

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Akrozomální reakce spermií

Bakalářská práce

Autor práce: Michaela Závorková

Obor studia: Chovatelství (ATZP)

Vedoucí práce: Ing. Jiří Šichtař, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Akrozomální reakce spermií" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17. 4. 2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Jiřímu Šichtařovi, Ph.D. za odborné vedení této práce a také svému partnerovi za jeho podporu při studiu.

Akrozomální reakce spermií

Souhrn

Bakalářská práce je sepsána formou literární rešerše, která se zabývá akrozomální reakcí spermií. Akrozomální reakci předcházejí procesy, jejichž správný průběh umožňuje spermiím akrozomální reakci podstoupit. Mezi tyto procesy se řadí spermatogeneze, epididymální zrání, kontakt spermií se semennou plazmou a kapacitace spermií. Kapacitace spermií probíhá v samičím pohlavním ústrojí a je zásadní událostí, která modifikuje plazmatickou membránu spermie do té úrovně, aby byla schopná akrozomální reakci podstoupit. Akrozomální reakce je děj, při kterém dochází ke splynutí plazmatické membrány spermie s vnější akrozomální membránou za vzniku hybridních vezikul, díky čemuž dochází k uvolnění obsahu akrozomu nacházejícího se v přední části hlavičky spermie. Akrozom obsahuje hydrolytické enzymy, které slouží k rozrušení obalu oocyty označovaný jako zona pellucida. Spermie jsou pak schopny proniknout skrz tento obal a oocyt oplodnit.

Akrozomální reakce spermií probíhá na základě vazby ligandu na specifický receptor spermie. Spermie obsahuje několik receptorů jako receptory spřažené s G proteinem, P2-purinoreceptor, EGFR receptor, angiotensin II receptor a například GABAA-like receptor. Nejvýznamnějším ligandem je ZP3 (glykoprotein zony pellucidy), ale akrozomální reakci dokáží vyvolat i progesteron, prostaglandiny, glykosaminoglykany, epidermální růstový faktor, atriopeptin, PAF, ATP a angiotensin II. V případě in vitro podmínek akrozomální reakci spouští vápníkový ionofor, neoglykoproteiny či lektiny. Vazba ligandu na receptor způsobuje otevření vápníkových kanálů, přes které do spermie pronikají Ca^{2+} a spouští signální kaskádu, která zahrnuje zejména působení fosfolipázy A_2 a C, PIP_2 , DAG, IP_3 , proteinkinázy A a C, což vede k fúzi plazmatické a vnější akrozomální membrány. K tomu je zapotřebí relativně vysoká koncentrace intracelulárních Ca^{2+} , proto dochází také k mobilizaci Ca^{2+} z akrozomu, který slouží jako jejich zásobárna. Důležitým jevem během akrozomální reakce je depolymerizace aktinu, která dovoluje spojování membrán. Fúze plazmatické a vnější akrozomální membrány se účastní SNARE proteiny, NSF, α -SNAP, Rab proteiny a synaptotagmin, které vytvářejí trans-SNARE komplexy, které umožňují přiblížení membrán.

Klíčová slova: spermie, akrozomální reakce, akrozomální exocytóza

Sperm acrosome reaction

Summary

The bachelor thesis is written in the form of literary research, which deals with sperm acrosome reaction. The acrosome reaction is preceded by processes whose proper course allows the sperm to undergo acrosome reaction. These processes include spermatogenesis, epididymal maturation, sperm contact with seminal plasma, and sperm capacitation. Sperm capacitation occurs in the female genital tract and is a significant event that modifies the sperm plasma membrane to a level that is capable for acrosome reaction to undergo. Acrosome reaction is a process in which the plasma membrane of the sperm merges with the outer acrosomal membrane to form hybrid vesicles, thereby releasing the acrosome content found in the anterior part of the sperm head. The acrosome contains hydrolytic enzymes that serve to disrupt the oocyte's cover referred to as the zona pellucida. The sperm are then able to penetrate through this envelope and fertilize the oocyte.

Inducing of sperm acrosome reaction is based on ligand binding to a specific sperm receptor. The sperm contains several receptors such as G protein-coupled receptors, P2-purinoreceptor, EGFR receptor, angiotensin II receptor and, for example, GABAA-like receptor. The most important ligand is ZP3 (glycoprotein zona pellucida), but progesterone, prostaglandins, glycosaminoglycans, epidermal growth factor, atriopeptin, PAF, ATP and angiotensin II can also cause acrosome reaction. In the case of in vitro conditions, calcium ionophore, neoglycoproteins or lectins trigger the acrosomal reaction. Binding of the ligand to the receptor causes the opening of calcium channels allowing Ca^{2+} enter into the sperm and trigger a signaling cascade that includes, in particular, the effect of phospholipases A_2 and C, PIP_2 , DAG, IP_3 , protein kinases A and C, resulting in fusion of plasma and outer acrosomal membrane. A relatively high concentration of intracellular Ca^{2+} is required for a fusion of this membranes, therefore, Ca^{2+} mobilization from acrosome, which serves as their reservoir, also occurs. An important event during the acrosome reaction is the depolymerization of actin, which allows membranes to join. Fusion of plasma and outer acrosomal membranes is involved in SNARE proteins, NSF, α -SNAP, Rab proteins and synaptotagmin, which create trans-SNARE complexes that allow membranes to approach.

Keywords: spermatozoa, acrosome reaction, acrosomal exocytosis

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce.....	2
3	Literární přehled	3
3.1	Spermatogeneze	3
3.1.1	Spermatocytogeneze	4
3.1.2	Meióza.....	5
3.1.3	Spermioogeneze	5
3.2	Stavba spermie.....	7
3.2.1	Plazmatická membrána	7
3.2.2	Hlavička	8
3.2.3	Krček	9
3.2.4	Bičík	10
3.3	Pohyb spermie	11
3.4	Procesy vedoucí k akrozomální reakci	13
3.4.1	Epididymální zrání.....	13
3.4.2	Semenná plazma	16
3.4.3	Kapacitace	19
3.5	Akrozomální reakce	25
3.5.1	Spouštěcí mechanismus.....	25
3.5.2	Signální transdukce	28
4	Závěr	32
5	Seznam použité literatury.....	33

1 Úvod

Proces oplození je výsledkem komplexního souboru molekulárních událostí, které dovolují spermii interagovat s oocytem a následně se s ním spojit za vzniku zygoty, ze které se vyvíjí nový jedinec (Okabe 2013). Schopnost oplození spermie získávají na základě série změn, které prodělávají během jejich vzniku a vývoje ve varlatech (spermatogeneze), dále v průběhu epididymálního zrání v nadvarleti a v neposlední řadě spermie podléhají v samičím pohlavním traktu kapacitaci, která je připravuje na následnou akrozomální reakci (Yanagimachi R. 1994b; Tulsiani et al. 1998; Okabe 2014). Akrozomální reakce je součástí procesu oplození, díky níž je spermie schopna proniknout přes extracelulární glykoproteinový matrix obklopující oocyt (zona pellucida) a následně se s oocytem spojit (Tulsiani et al. 1998).

Akrozomální reakce je velmi složitý děj, který je u spermií zkoumán několik desítek let a stále se přichází na nové poznatky.

2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je vypracovat literární rešerši shrnující nejnovější poznatky o akrozomální reakci spermií.

3 Literární přehled

3.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze probíhá ve varlatech, specificky v semenotvorných kanálkách, které vyúsťují do varletní sítě. Varletní síť navazuje na odvodné kanálky varlete. Na varlata navazují nadvarlata, která jsou tvořena třemi částmi: hlavou, tělem a ocasem. Na ocas nadvarlete navazuje chámovod, který spojuje vývod nadvarlete s močovou trubicí. Součástí samčího pohlavního ústrojí jsou i přídatné pohlavní žlázy (prostata, měchýřkovitá žláza, bulbouretrální žláza, ampule chámovodu) a celé ústrojí je pak zakončeno kopulačním orgánem – penisem (Garner & Hafez 2000).

Spermatogeneze je souhrnem dělení buněk a celulárních změn, v jehož důsledku se ze spermatogonií tvoří spermie (Amann 2011). Jedná se o zdlouhavý, chronologický proces, během něhož se kmenové buňky spermatogonie pomocí mitózy dělí, zachovávají svůj počet a periodicky produkují primární spermatocyty, které podléhají meióze a produkují haploidní spermatidy, ze kterých se bez dalšího dělení diferencují spermie (Johnson et al. 2000).

Spermie jsou produkovány v zárodečném epitelu stočených semenotvorných kanálků. Zárodečný epitel dospělého samce se skládá ze somatických buněk, nazývaných Sertoliho buňky, a z různých typů zárodečných buněk, kterými jsou spermatogonie, primární spermatocyty, sekundární spermatocyty a spermatidy (Johnson et al. 1978a).

Sertoliho buňky se nachází na lamina propria semenotvorných kanálků a díky protáhlé cytoplazmě, která obklopuje zárodečné buňky, zasahují až k lumen kanálku (Berndtson et al. 1987). Tyto buňky slouží jako opora zárodečných buněk, zprostředkovávají jejich výživu a usměrňují je regulujícími faktory. Fagocytují degenerující zárodečné buňky a jsou významné při metamorfóze spermatid ve spermie, při které fagocytují zbytek cytoplazmy na konci spermiogeneze (Johnson et al. 2011).

Dalšími somatickými parenchymálními buňkami varlat jsou Leydigovy buňky, které převládají v intersticiu mezi semenotvornými kanálky (Johnson et al. 2011). Jejich hlavní funkcí je produkce steroidních hormonů, zejména testosteronu, který je důležitý pro průběh spermatogeneze a ovlivňuje chování a vývin samčích sekundárních pohlavních znaků (Holstein et al. 2003).

Spermatogeneze může být z hlediska trvání rovnoměrně rozdělena na 3 fáze: spermatocytogenezi, meiózu a spermiogenezi (Johnson et al. 1997).

3.1.1 Spermatocytogeneze

Spermatocytogeneze je první fází spermatogeneze. Začíná vývinem spermatogonií ze zárodečných buněk neboli gonocytů, které se nacházejí při bázi semenotvorných kanálků. Vzniklé spermatogonie se poté pomocí mitózy násobí (Johnson 1991).

Dělení spermatogonií má dvě hlavní funkce. První funkcí je produkce zárodečných spermatogonií, které vznikají mitotickým dělením, aby se zachoval jejich počet pro nepřetržitou produkci spermií. Druhá funkce spočívá v produkci spermatogonií A_1 , které produkují další generace spermatogonií vedoucí k produkci primárních spermatocytů až po konečné spermie (Johnson 1991; Johnson et al. 1997).

V semenotvorných kanálcích se nacházejí 3 typy spermatogonií: spermatogonie A, spermatogonie In (intermediální) a spermatogonie B. Spermatogonie A se mitoticky dělí a dávají za vznik spermatogoniím A_1 až A_4 (Senger 2005). Spermatogonie A_4 se poté rozdělí a dávají za vznik spermatogoniím In, které se dále dělí za vzniku spermatogonií B. Spermatogonie B se poté jednou či pravděpodobně dvakrát rozdělí a vznikají primární spermatocyty, které vstupují do prvního meiotického dělení. U některých druhů se klasifikace spermatogonií může lišit (Garner & Hafez 2000). Například u koní se rozlišují spermatogonie A_1 , A_2 , A_3 , B_1 a B_2 (Johnson 1991).

Spermatocytogeneze nepředstavuje žádnou redukci chromozomů, proto z diploidní A_1 spermatogonie vznikají opět diploidní primární spermatocyty (Morel 2015). Teoreticky lze z jedné spermatogonie A_1 získat až 64 primárních spermatocytů (Senger 2005). Nicméně mnoho spermatogonií během spermatocytogeneze degeneruje (Morel 2015). Tato degenerace je patrná u sezónních zvířat, jako je například hřebec, a významně vzrůstá během nepřipouštěcího období, kdy je pro hřebce charakteristický nižší počet spermií (Johnson 1991; Johnson & Tatum 1989).

3.1.2 Meióza

Meióza obecně představuje dělení jedné diploidní buňky za vzniku dvou buněk haploidních. Tento proces probíhá pouze v samčích a samičích pohlavních žlázách, kde vznikají spermatidy a vajíčka, které jsou haploidní. Tento proces také umožňuje výměnu genetického materiálu mezi chromozómy dělící se buňky (Johnson et al. 1997).

Meióza následuje po spermatocytogenezi. Začíná u diploidních primárních spermatocytů, kdy z každého z nich vznikají čtyři haploidní kulovité spermatidy. Meiózu lze rozdělit do dvou fází: první a druhé meiotické dělení. První meiotické dělení zahrnuje znásobení a výměnu genetického materiálu za vzniku diploidních sekundárních spermatocytů. Druhé meiotické dělení spočívá v rozdělení genetického materiálu za vzniku dvou haploidních spermatid z každého sekundárního spermatocytu (Morel 2015).

3.1.3 Spermiogeneze

Spermiogeneze je posledním stádiem spermatogeneze. Jedná se o proces, při kterém jsou spermatidy diferencovány ve spermie (Johnson 1991). Během této fáze dochází ke značným změnám na jádru spermatid, ztrátě cytoplazmy a k vývoji bičíku (Holstein et al. 2003). Spermatidy, produkované druhým meiotickým dělením, se diferencují z kulovitých buněk s kulovitým jádrem do buněk, které mají hlavičku protáhlého tvaru se zhuštěným jádrem obsahujícím samčí genom, váček obsahující enzymy určené k proniknutí do vajíčka (akrozom) a bičík, který spermii zajišťuje pohyb (Johnson et al. 2011).

Spermiogeneze je rozdělena do několika fází: Golgiho fáze, akrozomální fáze, prodlužovací fáze a fáze maturační (Johnson et al. 2011).

Golgiho fáze

V této fázi Golgiho aparát produkuje proakrozomální váčky, které se dále shlukují v jeden. Takto vzniklý akrozomální váček přiléhá k jaderné membráně (Garner & Hafez 2000). Centrioly se přesouvají z cytoplazmy k bázi jádra (Senger 2005). Proximální centriola utváří základ pro spojení bičíku s hlavičkou vznikající spermie (Garner & Hafez 2000), zatímco distální centriola dává vzniknout vyvíjející se axonemě (Senger 2005).

Akrozomální fáze

V této fázi se akrozomální váček rozšiřuje a pokrývá přední dvě třetiny povrchu jádra spermatidy. Vzniká tak tenký váček s dvojitou membránou (akrozom), který je přilnut k jaderné membráně (Garner & Hafez 2000). Golgiho aparát se přemísťuje z místa poblíž jádra ke kaudálnímu konci spermatidy, kde nakonec mizí (Senger 2005).

Během této fáze se z distální centrioly vytvářejí jednotlivé stavební složky axonemy bičíku (Garner & Hafez 2000).

Prodlužovací fáze

Spermatidy v této fázi rotují. Akrozom se nachází při bázi semenotvorných kanálků a bičík směřuje do lumenu. Dochází ke zploštění jádra, k jeho prodlužování a chromatin jádra se zhušťuje (Garner & Hafez 2000). Chromatinu jádra se kondenzuje na základě náhrady somatických histonů za protaminy (Dadoune 1995), které mají poloviční velikost (Fuentes-Mascorro et al. 2000). Histony jsou nahrazovány nejdříve proteiny TP (transition proteins) (Ward et al. 1989), které jsou v této prodlužovací fázi následně nahrazeny protaminy (Dadoune 1995). Akrozom přiléhající k jádru se také zhušťuje a dochází i k jeho prodlužování. Tyto změny jsou doprovázeny přemístěním cytoplazmy do kaudální oblasti jádra, kde obklopuje proximální část vyvíjejícího se bičíku. Uvnitř cytoplazmy se vytváří na kaudálním okraji akrozomu dočasný válcovitý útvar zvaný manžeta, která volně obklopuje axonemu. Kolem axonemy se vytváří prstenec, který se nejdříve formuje blízko proximální centrioly, ale během následného vývoje migruje kaudálně podél bičíku. Mitochondrie, které se dříve nacházely v cytoplazmě spermatidy, se v této fázi koncentrují blízko axonemy (Garner & Hafez 2000).

