

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv inhibitorů ubiquitin-proteazómového komplexu na  
degradaci proteinů AKAP v průběhu kapacitace kančích  
spermíí**

**Diplomová práce**

**Bc. Adéla Škodová**

**Reprodukční biotechnologie**

**Mgr. Ing. Tereza Krejčová, Ph.D.**

**© 2022 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci „Vliv inhibitorů ubiquitin-proteazómového komplexu na degradaci proteinů AKAP v průběhu kapacitace kančích spermií“ vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4.2022

---

## **Poděkování**

Za cenné rady a připomínky, ochotu a odborné vedení diplomové práce bych chtěla poděkovat paní Mgr. Ing. Tereze Krejčové Ph.D. Dále děkuji Ing. Anetě Pilsové a Ing. Zuzaně Pilsové za konzultace a pomoc při experimentální části této práce. V neposlední řadě děkuji mé rodině za nezměrnou podporu při studiu.

# Vliv inhibitorů ubiquitin-proteazómového komplexu na degradaci proteinů AKAP v průběhu kapacitace kančích spermií

## Souhrn

Proteiny rodiny AKAP (A-kinázu kotvící proteiny) hrají v organismu důležitou roli v regulaci aktivity proteinkinázy A (PKA). Všechny AKAP proteiny se vyznačují schopností vázat se na regulační podjednotky PKA, čímž mohou ovlivňovat aktivitu cAMP/PKA signální kaskády. Díky této své funkci se podílejí i na regulaci mnoha buněčných procesů včetně gamet. Již bylo prokázáno, že u samců jsou AKAP proteiny významně zapojené do regulace motility spermií, dále i do procesů spojených s kapacitací a akrozomální reakcí spermií. Nejvíce zastoupenými proteiny rodiny AKAP v savčích spermiích, a to i kančích, jsou proteiny AKAP4 a AKAP3. Tyto proteiny jsou lokalizovány především v hlavní části bičíku spermie a AKAP3 protein byl prokázán také v akrozomu. Absence proteinu AKAP4 ve spermiích způsobuje sníženou motilitu bičíku, a tím i sníženou fertilitu spermií. Dosud byl popsán mechanismus degradace proteinu AKAP3 pomocí ubiquitin-proteazómového systému (UPS) v průběhu kapacitace spermií a tato degradace proteinu AKAP3 byla nezbytná pro aktivaci PKA. Mechanismus degradace AKAP4 u kančích spermií doposud popsán nebyl. Cílem této diplomové práce bylo vhodnými experimenty ověřit hypotézu, že UPS je během kapacitace kančích spermií v *in vitro* podmínkách zapojen do degradace proteinu AKAP4, podobně jako u proteinu AKAP3.

Detekce proteinu AKAP4 a sledování vlivu inhibice UPS na degradaci AKAP4 během kapacitace kančích spermií probíhalo prostřednictvím metody Western blot. Imunofluorescenční metodou byla sledována lokalizace proteinu AKAP4 v kančích spermiích.

Experimenty provedenými při řešení této diplomové práce byl detekován protein AKAP4 i jeho izoforma proAKAP4, a to jak u ejakulovaných kančích spermií, tak i u spermií po *in vitro* kapacitaci, a i u spermií po navozené akrozomální reakci. Byla prokázána jeho lokalizace v hlavní části bičíku spermie. Výsledky experimentů zaměřených na sledování zapojení UPS do degradace proteinu AKAP4 během kapacitace kančích spermií potvrdily hypotézu o zapojení UPS do degradace proteinu AKAP4 během kapacitace kančích spermií v *in vitro* podmínkách. V dalších experimentech by bylo vhodné se zaměřit na sledování aktivity PKA v souvislosti s degradací proteinu AKAP4 během kapacitace kančích spermií.

**Klíčová slova:** AKAP4, kančí spermie, kapacitace, proteazom, ubiquitin

# Effect of ubiquitin-proteasome complex inhibitors on the degradation of AKAP proteins during capacitation of boar sperm

## Summary

AKAP family proteins (A-kinase anchoring proteins) play an important role in organism in regulating protein kinase A (PKA) activity. All AKAP proteins are characterized by the ability to bind to PKA regulatory subunits, which may affect the activity of the cAMP/PKA signaling cascade. Thanks to this function, they are also involved in the regulation of many cellular processes, including gametes. In males, AKAP proteins have already been shown to be significantly involved in the regulation of sperm motility, as well as in the processes associated with capacitation and acrosomal reaction of sperm. The most abundant proteins of the AKAP family in mammalian sperm, including boar sperm, are the AKAP4 and AKAP3 proteins. These proteins are located mainly in the principal piece of the sperm flagellum and the AKAP3 protein has also been shown in the acrosome. The absence of protein AKAP4 in sperm causes reduced flagellar motility and thus reduced sperm fertility. To date, the mechanism of AKAP3 protein degradation by the ubiquitin-proteasome system (UPS) during sperm capacitation has been described and this degradation of protein AKAP3 was necessary for activation PKA. The mechanism of AKAP4 degradation in boar sperm has not been described to date. The aim of this diploma thesis was to verify the hypothesis that the UPS is involved in the degradation of AKAP4 protein during *in vitro* conditions during the capacitation of boar sperm, similarly to AKAP3 protein.

Detection of AKAP4 protein and monitoring of the effect of UPS inhibition on AKAP4 degradation during boar sperm capacitation was performed by Western blot. The localization of AKAP4 protein in boar sperm was observed by immunofluorescence method.

AKAP4 protein and its isoform proAKAP4 were detected by experiments performed in solving this diploma thesis in ejaculated boar sperm, as well as in sperm after *in vitro* capacitation and also in sperm after induced acrosomal reaction. Has been demonstrated localization of protein in principal piece of sperm flagellum. The results of experiments aimed at monitoring the effect of the UPS on the degradation of AKAP4 protein during capacitation of boar sperm confirmed hypothesis of involvement UPS in the degradation of AKAP4 protein during the capacitation of boar sperm *in vitro*. In further experiments, it would be appropriate to focus on monitoring PKA activity in relation to AKAP4 protein degradation during boar sperm capacitation.

**Keywords:** AKAP4, boar sperm, capacitation, proteasome, ubiquitin

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Spermatogeneze</b>	<b>10</b>
3.1.1	Spermatocytogeneze	11
3.1.2	Spermiogeneze	13
3.1.3	Neurohumorální regulace spermatogeneze	13
<b>3.2</b>	<b>Spermie</b>	<b>14</b>
3.2.1	Hlavička	15
3.2.2	Krček	17
3.2.3	Bičík	17
<b>3.3</b>	<b>Motilita spermií</b>	<b>19</b>
<b>3.4</b>	<b>Kapacitace</b>	<b>21</b>
3.4.1	Cholesterolový eflux	22
3.4.2	Změna v koncentraci vápenatých iontů	23
3.4.3	cAMP/PKA signální kaskáda	23
<b>3.5</b>	<b>Akrozomální reakce</b>	<b>25</b>
<b>3.6</b>	<b>Ubiquitin-proteazómový systém</b>	<b>25</b>
3.6.1	Inhibice UPS	29
<b>3.7</b>	<b>AKAP proteiny</b>	<b>30</b>
3.7.1	AKAP4 a AKAP3	31
<b>4</b>	<b>Metodika</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Biologický materiál</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Příprava vzorků</b>	<b>32</b>
<b>4.3</b>	<b>Western blot (WB)</b>	<b>33</b>
4.3.1	SDS – elektroforéza	33
4.3.2	Přenos proteinů	34
4.3.3	Imunodetekce proteinu AKAP4	35
<b>4.4</b>	<b>Nepřímá imunofluorescence</b>	<b>36</b>
<b>4.5</b>	<b>Statistická analýza</b>	<b>36</b>
<b>4.6</b>	<b>Experimentální schéma</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>38</b>
<b>5.1</b>	<b>Detekce proteinu AKAP4 v kančích spermích</b>	<b>38</b>
<b>5.2</b>	<b>Vliv proteazomu na degradaci proteinu AKAP4 během kapacitace kančích spermií</b>	<b>40</b>

<b>5.3</b>	<b>Vliv ubiquitin dependentní degradace proteinu AKAP4 během kapacitace kančích spermií .....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>47</b>

# 1 Úvod

Jedním z důležitých procesů, který předchází samotnému oplození vajíčka je proces kapacitace spermie (Chang 1955). Tento proces probíhá v samičím pohlavním traktu a je klíčový pro spuštění akrozomální reakce a následnou fertilizaci (Chang & Yanagimachi 1963). Během kapacitace prochází spermie řadou změn, jako je například modifikace plazmatické membrány v důsledku efluxu cholesterolu z plazmatické membrány (Visconti & Kopf 1998). Dochází také ke změnám pohybu bičíku, koncentrace intracelulárních iontů či pH (Ferramosca & Zara 2014; Martínez-León et al. 2015). S kapacitací také souvisí ubiquitin-proteazómový systém (UPS), který během tohoto procesu degraduje povrchové proteiny spermie a remodeluje její plazmatickou membránu (Kong et al. 2009; Schwartz & Ciechanover 2009). UPS je také zapojen do kontroly epididymální maturace spermií a do průběhu akrozomální reakce (Sutovsky et al. 2004; Baska et al. 2008). Proteazóm složený z proteáz dokáže účinně degradovat ubiquitinem označené proteiny na malé peptidy (Glickman & Ciechanover 2002). Proteazómy jsou přítomny i ve spermiích nejenom člověka, ale prokázány byly i u mnoha druhů zvířat (Tipler et al. 1997; Wojcik et al. 2000; Sutovsky et al. 2003). Mezi proteiny, které je UPS schopen rozpoznat, degradovat a tím i regulovat, patří protein kotvící kinázu A (AKAP). Proteiny z rodiny AKAP se vyskytují v samčích i samičích reprodukčních tkáních i v pohlavních buňkách (Luconi 2011). Proteiny AKAP3 a AKAP4 byly identifikovány v bičíku spermie. Studie uvádějí, že tyto proteiny mají významnou roli v regulaci motility spermií (Carrera et al. 1996; Harrison et al. 2000; Balbach et al. 2018). Dosud byl popsán mechanismus degradace proteinu AKAP3 pomocí UPS v průběhu kapacitace spermií. Mechanismus degradace AKAP4 u kančích spermií zůstává stále nejasným.



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

Cílem této diplomové práce bylo vhodnými experimenty ověřit hypotézu, že ubiquitin-proteazómový systém je během kapacitace kančích spermií v *in vitro* podmínkách zapojen do degradace proteinu AKAP4.

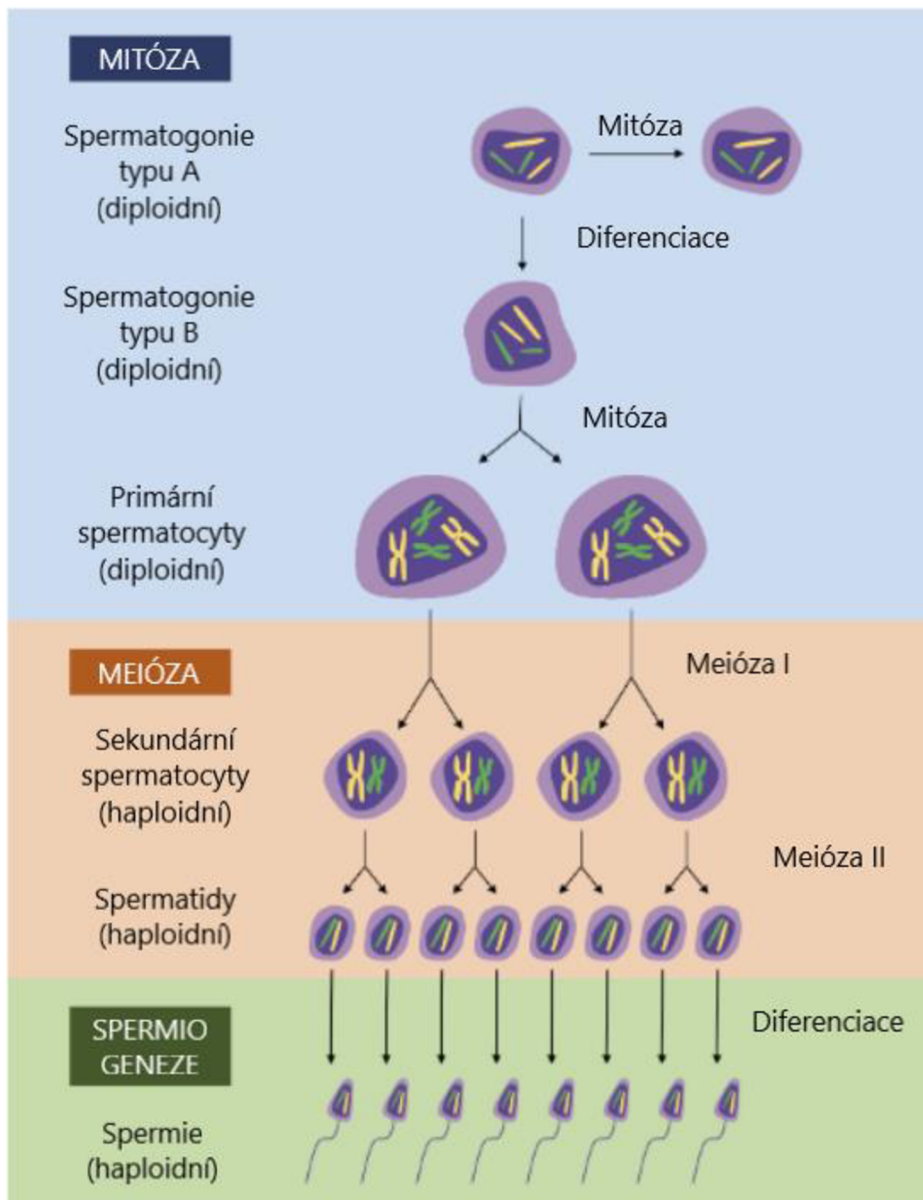
## 3 Literární rešerše

### 3.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces, během kterého vznikají samčí pohlavní buňky – spermie. Lze jej rozdělit do dvou fází: spermatocytogeneze a spermiogeneze (Tichý et al. 2004). Spermatocytogeneze zahrnuje nejprve mitotické a poté i meiotické dělení buněk, čímž vznikají kulaté spermatidy. Během spermiogeneze dochází ke konečné přeměně spermatid ve spermie (Lichnovský et al. 2001).

Spermatogeneze je vývojový proces, při kterém ze spermatogoniálních kmenových buněk (SSC) vznikají spermie. Ke spermatogenezi dochází v semenotvorných kanálcích varlat (Larson et al. 2018). Stěnu semenotvorných kanálků tvoří *lamina propria* a zárodečný epitel (Bergmann 2005), který obsahuje Sertoliho a zárodečné buňky ve všech fázích jejich vývoje. Sertoliho buňky podporují a regulují vývoj zárodečných buněk sekrecí růstových a dalších faktorů, jako je například laktát a pyruvát (Griswold 1995). Tyto faktory jsou důležité pro správnou funkci metabolismu zárodečných buněk (Aponte et al. 2005). Sertoliho buňky se také podílí na koordinaci diferenciaci zárodečných buněk, a to skrze produkci několika hormonů. Příkladem může být steroidní hormon estrogen, hormon inhibin či androgen vázající protein (ABP) (Larriva-Sahd et al. 1991; Maddocks et al. 1992; Vannelli et al. 1992). ABP reguluje lokální koncentraci androgenů v zárodečném epitelu (Vannelli et al. 1992; Lichnovský et al. 2001), váže a transportuje testosteron do semenotvorných kanálků a chrání jej i další steroidy před katabolickými ději (Bardin et al. 1981; Joseph 1994; Jeyaraj et al. 2005). Více než polovina vznikajících spermatogenních buněk dojde v různých stádiích své diferenciaci do fáze apoptózy. Rychlou fagocytózu apoptotických buněk zajišťují Sertoliho buňky, které takovéto buňky pohlcují a eliminují (Russell & Clermont 1977; Nakagawa et al. 2005). Mezi semenotvornými kanálky se nachází intersticiální tkáň obsahující krevní a lymfatické cévy, makrofágy a Leydigovy buňky, které produkují testosteron (Aponte et al. 2005). Testosteron se významně podílí na průběhu spermatogeneze a rozvoji sekundárních pohlavních znaků u samců (Ley & Leonard 1985). Spermatogeneze probíhá po celou dobu reprodukčního života samců (Russell et al. 1993; Suede et al. 2021). Vývoj spermie od spermatogoniální buňky po spermii trvá u savců od 30 do 75 dnů v závislosti na druhu (França et al. 2005). Délka spermatogeneze u prasete divokého i prasete domácího je přibližně 41 dnů (Amann & Schanbacher 1983; França & Cardoso 1998; Almeida et al. 2006).

Pro spermatocytogenezi je charakteristické mitotické i meiotické dělení, přičemž meiotické dělení se rozlišuje na dvě odlišná stádia: 1. meiotické dělení a 2. meiotické dělení (viz Obrázek 1) (Rodrigues & Sousa 2017). Po těchto dějích následuje finální proces, a to diferenciaci spermatid na spermie. Tento proces se nazývá spermiogeneze nebo také spermatohistogeneze (viz Obrázek 1) (Bergmann 2005).



**Obrázek 1: Spermatogeneze.** Schématické znázornění vývoje nediferenciované diploidní zárodečné buňky až do fáze haploidní zralé spermie. Spermatogonie se během mitotického dělení dělí na primární spermatocyty, které se po meiόze I stávají haploidními sekundárními spermatocyty. Během meiόzy II vznikají ze sekundárních spermatocytů spermatidy. V poslední fázi (spermiogenezi) se spermatidy diferencují na spermie (Převzato a upraveno z Rodrigues & Sousa 2017).

### 3.1.1 Spermatocytogeneze

Spermatocytogeneze zahrnuje mitotické dělení zárodečných buněk, vznik primárních spermatocytů a v průběhu meiotických dělení vznik haploidních sekundárních spermatocytů a spermatid (Johnson et al. 1997; Johnson et al. 2000). Tento proces trvá přibližně 16 dní (Slípka & Tonar 2019). Součástí spermatocytogeneze je fáze rozmnožování a růstu (Tichý et al. 2004).

## Období rozmnožování

Jako všechny somatické buňky v těle i spermatogonie mají diploidní sadu chromozomů. Na základě určitých funkčních vlastností se rozlišují spermatogonie na typ A a typ B. Spermatogonie typu A jsou neustále mitoticky aktivní a tvoří celoživotní zásobu kmenových buněk pro spermatogenezi. Některé z těchto typů buněk se dále diferencují na spermatogonie typu B. Spermatogonie typu B jsou také mitoticky aktivní, ale po dokončení buněčného dělení se pouze tento typ buněk posouvá do další fáze vývoje (Bergmann 2005), při kterém se během mitotického dělení diferencují na primární spermatocyty (Chłopik & Wysokińska 2019).

## Období růstu

Během období růstu se buňka nachází v prvním meiotickém dělení, konkrétně v profázi. Profáze tohoto dělení trvá oproti profázi klasické mitózy déle a dělí se do jednotlivých fází – leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze (Swierstra et al. 1974; Tichý et al. 2004). Charakteristické pro profázi I je párování homologních chromozomů (Otová & Mihalová 2012).

Profáze prvního meiotického dělení začíná nejprve leptotenním stádiem, kde dochází ke kondenzaci chromozomů do dvou sesterských chromatid u každého chromozomu (Snustad & Simmons 2017). U sesterských chromatid každého chromozomu se vytvoří axiální element (AE), který udržuje soudržnost sesterských chromatid (Baudat et al. 2000; Suja et al. 2000). V zygotenním stádiu dochází k párování homologních chromozomů tzv. synapsím, kdy k sobě chromozomy podélně přiléhají. V pachytenním stádiu jsou chromozomy více kondenzované a každý pár je tvořen dvěma duplikovanými chromozomy (Snustad & Simmons 2017). Mezi chromatidami chromozomů v pachytene dochází ke crossing-overu, během kterého si chromozomy vymění homologní úseky. Tento jev vede k různým kombinacím v rozložení genů na autozomálních chromozomech. Pro diplotenní stádium je charakteristické oddálení sdruženého páru chromozomů v bivalentu. Spojení chromozomů je v místě chiasm, kde došlo k jejich překřížení. Centromera stále spojuje sesterské chromatidy (Otová & Mihalová 2012). V diakinezi, což je poslední fáze profáze I, dochází k terminalizaci chiasm a k dokončení spiralizace chromozomů. V této fázi migrují bivalenty k jaderné membráně, která se postupně rozpadá (Sreekrishna 2000). V diakinezi dochází také k vytvoření dělicího vřeténka a chromozomy se srovnávají v ekvatoriální rovině, která je kolmá na osu dělicího vřeténka (Kallio et al. 1998; Snustad & Simmons 2017).

Po dokončené profázi I následuje metafáze, anafáze a telofáze prvního zracího dělení (Tichý et al. 2004). První meiotické dělení je dokončeno vznikem dvou haploidních sekundárních spermatocytů. Sekundární spermatocyty poté podstupují druhé meiotické dělení, které je obdobou klasické mitózy (Chłopik & Wysokińska 2019). Během tohoto dělení jsou od sebe chromatidy každého chromozomu odděleny a z každého sekundárního spermatocytu vznikají dvě kulaté spermatidy (Tichý et al. 2004; Bergmann 2005).

### 3.1.2 Spermioogeneze

Konečná fáze spermatogeneze, která zahrnuje produkci diferencovaných spermií, se nazývá spermioogeneze, nebo také spermatohistogeneze, či spermatelióza (Schultz & Leblond 1990; Suede et al. 2021). Spermioogeneze popisuje postmeiotický vývoj spermatid, který je v mnoha ohledech zcela jedinečný v porovnání s jinými buněčnými vývojovými procesy (Zhang et al. 2018).

Při přeměně na zralé spermie prochází spermatidy širokou škálou morfologických změn (Suede et al. 2021). Spermatidy v tomto období již neprodělávají žádné dělení, ale postupně dochází k jejich diferenciaci na spermie. Spermioogeneze je fáze, při které dochází k vývoji akrozomu a rozděluje se na čtyři fáze: Golgiho fáze, fáze akrozomální čepičky, akrozomální fáze (fáze kaudální manžety) a fáze maturace (Clermont & Leblond 1955). První Golgiho fáze zahrnuje vznik malých proakrozomálních vezikul. Tyto proakrozomální vezikuly se postupně spojují a vytváří velká akrozomální granula až vytvoří akrozomální váček (Russell et al. 1993; Konrádová et al. 2000). Během kondenzace chromatinu nahrazují většinu histonů přechodné proteiny (TP), které jsou poté z velké části nebo zcela úplně nahrazeny protaminy (Oliva & Dixon 1991; Wouters-Tyrou et al. 1998). Protaminy jsou malé kladně nabitě proteiny bohaté na arginin, které se vážou na DNA a zajišťují její větší kondenzaci (Grimes et al. 1977; Worawittayawong et al. 2008). K jednomu pólu buňky je zároveň odsunuto samotné jádro, které získává oploštělý a hruškovitý tvar (Konrádová et al. 2000). Ve druhé fázi akrozomální čepičky dochází ke zvětšení akrozomálních granul, která se začínají oplošťovat, rozšiřovat po přední části jádra a vytvářet akrozomální čepičku (Talbot & Kleve 1978). Ve třetí akrozomální fázi akrozom podstupuje kondenzaci a formuje se do finální zralé podoby. Několik cytoskeletárních proteinů včetně kalmodulinu či aktinu hraje důležitou roli v organizaci akrozomu (Camatini et al. 1992). U prodlužujících se spermatid dochází také k zahájení tvorby manžetových mikrotubulů a redukci objemu cytoplazmy (Ashman et al. 1992). Během této fáze také dochází ke změnám ve struktuře mitochondrií, nejprve se mitochondrie kulovitého tvaru kumulují ve střední části bičíku, kde poté nastává laterální prodlužování jejich struktury (Otani et al. 1988; Shimada et al. 2021). Diferenciace spermie je v poslední fázi maturace dále doprovázena prodlužováním bičíku a odstraňováním přebytečné cytoplazmy ze spermatid (Sakai & Yamashina 1989; Han et al. 2020). Zhuštěné jádro a přítomnost akrozomu poskytuje spermiím jedinečný tvar, který zlepšuje pohyb v samičím pohlavním traktu (Suede et al. 2021). Spermie v této fázi nejsou schopné se pohybovat. Schopnost pohybu spermie získají až v nadvarletí, kam jsou transportovány vývodními kanálky varlat (Slípka & Tonar 2019).

