

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Úloha vybraných proteinů při kapacitaci a akrozomální
reakci kančích spermií**

Diplomová práce

Autor: Bc. Jana Krajčírová

Obor studia: Biotechnologie a šlechtění zvířat

Vedoucí práce: prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Úloha vybraných proteinů při kapacitaci a akrozomální reakci kančích spermií" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Mgr. Ing. Markétě Sedmíkové, Ph. D. za odborné vedení mé diplomové práce a cenné rady. Další mé poděkování patří RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D., Ing. Anetě Pilsové a Ing. Zuzaně Pilsové za metodické vedení mé práce v laboratořích, pomoc ve chvílích, kdy jsem byla v koncích a nevyčíslitelnou trpělivost při konzultacích mé diplomové práce. V neposlední řadě děkuji svým rodičům za nezměrnou podporu při studiu, bez které bych toto studium nedokončila.

Úloha vybraných proteinů při kapacitaci a akrozomální reakci kančích spermií

Souhrn

Diplomová práce byla zacílena na úlohu vybraných proteinů kančích spermií při procesu kapacitace a akrozomální reakce. Zvoleným proteinem se stal sulfan produkující enzym cystathionin- γ -lyáza (CSE). Tento enzym spolu s cystathionin- β -syntázou (CBS) a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázou (3-MST) syntetizuje intracelulární sulfan (H_2S). H_2S je plynná signální molekula, která se vyskytuje i v savčím organismu. Sulfan zajišťuje v různých orgánových soustavách mnoho fyziologických procesů. Sulfan byl popsán i v reprodukční soustavě, kde se zapojuje i do procesu kapacitace spermií. Cílem teoretické části práce bylo shrnutí obecných poznatků o spermiogenezi a následných dějích, které vedou k procesu oplození. Práce byla zacílená na kapacitaci a akrozomální reakci u spermií savců. Literární rešerše dále pojednává o sulfanu a o enzymech, které tuto molekulu produkují.

Praktická část byla zaměřena na detekci přítomnosti sulfan produkujícího enzymu CSE v kančích spermiích. Vzorky byly získávány z komerčně dostupných inseminačních dávek. Expres CSE byla sledována pomocí specifických protilátek. Lokalizace a exprese tohoto enzymu byla detekována pomocí metody Western blot a nepřímé imunofluorescence s využitím fluorescenční a konfokální mikroskopie. Přítomnost CSE byla v kančích spermiích prokázána. Metody, které byly použity, prokázaly, že výskyt tohoto enzymu se během kapacitace a akrozomální reakce snižuje.

Klíčová slova: spermie, kapacitace, akrozomální reakce, enzymy, sulfan, CSE

The role of selected proteins in boar sperm capacitation and acrosomal reaction

Summary

The thesis focused on the role of selected proteins of boar sperm in the process of capacitation and acrosome reaction. The selected protein was the sulphur-producing enzyme cystathionine- γ -lyase (CSE). This enzyme, together with cystathionine- β -synthase (CBS) and 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase (3-MST), synthesizes intracellular sulphur (H_2S). H_2S is a gaseous signaling molecule that is also found in mammalian organisms. H_2S provides many physiological processes in various organ systems. H_2S has also been described in the reproductive system, where it is involved in the process of sperm capacitation. The aim of the theoretical part of the thesis was to summarize the general knowledge about spermatogenesis and the subsequent events that lead to the fertilization process. The work was focused on capacitation and the acrosome reaction in mammalian spermatozoa. The literature search further discusses H_2S and the enzymes that produce this molecule.

The practical part was focused on the detection of the presence of the sulfur-producing enzyme CSE in boar spermatozoa. Samples were obtained from commercially available insemination doses. CSE expression was monitored using specific antibody. The localization and expression of this enzyme was detected by Western blot and indirect immunofluorescence using epifluorescent and confocal microscopy. The presence of CSE in boar spermatozoa was proven. The used methods showed that the occurrence of this enzyme decreases during capacitation and acrosome reaction.

Keywords: sperm, capacitation, acrosomal reaction, enzymes, H_2S , CSE

Obsah

Obsah	7
1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Spermatogeneze	11
3.1.1 Spermatocytogeneze	11
3.1.2 Spermiohistogeneze	13
3.2 Morfologie spermie	15
3.2.1 Hlavička spermie	16
3.2.2 Akrozom	17
3.2.3 Krček spermie	17
3.2.4 Bičík spermie	18
3.2.5 Plazmatická membrána	18
3.3 Epididymální maturace	19
3.4 Kapacitace	21
3.5 Akrozomální reakce	24
3.6 Gasotransmitery	25
3.6.1 Sulfan	26
3.6.2 Enzymy produkující sulfan	27
3.6.3 Výskyt a funkce sulfanu v savčím organismu.....	29
3.6.4 Sulfan v reprodukci	30
4 Metodika	33
4.1 Zpracování biologického materiálu	33
4.1.1 Lyzace vzorků spermií	33
4.2 SDS elektroforéza a Western blot	34
4.2.1 Použité chemikálie a roztoky	34
4.2.2 SDS elektroforéza.....	35
4.2.3 Western blot metoda.....	36
4.2.4 Imunodetekce pomocí protilátky	37
4.3 Nepřímá imunofluorescence	37
4.3.1 Použité chemikálie a roztoky	37
4.3.2 Postup	38
4.4 Statistické vyhodnocení	38
5 Výsledky	39

5.1	Detekce enzymu produkující sulfan CSE v kančích spermích.....	39
5.2	Lokalizace enzymu produkující sulfan CSE v kančích spermích.....	41
6	Diskuze.....	45
7	Závěr.....	47
8	Literatura.....	48

1 Úvod

Savčí spermie, které opouští varle, nejsou zcela schopny dosáhnout úspěšného oplodnění za normálních okolností *in vivo*, i přes to, že jsou zcela zralé a motilní. Proto musí nejprve podstoupit mnoho maturačních procesů, následnou kapacitaci a akrozomální reakci. Tyto složité děje umožňují spermii dosáhnout schopnosti oplodnění. Během procesu kapacitace dochází k fyziologickým změnám, které souvisí s hyperaktivací pohybu spermie, následné uvolnění spermii z oviduktálního rezervoáru a přípravě spermie na splnutí s vajíčkem (Yanagimachi 1994). Všechny tyto procesy jsou spojeny se spoustou proteinových změn, a to jak uvnitř spermatické buňky, tak na jejím povrchu. Je tomu tak právě u proteinů semenné plazmy, které se při ejakulaci vážou na povrch spermie. Jejich přítomnost je nezbytná pro ochranu a zajištění přežitelnosti spermii v samičím reprodukčním traktu (Evans & Kopf 1998; Töpfer-Petersen 1999).

Reaktivní formy síry již nejsou považovány za škodlivé molekuly vedoucí k oxidačnímu stresu a apoptóze. Považují se za základní signální molekuly, které se účastní mnoha fyziologických událostí, jako je právě vývoj spermii, zrání a kapacitace. Sulfan (H_2S) je nejnověji objevená plynná molekula, která patří do rodiny Gasotransmitterů. Podílí se na různých biologických funkcích, stejně jako oxid dusnatý (NO) a oxid uhelnatý (CO). U savců může být sulfan syntetizován enzymatickými nebo neenzymatickými cestami (Kolluru et al. 2013). Sulfan je v savčích tkáních produkován enzymy cystathionin- β -syntázou (CBS), cystathionin- γ -lyázou (CSE) a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázou (3-MST) (Łowicka & Bełtowski 2007). Tyto enzymy využívají jako substrát aminokyselinu L-cystein a produkují různé množství sirovodíku (Starka 2009).

Produkce sulfanu byla nalezena v různých tkáních savců, v nichž má sulfan svoji specifickou funkci. Tento plynný přenašeč byl lokalizován a následně popsán například v kardiovaskulárním systému. Podporuje neokapilarizaci, hypotenzi, chrání srdce před srdeční zástavou a zabraňuje vzniku arteriosklerózy (Łowicka & Bełtowski 2007). Sulfan také působí v nervovém systému. Jednou z jeho hlavních funkcí je ochrana neuronových buněk před oxidativním stresem (Eto et al. 2002). Sulfan je dále důležitý v gastrointestinálním traktu. Nachází se v játrech, ledvinách, ale i buňkách pankreatu. Nízká až nedostatečná koncentrace sulfanu může být příčinou arteriální a plicní hypertonie, Alzheimerovy choroby, poškození žaludeční sliznice a jaterní cirhózy. Naopak zvýšená koncentrace může mít za následek zánětlivé onemocnění, srdeční selhání, mozkovou mrtvici a mentální postižení u pacientů s Downovým syndromem (Łowicka & Bełtowski 2007).

V poslední době se však v nedávných studiích potvrdilo, že se sulfan podílí i na reprodukčních procesech. Expresí enzymů, které regulují produkci sulfanu, byly detekovány v samčím i samičím reprodukčním systému. Účinky sulfanu napomáhají kontrakci dělohy, vývoji oocytů, regulaci funkce varlat a erekci penisu. Navíc byl tento plynný přenašeč nalezen i v oocytech, folikulárních buňkách a spermii (Sugiura et al. 2005; Liang et al. 2006; Guzmán et al. 2006; Liang et al. 2007; d'Emmanuele et al. 2009; Patel et al. 2009; Srilatha et al. 2009). Z výsledků těchto studií se dá usuzovat, že sulfan má důležitou roli v samičí i samčí reprodukci.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

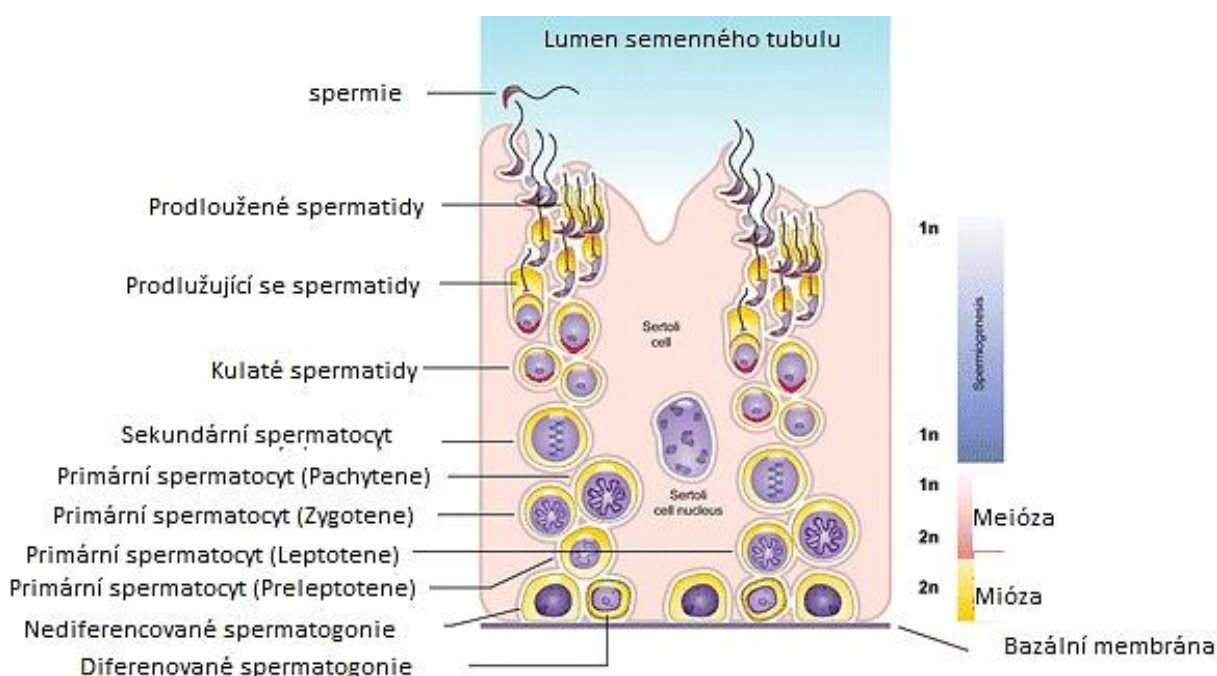
Nutnou podmínkou pro získání oplození schopnosti spermie je projít procesy kapacitace a akrozomální reakce. To jsou velmi složité, a ne zcela detailně objasněné děje, během kterých dochází ke změnám v proteinovém profilu spermie. Změny se týkají skladby jak povrchových, tak intracelulárních proteinů spermie. Cílem práce je ověřit hypotézu, kdy vybraný protein kančích spermíí sulfan produkující enzym CSE se podílí na kapacitaci a akrozomální reakci a jeho exprese a lokalizace v buňce se během těchto procesů mění. Pro ověření hypotézy byla k detekci enzymu CSE využita metoda Western blot a nepřímá imunofluorescence.

3 Literární rešerše

3.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze je postupný děj diferenciacie a opětovného dělení spermatogenních kmenových buněk vedoucí ke vzniku zralé spermie schopné pohybu a možnosti oplodnit samičí pohlavní buňku (viz Obrázek 1). Ke spermatogenezi dochází v semenotvorných tubulech varlat. Krevní cévy, nervy, lymfatické kapiláry a Leydigovy buňky jsou uloženy mimo semenotvorné tubuly v intersticiálním prostoru, zatímco zárodečné buňky a Sertoliho buňky sídlí v semenotvorných kanálcích. Sertoliho buňky podporují vývoj samčích zárodečných buněk. (Parrish et al. 2017).

Proces spermatogeneze lze rozčlenit do dvou cyklů (spermatocytogeneze a spermatohistogeneze) a tří fází (množení, růstu a zrání) (Leblond & Clermont 1952).



Obrázek 1: Spermatogeneze – schématické znázornění u myši (Převzato a upraveno z Teves & Ronal 2022).

3.1.1 Spermatocytogeneze

Spermatocytogeneze je proces, který se odehrává ve stočených semenotvorných kanálcích varlete. Po dosažení pohlavní dospělosti probíhá vývoj vznikajících spermií ve třech základních fázích – množení, růst a zrání (viz Obrázek 2) (Russell et al. 1993).

Spermatogeneze vyžaduje opakující se diferenciaci a následnou obnovu samčích zárodečných buněk. Obnovu zajišťují postupná mitotická dělení spermatogenních kmenových buněk a spermatogonií. Samčí zárodečné buňky tedy čekají dva možné osudy. Buď se duplikuje pomocí mitózy, nebo vstoupí do meiózy, která vede k redukci počtu

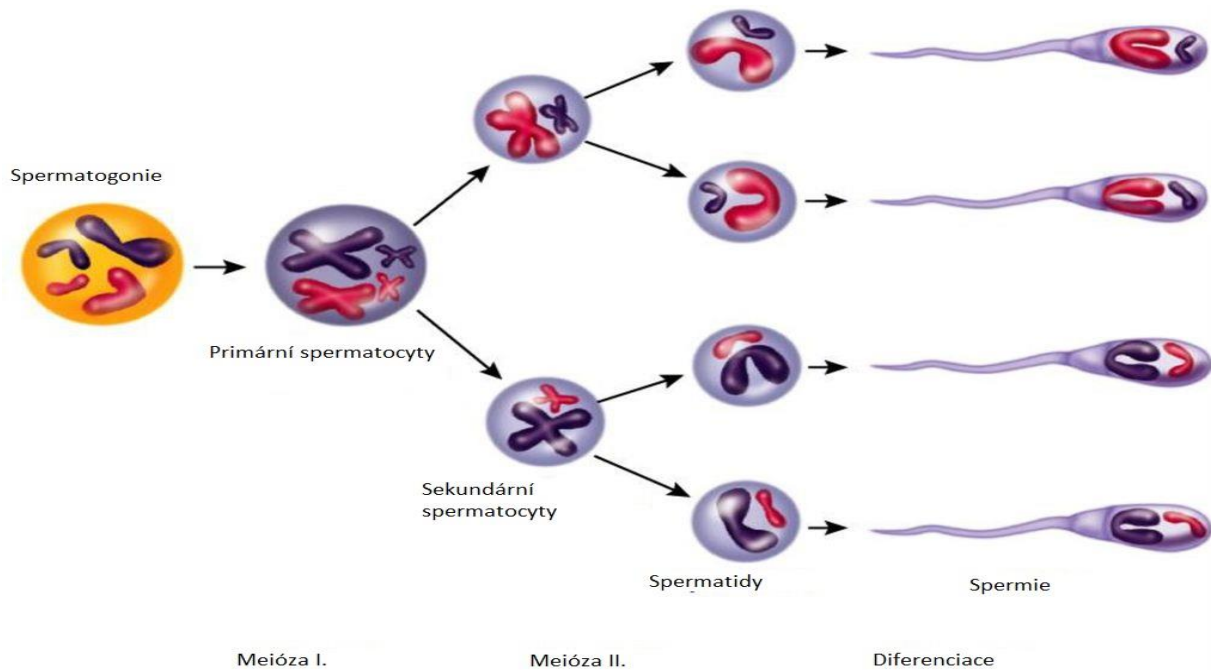
chromozomů na polovinu a následně k diferenciaci buněk procesem nazývaným spermatohistogeneze. Proliferativní fáze, tedy mitóza a meiotická fáze mohou probíhat buď souběžně (obnova a diferenciacie buněk nastává ve stejný čas v každém segmentu semenotvorného tubulu), nebo sekvenčně (po ukončení proliferativní fáze následuje meiotická fáze v každé jednotlivé zárodečné buňce). Proliferativní fáze se prostorově vyskytuje v kompartmentu semenotvorného tubulu hojném na živiny, zatímco buňky procházející diferenciací se nacházejí v adluminálním kompartmentu a jsou navíc chráněny před imunitní obranou díky hematotestikulární bariéře (Sutovsky & Manandhar 2006).

Fáze množení spočívá v mitotickém dělení kmenových buněk. U kance začíná fáze množení vnikáním nediferencované spermatogoniální kmenové buňky typu A do proliferativního pólu. Z tohoto důvodu se jedna dceřiná buňka vrací do pólu spermatogoniálních kmenových buněk, zatímco druhá dceřiná buňka, spermatogonie A1, dále pokračuje v dělení a diferenciaci. Dojde tedy ke vzniku dvou typů spermatogonie A2, které přetrvávají spojeny cytoplazmatickými můstky podobně jako všechny následné dceřiné buňky. Buňky typu A2 se dále mitoticky dělí, čímž dávají vzniknout čtyřem spermatogoniím typu A3, osm typu A4, 16 intermediálních spermatogonií, 32 spermatogonií typu B a na závěr 64 primárních spermatocytů (França et al. 2005).

Další fází spermatocytogeneze je fáze růstu. Při tomto stádiu dochází k růstu spermatogonií typu B a k následným změnám v jádře buněk. Ze spermatogonií typu B vznikají primární spermatocyty (França et al. 2005).

Třetí fází vývoje spermie je fáze zrání. Tento proces je charakterizován meiózou, při které dochází k prvnímu a druhému zracímu dělení. Během prvního meiotického dělení vznikají z primárních spermatocytů spermatocyty sekundární a z nich při druhém meiotickém dělení se vytvoří spermatidy s haploidním počtem chromozomů. První zrací dělení má mnohem delší profázi, než je tomu u ostatních buněk. Tento dlouhý proces lze rozdělit na leptotene, zygotene, pachytene a diplotene (de Kretser et al. 1998). Při fázi leptotene dochází ke spiralizaci a kondenzaci chromozomů. Zygotene je fáze, ve které vzniká tvorba bivalentů, kdy se k sobě připojují dva homologní chromozomy. Pachytene je fáze, která má za následek zkracování bivalentů. Z tohoto důvodu se každý chromozom zvlášť rozděluje na dvě chromatidy. Následně jsou všechny bivalenty tvořeny tetradami. Dále následuje proces crossing-over, jehož podstatou je vzájemná výměna genetického materiálu (Tanaka & Baba 2005). V diplotene stadiu dochází k oddělování chromozomů, ale jejich chromatidy zůstávají stále spojené v místech, tzv. chiasmatech, kde ještě probíhá výměna genetické informace. V diakinezi se bivalentní chromozómy nadále zkracují a v místě centromery se už jen spojují. Dalším následujícím dějem meiozy je metafáze I.. Na začátku metafáze I. dojde k rozpuštění jaderné membrány, jádro zaniká a následně se tvoří dělicí vřeténko. Bivalentní chromozomy se uspořádají do ekvatoriální roviny. Následuje stadium anafáze I.. Při tomto ději se homologní chromozomy přesouvají k opačnému pólu buňky, protože centromery se rozdělily. Ve stádiu telofáze I. vznikají dva sekundární spermatocyty s polovičním počtem chromozomů. Po krátké telofáze začíná druhé zrací dělení, během kterého dochází ke vzniku čtyř spermatid. Dvě spermatidy obsahují chromozom X a zbylé dvě chromozom Y. Vznikem

spermatid skončilo zrcí dělení a následuje proces spermiogeneze (Phillips et al. 2010; Ohkura 2015).