Maturační fáze

Během této fáze se kolem axonemy vytváří fibrózní pochva. Prstenec se nachází mezi spojovací a hlavní částí bičíku, mitochondrie vytvářejí mitochondriální pochvu, manžeta se rozpadá a Sertoliho buňky fagocytují velkou část cytoplazmy (Garner & Hafez 2000).

Tyto morfologické změny se mohou u různých druhů mírně lišit, proto jsou i spermie jednotlivých druhů mírně odlišné (Garner & Hafez 2000).

Dozrálé spermie jsou Sertoliho buňkami uvolňovány do lumenu varlete a pomocí rytmických kontrakcí jsou posouvány podél semenotvorných kanálků, kde jsou míchány se sekreční tekutinou. V této fázi ztratily značné množství cytoplazmy a mají vyvinutý bičík, který není funkční do doby, než dozrají v nadvarleti (Johnson et al. 1997; Varner & Johnson 2011).

Celý proces vzniku spermií trvá u hřebců 57 dní (Swierstra et al. 1974), u býků 61 dní a u kance 39 dní (Senger 2005). U lidí trvá přibližně 70 dní (Heller & Clermont 1964). Probíhá ve vlnách zajišťujících jejich nepřetržitý přísun pro ejakulaci (Varner & Johnson 2011). Celková produkce spermií je závislá na velikosti varlat nebo na jejich objemu (Morel 2015).

3.2 Stavba spermie

Spermie vzniklé v procesu spermatogeneze jsou určené k oplození vajíčka. Pro plnění této funkce musejí být vysoce specializované. Během formování ve varlatech a zrání v nadvarlatech jsou zbaveny většiny organel a také velké části cytoplazmy (Varner et al. 2015).

Hřebčí spermie dosahuje délky přibližně 60 μm . Délka býčí spermie je 75-90 μm , zatímco mužské spermie a spermie kance dosahují shodné délky 50-60 μm (Schnorr 1996).

Spermie se skládá z hlavičky, krčku a bičíku a je celá pokryta plazmatickou membránou (Pesch & Bergmann 2006).

3.2.1 Plazmatická membrána

Plazmatická membrána pokrývá vnější část spermie. Ačkoli je po celém povrchu spojitá, kromě stavu po akrozomální reakci či smrti spermie, plní v každé části jinou funkci (Amann & Graham 2011). Představuje fyzickou bariéru před vlivy vnějšího prostředí, kterým je spermie vystavena při průchodu samičím pohlavním ústrojím či během in vitro manipulace a skladování (Gadella 2008).

Základem membrány jsou fosfolipidová dvojvrstva, bílkoviny a glykokalyx (Amann & Graham 2011). Fosfolipidová dvojvrstva je specifická svou hydrofobní částí směřující dovnitř buňky a hydrofilní částí směřující vně (Amann & Pickett 1987). Převládající složkou této dvojvrstvy jsou fosfolipidy (fosfatidylcholin, sfingomyelin, fosfatidylethanolcholin,

fosfatidylserin, fosfatidylinositol) a cholesterol. Cholesterol napomáhá k uspořádání fosfolipidů do lamel (Amann & Graham 2011).

Bílkoviny jsou propojeny s lipidy a představují 50 % hmotnosti membrány. Mohou být do dvojvrstvy integrovány nebo mohou být navázány na povrch. Některé integrované bílkoviny slouží jako póry či kanálky skrz membránu nebo jako receptory pro jiné molekuly na povrchu membrány. Mnoho bílkovin na vnějším povrchu membrány obsahuje postranní řetězce se záporným nábojem, které mají tendenci přitahovat a volně vázat jiné proteiny v médiu. Díky těmto adsorbovaným látkám se může vnější vzhled v oblasti glykokalyxu měnit (Amann & Graham 2011).

Povaha fosfolipidů a také jejich poměr k cholesterolu určují fluiditu membrány. Při vyšším obsahu cholesterolu obecně fluidita membrány klesá. Při běžném obsahu cholesterolu a rozmístěním integrovaných bílkovin dochází k lamelovému uspořádání fosfolipidů, které je pro fosfolipidovou dvojvrstvu specifické (Amann & Graham 2011).

3.2.2 Hlavička

Hlavička spermie většiny savců má oválný (lžičkový) tvar a je z jedné strany (dorsoventrálně) zploštělá. U myši a krys je hlavička spermie srpovitého tvaru (Obr. 1) (Johnson 1991; Varner et al. 2000). U býka dosahuje velikosti přibližně 9 μm , u hřebce 5 μm , u kance 8,5 μm (Smollich & Michel 1992) a například u muže je hlavička spermie dlouhá 3,5-4,5 μm (Holstein & Roosen-Runge 1981). V hlavičce spermie se nachází jádro s jadernou membránou, akrozom a postakrozomální oblast. Obsahuje také plazmatickou membránu. Tvar hlavičky je primárně ovlivněn tvarem jádra (Amann & Graham 2011).

Jádro zaujímá největší část hlavičky a obsahuje genetický materiál ve formě vysoce kondenzované DNA (Brito 2007). V přední části se jádro pozvolně zužuje směrem k hustší kaudální části a maximální šířky dosahuje v centrální části (Amann & Graham 2011). Jádro obsahuje vysoce kondenzovaný chromatin (DNA a protaminy), který představuje pouze 5-10 % objemu somatické buňky (Varner et al. 2015).

Jádro je obklopeno dvojitou jadernou membránou obsahující několik pórů (Amann & Graham 2011), ale ve většině jaderné membrány, zejména v oblasti pod akrozomem a v postakrozomální oblasti, se póry nenacházejí (Varner et al. 2015).

Akrozom je membránou ohraničená organela pokrývající přední 2/3 jádra. Membrána je rozdělena na vnitřní akrozomální membránu, která přechází ve vnější. Tyto navazující membrány obklopují heterogenní akrozomální matrix. Vnitřní akrozomální membrána je v těsné blízkosti jaderné membrány, zatímco vnější akrozomální membrána se nachází pod plazmatickou membránou. Tyto dvě membrány se sbíhají v úrovni ekvatoriálního segmentu (Gerton 2002). Tento segment se nachází kaudálně v oblasti, kde je akrozom tenčí. Neobsahuje žádné enzymy, ale v této oblasti dochází ke spojování plazmatické membrány s membránou oocyty (Amann & Graham 2011).

Akrozom obsahuje značné množství hydrolytických a glykolytických enzymů. Nejznámějšími akrozomálními enzymy jsou proakrozin/akrozin, hyaluronidáza, β -galaktosidáza, různé proteázy, neuroaminidázy, esterázy, arylsulfatázy a fosfolipázy A a C. Obsahuje také velké množství fosfatáz, regulujících enzymů a proteinů (Eddy & O'Brien 1994).

Postakrozomální oblast pokrývá kaudální část jádra, ekvatoriální segment akrozomu a nukleární prstenec. Tato oblast může hrát sekundární roli při spojování spermie s plazmatickou membránou oocyty v průběhu oplození (Amann & Graham 2011).

Nukleární prstenec se nachází na kaudálním konci hlavičky a je to místo spojení mezi plazmatickou membránou a membránou jádra (Amann & Graham 2011).

Při bázi hlavičky se nachází implantační jamka, která slouží k připojení krčku (a bičíku) k hlavičce spermie. V případě vzniku dvou bičíků mohou existovat i dvě implantační jamky (Amann & Graham 2011).

3.2.3 Krček

Krček spermie slouží jako spojovací segment mezi hlavičkou a bičíkem (Brito 2007). Jedná se o krátkou část měřící přibližně 1 μm (Pesch & Bergmann 2006).

Krček se skládá z proximální centrioly a několik malých mitochondrií. V místě, kde se dvě kolmé mitochondrie začínají stáčet do spirály, přechází krček ve spojovací část bičíku (Brito 2007). Proximální centriola se skládá z devíti fibril a svírá s osou bičíku úhel 45-60° (Amann & Graham 2011).

3.2.4 Bičík

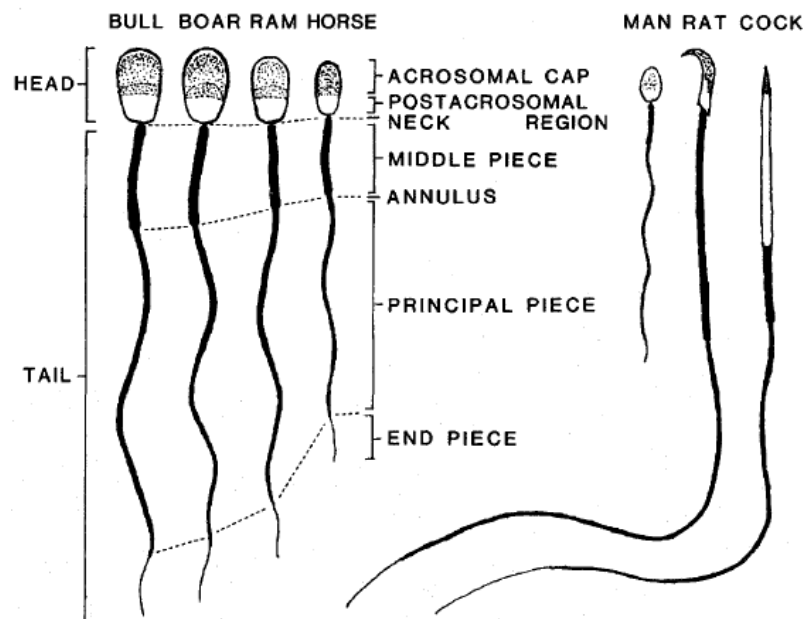
Bičík je nejdelší částí spermie a dělí se na spojovací část, hlavní část a část koncovou (Pesch & Bergmann 2006). Spojovací část dosahuje u hřebce velikosti asi 10 μm (Amann & Pickett 1987), u býka zhruba 15 μm , u kance 10 μm (Smollich & Michel 1992) a například u lidí je tomu 5 μm (Holstein & Roosen-Runge 1981). Hlavní část bičíku hřebčí spermie má velikost 40 μm (Amann & Pickett 1987), u býka 50 μm a u kance měří 30 μm (Smollich & Michel 1992). Hlavní část bičíku mužské spermie dosahuje délky 44-50 μm (Holstein & Roosen-Runge 1981). Koncová část hřebčí spermie měří přibližně 4 μm (Amann & Pickett 1987). Součástí bičíku je axonema, hladké provazce, fibrózní pochva a mitochondrie (Varner et al. 2015).

Axonema se skládá z mikrotubulárních dubletů, které zprostředkovávají pohyb bičíku. Tyto mikrotubuly vybíhají z oblasti krčku přes hlavní část bičíku až po jeho koncovou část, kde jsou volně zakončené. Je tvořena centrálním párem mikrotubulů, kolem něhož je rozmístěno 9 dubletů. Každý dublet je tvořen mikrotubuly A a B, ze kterých vycházejí dyneinová raménka (Brito 2007).

Hladké provazce postupují od krčku přes spojovací část do hlavní části bičíku. Mají vláknitou strukturu, která zajišťuje strukturální podporu bičíku a také jeho pasivní elasticitu při jeho ohýbání. Ve spojovací části obklopují axonemu po celé délce. V hlavní části se hladké provazce v různých místech zužují (Varner et al. 2015).

Fibrózní pochva pokrývá celou délku hlavní části bičíku. Slouží jako rigidní strukturální podpora a zajišťuje elasticitu bičíku. Hraje také důležitou roli při metabolických jevech. Začíná u Jensenova prstence a končí u koncové části bičíku (Varner et al. 2015). Koncová část je tvořena pouze centrální axonemou (Garner & Hafez 2000).

Mitochondrie jsou membránové organely, které produkují energii nezbytnou pro pohyb spermie (Brito 2007). Část vzniklé energie je využita i při aktivním transportu látek v membránách (Garner & Hafez 2000). Nacházejí se ve spojovací části bičíku v podobě mitochondriální pochvy. Ta je tvořena mitochondriemi uspořádanými do spirály (Amann & Graham 1993). Na kaudálním konci mitochondriální pochvy se nachází annulus (Jensenův prstenec), který leží mezi posledním kaudálním závitem mitochondrie a začátkem fibrózní pochvy (Brito 2007).



Obr.1 Stavba a porovnání spermií hospodářských zvířat a dalších obratlovců (Garner & Hafez 2000).

3.3 Pohyb spermie

Po uvolnění spermií do lumenu semenotvorných kanálků nejsou spermie schopny samostatného pohybu a jsou pomocí peristaltických pohybů poháněny do nadvarlat, kde podléhají maturačním změnám zahrnující získání motility (Johnson et al. 1978b). Tu savčí spermie získávají na základě sekvenčních interakcí s proteiny přítomnými v epididymální tekutině (Juyena & Stelletta 2012).

U spermií se rozlišují dva typy pohybu (Turner 2006). Prvním typem je relativně přímý pohyb, který je výsledkem symetrického vlnění bičíku s nízkou amplitudou. Tento pohyb je typický pro čerstvě ejakulované spermie a je nezbytný pro pohyb spermií směrem dopředu. Druhým typem je pohyb spermie v kruhu, nebo může pohyb spermie opisovat tvar osmy. Při tomto pohybu je vlnění bičíku asymetrické a má větší amplitudu. Tento typ pohybu spermie získávají při hyperaktivaci a umožňuje jim se odpoutat od epitelu vejcovodu, doputovat k místu oplození a proniknout do vajíčka (Hodder & Liu 2011). Viskozita media, ve kterém se spermie nacházejí, může ovlivňovat frekvenci vlnění bičíku (Rikmenspoel 1984).

Progresivní pohyb savčí spermie je výsledkem koordinovaného ohýbání bičíku ve vlnách. Toto ohýbání zprostředkovávají sousedící mikrotubulární dublety, mezi kterými

dochází ke vzájemnému posunu pomocí dyneinových ramének (Satir 1974; Satir 1984; Bedford & Hoskins 1990). Dyneinová raménka obsahují ATPázu, která přeměňuje chemickou energii v mechanický pohyb. Tato energie je získávána ve formě ATP, které je produktem dýchacího řetězce probíhajícího v mitochondriích, nebo se získává jako produkt glykolýzy (Garner & Hafez 2000).

V neutrální fázi, kdy se bičík nepohybuje, jsou dyneinová raménka vybíhající z mikrotubulu A dlouhá a připojená k mikrotubulu B přilehlého dubletu. Za přítomnosti ATP dochází k odpojení ramének od mikrotubulu B a raménka se zároveň zkracují. Volná raménka se poté sklánějí pod úhlem 40° , prodlužují a znovu připojují k mikrotubulu B v novém místě. Nastává kontrakce a připojená dyneinová raménka svírají s dubletem úhel 90° . Dochází tak ke klouzavému pohybu představující vzdálenost 16 nm, při kterém se dublety vůči sobě pohybují a posouvají směrem ke konci axonemy. Tento pohyb neprobíhá souběžně v celé délce dubletů, ale je lokalizován jen v jejich části. Dublety 1-4 kontrahují střídavě s dublety 6-9, nebo mohou kontrakce probíhat kolem devíti dubletů v kruhovém sledu. K odpojení a zkracování ramének dochází jen za přítomnosti ATP. Sklánění ramének pod úhlem 40° a jejich prodlužování při připojování k mikrotubulu B probíhá díky hydrolýze ATP, při které dochází k uvolnění potřebné energie (Amann & Graham 2011).

Pohyb bičíku se skládá z rovinného a šroubovitého ohýbání. Při rovinném ohýbání bičíku dochází na jedné straně axonemy ke klouzavému pohybu dubletů, zatímco na opačné straně dochází k pasivnímu posouvání a relaxaci. V případě šroubovitého ohýbání, při kterém spermie rotuje kolem své osy, dochází k mírnému kroucení bičíku podél jeho hlavní části. To je způsobené aktivací dyneinových ramének dubletů, které se kontrahují kruhově (Amann & Graham 2011).

Motilita spermií závisí na několika metabolických drahách a regulačních mechanismech (Pereira et al. 2017). Motilitu spermií regulují zejména Ca^{2+} a cAMP-dependentní proteinkináza neboli proteinkináza A (Darszon et al. 2001; Darszon et al. 2006). Regulace motility spermií se účastní také adenylcyklázy, HCO_3^- , různé membránové kanály a fosforylace proteinů, které dále ovlivňují děje jako je kapacitace, hyperaktivace a akrozomální reakce (Pereira et al. 2017).