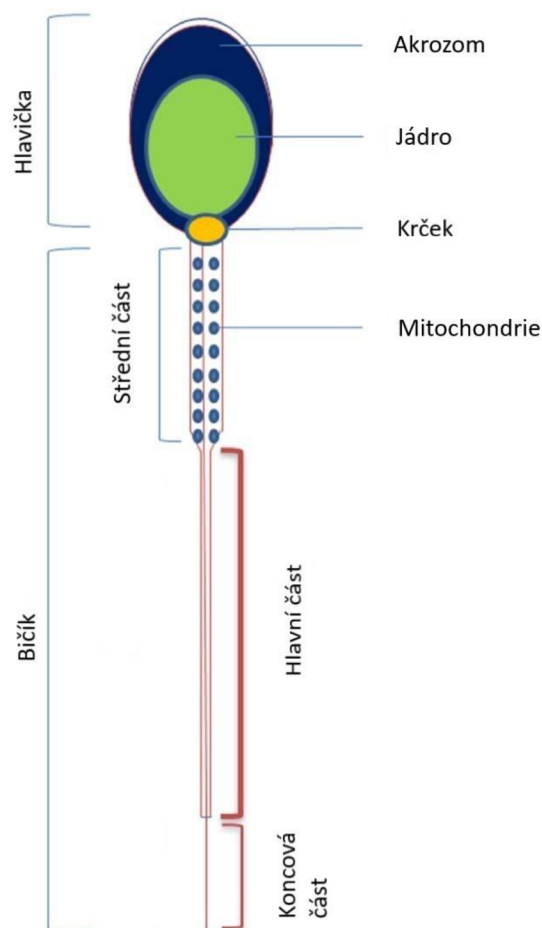
### 3.1.3 Neurohumorální regulace spermatogeneze

Pro zachování nepřetržité produkce spermií musí být zahájení spermatogeneze a její průběh koordinován a regulován. Vnější regulace spermatogeneze vyžaduje stimuly z hypotalamu a hypofýzy (Holstein et al. 2003). Hypofýza reaguje na signál vyslaný

z hypotalamu v podobě hormonů statinů či liberinů k zahájení uvolňování nebo potlačení sekrece hypofyzárních hormonů jako je například luteinizační hormon (LH) nebo folikulostimulační hormon (FSH) (Zolman & Valenta 1981). V případě uvolnění liberinu, gonadotropin releasing hormonu (GnRH) z hypotalamu, dojde k sekreci FSH nebo LH z adenohypofýzy. FSH je nezbytný pro tvorbu spermií během spermatogeneze, přispívá ke správnému vývoji varlat (Tapanainen et al. 1997) a společně s testosteronem působí na Sertoliho buňky (Griswold 1995). LH stimuluje Leydigovy buňky k produkci testosteronu (Gordon et al. 1989). Testosteron má významný vliv jak na zahájení, průběh a udržení spermatogeneze, tak i na další buněčné procesy probíhající v celém těle (Suede et al. 2021), například stimuluje proliferaci svalových buněk (Campelo et al. 2012). Testosteron je dále zásadní pro vývoj samčích pohlavních orgánů, tvorbu sekundárních pohlavních znaků jako je například maskulinizace (Scadding 1978), podílí se také na sexuálním chování, zvýšení fyzické výkonnosti (Page et al. 2005) a poskytuje negativní zpětnou vazbu hypofýze. Hladiny testosteronu regulují hypofyzární činnost, která může souviset se sekreční aktivitou Leydigových buněk (Ergün et al. 1994; Holstein et al. 2003). Při nadbytku koncentrace testosteronu v těle dostává hypofýza humorální signál, což vede k potlačení jeho sekrece (Krey et al. 1978). Leydigovy buňky vylučují kromě steroidů také několik dalších faktorů, včetně  $\beta$ -endorfinu, který se podílí na regulaci funkce a proliferaci Sertoliho buněk (França et al. 2005). Sertoliho buňky jsou do regulace spermatogeneze zapojeny sekrecí proteinu vázajícího testosteron (ABP) (Hagenäs et al. 1975) a uvolňováním hormonu inhibinu (Le Gac & de Kretser 1982). ABP udržuje vysoké hladiny testosteronu (Dohle et al. 2003) a podílí se na zrání spermií (Esteban et al. 1997). Spermatogeneze je také u některých druhů zvířat ovlivněna délkou světelných dnů během roku. U koz a ovcí dochází k sezónní autofagii Sertoliho buněk, což významně reguluje proces spermatogeneze a produkce spermií je na podzim výrazně vyšší (Barkawi et al. 2006; Xi et al. 2021). Hlavní hormon reagující na délku světelného dne je melatonin uvolňovaný epifýzou, který stimuluje uvolňování gonadotropinů FSH a LH (Schanbacher & Ford 1979; Chemineau et al. 1992; Martin et al. 2012).

### 3.2 Spermie

Spermie jsou pohlavní buňky, které se morfoloicky člení na hlavičku, krček a bičík (viz Obrázek 2). Takto zralé diferencované spermie jsou ohraničené souvislou plazmatickou membránou (Mortimer 2018). Plazmatická membrána spermie obsahuje velké množství fosfolipidů, cholesterol a glykoproteiny. Proteiny plazmatické membrány plní řadu funkcí, například funkci receptorů, iontových kanálů či strukturní (Chłopik & Wysokińska 2019). Morfologie spermií je značně variabilní v závislosti na živočišném druhu. Pro každý živočišný druh existují určité anatomické normy pro tvar hlavičky, nebo délku spermie. Například délka kančích i lidských spermií se pohybuje okolo 50–60  $\mu\text{m}$ , býčí spermie dosahují délky 70–90  $\mu\text{m}$  (Gage & Freckleton 2003; Pesch & Bergmann 2006).



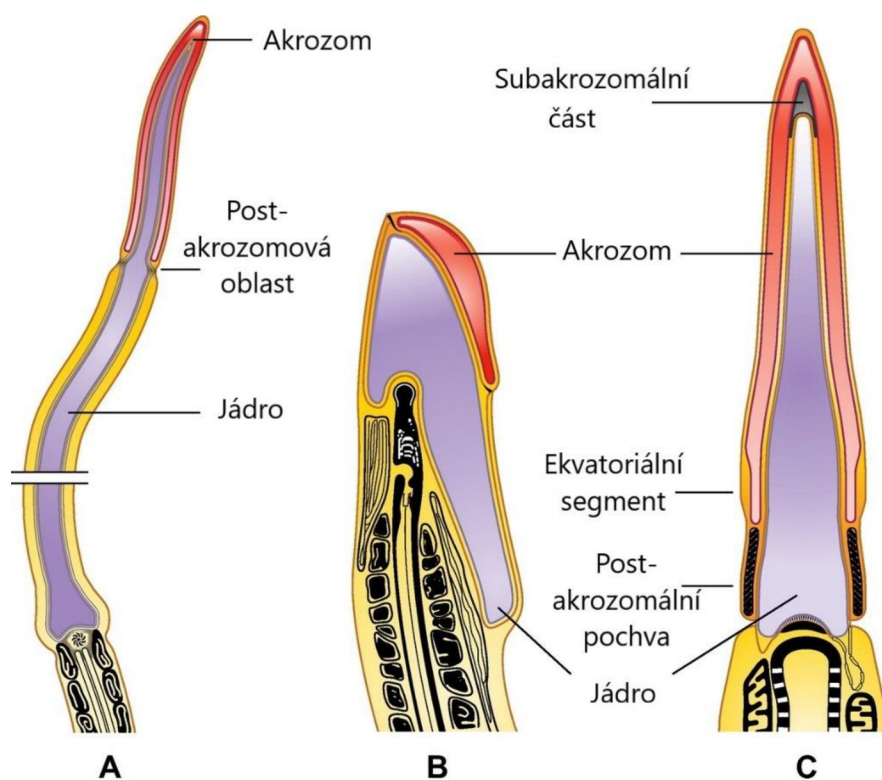
**Obrázek 2: Anatomická struktura spermie (Převzato a upraveno z Singh & Rajender 2015).**

### 3.2.1 Hlavička

Struktura a tvar hlavičky vykazuje vysokou druhovou specifitu (Pesch & Bergmann 2006), ale rozdíly ve velikostech hlavičky jsou patrné také mezi jedinci stejného druhu (Saravia et al. 2007). Tvary a velikosti hlavičky u kanců jsou specifické i pro jednotlivá plemena prasat, například plemeno Landrace má větší, protáhlejší hlavičky spermii a celkový poměr velikosti hlavičky k délce bičíku je menší než u plemene Large white (Górski et al. 2021). Obecně tvar kančích spermii je podlouhlý a oválný, jako je tomu například také u býků (Yagi & Paranko 1995).

Hlavička spermie obsahuje akrozom, který pokrývá 30–60 % přední části hlavičky spermie (viz Obrázek 3) (Danis & Samplaski 2019). Akrozom je tvarově a velikostí také druhově specifický. Velikost akrozomu u býka je menší než u kance. Býčí akrozom je malý a krátký, u kance je velký, podélný s výraznou křivkou ekvatoriálního segmentu (Pesch & Bergmann 2006; Yániz et al. 2016). Akrozom vzniká z Golgiho aparátu, který během spermiogeneze vytváří drobné proakrozomální vezikuly, které jsou potřebné pro formování zralého akrozomu (Leblond & Clermont 1952; Khawar et al. 2019). Akrozom obsahuje enzymy klíčové pro průnik do vajíčka skrz *zonu pellucidu* (Mortimer 2018). Mezi významné enzymy akrozomu patří

například serinová proteáza akrosin, glykosidasa, hyaluronidáza, neuraminidáza a mnoho dalších hydroláz, esteráz či fosfatáz (Fernandes & Bao 1998; Pesch & Bergmann 2006). Akrosin jako jeden z nejvýznamnějších enzymů akrozomu ovlivňuje nejen motilitu spermií, ale také rozrušení akrozomální matrix při akrozomální reakci, hraje roli při vazbě spermie na *zona pellucida* a napomáhá štěpení *zony pellucidy* před fúzí gamet (Salling 1989; Tranter et al. 2000; Jiang et al. 2011). Enzym hyaluronidáza jinak označován jako PH-20 nebo SPAM1 je lokalizován jak na plazmatické membráně, tak ve vnitřní akrozomální membráně spermie (Myles & Primakoff 1997; Martin-DeLeon 2006). Hyaluronidáza specificky štěpí kyselinu hyaluronovou, která je obsažena v *zoně pellucidě*, čímž napomáhá penetraci a oplodnění oocyty (Camaioni et al. 1996). Další důležité enzymy s glykohydrolázovou aktivitou, které jsou součástí akrozomu, jsou například  $\beta$ -galaktosidáza,  $\alpha$ -L-fukosidáza, manosidázy nebo A, B, C aryl sulfatázy (Tulsiani et al. 1998). Akrozom se dělí na větší anteriorní segment, který podstupuje akrozomální reakci a zadní část „ekvatoriálního segmentu“, který ji nepodstupuje. Ekvatoriální segment později hraje významnou roli při fúzi gamet, je to místo, kterým se spermie přímo váže na plazmatickou membránu oocyty. Spermie bez ekvatoriálního segmentu tak nemůže oocyt oplodnit (Inoue et al. 2010; Mortimer 2018).



**Obrázek 3: Struktura hlavičky spermie.** A) vejcorodí B) vačnatí C) placentálové (Převzato a upraveno z Teves & Roldan 2022).

V hlavičce spermie je dále jádro, které obsahuje vysoce kondenzovaný chromatin (Rehfeld et al. 2017). Chromatin disponuje histony, které jsou navázané na DNA. Histony jsou z velké části ve fázi spermiogeneze nahrazeny protaminy, které plní ochrannou funkci a díky

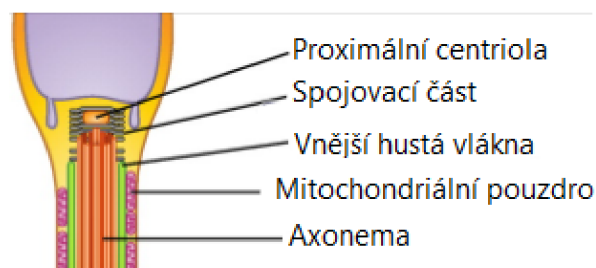


tvorbě disulfidických vazeb zajišťují stabilitu pro DNA a ochranu před jejím poškozením (Mortimer 2018). Také tvar jádra je druhově specifický, u většiny savců je obvykle dorzoventrálně zploštělé (Pesch & Bergmann 2006). Hlavní úlohou hlavičky spermie je přenos genetické informace lokalizované v jádře spermie do vajíčka (Gibbons et al. 1985).

Součástí hlavičky je dále cytoplazma a v zadní části hlavičky se nachází centrozóm (Rehfeld et al. 2017). Strukturu hlavičky spermie doplňuje také cytoskelet, který se skládá z odolných strukturních proteinů jádra a perinukleární théky, které se společně podílí na tvarování jádra (Longo & Cook 1991). Obecně se mezi cytoskeletární proteiny řadí aktin, proteiny vázající aktin (například spektrin) nebo různé druhy tubulinů ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -tubulin) (Virtanen et al. 1984). U spermii se řada cytoskeletárních proteinů podílí na klíčových událostech, jako je kapacitace a akrozomální reakce (Dvořáková et al. 2005).

### 3.2.2 Krček

Krček plní spojovací funkci a propouje hlavičku s bičkem. Krček mechanicky podpírá hlavičku spermie a zprostředkovává koordinaci pohybu (Zhu 2020). Nachází se v něm centrozóm, který se skládá z páru centriol, a to z proximální a distální centrioly (viz Obrázek 4) (Callaini & Riparbelli 1990; Rehfeld et al. 2017). Funkcí centriol je nejen mechanicky propojovat hlavičku a bičík, ale po fertilizaci se také podílí na organizaci cytoskeletu zygoty (Rattner 1972; Avidor-Reiss et al. 2020). V oblasti krčku je také velká zásoba  $\text{Ca}^{2+}$ . Přítomný je zde také inositoltrifosfátový receptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ), který po aktivaci inositoltrifosfátem ( $\text{IP}_3$ ) funguje jako výměňkový vápníkový kanál (Ho & Suarez 2001).

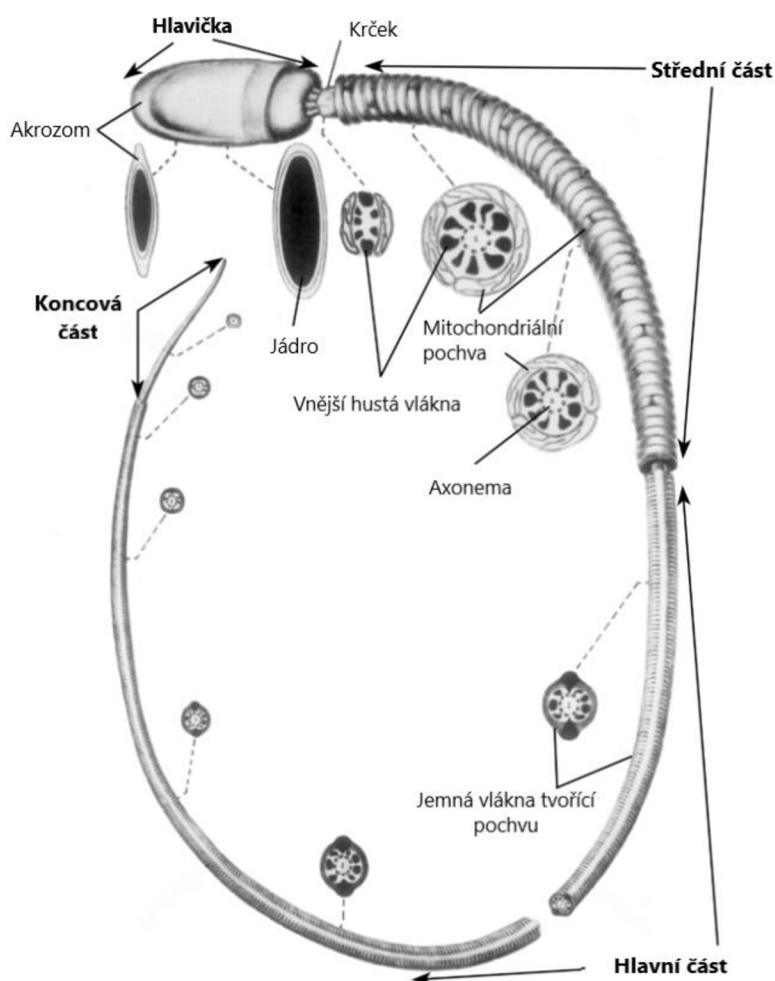


**Obrázek 4: Podélný řez krčkem a střední částí bičíku (Převzato a upraveno z Teves & Roldan 2022).**

### 3.2.3 Bičík

Základní funkcí bičíku spermie je zajištění schopnosti pohybu (Machin 1963). Bičík se skládá ze střední, hlavní a koncové části a po celé jeho délce je vyztužen axonemou, která se táhne od jeho střední až po koncovou část (Fawcett 1975; Rehfeld et al. 2017). Bičík je složen z dalších cytoskeletárních struktur, a to z vnějších hustých vláken, která se vyskytují ve střední a hlavní části bičíku, a jemných vláken obklopujících vnější hustá vlákna a tvořících

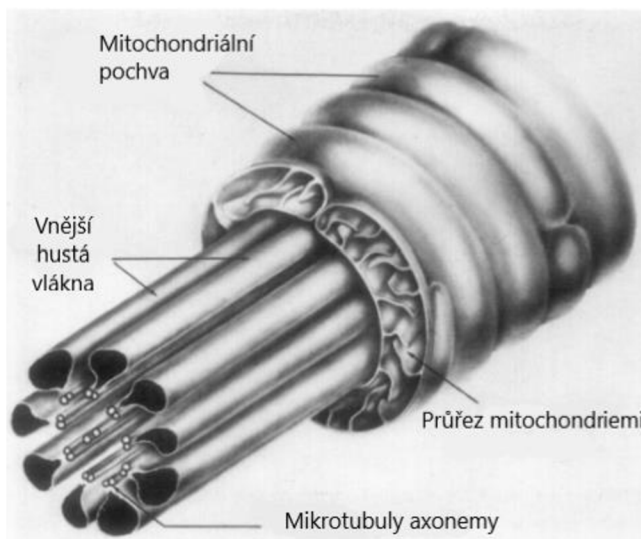
pochvu hlavní části bičíku (viz Obrázek 5) (Escalier & David 1984; Ferrer et al. 2013). Vnější hustá vlákna udržují elasticitu bičíku a chrání ho před vnějšími vlivy při transportu z epididymu a během ejakulace (Baltz et al. 1990).



**Obrázek 5: Příčné řezy spermii savčí spermie (Převzato a upraveno z Fawcett 1975).**

Střední částí prochází celkem devět vnějších hustých vláken, přičemž každé je spojeno se specifickým mikrotubulovým dubletem axonemy (viz Obrázek 6) (Oko 1988). Součástí vnějších hustých vláken u savčích druhů je více než 14 proteinů z rodiny ODF (ODF1-4), dále proteiny rodiny antigenů asociovaných se spermii (Spag) či proteiny rodiny Tektinů (Rivkin et al. 2008; Zhao et al. 2018). Jemná vlákna tvořící pochvu slouží jako lešení pro glykolytické enzymy, které poskytují energii pro hyperaktivaci motility. Další funkcí jemných vláken tvořících pochvu je samotná regulace motility spermii (Eddy et al. 2003). Tento vláknitý obal ovlivňuje pohyb a pružnost bičíku, a tím i tvar bičíkové vlny. Zhruba polovina proteinů, které jsou součástí jemných vláken tvořících pochvu, jsou A-kinázové kotvící proteiny (AKAP). Zejména protein AKAP4 je důležitou součástí této vláknité struktury, je potřebný pro přenos signálu mezi proteiny a enzymy a nepostradatelný pro správnou funkci bičíku (Miki et al. 2002). Dalšími proteiny jemných vláken tvořících pochvu jsou AKAP3, ropporin, rhopilin nebo

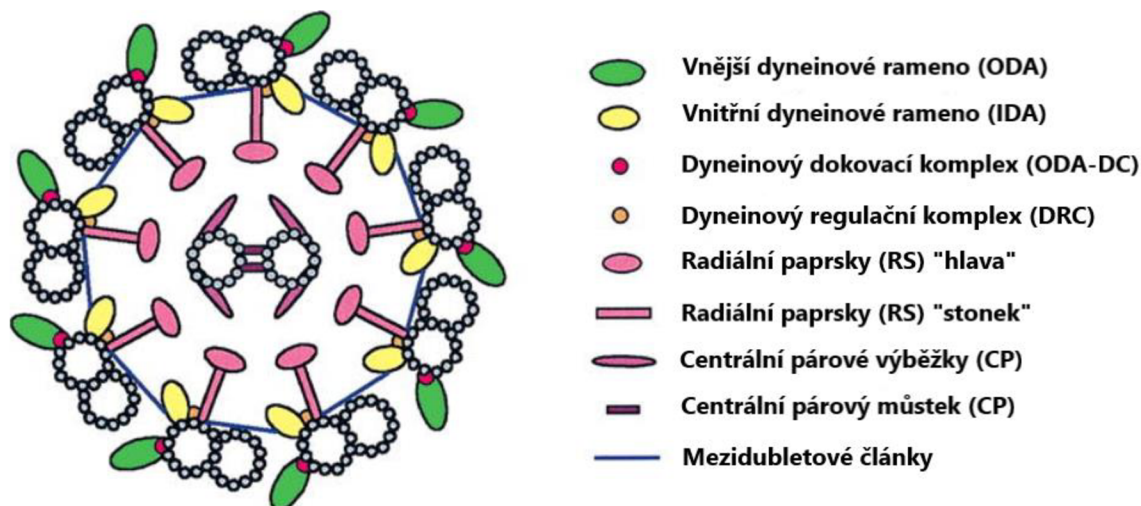
GAPDS proteiny nalezené v krysích spermiiích (Eddy et al. 2003). Střední část bičíku je obklopena dvojitou šroubovitou spirálou mitochondrií (Ankel-Simons & Cummins 1996). Množství mitochondrií ve střední části bičíku u spermii se liší mezi jednotlivými obratlovci, například savci oproti rybám mají větší počet mitochondrií (Lahnsteiner 2003). Mitochondriální pochva je bohatá na selen (Ursini et al. 1999) a specifické proteiny, jako je cytochrom c nebo enzymy laktátdehydrogenáza či E1-pyruvátdekarboxyláza (Goldberg 1963; Hess et al. 1993; Deburgos et al. 1994). Hlavní část bičíku tvoří přibližně  $\frac{3}{4}$  délky spermie (Rehfeld et al. 2017) a celý bičík zakončuje koncová část, která obsahuje pouze axonemu obklopenou plazmatickou membránou (Linck et al. 1981).