Obrázek 2: Jednotlivé kroky spermatogeneze – 1. - spermatogonie, 2. - spermatocyt prvního řádu, 3. - spermatocyt druhého řádu, 4. - spermatida, 5. – spermie (převzato a upraveno z Foster 2018).

3.1.2 Spermiogeneze

Během procesu spermiogeneze, nebo také spermiogeneze, dochází ke změnám na spermatidě, a to zejména ke změnám morfologickým, chemickým a biochemickým (Champroux et al. 2016). Spermatidy při přeměně na zralé spermie prochází širokou škálou morfologických změn (viz Obrázek 3). V tomto období spermatidy již neprodělávají žádné dělení, ale postupně dochází k jejich přeměně z kulatých spermatid na zralé spermie, schopné aktivně proniknout do vajíčka a vnést do něho své geny. Přeměnu spermií lze schématicky rozdělit do několika fází: Golgiho fáze, fáze akrozomální čepičky, akrozomální fáze (fáze kaudální manžety) a fáze maturace (Clermont & Leblond 1955).

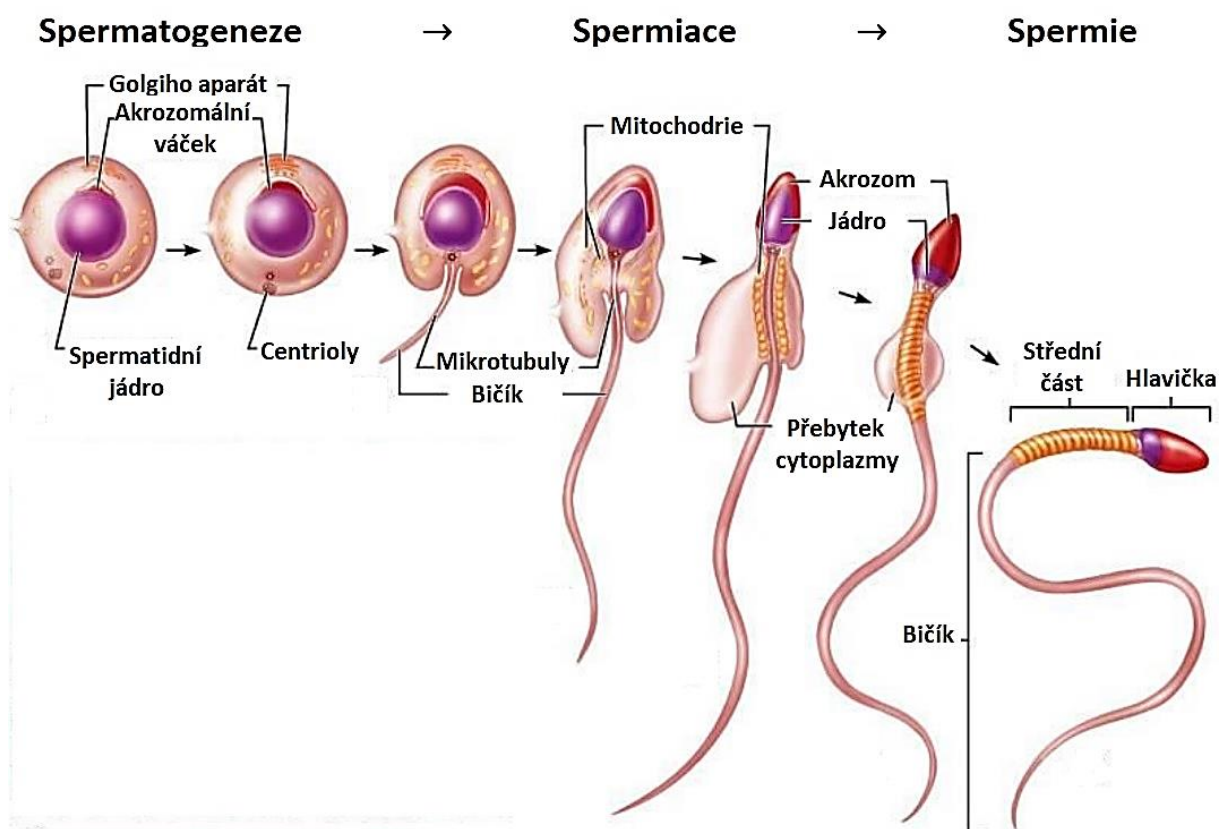
První změny probíhají v Golgiho fázi, při které dochází ke vzniku a formování akrozomálního váčku, který navíc obsahuje akrozomální zrno. Akrozomální váček se zvětšuje a zplošťuje. Zároveň je samotné jádro přesunuto k jednomu pólu buňky. Díky tomu získává oploštělý a hruškovitý tvar (Russell et al. 1993; Konrádová et al. 2000). Během kondenzace chromatinu nahrazují většinu histonů přechodné proteiny (TP). Tyto TP jsou poté z velké části nebo zcela

úplně nahrazeny malými jadernými proteiny bohaté na arginin – protaminy (Oliva & Dixon 1991; Wouters-Tyrou et al. 1998).

Ve druhé fázi akrozomální čepičky dochází ke zvětšení akrozomálních zrn. Při tomto zvětšení se začínají akrozomální zrna rozšiřovat po přední části jádra a vytvářet akrozomální čepičku (Talbot & Kleve 1978).

Ve třetí akrozomální fázi podstupuje akrozom kondenzaci a následně se formuje do konečné podoby. U prodlužujících se spermatid nastává také tvorba nukleárního prstence, pod nímž se organizují do válcovitého tvaru manžetové mikrotubuly, které vytvářejí kaudální manžetu (Ashman et al. 1992). Během akrozomální fáze dochází také ke změnám ve struktuře mitochondrií. Nejdříve se mitochondrie kulovitého tvaru seřadí do spirálovitě probíhajícího vlákna ve střední části bičiku, kde poté nastává tvorba mitochondriální pochvy (Otani et al. 1988; Shimada et al. 2021).

V poslední fázi maturace je diferenciací spermie doprovázena prodlužováním bičiku a odlučováním přebytečné cytoplazmy (Sakai & Yamashina 1989; Han et al. 2020). Přítomnost akrozomu a zhuštěné jádro poskytuje spermii jedinečný tvar, který zlepšuje proniknutí přes *zona pellucida* (Suede et al. 2021). Spermie po dokončení spermiogenezise nejsou schopné pohybu. Tuto schopnost spermie získají až v nadvarletí, kam jsou transportovány vývodními kanálky varlat (Slípka & Tonař 2019).



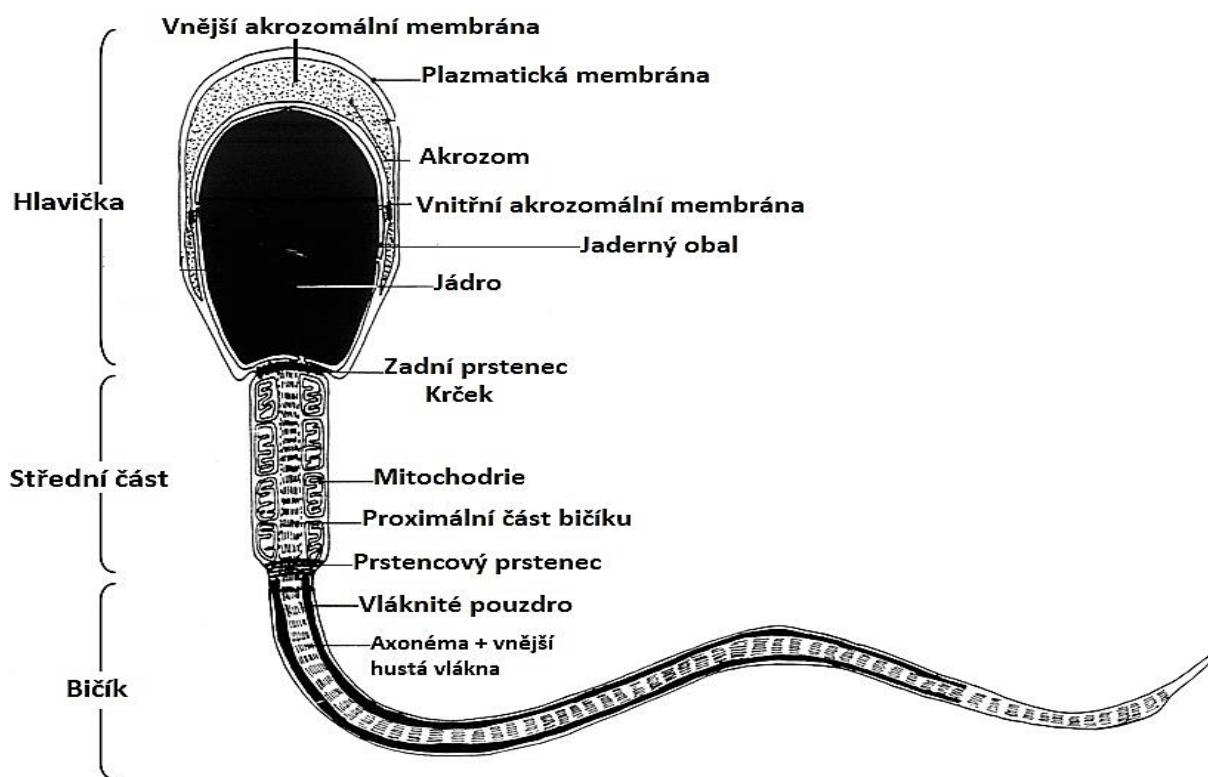
Obrázek 3: Jednotlivé kroky spermiogenezise – Proces přeměny kulaté spermatidy na spermii s bičíkem (převzato a upraveno z Cummings & Schnellmann 2004).

3.2 Morfologie spermie

Spermie je vysoce diferencovaná samčí pohlavní buňka, která je schopna samostatného pohybu a jejímž hlavním cílem je dosáhnout oocytu a podílet se na jeho oplodnění. Celková stavba savčí spermie se skládá ze dvou hlavních částí – hlavičky a bičíku (viz Obrázek 4).

Hlavička obsahuje specializované haploidní jádro s vysoce zhuštěným chromatinem, které nese dědičnou genetickou informaci v DNA, a akrozom, jehož součástí jsou exocytotické granule s enzymy, které po uvolnění napomáhají samčím spermii proniknout do samičích oocytů během procesu oplodnění. V hlavičce spermie lze identifikovat extraakrozomální a extranukleární oblasti. Dále se rozlišují cytoplazmatické kompartmenty přesně určené akrozomálními membránami, plazmatickou membránou a jaderným obalem. Jádro obaluje pochva zvaná perinukleární theca. V částech subakrozomální perinukleární theky v apikální oblasti se nachází specializovaná struktura – perforatorium, která slouží k ukotvení akrozomu k přední oblasti jádra (Avidor-Reiss 2018, Teves & Roldan 2022).

Spojovací oddíl, který připevňuje hlavičku spermie k bičíku se nazývá krček a je obohacen o typické i atypické proximální a distální centrioly. Bičík spermie je složen ze střední, hlavní a koncové části. Ve střední části se nachází mitochondriální pochva, kde dochází k výrobě vlastní energie ve formě ATP. Poskytuje také hnací sílu pro pohyb (Teves & Roldan 2022).



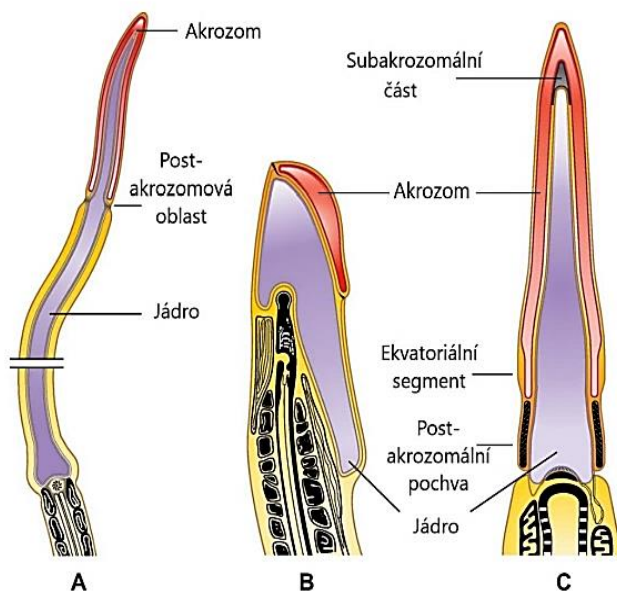
Obrázek 4: Anatomická struktura spermie (Převzato a upraveno z Boerke et al. 2008)

3.2.1 Hlavička spermie

Hlavička zralých spermií je výsledkem samčí spermiogeneze, což je komplexní diferenační proces, během kterého se kulatých větších raných spermií (spermatid) s euchromatickým jádrem vytvoří menší protáhlé spermie s heterochromatickým jádrem (Chemes & Sedo 2012).

V nitru hlavičky spermie se nachází jádro, ve kterém byly histony a kondenzované jádro deoxyribonukleové kyseliny (DNA) zčásti během spermiogeneze nahrazeny protaminy, pozitivně nabitými proteiny DNA, které umožňují hyperkondenzaci jádra spermie do kompaktního hydrodynamického tvaru. Ten napomáhá zprostředkovávat motilitu spermií a jejich pronikání přes obaly oocyty (Brewer et al. 2002; Dadoune 2003). Jádro je pokryto, a navíc chráněno redukováným jaderným obalem, ze kterého byly během procesu spermiogeneze odstraněny komplexy jaderných pórů (Ho & Suarez 2003). Ochrana jádra spermie je poskytována pomocí „perinukleární matrice“. Tato perinukleární matrice vytváří tuhý obal složený ze strukturálních proteinů, upevněných disulfidovou vazbou s různými jinými molekulami proteinů (Oko 1995). Některé z těchto proteinů mají funkci v buněčné signalizaci, jakmile jsou uvolněny rozpuštěním perinukleární thény do cytoplazmy samičích oocytů při oplodnění (Sutovsky et al. 2003).

Hlavička savčí spermie dále obsahuje cytoskelet a akrozom. Cytoskelet má dvě hlavní funkce. Určuje tvarování hlavičky a hraje nezbytnou roli při pronikání spermie přes obaly oocyty (Pěkníková et al. 2001). Cytoskeletární strukturu lze dle její lokalizace dělit do tří částí. Subakrozomální, parakrozomální a postakrozomální. Mezi akrozomem a jádrem je umístěna subakrozomální část, mezi plazmatickou membránou a akrozomem paraakrozomální část a mezi jádrem a plazmatickou membránou postakrozomální část (viz Obrázek 5) (Yanagimachi, 1994).



Obrázek 5: Struktura hlavičky spermie. A) vejcorodí B) vačnatí C) placentálové (Převzato a upraveno z Teves & Roldan 2022).

3.2.2 Akrozom

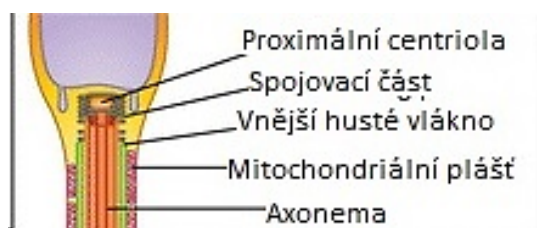
Akrozom je organela, která se vyskytuje jedině na spermii a kryje přední část jejího jádra (Kierszenbaum et al. 2011). Tvorba akrozomu je rozdělena do čtyř fází: Golgiho fáze, fáze čepičky, fáze akrozomu a fáze zrání. Struktura akrozomu spermie je tvořena vnější a vnitřní membránou (Yanagimachi 1994). Pod plazmatickou membránou se nachází vnější akrozomální membrána, pod kterou je akrozomální matrix. Uvnitř matrixu je vnitřní akrozomální membrána a následně navazuje jádro.

Akrozom je navázán k jádru vnitřní akrozomální membránou prostřednictvím akroplaxomu. Jedná se o síť proteinů, kterými jsou například β -aktin a keratin (Kierszenbaum et al. 2011). Tvarem a velikostí je akrozom druhově rozdílný a rozděluje se na ekvatoriální část, která vytváří spodní oblast akrozomu a podílí se na fúzi spermie a oocyty. Akrozom obsahuje specifické enzymy. Mezi tyto enzymy patří běžné hydrolázy nacházející se v lysozomech, a to například proakrozin nebo hyaluronidáza. To jsou enzymy typické právě pro akrozom spermatogenních buněk. Tvorba akrozomálních enzymů je spuštěna již v pachytenním stádiu meiózy v průběhu procesu spermatogeneze, kdy ještě není akrozomální váček vytvořen. Proakrozin je forma neaktivního enzymu. Je syntetizován ve spermatidách, a je součástí serin-proteázové superrodiny. Při procesu akrozomální reakce (AR) je proakrozin štěpen a vytváří se jeho aktivní forma – akrozin. Ten je zodpovědný za štěpení *zona pellucida*. (Yanagimachi 1994).

3.2.3 Krček spermie

Na postakrozomální oblast hlavičky spermie navazuje krček, který propojuje hlavičku s bičíkem. Krček je tvořen dvěma za sebou uspořádanými centrioly – proximální a distální (viz Obrázek 6) (Eddy & O'Brien 1994). Funkcí těchto centriol je nejen mechanicky propojovat hlavičku a bičík, ale také se po fertilizaci podílí na organizaci cytoskeletu zygoty (Rattner 1972; Avidor-Reiss et al. 2020). V oblasti krčku je také velká zásoba vápníku (Ca^{+2}). Přítomný je zde také inositoltrifosfátový receptor (IP3R), který po aktivaci inositoltrifosfátem (IP3) funguje jako výměňkový vápníkový kanál (Ho & Suarez 2001).

Během pohybu spermie směrem k oocyty je zapotřebí, aby měl krček spermie silnou integraci k hlavičce a bičíku. Jakékoliv defekty při tvorbě krčku spermie má za následek oddělení hlavičky spermie od ocasu během pohybu (Wu et al. 2020).



Obrázek 6: Podélný řez krčkem a střední částí bičíku (Převzato a upraveno z Teves & Roldan 2022).