3.4 Procesy vedoucí k akrozomální reakci

Pro dosažení schopnosti oplození a splynutí gamet podléhají spermie několika maturačním změnám, které zahrnují zejména epididymální zrání, kapacitaci a následnou akrozomální reakci (Hafez & Hafez 2000).

3.4.1 Epididymální zrání

Testikulární spermie jsou z varlat transportovány do nadvarlat, kde prodělávají proces zrání, při kterém nabývají potenciální schopnost k oplození vajíčka. Tento proces zajišťují epiteliální buňky nadvarlat, jejichž funkční schopnost je ovlivňována androgeny vylučovanými varlaty (Garner & Hafez 2000). Epiteliální buňky vylučují tekutinu nahrazující většinu tekutiny, proteinů a dalších látek z varlat, které vstupují do nadvarlete společně se spermiemi (Amann 1987; Robaire & Hermon 1988). Všechny části nadvarlete musejí spermiím poskytnout optimální množství kyslíku, výživu, odstranění odpadních látek a fyzikální/biochemickou ochranu (Marengo 2008).

Epididymální zrání zahrnuje interakci spermií s proteiny, které jsou syntetizovány a vylučovány epiteliálními buňkami v různých částech nadvarlete (Cornwall 2009). Tyto proteiny se přímo či nepřímo účastní změn probíhajících na spermiích při jejich průchodu nadvarlem (Dacheux & Dacheux 2014). V epididymální tekutině různých druhů byly identifikovány několik stovek proteinů, avšak ne více než 20 proteinů představuje 80-90 % z celkových luminálních proteinů nadvarlete. U různých druhů se běžně nachází několik těchto proteinů: lactoferrin, lipocalin 5 (LCN5, E-RAPB), clusterin, glutathionperoxidasa (GPX5), PTGDS (prostaglandin D2 synthase), transferrin, NPC2 (Niemann–Pick disease, typ C2), PEBP4 (phosphoethanolamine-binding protein 4), HEXB (β -N-acetyl-hexosaminidase), GST (glutathion S-transferase), gelsolin (GSN), actin a β -galaktosidasa (GLB1). U lidí zaujímá velký procentuální podíl z celkových luminálních proteinů albumin (Dacheux et al. 2006). Koncentrace těchto hlavních proteinů je rozdílná v závislosti na druhu. Lokální koncentrace proteinu v epididymální tekutině obecně souvisí se sekreční aktivitou epitelu nadvarlete, nicméně koncentrace jednotlivých vylučovaných proteinů nezávisí pouze na jejich sekreci, ale také na jejich vstřebávání epitelem nadvarlete (Dacheux et al. 2012).

Sekvenční vylučování proteinů podél nadvarlete má za následek postupnou změnu ve složení proteinů epididymální tekutiny v jednotlivých částech nadvarlete. Kromě toho je jejich

sled vylučování druhově specifický. Několik proteinů se však u různých druhů vyskytují v podobných oblastech. V proximální části se nacházejí PTGDS, GPX5 a RNASE10, zatímco ve střední a distální části lze nalézt lactoferrin, NPC2, gelsolin a několik glukosidáz. U několika dalších proteinů je místo vylučování druhově rozdílné. Příkladem může být LCN5, který je u myši primárně vylučován v hlavě nadvarlete, ale u býka, berana a kance k sekreci dochází v těle a ocasu nadvarlete (Dacheux et al. 2012).

Proteiny epididymální tekutiny plní několik funkcí. Jednou z nich je ochrana spermie během průchodu nadvarletem (Dacheux & Dacheux 2014). Několik proteinů, jako je například GPX5 (Taylor et al. 2013), thioredoxin, GSTM1-3, SOD1 a PRDX2-5, brání oxidaci spermií tím, že se účastní redukce reaktivních kyslíkových radikálů (Dacheux & Dacheux 2014). Proteiny β -defensins (Yamaguchi & Ouchi 2012), lipocaliny a CRES proteiny slouží jako ochrana před napadením bakteriemi (Wang et al. 2012). Epididymální proteiny mohou také být přímo součástí ochrany aktivních (vazných) míst na povrchu spermie. Tuto ochranu zajišťuje několik proteinů s vaznými vlastnostmi jako clusterin, lactoferrin, transferin, apolipoprotein A-1, PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) a některé další glykoproteiny, které jsou součástí glykokalyxu spermie. Pokud dojde k jejich odstranění z povrchu spermie, spermie začínají velmi rychle aglutinovat (Fábrega et al. 2012). Dále se mohou zmíněné proteiny účastnit přenosu molekul nebo mohou sloužit jako přenašeče hydrofobních látek (Guyonnet et al. 2011).

Průchod spermií nadvarletem závisí na kontrakcích vývodných cest, jejichž frekvence se pohybuje okolo tří za minutu. U býka je doba trvání průchodu spermie nadvarletem okolo 7 dní, u kanců je to 12 dní (Garner & Hafez 2000) a u hřebců může být 8 až 11 dní (Swiestra et al. 1975). Pokud se zvyšuje frekvence ejakulace, může se doba snížit o 10 až 20 % (Garner & Hafez 2000).

Během průchodu nadvarletem podléhají spermie procesům, které vedou ke zvýšení koncentrace spermií vstaženou na jednotku objemu (Marengo 2008). V odvodných kanálcích varlete a také v proximální části nadvarlete dochází k zpětnému vstřebávání vody luminální tekutiny varlete (Da Silva et al. 2006). Tento přenos vody má za následek zvýšení koncentrace spermií, kdy nejvyšší koncentrace dosahují v přední části nadvarlete. Ve varletní síti je obsaženo 10^8 spermií/ml, zatímco v chámovodu se po resorpci vody nachází 10^9 spermií/ml. Dochází také k modifikaci koncentrace proteinů, která dosahuje maxima v distální části hlavy nadvarlete (Fouchécourt et al. 2000; Belleannée et al. 2011; Dacheux et al. 2012).

Spermie během průchodu nadvarletem podléhají díky složení epididymální tekutiny několika sekvenčním změnám. Mezi nejvíce patrné morfologické změny se řadí migrace protoplazmatické kapénky. Tento pozůstatek buněčné cytoplazmy se ve střední části hlavy nadvarlete přesouvá z oblasti krčku ke konci spojovací části bičíku spermie. Mechanismus tohoto procesu není dosud objasněn, ale stojí za povšimnutí, že k němu dochází v určité oblasti nadvarlete, kde se spermie vyskytují v největší koncentraci a kde sekrece proteinů epitelem nadvarlete je nejvíce aktivní (Cooper 2005). Přítomnost této kapénky u velkého množství ejakulovaných spermií je projevem jejich nezralosti. Dále dochází ke změnám na chromatinu jádra, který se zdál být relativně inertní po kondenzaci v pozdější fázi spermiogeneze, ale během průchodu nadvarletem dochází k jeho dodatečnému zpevnění (Garner & Hafez 2000).

Během zráního procesu dochází také ke změnám v zastoupení lipidů a proteinů plazmatické membrány a povrchu spermie (Scott et al. 1967; Dacheux & Voglmayr 1983). Tyto změny probíhají za účelem získání schopnosti spermie se spojit s vajíčkem a následně vajíčko fertilizovat. Mezi povrchové proteiny se řadí například CRISP1 (Cysteine-rich secretory protein, protein D-E), akrozin, fertilin, IZUMO a SPAM1 (Sperm adhesion molecule 1, PH20). Některé povrchové proteiny jako ADAM rodina proteinů (ADAM1/ α -fertilin, ADAM2/ β -fertilin, ADAM3/cyritestin) jsou během průchodu nadvarletem proteolyticky štěpeny. Vzniklé peptidy těchto rozštěpených proteinů jsou jednak přemístěny v různých oblastech plazmatické membrány, nebo jsou uvolňovány do epididymální tekutiny, jako v případě ACE (Angiotensin I converting enzyme), který se stává u některých druhů hlavním proteinem této tekutiny (Gatti et al. 1999). Mezi proteiny luminální tekutiny nadvarlete, které se vážou na povrch spermie, patří například CRISP1, katepsin, ADAM7, EPPIN (Epididymal protease inhibitor), MAN2A2 (Alpha-mannosidase), SPAM1, MFGE8 (lactadherin), GPX5 a clusterin. Některé tyto proteiny jsou pomocí elektrostatické interakce adsorbovány na povrch spermie nebo jsou přímo integrovány do plazmatické membrány (Dacheux & Dacheux 2014).

Během procesu zrání získávají spermie schopnost progresivního pohybu (Garner & Hafez 2000). Motilita spermií je závislá na intracelulárním cAMP, který je produktem adenylcyklázy, a na následné fosforylaci proteinů zahrnující proteinkinázu A, AKAPs (A-kinase anchor proteins) a jiné proteiny (Turner 2006; Perino et al. 2012; Esseltine & Scott 2013). Během transportu spermií v lumen nadvarlete se hladina intracelulárního cAMP zvyšuje od těla nadvarlete k okasu (Hoskins et al. 1974; Dacheux & Paquignon 1980; Pariset et al. 1985) souběžně s metabolickou kapacitou a produkcí ATP (Inskeep & Hammerstedt 1982). Klíčovými

faktory epididymální tekutiny jsou HCO_3^- a Ca^{2+} , které přímo regulují koncentraci intracelulárního cAMP epididymálních spermií a následně aktivují fosforylaci proteinů a tím i motilitu (Xia et al. 2007).

Terminální část nadvarlate slouží jako zásobárna spermií. Ocas nadvarlate obsahuje 70% z celkového počtu spermií, zatímco chámovody obsahují pouhé 2%. Ačkoli prostředí v nadvarleti je pro spermie příznivé, jejich uchování není trvalé. Spermie, které nejsou ejakulované, jsou postupně vylučovány do moči. Ty, které nebyly takto eliminovány, postupně stárnou, ztrácejí oplozovací schopnost a motilitu, až nakonec dochází k jejich rozkladu (Garner & Hafez 2000).

3.4.2 Semenná plazma

Semenná plazma slouží jako substrát pro dopravení spermií do samičího pohlavního ústrojí (Morel 2015) a následně zajišťuje jejich přežití (Juyena & Stelletta 2012). Uplatňuje se dále při dozrávání spermií (Morel 2015), hraje významnou roli při aktivaci a augmentaci pohybu spermií, působí jako nutriční a osmotické medium, zabraňuje předčasné aktivaci spermií, stabilizuje jejich plazmatickou membránu kapacitačními inhibitory (Villemure et al. 2003) a účastní se také interakce mezi spermií a vajíčkem (Souza et al. 2008). Biochemické složky semenné plazmy jsou vylučovány varletní sítí, nadvarlaty a přídatnými pohlavními žlázami (Mann & Lutwak-Mann 1981). Sekrece měchýřkovité žlázy utváří u většiny přežvýkavců hlavní podíl ejakulátu (Metafora et al. 1989).

Semenná plazma obsahuje ionty (Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-), energetické substráty (fruktózu, sorbitol, glycerylfosfocholin), organické sloučeniny (kyselinu citronovou, aminokyseliny, peptidy, proteiny, lipidy, hormony, cytokiny) a tak dále. V semenné plazmě přežvýkavců se dále nachází amoniak, močovina, kyselina močová, kreatinin, kyselina askorbová a hypotaurin (Mann 1964). Chemické složení a funkce sekretu přídatných pohlavních žláz se liší druhově, dále se může lišit v rámci druhu mezi jednotlivými samci, a dokonce může být odlišné v různých ejakulátech jednoho samce (Aurich et al. 1996). Navíc zastoupení některých složek semenné plazmy může být ovlivněno výživou, managementem chovu, nebo také metabolickou aktivitou spermií (Juyena & Stelletta 2012).

V semenné plazmě je obsaženo několik proteinů, jejichž většina je produkována nadvarlaty a měchýřkovitou žlázou (Chandonnet et al. 1990). Přidávání a odstraňování různých

proteinů semenné plazmy hraje důležitou roli při zajištění stability plazmatické membrány (Desnoyers & Manjunath 1992), motility (Sánchez-Luengo et al. 2004), kapacity (Thérien et al. 1998), interakce mezi vajíčkem a spermií, a oplození (Yanagimachi 1994a).

Velkou rodinu proteinů bovinní semenné plazmy představují BSP proteiny (bovine seminal plasma proteins), které jsou vylučovány měchýřkovitou žlázou býků. Mezi tyto proteiny patří BSP-A1, BSP-A2, BSP A3 a BSP-30 kDa, které představují 70–86 % celkových proteinů bovinní semenné plazmy (Moura et al. 2007). BSP-A1 a BSP-A2 sdílejí stejnou primární strukturu a společně jsou označovány jako PDC-109 (Esch et al. 1983). Tento protein zvyšuje motilitu spermií, účinnost Ca^{2+} ATPázy v plazmatické membráně (Sánchez-Luengo et al. 2004) a také zabraňuje předčasné akrozomální reakci v samičím pohlavním ústrojí tím, že inhibuje aktivitu proteinkinázy C (Yu et al. 2003). Během ejakulace se spermie mísí s BSP proteiny, které odstraňují asi 5-8 % cholesterolu z plazmatické membrány, váží se na cholinové fosfolipidy, tím zabraňují volnému pohybu fosfolipidů a dochází tak ke stabilizaci membrány (Villemure et al. 2003). Po ejakulaci se BSP proteiny váží na povrch spermie v oblasti akrozomu, v postakrozomální oblasti a ve spojovací části bičíku, což je důležité pro iniciaci motility spermií (Manjunath et al. 1994). BSP proteiny také zprostředkovávají navázání spermií k epitelu vejcovodu, tím vzniká rezervoár spermií a dochází k prodloužení jejich schopnosti pohybu (Gwathmey et al. 2006). BSP navázané na povrchu spermie poté interagují s lipoproteiny obsaženými ve vejcovodu, dochází tak k dalšímu odstraňování cholesterolu z plazmatické membrány, stejně tak jako k odstraňování BSP, jež jsou na membránu navázány (Thérien et al. 2001). Tato reakce způsobuje destabilizaci plazmatické membrány a dochází ke zvýšení její propustnosti pro Ca^{2+} (Manjunath & Thérien 2002).

Homologními proteiny BSP proteinů jsou u berana RSP proteiny (ram seminal plasma protein) (Bergeron et al. 2005) a u kozla GSP proteiny (goat seminal plasma protein) (Villemure et al. 2003). U hřebce se nacházejí proteiny HSP-1 a HSP-2 (nyní známé jako SP-1 a SP-2) (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005), jež jsou orthology BSP proteinů (Töpfer-Petersen et al. 2005). HSP-1 a HSP-2 se řadí mezi krátké seminální proteiny Fn-2 typu (fibronectin type II) (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005). Semenná plazma hřebce obsahuje celkem osm HSP proteinů (horse seminal plasma protein), jimiž jsou proteiny HSP-1 až HSP-8 (Töpfer-Petersen et al. 2005). HSP-3 patří do rodiny CRISP proteinů (Schambony et al. 1998) a účastní se přímo fúze vajíčka a spermie (Ellerman et al. 2002).

Semenná plazma býků, hřebců a kanců obsahuje proteiny patřící do rodiny spermadhesinů (Töpfer-Petersen et al. 1998). Tyto proteiny jsou produkovány měchýřkovitou žlázou a jsou vázány na povrch spermie (Teixeira et al. 2006). U kance se vyskytuje pět proteinů AQN-1, AQN-3, AWN, PSP-I a PSP-II (Töpfer-Petersen et al. 1998). U skotu se nacházejí pouze dva spermadhesiny, jimiž jsou aSFP (SPADH1) a Z13 (SPADH2) (Haase et al. 2005). Homologním proteinem kančího AWN je u hřebce protein HSP-7 (Reinert et al. 1996). Spermadhesiny AQN-1, AQN-3 a AWN jsou proteiny vázající heparin a pokrývají povrch spermie, čímž nad akrozomem stabilizují plazmatickou membránu a během kapacitace jsou uvolňovány (Sanz et al. 1992; Dostálová et al. 1994; Calvete et al. 1997). AQN-3 tvoří část komplexu faktoru inhibujícího motilitu spermií (Iwamoto et al. 1995). AWN se nejspíše účastní interakce mezi spermií a zona pellucida v průběhu fertilizace (Rodríguez-Martinez et al. 1998).