**Obrázek 6: Střední část bičíku – mitochondriální pochva** (Převzato a upraveno z Fawcett 1975).

### 3.3 Motilita spermii

Motilita spermii je klíčová pro zajištění procesu oplodnění. Aktivace motility je ovlivněna iontovými změnami na úrovni spermie či v rámci samičího reprodukčního traktu (Babcock et al. 1983; Morisawa 1994). Tyto faktory ovlivňují jak pohybový aparát spermie, tak její energetický metabolismus. Pohybový aparát je lokalizován v bičíku spermie a skládá se z vysoce organizované struktury (Gardner et al. 1994; Gallo et al. 2021). Aparát má strukturu založenou na axonemě, která se skládá z mikrotubulů a je tvořena až 250 proteiny (Inaba 2003). Axonema je konstruována z devíti dubletových mikrotubulů a dvou singletových mikrotubulů (Phillips 1969). Síla pro pohyb bičíku je vyvíjena klouzáním vnějších dvojitých mikrotubulů poháněných proteinovými molekulárními motory – dyneiny (Burns & Pollard 1974). Každý dubletový mikrotubul je jednotkou s dyneinovými rameny, dyneinovým dokovacím komplexem, radiálními paprsky a dyneinovým regulačním komplexem. Devět dubletových mikrotubulů je vzájemně propojeno mezidubletovými články. Singletové mikrotubuly ve středu jsou spojeny centrálním párovým můstkem. Každý mikrotubul má dva centrální párové výběžky (viz Obrázek 7) (Baccetti et al. 1979; Inaba 2003).



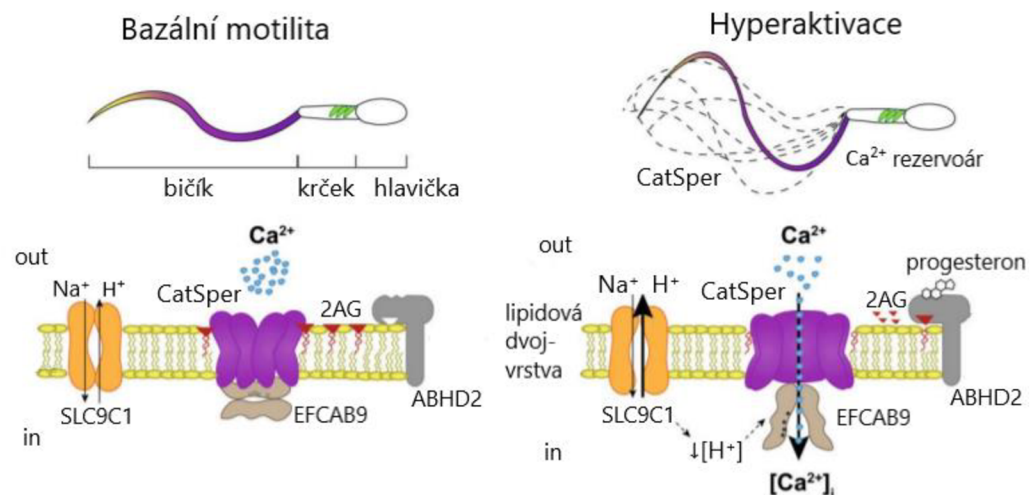
**Obrázek 7: Pohybový aparát bičíku – struktura axonemy (Převzato a upraveno z Inaba 2003).**

S rozvojem vysoce pokročilých technik v sekvenování genů během posledních dvou desetiletí bylo popsáno několik genů, které jsou zapojené do řízení motility spermií. Téměř všechny proteiny kódované těmito geny se nacházejí v bičíku spermie a dělí se do různých tříd. Jednou z nich jsou membránové proteiny, které slouží k výměně iontů. Mezi ně patří například multiproteinový komplex CatSper1 a CatSper2 (Quill et al. 2001; Ren et al. 2001). Další třídou jsou cytoskeletární proteiny, kam se řadí Tektin-t nebo SPAG6 (Sapiro et al. 2002; Tanaka et al. 2004). Do třídy glykolytických enzymů patří fosfoglycerátkináza 2 (PGK2) a součástí buněčných signálních proteinů je protein kalmodulin či protein AKAP4 (Ahmad et al. 2009; Ma et al. 2017).

Po opuštění varlat jsou všechny savčí spermie neschopné pohybu (Varano et al. 2008). Schopnost pohybu spermie získávají během průchodu epididymem. Většina kančích epididymálních spermií získává motilitu v oblasti těla a ocasu nadvarlete (Hurtado de Llera et al. 2016).

Motilitu spermií lze rozdělit na dva typy: pohyb vpřed a hyperaktivovaný pohyb (Fraser 1983; Quill et al. 2011). Pohyb vpřed v samičím reprodukčním traktu umožňuje spermiím oddělit se od semenné plazmy a aktivně prostupovat reprodukčním traktem (Ivanova-Kicheva et al. 2012). Zatímco hyperaktivace pohybu, která se objevuje během kapacitace, je nezbytná pro samotný proces oplození vajíčka (Boatman & Robbins 1991). Hyperaktivace zcela mění charakter pohybu spermie a je charakterizována dynamičtějším a asymetrickým pohybem bičíku (Aoki et al. 1994). Takový pohyb je důležitý pro průnik spermie přes *cumulus oophorus* a *zonu pellucidu* oocytu (Katz et al. 1989; Luconi 2011). Do regulace hypermotility je zapojen kanál CatSper, který reguluje proudění vápníkových iontů (Lehti & Sironen 2017). Progesteronem indukovaná aktivace CatSper v alkalickém prostředí umožňuje rychlý přísun  $Ca^{2+}$  (Strünker et al. 2011). Toto působení progesteronu na CatSper je zprostředkováno proteinem ABHD2. CatSper kanál je dále ovlivněn SLC9C1 kanálem, který slouží k výměně sodíkových a vodíkových iontů (Windler et al. 2018). SLC9C1 zajistí eflux vodíkových iontů

a příjem sodíkových iontů, na což CatSper reaguje také. Poté, co se progesteron naváže na receptor proteinu ABHD2, dojde k degradaci esteru endokanabinoid 2-arachodonoylglycerolu (2AG) (Miller et al. 2016). 2AG se uvolní, dojde k otevření CatSper kanálu, čímž se iniciuje hyperaktivace (viz Obrázek 8) (Trebichalská & Holubcová 2020).



**Obrázek 8: Změna motility z bazální na hyperaktivovanou vlivem signalizace  $Ca^{2+}$**  (Převzato a upraveno z Trebichalská & Holubcová 2020).

Vápník jakožto jeden z nejdůležitějších iontů regulující motilitu spermií je v pohybu spermií nepostradatelný. Po zvýšení hladin intracelulárního vápníku ve spermii dochází k aktivaci fosfolipáz a dalších enzymů (Varano et al. 2008), což nakonec vede ke zvýšení cAMP a fosforylaci proteinů (Luconi 2006).

Významným procesem v motilitě spermií je glykolýza, díky které spermie získává energii pro pohyb bičíku. Pohyb bičíku vyžaduje také dostatečný přísun energie ve formě ATP (Turner 2006). Podstatným zdrojem ATP nezbytným pro udržení pohybu bičíku jsou mitochondrie, které produkují ATP prostřednictvím oxidativní fosforylace (Westhoff & Kamp 1997). Změny ve struktuře a funkci mitochondrií mohou vést ke snížené funkci motility (Gallo et al. 2021).

### 3.4 Kapacitace

Proces kapacitace je velmi složitý a zahrnuje řadu strukturních a funkčních změn spermií, včetně modifikace membrány, změn v enzymové aktivitě a fosforylaci proteinů (Ferramosca & Zara 2014). Bezprostředně po ejakulaci nemají spermie savců schopnost oplodnit oocyt (Chang 1955) a tuto schopnost spermie získá až během procesu kapacitace. Kapacitace probíhá *in vivo* v reprodukčním traktu samice nebo ji lze navodit *in vitro* v kapacitačním médiu (De Jonge 2005). Kapacitace je navíc spojena s procesem hyperaktivace pohybu spermií, která je charakterizována zvýšeným pohybem bičíku spermie, změnou

motility, která napomáhá spermii v pohybu oviduktem a průniku *zonou pellucidou* oocytu (Ferramosca & Zara 2014).

Během kapacitace spermii dochází v membráně spermie k mnoha změnám, například ke zvýšení fluidity membrány, efluxu cholesterolu do extracelulárního prostředí (Molina et al. 2018), nebo k její hyperpolarizaci (Fraser 1995).

Dochází také ke změnám v koncentraci intracelulárních iontů nebo zvýšení intracelulárního pH. Do těchto událostí je také zapojena cAMP/PKA signální kaskáda (Martínez-León et al. 2015).

Nekapacitované spermie vykazují větší schopnost vázat se na epitel oviduktu v isthmické oblasti, což zaručuje udržení životaschopnosti spermii, plodnosti a zpomaluje proces destabilizace plazmatické membrány a pohyblivost buněk (Lefebvre & Suarez 1996). Spermie jsou vázány v této oblasti nazývané také jako oviduktální rezervoár do doby, než nastane doba ovulace vajíčka (Wilmot & Hunter 1984). Další funkcí oviduktálního rezervoáru je selekce spermii s nejlepšími morfologickými vlastnostmi (Suarez 2008). Během kapacitace dochází k uvolňování vazeb mezi spermii a oviduktálním epitelem a zároveň dochází ke snížení životaschopnosti spermii (Petrunkina et al. 2003).

### 3.4.1 Cholesterolový eflux

Jednou z prvních změn v průběhu kapacitace spermii je ztráta cholesterolu z plazmatické membrány spermie – jinak označována jako eflux cholesterolu (Aitken & Nixon 2013). Steroly, včetně cholesterolu, nejsou po plazmatické membráně spermie distribuovány rovnoměrně, ale nejvíce jsou koncentrovány v plazmatické membráně v předních oblastech hlavičky překrývající akrozom, méně už v zadní části hlavičky a v bičíku (Suzuki 1988). Tyto steroly, jako je cholesterol nebo desmosterol, jsou z povrchu spermie odstraněny proteinovými molekulami. Mezi takové proteinové molekuly patří například albumin nebo lipoproteiny (Flesch et al. 2001). Albumin a lipoproteiny jsou ve velké míře zastoupené v oviduktální tekutině (Ehrenwald et al. 1990). Z toho důvodu je albumin velmi podstatnou složkou *in vitro* kapacitačního média (Aitken & Nixon 2013). Pro kapacitaci spermii savců je často využíván bovinní sérový albumin (BSA), který vyvazuje cholesterol z plazmatické membrány (Visconti & Kopf 1998). Další molekulou, která může podporovat eflux cholesterolu z membrány je  $\beta$ -cyklodextrin (Visconti et al. 1999).

Cholesterol je výrazným dekapacitačním faktorem, který slouží ke stabilizaci plazmatické membrány spermii během epididymálního tranzitu a brání mezimolekulárním interakcím před předčasnou kapacitací (Davis & Bilayer 2009). Cholesterolový eflux tak zvyšuje permeabilitu membrány, čímž dochází ke změnám funkcí mnoha proteinů, iontových kanálů a enzymů plazmatické membrány (Gadella & Harrison 2002; Rajoriya et al. 2020).

### 3.4.2 Změna v koncentraci vápenatých iontů

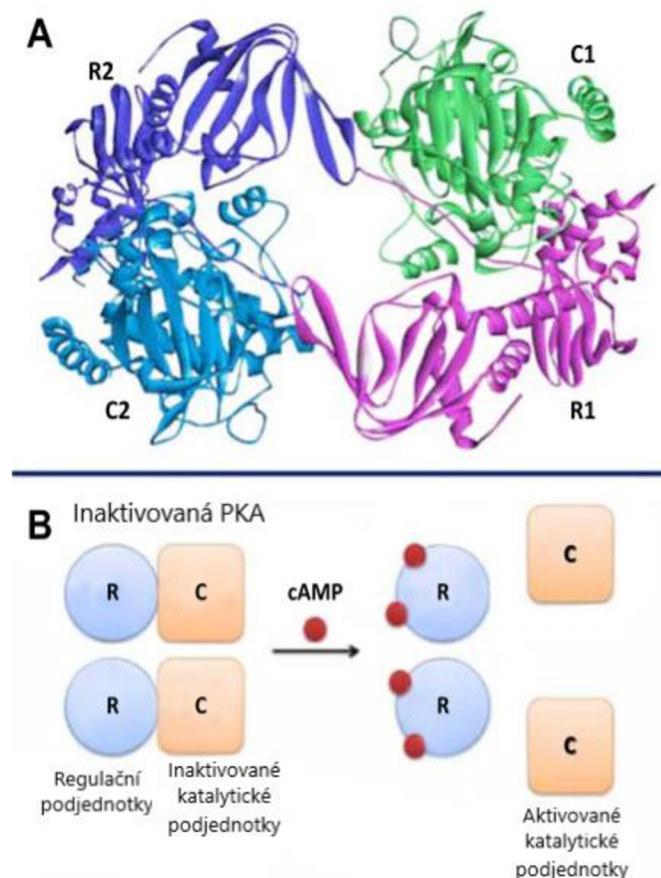
Během kapacitace spermií dochází u savčích spermií ke zvýšení hladiny vápenatých iontů (Molina et al. 2018; Baro Graf et al. 2020). Influx vápenatých iontů je klíčovým mechanismem pro aktivaci signálních kaskád, které regulují motilitu a hyperaktivaci spermií, a tím spouští celou řadu funkčního chování spermie (Jin & Yang 2017). Vápenaté ionty se také mohou vázat na membránové fosfolipidy a enzymy, čímž modifikují vlastnosti plazmatické membrány a enzymatickou aktivitu (Parks & Hammerstedt 1985; Boerke et al. 2008). Hladinu vápníku reguluje řada pump a kanálů, které se nachází na plazmatické membráně spermií. Mezi nejznámější vápníkové kanály patří kanály CatSper (Molina et al. 2018), které jsou lokalizovány v hlavní části bičíku spermie. Jejich další rolí je regulace hyperaktivace (Ren et al. 2001; Jin & Yang 2017). Zvýšení hladin intracelulárního vápníku a ovlivnění CatSper kanálů může vyvolat také změna pH, alkalizace totiž vede k vyšší aktivitě tohoto kanálu (Lishko et al. 2011).

### 3.4.3 cAMP/PKA signální kaskáda

Cyklický adenosinmonofosfát neboli cAMP je pro kapacitaci nezbytný a dochází při ní ke zvýšení jeho koncentrace (Baro Graf et al. 2020). Jeho funkcí je aktivace proteinkinázy A (PKA), která následně fosforyluje cílové proteiny (Visconti et al. 1995; Martínez-León et al. 2015). cAMP interaguje s mnoha různými molekulami důležitými pro regulaci kapacitace, některé studie uvádějí jeho aktivaci závislou na bikarbonátu (Battistone et al. 2013; Jin & Yang 2017). Koncentrace cAMP je regulována prostřednictvím dvou enzymů: adenylátcyklázy (AC) (Morton & Albagli 1973), která zajišťuje jeho syntézu z ATP, a fosfodiesterázy (PDE), která cAMP degraduje. PDE hydrolyzují cAMP na 5'-adenosinmonofosfát (AMP) (Conti & Beavo 2007). Jednotlivé fosfatázy fosfodiesterázové rodiny se mohou dělit do skupin podle jejich specifity na: štěpící cAMP (PDE4, 7 a 8), štěpící cyklický guanosinmonofosfát cGMP (PDE5, 6 a 9) nebo štěpí cAMP i cGMP (PDE1, 2, 3, 10 a 11) (Soderling & Beavo 2000). S tím souvisí i možnost využití nespecifických inhibitorů PDE, jako je například kofein nebo naopak specifických inhibitorů PDE, mezi které patří například sildenafil. Tyto inhibitory mohou ovlivňovat a regulovat zahájení i průběh celé cAMP/PKA signální dráhy (Ioki et al. 2016). Ve spermiích obratlovců dochází k syntéze cAMP prostřednictvím dvou typů adenylátcykláz: adenylátcyklázy vázané na plazmatickou membránu (tmAC) a solubilní (intracelulární) adenylátcyklázy (sAC) (Buck et al. 1999; Amer & Hebert-Chatelain 2018). První zmíněné AC jsou regulovány G-proteinem a forskolinem, sAC jsou aktivovány vápenatými ionty, bikarbonátem (Forte et al. 1983) a ATP (Jaiswal & Conti 2011). Intracelulární sAC jsou distribuovány do různých míst v celé buňce, včetně jader, mitochondrií, centriol a dělicího vřeténka (Zippin et al. 2002).

Protein kináza A je heterotetramer složený ze dvou katalytických podjednotek C a dvou regulačních podjednotek R (viz Obrázek 9) (Bramson et al. 1984; Taylor et al. 1990). Katalytické podjednotky PKA-C se spojují s regulačními podjednotkami PKA-R do komplexu holoenzymu

(Carr et al. 1992; Baro Graf et al. 2020). PKA má svou specifičnost v mechanismu její aktivace, která zahrnuje jednoduchou disociaci R a C podjednotek po navázání cAMP na regulační podjednotky (viz Obrázek 9). Díky tomuto navázání cAMP se katalytické podjednotky C uvolní, difundují po celé buňce a fosforylují proteinové substráty obsahující konsenzuální fosforylační motivy (Amieux et al. 2002). První regulační podjednotka PKA-RI je v *in vitro* čtyřikrát citlivější vůči cAMP než PKA-RII. Oba tyto typy regulačních podjednotek mají vazebné místo pro proteiny AKAP (Baro Graf et al. 2020). Každá regulační podjednotka RI i RII má izoformy dvojího typu, RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$  a RII $\beta$  (Cadd & Stanley McKnight 1989). Většina AKAP proteinů obsahuje rozpoznatelnou sekvenci, která tvoří vazebné místo pro podjednotky R (Carnegie et al. 2009).



**Obrázek 9: Struktura PKA a její aktivace. A)** Katalytické podjednotky C1 (zelená) a C2 (světle modrá) a regulační podjednotky R1 (růžová) a R2 (tmavě modrá). **B)** aktivace PKA pomocí cAMP (Převzato a upraveno z Sakkiah et al. 2017).

PKA reguluje více signálních drah, které závisí na její přesné aktivaci (Baro Graf et al. 2020). PKA je například zodpovědná za regulaci velkého množství buněčných fyziologických procesů, od udržování bazální transkripce specifických genů, přes ovlivnění sekrece inzulínu, až k rychlé reorganizaci cytoskeletu (Walsh et al. 1992; Liu et al. 2006). Fosforylace substrátů PKA je kritická pro různé buněčné procesy, včetně metabolismu, diferenciaci, synaptického přenosu nebo aktivity iontových kanálů (Taylor et al. 1992). Počet a výskyt proteinových substrátů fosforylovaných PKA je velmi vysoký a rozmanitý, tyto substráty se vyskytují



v jádrech, cytoplasmě i plazmatických membránách buněk (Walsh et al. 1992). Podjednotky PKA jsou odlišně exprimovány ve spermatogoniích, spermatocytech a spermatidách, což poukazuje na vliv PKA při signalizaci během procesů mitózy, meiózy či spermiogeneze (Baro Graf et al. 2020). PKA hraje roli také v regulaci motility spermií a zprostředkovává světlem indukovanou hyperaktivovanou motilitu (HAM), čímž přispívá ke zvýšení oplozeníschopnosti spermie (Shahar et al. 2011; Ickowicz et al. 2012).

### 3.5 Akrozomální reakce

Aby mohlo dojít k oplození vajíčka spermií, musí již kapacitované spermie podstoupit akrozomální reakci (Rubinstein & Breitbart 1991). Mezi induktory akrozomální reakce patří *zona pellucida*, folikulární tekutina nebo progesteron (Hardy & Garbers 1993; Brucker et al. 1994; Bravo & Valdivia 2018). Akrozomální reakce zahrnuje mnohočetné fúze plazmatické membrány a vnější akrozomální membrány spermie (Breitbart et al. 2010). Před samotnou fúzí dochází k tzv. tetheringu (úzkému kontaktu) a adhezi membrán (Tomes et al. 2005). Následkem fúze těchto membrán dochází k uvolnění obsahu akrozomu, a tím i k obnažení vnitřních akrozomálních membránových domén (Brener et al. 2003). Významnými proteiny působící v interakci těchto membrán jsou proteiny z rodiny SNARE (Kierszenbaum 2000). Další důležité proteiny hrající roli v akrozomální reakci jsou proteiny z rodiny Rab. Konkrétně různé izoformy proteinů Rab3 mohou akrozomální reakci regulovat (Ohnishi et al. 1997) či působit jako její inhibitory (Iida et al. 1999). Akrozomální reakce také vyžaduje dostatek  $Ca^{2+}$  iontů (Hirohashi & Yanagimachi 2018) a v průběhu celého procesu dochází ke zvýšení jejich hladin uvnitř spermie (Darszon et al. 1999). Během akrozomální reakce také dochází ke zvýšení intracelulárního pH (Nishigaki et al. 2014). Obsah akrozomu zahrnuje různé proteiny nutné pro následnou fúzi gamet (Florman et al. 1989). Akrozom obsahuje především hydrolytické enzymy, které dispergují *zonu pellucidu* (Flesch & Gadella 2000). Typické pro akrozom jsou některé glykohydrolázy, které jsou podobné enzymům přítomným v lysozomech nebo enzymům specifickým pouze pro spermie jako jsou například akrosin, hyaluronidáza nebo neuraminidáza (Tulsiani et al. 1998). Do degradace proteinů na povrchu *zóny pellucidy* může být zapojen také ubiquitin-proteazómový systém (UPS). Ubiquitin i proteazómové jednotky jsou obsaženy v akrozomu spermie a po jeho exocytóze dokážou účinně cílit na glykoproteiny *zóny pellucidy* (Sutovsky et al. 2000; Sutovsky et al. 2004).

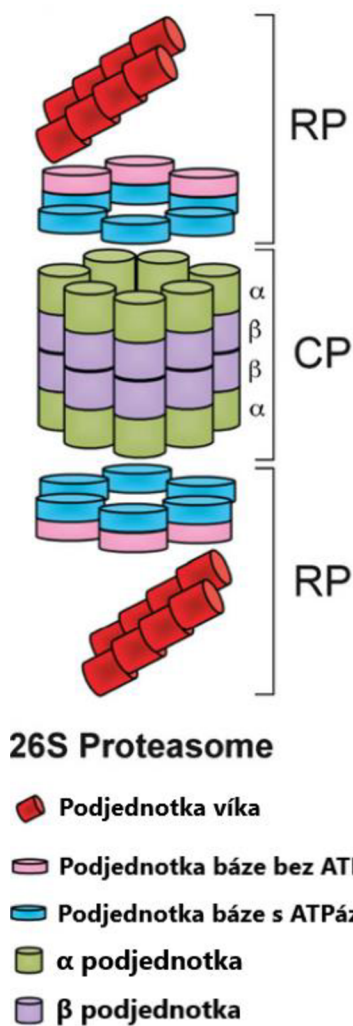
### 3.6 Ubiquitin-proteazómový systém

U savců existují dva hlavní degradační proteolytické systémy: autofagie pomocí lysozomu a ubiquitin-proteazómový systém (UPS) (Kwon & Ciechanover 2017). UPS je významným mechanismem degradující proteiny, zajišťuje degradaci mutantních, poškozených, či nesprávně strukturovaných proteinů (Kisselev & Goldberg 2001), kontroluje

buněčný cyklus, genovou transkripci či opravy DNA. UPS se řadí mezi důležité regulátory, které regulují přeměny proteinů, což je zásadní pro udržení homeostázy (Mofers et al. 2017). Ve většině případů je protein označený ubiquitinem rozpoznán proteazomem 26S (Doroodian & Hua 2021).

UPS hraje klíčovou roli při degradaci povrchových proteinů spermií a remodelaci plazmatické membrány během kapacitace (Kong et al. 2009). Během fosforylace proteinů po kapacitaci jsou fosforylovány i proteiny související s UPS, jako je například ubiquitin aktivující enzym (UBE), proteazomální podjednotky, protein obsahující valosin a samotný ubiquitin (Geussova et al. 2002; Arcelay et al. 2008; Baker et al. 2010). Také byla potvrzena existence obousměrného vztahu mezi proteazomem a PKA, při kterém inhibice PKA způsobila snížení aktivity proteazomu a stejně tak poklesla fosforylace proteazomových podjednotek (Kong et al. 2009). Dále se UPS podílí na degradaci spermadhezínů a zpracování proteinu DQH při kapacitaci na povrchu kančích spermií (Zigo et al. 2019). UPS je zapojen i do degradace proteinů AKAP3 (Hillman et al. 2013). Díky UPS dochází také ke kontrole kvality spermií v nadvarlatech během posttestikulárního zrání (Baska et al. 2008) a napomáhá také při samotné fertilizaci, při které se podílí na degradaci *zony pellucidy* (Saldívar-Hernández et al. 2015).