3.2.4 Bičík spermie

Pro motilitu spermie je zcela nezbytný bičík. Bičík spermie se skládá ze tří částí: střední, hlavní a koncová. Střední část je rozšířená oblast bičíku spermie, který je obklopen tzv. mitochondriální pochvou. Nachází se zde velké množství spirálovitě seskupených mitochondrií umožňující oxidativní fosforylaci, prostřednictvím které se produkuje adenosintrifosfát (ATP), který spermie využívá k pohybu bičíku. Pomocí hydrolyzace mitochondriálního adenosintrifosfátu dyneinovými ramínky dochází k následnému uvolnění energie, což má za následek ohýbání bičíku a pohyb spermie. Mitochondriální pochva je bohatá nejen na selen (Ursini et al. 1999), ale také na specifické proteiny, jako je cytochrom c nebo enzymy laktátdehydrogenáza či E1-pyruvátdekarboxyláza (Goldberg 1963; Hess et al. 1993; Deburgos et al. 1994). Dalšími strukturami střední části bičíku je axonema, vnější hustá vlákna a fibrózní pochva. Axonema se skládá se ze dvou centrálních tubulů obklopených devíti mikrotubulárními dublety. Nachází se uvnitř celého bičíku spermie. Vnější hustá vlákna sahající od spojovací části bičíku po konec hlavní části přiléhají po celé délce k axonémě. V hlavním segmentu vnější hustá vlákna obklopuje vláknitá pochva, která reguluje pohyby bičíku a jejíž součástí jsou enzymy potřebné pro glykolýzu (Oura 1971; Zamboni & Stefanini 1971; Yanagimachi 1994). Vnější hustá vlákna mají funkci udržovat elasticitu bičíku a také jej chránit před vnějšími vlivy při transportu z epididymu a během ejakulace (Baltz et al. 1990). Koncová část bičíku spermie je tvořena pouze centrálním párem mikrotubulů, jenž jsou obalené plazmatickou membránou (Baccetti 1984).

3.2.5 Plazmatická membrána

Povrch celé spermie pokrývá plazmatická membrána, která je tvořena lipidovou dvouvrstvou. Hlavními komponenty plazmatické membrány jsou fosfolipidy, ale i glykolipidy, cholesterol nebo i sfingolipidy. Tímto uspořádáním plazmatické membrány je zajištěna nejen její samozacelovací schopnost, ale také i tzv. „fluidita“ neboli přeskupování jednotlivých molekul v membráně. Plazmatická membrána spermie se rozděluje do regionálních domén, které se liší funkcí a složením. Hlavními oblastmi plazmatické membrány na hlavičce spermie jsou postakrozomální a akrozomální domény. Postakrozomální oblast zahrnuje plazmatickou membránu mezi spojovacím úsekem a zadní částí akrozomu. Plazmatickou membránu akrozomální oblasti lze rozčlenit na doménu ekvatoriálního, hlavního a apikálního segmentu (viz Obrázek 5) (Bearer & Friend 1990; Eddy & O'Brien 1994). V plazmatické membráně postakrozomální a ekvatoriální části jsou obsaženy molekuly, které jsou nezbytné pro splynutí spermie s vajíčkem. Plazmatická membrána, která pokrývá oblast bičíku spermie, obsahuje molekuly potřebné pro aktivitu bičíku. Molekuly, které jsou součástí akrozomální domény plazmatické membrány, plní svou důležitou funkci v době vazby spermie na *zona pellucida* (ZP) po akrozomální reakci (Toshimori & Ito 2003).

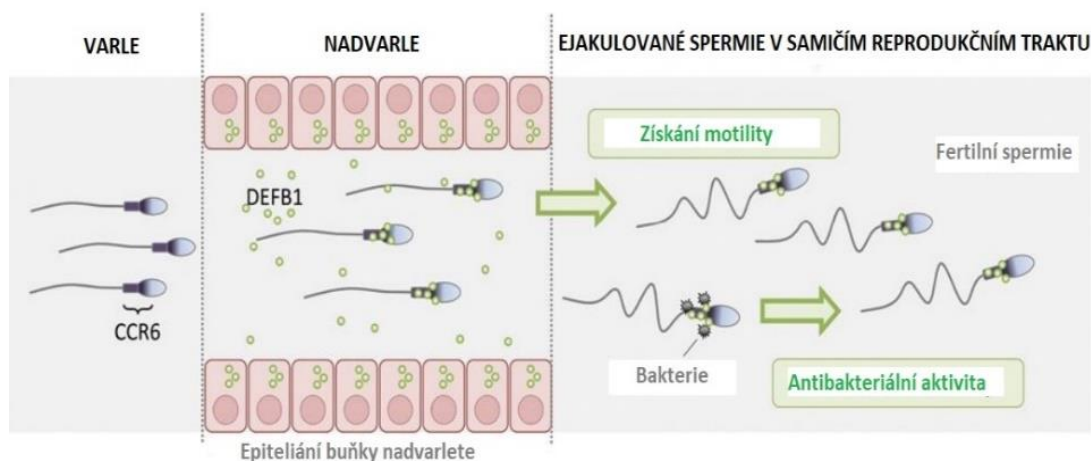
3.3 Epididymální maturace

Testikulární spermie ještě nejsou způsobilé oplodnit vajíčko, což je způsobeno hlavně tím, že spermie nejsou schopny pohybu a nemají na své membráně potřebné proteiny pro vznik rezervoáru a pro vazbu s oocytem. V organismu samce podstupují spermie při průchodu nadvarletem morfologické a biochemické změny a získávají oplozovací schopnost. Tento děj se označuje jako epididymální maturace.

Během zrání v nadvarleti jsou spermie uzavřeny ve specifickém prostředí, o kterém se předpokládá, že hraje velice zásadní úlohu při kontrole a indukci konečného zrání spermií. Prostředí obklopující spermie se neustále přeskupuje, a to nejen z hlediska chemického složení, ale i z hlediska obsahu bílkovin (viz Obrázek 7). Vnitřní prostředí nadvarlete je zajímavé přítomností nezvykle vysokých koncentrací různých látek (např. karnitin), které se nenalézají v jiných tělesných tekutinách (Daucheux et al. 2012). Maturační prostředí nadvarlete je vytvořeno prostřednictvím specializovaných membránových váček, tzv. epididymosomů (Sullivan et al. 2005; Caballero et al. 2011). Tyto membránové váčky jsou vylučovány epididymálním epitelem (Sullivan et al. 2005), který se sestává z rozmanitých typů buněk. Současně každý tento typ má svou specifickou funkci a strukturu, která se odlišuje na základě toho, v jaké části nadvarlete se nachází (Herms & Robaire 2002; Breton et al. 2016). Pomocí epididymosomů jsou na povrch spermie dopraveny proteiny a enzymy. Ty se rozličnými způsoby připojují na plazmatickou membránu spermie, dále transmembránové proteiny, které jsou do plazmatické membrány také začleněny (Kirchhoff et al. 1996; Martin-Deleon 2015).

Nadvarle je tvořeno meandrovitě stočeným nadvarletním kanálkem a člení se na tři části – hlavu (*caput*), tělo (*corpus*) a ocas (*cauda*) (Yanagimachi 1994). Každá část vykazuje odlišnou expresi genů a udržuje různé koncentrace luminálních iontů. Tyto děje jsou nepostradatelné pro regulaci zrání spermií v nadvarleti. Ocas nadvarlete slouží jako rezervoár spermií. Spermie v nadvarleti zůstávají nepohyblivé s nízkou metabolickou aktivitou. V anabióze se nachází až do ejakulace. Doba uchování spermií v nadvarleti záleží na druhu živočicha a pohybuje se v řádu několika dnů až týdnů (Yanagimachi 1994; Gervasi & Visconti 2017).

Při transportu putují spermie ze semenotvorných kanálků přes úzké kanálky, síť kanálků na zadní straně varlete a vývodné kanálky varlete. Změny, kterými při epididymální maturaci spermie procházejí, zabezpečují stabilizaci plazmatické membrány spermie. Díky tomu je zamezeno předčasné akrozomální reakci, a kromě toho dochází k ochraně receptorů, umožňující vazbu na *zona pellucida* (Gatti et al. 2004). Nejzřetelnější morfologickou změnou je přesun cytoplazmatické kapky z krčku spermie směrem k prstenci, který spojuje střední část s hlavní částí (Cooper 2011). Cytoplazmatická kapka obsahuje zbylou cytoplazmu zárodečných buněk, která vznikla v procesu spermatohistogeneze (Paunescu et al. 2014).



Obrázek 7: Epididymální maturace – Při průchodu epididymem jsou spermie obohaceny o různé proteiny epiteliálními buňkami nadvarlete. Tyto proteiny mohou působit jako maturační prostředí pro spermie nebo se na ně mohou vázat (převzato a upraveno z Diao et al. 2014).

Epididymální proteiny mohou tvořit slabé asociace s povrchem spermií. Mezi tyto proteiny patří určité izoformy klusterinu i lidský epididymální protein (Leahy & Gadella 2011). Nejvíce běžnými nalezenými proteiny jsou laktoferin (LTF), klusterin (CLU) a sekreční proteiny bohaté na cystein (jako je CRISP1). Tyto proteiny jsou mezidruhově rozdílné. Například LTF a manosidáza jsou přítomny ve vysokých koncentracích u hřebce, berana, člověka a kance. Naopak protein prostaglandin D2 syntáza (PTGDS) prakticky chybí u kance a člověka. Po sekreci dochází často k modifikaci epididymálních proteinů, což vede ke vzniku různých izoform. Některé proteiny jsou v epididymální tekutině přítomné po celou dobu maturace spermií. Některé, jako například kančí RNAsa 10, jsou resorbovány (Castella et al. 2004).

V epididymis dále dochází k degradaci starých či poškozených spermií pomocí aktivity ubikvitin-proteasomového systému, který prostřednictvím specifických enzymů ničí zbytné proteiny (Sutovsky et al. 2001). Ubikvitin-proteasomový systém (UPS) je zodpovědný za regulaci substrátově specifické proteolýzy. Významnou roli v tomto procesu hraje malý chaperonový protein – ubikvitin. Ten kovalentně modifikuje jiné proteiny a označuje je pro degradaci proteazomem 26S. Ubikvitin je nejkonzervovanější eukaryotický protein, který má molekulovou hmotnost 8,5 kDa a skládá se ze 76 aminokyselin. Konkrétně sedm z nich jsou zbytky Lysinu (K6, K11, K27, K29, K33, K48 a K63), na které se tandemovým způsobem vážou další molekuly ubikvitinu za vzniku isopeptidem vázaných multiubikvitinových řetězců. Proces ubikvitinace je řízen sérií enzymatických reakcí. Některé z nich vyžadují adenosintrifosfát (ATP). Pro aktivaci tohoto procesu je důležitý nekonjugovaný aktivační enzym ubikvitin (E1), ubikvitin konjugující enzym (E2) a ubikvitin-protein ligáza (E3).

E2 zajišťuje transport ubikvitinu k substrátu. Enzym E3 zajišťuje polyubikvitinylaci. Polyubiquitinový řetězec obsahuje okolo čtyř ubiquitinových molekul. Proteiny jsou pomocí proteasomu degradovány na peptidy o velikosti až 25 aminokyselinových zbytků. Ty se uvolňují a jsou vystaveny dalšímu štěpení cytosolovými endopeptidázami (Voges et al. 1999; Sutovsky 2011). UPS je využit také pro „opracování“ proteinů na povrchu spermie. Některé proteiny totiž spermie při průchodu epididymem ztrácí (Sutovsky et al. 2001).

3.4 Kapacitace

Kapacitace je proces, který je velmi složitý a zahrnuje řadu funkčních a strukturních změn spermií. Dochází při ní k modifikaci plazmatické membrány spermií, změnám v enzymové aktivitě a fosforylaci proteinů (Ferramosca & Zara 2014). Bezprostředně po ejakulaci nemají savčí spermie schopnost oplodnit oocyt (Chang 1955). Spermie tuto schopnost získá až během procesu kapacitace, buď *in vivo* v reprodukčním traktu samice nebo ji lze navodit *in vitro* v kapacitačním médiu (De Jonge 2005). Dále je kapacitace spojena s procesem hyperaktivace pohybu spermií, která je charakterizována změnou motility a zvýšeným pohybem bičíku spermie. Tyto změny napomáhají spermiím v pohybu oviduktem a průniku ZP oocytu (Ferramosca & Zara 2014).

Během procesu ejakulace jsou zralé epididymální spermie pumpovány do prostředí semenné plazmy přes chámovod a zbývající část samčího pohlavního traktu. Sekrety bulbo-uretrální žlázy, semenných váčků a prostaty ředí, chrání a vyživují spermie. Zároveň poskytují metabolické substráty, faktory a ionty, které stabilizují samčí gamety (viz Obrázek 8) (Harkema et al. 2004). Semenná plazma obsahuje kromě nejrůznějších iontů či sacharidů i velké množství proteinů jako jsou například spermadheziny, inhibitory proteináz (inhibitor akrozinu) a povrchový protein spermií DQH. Sekreční proteiny spermadheziny jsou exprimovány v samčích pohlavních orgánech kance, hřebce a býka. Vykazují řadu schopností vázat ligandy, např. sacharidy, fosfolipidy, sulfatované glykosaminoglykany a inhibitory proteináz, z čehož se usuzuje, že se mohou podílet na různých krocích fertilizace. Mezi nejznámější proteiny rodiny spermadhezinů v kančí semenné plazmě patří AQN, AWN a PSP. Další typ proteinu izolovaný z kančí semenné plazmy patřící k povrchovým proteinům spermií je označený jako DQH (podle jeho N-koncové aminokyselinové sekvence). Protein DQH nespadá do rodiny spermadhezinů, ale je členem velké rodiny buněčných a matricových adhezních proteinů (Calvete et al. 1997; Bork & Beckmann 1993; Jonáková et al. 1998; Bezouška et al. 1999). Také β -MSP a laktoferin patří mezi proteinové složky kančí semenné plazmy (Maňásková et al. 2002; Jelínková et al. 2003).

Další molekuly, které pokrývají plazmatickou membránu spermie a jsou odstraněny během kapacitace, se nazývají dekapacitační faktory. Tyto faktory jsou přítomny v seminální plazmě a jejich mechanismy účinku jsou vysoce komplexní a druhově závislé (Bedford & Chang 1962, Yanagimachi 1994). Dekapacitační faktor je obecný termín pro látky přítomné v semenné plazmě samce, které stabilizují a potahují povrch spermií, nepochybně

tím zabraňují předčasné kapacitaci. Tyto komponenty jsou nutné pro správné načasování procesu kapacitace a akrozomální reakce (Fraser et al. 2006). Dále jsou pak odstraněny v oviduktálním rezervoáru, čímž dojde ke kapacitaci později v době, kdy oocyt doputuje do vejcovodu a tím se umožní synchronizace kapacitace a navázání spermie na ZP oocytu (Thérien et al. 1998). Funkcí těchto molekul je zahájení signální kaskády vazbou na receptor, což má za následek produkování cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Vzestup hladiny cAMP koreluje s navozením kapacitace a akrozomální reakce. Proto musí být cyklický adenosinmonofosfát regulován, a to z důvodu předčasné nežádoucí akrozomální reakce. K jednomu z nejznámějších regulátorů kapacitace patří enzym fosfodiesteráza, jehož úkolem je štěpit cAMP na produkt metabolismu 5'AMP, který není aktivní (Fraser et al, 2006).

Ejakulované spermie mají na počátku nízkou intracelulární koncentraci Na^{2+} (14 mM) a vysokou intracelulární koncentraci K^{+} (120 mM). Kontinuálně s kapacitací nastává změna iontového prostředí (Baldi et al. 1996). Zahajující stadium procesu kapacitace je značně pomalé. Začíná likvidací cholesterolu z plazmatické membrány spermie, což snižuje poměr cholesterolu vůči 20 fosfolipidům a zvyšuje fluiditu membrány (Boerke et al. 2013). Dependentní protein kináza A aktivuje enzym skramblázu, která je odpovědná za šíření fosfolipidů ve vnějším a vnitřním listu plazmatické membrány a zprostředkovává snadnější odstranění membránového cholesterolu (Harrison & Gadella 2005). Ten je odstraňován pomocí albuminu a lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL). Membrána je tak mnohem více přístupná pro částice, které vážou lipidy (Abou-haila & Tulsiani 2009).

Dalšími látkami podílející se na kapacitaci, chemotaxi, motilitě a fertilizaci je aktivita vápenatých iontů (Ca^{+2}). Endoplazmatické retikulum a mitochondrie jsou hlavními organelami v somatických buňkách, které se účastní ukládání vápníku. Jinak tomu je v případě spermií. Předpokládá se, že cílem pro ukládání vápenatých iontů je jaderný obal a akrozom spermií (Santi et al. 2010). Intracelulární změna pH je životně podstatná pro zahájení a regulaci různých činností spojených s hyperaktivací a kapacitací spermií (Suarez 2008), z tohoto důvodu je intracelulární alkalizace spermií nezbytná (Darszon et al. 2006).

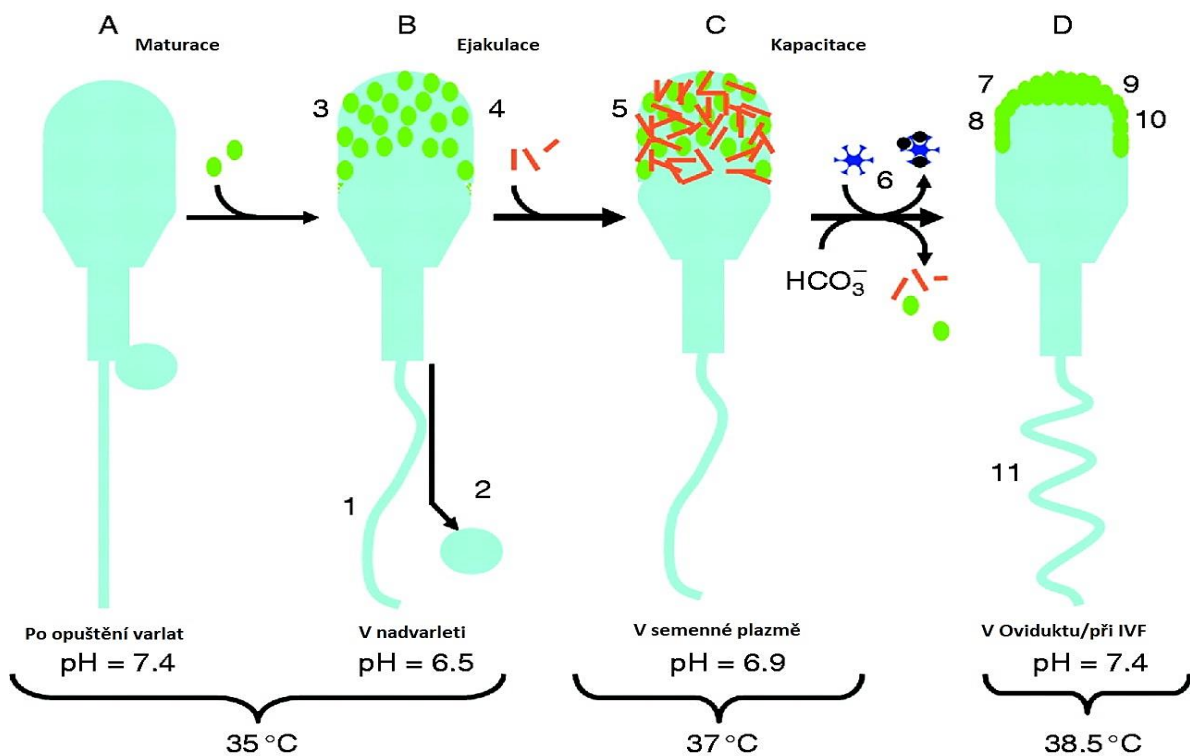
Proces kapacitace je také následně spojován se zvýšenou fosforylací proteinů serinových, tyrosinových a threoninových zbytků, zvýšeným metabolismem a s hyperaktivovanou motilitou (Baldi et al. 2002). Fosforylace proteinů tyrosin kinázou je charakteristickou posttranslační modifikací proteinů během kapacitace a akrozomální reakce. Fosforylace proteinů je důležitá z hlediska signalizačních dějů v samčí gametě, jelikož genetická informace je v buňce vysoce kondenzována a nemá možnost ovlivnit syntézu nových proteinů. V průběhu procesu kapacitace dochází k fosforylaci proteinů o váze 51, 75 a 95 kDa (Baldi et al. 1996).