V semenné plazmě beranů se dále nachází protein nazývaný calsemin. V přítomnosti tohoto proteinu, který se svou povahou podobá calmodulinu, může díky působení Ca^{2+} nastat stimulace flagelární aktivity (Bradley & Forrester 1982).

Osteopontin je dalším proteinem nacházejícím se v semenné plazmě býků. Je vylučován ampulí chámovodu a měchýřkovitou žlázou (Cancel et al. 1997). Věří se, že se při ejakulaci váže na spermii a zůstává zde navázán do doby, než spermie doputuje k místu oplození, kde se účastní interakce mezi spermií a oocytem (Souza et al. 2008).

Seminalplasmin byl izolován z bovinní semenné plazmy (Reddy & Bhargava 1979) a jeho biosyntéza probíhá v měchýřkovité žláze býků (Wempe et al. 1990). Tento protein, také známý jako caltrin, působí jako regulátor transportu vápenatých iontů na býčích spermiích (Sitaram et al. 1997) a jeho přítomnost na plazmatické membráně hraje významnou roli při akrozomální reakci (Clark et al. 1993). Jedná se také o protein inhibující transkripci. Reguluje mikrobiální činnost tím, že inhibuje jejich růst, stejně tak jako syntézu bakteriální nukleové kyseliny a proteinu (Scheit et al. 1985), a také tím, že zvyšuje propustnost jejich membrány (Sitaram et al. 1992).

Semenná plazma obsahuje také několik proteinů známých jako „první poslové“, kteří se váží na specifické receptory na povrchu spermie. Tyto proteiny tak regulují důležité intracelulární signální dráhy a tím modulují kapacitaci (Fraser et al. 2005, 2006). Nejprve urychlují kapacitaci a poté inhibují spontánní ztrátu akrozomu. Jako první poslové ovlivňují produkci druhých poslů, jako je cAMP, pomocí adenylcyklázy v dráze regulované proteinem G a tím urychlují kapacitaci (Fraser et al. 2005). Mezi tyto první posly patří FPP (fertilization-

promoting peptid), adenosin, kalcitonin a angiotensin II (Fraser et al. 2005, 2006). Ty molekuly, které inhibují produkci cAMP, inhibují i spontánní akrozomální reakci (Fraser et al. 2003, 2005).

Součástí semenné plazmy jsou molekuly, které pokrývají a stabilizují povrch spermie za účelem předejít předčasné kapacitaci. Tyto molekuly jsou obecně označovány jako dekapacitační faktory. Mezi dekapacitační faktory patří již zmiňované BSP proteiny, které se vážou na cholinové fosfolipidy spermie a jsou poté odstraňovány společně s cholesterolem a fosfolipidy pomocí heparinu či složek genitálního traktu krávy (Thérien et al. 1998). Dalšími dekapacitačními faktory jsou CRISP proteiny, které interagují se spermiemi v nadvarleti stejně tak jako i v semenné plazmě. Tato rodina proteinů dokáže blokovat iontové kanály plazmatické membrány spermie (Roberts et al. 2006), čímž inhibuje fosforylaci tyrosinu a její kapacitaci (Roberts et al. 2003). Dekapacitační efekt má i glykodelin-S, což je hlavní glykoprotein mužské semenné plazmy. Tento glykoprotein snižuje odstraňování cholesterolu indukované albuminem a cykloextrinem, a tím potlačuje kapacitaci (Chiu et al. 2005). Semenná plazma tak obsahuje kapacitační stimulatory i inhibitory. V samičím pohlavním ústrojí pak dochází k potlačování i stimulování kapacity za účelem zajištění dostatečného množství spermií schopných oplození (Bailey 2010).

3.4.3 Kapacitace

Proces kapacity, který fyziologicky probíhá v samičím pohlavním ústrojí, se skládá ze série biochemických a membránových změn, které připravují spermii nejprve k akrozomální reakci a následně k fertilizaci oocyta (Baldi et al. 2000). Tento proces, mimo jiné, zahrnuje změnu ve složení lipidů, povrchových vlastností a fluidity plazmatické membrány. Dochází k odstranění cholesterolu z plazmatické membrány a zvýšení její propustnosti pro Ca^{2+} . Dále zahrnuje zvýšení pH, aktivaci kaskád druhotných posílů (de Lamirade et al. 1997; Darszon et al. 2001; Suarez & Ho 2003a) a také dochází ke změně pohybu spermií (Felix 2005).

Odstranění cholesterolu z plazmatické membrány savčí spermie má za následek změnu její fluidity a díky tomu je plazmatická membrána propustná pro určité ionty jako je HCO_3^- a Ca^{2+} . Tento proces je následován stimulací adenylcyklázy, která ve spermii zvyšuje hladinu intracelulárního cAMP. cAMP aktivuje proteinkinázu A, která přímo či nepřímo ovlivňuje aktivitu tyrosinkinázy a fosfatázy, což nakonec vede ke zvýšení fosforylace tyrosinu. Této

signální dráhy se účastní také několik dalších signálních molekul jako je proteinkináza C, fosfodiesteráza (PDE) a další kinázy a fosfatázy (Kątska 2000).

Role receptorů G proteinu

Mezi rodinu receptorů spřažených s G proteinem (GPCR-G protein coupled receptor) patří adenosinový receptor a receptor kalcitoninu (Kątska-Książkiewicz 2007). U spermií se nacházejí dvě populace adenosinových receptorů, stimulační A_{2A} a inhibiční A_1 . Stimulační adenosinový receptor je aktivní pouze u nekapacitovaných spermií a inhibiční u spermií kapacitovaných. Adenosin u nekapacitovaných spermií stimuluje adenylcyklázu a cAMP, zatímco u kapacitovaných spermií dochází zase díky jeho působení k jejich inhibici (Adeoya-Osiguwa & Fraser 2002). Stejně tak působí i FPP (fertilization-promoting peptide) (Fraser et al. 2005). Receptory kalcitoninu se vyskytují pouze v jedné populaci, která také reguluje adenylcyklázu a cAMP stejně jako FPP a adenosin (Adeoya-Osiguwa & Fraser 2003; Fraser et al. 2005, 2006).

Role angiotensinu II

Angiotensin II patří mezi první posly, které obsahuje semenná plazma. Tento peptid urychluje kapacitaci u nekapacitovaných spermií (Fraser & Osiguwa 2004; Fraser et al. 2005). Navázání angiotensinu II na specifický receptor stimuluje u kapacitovaných i nekapacitovaných spermií cAMP (Mededovic & Fraser 2004), což je pravděpodobně způsobeno změnou koncentrace intracelulárních Ca^{2+} (Mededovic & Fraser 2005).

Role PAF a PAF-AH

PAF (platelet-activating factor) je důležitý signální fosfolipid nacházející se u spermií mnoha laboratorních i hospodářských zvířat stejně tak jako u člověka. PAF se váže na cílové buňky, dochází ke zvýšenému rozkladu PIP_3 (fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát) a ve spermiích vzniká diacylglycerol (DAG) a inositol 1,4,5-trifosfátu (IP_3), což vede k mobilizaci vápníku (Kordan et al. 2003). Výsledek působení PAF na buňky spermie je zvýšení intracelulárního vápníku, což je nezbytné pro hyperaktivaci pohybu spermií (Ricker et al. 1989). PAF-AH (PAF-acetylhydrolase) se řadí mezi dekapacitační faktory (Zhu et al. 2006; Roudebush 2007). Odstranění tohoto enzymu během kapacitace podporuje syntézu PAF, což má za následek zvýšení motility spermií a jejich schopnosti oplození (Roudebush 2007).

Role Ca^{2+} iontů

Vápenaté ionty ovlivňují různé funkce spermií jako motilitu, kapacitaci a schopnost oplození (Kątska-Książkiewicz 2007). Během kapacitace se zvyšuje jejich koncentrace. Dochází ke snížení odtoku Ca^{2+} z buňky díky inhibici Ca^{2+} ATPázy, dále ke zvýšení propustnosti Ca^{2+} přes plazmatickou membránu díky její destabilizaci způsobenou odstraněním cholesterolu a dochází i ke zvýšenému transportu Ca^{2+} díky aktivaci přenosových kanálů (Jagannathan et al. 2002; Felix 2005). V plazmatické a akrozomální membráně savčích spermií se nachází několik vápníkových kanálů. Ca_v (voltage-gated Ca^{2+}) kanály jsou řízené membránovým napětím a jedná se transmembránové proteiny, které se otevírají na základě depolarizace membrány a umožňují tak průchod vápenatých iontů z extracelulárního prostoru do buňky. Na základě jejich elektrofyziologických a farmakologických vlastností se Ca_v kanály dělí na T-typ kanály či LVA kanály (low-voltage activated) a na kanály HVA (high-voltage activated). Na zvyšování propustnosti vápenatých iontů se může podílet serum albumin. Dalším potenciálním mechanismem regulace Ca_v kanálů během kapacitace spermií je fosforylace (Felix 2005). Proces kapacitace koreluje se zvýšením fosforylace tyrosinu (Ficarro et al. 2003).

Množství extracelulárního Ca^{2+} potřebné k získání biologicky detekovatelné odpovědi se liší mezi petidy patřící mezi první posly. FPP se může vázat na spermii v médiu s deficitem Ca^{2+} , ale aby došlo k stimulaci kapacitace je zapotřebí minimálně 90 μM vápenatých iontů. Na rozdíl od FPP, kalcitonin dokáže stimulovat produkci cAMP a kapacitaci v médiu, kde se Ca^{2+} nachází ve stopovém množství (Adeoya-Osiguwa & Fraser 2003). Rozdíl v požadavcích na Ca^{2+} je zapříčiněn v regulaci těchto prvních poslů různými isoformami adenylcyclázy (Defer et al. 2000; Fraser et al. 2005). Na přítomnost Ca^{2+} jsou také závislé enzymy, jako je fosfolipáza A_2 a proteinkináza C nacházející se ve spermiích (Felix 2005).

Role calmodulinu a 1,4,5-trifosfátu (IP_3) během mobilizace intracelulárních Ca^{2+}

Calmodulin je protein, který na sebe váže Ca^{2+} a tento komplex reguluje aktivitu enzymů, jako jsou Ca^{2+} /calmodulin dependentní proteinkinázy (Bendahmane et al. 2001). Na bičíku mužské spermie je přítomná Ca^{2+} /calmodulin dependentní proteinkináza IV, jejíž aktivita se během kapacitace spermií zvyšuje (Marin-Briggiler et al. 2005). U kance se kapacitace a akrozomální reakce spermií účastní Ca^{2+} /calmodulin dependentní proteinkináza II (Ito et al. 2004). Pokud se calmodulin přidá do kapacitačního média, dochází ke stimulaci

adenylycyklázy, což má za následek zvyšování hladiny cAMP a následné zvyšování fosforylace tyrosinu (Zeng & Tulsiani 2003).

IP₃ receptory jsou vápníkové kanály, jejichž otevírání je regulováno Ca²⁺ a IP₃. Ca²⁺ z cytosolu se váží na IP₃ receptory na dvou různých místech. IP₃ podporuje otevírání kanálu na základě toho, zdali se Ca²⁺ váže na stimulační či inhibiční místo receptoru. Inhibice IP₃ receptorů pomocí Ca²⁺ pravděpodobně vyžaduje dodatečný protein, jímž může být calmodulin. Jedna část calmodulinu se může vázat na IP₃ receptor, zatímco druhá jeho část váže Ca²⁺ a poté interaguje s dalším místem receptoru, což způsobuje inhibici (Taylor & Laude 2007).

Role HCO₃⁻ a albuminu

Přítomnost HCO₃⁻ a albuminu v kapacitačním médiu in vitro je nezbytná pro začátek kapacity (Harrison 1996). HCO₃⁻ vstupující do spermie aktivuje adenylycyklázu, což vede ke zvýšení hladiny cAMP a k aktivaci proteinkinázy A, která přímo či nepřímo aktivuje dráhu tyrosinkinázy, jejíž výsledkem je fosforylace tyrosinu. Albumin podporuje odstraňování cholesterolu z plazmatické membrány (Chen et al. 2000; Visconti et al. 2002).

V procesu kapacity plní HCO₃⁻ několik funkcí. Během kapacity zvyšuje intracelulární pH (Zeng et al. 1996; Cross & Razy-Faulkner 1997), zvyšuje hladinu intracelulárního cAMP tím, že aktivuje adenylycyklázu, dále vyvolává rychlou a reversibilní změnu ve složení lipidů plazmatické membrány a účastní se i její hyperpolarizace (Jha et al. 2003).

Hyperaktivace

Hyperaktivace pohybu spermií se často objevuje během procesu kapacity (Suarez & Ho 2003a). U několika domácích druhů zvířat dochází k uchycení spermií na mukózním epitelu krčku vejcovodu, což má sloužit jako rezervoár spermií do doby, než vajíčko do vejcovodu vstoupí (Suarez 2002). Díky hyperaktivaci jsou spermie schopné se odpoutat od epitelu vejcovodu, postupovat jeho mucinózním prostředím a následně penetrovat matrix cumulus oophorus a zonu pellucida oocyty (Ho & Suarez 2001; Suarez & Ho 2003a,b). Studie ukázaly, že vlnění bičíku typické pro hyperaktivované spermie zlepšuje jejich progresivní pohyb ve viskoelastickém prostředí, jímž jsou ve vejcovodu vystaveny (Suarez & Dai 1992; Suarez & Ho 2003b). Inicaci hyperaktivace se nejspíše účastní chemotaktické a termotaktické

faktory (Eisenbach & Giojalas 2006), nebo primárním iniciátorem hyperaktivace může být alkalické prostředí, jež se ve vejcovodu nachází (Ho & Suarez 2001; Ho et al. 2002).

Pro aktivovanou a hyperaktivovanou formou motility se nacházejí různé signální dráhy. Aktivovaná forma motility využívá cAMP-sAC (soluble adenylyl cyclase)-PKA signální dráhu a vyžaduje relativně nízkou koncentraci Ca^{2+} pro fosforylaci proteinů bičíku. Hyperaktivovaná forma vyžaduje zvýšenou koncentraci Ca^{2+} (Lindermann & Kanous 1989; Marquez & Suarez 2004) a nevyžaduje cAMP (Ho et al. 2002; Suarez & Ho 2003a) nebo sAC (Hess et al. 2005).

Řízení hyperaktivace se nejspíše účastní zvýšené extracelulární pH, což vede ke zvýšení intracelulárního pH_i a to má za následek aktivování vápníkových kanálů (Kirichok et al. 2006; Marquez & Suarez 2007). V hlavní části bičíku spermie se nacházejí čtyři CatSper kanály, díky kterým dochází ke zvyšování Ca^{2+} v cytosolu (Qi et al. 2007). Signální dráhy hyperaktivace a akrozomální reakce jsou rozdílné a tyto procesy mohou probíhat nezávisle (Luconi & Baldi 2003; Marquez & Suarez 2004), ale zvýšení intracelulárního pH se zdá být iniciátorem obou těchto dějů (Varner & Johnson 2011).

Fosforylace tyrosinu a polymerizace aktinu

Fosforylace proteinů hraje důležitou roli při klíčových regulačních mechanismech různých buněčných procesů (Pawson 2004) a jak již bylo zmíněno, je významným dějem kapacity, při které dochází k fosforylaci tyrosinu u značného množství proteinů (Ficarro et al. 2003). Tato fosforylace se objevuje u proteinů hlavičky spermie a také u proteinů bičíku (Suarez & Dai 1995; Urner & Sakkas 2003), kde hraje důležitou roli při hyperaktivaci (Bailey 2007). Ve fibrózní pochvě se nacházejí dva členové rodiny obsahující tyrosin, které jsou označovány jako AKAPs proteiny (A kinase anchoring proteins). Tyto proteiny váží proteinkinázu A a mnoho dalších signálních enzymů bičíku spermie. Během kapacity jsou tyto členové AKAPs proteinů fosforylovány a regulují tak signální transdukcii (Carrera et al. 1996; Visconti et al. 2002; Bailey 2007). Ve fibrózní pochvě bičíku spermie se nachází protein vázající vápník označovaný jako CABYR, který je během kapacity také na tyrosinu fosforylován (Naaby-Hansen et al. 2002). Ve spojovací části bičíku se nachází PHGPx (phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase) a fosforylace tyrosinu tohoto enzymu během kapacity hraje roli při hyperaktivaci pohybu spermií (Nagdas et al. 2004). Mezi fosfotyrosinové proteiny patří protein obsahující valosin (VCP-valosin-containing protein), který se přemísťuje z oblasti krčku spermie do přední části hlavičky a možná se účastní

akrozomální reakce (Ficarro et al. 2003). Další fosfotyrosinové proteiny mohou být součástí při rozpoznávání a navázání spermií na zonu pellucidu (Aisquith et al. 2004). Enzym scrambláza, který může být aktivován pomocí fosforylace tyrosinu, je zodpovědný za rozrušení fosfolipidové dvojvrstvy a za aktivaci fosfolipázy (Gadella & Harrison 2000; Gadella et al. 2001).