V jádru a cytoplazmě všech eukaryotických buněk je exprimován multikatalytický enzymový komplex proteazom 26S, který je velký přibližně 2,5 MDa (Hilt et al. 1993; Doroodian & Hua 2021). V posledním desetiletí se ukázalo, že funkce tohoto enzymu má zásadní význam pro buněčný cyklus a přežití buněk (Adams 2003) a negativně také ovlivňuje proliferaci nádorových buněk (Meister et al. 2007). Proteazom reguluje také segregaci chromozomů a opravy DNA (Hershko & Ciechanover 1998). Primární funkcí a hlavní biochemickou úlohou proteazomu 26S je degradace ubiquitinovaných proteinů (Doroodian & Hua 2021). Inhibice funkce proteazomu může vést k apoptóze buněk (Adams 2003). Proteazom 26S je komplex, jehož struktura je tvořena subkomplexy proteazomem 20S, označovaným také jako střední část (CP), a proteazomem 19S, který je označován jako regulační část (RP) (viz Obrázek 10) (Glickman et al. 1998; Hunt et al. 1999). Část proteazomu 20S svou strukturou připomíná válec, který se skládá ze čtyř prstenců, a plní kontrolovanou proteolytickou funkci (Voges et al. 1999). Dva vnější prstence proteazomu 20S jsou označovány jako  $\alpha$  kruhové podjednotky (Adams 2003) a vnitřní jako  $\beta$  kruhové podjednotky (Sadanandom et al. 2012). Proteazom 20S u eukaryot se skládá ze sedmi různých podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$ , u prokaryotického jsou podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  identické (Chen & Hochstrasser 1996; Krüger et al. 2001). Proteazom 19S se účastní rozpoznání proteinů, jejich rozplétání a reguluje také velikost produktů proteolýzy (Moiseeva et al. 2013). Podjednotky proteazomu 19S jsou dále rozděleny na podjednotky báze a podjednotky víka (viz Obrázek 10). Rozplétání proteinů způsobuje aktivita ATPáz podjednotky báze (Baugh et al. 2009). Vnitřní část podjednotky báze obsahuje šest ATPáz (S7/Rpt1, S4/Rpt2, S6/Rpt3, S10/Rpt4, S6'/Rpt5 a S8/Rpt6). Vnější části podjednotky báze jsou bez ATPáz (Hunt et al. 1999). Podjednotka víka rozpoznává ubiquitinem označené řetězce (Di Giacomo et al. 2013).

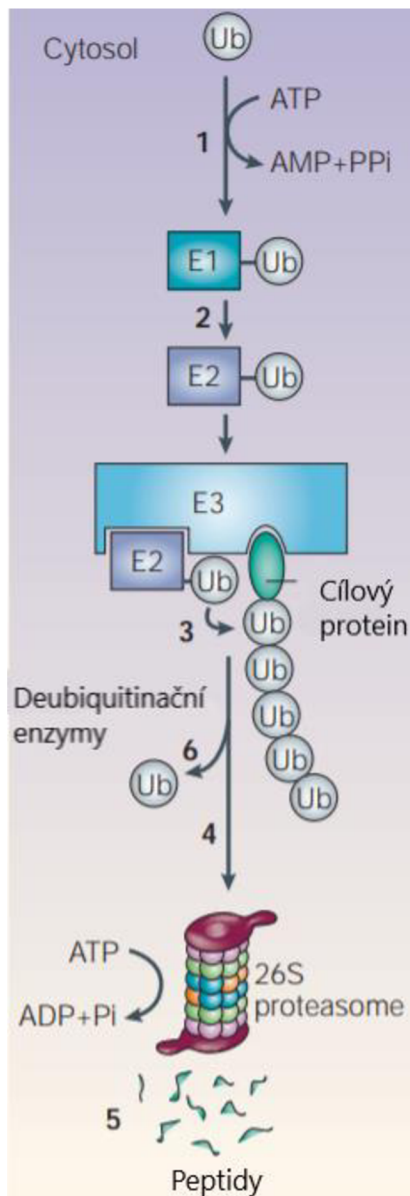


**Obrázek 10: Organizace a struktura Proteazomu 26S.** Uspořádání proteazomových podjednotek zobrazující součásti RP (regulační části) a CP (střední část) s  $\alpha$  a  $\beta$  kruhovými podjednotkami (Převzato a upraveno z Sadanandom et al. 2012).

Počátkem 80. let minulého století byl objeven rozpoznávací signál pro selektivní degradaci proteinů ubiquitin, který se nachází ve všech eukaryotických organismech a tkáních (Ciechanover et al. 1980; Su et al. 2020). Ubiquitin je malý, stabilní chaperonový polypeptid skládající se ze 76 aminokyselin (Kaiser & Huang 2005). C-konec ubiquitinu je zakončen aminokyselinou glycinem (Sadanandom et al. 2012). Modifikace proteinů obvykle zahrnuje tvorbu izopeptidové vazby mezi tímto C-koncem ubiquitinu s navázaným glycinem a specifickými zbytky lysinu v cílové proteinové sekvenci. Samotný ubiquitin obsahuje sedm lysinových zbytků (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 a Lys63) a také methionin (Met1) na N-konci (Heride et al. 2014). Nejvíce v buňce převažují vazby řetězců přes Lys48 (K48) (Pickart & Fushman 2004).

Aby byl protein rozpoznán proteazomem, musí být nejprve k cílovému proteinu připojen ubiquitin. Tento proces je označován také jako ubiquitylace či ubiquitinace (Wilkinson 2005). Za tento proces je zodpovědná kaskáda enzymů tzv. třístupňová enzymatická reakce, která

aktivuje volný ubiquitin a přenáší jej k cílovému proteinu. Tyto enzymy se nazývají E1 (enzym aktivující ubiquitin; UBA1), E2 (ubiquitin-konjugující protein; UBC) a E3 (ubiquitin-protein ligáza; UBE) (Hershko & Ciechanover 1998; Cardozo & Pagano 2007; Kravtsova-Ivantsiv & Ciechanover 2012). Aktivace ubiquitinu je závislá na adenosintrifosfátu (ATP), který vyžaduje enzym aktivující ubiquitin (E1). E1 aktivuje volný ubiquitin, vytváří thioesterovou vazbu mezi cysteinem na E1 a C-koncem ubiquitinu, vedlejší produkt této reakce je adenosinmonofosfát (AMP) a pyrofosfát (PPi) (Hicke 2001). E1 poté přenáší ubiquitin na nosič E2. E2 prezentuje ubiquitin pro E3. E3 se váže na cílový protein a interaguje s E2, aby kovalentně připojil ubiquitin k cílovému proteinu (Voges et al. 1999). Vytváří se tak polyubiquitinový řetězec, který označí protein pro degradaci proteazomem (viz Obrázek 11) (Adams 2003). Délka ubiquitinového řetězce se může lišit v závislosti na počtu kol ubiquitinace, což může vést k připojení jednoho nebo více ubiquitinovaných řetězců k cílovým proteinům. V důsledku toho mohou být řetězce monoubiquitinované či polyubiquitinované (Li et al. 2018). Tato cesta se nazývá ubiquitin-proteazomová (UPP) a je důležitá nejen pro buněčný cyklus, ale také pro zánětlivou reakci a prezentaci antigenu (Adams 2003). Označení proteinů ubiquitinem je reverzibilním procesem, při kterém jsou všechny vytvořené vazby v řetězci ubiquitinů štěpeny deubiquitinačními enzymy (DUB), tím dochází k recyklaci vzniklých polyubiquitinových řetězců (Amerik & Hochstrasser 2004). Na rozdíl od velké většiny proteáz, které štěpí proteiny jednou za vzniku dvou fragmentů, proteazomy štěpí proteiny vícekrát. Vzniká tak větší počet peptidů, které mají po rozštěpení různé délky (Akopian et al. 1997).



**Obrázek 11: Degradace proteinů UPS.** Ubiquitin je aktivován enzymem E1 (krok 1) a následuje jeho přenos na E2 (krok 2). Enzym E2 a cílový protein se specificky vážou na E3 a na cílový protein se přenesou ubiquitinová skupina se (krok 3). Ubiquitinový řetězec funguje jako signál pro zacílení na proteazom 26S (krok 4). Cílový protein je degradován na krátké peptidy (krok 5) a znovu použitelný ubiquitin je odštěpen deubiquitinačními enzymy (DUB) (krok 6) (Převzato a upraveno z Ciechanover 2005).

### 3.6.1 Inhibice UPS

Inhibitory proteazomu jsou molekuly, které mohou účinně blokovat aktivitu proteazomu, a tím i degradaci proteinů (Wang et al. 2020). Inhibice proteazomu může vést k zastavení buněčného cyklu nebo k indukci buněčné apoptózy (Sterz et al. 2008). Inhibitory jsou často popisovány jako nástroje ke zkoumání ubiquitin-proteazomové dráhy v různých buněčných procesech (Sherman & Li 2020). Inhibitory proteazomu by mohly také pozitivně

ovlivňovat léčbu nádorových onemocnění a zabraňovat nekontrolovanému množení nádorových buněk tím, že inhibují aktivitu proteazomu (Deshaies 2014). Ačkoli má proteazom více aktivních míst, inhibice všech z nich není nutná k zablokování procesu degradace cílových proteinů. Většina inhibitorů proteazomu cílí na místa proteazomu, která zodpovídají za štěpení proteinů, taková místa se nacházejí zejména v  $\beta$  podjednotkách proteazomu 20S (Kisselev & Goldberg 2001). Existuje několik skupin proteazomových inhibitorů, které se klasifikují podle mechanismu účinku. Velká skupina inhibitorů se zaměřuje na inhibici proteazomu 20S, ale existuje i skupina inhibitorů, které cílí na jiné složky UPS nebo inhibují expresi genů specifických pro vznik receptorů proteazomu 19S (Lauinger et al. 2017). Mezi syntetické inhibitory proteazomu patří například MG-132, OBut, PSI nebo ALLN (Chitra et al. 2012). Inhibitor MG-132 je peptidový aldehyd přítomný v savčích spermiích, který inhibuje nejen aktivitu proteazomu 20S (Yamada et al. 1994; Sutovsky et al. 2003), ale také enzymy kalpainy z rodiny proteáz (Tsubuki et al. 1996). Aktivita inhibitoru MG-132 je reverzibilní (Josefberg et al. 2000). Dalším inhibitorem souvisejícím s UPS je PYR-41, který inhibuje aktivaci ubiquitinu tím, že cílí na enzym aktivující ubiquitin E1 (UBA1) (Yi et al. 2012).

### 3.7 AKAP proteiny

Rodina proteinů kotvících kinázu A (AKAP) zahrnuje více než 50 strukturně odlišných, ale funkčně podobných proteinů (Ben-Navi et al. 2016). Mnoho AKAP je pojmenováno podle jejich molekulové hmotnosti, například AKAP79 s molekulovou hmotností 79 kDa (Gabrovsek et al. 2017). Všechny AKAP mají společnou schopnost vázat se na doménu protein kinázy A (PKA) (Carnegie et al. 2009; Dessauer 2009) a také kinázám pomáhají připojit se k jiným molekulám zapojeným do fosforylace (Smith et al. 2013). Další funkcí AKAP je schopnost vytvářet víceproteinové signalizační komplexy. Do těchto komplexů je připojena fosfodiesteráza (PDE), která může regulovat koncentrace cAMP, a tím ovlivňovat signální dráhy cAMP/PKA (Jarnæss & Taskén 2007). Součástí komplexů s AKAP mohou být také fosfatázy nebo malé G-proteiny (Skroblin et al. 2010). V posledním desetiletí se studie zaměřují zejména na roli AKAP zapojených do komplexů, které souvisí s progresí rakoviny. Na AKAP komplexy se tak pohlíží jako na možné terapeutické cíle v léčbě rakoviny (Reggi & Diviani 2017). AKAP hrají také důležitou roli ve funkci spermií, včetně motility, kapacity a akrozomální reakce. Další rolí některých AKAP proteinů je funkce v gametogenezi či v oogenezi, například při regulaci lokalizace PKA a udržování meiotického bloku a regulaci meiotického dělení oocytů (Klingbeil et al. 2001; Rawe et al. 2004). Po oplodnění vajíčka mají AKAP funkci v embryogenezi, příkladem může být AKAP12 (gravin), který má vliv na gastrulaci oplozeného vajíčka (Carnegie et al. 2009). Některé AKAP (AKAP79) se podílí na regulaci sekrece inzulínu (Hinke et al. 2012).

AKAP proteiny se převážně vážou na regulační podjednotku protein kinázy A RII (Burton et al. 1997; Miki & Eddy 1999). Některé AKAP interagují s podjednotkou RI a malé procento AKAP má dvojí afinitu a váže se na RI i RII. AKAP s dvojí afinitou mají 10–100x nižší afinitu než skupina AKAP vázající se pouze na RII (Huang et al. 1997; Means et al. 2011). Pro spermie jsou

specifické například tyto AKAP: AKAP4, AKAP3, AKAP8 nebo AKAP11 (Carr & Newell 2007). U savčích spermíí jsou PKA a AKAP lokalizovány v bičíku a akrozomu, příkladem můžou být AKAP3 a AKAP4, které se vyskytují na bičíku spermie a podílejí se na regulaci motility spermie (Carr et al. 2001; Luconi 2011; Balbach et al. 2018).

### 3.7.1 AKAP4 a AKAP3

AKAP4 i AKAP3 proteiny jsou transkribovány a syntetizovány postmeioticky během spermatogeneze a jsou lokalizovány v hlavní části bičíku spermie (Carrera et al. 1994). Molekulová hmotnost AKAP3 se pohybuje okolo 110 kDa (Luconi et al. 2004) a molekulová hmotnost AKAP4 je 82 kDa (Carrera et al. 1994). Bylo zjištěno, že během vývoje bičíku spermie se AKAP3 podílí na organizaci struktury jemných vláken tvořících pochvu bičíku (Luconi 2011). Tato jemná vlákna se významně podílí na motilitě spermie (Ben-Navi et al. 2016). Pokud AKAP3 není navázán na regulační podjednotku PKA je motilita spermíí výrazně snížena (Luconi et al. 2004). AKAP3 byl také lokalizován v akrozomu spermíí, což podporuje roli AKAP/PKA jako signálního komplexu v akrozomální reakci iniciované progesteronem (Harrison et al. 2000; Luconi 2006). AKAP3 je protein, který patří mimo jiné do rodiny antigenů CT (z angl. cancer-testis) (Zendman et al. 2003). Jedná se o třídu antigenů vysoce a specificky exprimovaných v zárodečných buňkách lidských spermíí. Některé studie naznačují souvislosti AKAP3 mezi rakovinou a spermatogenními procesy (Sharma et al. 2005). Při spermatogenezi dochází k expresi AKAP3 a dalších CT antigenů (Luconi 2011).

AKAP4 (dříve označovaný jako AKAP82) byl první AKAP, u kterého byla popsána spojitost s bičíkem spermie (Carrera et al. 1994). AKAP4 má hlavní roli v dokončení tvorby jemných vláken tvořících pochvu bičíku spermie a je jejich součástí (Luconi 2011). AKAP4 reguluje cAMP/PKA signální kaskádu a je nezbytný pro přenos signálu z PKA na dyneiny, a tím podporuje klouzání mikrotubulových dubletů axonemy (Nipper et al. 2005). Regulace těchto signálních drah podporuje také proces kapacitace (Nixon et al. 2019). Současné studie AKAP4 u různých druhů zvířat popisují přítomnost AKAP4 a jeho prekurzoru (izoformy) proAKAP4 ve zralých spermíích (Delehedde et al. 2018; Le Couazer et al. 2019). Molekulová hmotnost proAKAP4 je přibližně 100 kDa (Le Couzaer & Bencharif 2021). Některé studie popisují AKAP4 a proAKAP4 jako proteiny, které jsou aktivně fosforylovány během kapacitace u lidských spermíí (Brown et al. 2003; Luconi 2011). Nepřítomnost proteinu AKAP4 ve spermíích může způsobovat sníženou motilitu a fertilitu spermíí (Balbach et al. 2018). Stejně tak jakákoli modifikace exprese prekurzoru proAKAP4 má vliv na motilitu spermíí (Matzuk & Lamb 2008) nebo na dysplazii jemných vláken tvořících pochvu v bičíku (Miki et al. 2002).

K regulaci AKAP proteinů může dojít proteinovou fosforylací (Luconi et al. 2005). Bylo například prokázáno, že tyrozinová fosforylace AKAP3 může být zvýšena stimulací bikarbonátem, nebo inhibicí fosfatidylinositol-3-kinázou (PI3) (Luconi 2011).

## 4 Metodika

### 4.1 Biologický materiál

Pro experimenty této diplomové práce byl používán nativní ejakulát kanců z testačního a inseminačního střediska Skršín, LIPRA PORK, a.s. Odběry ejakulátu probíhaly u kanců plemene Duroc chovaných v dánském šlechtitelském programu DanBred.

### 4.2 Příprava vzorků

Pro potřeby experimentů byly získány nativní dávky ejakulátu od několika kanců. Pro přípravu vzorků (ejakulované spermie, kapacitované 0, kapacitované 3,5 h, s DMSO, s 100  $\mu$ M MG-132, 100  $\mu$ M PYR-41 a po akrozomální reakci) byl vždy 1 ml ejakulát přidán do 9 ml předem zahřátého BASIC-TL-HEPES a zcentrifugován (Hettich Mikro 22R; DJB Labcare, UK).

Na přípravu 250 ml BASIC-TL-HEPES byly použity následující chemikálie (Sigma-Aldrich, USA):

- 1,6585 g NaCl
- 0,05965 g KCl
- 0,0102 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 0,35 ml laktát sodný
- 0,02545 g MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O
- 0,59575 g HEPES
- 0,0055 g pyruvát sodný
- 0,5465 g sorbitol
- 0,00625 g gentamicin
- 0,01625 g penicilin
- 0,025 g PVA.

Centrifugace probíhala po dobu 10 min při 300 x g při pokojové teplotě a následovalo odstranění supernatantu. Po odsátí supernatantu byl doplněn BASIC-TL-HEPES do 10 ml a centrifugace vzorku byla provedena ještě 3x, přičemž po každé centrifugaci byl odsát supernatant a vzorek byl resuspendován. Po poslední centrifugaci s BASIC-TL-HEPES byl vzorek doplněn do 10 ml PBS (0,01 M fosfátový pufr, pH 7,4, Sigma-Aldrich, USA) a následně promyt opět za využití centrifugy (2x5 min při 300 xg). Po každé centrifugaci byl odsát supernatant, doplněno PBS do 10 ml a vzorek byl resuspendován.

Pro potřeby Western blotu byly takto připravené vzorky rozpipetovány do mikrozkušavek po 1 ml a následně centrifugovány 5 min při 300 x g a 17 °C. Po této centrifugaci byl odsát supernatant a peleta byla zamrazena. Tyto vzorky byly později zlyzovány přidáním 100  $\mu$ l neredukujícího vzorkového pufru. Vzorek byl následně 60 minut inkubován na ledu, přičemž každých 5 minut byl vortexován (MX-S Adjustable speed; DLAB Scientific, USA). Následně byl 5 minut povážen v termoshakeru (TS-100; Biosan, Latvia)



a zcentrifugován (5 min při 10 000  $\times$ g a 4 °C). Takto připravené vzorky byly skladovány v mrazáku.

Pro potřeby nepřímé imunofluorescence bylo odebráno 200  $\mu$ l suspenze spermií, ke kterým bylo přidáno 800  $\mu$ l PBS. Následně bylo do předem připravených koleček pomocí PAP Pen liquid blocker (Sigma-Aldrich, USA) na sklíčcích přeneseno 20  $\mu$ l suspenze spermií a ihned 50  $\mu$ l vymraženého aceton:methanolu (ředění 1:1). Vzorky byly takto 5 min inkubovány při pokojové teplotě a následně byly omyty v PBS. Takto připravené vzorky byly skladovány v lednici.

Pro potřeby kapacitace bylo použito kapacitační médium o objemu 50 ml s následujícím složením látek:

- 50 ml BASIC TL-HEPES
- 0,099 g glukóza
- 0,0275 g pyruvát sodný
- 1 g BSA (bovinní sérový albumin; Sigma-Aldrich, USA)
- 0,0084 g NaHCO<sub>3</sub>
- 0,0147 g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O.

Kapacitační médium bylo přidáno k suspenzi spermií po posledním promývání v BASIC-TL-HEPES. Kapacitační médium bylo po odebrání supernatantu doplněno do 10 ml, vzorek byl resuspendován a následně byl inkubován v termostatu při teplotě 38 °C a 5% CO<sub>2</sub> po dobu 3,5 hodiny (v případě kontrolní skupiny KAPO bylo přidáno pouze kapacitační médium, inkubace neproběhla). V případě experimentálních skupin s inhibitory proteazomu a kontrolní skupiny s DMSO byl ještě před inkubací do každé zkumavky přidán konkrétní inhibitor v efektivní koncentraci. Následně byl vzorek 3 $\times$  promyt v PBS (centrifugace 2 $\times$ 5 min při 300  $\times$ g). Nakonec byl vzorek doplněn do 10 ml PBS, resuspendován a následně byly vzorky připraveny a uskladněny obdobným způsobem, jako u ejakulovaných spermií.

Poslední experimentální skupinou byla skupina spermií po akrozomální reakci. K tomu byly využity již kapacitované spermie, ke kterým byl přidán calcium ionofor (A23187; Sigma-Aldrich, USA). Na 1 ml spermií připadlo 20  $\mu$ l calcium ionoforu. Následně byly vzorky inkubovány v termostatu (38 °C, 5% CO<sub>2</sub>) po dobu 1 hodiny. Dále byly vzorky 3 $\times$  promyty v PBS (centrifugace 2 $\times$ 5 min při 300  $\times$ g), doplněny do 10 ml PBS a následně připraveny a uskladněny obdobně jako u výše uvedených variant.

## 4.3 Western blot (WB)

### 4.3.1 SDS – elektroforéza

Pro detekci proteinu AKAP4 byla použita metoda Western blot. Vzorky použité pro SDS-PAGE byly ejakulované a kapacitované spermie, spermie po akrozomální reakci a dále vzorky kapacitovaných spermií s přidávanými inhibitory PYR-41 a MG-132 v koncentraci 100  $\mu$ M.

Pro přípravu separačních gelů byla použita sestava Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA). Na přípravu dvou 15% separačních gelů bylo použito:

- 2,5 ml destilované H<sub>2</sub>O
- 2,5 ml pufru (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; Bio-Rad, USA)
- 5 ml 30% roztoku (Acrylamide/bis-acrylamide; Bio-Rad, USA)
- 100 μl 10% SDS (sodium dodecyl sulfate; Bio-Rad, USA)
- 4,5 μl TEMED (PlusOne, USA)
- 70 μl 10% APS (persíran amonný; Amersham Biosciences, Švédsko).

Připravený 15% separační roztok byl aplikován mezi skla umístěná v rámu, následně převrstven destilovanou vodou a 30 minut polymeroval. Po uplynutí požadované doby byla vylita destilovaná voda a následovalo převrstvení 4% zaostřovacím gelem. Pro přípravu 4% zaostřovacího gelu bylo použito:

- 1,52 ml destilované H<sub>2</sub>O
- 0,625 ml stacking gel buffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, Bio-Rad, USA)
- 0,325 ml 30% roztoku (Acrylamide/bis-acrylamide, Bio-Rad, USA)
- 0,025 ml 10% SDS (sodium dodecyl sulfate; Bio-Rad, USA)
- 3,8 μl TEMED (PlusOne, USA)
- 50 μl 10% APS (persíran amonný; Amersham Biosciences, Švédsko).

