můžeme tedy předpokládat, že se podílí na procesech, které během kapacitace probíhají, včetně motility spermií kanců. Navíc by bylo vhodné během dalších experimentů využít například systém CASA, díky kterému bychom mohli pozorovat změny právě u motility spermií.

## 8 Literatura

- Abou-Haila A, Tulsiani DR. 2000. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of biochemistry and biophysics* **379(2)**:173-182.
- Bailey JL. 2010. Factors regulating sperm capacitation. *Systems biology in reproductive medicine* **56(5)**:334-348.
- Bajpai M, Fiedler SE, Huang Z, Vijayaraghavan S, Olson GE, Livera G, Carr DW. 2006. AKAP3 selectively binds PDE4A isoforms in bovine spermatozoa. *Biology of reproduction* **74(1)**:109-118.
- Berndtson WE. 2014. Sperm Production and its Harvest. Pages 11-33 in: Chenoweth PJ, Lorton SP, editors. *Animal Andrology: theories and applications*. Wallingford, Oxfordshire.
- Blommaert D, Sergeant N, Delehedde M, Jouy N, Mitchell V, Franck T, Serteyn D. 2019. Expression, localization, and concentration of A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) and its precursor (proAKAP4) in equine semen: Promising marker correlated to the total and progressive motility in thawed spermatozoa. *Theriogenology* **131**:52-60.
- Breitbart H. 2003. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY-PARIS-WEGMANN* **49(3)**:321-328.
- Brown PR, Miki K, Harper DB, Eddy EM. 2003. A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum. *Biology of reproduction* **68(6)**:2241-2248.
- Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. 2009. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology* **72(7)**:930-948.
- Castillo J, Bogle OA, Jodar M, Torabi F, Delgado-Dueñas D, Estanyol JM, Oliva R. 2019. Proteomic changes in human sperm during sequential in vitro capacitation and acrosome reaction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2019**:295.
- Champroux A, Torres-Carreira J, Gharagozloo P, Drevet JR, Kocer A. 2016. Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic and Clinical Andrology* **26(17)**:1-22.
- Chłopik A, Wysokińska A. 2020. Canine spermatozoa—What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reproduction in Domestic Animals* **55(2)**:113-126.
- Czaker R. 1985. Morphogenesis and cytochemistry of the postacrosomal dense lamina during mouse spermiogenesis. *Journal of Ultrastructure Research* **90**:26-39.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* **63(2)**:319-341.
- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Human reproduction* **13**:1-8.

de Lazari FL, Sontag ER, Schneider A, Moura AAA, Vasconcelos FR, Nagano CS, Bustamante-Filho IC. 2020. Proteomic identification of boar seminal plasma proteins related to sperm resistance to cooling at 17 C. *Theriogenology* **147**:135-145.

Eddy E, O'Brien D. 1994. The Spermatozoon. Pages 29-77 in: Neill JD, Knobil E, editors. *Physiology of Reproduction* edition. Academic Press, Cambridge.

Fawcett DW. 1975. The mammalian spermatozoon. *Developmental biology* **44(2)**:394-436.

Florman HM, Fissore RA. 2015. Fertilization in Mammals. In: Knobil and Neill's physiology of reproduction **1**:149-196.

Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. 2004. Regulating the acrosome reaction. *International Journal of Developmental Biology* **52(5-6)**:503-510.

França LR, Avelar GF, Almeida FF. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* **63(2)**:300-318.

Frayne J, Hall L. 2002. A re-evaluation of sperm protein 17 (Sp17) indicates a regulatory role in an A-kinase anchoring protein complex, rather than a unique role in sperm-zona pellucida binding. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE* **124(6)**:767-774.

Gabrovsek L, Bucko P, Carnegie GK, Scott JD. 2017. A-kinase anchoring protein (AKAP). *Encyclopedia of Signaling Molecules* **2017**:1-6.

García-Vázquez FA, Gadea J, Matás C, Holt WV. 2016. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian Journal of Andrology* **18(6)**:844.

Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. *Reproduction in farm animals* **2000**:96-109.

Gervasi MG, Visconti PE. 2016. Chang's Meaning Of Capacitation: A Molecular Perspective. *Molecular Reproduction And Development* **83**:860-874.

Guyonnet B, Egge N, Cornwall GA. 2014. Functional amyloids in the mouse sperm acrosome. *Molecular and cellular biology* **34(14)**:2624-2634.

Ho HC, Suarez SS. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE* **122(4)**:519-526.

Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal Reproduction Science* **60**:471-480.

Jumeau F, Sigala J, Dossou-Gbete F, Frimat K, Barbotin AL, Buee L, Mitchell V. 2018. A-kinase anchor protein 4 precursor (pro-AKAP4) in human spermatozoa. *Andrology* **6(6)**:854-859.