Fosforylace tyrosinu proteinů spermie je aktivována vysokými hladinami cAMP, který reguluje proteinkinázu A (Urner & Sakkas 2003). Při fosforylaci tyrosinu se uplatňuje i proteinkináza C (Breitbart 2003). Fosforylaci tyrosinu a kapacitaci mohou spouštět i ROS (reactive oxygen species), mezi které patří O_2 , H_2O_2 (Bize et al. 1991; de Lamirande & Gagnon 1993) a NO (Herrero et al. 1999).

Polymerizace aktinu je závislá na fosfolipáze D, která je regulována proteinkinázou A a proteinkinázou C (Cohen et al. 2004). Uspořádání filament tvořených aktinem, které se nacházejí v periakrozomálním prostoru, zabraňuje předčasnému spojování vnější akrozomální membrány s plazmatickou membránou spermie v průběhu kapacitace. K tomu, aby nastala akrozomální reakce, je nezbytná depolymerizace aktinu (Breitbart et al. 2005).

Ačkoli proteinkináza A nebo proteinkináza C vede k polymerizaci aktinu, pro optimální průběh kapacitace spermií je potřeba udržení rovnováhy mezi těmito dvěma signálními drahami. Proteinkináza A podporuje kapacitaci, ale brzká aktivace proteinkinázy C dokáže průběh kapacitace ohrozit. Proto je nezbytná inhibice aktivity proteinkinázy A ke konci kapacitace za účelem dosažení aktivace proteinkinázy C, která předchází akrozomální reakci (Breitbart et al. 2005).

3.5 Akrozomální reakce

Akrozomální reakce nastává bezprostředně po navázání kapacitované spermie na oocyt (Gadella et al. 2001). Jedná se o proces, při kterém dochází ke splynutí plazmatické membrány spermie s vnější akrozomální membránou v několika místech. Tato fúze probíhá postupně v různých oblastech akrozomu. Splynutím membrán vznikají hybridní vezikuly, které vytvářejí póry, přes které následně dochází k uvolnění obsah akrozomu (Tulsiani et al. 1998; Abou-Haila & Tulsiani 2000). Hydrolytické enzymy, které se tímto uvolní, jsou nezbytné k rozrušení matrixu ZP (zona pellucida), což umožňuje spermii penetrovat ZP a vstoupit do perivitellinního prostoru (Florman & Ducibella 2006). Mezi hydrolytické enzymy, které takto rozrušují ZP, patří například akrozin, což je proteáza podobná trypsinu (Florman & Ducibella 2006). Akrozin je v inaktivní formě označován jako proakrozin, který má vysokou afinitu k ZP. Proto proakrozin zlepšuje schopnost navázání spermie na ZP (Senger 2005). Pokud by však došlo k předčasné akrozomální reakci (před navázáním na ZP), enzymy by byly ztraceny a spermie by nebyly dále schopné penetrovat přes ZP a tím by byla ztracena i jejich schopnost oplození (Gadella et al. 2001).

3.5.1 Spouštěcí mechanismus

Spermie obsahují několik receptorů jako například P2-purinoreceptor, který je aktivován extracelulárním ATP. Dalšími receptory jsou EGFR (epidermal growth factor receptor), angiotensin II receptor, progesteronem aktivovaný CatSper, což je specifický vápenatý kanál spermie, a receptory spřažené s G proteinem jako je LPA-R (lysophosphatidic acid receptor). Tyto receptory způsobují zvýšení koncentrace intracelulárních Ca^{2+} , čímž dochází ke spuštění akrozomální reakce. Na tyto receptory se váží ligandy, které se nacházejí v samičím reprodukčním ústrojí v takové koncentraci, která by akrozomální reakci spustila (Breitbart & Shabtay 2018).

Akrozomální reakce je vyvolána primárně ZP a probíhá na základě vazby ligandu ZP na povrchový receptor spermie, což vede ke stimulaci signální transdukce a následně dochází k akrozomální exocytóze (Yanagimachi 2011). U většiny savců obsahuje ZP tři glykoproteiny označující se jako ZP1, ZP2 a ZP3 (Bleil & Wassarman 1980, 1983; Wassarman 1988). Harris et al. (1994) pro označení proteinů ZP používají jinou nomenklaturu a rozdělují je jako ZPA, ZPB a ZPC. Peptidová složka těchto glykoproteinů je mezi druhy stejná, ale díky posttranslační

modifikaci, jako je glykosylace, dochází k druhové heterogenitě, díky níž je jejich vazebná afinita druhově specifická (Sinowatz et al. 2001). Například u bovinní spermie nemusí být glykosylace ZP3 pro indukci akrozomální reakce nezbytně nutná (Hinsch et al. 2005). Interakce mezi spermií a ZP se účastní proteiny plazmatické membrány spermie a spočívá v jejich rozpoznávání cukerné složky ZP3 (Miller et al. 1992; Wassarman 1999). Zatímco ZP3 se považuje za stěžejní signální molekulu spouštějící akrozomální reakci, ZP2 se může účastnit navázání na ZP (Wassarman 2005).

Navázání spermie na ZP se účastní membránové proteiny, které jsou pomocí GPI kotvy kovalentně připojeny na membránové lipidy (Thaler & Cardullo 1995). Jedním takovým proteinem je PH20, který je označován také jako SPAM1 (Sun et al. 2019). Jedná se o hyaluronidasu, která hraje roli při navázání spermie na ZP a také při jejím rozrušení (Thaler & Cardullo 1995). U kanců se ukázalo, že isoformy AQN-3 (spermadhesinu), P47 (kančí homolog SED-1), fertilinu β a peroxiredoxinu jsou klíčovými proteiny, které regulují navázání kapacitované spermie na ZP (van Gestel et al. 2007).

Ačkoli je ZP považována za primární ligand vázající se na receptor přítomný na povrchu přední části hlavičky kapacitované spermie (Yanagimachi 1994b; Tulsiani et al. 1997; Tulsiani & Abou-Haila 2001), akrozomální reakci mohou vyvolávat také další látky, se kterými se spermie setkávají během oplození in vivo (Abou-Haila & Tulsiani 2009). Takovou látkou může být progesteron, který je produkován během ovulace. Tento hormon se váže na receptor plazmatické membrány spermie, čímž spouští akrozomální reakci (Lenz et al. 1983; Roldan & Fraser 1998). Prostaglandiny a glykosaminoglykany přítomné ve folikulární tekutině a sekretu kumulárních buněk mohou též akrozomální reakci vyvolat (Yanagimachi 1994b; Tulsiani et al. 1998). Dalšími agonisty mohou být epidermální růstový faktor, atriopeptin, PAF, ATP (Abou-Haila & Tulsiani 2009) a angiotensin II (Gur et al. 1998).

Akrozomální reakci in vitro mohou indukovat například vápníkový ionofor, neoglykoproteiny či lektiny (Tarin & Trounson 1993). Vápníkový ionofor indukuje akrozomální reakci tím, že otevírá vápníkové kanály, které umožňují vstup Ca^{2+} (Abou-Haila & Tulsiani 2009).

Působením progesteronu dochází k influxu Ca^{2+} stejně jako díky působení ZP. Tudíž se zdá být, že tento mechanismus přenosu vápenatých kationtů je podobný (Garcia & Meizel 1999; Kirkman-Brown et al. 2002). Při akrozomální reakci, která je vyvolána pomocí progesteronu, se uplatňuje dráha tyrosinkináz (Bonaccorsi et al. 1995; Garde & Roldan 1996;

Garcia & Meizel 1999) a GABA (gamma aminobutyric acid) A-like receptoru (Shi & Roldan 1995; Kuroda et al. 1999) jako mediátorů Ca^{2+} , který spouští akrozomální reakci (Abou-Haila & Tulsiani 2009). U akrozomální reakce spuštěnou ZP dochází k influxu Ca^{2+} pomocí vápníkových kanálů řízenými napětím (Florman et al. 1989), ale u akrozomální reakce vyvolanou progesteronem nebyl tento mechanismus popsán (Garcia & Meizel 1999). Zásadní rozdíl mezi akrozomální reakcí spuštěnou progesteronem a ZP spočívá na povaze jejich receptorů. V případě akrozomální reakce vyvolanou ZP se uplatňují G proteiny, ale nemusí se účastnit při indukované akrozomální reakce progesteronem (Wassarman 1999). Díky těmto rozdílům je možné, že akrozomální reakce vyvolaná působením progesteronu a ZP může být regulována nezávislým mechanismem (Abou-Haila & Tulsiani 2009).

Kromě indukované akrozomální reakce může akrozomální reakce probíhat také bez vnějšího stimulu (agonisty) a je označována jako spontánní (Yanagimachi 1994b). U spermií se vyskytují mechanismy, které zabraňují spontánní akrozomální reakci. Jedním z nich je již zmiňovaná polymerace aktinu, která probíhá během kapacitace (Breitbart & Shabtay 2018). Samovolné akrozomální reakci zabraňuje také Ca^{2+} /calmodulin dependentní kináza II (CaMKII), jejíž inhibice během kapacitace u bovinních spermií výrazně spontánní akrozomální reakci spouští (Rotfeld et al. 2014). V podmínkách in vitro může dojít ke spontánní akrozomální reakci například při zchlazování kapacitovaných spermií z 38 °C na 30 °C, jelikož mají již destabilizovanou plazmatickou membránu (Gadella et al. 2001).

Spouštěcího mechanismu akrozomální reakce se účastní již zmiňované G proteiny, které se u savčích spermií nacházejí v různých oblastech, jež zahrnují i akrozom a ekvatoriální segment (Garty et al. 1988; Glassner et al. 1991; Merlet et al. 1999). G_i proteiny jsou přímo aktivovány pomocí ZP3 (Wilde et al. 1992), díky čemuž dochází k alkalizaci spermie, při které se zvyšuje intracelulární pH (Arnoult et al. 1996a). Depolarizace membrány spolu s alkalizací, kterou způsobují G_i proteiny, jsou zodpovědné za otevření vápníkových kanálů T-typu (Arnoult et al. 1996b). G_i proteiny inaktivuje pertusový toxin, což je bakteriální toxin, který blokuje spuštění akrozomální reakce ZP3. Díky inaktivaci G_i proteinů nedochází k otevření vápníkových kanálů, čímž nedochází k influxu Ca^{2+} a zvýšení jejich koncentrace uvnitř spermie nezbytné pro spuštění akrozomální reakce (Bailey & Storey 1994).

3.5.2 Signální transdukce

Jak již bylo zmíněno, navázání kapacitované spermie na ZP oocyту spouští kaskádu signálních drah. Ty spočívají ve zvyšování koncentrace intracelulárních Ca^{2+} , což má za následek aktivaci druhých posílů, kteří ovlivňují dále průběh událostí, které vrcholí akrozomální reakcí (Florman et al. 2008; Abou-Haila & Tulsiani 2009).

Watson et al. (1995) zjišťovali u spermií berana distribuci Ca^{2+} během akrozomální reakce. Na základě toho uvádějí, že se Ca^{2+} během akrozomální reakce primárně nachází na vnější akrozomální membráně a jak průběh akrozomální exocytózy dále postupuje, dochází k redistribuci Ca^{2+} do přední části mezi vnější akrozomální membránu a plazmatickou membránu, kde při akrozomální reakci nastává jejich fúze. Tato distribuce nasvědčuje tomu, že se Ca^{2+} přímo účastní fúze membrán vedoucí k akrozomální exocytóze.

Akrozomální reakce vyžaduje spíše vyšší hladinu intracelulárních Ca^{2+} , jejichž koncentrace se pohybuje v řádu mM. U kapacitovaných spermií se koncentrace intracelulárních Ca^{2+} pohybuje poměrně v nižších hodnotách (μM), proto než dojde k akrozomální reakci, musí extracelulární Ca^{2+} projít skrz plazmatickou membránu do buňky. Význačný influx Ca^{2+} nastává právě navázáním spermie na ZP (Bailey & Storey 1994; Brewis et al. 1996), kdy dochází k aktivaci LVA vápníkových kanálů (Arnoult et al. 1996b).

Akrozom může sloužit jako zásobárna Ca^{2+} , které mohou být díky působení ZP během akrozomální reakce mobilizovány (Aitken 1997; Breitbart & Spungin 1997). Eflux těchto zásobních vápenatých iontů může aktivovat SOC (store-operated channels) v plazmatické membráně (Jimenez-Gonzalez et al. 2006), pravděpodobně také TRP (transient receptor potential) kanály (Jungnickel et al. 2001), díky kterým dochází ke zvyšování intracelulárních Ca^{2+} , které jsou pro řízení akrozomální reakce nezbytné (O'Toole et al. 2000; Gonzalez-Martinez et al. 2001; Hirohashi & Vacquier 2003).

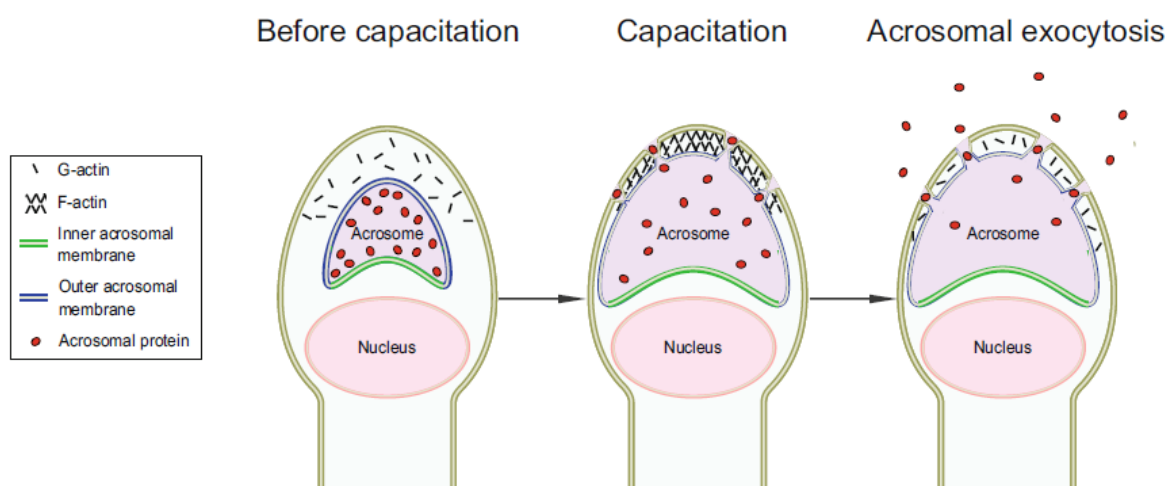
Zvýšení koncentrace intracelulárních Ca^{2+} na základě působení ZP3 a progesteronu je také doprovázeno efluxem H^+ , díky čemuž dochází ke zvýšení intracelulárního pH (Florman et al. 1989; Brook et al. 1996; Garcia & Meizel 1996). Intracelulární pH spermie může být regulováno pomocí Na^+/H^+ pumpy, stejně tak jako $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Holappa et al. 1999). Navíc progesteron rapidně stimuluje influx Na^+ (Patrat et al. 2000), jehož přítomnost v extracelulárním mediu je pro indukci akrozomální reakci tímto steroidním hormonem žádoucí (Garcia & Meizel 1996; Patrat et al. 2000).