Epididymální tekutina má nižší koncentrace bikarbonátu v porovnání se semennou plazmou a oviduktální tekutinou. Karbonická anhydráza IV vázaná v plazmatické membráně mění oxid uhličitý (CO_2) přítomný v samičím reprodukčním traktu na hydrogenuhličitánový iont (Wandernoth et al. 2010). Aktivace rozpustné adenylyl cyklázy a zvýšení koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v cytosolu mají za následek vznik

hydrogenuhlíčanových iontů, které zvyšují intracelulární pH. To vyvolává tyrosinovou fosforylaci, která zprostředkovává hyperaktivaci motility (Hess et al. 2005).

Reaktivní formy kyslíku (ROS), také zvané jako kyslíkové radikály, jsou jedny z dalších součástí procesu kapacitace. Mají velmi specifickou roli při zrání spermií. Mezi kyslíkové radikály (ROS) patří například peroxid vodíku a oxid dusnatý. ROS se účastní na aktivaci signalizační kaskády tyrosinové fosforylace. Peroxid vodíku a superoxid aktivují rozpustnou adenyl cyklázu, čímž zvyšují intracelulární cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) a následně aktivují tyrosinové kinázy (O'Flaherty et al. 2006; Roy & Atreja 2008; Jagan Mohanarao & Atreja 2011).

Uchování zralých spermií v istmu samice je závislé na živočišném druhu. U některých savčích druhů vzniká vazba samčích spermií na samičí epitel vejcovodu ve spodní části isthmu a vytváří se tak oviduktální rezervoár. U ostatních živočišných druhů, např. u člověka dochází k uložení spermií nejdříve v cervikálním hlenu a následně vzniká oviduktální rezervoár. Zásadou této vazby je zachována stabilita plazmatické membrány, díky čemuž se zbrzdí proces kapacitace a prodlouží se životaschopnost spermií. K dřívějšímu vypuštění spermií z isthmu a k urychlení kapacitace dochází, pokud kopulace započala po ovulaci oocyty. Důvodem je, aby spermie dosáhly oocyty v přijatelnou chvíli pro oplození (Yanagimachi 1994).

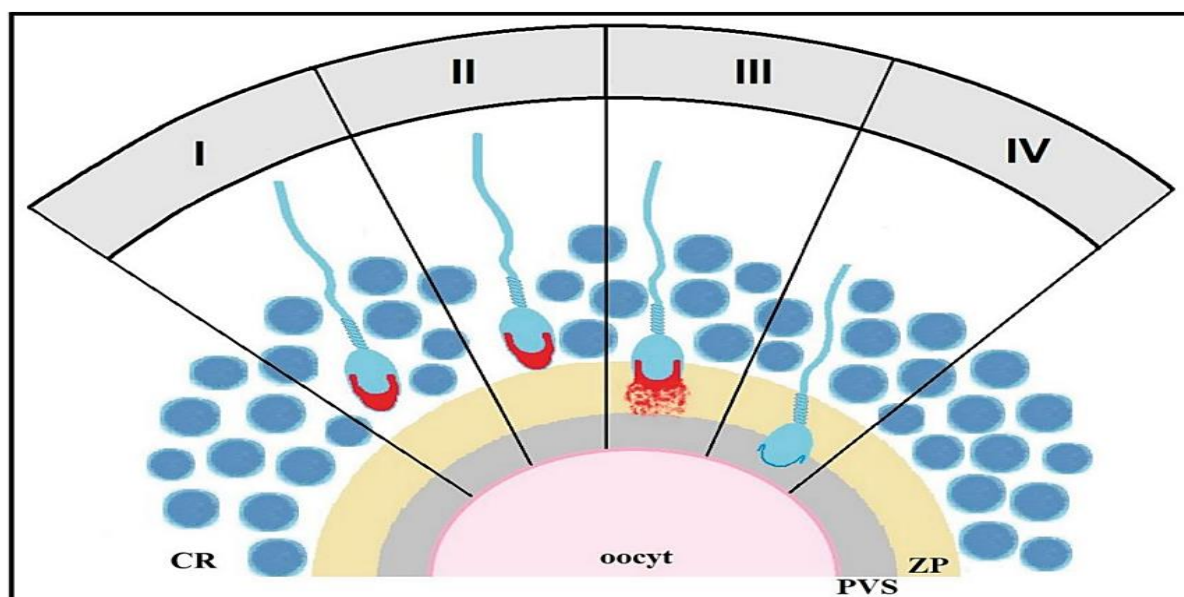


Obrázek 8: Nezbytné fyziologické změny na povrchu membrány spermií - A) Spermie po opuštění varlete. Získává specifickou motilitu, ztrácí cytoplazmatickou kapku a absorbuje na povrch plazmatické membrány specifické proteiny.; B) Spermie v nadvarleti – Ejakulace; C) Spermie v semenné plazmě – Kapacitace; D) Spermie v oviduktu (Leahy & Gadella 2011).

3.5 Akrozomální reakce

Akrozomální reakce (AR) je ústřední maturační děj, který umožňuje penetraci *zona pellucida* a fúzi gamet. Po kontaktu kapacitované spermie s vnějšími obaly oocyta dochází ve spermii k aktivaci různých proteinů a signálních kaskád. To má za následek exocytózu akrozomálního váčku, která je ireverzibilní (Florman et al. 2004).

Nejprve dochází ke kontaktu samčí gamety s *corona radiata* (CR) (viz Obrázek 9). Průnik přes vrstvu granulózních buněk CR se uskutečňuje primárně přes membránový protein PH-20 (SPAM 1 - molekula adheze spermií) hlavičkou spermie. Tento protein vykazuje hyaluronidázovou aktivitu, která v extracelulární matici štěpí kyselinu hyaluronovou, jež spojuje buňky CR (Kimura et al. 2009). Mezi další důležité proteiny, které umožňují penetraci CR, patří β -galaktosidáza a aryl sulfatáza A (Tantibhedhyangkul et al. 2002; Wu et al. 2007). Kapacitovaná spermie se po průniku CR dostane k *zona pellucida* a následně dochází k vyvolání akrozomální reakce. Tento klíčový děj zahajuje kombinace charakteristických receptorových glykoproteinů, které jsou součástí povrchu hlavičky spermie. Dalším indukujícím faktorem je hormon progesteron. Ten zahajuje přechodný intracelulární příliv vápenatých iontů ve spermii, nezbytných pro spuštění akrozomální reakce po navázání na *zona pellucida* (De Jonge 2017; Fleisch & Gadella 2000; Tosti & Ménéz 2016).



Obrázek 9: Fáze průniku spermií oocytem – I. - průnik corona radiata (CR); II. - vazba na zona pellucida (ZP); III. - akrozomální reakce (AR) a průnik zona pellucida; IV. - průchod spermií do perioyolkového prostoru (PVS) (Krawczyk & Jaworska-Adamu 2020).

Akrozomální reakce probíhá v několika základních fázích. V prvním kroku začíná tvorba slabé vazby s glykoproteinem 3 (ZP3) na *zona pellucida*. U kance byl identifikován glykoprotein β -1-4-galaktosyltransferáza (GalTase). Následkem navázání spermií na ZP3 se mění uspořádání receptorových proteinů. Dochází k aktivaci intracelulární dráhy

za účasti např. tyrosinkináz, fosfatáz, proteinů fosfolipázy C a G. Tento proces má za následek otevření vápníkových kanálů a příliv Ca^{2+} iontů do buňky. V důsledku toho jsou K^+ , Na^+ a ATP - áza inaktivovány a dále nastává příliv sodných iontů do buňky, stejně jako odtok vodíkových iontů z buňky. Navýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů aktivuje protein kalmodulin a kalmodulin dependentní kinázu, což vede ke zvýšené produkci ATP a fosforylaci proteinů. Také dochází k neutralizaci náboje z vnějšku vnější membrány akrozomu a z vnitřní strany membrány spermii, což usnadňuje splnutí spermie a oocyty. V první fázi fúze se vytvoří mezery, dále následuje tvorba akrozomálních váčků a rozptýlení membrán. Tento děj nastává v oblasti akrozomu hlavičky spermie (Larson & Miller 1997; Krawczyk & Jaworska-Adamu 2020).

V dalším kroku akrozomální reakce dochází k exocytóze a aktivaci enzymů, jako jsou například proteinázy, kyselá glykohydroláza, fosfolipáza, esteráza, fosfatáza a kolagenáza usnadňující proniknutí samčí gamety do *zona pellucida* (Bhakta et al. 2019; Georgadaki et al. 2016; Kratz & Achcińska 2011). Následně je obnažena vnitřní membrána akrozomu a na ni navázané enzymy, mezi nimiž jsou nejvíce zastoupené akrozin a hyaluronidáza (Khawar 2019). Akrozin je nepostradatelný, usnadňuje penetraci *zona pellucida* a je schopen regulovat aktivitu dalších akrozomálních proteinů. Jeho další nezbytnou funkcí je podílení se na vazbě receptorů spermii na glykoprotein ZP2. Toto spojení je odolnější. Proces akrozomální reakce je také zprostředkován proteinem PH-20 a proteinem MC41, které jsou uloženy v membráně akrozomálního vezikulu (Bukowska et al. 2014; Tosti & Ménéz 2016). Při fúzi spermie s oocytem se matrice akrozomu krok za krokem disperguje a v důsledku aktivního pohybu spermii se odstraní na jejím povrchu přítomné proteiny (Kratz & Achcińska 2011).

Po překonání glykoproteinového obalu *zona pellucida* vstupuje spermie do perivitellinního prostoru oocyty a pohybuje se směrem k oolemě. Kontakt s membránou samičí gamety způsobí, že se naváže spermie na její povrch, což dále vede ke splnutí obou buněk. Tento nepostradatelný proces je důležitý pro aktivaci oocyty, který je nevyhnutelný pro dokončení děje oplodnění (Krawczyk & Jaworska-Adamu 2020).

3.6 Gasotransmitery

Gasotransmitery jsou malé plynné signální molekuly uvolňované charakteristickými enzymy, které jsou exprimovány v různých savčích tkáních a podílejí se na buněčné signalizaci. Mezi gasotransmitery patří oxid dusnatý (NO) (Ignarro et al. 1987; Palmer et al. 1987), oxid uhelnatý (CO) a sulfan (H_2S) (Wang 2002).

Gasotransmitery nevyžadují pro svou tvorbu složité metabolické dráhy. Mají schopnost lehce pronikat buněčnou membránou a používat krevní řečiště k volnému pohybu v organismu (Imbrogno 2018). Jejich působení na buňku může být uskutečněno skrze druhé posly (Pae et al. 2009). Společným rysem těchto plyných molekul je také rychlá degradace po jejich uvolnění (Wang 2002). Gasotransmitery se účastní regulace fyziologických

dějí jako je obranyschopnost, zánět, cévní homeostáza nebo přenos nervových vzruchů (Pae et al. 2009).

3.6.1 Sulfan

Sulfan (H_2S) je hořlavý, bezbarvý a ve vodě rozpustný plyn s velmi specifickým výrazným zápachem po zkažených vejcích (Szabó 2007; Beauchamp et al. 1984). Podobně jako NO a CO byl H_2S po desetiletí považován za toxickou molekulu a jako riziko pro životní prostředí až do doby, kdy Abe a Kimura (1996) poprvé objevili jeho fyziologickou produkci a funkci v nervovém systému.

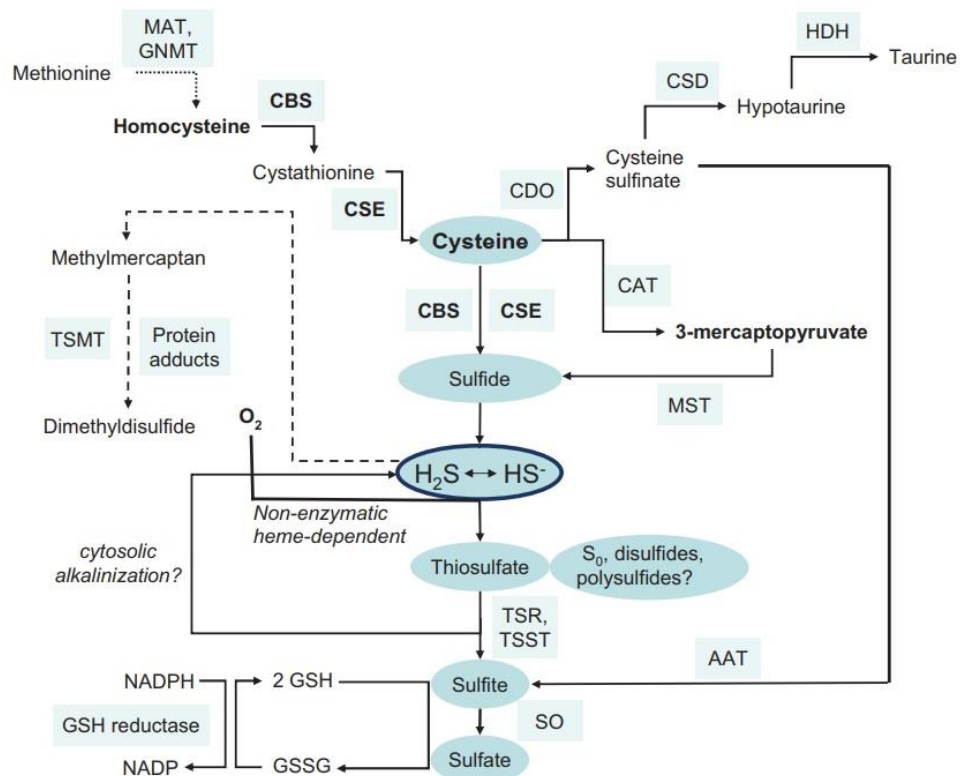
Tato malá plynná molekula se ve volné přírodě syntetizuje při rozkladu bílkovinných molekul, které obsahují aminokyseliny obsahující síru. V nepatrném množství je obsažen i ve střevech zvířat a lidí. Jeho bod varu je $60,3\text{ }^\circ\text{C}$, bod tání $82,3\text{ }^\circ\text{C}$ a bod tuhnutí $-86\text{ }^\circ\text{C}$. Koncentrace sulfanu by za normálních okolností neměla překročit $0,1\text{ mg/m}^3$. Z tohoto důvodu zůstává sulfan nebezpečnější a 5x toxičtější než oxid uhelnatý díky své schopnosti inhibovat procesy tkáňového dýchání potlačením enzymu – cytochromoxidázy v mitochondriích. Intenzita syntézy, biologický účinek a celkový obsah tohoto enzymu jsou v různých buňkách těla odlišné (Łowicka & Bełtowski 2007; Zaichko et al. 2014).

Furne et al. (2001) dodává, že koncentrace endogenního sirovodíku v savčích tkáních se pohybují v rozmezí od $50\text{ }\mu\text{M}$ do $160\text{ }\mu\text{M}$. Z tohoto důvodu je zcela nezbytné, aby existoval degradační mechanismus sulfanu pro udržení adekvátních hladin ve tkáních. V mitochondriích sirovodík oxiduje na thiosulfid, který se dále přemění na konečný produkt sulfid. Druhou metabolickou cestou sulfidu je methylace thiolem S-methyltransferáza (TSMT) na dimethylsulfid. Podle Starka (2009) se sulfan váže podobně jako oxid uhelnatý a oxid dusnatý na hemoglobin za vzniku sulfhemoglobinu (Wang 2002). Kromě toho může sulfan reagovat společně s oxidem dusnatým za vzniku nitrosothiolové sloučeniny, která se účastní na reverzní regulaci aktivity enzymu syntázy oxidu dusnatého (NOS) (Whiteman 2006).

Endogenní sulfan může být vytvářen enzymatickými i neenzymatickými cestami (Wang 2002). Nejvýznamnější pro endogenní hladinu sulfanu je enzymatická produkce. Enzymatická syntéza sulfanu v savčích tkáních může být zprostředkovávána prostřednictvím cystathionin γ -lyázou (CSE), cystathionin β -syntázou (CBS) a 3-merkaptopyruvátsulfurtransferázou (MST) ve shodě s cysteinaminotransferázou (CAT) (viz Obrázek 10). Enzymy CBS a CSE jsou závislé na pyridoxal-5'-fosfátu. Substrátem CBS a CSE je L-cystein. Cystein může být pomocí enzymů CBS a CSE hydrolyzován. CSE působí na cystein za vzniku sulfanu, pyruvátu a amoniaku. CBS kondenzuje cystein a homocystein za vzniku H_2S a vedlejšího produktu L-serinu, což má za následek tvorbu cystathionu (Singh et al. 2009; Ahmad et al. 2016; Tao et al. 2017; Ahmad et al. 2019; Augsburger & Szabo 2020). Pomocí tohoto procesu je poté hydrolyzován CSE. Následně vznikne cystein s vedlejšími produkty amoniaku a α -ketobutyratem. CBS je schopný katalyzovat kondenzaci cysteinu a homocysteinu za vzniku cystathioninu a sulfanu. Enzym CSE také může přeměnit cystein a siřičitan na L-cysteát a sulfan (Cavallini et al. 1962).

Další enzymatickou reakcí přispívající k produkci endogenního sulfanu, je 3-merkaptopyruvát-sulfurtransferáza (3MST). Tato reakce je katalyzována dalším enzymem – cysteinaminotransferázou (CAT/AAT) Shibuya et al. 2009a; Shibuya et al. 2009b). V mitochondriích mohou být L-cystein a α -ketoglutarát jako substráty převedeny na 3-MST pomocí CAT, poté se tento meziprodukt převede na H_2S pomocí 3MST (Shibuya et al. 2009b).

Důležitá je i neenzymatická cesta získávání endogenního sulfanu. Jedná se o přeměnu elementární síry a oxidace glukózy. Neenzymatická cesta zahrnuje fosfoglukonát, glykolýzu a glutathion (Wang 2002).



Obrázek 10: Endogenní produkce a metabolismus L-cysteinu a H_2S . Enzymatické cesty produkce H_2S využívá tkáňově specifické enzymy: Cystathionin- β -syntázu (CBS) a Cystathionin γ -lyázu (CSE) a merkaptopyruvát sulfurtransferázu (MPST) (Elsey et al. 2010).

3.6.2 Enzymy produkující sulfan

Sulfan je ve většině savčích tkáních tvořen třemi enzymy. Mezi hlavní enzymy produkující sulfan se řadí cystathionin- β -syntáza (CBS) a cystathionin- γ -lyáza (CSE) (Wang 2002). Tyto dva enzymy působí velmi podobně. Odlišná je jejich tkáňová distribuce. U obou enzymů je společným substrátem pro tvorbu sulfanu L-cystein. Tato neesenciální

aminokyselina může být buď alimentárního původu nebo může být uvolňována z endogenních proteinů, případně být syntetizována z methioninu (Starka 2009).

Dalším enzymem produkující sulfan je 3-merkaptopyruvat sulfurtransferáza (3MPST) (Shibuya et al. 2009). Každý z těchto enzymů se vyskytuje v různých savčích tkáních (Starka 2009).

Cystathionin β -syntáza

Cystathionin- β -syntáza (CBS) je považována za hlavní enzym produkující sulfan (H_2S) a reguluje metabolismus homocysteinu. CBS má velmi významnou roli v regulaci buněčné energetiky, redox stavu, metylaci DNA a modifikaci proteinů (Zhu et al. 2018).

CBS je savčí protein o velikosti okolo 551 aminokyselin. Má aktivní krystalovou strukturu tvořenou čtyřmi 63kDa podjednotkami (viz Obrázek 11) (Ereño-Orbea et al. 2013; Ereño-Orbea et al. 2014). Každá podjednotka se skládá ze tří strukturních domén. Těmi jsou N-terminální doména, katalytická doména a C-terminální regulační doména. Má kovalentně vázaný kofaktor pyridoxal-5'-fosfátu (PLP) v každém monomeru (Zhu et al. 2018).