- Kamada M, Mori H, Maeda N, Yamamoto S, Kunimi K, Takikawa M, Maegawa M, Aono T, Futaki S, Koide SS. 1998. B-Microseminoprotein/prostatic secretory protein is a member of immunoglobulin binding factor family. *Biochimica et Biophysica Acta* **1388**:101-110.
- Kann M, Feinberg J, Rainteau D, Dadoune J, Weinman S, Fouquet J. 1991. Localization of Calmodulin in perinuclear structures of spermatids and spermatozoa: A comparison of six mammalian species. *The Anatomical Record* **230**:481-488.
- Krapf D, Arcelay E, Wertheimer EV, Sanjay A, Pilder SH, Salicioni AM, Visconti PE. 2010. Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *J Biol Chem* **285**:7977–7985.
- Lehti MS, Sironen A. 2017. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biology of reproduction* **97**(4):522-536.
- Lindemann CB, Lesich KA. 2016. Functional anatomy of the mammalian sperm flagellum. *Cytoskeleton* **73**(11):652-669.
- Lipenský J, Lustykova A, Čerovský J. 2010. Effect of season on boar sperm morphology. *Journal of Central European Agriculture*.
- Liu Y, Merrill RA, Strack S. 2020. A-kinase anchoring protein 1: Emerging roles in regulating mitochondrial form and function in health and disease. *Cells* **9**(2):298.
- Luconi M, Cantini G, Baldi E, Forti G. 2011. Role of a-kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction. *Front Biosci* **16**(1):1315-1330.
- Michel JJC, Scott JD. 2002. AKAP mediated signal transduction. *Annual review of pharmacology and toxicology* **42**(1):235-257.
- Moreno RD, Alvarado CP. 2006. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* **73**(11):1430-1434.
- Moretti E, Scapigliati G, Pascarelli NA, Baccetti B, Collodel G. 2007. Localization of AKAP4 and tubulin proteins in sperm with reduced motility. *Asian journal of andrology* **9**(5):641-649.
- Ohkura H. 2015. Meiosis: an overview of key differences from mitosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**(5):a015859.
- Park SY, Guo X. 2014. Adaptor protein complexes and intracellular transport. *Bioscience reports* **34**(4).
- Pastor-Soler N, Pietrement C, Breton S. 2005. Role of acid/base transporters in the male reproductive tract and potential consequences of their malfunction. *Physiology (Bethesda)* **20**:417–428.
- Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society* **365**:1663-1678.

Rahamim Ben-Navi L, Almog T, Yao Z, Seger R, Naor Z. 2016. A-Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP4) is an ERK1/2 substrate and a switch molecule between cAMP/PKA and PKC/ERK1/2 in human spermatozoa. *Scientific reports* **6(1)**:1-13.

Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. 2001. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of reproduction* **65(2)**:462-470.

Russell L, Ettl R, Hikim A, Clegg E. 1993. Histological and histopathological evaluation of the testis. *International journal of andrology* **16**:83.

Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Society of Reproduction and Fertility supplement* **65**:245.

Sergeant N, Briand-Amirat L, Bencharif D, Delehedde M. 2019. The sperm specific protein proAKAP4 as an innovative marker to evaluate sperm quality and fertility. *Dairy Vet. Sci. J* **11**:555803.

Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. 2008. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **109(3-5)**:323-330.

Stival C, Puga Molina LDC, Paudel B, Buffone MG, Visconti PE, Krapf D. 2016. Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm. *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization* **2016**:93-106.

Strzerek J, Wysocki P, Kordan W, Kuklinska M, Mogielnicka M, Soliwoda D, Fraser L. 2005. Proteomics of boar seminal plasma—current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol* **5(3)**:279-90.

Suarez SS. 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Human reproduction update* **14(6)**:647-657.

Suarez SS, Ho HC. 2003. Hyperactivated motility in sperm. *Reproduction in domestic animals* **38(2)**:119-124.

Sutovsky P. 2011. Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction* **142**:1-14.

Tanaka H, Baba T. 2005. Gene expression in spermiogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **62(3)**:344-354.

Teijeiro JM, Marini PE. 2012. The effect of oviductal deleted in malignant brain tumor 1 over porcine sperm is mediated by a signal transduction pathway that involves pro-AKAP4 phosphorylation. *Reproduction* **143(6)**:773-785.

Toshimori K. 2009. Dynamics of the mammalian sperm head. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol* **204**:5-94.

Toshimori K, Eddy EM. 2015. The Spermatozoon. Pages 99-148 in: Plant TM, Zeleznik AJ, editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, London.

Vigil P, Orellana RF, Cortés ME. 2011. Modulation of spermatozoon acrosome reaction. *Biological Research* **44(2)**:151-159.

Visconti PE, Krapf D, De La Vega-Beltran JL, Acevedo JJ, Darszon A. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl* **13**:395–405.

Wong W, Scott JD. 2004. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nature reviews Molecular cell biology* **5(12)**:959-970.

Zaneveld LJD, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR. 1991. Opinion: human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human reproduction* **6(9)**:1265-1274.

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* **2020**:1-26.