Po aplikaci 4% zaostřovacího roztoku byly mezi skla zasazeny hřebínky o 15 jamkách. Hřebínky byly po 15 minutách polymerace vyjmuty a souprava byla umístěna do nádoby určené k elektroforéze. Ta byla zalita elektrodovým pufrem. Na výrobu elektrodového pufru bylo použito:

- 15 g Tris (Sigma-Aldrich, USA)
- 72 g glycin (Sigma-Aldrich, USA)
- 5 g SDS (sodium dodecyl sulfate; Bio-Rad, USA)
- Do 1 litru doplněno destilovanou H<sub>2</sub>O.

Po zalití elektrodovým pufrem byly hřebínky vyjmuty a do patnácti jamek napipetovány proteinové standardy (3 μl) a připravené vzorky (15 μl) pomocí Hamiltonovy pipety. Do první jamky byly aplikovány 3 μl standardu, do zbylých jamek 15 μl vzorků. Pro elektroforézu byl použit přístroj PowerPac HC High-Current Power Supply (Bio-Rad, USA). Část procesu zaostření vzorku elektroforézy probíhala pod napětím 80 V po dobu 20 minut a v druhé části bylo napětí navýšeno na 120 V po dobu cca 80 minut, dokud nedošlo vlivem elektrického pole k dostatečnému rozdělení proteinů.

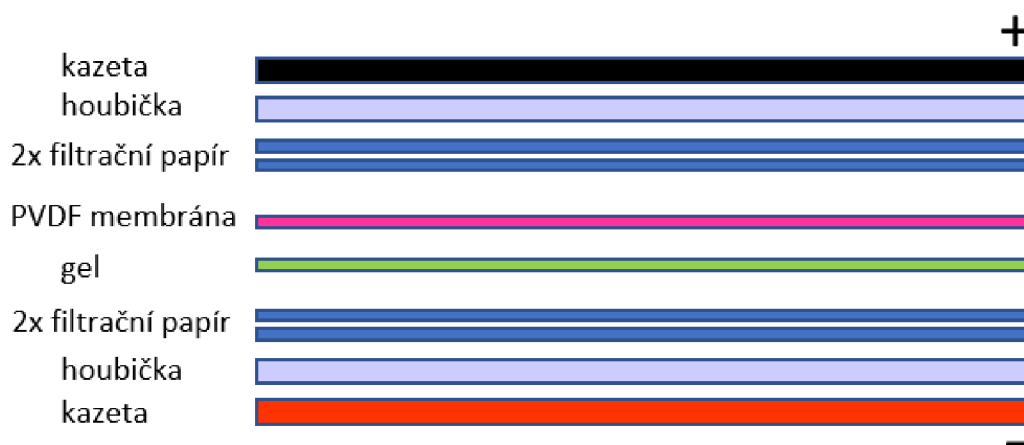
#### 4.3.2 Přenos proteinů

Před elektropřenosem proteinů došlo nejdříve k aktivaci PVDF membrány po dobu 1 minuty v methanolu. Souprava pro Western blot (kazeta, houbičky, filtrační papíry

Whatman) byla ponořena na 15 minut do blotovacího (transferového) pufru. Na 1l blotovacího pufru bylo použito:

- 3,03 g Tris (Sigma-Aldrich, USA) + 14,4 g glycin (Sigma-Aldrich, USA) rozpuštěno ve 200 ml destilované H<sub>2</sub>O
- 200 ml methanol
- Doplnění 600 ml destilované H<sub>2</sub>O do 1l.

Uspořádání kazety bylo následovné: houbička, dva filtrační papíry, gel se separovanými proteiny, dva filtrační papíry, houbička (viz Obrázek 12). Pomocí zkumavky byly přes houbičku vytlačeny přebytečné bubliny.



**Obrázek 12: Znárodnění uspořádání kazety pro WB.**

Kazeta v tomto zkompletování byla vložena do soupravy Mini Trans-Blot Central Core (Bio-Rad, USA) pro elektropřenos a poté do nádoby, která byla zalita blotovacím pufrem. Aparaturu ochlazoval z vnějšku led, aby nedošlo k jejímu přehřívání. Elektropřenos probíhal pod stálým proudem 500 mA po dobu 90 minut za pomoci přístroje PowerPac HC High-Current Power Supply (Bio-Rad, USA). Membrána byla po uplynulé době vyjmuta z kazety pro elektropřenos a pomocí destilované H<sub>2</sub>O omývána 5 minut.

#### **4.3.3 Imunodetekce proteinu AKAP4**

Na PVDF membráně s přenesenými proteiny byla zablokována nescifická vazebná místa 5% sušeném mléku (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk; Bio-Rad, USA) rozpuštěném v PBS po dobu 60 minut. Poté probíhalo promytí 2x po 5 minutách v PBS s 0,1% Tweenem 20 (Sigma-Aldrich, USA) na rotační třepačce (MX-T6-Pro; DLAB Scientific, USA). Po promytí byla membrána inkubována s králičí polyklonální primární protilátkou proti kančímu AKAP4 proteinu (Abcam, USA), která byla naředěna v poměru 1:1000 v PBS. Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc při 4 °C. Po inkubaci s protilátkou proběhlo promytí PVDF membrány 3x po 10 minutách v PBS s 0,1% Tweenem 20. Sekundární protilátka

anti-rabbit proti králičím imunoglobulinům byla ředěna v poměru 1:3000 v PBS. Membrána byla se sekundární protilátkou inkubována po dobu 60 minut na rotační třepačce. Poté se membrána promývala v PBS s Tweenem 20 4x po 5 minutách a v PBS 2x po 5 minutách.

Na membráně po promytí proběhla vizualizace detekce proteinů protilátkou za použití chemiluminiscenčního substrátu ředěného 1:1 (SuperSignal West Chemiluminescent Substrate; Thermo Scientific, USA). Detekce chemiluminiscence byla vyhodnocena v digitálním přístroji Azure c300 (Azure Biosystems; Biocev, Vestec). Probíhala také kontrola přenesených proteinů a jejich hustota inkubací s protilátkou anti-mouse proti  $\alpha$ -tubulinu.

#### 4.4 Nepřímá imunofluorescence

Připravená skla s fixovanými spermii byla nejprve omyta v PBS a poté bylo na kontrolní i experimentální vzorky aplikováno 150  $\mu$ l SuperBlocku (Blocking Buffer in PBS; ThermoFischer Scientific, USA) po dobu 30 minut ve vlhké komůrce. Poté byla sklíčka omyta v PBS a na pokusné vzorky bylo přidáno 100  $\mu$ l primární protilátky. Králičí primární protilátka anti-AKAP4 (Abcam, USA) byla ředěna v poměru 1:50 v PBS. Do kontrolních vzorků bylo aplikováno 100  $\mu$ l PBS, aby nedošlo k vyschnutí vzorku. Následovala inkubace primární protilátky po dobu 2 hodin ve vlhké komůrce. Poté byla sklíčka promyta v PBS a následně bylo na pokusné i kontrolní vzorky nanášeno 100  $\mu$ l sekundární protilátky. Sekundární protilátka anti-rabbit Alexa Fluor 488 (AKAP4) proti králičím imunoglobulinům byla naředěna v poměru 1:300. Od této chvíle byly vzorky uchovávány ve tmě. Inkubace se sekundární protilátkou trvala ve vlhké komůrce 60 minut. Vzorky byly poté omyty nejprve v PBS a poté destilovanou vodou. Následně na ně bylo aplikováno 100  $\mu$ l PNA s Rhodaminem (Peanut Agglutinin; Vector laboratories, USA) pro obarvení akrozomů, které bylo ředěno v poměru 1:500. Inkubace trvala 30 minut ve vlhké komůrce a následně byly vzorky omyty v PBS a 3x destilovanou vodou. Posledním krokem byla aplikace 10  $\mu$ l montovacího média Vectashieldu s DAPI (Vector Laboratories, USA). Sklíčka byla zakryta krycími skly (22x22 mm, Hirschmann, Německo) a fixována lakem na nehty. Sklíčka byla skladována při teplotě 4 °C ve tmě a jejich analýza proběhla pod fluorescenčním mikroskopem Nikon.

#### 4.5 Statistická analýza

Experimenty byly několikrát zopakovány. Pro denzitometrickou analýzu exprese proteinů byl použit program Image Studio Digits (Lite Verze 5.2.; LI-COR Biosciences, USA). Program Statistica 12 (StatSoft CR s.r.o., Česká republika) a metoda ANOVA byla využita pro vypracování statistických analýz dat u detekce proteinu AKAP4. Pro sledování vlivu inhibitoru proteazomu a inhibitoru ubiquitinace na degradaci proteinu AKAP4 během kapacitace kančích spermií byla zvolena analýza T-test. Hodnota P menší než hladina významnosti ( $\alpha = 0,05$ ) byla považována za statisticky významnou.

## 4.6 Experimentální schéma

Pro detekování proteinu AKAP4 u kančích spermíí byla použita metoda Western blot (kap. 4.3). Při detekci proteinu byly využity vzorky ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermíí a spermíí po akrozomální reakci. Lokalizace a přítomnost AKAP4 v kančích spermíích byla hodnocena metodou nepřímé imunofluorescence.

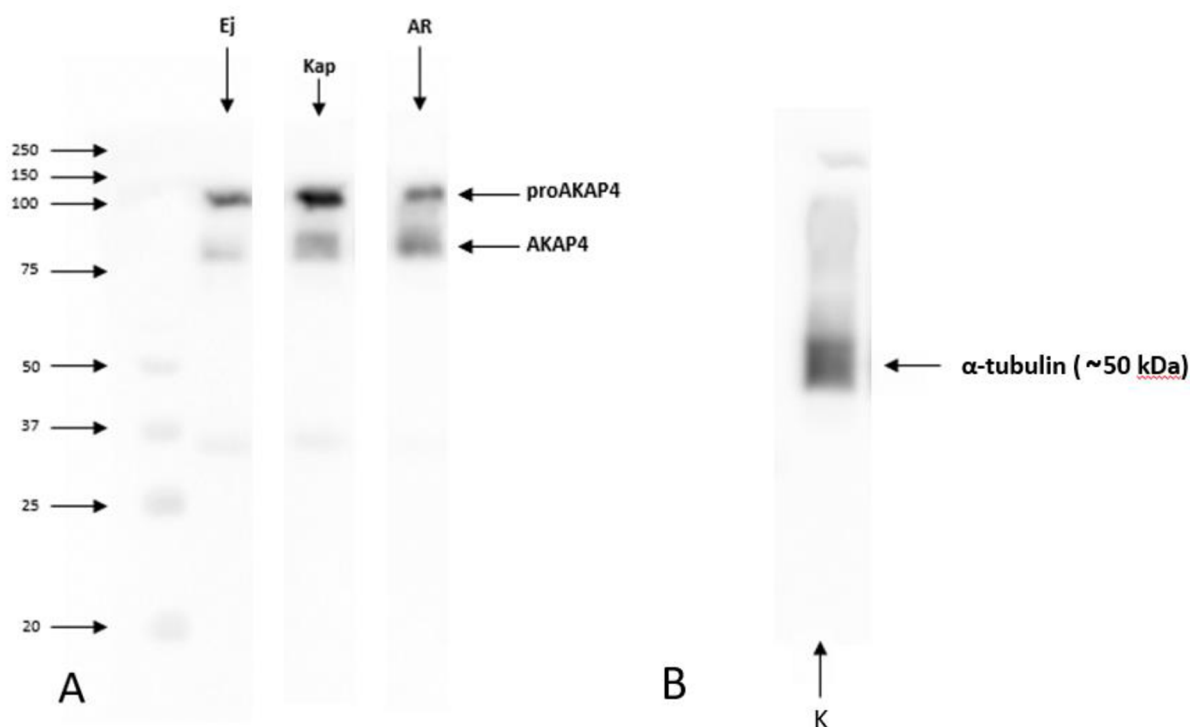
Vliv inhibitoru proteazomu MG-132 na degradaci proteinu AKAP4 během kapacitace byl hodnocen pomocí denzitometrické analýzy. V tomto hodnocení byly porovnávány *in vitro* kapacitované spermie bez inhibitoru a *in vitro* kapacitované spermie s inhibitorem proteazomu MG-132.

Hodnocení inhibice ubiquitinace během kapacitace kančích spermíí v průběhu kapacitace bylo provedeno u vzorků *in vitro* kapacitovaných spermíí bez inhibitoru a vzorků *in vitro* kapacitovaných spermíí s přidaným inhibitorem ubiquitin aktivačního enzymu (E1) PYR-41.

## 5 Výsledky

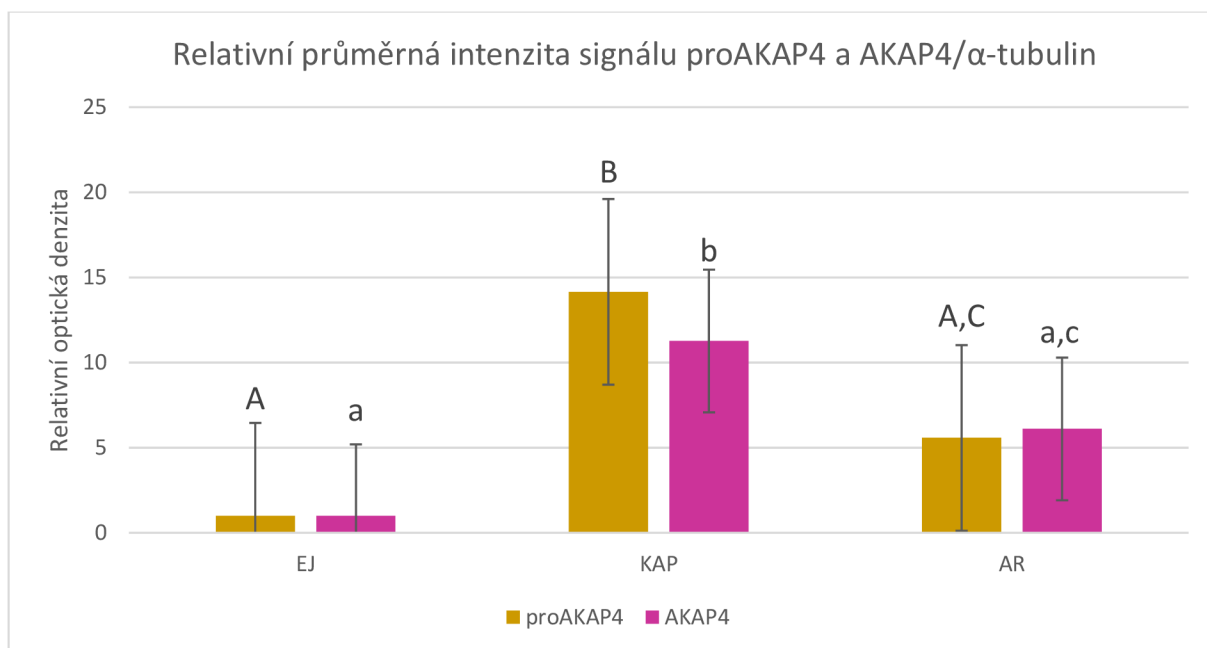
### 5.1 Detekce proteinu AKAP4 v kančích spermích

Detekovali jsme protein AKAP4 a jeho izoformu proAKAP4. Detekce bylo provedena u ejakulovaných a kapacitovaných spermíí a spermíí po akrozomální reakci. U všech zkoumaných vzorků spermíí byla pozorována detekce proteinu AKAP4 o molekulové hmotnosti 82 kDa a dále prekursoru proAKAP4 o molekulové hmotnosti 110 kDa (viz Obrázek 13).



**Obrázek 13: Imunodetekce (A) proteinu AKAP4 a jeho prekursoru proAKAP4 a (B) detekce  $\alpha$ -tubulinu (kontrola).** Ej – ejakulované spermie, Kap – kapacitované spermie, AR – spermie po akrozomální reakci, K – kontrola (ejakulované spermie).

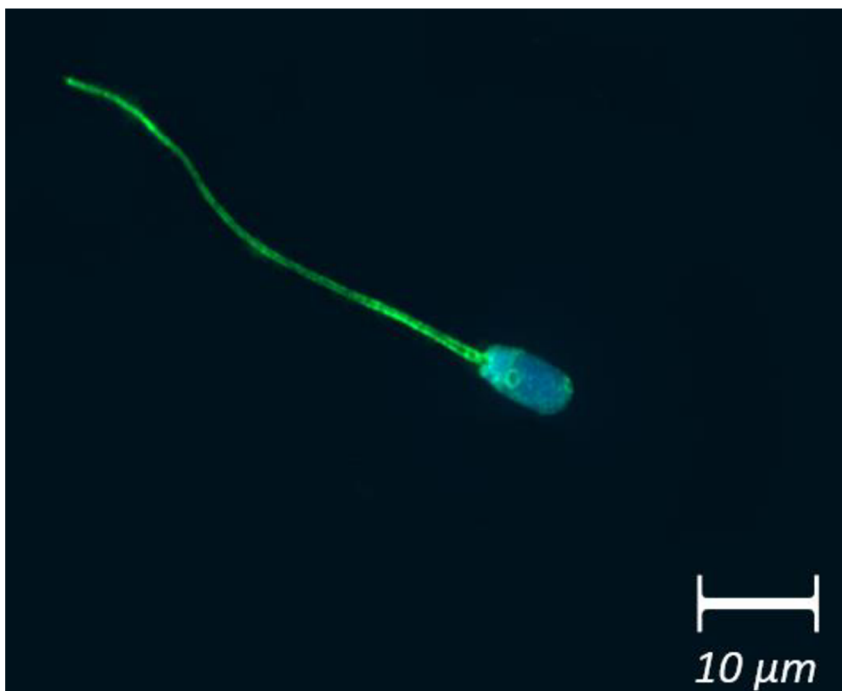
Pomocí denzitometrické analýzy v programu Image Studio Digits byla zhodnocena exprese proteinu proAKAP4 a AKAP4 porovnávaná oproti signálu protilátky proti  $\alpha$ -tubulinu (viz Graf 1). Podle výsledků detekce proteinu byl pozorován nárůst intenzity signálu u kapacitovaných spermíí oproti ejakulovaným spermíím. Dále lze pozorovat sníženou intenzitu signálu u spermíí po akrozomální reakci v porovnání s kapacitovanými spermíemi.



**Graf 1: Porovnání relativní průměrné intenzity signálu vztažené k  $\alpha$ -tubulinu u kančích spermii.** EJ - ejakulované spermie, KAP - kapacitované spermie, AR - spermie po akrozomální reakci. Ejakulované spermie jsou vztažené k hodnotě 1. Statisticky významné rozdíly jsou v grafu znázorněny různými superskripty (A, B, C, a, b, c).

Relativní průměrná intenzita signálu proAKAP4 a AKAP4 byla podrobena statistické analýze v programu Statistica 12 pomocí statistické metody jednofaktorové ANOVA. Po porovnání všech vzorků byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermii u proAKAP4 i AKAP4 ( $P < \alpha$ ). Statisticky průkazný rozdíl byl také mezi kapacitovanými spermii a spermii po akrozomální reakci u proAKAP4 a AKAP4 ( $P < \alpha$ ). Mezi ejakulovanými spermii a spermii po akrozomální reakci nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl ( $P > \alpha$ ).

Protein AKAP4 byl dále detekován pomocí metod nepřímé imunofluorescence (kap. 4.4). Lokalizace AKAP4 byla prováděna u všech vzorků spermii. Obrázek 14 znázorňuje vazbu protilátky u *in vitro* kapacitované spermie s lokalizací proteinu AKAP4 v bičíku a postakrozomální oblasti hlavičky. Chromatin jádra byl barven pomocí DAPI.



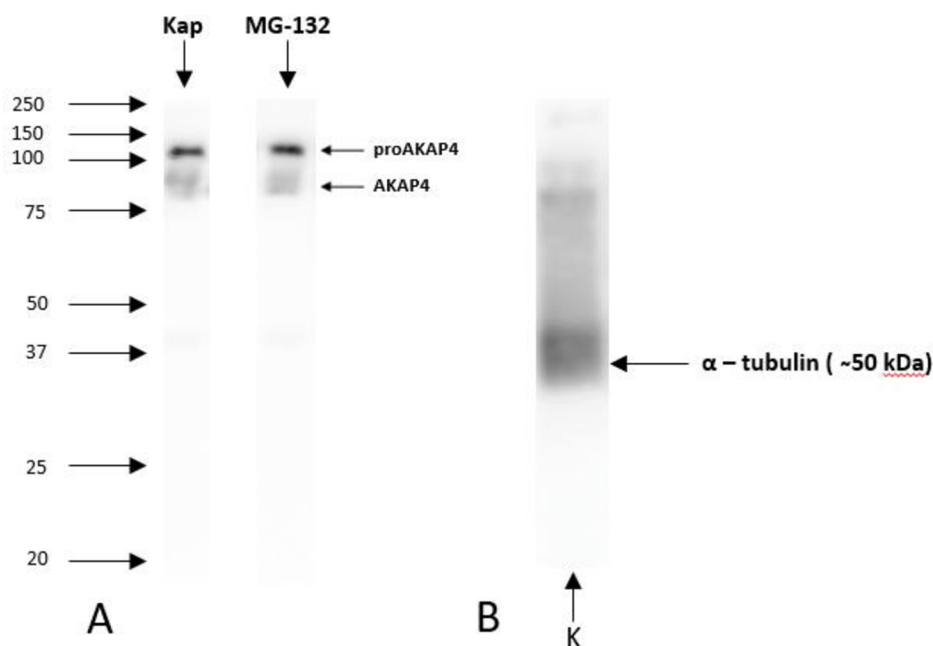
**Obrázek 14: Imunolokalizace AKAP4 u kapacitované kančí spermie.** AKAP4 – značení zelenou barvou (FITC), chromatin – značení modrou barvou (DAPI). Snímek pořízen na konfokálním mikroskopu, zvětšení 400x.

## 5.2 Vliv proteazomu na degradaci proteinu AKAP4 během kapacitace kančích spermií

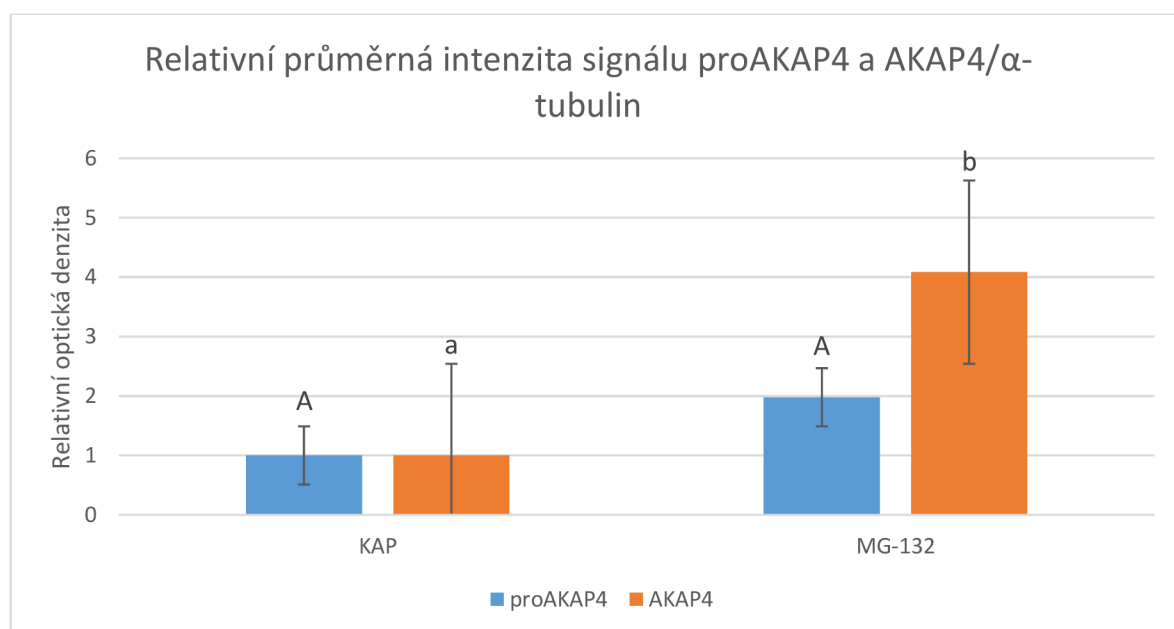
Byla provedena inhibice proteazomu pomocí inhibitoru proteazomu MG-132 (100  $\mu\text{M}$ ) během kapacitace spermií a poté byl detekován AKAP4 pomocí protilátky v proteinových extraktech spermií (viz Obrázek 15).