Protein CBS je nejvíce exprimován v mozku, slinivce břišní, játrech a ledvinách. U specifických typů buněk byla zjištěna lokalizace tohoto enzymu v jádře a mitochondriích, primárně se však nalézá v cytosolu (Kabil et al. 2006; Bhattacharyya et al. 2013). Enzym CBS může být translokován do mitochondrií v reakci na nukleolární stres (Pagliara et al. 2016) nebo hypoxii (Teng et al. 2013). Expresi enzymu CBS je při různých stimulech regulována na více úrovních. Například hormonální regulace steroidních hormonů glukokortikoidů zvyšuje expresi CBS na transkripční úrovni v jaterních buňkách. Tento proces může být narušen podáváním inzulínu (Ratnam et al. 2002). Kromě toho může i testosteron regulovat aktivitu a expresi CBS v renální tkáni (Vitvitsky et al. 2007).

Cystathionin γ -lyáza

Cystathionin γ -lyáza (CSE) je v savčích buňkách jedním z dalších významných enzymů produkujících sulfan využívajících L-cystein jako hlavní substrát (Zhao et al. 2014). CSE je bílkovina o 405 aminokyselinách. Strukturně jde o tetramer (viz Obrázek 11), který se skládá ze čtyř identických monomerů s kovalentně vázaným kofaktorem pyridoxal-5'-fosfátu (PLP) v každém monomeru (Starka 2009; Zhu et al. 2008). CSE působí jako jeden z hlavních enzymů produkujících sulfan v kardiovaskulárním systému, játrech, slinivce, ledvinách a prostatě (Yang et al. 2008; Mustafa et al. 2009; Zhao et al. 2001; Pei et al. 2011; Bos et al. 2013). CSE je součástí transsulfurační dráhy, která má za následek katalyzaci cystathioninu na cystein, amoniaku na alfa-aketylbutyrát u většiny eukaryot i prokaryot (Aitken & Kirsch 2005). CSE má širokou substrátovou specifitu. Enzym CSE může štěpit cystein na pyruvat, amoniak a thiocystein (Marco 1962; Stipanuk & Beck 1982). Thiocystein může být dále katalyzován CSE za vzniku sulfanu (Hargrove et al. 1989). CSE může také využívat homocystein jako substrát pro tvorbu sulfanu (Jacobs et al. 2001).

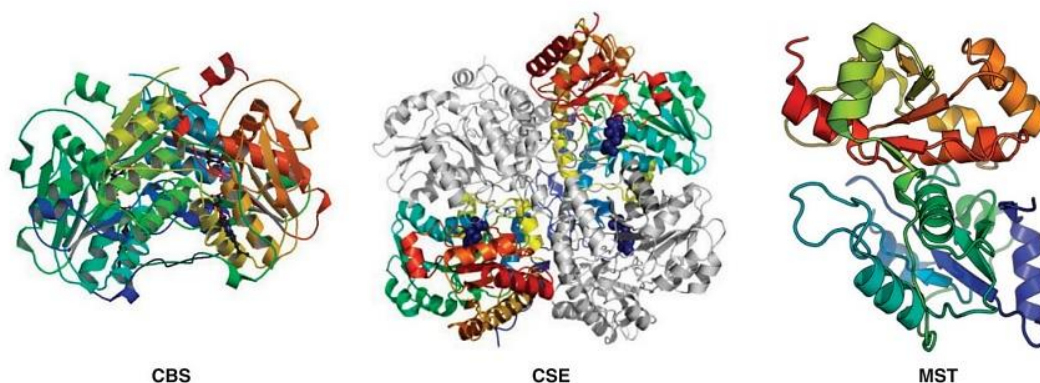
3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza

Enzym 3-MST je přítomen ve všech savčích tkáních a jeho hladiny exprese jsou na nich zcela závislé. Mozek, ledviny, játra, varlata, tlusté střevo a endokrinní orgány vykazují zvláště vysoké hladiny exprese tohoto proteinu (Nagahara 2018).

Tento enzym o velikosti 33 kDa (viz Obrázek 11) existuje v rovnováze monomer-dimer, přičemž jeho aktivní formou je monomer 3-MST. Jeho C – terminální doména je katalyticky aktivní.

3-MST pro biologickou syntézu sulfanu potřebuje nutně druhý enzym (cysteinaminotransferáza nebo CAT). Molekulární mechanismus produkce sulfanu zprostředkované enzymem 3-MST zahrnuje přenos síry z 3-merkaptopyruvátu na nukleofilní cystein (Cys247) v jeho aktivním místě. (Nagahara 2018; Mikami et al. 2011; Kimura 2015).

3-MST je závislý na zinku, který se většinou nachází v mitochondriích (Kolluru et al. 2017).



Obrázek 11: Struktura ústředních enzymů sulfanu – CBS – Cystathionin beta – syntáza; CSE – Cystathionin gama-lyáza; MST - 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (Wang 2012).

3.6.3 Výskyt a funkce sulfanu v savčím organismu

Větší zájem sulfanu byl věnován od objevu jeho přítomnosti v savčích tkáních. Tento plyn je produkován v různých částech těla, jako např. v oběhové, nervové, reprodukční soustavě. Zhao et al. (2001) potvrdil, že sulfan, podobně jako oxid dusnatý, může snižovat krevní tlak a regulovat kontraktilitu cév. Účinek sulfanu závisí na jeho koncentraci (Łowicka & Beltowsky 2007). Současně byla značná pozornost věnována roli sulfanu v centrálním nervovém systému. Vysoké koncentrace endogenního sulfanu v mozkové tkáni byly naměřeny u skotu, potkanů a lidí (Eto et al. 2002). Sirovodík podobně jako oxid dusnatý náleží k molekulám, které se účastní na přenosu informací mezi nervovými buňkami. Dokonce se podílí na procesech tvorby paměti a učení. Reguluje aktivitu mnoha enzymů a membránové iontové kanály v mozkové tkáni, které mohou různě ovlivňovat mozkovou aktivitu (Abe & Kimura 1996). Kromě funkce přenašečů signálu mezi neurony může sulfan plnit

také neuroprotektivní úlohu a chránit neurony před oxidačním stresem. Děje se tak jak zvyšováním koncentrace glutathionu (Kimura Y & Kimura H 2004), tak i aktivací ATP, K⁺ a Cl⁻ kanálů (Kimura et al. 2006). Při některých onemocnění mozku se koncentrace sulfanu v centrální nervové soustavě může rapidně měnit. Hladina sirovodíku klesá o více než polovinu u Alzheimerovy nemoci (Eto et al. 2002). U Downova syndromu se hladina sulfanu naopak zvyšuje (Ichinohe 2005).

Jednou ze zásadních vlastností sulfanu je schopnost modifikace aktivity mnoha enzymů. Zatímco oxid dusnatý může měnit aktivitu proteinu procesem S-nitrosylace (Hanafy et al. 2001), sulfan reguluje aktivitu proteinů nahrazením sulfanylové skupiny (SH) skupinou SSH v proteinu. Tato reakce, která je nazývána sulfhydratace, je významným faktorem, který řídí aktivity 10 až 25 % proteinů v játrech. Pomocí sulfhydratace se například velmi rychle zvyšuje aktivita enzymu glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázy. Tento enzym je nezbytnou součástí při procesu glykolýzy. Sulfhydratace je jednou z velmi důležitých reakcí, která řídí mnoho dalších nezbytných metabolických procesů v těle zvířat a lidí (Mustafa et al. 2009). Signální molekula může být součástí řízení kontraktálních funkcí v motilitě střev (Teague et al. 2002). Endogenní produkce sulfanu a exprese CSE a CBS byla také prokázána v acinárních i beta-buňkách slinivky břišní. Dále bylo prokázáno zvýšení koncentrace sulfanu při diabetu (Cao 2006).

Játra produkují ve srovnání s ostatními tkáněmi velké množství sulfanu, nicméně zvýšená tvorba sulfanu může přispět k poškození jater (Shirozu et al. 2014; Li et al. 2005).

Nedávné výsledky zkoumání na zvířatech dokázaly, že sulfan má klíčovou roli při zamezení zánětu a hojení poranění (Nishida et al. 2012; Cheng et al. 2004). Ve většině výzkumech se navíc prokázalo, že sulfan chrání buňky a tkáně proti poškození zeslabením oxidačního stresu. Vychytávání oxidantů tedy také svědčí o protizánětlivé vlastnosti sulfanu (Qabazard et al. 2013; Erwin et al. 2006; Li et al. 2012).

Prokázána byla tvorba sulfanu in vitro v kavernózních těliscích penisu a byl proto předpokládán farmakologický proerektilní účinek sulfanu (Srilatha et al. 2007).

3.6.4 Sulfan v reprodukci

Sulfan se také široce podílí na reprodukčních funkcích savců. Dříve však bylo u sulfanu léta známo, že v reprodukčním systému neměl zcela pozitivní účinek ve spojitosti s plodností (Reiffenstein et al. 1992). Expres sulfan produkujících enzymů regulující jeho endogenní produkci, byly nalezeny v samčím i samičím reprodukčním systému. Sulfan se podílí na procesech erekce penisu, kontraktility dělohy a vývoji oocytů (Šmelcová & Tichovská 2011).

Patel et al. (2009) našel enzymy CBS a CSE v děloze, fetální membráně a placentě potkanů. Dále byla detekována vysoká exprese enzymu CBS v myších vaječnicích ve folikulárních buňkách. CBS je také nezbytný pro plodnost myši, protože jeho knock-out vedl ke zkrácenému nepravidelnému estrálnímu cyklu a nižšímu počtu vyvíjejících se folikulů (Guzmán et al. 2006).

Liang et al. (2007) zkoumal potlačení exprese CBS v granulózních buňkách. V jeho výzkumu zjistil inhibici meiotického zrání oocytu, což naznačuje podíl CBS na zrání oocytů.

Také Krejčová et al. (2015) pozorovala hladinu sulfanu ve zralých oocytech, u kterých zatím neproběhl proces stárnutí. U těchto oocytů, které byly po dobu 24 hodin vystaveny stárnutí, významně klesla hladina sulfanu. V porovnání se zralými oocyty bez vystavení procesu stárnutí. Dále bylo v této studii prokázáno, že snížení produkce endogenního sulfanu vede ke zrychlenému stárnutí oocytů. Při podání tohoto sulfanu jsou oocyty naopak chráněny před stárnutím.

Podobně jako NO a CI se i sulfan podílí na regulaci kontraktility děložního svalů v samičí reprodukční soustavě. Srilatha et al. (2009) zjistil, že sulfan má za následek uvolňování hladké svaloviny samičího reprodukčního systému pomocí signální dráhy NO a zvýšené permeability senzitivních draslíkových kanálů.

Sulfan je molekula nezbytná pro usnadnění erekce penisu. Podle výzkumu Srilatha et al. (2006) se sulfan podílí na relaxaci hladkého svalstva v cévách a tento proces je jeden ze základních dějů vedoucích ke ztopoření penisu. Dále v kladném smyslu ovlivňuje tlak v kavernózních tělískách u primátů. Enzymy produkující sulfan CBS a CSE a také mRNA byly dále nalezeny v tkáni lidského penisu (d'Emmanuele et al. 2009). Na základě těchto výsledků se předpokládá, že sulfan by mohl sloužit jako alternativní lék proti poruchám erekce. Ve studii Sugiura et al. (2005) byla odhalena ve varlatech potkana odlišná distribuce sulfan produkujících enzymů. Protein CBS byl přítomen hlavně v Sertoliho, Leydigových a zárodečných buňkách. Avšak enzym CSE byl lokalizován výhradně v Sertoliho buňkách a nezralých zárodečných buňkách.

Sulfan hraje roli i v mužské neplodnosti. Několik studií prokázalo nerovnováhu enzymů CBS a CSE v transsulfurační dráze u spermií (Sugiura et al. 2005; Wu et al. 2021). Wang et al. (2018) také ve své studii uvádí snížené množství sulfanu v semenné plazmě infertilních mužů a jeho pozitivní vliv na motilitu. Nízká hladina H₂S v semenné plazmě byla zjištěna hlavně u pacientů, kteří měli ejakulát se sníženou koncentrací a motilitou spermií. Dále byly spermie vystaveny účinku dvou různých donorů sulfanu – GYY4137 a NaHS. Pomalejší uvolňování a nižší koncentrace sulfanu byly zaznamenány u donoru GYY4137. Při postupném zvyšování hladiny sulfanu došlo ke zlepšení motility spermií. Naopak rychlé uvolňování sulfanu ve vysokých koncentracích měl za následek NaHS. Motilita spermií byla naopak ještě nižší než při podání inhibitoru CBS. Wang et al. (2018) dále potvrdil, že má sulfan pozitivní účinek na spermatogenezi a udržení hematotestikulární bariéry. Je to z důvodu protizánětlivých a antioxidačních účinků sulfanu. Tyto účinky pomáhají spermiím zvládat oxidativní stres a zánět.

Snížená exprese CBS a CSE u neplodných mužů byla dále prokázána v nedávné studii Akbarian et al. (2022). Prokázalo se, že koncentrace a motilita spermií u neplodných mužů byly významně nižší. Také hladiny exprese genů CBS a CSE u neplodných mužů byly významně nižší než u fertilní skupiny.

U samčí reprodukční soustavy jsou reaktivní formy kyslíku, dusíku a síry považovány za základní signální molekuly, které se velmi často účastní mnoha fyziologických dějů, jako je vývoj spermií, zrání a kapacitace. V nedávné studii Římnáčková et al. (2022) byl detekován H₂S i jeho enzymy (CSE, CBS a 3MST) v samčí reprodukci, včetně spermií. V této studii byl poskytnut důkaz, že spermie s obsahem H₂S vede k persulfidaci proteinů, jako

je glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, tubulin a kotevní protein A-kináza. Celkově tato studie naznačuje, že persulfidace, jako součást redoxní signální dráhy, je přísně regulována enzymatickou produkcí H_2S a je nezbytná pro životaschopnost spermií. Na základě nedávných poznatků se potvrdilo, že postupná ztráta enzymů produkující sulfan není jenom při zrání v nadvarleti, ale pokračuje v dalších krocích, jako je právě kapacitace a akrozomální reakce.

4 Metodika

4.1 Zpracování biologického materiálu

K experimentům byl využit nativní kančí ejakulát v podobě inseminačních dávek plemene Duroc. Vzorky spermií byly získány z inseminační stanice Skršín (NATURAL, spol. s.r.o.). Při převzetí došlo k okamžitému zpracování nativního kančího ejakulátu, který byl uchováván v inseminačních dávkách v chladicím termoboxu při 17 °C.

4.1.1 Lyzace vzorků spermií

Při ředění a přípravě nativního kančího ejakulátu se po celou dobu experimentu pracovalo s roztokem PBS (0,01 M fosfátový pufr; výrobce: Sigma-Aldrich, USA) ohřátým na 38 °C. Do dvou zkumavek byl ihned odebrán 1 ml ejakulátu a následně byly zkumavky doplněny 9 ml PBS. Při laboratorní teplotě po dobu 10 minut byla provedena centrifugace (Hettich Mikro 22R; DJB Labcare, Velká Británie) při 300 ×g. Vzniklý supernatant byl odebrán a odstraněn. Ve zkumavce se zbylými spermii byl objem doplněn do 10 ml PBS. Celý tento proces byl ještě dvakrát zopakován. Pro potřeby kapacitace a akrozomální reakce bylo po poslední centrifugaci doplněno kapacitační médium TL-HEPES-PVA do 10 ml. Na přípravu 250 ml BASIC-TL-HEPES byly použity následující chemikálie od výrobce Sigma-Aldrich, USA:

- 1,6585 g NaCl
- 0,05965 g KCl
- 0,0102 g NaH₂PO₄
- 0,35 ml laktát sodný
- 0,02545 g MgCl₂ · 6H₂O
- 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.

Do zbývajících experimentálních skupin byl přidán roztok PBS. Takto připravené vzorky byly resuspendovány. Poté v inkubátoru (Sanyo MCO-19AIC; Marshall Scientific, USA) probíhala kapacitace po dobu 120 minut o teplotě 38 °C a 5% CO₂.

Po kapacitaci byly vzorky spermií samostatně po dobu 5 minut 3x centrifugovány (Labnet International, Inc., USA) při 300×g. Následně po první a druhé centrifugaci byl znovu odstraněn supernatant a přimíchán roztok PBS do objemu 1 ml. Taktéž i po třetí centrifugaci byl odstraněn supernatant. Pro následnou metodu Western blot bylo k těmto vzorkům přidáno 100 µl neredukujícího vzorkového pufru (2 ml glycerol, 4 ml 10 % SDS, 1,6 ml 0,5 M TRIS.HCl, pH 6,8, 0,5 mg bromfenolové modři). Následně byly tyto vzorky vždy po 5 sekundách vortexovány a celkově lyzovány 1 hodinu. Po ukončení tohoto procesu byly

vzorky nejdříve povařeny po dobu 5 minut. V dalším kroku byly lyzáty spermií centrifugovány při 10 000 xg po dobu 5 minut. Takto připravené vzorky byly uskladněny v mrazáku pro další zpracování.

Pro potřeby nepřímé imunofluorescence bylo odebráno 200 µl suspenze spermií, ke kterým bylo přidáno 800 µl roztoku PBS. Následně bylo do předem připravených sklíček s označenými kolečky pomocí PAP Pen liquid blocker (Sigma-Aldrich, USA) přeneseno 20 µl suspenze spermií a následně také 50 µl vymraženého aceton:methanolu (ředění 1:1). Jedno kolečko bylo připraveno pro reakci s protilátkou, druhé sloužilo jako negativní kontrola. Vzorky byly takto 5 min inkubovány při pokojové teplotě a následně byly omyty v roztoku PBS a následně se nechaly zaschnout. Takto připravené vzorky byly uskladněny v lednici a byly připravené pro nepřímou imunofluorescenci.

4.2 SDS elektroforéza a Western blot

4.2.1 Použité chemikálie a roztoky

Použité protilátky:

- **králíčí polyklonární primární protilátka anti-CTH** – CTH Polyclonal Antibody #AB136604; výrobce: ABCAM, USA
- **anti-rabbit sekundární protilátka** – IgG Antibody Goat anti Rabbit IgG 402001, konjugovaná s křenovou peroxidázou; výrobce: Bio-Rad Laboratories, USA.
- **protilátka proti alfa-tubulinu** – výrobce: Sigma-Aldrich, USA

Další použité chemikálie:

- **PBS** - 0,01 M fosfátový pufr; výrobce: Sigma-Aldrich, USA
- **Neredukující vzorkový pufr** - 2 ml glycerol, 4 ml 10 % SDS, 1,6 ml 0,5 M TRIS.HCl, pH 6,8, 0,5 mg bromfenolové modři
- **Roztok A**–30% roztok akrylamidu/bis-akrylamidu; výrobce: Sigma-Aldrich, USA
- **Pufr B** – 1,5 M Tris, pH 8,8; výrobce: Bio-Rad Laboratories, USA
- **Pufr C** – 0,5 M Tris, pH 6,8; výrobce: Bio-Rad Laboratories, USA
- **10% SDS** – 10 % dodecylsírán sodný; výrobce: Bio-Rad Laboratories, USA
- **TEMED** – výrobce – PlusOne, USA
- **10% APS** – 1 g persíranu amonného, 10 ml destilované vody
- **Elektrodotový pufr** – 15 g Tris, 72 g glycin, 5 g SDS, 1 l destilovaná voda, ředění 1:4
- **Transferový pufr** – 3,03 g Tris, 14,4 g glycin, 800 ml destilovaná voda, 200 ml methanol
- **Ponceau S solution** – výrobce: Sigma-Aldrich, USA
- **PBS s 0,1% Tweenem** – Tween 20; výrobce: Sigma-Aldrich, USA
- **Sušené mléko** – Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk; výrobce: Bio-Rad Laboratories, USA

- **chemiluminiscenční substrát** – SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; výrobce: ThermoFisher Scientific, USA
- **Proteinový molekulový standard** – Precision Plus Protein™ WesternC™ Blotting Standards; výrobce: Bio-Rad, USA
- **Coomassie Brilliant Blue R-250** – 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250 (výrobce: Sigma-Aldrich, USA), 45ml methanolu, 9 ml kyseliny octové do 100 ml destilované vody.