Akrozoem obsahuje (mimo jiné) enzymy, které jsou označovány jako fosfolipáza A₂ a C. Tyto fosfolipázy jsou aktivovány pomocí Ca²⁺ a věří se, že hrají důležitou roli při akrozomální exocytóze. U kapacitovaných spermií, které jsou vystaveny působení fyziologických agonistů jako ZP nebo progesteronu, dochází k influxu Ca²⁺, což způsobuje aktivaci fosfolipázy C, která se váže na plazmatickou membránu. Fosfolipáza C aktivuje hydrolýzu PIP₂ (fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát) uvnitř membrány, díky čemuž dává za vznik dvěma aktivním intracelulárním posílům jako je DAG (diacylglycerol) a IP₃ (inositol 1,4,5-trifosfát) (Walensky & Snyder 1995; Breitbart 2003). Zvýšená hladina DAG způsobuje aktivaci DAG-dependentní proteinkinázy C, což vede k otevření vápníkových kanálů plazmatické membrány (Roldan 1998). IP₃ se účastní uvolňování Ca²⁺ z akrozomu (Walensky & Snyder 1995; Breitbart 2003). Fosfolipáza Cδ4, jež je členem rodiny fosfolipáz C, hraje důležitou roli při mobilizaci Ca²⁺ zásob z akrozomu a také aktivuje SOCy plazmatické membrány, díky čemuž dochází ke zvyšování koncentrace Ca²⁺ v cytosolu spermie (Walensky & Snyder 1995; Aitken 1997; Breitbart & Spungin 1997). Fosfolipáza Cδ4 a IP₃ receptor, nacházející se na akrozomu (Walensky & Snyder 1995; Fukami et al. 2001), pravděpodobně hrají roli při regulaci Ca²⁺, které se účastní TRP kanál (Jungnickel et al. 2001; Montell et al. 2002). Na otevření vápníkových kanálů vnější akrozomální membrány se podílí i proteinkináza A, která je aktivována zvýšenou koncentrací cAMP. Zvýšená hladina cAMP je důsledkem signální dráhy, jež zahrnuje navázání ZP na receptor spřažený s G_i proteinem, který aktivuje fosfolipázu Cβ₁. Ta reguluje adenylcyklázu, která zvyšuje hladinu cAMP (Breitbart 2002).

Díky působení agonistů a influxu Ca²⁺ dochází k aktivaci i fosfolipázy A₂, která se účastní dějů při fúzi membrán během akrozomální exocytózy (Roldan 1998). Bylo zjištěno, že zvýšená hladina DAG způsobuje aktivaci také fosfolipázy A₂ (Yuan et al. 2003). Aktivace fosfolipázy C také vede k rozrušení filament F-aktinu (Walensky & Snyder 1995; Aitken 1997; Breitbart & Spungin 1997). Bylo zjištěno, že neomycin inhibuje fosfolipázu C, díky čemuž dochází i k inhibici akrozomální reakce (Breitbart 2002).

Během akrozomální reakce dochází k depolymerizaci aktinu, který se nachází mezi vnější akrozomální membránou a plazmatickou membránou spermie. U kapacitovaných spermií se nachází ve formě filament (označuje se jako F-aktin). F-aktin zajišťuje udržení fosfolipázy C navázanou na plazmatickou membránu a poskytuje fyzickou bariéru, která brání spojování plazmatické membrány s vnější akrozomální. V závislosti na zvýšené koncentraci Ca²⁺ a zvyšování pH dochází k depolymerizaci F-aktinu na rozpustný monomerní G-aktin, což má

za následek přiblížení plazmatické membrány k vnější akrozomální membráně (Obr. 2) (Spungin et al. 1995). Zároveň dochází k deacylaci mastných kyselin fosfolipidů pomocí fosfolipázy A₂ za vzniku kyseliny arachidonové a lysofosfolipidů. Klíčovým fosfolipidem je fosfatidylcholin, ze kterého vzniká lysofosfatidylcholin, který podněcuje fúzi membrán (Flemming & Yanagimachi 1981; Llanos et al. 1993).



Obr. 2 Model dynamiky aktinu během kapacitace a akrozomální exocytózy savčích spermií (Romarowski et al. 2016).

Spojování plazmatické a vnější akrozomální membrány se účastní mimo vápenatých iontů také SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) proteiny, NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor), α -SNAP (soluble NSF attachment protein), Rab-GTPáza a synaptotagmin (Katafuchi et al. 2000; Ramalho-Santoz et al. 2000). U hřebčích spermií byly idnetifikovány SNARE proteiny, NSF a synaptotagmin s převážným výskytem v oblasti přední části akrozomu a ekvatoriálního segmentu (Gamboa & Ramalho-Santoz 2005).

SNARE proteiny lze funkčně dělit na v-SNARE proteiny a t-SNARE proteiny. v-SNARE proteiny nacházející se na akrozomální membráně se spojují s komplementárními t-SNARE proteiny, které se nacházejí na plazmatické membráně spermie. Vytvářejí tak trans-SNARE komplexy, které se účastní fúze membrán (Grote et al. 2000; McNew et al. 2000; Sollner 2003).

NSF a jeho kofaktor α -SNAP jsou cytosolické proteiny, které kooperativně regulují funkci SNARE proteinů. α -SNAP proteiny se vážou na SNARE proteiny tak, aby zajišťovaly správné připojení NSF a jsou zodpovědné za stimulaci ATPázy NSF, které disociují trans-SNARE komplexy (Clary et al. 1990; Barnard et al. 1997; He et al. 1999). Tento mechanismus

recyklování látek však probíhá u fúze membrán ostatních buněk, ale neprobíhá při akrozomální reakci spermií, jelikož je jednorázovou událostí (Varner & Johnson 2011). Při akrozomální reakci pravděpodobně indukují konformační změny komplexů SNARE proteinů, kdy katalyzují rozpojení inaktivních cis-SNARE proteinových komplexů, čímž může dojít k reasociaci na aktivní trans-SNARE komplexy (deBlas et al. 2005).

Rab proteiny patřící mezi rodinu G proteinů se nacházejí na akrozomální membráně. Na Rab proteiny se váže GTP (guanosintrifosfát), díky čemuž dochází k jejich aktivaci a Rab proteiny poté interagují s plazmatickou membránou. Vytvářejí tak fyzický spoj, který dovoluje v-SNARE a t-SNARE proteinům interagovat za vzniku již zmiňovaného trans-SNARE komplexu (Waters & Hughson 2000; Pfeffer 2001; Sollner 2003). Utvoření tohoto komplexu vyvolává dostatečnou energii k překonání repulzivních sil mezi dvěma membránami (Sollner 2003). Je možné, že filamentární F-aktin může tyto síly oslabovat (Breibart 2003). Epac, který na Rab proteinech katalyzuje přeměnu GDP na GTP a je aktivován pomocí cAMP, se tímto také účastní regulace akrozomální reakce (Branham et al. 2006).

Synaptotagmin je velký transmembránový protein, který na sebe váže Ca^{2+} . Tento protein díky působení Ca^{2+} přímo interaguje s t-SNARE proteiny a SNAP proteiny a může se účastnit utváření SNARE komplexů (Littleton et al. 2001; Tucker & Chapman 2002). Synaptotagmin může také díky působení proteinkinázy C a intracelulárního Ca^{2+} inhibovat spontánní fúzi membrán (Varner & Johnson 2011).

4 Závěr

Spermie musejí před akrozomální reakcí prodělat serii změn, díky kterým může tato reakce úspěšně proběhnout. Během spermatogeneze dochází ve varlatech ke vzniku a vývoji spermií (zejména akrozomu), při zrání v nadvarleti dochází k sekvenčnímu vylučování proteinů, které se váží na povrch spermie a účastní se navázání na ZP. Během kontaktu spermií se semennou plazmou dochází také k adsorbování proteinů na povrch spermie, které hrají roli při interakci spermie se ZP a následně při fúzi s oocytem. Důležitá funkce semenné plazmy spočívá také v navázání tzv. dekapacitačních faktorů na plazmatickou membránu spermie, které ji stabilizují do doby, než v samičím pohlavním traktu dojde k její destabilizaci při kapacitaci spermií. Kapacitace je důležitým milníkem v procesu oplození, jelikož připravuje spermii k akrozomální reakci. Pouze u kapacitovaných savčích spermií může k akrozomální reakci dojít.

Destabilizace plazmatické membrány způsobuje její zvýšenou propustnost zejména pro Ca^{2+} , který je pro řízení akrozomální reakce nezbytný. Spouštěcím mechanismem pro influx těchto kationtů je navázání určitých ligandů na specifické receptory spermie, které spouští signální dráhy vedoucí k otevření vápníkových kanálů, kterými mohou Ca^{2+} proniknout do buňky. Koncentrace intracelulárních Ca^{2+} musí být relativně vysoká, proto dochází i k mobilizaci Ca^{2+} z akrozomu. Zvýšení koncentrace těchto iontů vede k fúzi plazmatické a vnější akrozomální membrány za vzniku tzv. hybridních vezikulů. Díky tomu dojde k odhalení vnitřní akrozomální membrány a k uvolnění obsahu akrozomu do extracelulárního prostoru, kde rozruší ZP a spermie může oocyt oplodnit.

Na základě zjištění, jakým mechanismem dochází k fúzi plazmatické a vnější akrozomální membrány, které ligandy akrozomální reakci spermií spouštějí a které naopak inhibují, můžeme být schopni zajistit příznivé podmínky pro průběh akrozomální reakce v in vitro podmínkách a tím i úspěšné oplození oocyty. Při oplození in vivo by spermie neměly přijít do kontaktu s inhibitory akrozomální reakce, které by snižovaly schopnost spermií se s vajíčkem spojit. Látky, které dokáží inhibovat akrozomální reakci, by mohly být předmětem dalšího výzkumu.

5 Seznam použité literatury

- Abou-Haila A, Tulsiani DRP. 2000. Mammalian Sperm Acrosome: Formation, Contents, and Function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **379**: 173–182.
- Abou-Haila A, Tulsiani DRP. 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **485**: 72-81.
- Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR. 2002. Capacitation state-dependent changes in adenosine receptors and their regulation of adenylyl cyclase/cAMP. *Molecular Reproduction and Development* **63**: 245-255.
- Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR. 2003. Calcitonin acts as a first messenger to regulate adenylyl cyclase/cAMP and mammalian sperm function. *Molecular Reproduction and Development* **65**: 228-236.
- Aisquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ. 2004. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *Journal of Cell Science* **117**: 3657.
- Aitken RJ. 1997. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Molecular Human Reproduction* **3**: 169-173.
- Amann RP. 1987. Function of the epididymis in bulls and rams. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* **34**: 115-131.
- Amann RP. 2011. Physiology and Endocrinology. Pages 881-908 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. *Equine Reproduction*. 2nd edn. Wiley-Blackwell. Iowa.
- Amann RP, Graham JK. 1993. Spermatozoal function. Pages 715-745 in McKinnon AO, Voss JL, editors. *Equine Reproduction*. Media, PA: Williams & Wilkins.
- Amann RP, Graham JK. 2011. Spermatozoal function. Pages 1053-1084 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. *Equine Reproduction*. 2nd edn. Wiley-Blackwell. Iowa.
- Amann RP, Pickett BW. 1987. Principals of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* **7**: 145-173.
- Arnoult C, Zeng Y, Florman HM. 1996a. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *The Journal of Cell Biology* **134**: 637-645.
- Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM. 1996b. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**: 6757-6762.
- Aurich JE, Kühne A, Hoppe H, Aurich C. 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* **46**: 791–797.

- Bailey JL. 2007. Cell signalling during capacitation and the acrosome reaction. In: Proceedings of the Havemeyer Foundation Workshop on Stallion Reproduction. Bandera. Texas.
- Bailey JL. 2010. Factors regulating sperm capacitation. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **56**: 334-348.
- Bailey JL, Storey BT. 1994. Calcium influx into mouse spermatozoa activated by solubilized mouse zona pellucida, monitored with the calcium fluorescent indicator, fluo-3. Inhibition of the influx by three inhibitors of the zona pellucida induced acrosome reaction: tyrphostin A48, pertussis toxin, and 3-quinuclidinyl benzilate. *Molecular Reproduction and Development* **39**: 297-308.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. 2000. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Frontiers in Bioscience* **5**: 110-123.
- Barnard RJ, Morgan A, Burgone RD. 1997. Stimulation of NSF ATPase activity by alpha SNAP is required for SNARE complex disassembly and exocytosis. *Journal of Cell Biology* **139**: 875-883.
- Bedford JM, Hoskins DD. 1990. The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. Pages 379-568 in Lamming GE, editor. *Marshall's Physiology of Reproduction*, vol. 2. 4th edn. Churchill Livingstone. London.
- Bendahmane M, Lynch C, Tulsiani DRP. 2001. Calmodulin signals capacitation and triggers the antagonist-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **390**: 1-8.
- Belleannée C, Labas V, Teixeira-Gomes AP, Gatti JL, Dacheux JL, Dacheux F. 2011. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *Journal of Proteomics* **74**: 59–78.
- Bergeron A, Villemure M, Lazure C, Manjunath P. 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development* **71**: 461–470.
- Berndtson WE, Igboeli G, Parker WG. 1987. The number of Sertoli cells in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. *Biology of Reproduction* **37**: 60-67.
- Bize I, Santander G, Cabello P, Driscoll D, Sharpe C. 1991. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biology of Reproduction* **44**: 398-403.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1980. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Developmental Biology* **76**: 185-202.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1983. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Developmental Biology* **95**: 317-324.

- Bonaccorsi L, Luconi M, Forti G, Baldi E. 1995. Tyrosine kinase inhibition reduces the plateau phase of the calcium increase in response to progesterone in human sperm. *FEBS Letters* **364**: 83–86.
- Bradley MP, Forrester IT. 1982. Human and ram seminal plasma both contain a calcium-dependent regulator protein calsemin. *Journal of Andrology* **3**: 289–296.
- Branham MT, Mayorga LS, Tomes CN. 2006. Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 8656-8666.
- Breitbart H. 2002. Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis. *Journal of Reproductive Immunology* **53**: 151-159.
- Breitbart H. 2003. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cellular and Molecular Biology* **49**: 321-327.
- Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S. 2005. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* **129**: 263-268.
- Breitbart H, Shabtay O. 2018. Sperm acrosome reaction. *Encyclopedia of Reproduction* **3**: 284-288.
- Breitbart H, Spungin B. 1997. The biochemistry of the acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction* **3**: 195-202.
- Brewis IA, Clayton R, Barratt CL, Hornby DP, Moore HDM. 1996. Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* **2**: 583-589.
- Brito LFC. 2007. Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* **6**: 249-264.
- Brook PF, Lawry J, Cooke ID, Barratt CL. 1996. Measurement of intracellular pH in human spermatozoa by flow cytometry with the benzo[c]xanthene dye SNAFL-1: a novel, single excitation, dual emission, molecular probe. *Molecular Human Reproduction* **2**: 18-25.
- Calvete JJ, Ensslin M, Mburu J, Iborra A, Martinez P, Adermann K, Waberski D, Sanz L, Töpfer-Petersen E, Weitze KF, Einarsson S, Rodriguez-Martinez H. 1997. Monoclonal antibodies against boar sperm zona pellucida-binding protein AWN-1. Characterization of a continuous antigenic determinat and immunolocalization of AWN epitopes in inseminated sows. *Biology of Reproduction* **57**: 735-742.
- Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ. 1997. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction* **57**: 1293–1301.
- Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton FL, Texarik J, Kopf FS, Moss SB. 1996. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A

kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Developmental Biology* **180**: 284-296.

Chandonnet I, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. 1990. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development* **26**: 313–318.

Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iorgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J. 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* **289**: 625-628.

Chiu PC, Chung MK, Tsang HY, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Lee KF, Yeung WS. 2005. Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 25580–25589.

Clark EN, Corron ME, Florman HM. 1993. Caltrin, the calcium transport regulatory peptide of spermatozoa, modulates acrosomal exocytosis in response to the egg's zona pellucida. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 5309–5316.

Clary DO, Griff IC, Rothman JE. 1990. SNAPS, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animal and yeast. *Cell* **51**: 709-721.

Cohen G, Rubinstein S, Gur Y, Breitbart H. 2004. Crosstalk between protein kinase a and c regulates phospholipase d and f-actin formation during sperm capacitation. *Developmental Biology* **267**: 230-241.

Cooper TG. 2005. Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Human Reproduction* **20**: 9–11.

Cornwall GA. 2009. New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update* **15**: 213-227.

Cross NL, Razy-Faulkner P. 1997. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biology of Reproduction* **56**: 1169-1174.