Relativní průměrná intenzita signálu proAKAP4 a AKAP4 byla porovnána s intenzitou signálu protilátky proti  $\alpha$ -tubulinu pro normalizaci množství proteinu ve vzorcích (viz Graf 2). Výsledky tohoto hodnocení prokázaly vyšší hodnoty intenzity signálu u vzorků *in vitro* kapacitovaných spermií s inhibitorem proteazomu MG-132 než hodnoty pro kapacitované spermie bez inhibitoru. Po denzitometrické analýze byly hodnoty statisticky porovnávány.





**Obrázek 15: Imunodetekce (A) proteinu AKAP4 a jeho prekurzoru proAKAP4 a (B) detekce  $\alpha$ -tubulinu (kontrola).** Kap – kapacitované spermie, MG-132 – inhibitor proteazomu, K - kontrola (kapacitované spermie).

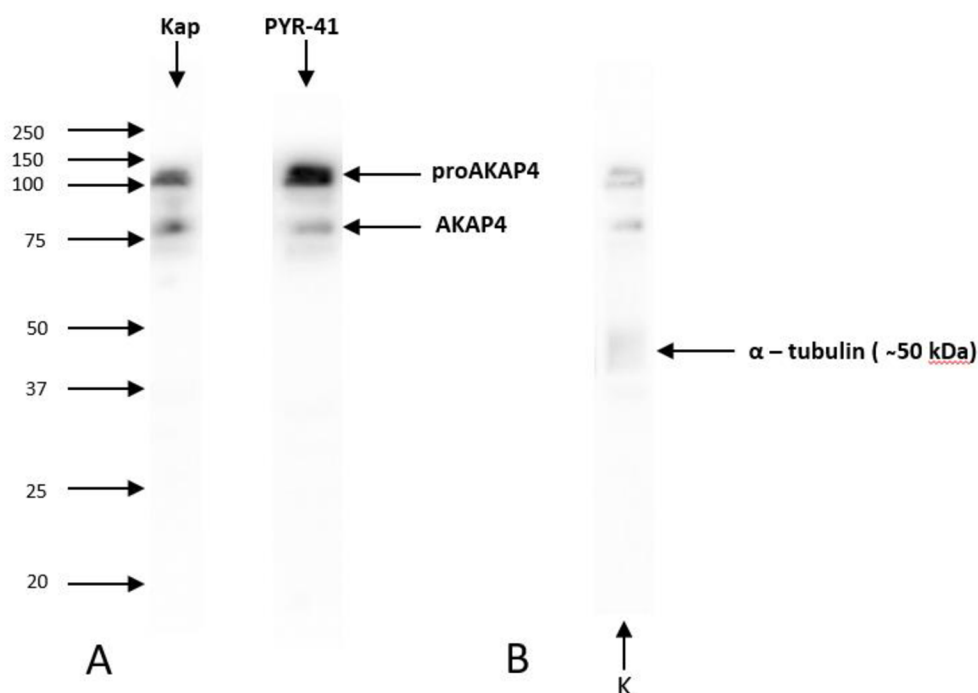


**Graf 2: Relativně vyjádřená intenzita signálu proteinu AKAP4 u kančích spermii.** Porovnání intenzity signálu mezi kapacitovanými spermii a kapacitovanými spermii s přidáním inhibitory proteazomu MG-132. KAP - kapacitované spermie, MG-132 – inhibitor proteazomu. Kapacitované spermie jsou vztaženy k hodnotě 1. Statisticky významné rozdíly jsou v grafu znázorněny různými superskripty (A, a, b).

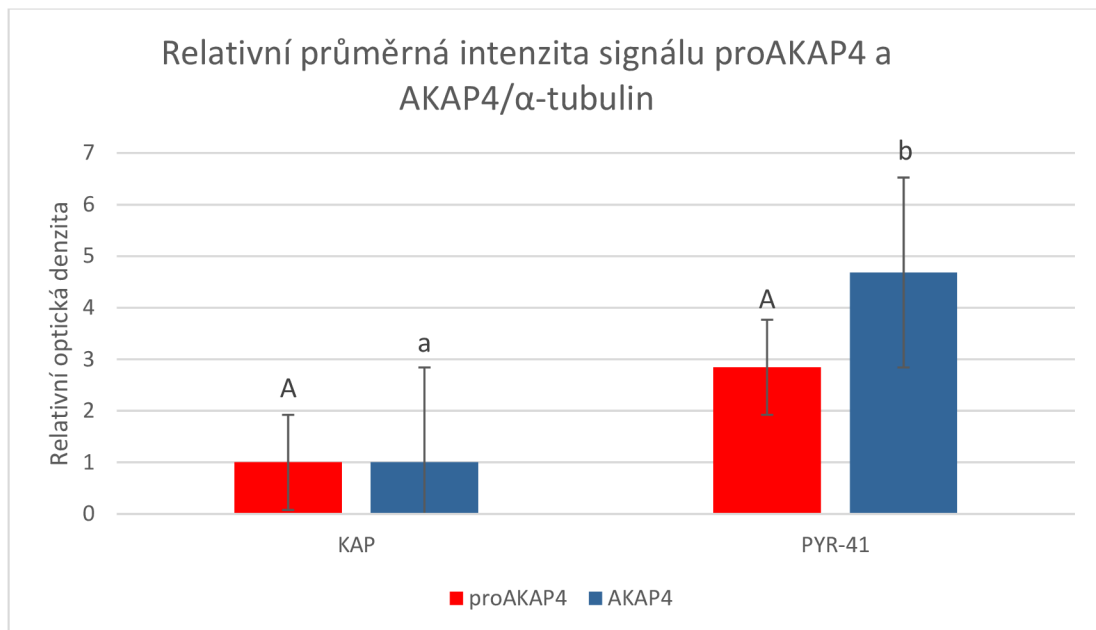
Po statistickém porovnání izoformy proAKAP4 nebyl mezi kapacitovanými spermii a spermii s inhibitorem proteazomu MG-132 pozorován statisticky významný rozdíl ( $P > \alpha$ ). Statisticky významně vyšší signál byl detekován u proteinu AKAP4 u kapacitovaných spermii s inhibitorem proteazomu MG-132 oproti kapacitovaným spermii bez inhibitoru ( $P < \alpha$ ).

### 5.3 Vliv ubiquitin dependentní degradace proteinu AKAP4 během kapacitace kančích spermii

Byla provedena inhibice enzymu aktivující ubiquitin pomocí inhibitoru PYR-41 (100  $\mu\text{M}$ ) během kapacitace spermii a poté byl detekován AKAP4 pomocí protilátky v proteinových extraktech spermii (viz Obrázek 16). Z výsledků denzitometrické analýzy lze pozorovat vyšší relativní průměrnou intenzitu signálu u vzorků kapacitovaných spermii s přidaným inhibitorem ubiquitin aktivačního enzymu PYR-41. Průměrná intenzita signálu proAKAP4 a AKAP4 byla porovnána s intenzitou signálu protilátky proti  $\alpha$ -tubulinu pro normalizaci množství proteinu ve vzorcích (viz Graf 3). V dalším kroku byla intenzita signálu mezi skupinami hodnocena statistickou analýzou v programu Statistica.



**Obrázek 16: Imunodetekce (A) proteinu AKAP4 a jeho prekurzoru proAKAP4 a (B) detekce  $\alpha$ -tubulinu (kontrola).** Kap – kapacitované spermie, PYR-41 – inhibitor ubiquitin aktivačního enzymu (E1), K – kontrola (kapacitované spermie).



**Graf 3: Relativně vyjádřená intenzita signálu proteinu AKAP4 u kančích spermii.** Porovnání intenzity signálu mezi kapacitovanými spermii a kapacitovanými spermii s přidaným inhibítoem ubiquitin aktivačního enzymu (E1). KAP - kapacitované spermie, PYR-41 - inhibitor ubiquitin aktivačního enzymu (E1). Kapacitované spermie jsou vztaženy k hodnotě 1. Statisticky významné rozdíly jsou v grafu znázorněny různými superskripty (A, a, b).

Statistická analýza neprokázala statisticky významný rozdíl u izofomy proAKAP4 mezi vzorky *in vitro* kapacitovaných spermii a kapacitovaných spermii s přidaným inhibítoem ubiquitin aktivačního enzymu PYR-41 (E1) ( $P > \alpha$ ). Statisticky významné zvýšení relativní intenzity signálu bylo patrné u proteinu AKAP4 u *in vitro* kapacitovaných spermii s inhibítoem PYR-41 oproti kapacitovaným spermii bez inhibítoem ( $P < \alpha$ ).

## 6 Diskuze

Spermie na cestě k vajíčku prodělává řadu biochemických a fyziologických změn, které jsou nutné pro úspěšné oplození. Podstatné změny nastávají během procesu kapacitace, při které dochází například k reorganizaci plazmatické membrány, efluxu cholesterolu, změnám koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, k aktivaci cAMP/PKA signální kaskády nebo ke změnám motility (Visconti et al. 1995; Visconti et al. 1999). V některých studiích bylo prokázáno, že s motilitou spermií u většiny druhů savců souvisejí proteiny z rodiny AKAP (Jumeau et al. 2018; Blommaert et al. 2019). Ve spermiích jsou zastoupeny zejména proteiny AKAP4 a AKAP3. Oba tyto proteiny jsou jedněmi z nejhodněji zastoupených cytoskeletárních proteinů jemných vláken tvořících pochvu bičíku a AKAP3 je navíc obsažen v akrozomu (Carrera et al. 1994). Předpokládá se, že motilita a pohyb bičíku jsou pod kontrolou velmi složitého molekulárního a strukturního mechanismu, ve kterém hraje AKAP4 podstatnou roli (Miki et al. 2002; Luconi 2011). Ve zralých spermiích je kromě AKAP4 přítomen také jeho prekurzor proAKAP4 (Delehedde et al. 2018). Proteiny proAKAP4 a AKAP4 jsou podle dosavadních poznatků považovány za markery fertility (Sergeant et al. 2019). Při kapacitaci spermií dochází k fosforylaci proteinů, mezi které patří také ubiquitin aktivující enzym E1 (Baker et al. 2010). Fosforylaci cílových proteinů reguluje PKA aktivovaná cAMP (Bajpai & Doncel 2003). Proteiny AKAP slouží jako lešení pro víceproteinové signalizační komplexy (Dodge & Scott 2000). S tím souvisí i schopnost AKAP vázat PKA. AKAP4 rekrutuje holoenzym PKA do jemných vláken tvořících pochvu a usnadňuje fosforylaci substrátů k regulaci pohybu bičíku (Huang et al. 2005). Během kapacitace lidských spermií je zejména protein AKAP3 nejvýrazněji fosforylovaný (Pereira et al. 2015).

Cílem této diplomové práce bylo prostřednictvím experimentů studovat vliv ubiquitin-proteazomového systému (UPS) na degradaci proteinu AKAP4 během kapacitace kančích spermií. UPS je klíčovým regulačním mechanismem zodpovědným za degradaci proteinů, která probíhá během kapacitace spermií, není však jediným možným mechanismem degradace (Kerns et al. 2016). Předchozími studiemi však již byla potvrzena degradace proteinu AKAP3 tímto systémem u býků (Hillman et al. 2013) a člověka (Zapata-Carmona et al. 2021), a proto bylo možné předpokládat, že i AKAP4 je kandidátním proteinem, který je v průběhu kapacitace degradován tímto systémem.

Ve studii od Hillman et al. (2013) bylo potvrzeno, že při procesu kapacitace u býčích spermií je protein AKAP3 degradován pomocí UPS a zároveň může být tato degradace inhibována inhibitorem proteazomu MG-132. Proto i pro experimenty této diplomové práce byl zvolen právě tento inhibitor. V jiných studiích se ukázalo, že inhibitor enzymu aktivujícího ubiquitin (E1) PYR-41 narušuje ubiquitinaci proteinů a následnou modifikaci akrozomálních proteinů, která probíhá již během kapacitace a je za fyziologických podmínek klíčová pro korektní průběh akrozomální reakce (Kerns et al. 2016). Proto byl inhibitor PYR-41 zvolen i pro experimenty této diplomové práce zaměřené na inhibici procesu ubiquitinace.

V této diplomové práci byla detekce AKAP4 prováděna pomocí metody Western blot, kdy nejprve došlo k separaci proteinů pomocí SDS-elektroforézy a následně k imunodetekci požadovaného proteinu AKAP4 pomocí specifické protilátky. Přítomnost AKAP4 byla

detekována u všech vzorků spermií (ejakulované, kapacitované a spermie po akrozomální reakci), a to protein AKAP4 o molekulové hmotnosti 82 kDa a prekurzor AKAP4, protein proAKAP4 o molekulové hmotnosti 110 kDa. Tyto výsledky korelují s publikacemi od Brown et al. (2003) a Le Couzaer & Bencharif (2021). Densitometrickou analýzou byl pozorován nárůst intenzity signálu AKAP4 a proAKAP4 u vzorků kapacitovaných spermií oproti ejakulovaným spermiím. Tato tendence byla pozorována i u myších spermií ve studii od Syifa et al. (2020) a není zcela jednoduché ji vysvětlit. U vzorků spermií po akrozomální reakci byla pozorována nižší intenzita signálu AKAP4 a jeho izoformy proAKAP4 oproti *in vitro* kapacitovaným spermiím. To může být vysvětlováno degradací AKAP4 ve spermii až po kapacitaci. Stále byl však u spermií po akrozomální reakci nějaký signál detekován. To by znamenalo, že dochází pouze k částečné degradaci AKAP4 během kapacitace a poté i akrozomální reakce kančích spermií. Dále je možné, že v průběhu kapacitace je AKAP4 degradován i pomocí dalších mechanismů, které nebyly dosud popsány. Pro ověření těchto tvrzení by bylo třeba provést další vhodné experimenty. Dále je nutné uvažovat vysokou individualitou mezi jednotlivými samci, která je pro kance typická.

V další části výzkumu AKAP4 byla sledována jeho lokalizace v kapacitovaných spermiích pomocí metody nepřímé imunofluorescence. AKAP4 je lokalizován v hlavní části bičíku spermií u lidí, skotu, koní i myší (Carrera et al. 1994; Luconi 2011; Blommaert et al. 2019; Delehedde 2019). Z námi provedených experimentů je patrné, že lze potvrdit přítomnost AKAP4 v hlavní části bičíku i u kančích spermií.

Pro studium vlivu inhibitorů proteazomu na degradaci AKAP během kapacitace byl použit inhibitor proteazomu MG-132 a inhibitor enzymu aktivující ubiquitin PYR-41. Předpokládalo se, že na degradaci AKAP4 během kapacitace má významný vliv UPS. U relativních průměrných hodnot intenzity signálu AKAP4 i proAKAP4 byla sledována tendence jeho zvýšení u vzorků kapacitovaných spermií s přidaným inhibitorem MG-132 i u vzorků kapacitovaných spermií s inhibitorem PYR-41 oproti kapacitovaným spermiím bez inhibitorů. Z toho lze vyvodit závěr, že se oba zmíněné inhibitory podílejí na blokování degradace AKAP4 v průběhu kapacitace kančích spermií.

V současné době není zcela jasné, zda jsou proteiny z AKAP rodiny ubiquitinovány před kapacitací nebo v průběhu kapacitačních událostí u spermií (Kerns et al. 2016), což by mohlo být dalším předmětem výzkumu. V souvislosti s degradací proteinu AKAP4 by bylo dobré v budoucích experimentech sledovat, jakou roli v tomto procesu hraje proteinkináza A.

## 7 Závěr

V této diplomové práci byla ověřována hypotéza, že ubiquitin-proteazómový systém (UPS) je zapojen do degradace proteinu AKAP4 během kapacitace kančích spermií v *in vitro* podmínkách.

V experimentu zaměřeném na detekci proteinu AKAP4 byl tento protein i jeho prekurzor proAKAP4 detekován u vzorků ejakulovaných kančích spermií, *in vitro* kapacitovaných kančích spermií i u kančích spermií po navozené akrozomální reakci. V experimentech zaměřených na imunolokalizaci AKAP4 u kančích spermií byla prokázána přítomnost tohoto proteinu v hlavní části bičíku kančí spermie. Při detekci proteinu AKAP4 byl zaznamenán pokles intenzity signálu proteinu u vzorků spermií po akrozomální reakci oproti kapacitovaným spermiím. Tento výsledek by mohl poukazovat na důležitost degradace proteinu AKAP4 pro procesy související s akrozomální reakcí spermie. Je možné, že úloha proteinu AKAP4 je klíčová pro navození hyperaktivace motility spermie v samičím pohlavním traktu, která je spojená s kapacitací, a poté dochází k jeho zvýšené degradaci. To by potvrzoval i fakt, že AKAP4 má již prokázanou úlohu při motilitě spermie. K ověření této hypotézy by však bylo potřeba provést vhodné experimenty.

Funkce ubiquitin – proteazómového systému (UPS) v regulaci degradace AKAP4 v průběhu kapacitace kančích spermií nebyla doposud objasněná. Výsledky experimentů této diplomové práce zaměřené právě na sledování zapojení UPS do degradace proteinu AKAP4 během kapacitace kančích spermií potvrdily hypotézu o zapojení UPS do degradace proteinu AKAP4 během kapacitace kančích spermií v *in vitro* podmínkách. Z výsledků provedených experimentů v této práci byla pomocí inhibitoru proteazomu MG-132 a inhibitoru ubiquitin aktivačního enzymu PYR-41 pozorována nižší míra degradace proteinu AKAP4 oproti vzorkům spermií kapacitovaných v kapacitačním médiu bez těchto inhibitorů. Z toho jasně vyplývá, že ubiquitin – proteazómový systém je za fyziologických podmínek zapojen do degradace proteinu AKAP4 během kapacitace kančích spermií. Fyziologický význam této degradace ovšem zůstává nejasným a je vhodným předmětem dalšího studia.

Tato diplomová práce může být považována za jednu z prvotních prací, která se zabývá vlivem ubiquitin – proteazómového systému na degradaci proteinu AKAP4 během kapacitace u kančích spermií. V současné době není zcela jasné, zda jsou proteiny z AKAP rodiny ubiquitinovány před kapacitací nebo až v průběhu kapacitačních událostí u spermií, což by mohlo být dalším zajímavým předmětem výzkumu.

## 8 Literatura

- Adams J. 2003. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treatment Reviews* **29**:3-9.
- Ahmad K, Bracho GE, Wolf DP, Tash JS. 2009. Regulation of Human Sperm Motility and Hyperactivation Components by Calcium, Calmodulin, and Protein Phosphatases. *Archives of Andrology* **35**:187-208.
- Aitken RJ, Nixon B. 2013. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Molecular Human Reproduction* **19**:785-793.
- Akopian TN, Kisselev AF, Goldberg AL. 1997. Processive Degradation of Proteins and Other Catalytic Properties of the Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *Journal of Biological Chemistry* **272**:1791-1798.
- Almeida FFL, Leal MC, França LR. 2006. Testis Morphometry, Duration of Spermatogenesis, and Spermatogenic Efficiency in the Wild Boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biology of Reproduction* **75**:792-799.
- Amann RP, Schanbacher BD. 1983. Physiology of male reproduction. *Journal of animal science* **57**:380-403.
- Amer YO, Hebert-Chatelain E. 2018. Mitochondrial cAMP-PKA signaling: What do we really know?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1859**:868-877.
- Amerik AY, Hochstrasser M. 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1695**:189-207.
- Amieux PS, Howe DG, Knickerbocker H, Lee DC, Su T, Laszlo GS, Idzerda RL, McKnight GS. 2002. Increased Basal cAMP-dependent Protein Kinase Activity Inhibits the Formation of Mesoderm-derived Structures in the Developing Mouse Embryo. *Journal of Biological Chemistry* **277**:27294-27304.
- Ankel-Simons F, Cummins JM. 1996. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: Implications for theories on human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**:13859-13863.
- Aoki F, Ishida K, Okuno M, Kohmoto K. 1994. Analysis of flagellar bending in hyperactivated hamster and mouse spermatozoa. *Reproduction* **101**:397-403.
- Aponte PM, Van Bragt MPA, De Rooij DG, Van Pelt AMM. 2005. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS* **113**:727-742.
- Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE. 2008. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *The International Journal of Developmental Biology* **52**:463-472.

- Ashman JB, Hall ES, Eveleth J, Boekelheide K. 1992. Tau, the Neuronal Heat-Stable Microtubule-Associated Protein, is also Present in the Cross-Linked Microtubule Network of the Testicular Spermatid Manchette1. *Biology of Reproduction* **46**:120-129.
- Avidor-Reiss T, Carr A, Fishman EL. 2020. The sperm centrioles. *Molecular and Cellular Endocrinology* 518 (110987) DOI: 10.1016/j.mce.2020.110987.
- Babcock DF, Rufo GA, Lardy HA. 1983. Potassium-dependent increases in cytosolic pH stimulate metabolism and motility of mammalian sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**:1327-1331.
- Baccetti B, Burrini AG, Dallai R, Pallini V. 1979. The dynein electrophoretic bands in axonemes naturally lacking the inner or the outer arm. *Journal of Cell Biology* **80**:334-340.
- Bajpai M, Doncel GF. 2003. Involvement of tyrosine kinase and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. *Reproduction* **126**:183-195.
- Baker MA, Smith ND, Hetherington L, Taubman K, Graham ME, Robinson PJ, Aitken RJ. 2010. Label-Free Quantitation of Phosphopeptide Changes During Rat Sperm Capacitation. *Journal of Proteome Research* **9**:718-729.
- Balbach M, Beckert V, Hansen JN, Wachten D. 2018. Shedding light on the role of cAMP in mammalian sperm physiology. *Molecular and Cellular Endocrinology* **468**:111-120.
- Baltz JM, Oneeka Williams P, Cone RA. 1990. Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biology of Reproduction* **43**:485-491.
- Bardin WC, Musto N, Gunsalus G, Kotite N, Cheng SL, Larrea F, Becker R. 1981. Extracellular Androgen Binding Proteins. *Annual Review of Physiology* **43**:189-198.
- Barkawi AH, Elsayed EH, Ashour G, Shehata E. 2006. Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small Ruminant Research* **66**:209-213.
- Baro Graf C, Ritagliati C, Stival C, Luque GM, Gentile I, Buffone MG, Krapf D. 2020. Everything you ever wanted to know about PKA regulation and its involvement in mammalian sperm capacitation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 518 (110992) DOI:10.1016/j.mce.2020.110992.
- Baska KM, Manandhar G, Feng D, Agca Y, Tengowski MW, Sutovsky M, Yi Y-J, Sutovsky P. 2008. Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *Journal of Cellular Physiology* **215**:684-696.
- Battistone MA, Da Ros VG, Salicioni AM, Navarrete FA, Krapf D, Visconti PE, Cuasnicu PS. 2013. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. *Molecular Human Reproduction* **19**:570-580.
- Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M, Keeney S. 2000. Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Molecular Cell* **6**:989-998.