Gely:

Tabulka I: Složení separačního 12% gelu

Separací 12% gel	
Sloučenina	Množství
Destilovaná H ₂ O	5,25 ml
Pufř B	3,75 ml
Roztok A	6 ml
10% SDS	150 ul
TEMED	6,75 ul
10% APS	105 ul

Tabulka II: Složení zaostřovacího 4% gelu

Zaostřovací 4% gel	
Sloučenina	Množství
Destilovaná H ₂ O	1,52 ml
Pufř C	625 ul
Roztok A	325 ul
10 % SDS	25 ul
0,05% Bromfenolová modř	5 ul
TEMED	3,8 ul
10% APS	50 ul

4.2.2 SDS elektroforéza

Pro přípravu SDS elektroforézy je potřeba si připravit příslušnou aparaturu. Sestavená skla se zajistí svorkami. Dále byl připraven 12% separační gel (viz Tabulka I.). Všechny výše vypsané sloučeniny z tabulky č. I. byly smíchány přesně podle uvedeného pořadí. Pro přípravu 2 gelů bylo použito 10 ml namíchaného 12% gelu. Po tomto procesu se naněsla destilovaná voda na povrch separačního gelu a dále se nechala ve vertikální poloze zaschnout na 30 minut.

V průběhu zasychání separačního gelu se připravil podle tabulky č. II. 4% zaostřovací gel. Opět podle uvedeného pořadí. Po uběhnutí 30 minut a zaschnutí separačního gelu

bylo nutné vylít destilovanou vodu a následně nahradit zaostřovacím gelem, do kterého byl aplikován 15 žlábkový hřebínek pro tvorbu jamek. Polymerizace trvala cca 20 minut. Po uběhnutí 20 minut byly hřebínky ze zaostřovacího gelu opatrně vyjmuty. Skla se zaschnutými gely byla odjištěna ze svorek a přesunuta do elektroforetické aparatury (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Po tomto procesu byla celá souprava zalita elektrodočným pufrem. Do vzniklých jamek byly nanесeny Hamiltonovou pipetou 3 µl molekulárních proteinových standardů a 15 µl lyzátu spermií.

Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji. Elektroforéza byla nastavena na 80 V po dobu 30 minut, než došlo k průchodu vzorku přes zaostřovací gel. Ve chvíli, kdy vzorky postoupily přes zaostřovací gel bylo napětí zvýšeno na 120 V po dobu 60 minut.

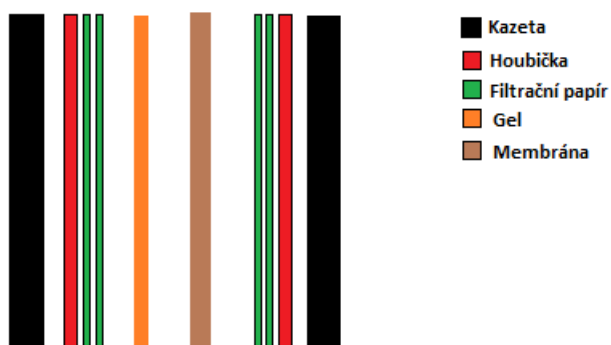
Barvení proteinů bylo provedeno prostřednictvím Comassie Brilliant Blue R-250 v gelu rozdělených pomocí SDS elektroforézy za účelem denzitometrického hodnocení.

4.2.3 Western blot metoda

Metoda Western blot navazovala na SDS elektroforézu. Pro experimenty byla využita nitrocelulósová membrána (0.45 µm NC; Amersham™ Protran™, Germany) nebo PVDF membrána (0.45 µm PVDF; Immobilon®-P Transfer Mebrane, Ireland).

Komponenty pro elektropřenos na 1 membránu (viz Obrázek 12):

- filtrační papíry Whatman™ (Chromatography paper; GE Healthcare, USA)
- Nitrocelulósová nebo PVDF membrána
- 2 houbičky
- Kazeta



Obrázek 12: Složení kazety na Western Blot

Sestavená blotovací souprava byla namočená na 15 minut do transferového pufru. Pro aktivaci PVDF membrány bylo nezbytné membránu na 1 minutu ponořit do 20 ml methanolu. Ze sklíčků byl po SDS elektroforéze odstraněn zaostřovací gel. Následně byl separační gel přenesen do blotovací kazety v tomto sestavení (viz Obrázek 12): kazeta,

houbička, 2 filtrační papíry Whatman, gel, membrána, 2 filtrační papíry Whatman, kazeta. Celá tato sestava byla vložena do blotovacího rámu a ten byl následně vložen do vaničky určené pro elektropřenos. Do tohoto zařízení byl až po rysku nalit transferový pufr. Transfer byl proveden při 500 mA po dobu 90 minut.

4.2.4 Imunodetekce pomocí protilátky

Po přenesení proteinů z gelu na membránu byla kazeta vyjmuta, membrána byla opláchnuta v destilované vodě a 5 minut barvena Ponceau pro vizualizaci proteinů. Pro následné použití membrány pro imunodetekci bylo pozadí odbarveno destilovanou vodou a roztokem PBS. Deaktivace volných míst na membráně byla provedena pomocí 5% sušeného mléka v PBS 1 hodinu na třepačce. Poté byla membrána 2x promývána v PBS s 0,1% Tweenem po dobu 5 minut na rotační třepačce (MC-T6-Pro; LABtechnik, s.r.o., Brno). Dále následovala aplikace 2 ml ředěné (1:1000 v PBS) specifické primární protilátky: králičí polyklonální anti-CTH. Inkubace probíhala v lednici po dobu 1,5 hodiny nebo přes noc. Pro zjištění proteinového obsahu v lyzátech byly membrány inkubovány s králičí protilátkou proti alfa-tubulinu (Sigma-Aldrich, USA). Druhý den byla membrána promyta 3x po 10 minutách v PBS s 0,1% Tweenem a následovala aplikace 2 ml sekundární protilátky proti králičím imunoglobulinům ředěným 1:3000 v roztoku PBS. Membrána byla inkubována se sekundární protilátkou po dobu 60 minut na rotační třepačce. Poté byla opět membrána promyta 4x po 5 minutách v roztoku PBS s 0,1% Tweenem a 2x po 5 minutách v PBS bez Tweenu.

Následovala vizualizace specifické detekce proteinu protilátkou pomocí elektrogenované chemiluminiscence. Na každou membránu byl nanesen 1 ml chemiluminiscenčního substrátu. Pro tento proces vizualizace byl použit přístroj Azure c300 Gel Imaging System (Azure Biosystems, USA).

4.3 Nepřímá imunofluorescence

4.3.1 Použité chemikálie a roztoky

Použité protilátky:

- **králičí polyklonální primární protilátka anti-CTH** – CTH Polyclonal Antibody #AB136604; ABCAM, USA
- **anti-rabbit sekundární protilátka** – IgG Antibody Goat anti Rabbit IgG 402001, konjugovaná s Alexa Fluor 488 (výrobce: ThermoFisher Scientific, USA); výrobce: Bio-Rad Laboratories, USA.

Další použité chemikálie:

- **PBS** – 0,01 M fosfátový pufr; výrobce: Sigma-Aldrich, USA
- **SuperBlock** – Blocking Buffer in PBS; výrobce: ThermoFisher Scientific, USA

- **PNA lektin s Rhodaminem** – Rhodamine Peanut Agglutinin; výrobce: Vector Laboratories, USA
- **Montovací médium Vectashield s DAPI** – výrobce: Vector Laboratories, USA

4.3.2 Postup

Připravená skla se spermiemi zafixovaná aceton/methanol, byla nejprve omyta v roztoku PBS a následně ponechána oschnout. Na kontrolní a experimentální spermie bylo nanášeno 150 μ l SuperBlocku pro blokaci. Dalším krokem byla inkubace vzorků po dobu 30 minut ve vlhké komůrce. Po uplynutí 30 minut byla sklíčka opět omyta v roztoku PBS a destilované vodě. Na sklíčka se spermiemi bylo přidáno 100 μ l primární protilátky. Králičí polyklonární protilátka anti-CTH byla ředěna 1:200 s roztokem PBS. Primární protilátka anti-CTH byla nanášena pouze do experimentu. Do kontrolních vzorků bylo aplikováno 100 μ l roztoku PBS, místo primární protilátky. Následovala inkubace do druhého dne v lednici. Následující den byla sklíčka promyta v roztoku PBS a následně bylo na pokusné i kontrolní vzorky nanášeno 100 μ l sekundární protilátky konjugované s Alexa Fluor 488 ředěnou 1:300 v PBS. Sekundární protilátky byly tentokrát nanášeny jak na experiment, tak na negativní kontrolu. Po nanášení sekundární protilátky byly vzorky uchovávány ve tmě. Inkubace vzorků se sekundární protilátkou trvala ve vlhké komůrce 60 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byly vzorky omyty nejprve v roztoku PBS a následně ještě v destilované vodě. V dalším kroku na ně bylo aplikováno 100 μ l PNA lektinu s Rhodaminem pro obarvení akrozomů, které bylo ředěno v poměru 1:700. Po nanášení PNA proběhla inkubace, která trvala 30 minut ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Na závěr byly vzorky opět omyty v roztoku PBS a destilované vodě. Po osušení byla posledním krokem aplikace 10 μ l montovacího média Vectashield s DAPI pro vizualizaci jader. Sklíčka byla zakryta krycími skly a zafixována lakem na nehty. Takto připravená sklíčka byla skladována při teplotě 4 °C ve tmě a jejich dokumentace proběhla na konfokálním mikroskopu v programu (Zeiss LSM 800, Německo) při zvětšení 630krát.

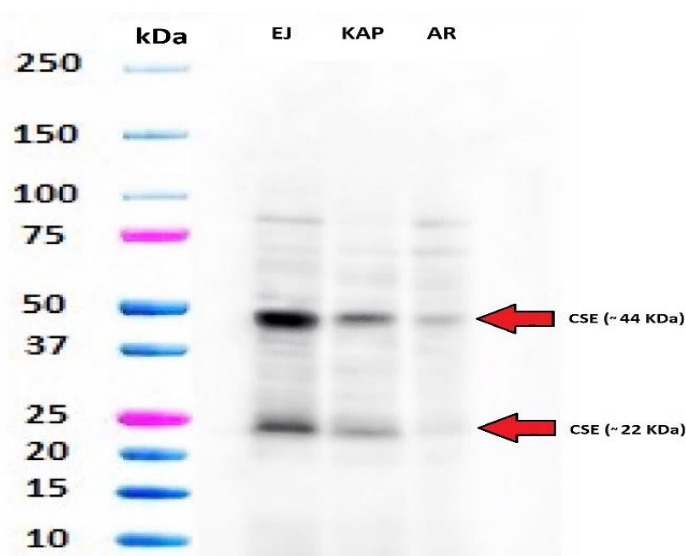
4.4 Statistické vyhodnocení

Detekce enzymu CTH pomocí metody Western blot a nepřímé imunofluorescence byla minimálně 3x zopakována. Pro denzitometrickou analýzu exprese a lokalizace proteinů byl použit program NIS Elements Viewer (Nikon Europe BV, Nizozemsko). Pro vypracování statistických analýz byl využit program Statistica 12 (StatSoft CR s.r.o., Česká republika). Pro zjištění statistické významnosti byla vybrána metoda jednofaktorová ANOVA. Hladina statistické významnosti odpovídala $p < 0,05$.

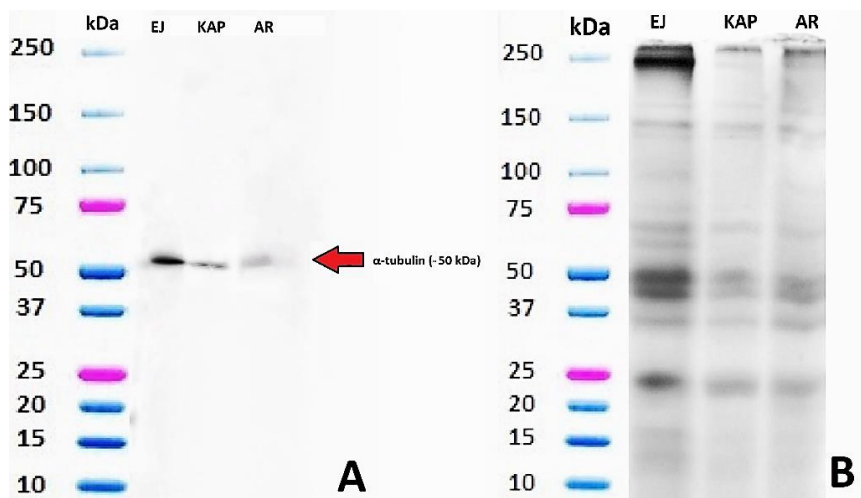
5 Výsledky

5.1 Detekce enzymu produkující sulfan CSE v kančích spermích

Pomocí metody Western blot (kap. 4.2) byla prokázána přítomnost enzymu CSE v extraktech spermích. Detekce byla provedena u ejakulovaných (EJ) a kapacitovaných (KAP) spermích a spermích po akrozomální reakci (AR), nicméně intenzita signálu se v rámci jednotlivých procesů lišila. Nejvyšší průměrná intenzita signálu sulfan produkujícího enzymu byla detekována u ejakulovaných spermích. U spermích kapacitovaných a po akrozomální reakci se intenzita snižovala (viz Obrázek 13). Průměrná intenzita signálu enzymu CSE byla zhodnocena analýzou obrazu, dále byla vyjádřena relativně a byla vztažena k průměrné intenzitě signálu ejakulovaných spermích. Imunodetekce primární protilátky proti sulfan produkujícímu enzymu CSE označila na membráně tetramer o molekulové hmotnosti 44 kDa. Dále byl na membráně detekován i proteinový proužek o molekulové hmotnosti 22 kDa. Tento protein odpovídá svojí molekulovou hmotností enzymu CSE (viz Obrázek 13). Kontrola výskytu proteinů byla provedena zjištěním α -tubulinu na membráně a také obarvením proteinů v gelu pomocí Comassie Brilliant Blue R-250 (viz Obrázek 14).



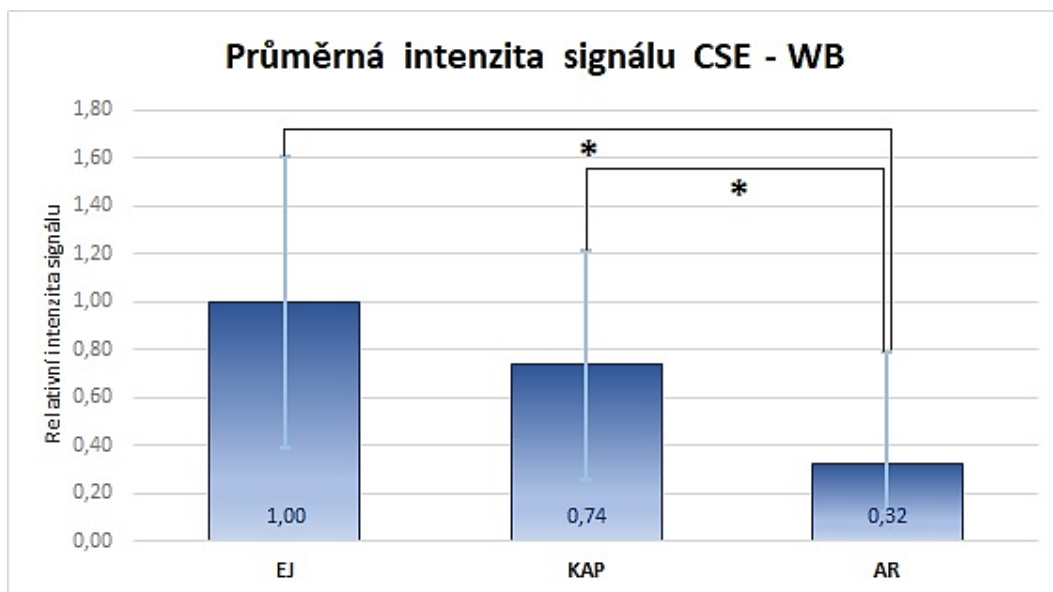
Obrázek 13: Imunodetekce CSE v extraktech kančích spermích metodou Western blot. EJ - ejakulované spermie; KAP – kapacitované spermie; AR – spermie po akrozomální reakci. Šipky značí odpovídající detekci CSE proteinu.



Obrázek 14: Kontrolní imunodetekce (A) α -tubulinu a (B) obarvení proteinů v gelu pomocí Comassie. Ej – ejakulované spermie; Kap – kapacitované spermie; AR – spermie po akrozomální reakci. Šipka značí odpovídající detekci α -tubulinu (~50 kDa).

Hodnoty proteinu CSE byly naměřeny pomocí denzitometrické analýzy v programu NIS Elements Viewer. Výsledky jsou buď vztažené k obarveným proteinům v gelu pomocí Comassie Brilliant Blue R-250 anebo k signálu α -tubulinu (viz Obrázek 15) za účelem zahrnutí rozdílného množství proteinů v celkové nanášce v extraktech ejakulovaných a kapacitovaných spermií a spermií po akrozomální reakci.

Relativní průměrná intenzita signálu enzymu CSE byla podrobena statistické analýze v programu Statistica 12 pomocí statistické metody ANOVA. Po porovnání všech vzorků byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi ejakulovanými spermiemi a spermiemi po akrozomální reakci. Statisticky průkazný rozdíl ($p < 0,05$) byl také mezi kapacitovanými spermiemi a spermiemi po akrozomální reakci. Mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermiemi nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl (viz Obrázek 15).

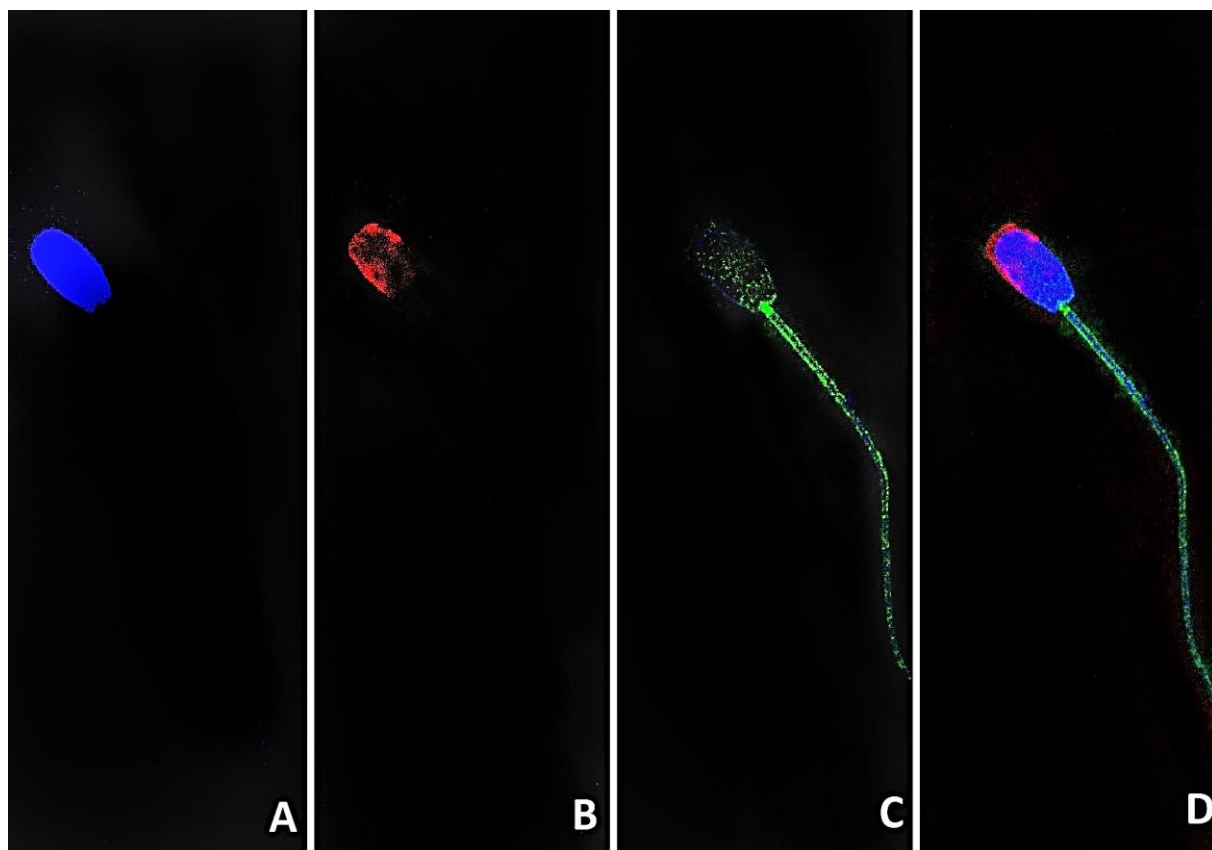


Obrázek 15: Relativně vyjádřená průměrná intenzita signálu CSE v kančích spermích pomocí metody Western blot vztážená k celkové nanášce proteinů ve vzorku nebo k signálu α -tubulinu. EJ – ejakulované spermie; KAP – kapacitované spermie; AR – spermie po akrozomální reakci. V grafu je uvedena směrodatná odchylka mezi jednotlivými měřeními vyznačená modrými svorkami; statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) je označen hvězdičkami (*).