Dadoune JP. 1995. The nuclear status of human sperm cells. *Micron* **26**: 323–345.

Da Silva N, Pietrement C, Brown D, Breton S. 2006. Segmental and cellular expression of aquaporins in the male excurrent duct. *Biochimica et Biophysica Acta* **1758**: 1025–1033.

Dacheux JL, Paquignon M. 1980. Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. *Reproduction Nutrition Development* **20**: 1085-1099.

Dacheux JL, Belghazi M, Lanson Y, Dacheux F. 2006. Human epididymal secretome and proteome. *Molecular and Cellular Endocrinology* **250**: 36–42.

- Dacheux JL, Belleannée C, Guyonnet B, Labas V, Teixeira-Gomes AP, Ecroyd H, Druart X, Gatti JL, Dacheux F. 2012. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **58**: 197–210.
- Dacheux JL, Dacheux F. 2014. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* **147**: 27-42.
- Dacheux JL, Voglmayr JK. 1983. Sequence of sperm cell surface differentiation and its relationship to exogenous fluid proteins in the ram epididymis. *Biology of Reproduction* **29**: 1033–1046.
- Darszon A, Beltrán C, Felix R, Nishigaki T, Treviño CL. 2001. Ion transport in sperm signaling. *Developmental Biology* **240**: 1–14.
- Darszon A, Lopez-Martinez P, Acevedo JJ, Hernandez-Cruz A, Treviño CL. 2006. T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell Calcium* **40**: 241–252.
- deBlas GA, Roggero CM, Tomes C, Mayorga LS. 2005. Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLOS Biology* **3**: 1801-1812.
- de Lamirande E, Gagnon C. 1993. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology* **16**: 21-25.
- de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction* **3**: 175-194.
- Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J. 2000. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *American Journal of Physiology. Renal-Physiology* **279**: F400-F416.
- Desnoyers L, Manjunath P. 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 10149–10155.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1994. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex glands fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta* **1200**: 48-54.
- Eddy EM, O'Brien DA. 1994. The Spermatozoon. Pages 29-77 in Knobil E, Neil JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. 2nd edn. Raven Press. New York.
- Eisenbach M, Giojalas LC. 2006. Sperm guidance in mammals: an unpaved road to the egg. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**: 276-285.
- Ekhlas-Hundrieser M, Schafer B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Müller P, Töpfer-Petersen E. 2005. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Molecular Reproduction and Development* **70**: 45–57.

- Ellerman DA, Da Ros VG, Cohen DJ, Busso D, Morgenfeld MM, Cuasnicu PS. 2002. Expression and structure–function analysis of de, a sperm cysteine-rich secretory protein that mediates gamete fusion. *Biology of Reproduction* **67**: 1225–1231.
- Esseltine JL, Scott JD. 2013. AKAP signaling complexes: pointing towards the next generation of therapeutic targets? *Trends in Pharmacological Sciences* **34**: 648-655.
- Esch FS, Ling NC, Böhlen P, Ying SY, Guillemin R. 1983. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **113**: 861–867.
- Fábrega A, Puigmulé M, Dacheux JL, Bonet S, Pinart E. 2012. Glycocalyx characterisation and glycoprotein expression of *Sus domesticus* epididymal sperm surface samples. *Reproduction, Fertility and Development* **24**: 619–630.
- Felix R. 2005. Molecular physiology and pathology of Ca²⁺ –conducting channels in the plasma membrane of mammalian sperm. *Reproduction* **129**: 251-262.
- Ficarro S, Chertihin O, Westbrook VA, White F, Jayes F, Kalab P, Marto JA, Shabanowitz J, Herr JC, Hunt DF, Visconti PE. 2003. Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 11579-11589.
- Flemming AD, Yanagimachi R. 1981. Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. *Gamete Research* **4**: 253-273.
- Florman HM, Ducibella T. 2006. Fertilization in mammals. Pages 55–112 in Neill JD, editor. *The Physiology of Reproduction*. Elsevier, San Diego.
- Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. 2008. Regulating the acrosome reaction. *The International Journal of Developmental Biology* **52**: 503–510.
- Florman HM, Tombes RM, First NL, Babcock DF. 1989. An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Developmental Biology* **135**: 133-146.
- Fouchécourt S, Métayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux JL. 2000. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biology of Reproduction* **62**: 1790–1803.

- Fraser LR, Adeoya-Osiguwa S, Baxendale RW. 2003. First messenger regulation of capacitation via G protein-coupled mechanisms: a tale of serendipity and discovery. *Molecular Human Reproduction* **9**: 739-748.
- Fraser LR, Osiguwa OO. 2004. Human sperm responses to calcitonin, angiotensin II and FPP in prepared semen samples from normal donors and infertility patients. *Human Reproduction* **19**: 596-606.
- Fraser LR, Adeoya-Osiguwa S, Baxendale RW, Mededovic S, Osiguwa OO. 2005. First messenger regulation of mammalian sperm function via adenylyl cyclase/cAMP. *Journal of Reproduction and Development* **51**: 37-46.
- Fraser LR, Adeoya-Osiguwa S, Baxendale RW, Gibbons R. 2006. Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules. *Frontiers in Bioscience* **11**: 1636-1645.
- Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. 2000. Sperm chromatin. *Archives of Andrology* **45**: 215–225.
- Fukami K, Nakao K, Inoue T, Kataoka Y, Kurokawa M, Fissore RA, Nakamura K, Katsuki M, Mikoshiba K, Yoshida N, Takenawa T. 2001. Requirement of phospholipase Cdelta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science* **292**: 920-923.
- Gadella BM. 2008. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Animal Reproduction Science* **107**: 229-236.
- Gadella BM, Harrison RAP. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* **127**: 2407-2420.
- Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science* **68**: 249-265.
- Gamboa S, Ramalho-Santos J. 2005. SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility. *Theriogenology* **64**: 275-291.
- Garcia MA, Meizel S. 1996. Importance of sodium ion to the progesterone-initiated acrosome reaction in human sperm. *Molecular Reproduction and Development* **45**: 513-520.
- Garcia MA, Meizel S. 1999. Progesterone-Mediated Calcium Influx and Acrosome Reaction of Human Spermatozoa: Pharmacological Investigation of T-Type Calcium Channels. *Biology of Reproduction* **60**: 102–109.
- Garde J, Roldan ER. 1996. rab 3-peptide stimulates exocytosis of the ram sperm acrosome via interaction with cyclic AMP and phospholipase A2 metabolites. *FEBS Letters* **391**: 263–268.

- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. Pages 96-109 in Hafez B, Hafez ESE, editors. Reproduction in farm animals. 7th edn. Lippincott Williams & Wilkins. USA.
- Garty NB, Galiani D, Aharonheim A, Ho YK, Phillips DM, Dekel N, Salomon Y. 1988. G-proteins in mammalian gametes: an immunocytochemical study. *Journal of Cell Science* **91**: 21-31.
- Gatti JL, Druart X, Guerin Y, Dacheux F, Dacheux JL. 1999. A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. *Biology of Reproduction* **60**: 937-945.
- Gerton GL. 2002. Function of the sperm acrosome. Pages 265-302 in Hardy DM, editor. Fertilization. Academic Press. San Diego.
- Glassner M, Jones J, Kligman I, Woolkalis MJ, Gerton GL, Kopf GS. 1991. Immunocytochemical and biochemical characterization of guanine nucleotide-binding regulatory proteins in mammalian spermatozoa. *Developmental Biology* **146**: 438-450.
- Gonzalez-Martinez MT, Galindo BE, De La Tore L, Zapata O, Rodriguez E, Florman HM, Darszon A. 2001. A sustained increase in intracellular Ca^{2+} is required for the acrosome reaction in sea urchin sperm. *Developmental Biology* **236**: 220-229.
- Grote E, Baba M, Ohsumi Y, Novick PJ. 2000. Geranyl-geranylated SNAREs are dominant inhibitors of membrane fusion. *Journal of Cell Biology* **151**: 453-466.
- Gur Y, Breitbart H, Lax Y, Rubinstein S, Zamir N. 1998. Angiotensin II induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *American Journal of Physiology* **275**: E87-E93.
- Guyonnet B, Dacheux F, Dacheux JL, Gatti JL. 2011. The epididymal transcriptome and proteome provide some insights into new epididymal regulations. *Journal of Andrology* **32**: 651-664.
- Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JI, Manjunath P, Suarez SS. 2006. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30- kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of Reproduction* **75**: 501-507.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. Fertilization and Cleavage. Pages 96-109 in Hafez B, Hafez ESE, editors. Reproduction in farm animals. 7th edn. Lippincott Williams & Wilkins. USA.
- Haase B, Schlötterer C, Ekhlas-Hundrieser M, Kuiper H, Distl O, Töpfer-Petersen E, Leeb T. 2005. Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene* **352**: 20-29.
- Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG. 1994. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Sequence* **4**: 361-393.

- Harrison RAP. 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reproduction Fertility and Development* **8**: 581-594.
- He P, Southard C, Chen D, Whiteheart SW, Cooper RL. 1999. Role of alpha-SNAP in promoting efficient neurotransmission at the crayfish neuromuscular junction. *Journal of Neurophysiology* **82**: 3406-3416.
- Heller C, Clermont Y. 1964. Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Progress in Hormone Research* **20**: 545-575.
- Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suarez SS, Levin LR, Williams CJ, Buck J, Moss SB. 2005. The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Developmental Cell* **9**: 249-259.
- Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C. 1999. Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation in vitro. *Biology of Reproduction* **61**: 575-581.
- Hinsch E, Aires VA, Hedrich F, Oehninger S, Hinsch KD. 2005. A synthetic decapeptide from a conserved ZP3 protein domain induces the G protein-regulated acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Theriogenology* **63**: 1682-1694.
- Hirohashi N, Vacquier D. 2003. Store-operated calcium channels trigger exocytosis of the sea urchin sperm acrosomal vesicle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**: 285-292.
- Ho HC, Suarez SS. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* **122**: 519-526.
- Ho HC, Granish KA, Suarez SS. 2002. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca^{2+} and not cAMP. *Developmental Biology* **250**: 208-217.
- Hodder ADJ, Liu IKM. 2011. Spermatozoal motility. Pages 1292-1296 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. *Equine Reproduction*. 2nd edn. Wiley-Blackwell. Iowa.
- Holappa K, Mustonen M, Parvinen M, Vihko P, Rajaniemi H, Kellokumpu SP. 1999. Primary structure of a sperm cell anion exchanger and its messenger ribonucleic acid expression during spermatogenesis. *Biology of Reproduction* **61**: 981-986.
- Holstein AF, Roosen-Runge EC. 1981. *Atlas of Human Spermatogenesis*. Grosse Verlag, Berlin.
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. 2003. Understanding spermatogenesis is a pre-requisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1**: 107-123.
- Hoskins DD, Stephens DT, Hall ML. 1974. Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and protein kinase levels in developing bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* **37**: 131-133.
- Inskip PB, Hammerstedt RH. 1982. Changes in metabolism of ram sperm associated with epididymal transit or induced by exogenous carnitine. *Biology of Reproduction* **27**: 735-743.

- Ito J, Kawano N, Hirabayashi M, Shimada M. 2004. The role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on the inactivation of MAP kinase and p34cdc2 kinase during fertilization and activation in pig oocytes. *Reproduction* **128**: 409-415.
- Iwamoto T, Hiroaki H, Furuichi Y, Wada K, Satoh M, Osada T, Gagnon C. 1995. Cloning of boar SPMI gene which is expressed specifically in seminal vesicles and codes for a sperm motility inhibitor protein. *FEBS Letters* **368**: 420-424.
- Jagannathan S, Pulicover SJ, Barratt CL. 2002. Voltage-operated calcium channels in male germ cells. *Reproduction* **123**: 203-215.
- Jha KN, Kameshwari DB, Shivaji S. 2003. Role of signaling pathways in regulating the capacitation of mammalian spermatozoa. *Cellular and Molecular Biology* **49**: 329-340.
- Jimenez-Gonzalez C, Michelangeli F, Harper CV, Bratt CLR, Publicover SJ. 2006. Calcium signaling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. *Human Reproduction Update* **12**: 253-267.
- Johnson L. 1991. Spermatogenesis. Pages 173-219 in Cupps PT, editor. *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press. San Diego.
- Johnson L, Amann RP, Pickett BW. 1978a. Scanning electron and light microscopy of the equine seminiferous tubule. *Fertility and Sterility* **29**: 208-215.
- Johnson L, Amann RP, Pickett BW. 1978b. Scanning electron microscopy of the epithelium and spermatozoa in the equine excurrent duct system. *American Journal of Veterinary Research* **39**: 1428-1434.
- Johnson L, Tatum ME. 1989. Temporal appearance of seasonal changes in numbers of sertoli cells, leydig cells and germ cells in stallions. *Biology of Reproduction* **40**: 994-999.
- Johnson L, Blanchard TL, Varner DD, Scrutchfield WL. 1997. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology* **48**: 1199-1216.
- Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal Reproduction Science* **60-61**: 471-480.
- Johnson L, Griffin CE, Martin MT. 2011. Spermatogenesis. Pages 1026-1052 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. *Equine Reproduction*. 2nd edn. Wiley-Blackwell. Iowa.
- Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM. 2001. Trp2 regulates entry of Ca^{2+} into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nature Cell Biology* **3**: 499-502.
- Juyena NS, Stelletta C. 2012. Seminal Plasma: An Essential Review Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology* **33**: 536-551.

- Katafuchi K, Mori T, Toshimori, Iida H. 2000. Localization of a syntaxin isoform, syntaxin 2, to the acrosomal reaction of rodent spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* **57**: 375-383.
- Kątska L. 2000. Molecular events in mammalian sperm capacitation (in Polish). *Medycyna weterynaryjna* **56**: 372-375.
- Kątska-Książkiewicz L. 2007. Recent studies on molecular mechanisms involved in mammalian sperm capacitation: A review. *Journal of Animal and Feed Sciences* **16**: 311-328.
- Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. 2006. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature* **439**: 737-740.
- Kirkman-Brown JC, Punt EL, Barrat CLR, Publicover SJ. 2002. Zona Pellucida and Progesterone-Induced Ca^{2+} Signaling and Acrosome Reaction in Human Spermatozoa. *Journal of Andrology* **23**: 306-315.
- Kordan W, Strzeżek J, Fraser L. 2003. Functions of platelet activating factor (PAF) in mammalian reproductive processes: a review. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **6**: 55-60.
- Kuroda Y, Kaneko S, Yoshimura Y, Nozawa S, Mikoshiba K. 1999. Influence of progesterone and GABAA receptor on calcium mobilization during human sperm acrosome reaction. *Archives of Andrology* **42**: 185-191.
- Lenz RW, Ball GD, Lohse JK, First NL, Ax RL. 1983. Chondroitin Sulfate Facilitates an Acrosome Reaction in Bovine Spermatozoa as Evidenced by Light Microscopy, Electron Microscopy and in Vitro Fertilization. *Biology of Reproduction* **28**: 683-690.
- Lindermann CB, Kanous KS. 1989. Regulation of mammalian sperm motility. *Archives of Andrology* **23**: 1-22.
- Littleton JT, Bai J, Vyas B, Desai R, Baltus AE, Garment MB, Carlson SD, Ganetzky B, Chapman ER. 2001. Synaptotagmin mutants reveal essential functions for the C2B domain in Ca^{2+} -triggered fusion and recycling of SVs in vivo. *Journal of Neuroscience* **21**: 421-433.
- Llanos MN, Morales P, Rizzo MS. 1993. Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction. *Journal of Experimental Zoology* **267**: 209-216.
- Luconi M, Baldi E. 2003. How do sperm swim? Molecular mechanisms underlying sperm motility. *Cellular and Molecular Biology* **49**: 357-369.
- Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L. 1994. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biology of Reproduction* **50**: 27-37.
- Manjunath P, Thérien I. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology* **53**: 109-119.