- Baugh JM, Viktorova EG, Pilipenko EV. 2009. Proteasomes Can Degrade a Significant Proportion of Cellular Proteins Independent of Ubiquitination. *Journal of Molecular Biology* **386**:814-827.
- Ben-Navi LR, Almog T, Yao Z, Seger R, Naor Z. 2016. A-Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP4) is an ERK1/2 substrate and a switch molecule between cAMP/PKA and PKC/ERK1/2 in human spermatozoa. *Scientific Reports* 6 (37922) DOI: 10.1038/srep37922.
- Bergmann M. 2005. Spermatogenese. *Der Urologe* **44**:1131-1138.
- Blommaert D, Sergeant N, Delehedde M, Jouy N, Mitchell V, Franck T, Donnay I, Lejeune JP, Serteyn D. 2019. Expression, localization, and concentration of A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) and its precursor (proAKAP4) in equine semen: Promising marker correlated to the total and progressive motility in thawed spermatozoa. *Theriogenology* **131**:52-60.
- Boatman DE, Robbins RS. 1991. Bicarbonate: Carbon-Dioxide Regulation of Sperm Capacitation, Hyperactivated Motility, and Acrosome Reactions1. *Biology of Reproduction* **44**:806-813.
- Boerke A, Tsai PS, Garcia-Gil N, Brewis IA, Gadella BM. 2008. Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: Functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology* **70**:1188-1196.
- Bramson HN, Kaiser ET, Mildvan AS. 1984. Mechanistic Studies of cAMP-Dependent Protein Kinase Action. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **15**:93-124.
- Bravo Z, Valdivia M. 2018. Follicular fluid stimulates capacitation and acrosome reaction in alpaca sperm (*Vicugna pacos*). *Reproduction in Domestic Animals* **53**:629-635.
- Breitbart H, Rotman T, Rubinstein S, Etkovitz N. 2010. Role and regulation of PI3K in sperm capacitation and the acrosome reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology* **314**:234-238.
- Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J, Breitbart H. 2003. Remodeling of the Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Capacitation and Acrosome Reaction1. *Biology of Reproduction* **68**:837-845.
- Brown PR, Miki K, Harper DB, Eddy EM. 2003. A-Kinase Anchoring Protein 4 Binding Proteins in the Fibrous Sheath of the Sperm Flagellum. *Biology of Reproduction* **68**:2241-2248.
- Brucker C, Kaßner G, Löser C, Hinrichsen M, Lipford GB. 1994. Fertilization and early embryology: Progesterone-induced acrosome reaction. *Human Reproduction* **9**:1897-1902.
- Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR. 1999. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**:79-84.
- Burns RG, Pollard TD. 1974. A dynein-like protein from brain. *FEBS Letters* **40**:274-280.

- Burton KA, Johnson BD, Hausken ZE, Westenbroek RE, Idzerda RL, Scheuer T, Scott JD, Catterall WA, McKnight GS. 1997. Type II regulatory subunits are not required for the anchoring-dependent modulation of Ca<sup>2+</sup> channel activity by cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**:11067-11072.
- Cadd G, Stanley McKnight G. 1989. Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. *Neuron* **3**:71-79.
- Callaini G, Riparbelli MG. 1990. Centriole and centrosome cycle in the early drosophila embryo. *Journal of Cell Science* **97**:539-543.
- Camaioni A, Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC. 1996. Proteoglycans and Proteins in the Extracellular Matrix of Mouse Cumulus Cell–Oocyte Complexes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **325**:190-198.
- Camatini M, Colombo A, Bonfanti P. 1992. Cytoskeletal elements in mammalian spermiogenesis and spermatozoa. *Microscopy Research and Technique* **20**:232-250.
- Campelo AE, Cutini PH, Massheimer VL. 2012. Cellular actions of testosterone in vascular cells: Mechanism independent of aromatization to estradiol. *Steroids* **77**:1033-1040.
- Cardozo T, Pagano M. 2007. Wrenches in the works: drug discovery targeting the SCF ubiquitin ligase and APC/C complexes. *BMC Biochemistry* 8 (S9) DOI: 10.1186/1471-2091-8-S1-S9.
- Carnegie GK, Means CK, Scott JD. 2009. A-kinase anchoring proteins: From protein complexes to physiology and disease. *IUBMB Life* **61**:394-406.
- Carr DW, Hausken ZE, Fraser ID, Stofko-Hahn RE, Scott JD. 1992. Association of the type II cAMP-dependent protein kinase with a human thyroid RII-anchoring protein. Cloning and characterization of the RII-binding domain. *Journal of Biological Chemistry* **267**:13376-13382.
- Carr DW, Fujita A, Stentz CL, Liberty GA, Olson GE, Narumiya S. 2001. Identification of Sperm-specific Proteins That Interact with A-kinase Anchoring Proteins in a Manner Similar to the Type II Regulatory Subunit of PKA. *Journal of Biological Chemistry* **276**:17332-17338.
- Carr DW, Newell AE. 2007. The role of A-kinase anchoring proteins (AKAPs) in regulating sperm function. *Society of Reproduction and Fertility* **63**:135-141.
- Carrera A, Gerton GL, Moss SB. 1994. The Major Fibrous Sheath Polypeptide of Mouse Sperm: Structural and Functional Similarities to the A-Kinase Anchoring Proteins. *Developmental Biology* **165**:272-284.
- Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, 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.
- Ciechanover A. 2005. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**:79-87.

- Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A. 1980. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**:1365-1368.
- Clermont Y, Leblond CP. 1955. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the „periodic acid-schiff“ technique. *American Journal of Anatomy* **96**:229-253.
- Conti M, Beavo J. 2007. Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling. *Annual Review of Biochemistry* **76**:481-511.
- Danis RB, Samplaski MK. 2019. Sperm Morphology: History, Challenges, and Impact on Natural and Assisted Fertility. *Current Urology Reports* 20 (43) DOI: 10.1007/s11934-019-0911-7.
- Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F. 1999. Ion Channels in Sperm Physiology. *Physiological Reviews* **79**:481-510.
- Davis BK, Bilayer. L. 2009. Interaction of Lipids with the Plasma Membrane of Sperm Cells. I. The Antifertilization Action of Cholesterol. *Archives of Andrology* **5**:249-254.
- De Jonge C. 2005. Biological basis for human capacitation. *Human Reproduction Update* **11**:205-214.
- Deburgos NMG, Gallina F, Burgos C, Blanco A. 1994. Effect of L-Malate on Pyruvate-Dehydrogenase Activity of Spermatozoa. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **308**:520-524.
- Delehedde M, Bloomaert D, Jouy N, Scabello J, Miersman H, Franck T, Serteyn D, Mitchell V, Sergeant N. 2018. Concentration of proAKAP4 as a pertinent read-out of sperm quality in mammals. *Animal Reproduction Science* **194**:24.
- Deshaies RJ. 2014. Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy. *BMC Biology* 12 (94) DOI: 10.1186/s12915-014-0094-0.
- Dessauer CW. 2009. Adenylyl Cyclase–A-kinase Anchoring Protein Complexes: The Next Dimension in cAMP Signaling. *Molecular Pharmacology* **76**:935-941.
- Di Giacomo E, Serino G, Frugis G. 2013. Emerging Role of the Ubiquitin Proteasome System in the Control of Shoot Apical Meristem Function F. *Journal of Integrative Plant Biology* **55**:7-20.
- Dodge K, Scott JD. 2000. AKAP79 and the evolution of the AKAP model. *FEBS Letters* **476**:58-61.
- Dohle GR, Smit M, Weber RFA. 2003. Androgens and male fertility. *World Journal of Urology* **21**:341-345.
- Doroodian P, Hua Z. 2021. The Ubiquitin Switch in Plant Stress Response. *Plants* 10 (246) DOI: 10.3390/plants10020246.

- Dvořáková K, Moore HDM, Šebková N, Paleček J. 2005. Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction* **130**:61-69.
- Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. 2003. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microscopy Research and Technique* **61**:103-115.
- Ehrenwald E, Foote RH, Parks JE. 1990. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Molecular Reproduction and Development* **25**:195-204.
- Ergün S, Stingl J, Holstein AF. 1994. Microvasculature of the human testis in correlation to Leydig cells and seminiferous tubules. *Andrologia* **26**:255-262.
- Escalier D, David G. 1984. Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum: axonemal and peri-axonemal anomalies. *Biology of the Cell* **50**:37-52.
- Esteban C, Gérard A, Larrib S, Torán N, Gérard H, Reventós J. 1997. Sertoli cell-specific expression of rat androgen-binding protein in transgenic mice: effects on somatic cell lineages. *Molecular and Cellular Endocrinology* **132**:127-136.
- Fawcett DW. 1975. The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology* **44**:394-436.
- Fawcett DW, Phillips DM. 1969. The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. *The Anatomical Record* **165**:153-183.
- Fernandes AP, Bao SN. 1998. Cytochemical localization of phosphatases in the germ- and Sertoli cells of *Odontophrynus cultripes* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Biocell* **22**:93-101.
- Ferramosca A, Zara V. 2014. Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation. *BioMed Research International* **2014**:1-8.
- Ferrer M, Cornwall G, Oko R. 2013. A Population of CRES Resides in the Outer Dense Fibers of Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 88 (65) DOI: 10.1095/biolreprod.112.104745.
- Flesch FM, Gadella BM. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1469**:197-235.
- Flesch FM, Brouwers JFHM, Nievelstein PFEM, Verkleij AJ, van Golde LMG, Colenbrander B, Gadella BM. 2001. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal of Cell Science* **114**:3543-3555.
- Florman HM, Tombes RM, First NL, Babcock DF. 1989. An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal  $Ca^{2+}$  and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Developmental Biology* **135**:133-146.
- Forte LR, Bylund DB, Zahler WL. 1983. Forskolin does not activate sperm adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* **24**:42-47.

- França LR, Avelar GF, Almeida FFL. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* **63**:300-318.
- França LR, Cardoso FM. 1998. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. *Tissue and Cell* **30**:573-582.
- Fraser LR. 1983. Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and hyperactivated motility in vitro. *Reproduction* **69**:539-553.
- Fraser LR. 1995. Ionic control of sperm function. *Reproduction, Fertility and Development* **7**:905-925.
- Gabrovsek L, Bucko P, Carnegie GK, Scott JD. 2017. A-Kinase Anchoring Protein (AKAP). *Encyclopedia of Signaling Molecules*, New York.
- Gadella BM, Harrison RAP. 2002. Capacitation Induces Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent, but Apoptosis-Unrelated, Exposure of Aminophospholipids at the Apical Head Plasma Membrane of Boar Sperm Cells<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* **67**:340-350.
- Gage MJG, Freckleton RP. 2003. Relative testis size and sperm morphometry across mammals: no evidence for an association between sperm competition and sperm length. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **270**:625-632.
- Gallo A, Esposito MC, Tosti E, Boni R. 2021. Sperm Motility, Oxidative Status, and Mitochondrial Activity: Exploring Correlation in Different Species. *Antioxidants* **10** (1131) DOI: 10.3390/antiox10071131.
- Gardner LC, O'Toole E, Perrone CA, Giddings T, Porter ME. 1994. Components of a "dynein regulatory complex" are located at the junction between the radial spokes and the dynein arms in *Chlamydomonas* flagella. *Journal of Cell Biology* **127**:1311-1325.
- Geusova G, Kalab P, Peknicova J. 2002. Valosine containing protein is a substrate of cAMP? Activated boar sperm tyrosine kinase. *Molecular Reproduction and Development* **63**:366-375.
- Gibbons BH, Baccetti B, Gibbons IR. 1985. Live and reactivated motility in the 9 + 0 flagellum of *Anguilla* sperm. *Cell Motility and The Cytoskeleton* **5**:333-350.
- Glickman MH, Ciechanover A. 2002. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews* **82**:373-428.
- Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, Finley D. 1998. The Regulatory Particle of the *Saccharomyces cerevisiae* Proteasome. *Molecular and Cellular Biology* **18**:3149-3162.
- Goldberg E. 1963. Lactic and Malic Dehydrogenases in Human Spermatozoa. *Science* **139**:602-603.

- Gordon D, Gray CE, Beastall GH, Thomson JA. 1989. The effects of pulsatile GnRH infusion upon the diurnal variations in serum LH and testosterone in pre-pubertal and pubertal boys. *Acta Endocrinologica* **121**:241-245.
- Górski K, Kondracki S, Iwanina M, Kordan W, Fraser L. 2021. Effects of breed and ejaculate volume on sperm morphology and semen parameters of boars. *Animal Science Journal* 92 (e13629) DOI: 10.1111/asj.13629.
- Grimes SR, Meistrich ML, Platz RD, Hnilica LS. 1977. Nuclear protein transitions in rat testis spermatids. *Experimental Cell Research* **110**:31-39.
- Griswold MD. 1995. Interactions Between Germ Cells and Sertoli Cells in the Testis. *Biology of Reproduction* **52**:211-216.
- Hagenäs L, Ritzén EM, Plöen L, Hansson V, French FS, Nayfeh SN. 1975. Sertoli cell origin of testicular androgen-binding protein (ABP). *Molecular and Cellular Endocrinology* **2**:339-350.
- Han Y et al. 2020. Chronic arsenic exposure lowered sperm motility via impairing ultra-microstructure and key proteins expressions of sperm acrosome and flagellum formation during spermiogenesis in male mice. *Science of The Total Environment* 734 (139233) DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139233.
- Hardy DM, Garbers DL. 1993. Molecular Basis of Signaling in Spermatozoa. *Molecular Biology of the Male Reproductive System* 233-270.
- Harrison DA, Carr DW, Meizel S. 2000. Involvement of Protein Kinase A and A Kinase Anchoring Protein in the Progesterone-Initiated Human Sperm Acrosome Reaction<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* **62**:811-820.
- Heride C, Urbé S, Clague MJ. 2014. Ubiquitin code assembly and disassembly. *Current Biology* **24**:215-220.
- Hershko A, Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* **67**:425-479.
- Hess RA, Miller LA, Kirby JD, Margoliash E, Goldberg E. 1993. Immunoelectron Microscopic Localization of Testicular and Somatic Cytochromes c in the Seminiferous Epithelium of the Rat<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* **48**:1299-1308.
- Hicke L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**:195-201.
- Hillman P, Ickowicz D, Vigel R, Breitbart H, Sun Q-Y. 2013. Dissociation between AKAP3 and PKARII Promotes AKAP3 Degradation in Sperm Capacitation. *PLoS ONE* 8 (e68873) DOI: 10.1371/journal.pone.0068873.
- Hinke SA et al. 2012. Anchored phosphatases modulate glucose homeostasis. *The EMBO Journal* **31**:3991-4004.

- Hilt W, Heinemeyer W, Wolf DH. 1993. Studies on the Yeast Proteasome Uncover Its Basic Structural Features and Multiple in vivo Functions. *Enzyme and Protein* **47**:189-201.
- Hirohashi N, Yanagimachi R. 2018. Sperm acrosome reaction: its site and role in fertilization†. *Biology of Reproduction* **99**:127-133.
- Ho H-C, Suarez SS. 2001. An inositol 1,4,5-Trisphosphate receptor-gated intracellular Ca<sup>2+</sup> store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biology of Reproduction* **65**:1606-1615.
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. 2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1 DOI: 10.1186/1477-7827-1-107.
- Huang LJ-shen, Durick K, Weiner JA, Chun J, Taylor SS. 1997. Identification of a Novel Protein Kinase A Anchoring Protein That Binds Both Type I and Type II Regulatory Subunits. *Journal of Biological Chemistry* **272**:8057-8064.
- Huang Z, Somanath PR, Chakrabarti R, Eddy EM, Vijayaraghavan S. 2005. Changes in Intracellular Distribution and Activity of Protein Phosphatase PP1 $\gamma$ 2 and Its Regulating Proteins in Spermatozoa Lacking AKAP41. *Biology of Reproduction* **72**:384-392.
- Hunt RT, Nasmyth KA, Diffley J, Zwickl P, Voges D, Baumeister W. 1999. The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **354**:1501-1511.
- Hurtado de Llera A, Martin-Hidalgo D, Gil MC, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ. 2016. New insights into transduction pathways that regulate boar sperm function. *Theriogenology* **85**:12-20.
- Chang MC. 1955. Development of Fertilizing Capacity of Rabbit Spermatozoa in the Uterus. *Nature* **175**:1036-1037.
- Chang MC, Yanagimachi R. 1963. Fertilization of ferret ova by deposition of epididymal sperm into the ovarian capsule with special reference to the fertilizable life of ova and the capacitation of sperm. *Journal of Experimental Zoology* **154**:175-187.
- Chemineau P, Malpoux B, Guérin Y, Maurice F, Daveau A, Pelletier J. 1992. Lumière et mélatonine pour la maîtrise de la reproduction des ovins et des caprins. *Annales de Zootechnie* **41**:247-261.
- Chen P, Hochstrasser M. 1996. Autocatalytic Subunit Processing Couples Active Site Formation in the 20S Proteasome to Completion of Assembly. *Cell* **86**:961-972.
- Chitra S, Nalini G, Rajasekhar G. 2012. The ubiquitin proteasome system and efficacy of proteasome inhibitors in diseases. *International Journal of Rheumatic Diseases* **15**:249-260.
- Chłopak A, Wysokińska A. 2019. Canine spermatozoa—What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reproduction in Domestic Animals* **55**:113-126.

- Ickowicz D, Finkelstein M, Breitbart H. 2012. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian Journal of Andrology* **14**:816-821.
- Iida H, Yoshinaga Y, Tanaka S, Toshimori K, Mori T. 1999. Identification of Rab3A GTPase as an Acrosome-Associated Small GTP-Binding Protein in Rat Sperm. *Developmental Biology* **211**:144-155.
- Inaba K. 2003. Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. *Zoological Science* **20**:1043-1056.
- Inoue N, Ikawa M, Okabe M. 2010. The mechanism of sperm-egg interaction and the involvement of IZUMO1 in fusion. *Asian Journal of Andrology* **13**:81-87.
- Ioki S, Wu Q-S, Takayama O, Motohashi HH, Wakai T, Funahashi H. 2016. A phosphodiesterase type-5 inhibitor, sildenafil, induces sperm capacitation and penetration into porcine oocytes in a chemically defined medium. *Theriogenology* **85**:428-433.
- Ivanova-Kicheva M, Dimov G, Daskalova D, Gerzilov V, Kukov A. 2012. Impact of separated seminal plasma proteins on the motility, integrity of plasma membrane and velocity parameters of ram spermatozoa during low temperature preservation. *Comptes Rendus de L'academie Bulgare des Sciences* **65**:953-960.
- Jaiswal BS, Conti M. 2011. Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**:10676-10681.
- Jarnæss E, Taskén K. 2007. Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes. *Biochemical Society Transactions* **35**:931-937.
- Jeyaraj DA, Grossman G, Petrusz P. 2005. Altered bioavailability of testosterone in androgen-binding protein-transgenic mice. *Steroids* **70**:704-714.
- Jiang JH, Liu XF, Zhen CH, Zhou YJ, Zhu J, Lv JG, Sheng CQ. 2011. Acrosin structure-based design, synthesis and biological activities of 7-azaindol derivatives as new acrosin inhibitors. *Chinese Chemical Letters* **22**:272-275.
- Jin S-K, Yang W-X. 2017. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget* **8**:3600-3627.
- 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.
- Josefberg L, Galiani D, Dantes A, Amsterdam A, Dekel N. 2000. The proteasome is involved in the first metaphase-to-anaphase transition of meiosis in rat oocytes. *Biology of reproduction* **62**:1270-1277.



- Joseph DR. 1994. Structure, Function, and Regulation of Androgen-Binding Protein/Sex Hormone-Binding Globulin. *Advances in Research and Applications - Steroids* **49**:197-280.
- Jumeau F, Sigala J, Dossou-Gbete F, Frimat K, Barbotin AL, Buée L, Béhal H, Sergeant N, Mitchell V. 2018. A-kinase anchor protein 4 precursor (pro-AKAP4) in human spermatozoa. *Andrology* **6**:854-859.
- Kaiser P, Huang L. 2005. Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biology* **6**.
- Kallio M, Mustalahti T, Yen TJ, Lähdetie J. 1998. Immunolocalization of  $\alpha$ -Tubulin,  $\gamma$ -Tubulin, and CENP-E in Male Rat and Male Mouse Meiotic Divisions: Pathway of Meiosis I Spindle Formation in Mammalian Spermatocytes. *Developmental Biology* **195**:29-37.
- Katz DF, Drobnis EZ, Overstreet JW. 1989. Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Research* **22**:443-469.
- Kerns K, Morales P, Sutovsky P. 2016. Regulation of Sperm Capacitation by the 26S Proteasome: An Emerging New Paradigm in Spermatology<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* **94** (117) DOI: 10.1095/biolreprod.115.136622.
- Khawar MB, Gao H, Li W. 2019. Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **7** (195) DOI: 10.3389/fcell.2019.00195.
- Kierszenbaum AL. 2000. Fusion of membranes during the acrosome reaction: A tale of two SNAREs. *Molecular reproduction and development* **57**:309-310.
- Kisselev AF, Goldberg AL. 2001. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chemistry & Biology* **8**:739-758.
- Klingbeil P, Frazzetto G, Bouwmeester T. 2001. Xgravin-like (Xgl), a novel putative a-kinase anchoring protein (AKAP) expressed during embryonic development in *Xenopus*. *Mechanisms of Development* **100**:323-326.
- Kong M, Diaz ES, Morales P. 2009. Participation of the Human Sperm Proteasome in the Capacitation Process and Its Regulation by Protein Kinase A and Tyrosine Kinase<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* **80**:1026-1035.
- Konrádová V, Uhlík J, Vajner L. 2000. *Funkční histologie*. 2. vyd. H & H, Jinočany.
- Kravtsova-Ivantsiv Y, Ciechanover A. 2012. Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. *Journal of Cell Science* **125**:539-548.
- Krey L, Roy E, Lieberburg I, Robbins R. 1978. Intracellular mechanisms in testosterone suppression of luteinizing hormone (LH) secretion. *Journal of Steroid Biochemistry* **9**:875-876.
- Krüger E, Kloetzel P-M, Enenkel C. 2001. 20S proteasome biogenesis. *Biochimie* **83**:289-293.

- Kwon YT, Ciechanover A. 2017. The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends in Biochemical Sciences* **42**:873-886.
- Lahnsteiner F. 2003. The spermatozoa and eggs of the cardinal fish. *Journal of Fish Biology* **62**:115-128.
- Larriva-Sahd J, Orozco H, Hernandez-Pando R, Oliart RM, Musto NA, Larrea F. 1991. Immunohistochemical Demonstration of Androgen-Binding Protein in the Rat Prostatic Gland. *Biology of Reproduction* **45**:417-423.
- Larson EL, Kopania EEK, Good JM. 2018. Spermatogenesis and the Evolution of Mammalian Sex Chromosomes. *Trends in Genetics* **34**:722-732.
- Lauinger L et al. 2017. Thiolutin is a zinc chelator that inhibits the Rpn11 and other JAMM metalloproteases. *Nature Chemical Biology* **13**:709-714.
- Le Couazer D, Bencharif D. 2021. Are AKAP4 and proAKAP4 Found in Canine Semen? Preliminary Results. *Aspects of Nanotechnology* **3**:70-75.
- Le Couazer D, Sergeant N, Jouy N, Michaud S, Loyens A, Delehedde M, Amirat-Briand L, Bencharif D. 2019. Expression of proAKAP4 in dog semen as promising marker of sperm quality. *Reproduction in domestic animals* **54**:73.
- Le Gac F, de Kretser DM. 1982. Inhibin production by sertoli cell cultures. *Molecular and Cellular Endocrinology* **28**:487-498.
- Leblond CP, Clermont Y. 1952. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid? technique. *American Journal of Anatomy* **90**:167-215.
- Lefebvre R, Suarez SS. 1996. Effect of Capacitation on Bull Sperm Binding to Homologous Oviductal Epithelium. *Biology of Reproduction* **54**:575-582.
- Lehti MS, Sironen A. 2017. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects†. *Biology of Reproduction* **97**:522-536.
- Ley SB, Leonard JM. 1985. Male Hypogonadotropic Hypogonadism: Factors Influencing Response to Human Chorionic Gonadotropin and Human Menopausal Gonadotropin, Including Prior Exogenous Androgens. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **61**:746-752.
- Li J, Johnson JA, Su H. 2018. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cardiac disease and protection. *Current Drug Targets* **19**:989-1002.
- Lichnovský V et al. 2001. Repetitorium histologie. 3. přeprac. vyd. Univerzita Palackého, Olomouc.
- Linck RW, Olson GE, Langevin GL. 1981. Arrangement of tubulin subunits and microtubule-associated proteins in the central-pair microtubule apparatus of squid (*Loligo pealei*) sperm flagella. *Journal of Cell Biology* **89**:309-322.

- Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature* **471**:387-391.
- Liu D, Zhen W, Yang Z, Carter JD, Si H, Reynolds KA. 2006. Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *Diabetes* **55**:1043-1050.
- Longo FJ, Cook S. 1991. Formation of the perinuclear theca in spermatozoa of diverse mammalian species: Relationship of the manchette and multiple band polypeptides. *Molecular Reproduction and Development* **28**:380-393.
- Luconi M. 2006. Pathophysiology of sperm motility. *Frontiers in Bioscience* **11**:1433-1447.
- Luconi M. 2011. Role of a-kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction. *Frontiers in Bioscience* **16**:1315-1330.
- Luconi M, Carloni V, Marra F, Ferruzzi P, Forti G, Baldi E. 2004. Increased phosphorylation of AKAP by inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances human sperm motility through tail recruitment of protein kinase A. *Journal of Cell Science* **117**:1235-1246.
- Luconi M, Porazzi I, Ferruzzi P, Marchiani S, Forti G, Baldi E. 2005. Tyrosine Phosphorylation of the A Kinase Anchoring Protein 3 (AKAP3) and Soluble Adenylate Cyclase Are Involved in the Increase of Human Sperm Motility by Bicarbonate<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* **72**:22-32.
- Ma Q, Li Y, Luo M, Guo H, Lin S, Chen J, Du Y, Jiang Z, Gui Y. 2017. The expression characteristics of FAM71D and its association with sperm motility. *Human Reproduction* **32**:2178-2187.
- Maddocks S, Kerr JB, Allenby G, Sharpe RM. 1992. Evaluation of the role of germ cells in regulating the route of secretion of immunoreactive inhibin from the rat testis. *Journal of Endocrinology* **132**:439-448.
- Machin KE. 1963. The control and synchronization of flagellar movement. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* **158**:88-104.
- Martin GB, de St Jorre TJ, Al Mohsen FA, Malecki IA. 2012. Modification of spermatozoa quality in mature small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development* **24**:13-18.
- Martin-DeLeon PA. 2006. Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. *Molecular and Cellular Endocrinology* **250**:114-121.
- Martínez-León E, Osycka-Salut C, Signorelli J, Pozo P, Pérez B, Kong M, Morales P, Pérez-Martínez S, Díaz ES. 2015. Fibronectin stimulates human sperm capacitation through the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Human Reproduction* **30**:2138-2151.
- Matzuk MM, Lamb DJ. 2008. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine* **14**:1197-1213.

- Means CK et al. 2011. An entirely specific type I A-kinase anchoring protein that can sequester two molecules of protein kinase A at mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**:1227-1235.
- Meister S et al. 2007. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Research* **67**:1783-1792.
- Miki K, Eddy EM. 1998. Identification of Tethering Domains for Protein Kinase A Type I $\alpha$  Regulatory Subunits on Sperm Fibrous Sheath Protein FSC1. *Journal of Biological Chemistry* **273**:34384-34390.
- Miki K, Eddy EM. 1999. Single Amino Acids Determine Specificity of Binding of Protein Kinase A Regulatory Subunits by Protein Kinase A Anchoring Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **274**:29057-29062.
- Miki K, Willis WD, Brown PR, Goulding EH, Fulcher KD, Eddy EM. 2002. Targeted Disruption of the Akap4 Gene Causes Defects in Sperm Flagellum and Motility. *Developmental Biology* **248**:331-342.
- Miller MR, Mannowetz N, Iavarone AT, Safavi R, Gracheva EO, Smith JF, Hill RZ, Bautista DM, Kirichok Y, Lishko PV. 2016. Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science* **352**:555-559.
- Mofers A, Pellegrini P, Linder S, D'Arcy P. 2017. Proteasome-associated deubiquitinases and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **36**:635-653.
- Moiseeva TN, Bottrill A, Melino G, Barlev NA. 2013. DNA damage-induced ubiquitylation of proteasome controls its proteolytic activity. *Oncotarget* **4**:1338-1348.
- Molina LCP, Luque GM, Balestrini PA, Marín-Briggiler CI, Romarowski A, Buffone MG. 2018. Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **6** (72) DOI: 10.3389/fcell.2018.00072.
- Morisawa M. 1994. Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zoological Science* **11**:647-662.
- Mortimer D. 2018. The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *MHR: Basic science of reproductive medicine* **24**:567-592.
- Morton B, Albagli L. 1973. Modification of hamster sperm adenylyl-cyclase by capacitation in-vitro. *Biochemical and Biophysical Research communication* **50**:697-703.
- Myles DG, Primakoff P. 1997. Why did the Sperm Cross the Cumulus? To Get to the Oocyte. Functions of the Sperm Surface Proteins PH-20 and Fertilin in Arriving at, and Fusing With, the Egg1. *Biology of Reproduction* **56**:320-327.
- Nakagawa A, Shiratsuchi A, Tsuda K, Nakanishi Y. 2005. In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells. *Molecular Reproduction and Development* **71**:166-177.

- Nipper RW, Chennothukuzhi V, Tutuncu L, Williams CJ, Gerton GL, Moss SB. 2005. Differential RNA expression and polyribosome loading of alternative transcripts of the Akap4 gene in murine spermatids. *Molecular Reproduction and Development* **70**:397-405.
- Nishigaki T, José O, González-Cota AL, Romero F, Treviño CL, Darszon A. 2014. Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **450**:1149-1158.
- Nixon B et al. 2019. A Kinase Anchor Protein 4 Is Vulnerable to Oxidative Adduction in Male Germ Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **7** (319) DOI: 10.3389/fcell.2019.00319.
- Ohnishi H, Samuelson LC, Yule DI, Ernst SA, Williams JA. 1997. Overexpression of Rab3D enhances regulated amylase secretion from pancreatic acini of transgenic mice. *Journal of Clinical Investigation* **100**:3044-3052.
- Oko R. 1988. Comparative Analysis of Proteins from the Fibrous Sheath and Outer Dense Fibers of Rat Spermatozoa. *Biology of Reproduction* **39**:169-182.
- Oliva R, Dixon GH. 1991. Vertebrate Protamine Genes and the Histone-to-Protamine Replacement Reaction. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **40**:25-94.
- Otani H, Tanaka O, Kasai K-I, Yoshioka T. 1988. Development of mitochondrial helical sheath in the middle piece of the mouse spermatid tail: Regular dispositions and synchronized changes. *The Anatomical Record* **222**:26-33.
- Otová B, Mihalová R. 2012. *Základy biologie a genetiky člověka*. Karolinum, Praha.
- Page ST, Amory JK, Bowman FDB, Anawalt BD, Matsumoto AM, Bremner WJ, Tenover JL. 2005. Exogenous Testosterone (T) Alone or with Finasteride Increases Physical Performance, Grip Strength, and Lean Body Mass in Older Men with Low Serum T. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **90**:1502-1510.
- Parks JE, Hammerstedt RH. 1985. Developmental Changes Occurring in the Lipids of Ram Epididymal Spermatozoa Plasma Membrane 1. *Biology of Reproduction* **32**:653-668.
- Pereira R, Sá R, Barros A, Sousa M. 2015. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian Journal of Andrology* **19**:5-14.
- Pesch S, Bergmann M. 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* **37**:597-612.
- Petrunkina AM, Simon K, Gunzel-Apel A-R, Topfer-Petersen E. 2003. Regulation of Capacitation of Canine Spermatozoa during Co-culture with Heterologous Oviductal Epithelial Cells. *Reproduction in Domestic Animals* **38**:455-463.
- Phillips DM. 1969. Exceptions to the prevailing pattern of tubules (9 + 9 + 2) in the sperm flagella of certain insect species. *Journal of Cell Biology* **40**:28-43.

- Pickart CM, Fushman D. 2004. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Current Opinion in Chemical Biology* **8**:610-616.
- Quill TA, Ren D, Clapham DE, Garbers DL. 2001. A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**:12527-12531.
- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL. 2011. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**:14869-14874.
- Rajoriya JS et al. 2020. Exogenous cholesterol prevents cryocapacitation-like changes, membrane fluidity, and enhances in vitro fertility in bubaline spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* **55**:726-736.
- Rawe VY, Payne C, Navara C, Schatten G. 2004. WAVE1 intranuclear trafficking is essential for genomic and cytoskeletal dynamics during fertilization: cell-cycle-dependent shuttling between M-phase and interphase nuclei. *Developmental Biology* **276**:253-267.
- Rattner JB. 1972. Observations of centriole formation in male meiosis. *Journal of Cell Biology* **54**:20-29.
- Reggi E, Diviani D. 2017. The role of A-kinase anchoring proteins in cancer development. *Cellular Signalling* **40**:143-155.
- Rehfeld A, Nylander M, Karnov K. 2017. The Male Reproductive System. 569-592 in *Compendium of Histology*. Springer International Publishing, Cham.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE. 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* **413**:603-609.
- Rivkin E, Tres LL, Kierszenbaum AL. 2008. Genomic origin, processing and developmental expression of testicular outer dense fiber 2 (ODF2) transcripts and a novel nucleolar localization of ODF2 protein. *Molecular Reproduction and Development* **75**:1591-1606.
- Rodrigues BC, Sousa M. 2017. Basic Aspects of Spermatogenesis. *Andrology: Current and Future Developments* **1**:80-125.
- Rubinstein S, Breitbart H. 1991. Role of spermine in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biochemical Journal* **278**:25-28.
- Russell LD, Clermont Y. 1977. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *The Anatomical Record* **187**:347-365.
- Russell LD, Ettlín RA, Hikim APS, Clegg ED. 1993. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *International Journal of Andrology* **16**:83-83.
- Sadanandom A, Bailey M, Ewan R, Lee J, Nelis S. 2012. The ubiquitin–proteasome system: central modifier of plant signalling. *New Phytologist* **196**:13-28.

- Sakai Y, Yamashina S. 1989. Mechanism for the removal of residual cytoplasm from spermatids during mouse spermiogenesis. *The Anatomical Record* **223**:43-48.
- Sakkiah S, Cao GP, Gupta SP, Lee KW. 2017. Overview of the Structure and Function of Protein Kinases. *Current Enzyme Inhibition* **13**:81-88.
- Saldívar-Hernández A, González-González ME, Sánchez-Tusié A, Maldonado-Rosas I, López P, Treviño CL, Larrea F, Chirinos M. 2015. Human sperm degradation of zona pellucida proteins contributes to fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology* **13** (99) DOI: 10.1186/s12958-015-0094-0.
- Salling PM. 1998. Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. *Oxford reviews of reproductive biology* **11**:339-388.
- Sapiro R, Kostetskii I, Olds-Clarke P, Gerton GL, Radice GL, Strauss JF. 2002. Male Infertility, Impaired Sperm Motility, and Hydrocephalus in Mice Deficient in Sperm-Associated Antigen 6. *Molecular and Cellular Biology* **22**:6298-6305.
- Saravia F, Núñez-Martínez I, Morán JM, Soler C, Muriel A, Rodríguez-Martínez H, Peña FJ. 2007. Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. *Theriogenology* **68**:196-203.
- Scadding SR. 1978. Testosterone and 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone inhibit both growth and spermatogenesis in the remaining testis in partially castrated adult newts, *Notophthalmus viridescens*. *Journal of Experimental Zoology* **205**:403-411.
- Sergeant N, Briand-Amirat L, Bencharif D, Delehedde M. 2019. The Sperm Specific Protein Proakap4 as an Innovative Marker to Evaluate Sperm Quality and Fertility. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences* **11** (555803) DOI: 10.19080/JDVS.2019.11.555803.
- Sharma S, Qian F, Keitz B, Driscoll D, Scanlan MJ, Skipper J, Rodabaugh K, Lele S, Old LJ, Odunsi K. 2005. A-kinase anchoring protein 3 messenger RNA expression correlates with poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* **99**:183-188.
- Sherman DJ, Li J. 2020. Proteasome Inhibitors: Harnessing Proteostasis to Combat Disease. *Molecules* **25** (671) DOI: 10.3390/molecules25030671.
- Shimada K, Park S, Miyata H, Yu Z, Morohoshi A, Oura S, Matzuk MM, Ikawa M. 2021. ARMC12 regulates spatiotemporal mitochondrial dynamics during spermiogenesis and is required for male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118** (e2018355118) DOI:10.1073/pnas.2018355118.
- Schanbacher BD, Ford JJOE. 1979. Photoperiodic Regulation of Ovine Spermatogenesis: Relationship to Serum Hormones. *Biology of Reproduction* **20**:719-726.
- Schultz MC, Leblond CP. 1990. Nucleolar structure and synthetic activity during meiotic prophase and spermiogenesis in the rat. *American Journal of Anatomy* **189**:1-10.

- Singh AP, Rajender S. 2015. CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reproductive BioMedicine Online* **30**:28-38.
- Skroblin P, Grossmann S, Schäfer G, Rosenthal W, Klussmann E. 2010. Mechanisms of Protein Kinase A Anchoring. *International review of cell and molecular biology* **283**:235-330.
- Slípka J, Tonar Z. 2019. *Základy embryologie. 2., upravené vydání.* Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, Praha.
- Smith FD, Reichow SL, Esseltine JL, Shi D, Langeberg LK, Scott JD, Gonen T. 2013. Intrinsic disorder within an AKAP-protein kinase A complex guides local substrate phosphorylation. *ELife* 2 (e01319) DOI: 10.7554/eLife.01319.
- Snustad DP, Simmons MJ. 2017. *Genetika. Druhé, aktualizované vydání.* Masarykova univerzita, Brno.
- Soderling SH, Beavo JA. 2000. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Current Opinion in Cell Biology* **12**:174-179.
- Sreekrishna V. 2000. *Comprehensive Biotechnology, Volume I: Cell Biology and Genetics.* New Age International Ltd, New Delhi.
- Sterz J, Metzler I von, Hahne J-C, Lamottke B, Rademacher J, Heider U, Terpos E, Sezer O. 2008. The potential of proteasome inhibitors in cancer therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **17**:879-895.
- Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. 2011. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca<sup>2+</sup> influx in human sperm. *Nature* **471**:382-386.
- Su T, Yang M, Wang P, Zhao Y, Ma C. 2020. Interplay between the Ubiquitin Proteasome System and Ubiquitin-Mediated Autophagy in Plants. *Cells* 9 (2219) DOI: 10.3390/cells9102219.
- Suarez SS. 2008. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *The International Journal of Developmental Biology* **52**:455-462.
- Suede SH, Malik A, Sapra A. 2021. *Histology, Spermatogenesis.* StatPearls Publishing, Treasure Island, Florida.
- Suja Jé A, del Cerro AL, Page Jús, Rufas JS, Santos JL. 2000. Meiotic sister chromatid cohesion in holocentric sex chromosomes of three heteropteran species is maintained in absence of axial elements. *Chromosoma* **109**:35-43.
- Sutovsky P, Manandhar G, McCauley TC, Caamaño JN, Sutovsky M, Thompson WE, Day BN. 2004. Proteasomal Interference Prevents Zona Pellucida Penetration and Fertilization in Mammals. *1. Biology of Reproduction* **71**:1625-1637.



- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. 2000. Ubiquitinated Sperm Mitochondria, Selective Proteolysis, and the Regulation of Mitochondrial Inheritance in Mammalian Embryos<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* **63**:582-590.
- Suzuki F. 1988. Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes during epididymal maturation of golden hamster spermatozoa. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* **100**:39-54.
- Swierstra EE, Gebauer MR, Pickett BW. 1974. Reproductive physiology of the stallion. *Reproduction* **40**:113-123.
- Syifa N et al. 2020. Phosphoproteomics and Bioinformatics Analyses Reveal Key Roles of GSK-3 and AKAP4 in Mouse Sperm Capacitation. *International Journal of Molecular Sciences* **21** (19) DOI: 10.3390/ijms21197283.
- Talbot P, Kleve MG. 1978. Hamster sperm cross react with antiactin. *Journal of Experimental Zoology* **204**:131-136.
- Tanaka H, Iguchi N, Toyama Y, Kitamura K, Takahashi T, Kaseda K, Maekawa M, Nishimune Y. 2004. Mice Deficient in the Axonemal Protein Tektin-t Exhibit Male Infertility and Immotile-Cilium Syndrome Due to Impaired Inner Arm Dynein Function. *Molecular and Cellular Biology* **24**:7958-7964.
- Tapanainen JS, Aittomäki K, Min J, Vaskivuo T, Huhtaniemi IT. 1997. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nature Genetics* **15**:205-206.
- Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. 1990. cAMP-dependent protein kinase: Framework for a diverse family of regulatōry enzymes. *Annual Review of Biochemistry* **59**:971-1005.
- Taylor SS, Knighton DR, Zheng J, Ten Eyck LF, Sowadski JM. 1992. Structural Framework for the Protein Kinase Family. *Annual Review of Cell Biology* **8**:429-462.
- Teves ME, Roldan ERS. 2022. Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. *Physiological Reviews* **102**:7-60.
- Tichý F, Horký D, Buchtová M, Gorošová A, Kociánová I, Páral V, Zibrín M. 2004. *Histologie: mikroskopická anatomie*. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno.
- Tipler C, Hutchon SP, Hendil K, Tanaka K, Fishel S, Mayer RJ. 1997. Purification and characterization of 26S proteasomes from human and mouse spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* **3**:1053-1060.
- Tomes CN, De Blas GA, Michaut MA, Farré EV, Cherhiti O, Visconti PE, Mayorga LS. 2005. A-SNAP and NSF are required in a priming step during the human sperm acrosome reaction. *MHR: Basic science of reproductive medicine* **11**:43-51.
- Tranter R, Read JA, Jones R, Brady RL. 2000. Effector Sites in the Three-Dimensional Structure of Mammalian Sperm  $\beta$ -Acrosin. *Structure* **8**:1179-1188.

- Trebichalská Z, Holubcová Z. 2020. Perfect date—the review of current research into molecular bases of mammalian fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **37**:243-256.
- Tsubuki S, Saito Y, Tomioka M, Ito H, Kawashima S. 1996. Differential Inhibition of Calpain and Proteasome Activities by Peptidyl Aldehydes of Di-Leucine and Tri-Leucine. *Journal of Biochemistry* **119**:572-576.
- 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.
- Turner RM. 2006. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development* 18 (1131) DOI: 10.3390/antiox10071131.
- Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohé L. 1999. Dual Function of the Selenoprotein PHGPx During Sperm Maturation. *Science* **285**:1393-1396.
- Vannelli GB, Barni T, Forti G, Negro-Vilar A, Vale W, Serio M, Balboni GC. 1992. Immunolocalization of inhibin alpha-subunit in the human testis. A light-and electron-microscopy study. *Cell & Tissue Research* **269**:221-227.
- Varano G, Lombardi A, Cantini G, Forti G, Baldi E, Luconi M. 2008. Src activation triggers capacitation and acrosome reaction but not motility in human spermatozoa. *Human Reproduction* **23**:2652-2662.
- Virtanen I, Badley RA, Paasivuo R, Lehto VP. 1984. Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *Journal of Cell Biology* **99**:1083-1091.
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning XP, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS. 1999. Cholesterol Efflux-mediated Signal Transduction in Mammalian Sperm. *Journal of Biological Chemistry* **274**:3235-3242.
- Visconti PE, Kopf GS. 1998. Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction* **59**:1-6.
- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* **121**:1139-1150.
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W. 1999. The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis. *Annual Review of Biochemistry* **68**:1015-1068.
- Walsh DA, Glass DB, Mitchell RD. 1992. Substrate diversity of the cAMP-dependent protein kinase: regulation based upon multiple binding interactions. *Current Opinion in Cell Biology* **4**:241-251.

- Wang X, Meul T, Meiners S. 2020. Exploring the proteasome system: A novel concept of proteasome inhibition and regulation. *Pharmacology & Therapeutics* 211 (107526) DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107526.
- Westhoff D, Kamp G. 1997. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Journal of Cell Science* **110**:1821-1829.
- Wilkinson KD. 2005. The discovery of ubiquitin-dependent proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**:15280-15282.
- Wilmot I, Hunter RHF. 1984. Sperm transport into the oviducts of heifers mated early in oestrus. *Reproduction Nutrition Développement* **24**:461-468.
- Windler F, Bönigk W, Körschen HG, Grahn E, Strünker T, Seifert R, Kaupp UB. 2018. The solute carrier SLC9C1 is a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger gated by an S4-type voltage-sensor and cyclic-nucleotide binding. *Nature Communications* 9 (2809) DOI: 10.1038/s41467-018-05253-x.
- Wojcik C, Benchaib M, Lornage J, Czyba JC, Guerin JF. 2000. Proteasomes in human spermatozoa. *International Journal of Andrology* **23**:169-177.
- Worawittayawong P, Leigh C, Weerachatanukul W, Manochantr S, Sobhon P, Breed WG, Sretarugsa P. 2008. Changes in distribution of basic nuclear proteins and chromatin organization during spermiogenesis in the greater bandicoot rat, *Bandicota indica*. *Cell and Tissue Research* **334**:135-144.
- Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevallier P, Sautière P. 1998. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* **80**:117-128.
- Xi H, Ren F, Li Y, Du Y, Wang L, Hu J. 2021. Changes in histology, protein expression, and autophagy in dairy goat testes during nonbreeding season. *Biology of Reproduction* **105**:1344-1354.
- Yagi A, Paranko J. 1995. Actin, alpha-actinin, and spectrin with specific associations with the postacrosomal and acrosomal domains of bovine spermatozoa. *The Anatomical Record* **241**:77-87.
- Yamada T, Matsumori A, Sasayama S. 1994. Therapeutic effect of anti-tumor necrosis factor-alpha antibody on the murine model of viral myocarditis induced by encephalomyocarditis virus. *Circulation* **89**:846-851.
- Yániz JL, Capistrós S, Vicente-Fiel S, Hidalgo CO, Santolaria P. 2016. A comparative study of the morphometry of sperm head components in cattle, sheep and pigs with a computer-assisted fluorescence method. *Asian Journal of Andrology* **18**:840-843.
- Yi Y-J, Zimmerman SW, Manandhar G, Odhiambo JF, Kennedy C, Jonáková V, Maňásková-Postlerová P, Sutovsky M, Park C-S, Sutovsky P. 2012. Ubiquitin-activating enzyme (UBA1) is required for sperm capacitation, acrosomal exocytosis and sperm-egg coat penetration during porcine fertilization. *International Journal of Andrology* **35**:196-210.

- Zendman AJW, Ruiter DJ, Van Muijen GNP. 2003. Cancer/testis-associated genes: Identification, expression profile, and putative function. *Journal of Cellular Physiology* **194**:272-288.
- Zhang D et al. 2018. The transcription factor SOX30 is a key regulator of mouse spermiogenesis. *Development* 145 (dev164723) DOI:10.1242/dev.164723.
- Zhao W, Li Z, Ping P, Wang G, Yuan X, Sun F. 2018. Outer dense fibers stabilize the axoneme to maintain sperm motility. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **22**:1755-1768.
- Zhu W-J. 2020. Ultrastructural Morphology of Human Sperm Neck. *Atlas of Human Sperm Ultrastructural Morphology*. Springer Singapore, Singapore.
- Zigo M, Jonakova V, Manaskova-Postlerova P, Kerns K, Sutovsky P. 2019. Ubiquitin-proteasome system participates in the de-aggregation of spermadhesins and DQH protein during boar sperm capacitation. *Reproduction* **157**:283-295.
- Zippin JH, Chen Y, Nahirney P, Kamenetsky M, Wuttke MS, Fischman DA, Levin LR, Buck J. 2002. Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *The FASEB Journal* **17**:82-84.
- Zolman JC, Valenta LJ. 1981. Effect of calcium and potassium on basal and gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) stimulated release of luteinizing hormone (LH). *Acta Endocrinologica* **97**:26-32.