5.2 Lokalizace enzymu produkující sulfan CSE v kančích spermích

Nepřímá imunofluorescenční metoda (kap. 4.3) byla využita jako kontrolní metoda k potvrzení přítomnosti sulfan produkujícího enzymu CSE a jeho lokalizace ve spermích. I u této metody byla průměrná intenzita signálu CSE zhodnocena analýzou obrazu a následně vyjádřena relativně. Pomocí nepřímé imunofluorescence byla sledována lokalizace sulfan produkujícího enzymu CSE na preparátech spermíí ejakulovaných (EJ), kapacitovaných (KAP) a akrozomálně zreagovaných (AR).

Lokalizace CSE ve spermích byla detekována pomocí polyklonální protilátky a následně sekundární protilátkou s fluorochromem (zelené značení). Akrozom byl sledován pomocí PNA lektinu značeného Rhodaminem (červené značení) a chromatin byl značen DAPI (modrá fluorescence) (viz Obrázek 16). Z experimentu je patrné, že CSE je lokalizován v celé spermii, a to v celé části hlavičky, krčku a bičíku.



Obrázek 16: Lokalizace enzymu CSE v ejakulovaných kančích spermích. A) Jádru označeno DAPI (modře); B) akrozom PNA (červeně); C) protein CSE detekovaný protilátkou (zeleně); D) složený obrázek. Vyhodnocení pomocí konfokálního mikroskopu. Zvětšení 630x.

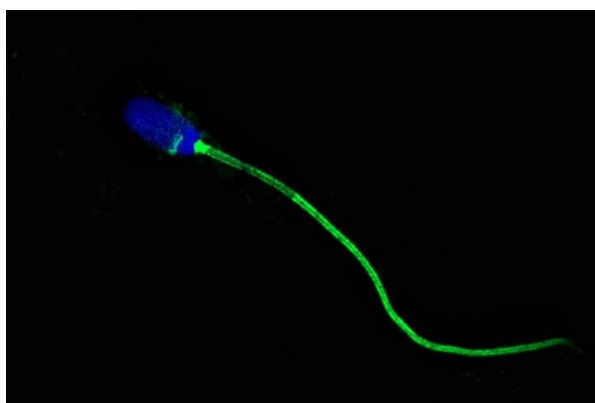
CSE byl detekován u spermíí ejakulovaných (viz Obrázek 17), kapacitovaných (viz Obrázek 18) a akrozomálně zreagovaných (viz Obrázek 19). Pomocí analýzy obrazu byla změřena intenzita signálu enzymu. Signál CSE byl pozorován v celé spermii a vykazoval snižující se tendenci (viz Obrázek 20). Největší signál byl pozorován u ejakulovaných spermíí. U kapacitovaných spermíí se signál začal postupně snižovat. Nejnižší hodnoty byly pozorovány u spermíí po akrozomální reakci. Po porovnání vzorků EJ, KAP a AR byl úbytek proteinu viditelný, ale nebyl statisticky významný ($p < 0,05$).



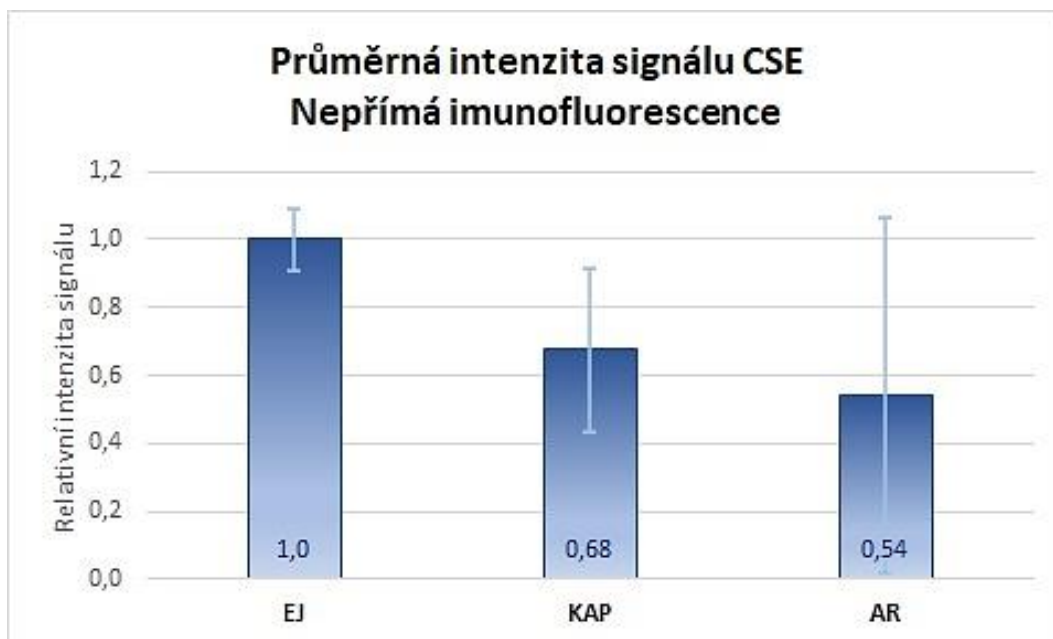
Obrázek 17: Intenzita signálu CSE u ejakulovaných kančích spermíích. Jádro označeno DAPI (modře); akrozom PNA (červeně); protein CSE protilátkou s fluorescenčním značením Alexa Fluor 488 (zeleně). Vyhodnocení pomocí konfokálního mikroskopu. Zvětšení 630x.



Obrázek 18: Intenzita signálu CSE u kapacitovaných kančích spermíích. Jádro označeno DAPI (modře); akrozom PNA (červeně); protein CSE protilátkou s fluorescenčním značením Alexa Fluor 488 (zeleně). Vyhodnocení pomocí konfokálního mikroskopu. Zvětšení 630x.



Obrázek 19: Intenzita signálu CSE u akrozomálně zreagovaných kančích spermíích. Jádro označeno DAPI (modře); akrozom PNA (červeně); protein CSE protilátkou s fluorescenčním značením Alexa Fluor 488 (zeleně). Vyhodnocení pomocí konfokálního mikroskopu. Zvětšení 630x.



Obrázek 20: *Relativně vyjádřená průměrná intenzita signálu CSE v kančích spermích pomocí metody nepřímé imunofluorescence. EJ – ejakulované spermie; KAP – kapacitované spermie; AR – spermie po akrozomální reakci. V grafu je uvedena směrodatná odchylka mezi jednotlivými měřeními; statisticky významný rozdíl nebyl zjištěn ($p < 0,05$).*

6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo prokázat přítomnost a změny exprese enzymu produkujícího sulfan cystathionin- γ -lyáza (CSE) v kančích spermiiích v průběhu kapacitace a akrozomální reakce. Přítomnost enzymů produkujících sulfan byla nalezena v savčích buňkách různých orgánových tkání. Vyskytují se v kardiovaskulární, nervové a gastrointestinální tkáni. V těchto tkáních mají tyto enzymy svoji specifickou funkci. Podporují například neokapilarizaci a hypotenzi. Dále jsou důležité při ochraně neuronových buněk před oxidativním stresem (Eto et al. 2002; Whiteman et al. 2004; Łowicka & Bełtowski 2007). V nedávné době byly popsány enzymy produkující sulfan i v reprodukční soustavě savců. V reprodukčním traktu vykonávají enzymy produkující sulfan různé činnosti. Jejich přítomnost byla nalezena v děloze a placentě potkanů. Dále byly detekovány enzymy v myších vaječnicích, a to především ve folikulárních a granulózních buňkách (Guzmán et al. 2006; Liang et al. 2007; Patel et al. 2009). Tyto enzymy byly také nalezeny a popsány v prasečích oocytech (Krejčová et al. 2015). V samčí reprodukční soustavě byly enzymy produkující sulfan nalezeny v Sertoliho a Leydigových buňkách, buňkách zárodečných a tkáni lidského penisu, kde se podílí na tlaku v kavernózních tělískách a relaxaci hladkého svalstva v cévách, což je nezbytné pro usnadnění erekce penisu (Sugiura et al. 2005; Srilatha et al. 2006; d'Emmanuele et al. 2009). Enzymy produkující sulfan hrají roli i v mužské neplodnosti. Studie Sugiura et al. (2005) a Wu et al. (2021) prokázaly ve svých experimentech nerovnováhu enzymů CBS a CSE v transsulfurační dráze (katabolismu cysteinu/ H_2S) u spermiiích. Wang et al. (2018) také ve své studii uvádí snížené množství sulfanu v semenné plazmě neplodných mužů a jeho pozitivní vliv na motilitu. Tuto skutečnost prokázal i Akbarian et al. (2022), který ve svých experimentech potvrdil nižší koncentraci sulfanu spolu se sníženou motilitou spermiiích u neplodných mužů.

V této práci jsme se zaměřili na detekci enzymu CSE a změnu jeho exprese při procesu kapacitace a akrozomální reakce u kančích spermiiích. Metodou Western blot jsme detekovali pomocí polyklonální protilátky enzym produkující sulfan CSE v proteinových extraktech spermiiích ejakulovaných, *in vitro* kapacitovaných a spermiiích po *in vitro* navozené akrozomální reakci. Podařilo se nám detekovat dva proteinové proužky ve všech vzorcích spermiiích, a to jako jeho tetramer o molekulové hmotnosti okolo 44 kDa. Řimnáčová (2022), která sledovala enzymy produkující sulfan v myších, lidských a kančích spermiiích, ve své studii detekovala enzym CSE v rozmezí molekulových hmotností 40-50 kDa. Druhý námi nalezený proteinový proužek měl molekulovou hmotnost okolo 22 kDa. Což by naznačovalo výskyt dimeru CSE. Intenzita detekovaných proteinových proužků se však u vzorků spermiiích snižovala s jejich rozdílným maturačním stavem. Nejvíce výrazný proužek byl detekován u ejakulovaných spermiiích. Druhé v zastoupení množství tohoto proteinu byly kapacitované spermie. S nejnižší intenzitou signálu byly vyhodnoceny spermie po akrozomální reakci. Pro kontrolu výskytu proteinů byla provedena imunodetekce na α -tubulin. V průběhu experimentu s ním však byl problém při jeho detekci na membráně. Z tohoto důvodu jsme zvolili metodu barvení proteinů ve vzorcích spermiiích přímo v gelu pomocí Comassie Brilliant Blue R-250. K hodnocení množství enzymu CSE v kančích spermiiích byly pak využity obě tyto metody pro normalizaci

detekce. Přítomnost CSE byla jak u kapacitovaných tak i akrozomálně zreagovaných spermií statisticky významně snížena.

Metodou nepřímé imunofluorescence jsme zjišťovali přítomnost a intracelulární distribuci CSE a změny v jeho expresi v ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných spermiích. CSE jsme ve spermiích našli, ale jeho intracelulární distribuce nebyla rovnoměrná. V akrozomu byla intenzita signálu nízká. Naopak vysoká intenzita signálu CSE byla naměřena v postakrozomální části hlavičky, krčku a bičíku spermie, což naznačuje, že by sulfan mohl hrát podstatnou roli při regulaci motility spermie. To by odpovídalo studiím, které publikovali Akbarian et al. (2022) a Římnáčová et al. (2022). Naopak Zhao et al. (2016) ve svých experimentech na kančích spermiích uvádí sníženou motilitu spermií vystavených působení donoru sulfanu. Výsledky našeho experimentu ukázaly na změnu exprese CSE. Exprese CSE se postupně v kančích spermiích v průběhu kapacitace a akrozomální reakce snižovala. Úbytek proteinu byl sice vizuálně zřejmý, ale rozdíly v relativně vyjádřené průměrné intenzitě signálu CSE nebyly signifikantní. Důvodem byla zřejmě vyšší variabilita biologického materiálu a tím i velká směrodatná odchylka. Římnáčová et al. (2022) ve své práci obdobně popsali postupné ubývání těchto enzymů ze spermií nejen během jejich zrání v nadvarleti, ale také v dalších procesech, jako je například kapacitace a vazba spermie na *zona pellucida* oocyty, zatímco u myších spermií Teng et al. (2013) ve své studii uvádí naopak zvyšující se množství enzymů produkujících sulfan při probíhající kapacitaci. Rozdíly v distribuci CSE mohou být důsledkem remodelace, která doprovází zrání spermií, kdy dochází částečně k úbytku enzymů z povrchu spermie. Toto ve své studii potvrzuje i Římnáčová et al. (2022).

Nicméně přítomnost enzymu CSE produkujícího sulfan v kančích spermiích a změna jeho exprese v průběhu kapacitace a akrozomální reakce dává předpoklad pro domněnku, že je tento enzym zapojený do regulace těchto fyziologických procesů u kančích spermií. Pro potvrzení úlohy CSE při kapacitaci a akrozomální reakci je však třeba dalších výzkumů zacílených například na motilitu spermií s inhibovaným CSE enzymem nebo indukci akrozomální reakce s přidavkem donorů sulfanu. Další zajímavý experiment by mohl být zacílen na samostatný další enzym produkující sulfan 3-MST, který je stále v mnoha ohledech neprobádaným proteinem v samčí reprodukci.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo shrnutí současných poznatků o vybraných proteinech kančích spermií a jejich funkce při kapacitaci a akrozomální reakci. Dále ověření hypotézy, že vybraný protein kančích spermií sulfan produkující enzym CSE se na kapacitaci a akrozomální reakci podílí, a že se jeho exprese a lokalizace v buňce během procesů mění. K potvrzení této hypotézy byly při laboratorním výzkumu využity metody Western blot a nepřímá imunofluorescence. Získané výsledky potvrdily stanovenou hypotézu, že se v kančích spermiích sulfan produkující enzym CSE vyskytuje a jeho exprese se v závislosti na kapacitaci a akrozomální reakci mění. Přítomnost CSE vykazovala s postupnými ději snižující se tendenci. Uvedené výsledky naznačují, že sulfan produkující enzym CSE by mohl hrát v průběhu kapacitace a akrozomální reakce svou určitou roli. Nicméně bylo by vhodné provést další experimenty se zaměřením na konkretizaci funkce enzymu v průběhu kapacitace, akrozomální reakce a infertility.

8 Literatura

- Abe K & Kimura H. 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience* **16**:066-1071.
- Abou-haila A & Tulsiani DR. 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of biochemistry and biophysics* **485**:72-81.
- Ahmad A, Druzhyina N, Szabo C. 2019. Effect of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase deficiency on the development of multiorgan failure, inflammation, and wound healing in mice subjected to burn injury. *J Burn Care Res* **40**:148-156.
- Ahmad A, Gero D, Olah G, Szabo C. 2016. Effect of endotoxemia in mice genetically deficient in cystathionine-gamma-lyase, cystathionine-beta-synthase or 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. *Int J Mol Med* **38**:1683-1692.
- Aitken SM & Kirsch JF. 2005. The enzymology of cystathionine biosynthesis: strategies for the control of substrate and reaction specificity. *Archives of biochemistry and biophysics* **433**:166-175.
- Akbarian F, Tavalae M, Dattilio M, Nasr-Esfahani MH. 2022. Down-regulated expression of cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase in varicocele, and infertile men: a case-control study. *Cell Journal (Yakhteh)* **24**:176.
- 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.
- 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.
- Augsburger F & Szabo C. 2020. Potential role of the 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST)-hydrogen sulfide (H₂S) pathway in cancer cells. *Pharmacol Res* **154**:104083.
- Avidor-Reiss T. 2018. Rapid evolution of sperm produces diverse centriole structures that reveal the most rudimentary structure needed for function. *Cells* **7**:67.
- Avidor-Reiss T, Carr A, Fishman EL. 2020. The sperm centrioles. *Molecular and Cellular Endocrinology* **518**:110987.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. 1996. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci.* **1**:189-205.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Forti G. 2002. Signal transduction pathways in human spermatozoa. *Journal of reproductive immunology* **53**:121-131.

- Baltz JM, Oneeka Williams P, Cone RA. 1990. Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biology of Reproduction* **43**:485-491.
- Bearer E & Friend D. 1990. Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. *Journal of Electron Microscopy Technique* **16**:281-297.
- Beauchamp RO, Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA, Leber P. 1984. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *CRC Critical Reviews in Toxicology* **13**:25-97.
- Bedford JM. 2004. Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biological Reviews* **79**:429-460.
- Bedford JM & Chang MC. 1962. Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high-speed centrifugation. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, **202**:179-181.
- Bezouška K, Sklenář J, Novák P, Halada P, Havlíček V, Kraus M, Jonáková V. 1999. Determination of the complete covalent structure of the major glycoform of DQH sperm surface protein, a novel trypsin-resistant boar seminal plasma O-glycoprotein related to pB1 protein. *Protein science* **8**:1551-1556.
- Bhakta HH, Refai FH, Avella MA. 2019. The molecular mechanisms mediating mammalian fertilization. *Development* **146**:176966.
- Bhattacharyya S, Saha S, Giri K, Lanza IR, Nair KS, Jennings NB, Mukherjee P. 2013. Cystathionine beta-synthase (CBS) contributes to advanced ovarian cancer progression and drug resistance. *PloS one* **8**:79167.
- Boerke A, Brouwers J, Olkkonen V, van de Lest C, Sostaric E, Schoevers E, Helms J, Gadella B. 2013. Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during in vitro fertilization. *Biology of Reproduction* **88**:8-21.
- 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.
- Bork P & Beckmann G. 1993. The CUB domain: a widespread module in developmentally regulated proteins. *Journal of molecular biology* **231**:539-545.
- Bos EM, Wang R, Snijder PM, Boersema M, Damman J, Fu M, van Goor H. 2013. Cystathionine γ -lyase protects against renal ischemia/reperfusion by modulating oxidative stress. *Journal of the American Society of Nephrology* **24**:759-770.