- Mann, T. 1964. The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract. 2nd ed. Methuen. London, United Kingdom.
- Mann T, Lutwak-Mann C. 1981. Male reproductive function and semen. Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology. Springer-Verlag. Berlin, Germany.
- Marengo SR. 2008. Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Animal Reproduction Science* **105**: 52-63.
- Marin-Briggiler CI, Jha KN, Chertihin O, Buffone G, Herr JC, Vazquez-Levin MH, Visconti PE. 2005. Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in human sperm and its involvement in motility regulation. *Journal of Cell Science* **118**: 2013-2022.
- Marquez B, Suarez SS. 2004. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of Reproduction* **70**: 1626-1633.
- Marquez B, Suarez SS. 2007. Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca^{2+} influx. *Biology of Reproduction* **76**: 660-665.
- McNew JA, Weber T, Parlati F, Johnson RJ, Melia TJ, Sollner TH, Rothman JE. 2000. Close is not enough: SNARE-dependent membrane fusion requires an active mechanism that transduces force to membrane anchors. *Journal of Cell Biology* **150**: 105-117.
- Mededovic S, Fraser LR. 2004. Angiotensin II stimulates cAMP production and protein tyrosine phosphorylation in mouse spermatozoa. *Reproduction* **127**: 601-612.
- Mededovic S, Fraser LR. 2005. Mechanisms of action of angiotensin II on mammalian sperm function. *Reproduction* **129**: 211-218.
- Merlet F, Weinstein LS, Goldsmith PK, Rarick T, Hall JL, Bisson JP, De Mazancourt P. 1999. Identification and localization of G protein subunits in human spermatozoa *Molecular Human Reproduction* **5**: 38-45.
- Metafora S, Peluso G, Persico P, Ravagnan G, Esposito C, Porta R. 1989. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of a major protein secreted from the epithelium of the rat seminal vesicles. *Biochemical Pharmacology* **38**: 121-131.
- Miller DJ, Macek MB, Shur BD. 1992. Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* **357**: 589-593.
- Montell CL, Birnbaumer L, Flockerzi V. 2002. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **108**: 595-598.
- Morel MCGD. 2015. Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management. CABI Publishing. USA. UK.

- Moura AA, Chapman D, Koc H, Killian G.J. 2007. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science* **98**: 169–188.
- Naaby-Hansen S, Mandal A, Wolkowicz MJ, Sen B, Westbrook VA, Shetty J, Coonrod SA, Klotz KL, Kim YH, Bush LA, Flickinger CJ, Herr JC. 2002. CABYR, a novel calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Developmental Biology* **242**: 236-254.
- Nagdas SK, Winfrey VP, Olson GE. 2004. Tyrosine phosphorylation generates multiple isoforms of the mitochondrial capsule protein, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx), during hamster sperm capacitation. *Biology of Reproduction* **72**: 164-171.
- Okabe M. 2013. The cell biology of mammalian fertilization. *Development* **140**: 4471-4479.
- Okabe M. 2014. Mechanism of fertilization: a modern view. *Experimental Animals* **63**: 357–365.
- O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM. 2000. Ca^{2+} entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Molecular Biology of the Cell* **11**: 1571-1584.
- Pariset CC, Feinberg JM, Dacheux JL, Weinman SJ. 1985. Changes in calmodulin level and cAMP-dependent protein kinase activity during epididymal maturation of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* **74**: 105-112.
- Patrat C, Serres C, Jouannet P. 2000. Induction of a sodium ion influx by progesterone in human spermatozoa. *Biology of Reproduction* **62**: 1380-1386.
- Pawson T. 2004. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* **116**: 191–203.
- Pesch S, Bergmann M. 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* **37**: 597-612.
- Pereira R, Sá R, Barros A, Sousa M. 2017. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian Journal of Andrology* **19**: 5-14.
- Perino A, Ghigo A, Scott JD, Hirsch E. 2012. Anchoring proteins as regulators of signaling pathways. *Circulation Research* **111**: 482-492.
- Pfeffer SR. 2001. Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nature Cell Biology* **1**: E17-E22.
- Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Quill TA, Clapham DE. 2007. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 1219-1223.

- Ramalho-Santos J, Moreno RD, Sutovsky P, Chan AW, Hewitson L, Wessel GM, Simerly CR, Schatten G. 2000. SNAREs in mammalian sperm: possible implications for fertilization. *Developmental Biology* **223**: 54-69.
- Reddy ESP, Bhargava PM. 1979. Seminalplasmin—an antimicrobial protein from bovine seminal plasma which acts in E coli by specific inhibition of rRNA synthesis. *Nature* **279**: 725–728.
- Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Töpfer-Petersen E. 1996. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *European Journal of Biochemistry* **242**: 636–640.
- Ricker DD, Minhas BS, Kumar R, Robertson JL, Dodson MG. 1989. The effect of platelet-activating factor on the motility of human spermatozoa. *Fertility and Sterility* **52**: 655-658.
- Rikmenspoel R. 1984. Movements and active moments of bull sperm flagella as a function of temperature and viscosity. *Journal of Experimental Biology* **108**: 205-230.
- Robaire B, Hermo L. 1988. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions and their regulation. Pages 999-1080 in Knobil E, Neil E, editors. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York.
- Roberts KP, Ensrud KM, Wooters JL, Nolan MA, Johnston DS, Hamilton DW. 2006. Epididymal secreted protein CRISP-1 and sperm function. *Molecular and Cellular Endocrinology* **250**: 122-127.
- Roberts KP, Wamstad JA, Ensrud KM, Hamilton DW. 2003. Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein CRISP-1. *Biology of Reproduction* **69**: 572-581.
- Rodríguez-Martínez H, Iborra A, Martínez P, Calvete JJ. 1998. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. *Reproduction, Fertility and Development* **10**: 491-497.
- Roldan ERS. 1998. Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. *Frontiers in Bioscience* **3**: 1109–1119.
- Roldan ERS, Fraser LR. 1998. Protein kinase C and exocytosis in mammalian spermatozoa. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **9**: 296–297.
- Romarowski A, Luque GM, La Spina FA, Krapf D, Buffone MG. 2016. Role of Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis. Pages 129-144 in Buffone MG, editor. *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*. Springer Nature. Switzerland.
- Rotfeld H, Hillman P, Ickowicz D, Breitbart H. 2014. PKA and CaMKII mediate PI3K activation in bovine sperm by inhibition of the PKC/PP1 cascade. *Reproduction* **147**: 347-356.

- Roudebush WE. 2007. Seminal platelet-activating factor. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **33**: 69-74.
- Sánchez-Luengo S, Aumüller G, Albrecht M, Sen PC, Röhm K, Wilhelm B. 2004. Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca^{2+} -ATPase. *Journal of Andrology* **25**: 234–244.
- Sanz L, Calvette JJ, Jonáková V, Töpfer-Petersen E. 1992. Boar spermadhesin AQN-1 and AWN are sperm-associated acrosin inhibitor acceptor proteins. *FEBS Letters* **300**: 63-66.
- Satir P. 1974. How cilia move. *Scientific American* **231**: 44-52.
- Satir P. 1984. The generation of ciliary motion. *The Journal of Protozoology* **31**: 8-12.
- Scott TW, Voglmayr JK, Setchell BP. 1967. Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. *The Biochemical Journal* **102**: 456–461.
- Schambony A, Gentzel M, Wolfes H, Raida M, Neumann U, Töpfer-Petersen E. 1998. Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochimica et Biophysica Acta* **1387**: 206–216.
- Scheit KH, Shivaji S, Bhargava PM. 1985. Seminalplasmin, an antimicrobial protein from bull seminal plasma, inhibits growth, and synthesis of nucleic acids and proteins in *S cerevisiae*. *The Journal of Biochemistry* **97**: 463–471.
- Schnorr B. 1996. *Embryology of Domestic Animals*. Enke, Stuttgart. 10–13.
- Senger PL. 2005. *Pathways to pregnancy and parturition*. 2nd edn. Current Conceptions. USA.
- Shi QX, Roldan ER. 1995. Evidence that a GABAA-like receptor is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction* **52**: 373–381.
- Sinowatz F, Töpfer-Petersen E, Kölle S, Palma G. 2001. Functional morphology of the zona pellucida. *Anatomia, Histologia, Embryologia* **30**: 257-263.
- Sitaram N, Krishnakumari V, Nagaraj R. 1992. The antibacterial peptide seminalplasmin alters permeability of the inner membrane of *E coli*. *FEBS Letters* **303**: 265–268.
- Sitaram N, Subbalakshmi C, Krishnakumari V, Nagaraj R. 1997. Identification of the region that plays an important role in determining antibacterial activity of bovine seminalplasmin. *FEBS Letters* **400**: 289–292.
- Smollich A, Michel G. 1992. *Microscopical anatomy of domestic animals*. Gustav Fischer, Jena, Stuttgart. p. 245.
- Sollner TH. 2003. Regulated exocytosis and SNARE function (Review). *Molecular Membrane Biology* **20**: 209-220.

- Souza CE, Moura AA, Monaco E, Killian GJ. 2008. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Animal Reproduction Science* **105**: 72–89.
- Spungin B, Margalit I, Breitbart H. 1995. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *Journal of Cell Science* **108**: 2525–2535.
- Suarez SS, Dai X. 1992. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biology of Reproduction* **46**: 686–691.
- Suarez SS, Dai X. 1995. Intracellular calcium reaches different levels of elevation in hyperactivated and acrosome reacted hamster sperm. *Molecular Reproduction and Development* **42**: 325–333.
- Suarez SS. 2002. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reproduction in Domestic Animals* **37**: 140–143.
- Suarez SS, Ho HC. 2003a. Hyperactivated motility in sperm. *Reproduction in Domestic Animals* **38**: 119–124.
- Suarez SS, Ho HC. 2003b. Hyperactivation of mammalian sperm. *Cellular and Molecular Biology* **49**: 351–356.
- Sun TC, Wang JH, Wang XX, Liu XM, Zhang CL, Hao CF, Ma WZ, Deng SL, Liu YX. 2019. Effects of sperm proteins on fertilization in the female reproductive tract. *Frontiers in Bioscience* **24**: 735–749.
- Swierstra EE, Gebauer MR, Pickett BW. 1974. Reproductive physiology of the stallion. I. Spermatogenesis and testis composition. *Journal of Reproduction and Fertility* **40**: 113–123.
- Swierstra EE, Pickett BW, Gebauer MR. 1975. Spermatogenesis and duration of transit of spermatozoa through the excurrent ducts of stallion. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* **23**: 53–57.
- Tarin JJ, Trounson AO. 1993. Zona-free sperm penetration assay and inducers of the acrosome reaction: a model for sperm microinjection under the zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* **35**: 95–104.
- Taylor CW, Laude AJ. 2007. IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium* **32**: 321–334.
- Taylor A, Robson A, Houghton BC, Jepson CA, Ford WC, Frayne J. 2013. Epididymal specific, selenium-independent GPX5 protects cells from oxidative stress-induced lipid peroxidation and DNA mutation. *Human Reproduction* **28**: 2332–2342.
- Teixeira DIA, Mello LM, Gadelha CAA, Cunha RMS, Bloch C Jr, Rádis-Baptista G, Cavada BS, Freitas VJF. 2006. Ion-exchange chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. *Genetics and Molecular Research* **5**: 79–87.

- Thaler CD, Cardullo RA. 1995. Biochemical characterization of a glycosylphosphatidylinositol-linked hyaluronidase on mouse sperm. *Biochemistry* **34**: 7788-7795.
- Thérien I, Bousquet D, Manjunath P. 2001. Effect of seminal phospholipidbinding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. *Biology of Reproduction* **65**: 41–51.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P. 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction* **59**: 768–776.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlas-Hundrieser M, Dostálová Z, Sanz L, Calvete JJ. 1998. Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* **30**: 217-224.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlas-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Harald S. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Animal Reproduction Science* **89**: 159-170.
- Tucker WC, Chapman ER. 2002. Role of synaptotagmin in Ca^{2+} -triggered exocytosis. *Biochemical Journal* **366**: 1-13.
- Tulsiani DRP, Abou-Haila A, Loeser CR, Pereira BMJ. 1998. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Experimental Cell Research* **240**: 151–164.
- Tulsiani DRP, Abou-Haila A. 2001. Mammalian sperm molecules that are potentially important in interaction with female genital tract and egg vestment. *Zygote* **9**: 51–69.
- Tulsiani DRP, Yoshida-Komiya H, Araki Y. 1997. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biology of Reproduction* **57**: 487–494.
- Turner RM. 2006. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development* **18**: 25-38.
- Urner F, Sakkas D. 2003. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction* **125**: 17-26.
- van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Brouwers JF, Gadella BM. 2007. Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *Molecular Human Reproduction* **13**: 445–454.
- Varner DD, Blanchard TL, Brinsko SP, Love CC, Taylor TS, Johnson L. 2000. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. *Animal Reproduction Science* **60-61**: 493-509.
- Varner DD, Johnson L. 2011. From a Sperm's Eye View-Revisiting Our Perception of this Intriguing Cell. Pages 909-990 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. *Equine Reproduction*. 2nd edn. Wiley-Blackwell. Iowa.

- Varner DD, Gibb Z, Aitken RJ. 2015. Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. *Equine Veterinary Journal* **47**: 16-24.
- Villemure M, Lazure C, Manjunath P. 2003. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1**: 39–48.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. 2002. Novel signaling pathways in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of Reproductive Immunology* **53**: 133-150.
- Walensky LD, Snyder SH. 1995. Inositol 1,4,5-triphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *The Journal of Cell Biology* **130**: 857-869.
- Wang L, Yuan Q, Chen S, Cai H, Lu M, Liu Y, Xu C. 2012. Antimicrobial activity and molecular mechanism of the CRES protein. *PLoS ONE* 7 (e48368) DOI: 10.1371/journal.pone.0048368.
- Ward WS, Partin AW, Coffey DS. 1989. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma* **98**: 153–159.
- Wassarman PM. 1988. Fertilization in mammals. *Scientific American* **259**: 78-84.
- Wassarman PM. 1999. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion. *Cell* **96**: 175-83.
- Wassarman PM. 2005. Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *Journal of Cellular Physiology* **204**: 388-391.
- Waters MG, Hughson FM. 2000. Membrane tethering and fusion in the secretory and endocytic pathways. *Traffic* **1**: 588-597.
- Watson PF, Plummer JM, Jones PS, Bredl JCS. 1995. Localization of intracellular calcium during the acrosome reaction in ram spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* **41**: 513–520.
- Wempe F, Wagner S, Kammer H, Krauhs E, Scheit KH. 1990. Seminalplasmin, the major basic protein of bull seminal plasma, is a secretory protein of the seminal vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* **1034**: 260–262.
- Wilde MW, Ward CR, Kopf GS. 1992. Activation of a G protein in mouse sperm by the zona pellucida, an egg-associated extracellular matrix. *Molecular Reproduction and Development* **31**: 297-306.
- Xia J, Reigada D, Mitchell CH, Ren D. 2007. CATSPER channel-mediated Ca²⁺ entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation. *Biology of Reproduction* **77**: 551-559.
- Yamaguchi Y, Ouchi Y. 2012. Antimicrobial peptide defensin: identification of novel isoforms and the characterization of their physiological roles and their significance in the pathogenesis of diseases. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* **88**: 152–166.

- Yanagimachi R. 1994a. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* **2**: 371–372.
- Yanagimachi R. 1994b. Mammalian Fertilization. Pages 189-317 in Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York.
- Yanagimachi R. 2011. Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization? *Biology of Reproduction* **85**: 4–5.
- Yu B, Zhao Y, Zhao W, Chen F, Liu Y, Zhang J, Fu W, Zong Z, Yu A, Guan Y. 2003. The inhibitory effect of BSP-A1/-A2 on protein kinase C and tyrosine protein kinase. *Cell Biochemistry Function* **21**: 183–188.
- Yuan YY, Chen WY, Shi QX, Mao LZ, Yu SQ, Fang X, Roldan ERS. 2003. Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *Biology of Reproduction* **68**: 904–913.
- Zeng Y, Oberdorf JA, Florman HM. 1996. pH regulations in mouse sperm: identification of Na⁺, Cl⁻ and HCO₃⁻ -dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Developmental Biology* **173**: 510-520.
- Zeng HT, Tulsiani DRP. 2003. Calmodulin antagonists differentially affect capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation of mouse sperm components. *Journal of Cell Science* **116**: 1981-1989.
- Zhu J, Massey JB, Mitchell-Leef D, Elsner CW, Kort HI, Roudebush WE. 2006. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity affects sperm motility and serves as a decapacitation factor. *Fertility and Sterility* **85**: 391-394.