- Breton S, Nair AV, Battistone MA. 2019. Epithelial dynamics in the epididymis: role in the maturation, protection, and storage of spermatozoa. *Andrology* **7**:631-643.
- Brewer L, Corzett M, Balhorn R. 2002. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *Journal of Biological Chemistry* **277**:38895-38900.
- Bukowska D, Kempisty B, Zaorska K, Antosik P, Pawłowska J, Nowicki M. 2014. Molecular aspects of sperm-oocyte activation during mammalian fertilization. *Medycyna Weterynaryjna* **70**:269-273.
- Bukovska G, Kery V, Kraus JP. 1994. Expression of human cystathionine β -synthase in *Escherichia coli*: purification and characterization. *Protein expression and purification* **5**:442-448.
- Caballero J, Frenette G, Sullivan R. 2011. Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. *Veterinary medicine international* <https://doi.org/10.4061/2011/757194>.
- Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1997. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS letters* **407**:201-206.
- Camatini M, Colombo A, Bonfanti P. 1992. Cytoskeletal elements in mammalian spermiogenesis and spermatozoa. *Microscopy Research and Technique* **20**:232-250.
- Cao Y, Adhikari S, Ang AD, Moore PK, Bhatia M. 2006. Mechanism of induction of pancreatic acinar cell apoptosis by hydrogen sulfide. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**:503-510.
- Castella S, Benedetti H, de Llorens R, Dacheux JL, Dacheux F. 2004. Train A, an RNase A-like protein without RNase activity, is secreted and reabsorbed by the same epididymal cells under testicular control. *Biology of reproduction* **71**:1677-1687.
- Cavallini D, Mondovi B, de Marco C, Scioscia-Santoro A. 1962. The mechanism of desulphhydration of cysteine. *Enzymologia* **24**:253-266.
- 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.
- Cooper TG. 2011. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J Androl* **13**, 130–138.
- Cummings BS & Schnellmann RG. 2004. Measurement of cell death in mammalian cells. *Current protocols in pharmacology* **25**:12-8.
- Dadoune JP. 2003. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech* **61**, 56–75.

- Dacheux JL, Belleannée C, Guyonnet B, Labas V, Teixeira-Gomes AP, Ecroyd H, Dacheux F. 2012. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Systems biology in reproductive medicine* **58**:197-210.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* **63**:319–341.
- Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernández-González EO, Nishigaki T, Trevino CL, Beltrán C. 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction: Colchester* **131**:977-988.
- d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Maffia P, Mirone V, Imbimbo C, Fusco F, Cirino G. 2009. Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:4513-4518.
- De Jonge C. 2005. Biological basis for human capacitation. *Human Reproduction Update* **11**:205-214.
- De Jonge C. 2017. Biological basis for human capacitation—revisited. *Human reproduction update* **23**:289-299.
- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Human reproduction* **13**:1-8.
- De Marco C. 1962. The mechanism of desulphydration of cysteine. *Enzymologia* **24**:253-266.
- 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.
- Diao R, Fok KL, Chen H, Yu MK, Duan Y, Chung CM, Chan HC. 2014. Deficient human β -defensin 1 underlies male infertility associated with poor sperm motility and genital tract infection. *Science translational medicine* **6**:249.
- Eddy E & O'Brien D. 1994. The Spermatozoon. Pages 29–77 in Neill JD, Knobil E, editors. *Physiology of Reproduction* edition. Academic Press, Cambridge.
- Elsley DJ, Fowkes RC, Baxter GF. 2010. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S). *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease* **28**:95-106.
- Ereño-Orbea J, Majtan T, Oyenarte I, Kraus JP, Martínez-Cruz LA. 2013. Structural basis of regulation and oligomerization of human cystathionine β -synthase, the central enzyme of transsulfuration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**:3790-3799.
- Ereño-Orbea J, Majtan T, Oyenarte I, Kraus JP, Martínez-Cruz LA. 2014. Structural insight into the molecular mechanism of allosteric activation of human cystathionine β -synthase by S-adenosylmethionine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**:3845-3852.

- Erickson PF, Maxwell IH, Su LJ, Baumann M, Glode LM. 1990. Sequence of cDNA for rat cystathionine γ -lyase and comparison of deduced amino acid sequence with related *Escherichia coli* enzymes. *Biochemical Journal* **269**:335-340.
- Erwin PA, Mitchell DA, Sartoretto J, Marletta MA, Michel T. 2006. Subcellular targeting and differential S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **281**:151-157.
- Eto K, Asada T, Arima K, Makifuchi T, Kimura H. 2002. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications* **293**:1485-1488.
- Evans JP & Kopf GS. 1998. Molecular mechanisms of sperm–egg interactions and egg activation. *Andrologia* **30**:297-307.
- Ferramosca A & Zara V. 2014. Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation. *BioMed Research International* **2014**:1-8.
- Fiedler SE, Dudiki T, Vijayaraghavan S, Carr DW. 2013. Loss of R2D2 proteins ROPN1 and ROPN1L causes defects in murine sperm motility, phosphorylation, and fibrous sheath integrity. *Biology of reproduction*. **88**:41-1.
- 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.
- Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. 2004. Regulating the acrosome reaction. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 503-510.
- Foster J. 2018. Reproduction and Development. Page in SlidePlayer edition. Available from <https://slideplayer.com/slide/12849322/> (accessed 2020-09-27).
- França LR, Avelar GF, Almeida FF 2005. Spermatogeneze a tranzit spermií přes epididymis u savců s důrazem na prasata. *Theriogenology* **63**:300-318.
- Fraser LR, Adeoya-Osiguwa SA, Baxendale RW, Gibbons R. 2006. Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules. *Front Biosci*. **11**:1636-1645.
- Furne J, Springfield J, Koenig T, DeMaster E, Levitt MD. 2001. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochemical pharmacology* **62**:255-259.
- Gadella BM, Lopes-Cardozo M, Van Golde LM, Colenbrander B, Gadella TW. 1995. Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction. Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa. *Journal of Cell Science* **108**:935-946.

- Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. 2004. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *International Journal of Developmental Biology* **52**:473-480.
- Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Metayer S, Thimon V, Dacheux JL. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal reproduction science* **82**:321-339.
- Georgadaki K, Houry N, Spandidos DA, Zoumpourlis V. 2016. The molecular basis of fertilization. *International journal of molecular medicine* **38**:979-986.
- Gervasi MG & Visconti PE. 2017. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology* **5**:204-218.
- Goldberg E. 1963. Lactic and Malic Dehydrogenases in Human Spermatozoa. *Science* **139**:602-603.
- Guyonnet B, Dacheux F, Dacheux JL, Gatti, JL. 2011The epididymal transcriptome and proteome provide some insights into new epididymal regulations. *Journal of andrology* **32**:651-664.
- Guzmán MA, Navarro MA, Carnicer R, Sarría AJ, Acín S, Arnal C, Osada J. 2006. Cystathionine β -synthase is essential for female reproductive function. *Human molecular genetics* **15**:3168-3176.
- Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. 2006. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of reproduction* **75**:501-507.
- Han Y, Liang C, Yu Y, Manthari RK, Cheng C, Tan Y, Zhang J. 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.
- Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. 2001. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Medical Science Monitor* **7**:801-819.
- Hargrove JL, Trotter JF, Ashline HC, Krishnamurti, PV. 1989. Experimental diabetes increases the formation of sulfane by transsulfuration and inactivation of tyrosine aminotransferase in cytosols from rat liver. *Metabolism* **38**:666-672.
- Harkema W, Colenbrander B, Engel B, Woelders H. 2004. Effects of exposure of epididymal boar spermatozoa to seminal plasma on the binding of zona pellucida proteins during in vitro capacitation. *Theriogenology* **61**:215-226.
- Harrison RA & Gadella BM. 2005. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* **63**:342-351.

- Hayden LJ, Franklin KJ, Roth SH, Moore GJ. 1989. Inhibition of oxytocin-induced but not angiotensin-induced rat uterine contractions following exposure to sodium sulfide. *Life sciences* **45**:2557-2560.
- Hess RA & De Franca LR. 2008. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*, 1-15. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1
- 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 Rat1. *Biology of Reproduction* **48**:1299-1308.
- Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Moss SB. 2005. The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Developmental cell* **9**:249-259.
- Hermo L & Robaire B. 2002. Epididymal cell types and their functions. *The epididymis: from molecules to clinical practice* **1**:81-102.
- Ho HC & Suarez SS. 2001. An inositol 1,4,5 – Trisphosphate receptor-gated intracellular Ca²⁺ store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biology of Reproduction* **65**:1606-1615.
- Ho HC & Suarez SS. 2003. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod* **68**:1590–1596.
- Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. 1997. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and biophysical research communications* **237**:527-531.
- Hunnicutt GR, Koppel DE, Myles DG. 1997. Analysis of the process of localization of fertilin to the sperm posterior head plasma membrane domain during sperm maturation in the epididymis. *Developmental biology* **191**:146-159.
- Hunter RHF, Cook B, Poyser NL. 1983. Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian steroids and prostaglandins: a mechanism to influence sperm transport. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **14**:225-232.
- Champroux A, Torres-Carreira J, Gharagozloo P, Drevet JR, Kocer A. 2016. Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic and Clinical Andrology* **26**:1–22.
- Chang MC. 1955. Development of Fertilizing Capacity of Rabbit Spermatozoa in the Uterus. *Nature* **175**:1036-1037.

- Chemes HE & Sedo CA. 2012. Tales of the tail and sperm head aches changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian journal of andrology*, **14**:14.
- Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R. 2004. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **287**:2316-2323.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**:9265-9269.
- Ichinohe A, Kanaumi T, Takashima S, Enokido Y, Nagai Y, & Kimura H. 2005. Cystathionine β -synthase is enriched in the brains of Down's patients. *Biochemical and biophysical research communications* **338**:1547-1550.
- Imbrogno S, Filice M, Cerra MC, Gattuso A. 2018. NO, CO and H₂S: What about gasotransmitters in fish and amphibian heart. *Acta Physiologica* **223**:13035.
- Jacobs RL, Stead LM, Brosnan ME, Brosnan JT. 2001. Hyperglucagonemia in rats results in decreased plasma homocysteine and increased flux through the transsulfuration pathway in liver. *Journal of Biological Chemistry* **276**:43740-43747.
- Jelínková P, Maňásková P, Tichá M, Jonáková V. 2003. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. *International Journal of Biological Macromolecules* **32**:99-107.
- Jonakova V, Kraus M, Veselský L, Čechová D, Bezouška K, Ticha M. 1998. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *Reproduction* **114**:25-34.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. 1997. *Základy histologie*. Praha, 502 p.
- Kabil O, Zhou Y, Banerjee R. 2006. Human cystathionine β -synthase is a target for sumoylation. *Biochemistry* **45**:13528-13536.
- Khawar MB, Gao H, Li W. 2019. Mechanism of acrosome biogenesis in mammals. *Frontiers in cell and developmental biology* **7**:195.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL, Yoder BK, Haycraft CJ, Bornens M, Rios RM. 2011. GMAP210 and IFT88 are present in the spermatid golgi apparatus and participate in the development of the acrosome–acroplaxome complex, head–tail coupling apparatus and tail. *Developmental Dynamics* **240**:723-736.
- Kimura H. 2011. Hydrogen sulfide: its production and functions **96**:833-835 <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.057455>.

- Kimura H. 2015. Physiological roles of hydrogen sulfide and polysulfides. *Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide* **2015**:61-81.
- Kimura M, Kim E, Kang W, Yamashita M, Saigo M, Yamazaki T, Baba T. 2009. Functional roles of mouse sperm hyaluronidases, HYAL5 and SPAM1, in fertilization. *Biology of reproduction* **81**:939-947.
- Kimura Y & Kimura H. 2004. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *The FASEB journal*, **18**:1165-1167.
- Kimura Y, Dargusch R, Schubert D, Kimura H. 2006. Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* **8**:661-670.
- Kirchhoff C & Hale G. 1996. Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *MHR: Basic science of reproductive medicine* **2**:177-184.
- Koehler JK. 1978. The mammalian sperm surface: studies with specific labeling techniques. *International review of cytology* **54**:73-108.
- Konrádová V, Uhlík J, Vajner L. 2000. *Funkční histologie*. 2. vyd. H & H, Jinočany.
- Kratz E & Achcińska M. 2011. Molecular mechanisms of fertilization: The role of male factor. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine* **65**:784-795.
- Krawczyk A & Jaworska-Adamu J. 2020. Activation of sperm in the female reproductive tract in mammals. *Medycyna Weterynaryjna* **76**:559-563.
- Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular human reproduction* **3**:175-194.
- Larson, JL & Miller DJ. 1997. Sperm from a variety of mammalian species express β 1, 4-galactosyltransferase on their surface. *Biology of reproduction* **57**:442-453.
- Leahy T & Gadella BM. 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction* **142**:759.
- 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(2), 167-215.
- Li H, Mani S, Cao W, Yang G, Lai C, Wu L, Wang R. 2012. Interaction of hydrogen sulfide and estrogen on the proliferation of vascular smooth muscle cells. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041614>
- Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Moore PK. 2005. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *The FASEB Journal* **19**:1196-1198.

- Liang R, Yu WD, Du JB, Yang LJ, Shang M, Guo JZ. 2006. Localization of cystathionine β synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chinese medical journal* **119**:1877-1883.
- Liang R, Yu WD, Du JB, Yang LJ, Yang JJ, Xu J, Guo JZ. 2007. Cystathionine β synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive Toxicology* **24**:89-96.
- Łowicka E & Bełtowski J. 2007. Hydrogen sulfide (H₂S)-the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological reports* **59**:4-24.
- Maňásková P, Ryšlavá H, Tichá M, Jonáková V. 2002. Characterization of proteins from boar prostate. *American Journal of Reproductive Immunology* **48**:283-290.
- Martin-DeLeon PA. 2015. Epididymosomes: transfer of fertility-modulating proteins to the sperm surface. *Asian journal of andrology* **17**:720.
- Mikami Y, Shibuya N, Kimura Y, Nagahara N, Ogasawara Y, Kimura H. 2011. Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. *Biochemical Journal* **439**:479-485.
- Mohanarao GJ & Atreja SK. 2012. Identification of NO induced and capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Research in veterinary science* **93**:618-623.
- Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Snyder SH. 2009. H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Science signaling* **2**:72.
- Nagahara N. 2018. Multiple role of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase: antioxidative function, H₂S and polysulfide production and possible SO_x production. *British Journal of Pharmacology* **175**:577-589.
- Nishida M, Sawa T, Kitajima N, Ono K, Inoue H, Ihara H, Akaike T. 2012. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nature chemical biology* **8**:714-724.
- O'Flaherty, C, de Lamirande E, Gagnon C. 2006. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology and Medicine* **41**:528-540.
- Ohkura H. 2015. Meiosis: an overview of key differences from mitosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* PLoS 7(a015859) doi: 10.1101/cshperspect.a015859.
- Oko RJ. 1995. Developmental expression and possible role of perinuclear theca proteins in mammalian spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* **7**:777-797.

- 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.
- Oura C. 1971. The ultrastructure and development of the neck region of the golden hamster spermatozoon. *Monitore Zoologico Italiano* **5**:253-264.
- Pae HO, Lee YC, Jo EK, Chung HT. 2009. Subtle interplay of endogenous bioactive gases (NO, CO and H₂S) in inflammation. *Archives of pharmacal research* **32**:1155-1162.
- Pagliara V, Saide A, Mitidieri E, di Villa BRDE, Sorrentino R, Russo G, Russo A. 2016. 5-FU targets rpl3 to induce mitochondrial apoptosis via cystathionine- β -synthase in colon cancer cells lacking p53. *Oncotarget* **7**:50333.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**:524-526.
- Parrish JJ, Willenburg KL, Gibbs KM, Yagoda KB, Krautkramer MM, Loether TM, Melo FC. 2017. Scrotal insulation and sperm production in the boar. *Molecular reproduction and development* **84**:969-978.
- Patel P, Vatish M, Heptinstall J, Wang R, Carson RJ. 2009. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology* **7**:1-9.
- Paunescu TG, Shum WW, Huynh C, Lechner L, Goetze B, Brown D, Breton S. 2014. High-resolution helium ion microscopy of epididymal epithelial cells and their interaction with spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **20**:929–937.
- Pei Y, Wu B, Cao Q, Wu L, Yang G. 2011. Hydrogen sulfide mediates the anti-survival effect of sulforaphane on human prostate cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology* **257**:420-428.
- Pěkníková J, Čapková J, Geussová G, Ivanova M, Mollova M. 2001. Monoclonal antibodies to intra-acrosomal proteins inhibit gamete binding. *Theriogenology* **56**:211-223.
- Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society* **365**:1663-1678.
- Qabazard B, Li L, Gruber J, Peh MT, Ng LF, Kumar SD, Moore PK. 2014. Hydrogen sulfide is an endogenous regulator of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants & redox signaling* **20**:2621-2630.

- Ratnam S, Maclean KN, Jacobs RL, Brosnan ME, Kraus JP, Brosnan JT. 2002. Hormonal regulation of cystathionine β -synthase expression in liver. *Journal of Biological Chemistry* **277**:42912-42918.
- Rattner JB. 1972. Observations of centriole formation in male meiosis. *Journal of Cell Biology* **54**:20-29.
- Reiffenstein R J, Hulbert WC, Roth SH. 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual review of pharmacology and toxicology* **32**:109-134.
- Roy SC & Atreja SK. 2008. Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Animal reproduction science* **107**:68-84.
- Russell LD, Ettlin RA, Hikim APS, Clegg ED. 1993. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *International Journal of Andrology* **16**:83-83.
- Řimnáčová H, Moravec J, Štiavnická M, Havránková J, Monsef L, Hošek P, Nevoral J. 2022. Evidence of endogenously produced hydrogen sulfide (H₂S) and persulfidation in male reproduction. *Scientific Reports* **12**:11426.
- Sakai Y & Yamashina S. 1989. Mechanism for the removal of residual cytoplasm from spermatids during mouse spermiogenesis. *The Anatomical Record* **223**:43-48.
- Santi CM, Marti'nez-Lo' pP, de la Vega-Beltra' n JL, Butler A, Alisio A, Darszon A, Salkoff L, 2010: The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett* **584**:1041–1046.
- Sen N. 2017. Functional and molecular insights of hydrogen sulfide signaling and protein sulfhydration. *Journal of Molecular Biology* **429**:543-561.
- Singh S, Padovani D, Leslie RA, Chiku T, Banerjee R. 2009. Relative contributions of cystathionine β -synthase and γ -cystathionase to H₂S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *Journal of Biological Chemistry* **284**:22457-22466.
- Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. 2009a. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *The journal of biochemistry* **146**:623-626.
- Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K, Kimura H. 2009b. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants & redox signaling* **11**:703-714.
- 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 PLoS* **118** (e2018355118) DOI:10.1073/pnas.2018355118.

- Shirozu K, Tokuda K, Marutani E, Lefer D, Wang R, Ichinose F. 2014. Cystathionine γ -lyase deficiency protects mice from galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver failure. *Antioxidants & redox signaling* **20**:204-216.
- Sidhu R, Singh M, Samir G, Carson RJ. 2001. L-cysteine and sodium hydrosulphide inhibit spontaneous contractility in isolated pregnant rat uterine strips in vitro. *Pharmacology & toxicology* **88**:198-203.
- Slípka J & Tonar Z. 2019. *Základy embryologie. 2., upravené vydání.* Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, Praha.
- Srilatha B, Adaikan PG, Moore PK. 2006. Possible role for the novel gasotransmitter hydrogen sulphide in erectile dysfunction—a pilot study. *European journal of pharmacology* **535**:280-282.
- Srilatha B, Adaikan PG, Li L, Moore PK. 2007. Hydrogen sulphide: a novel endogenous gasotransmitter facilitates erectile function. *The journal of sexual medicine* **4**:1304-1311.
- Srilatha B, Hu L, Adaikan GP, Moore PK. 2009. Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. *The Journal of Sexual Medicine* **6**:1875-1884.
- Starka L. 2009. Hydrogen Sulfide—Another Gaseous Hormone?. *Chemické listy* **103**:1.
- Stipanuk MH & Beck PW. 1982. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochemical Journal* **206**:267-277.
- Strzeżek J, Lecewicz L, Dziekońska A, Fraser L, 2005. A simple method of extraction of lipoprotein fractions from avian egg yolk – protective effect on cooled boar semen. *Theriogenology* **63**:496–497.
- Suarez SS. 2008. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* **52**:455–462.
- Suede SH, Malik A, Sapra A. 2021. *Histology, Spermatogenesis.* StatPearls Publishing, Treasure Island, Florida.
- Sugiura Y, Kashiba M, Maruyama K, Hoshikawa K, Sasaki R, Saito K, Suematsu M. 2005. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxidants & redox signaling* **7**:781-787.
- Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **35**:1-10.
- Sutovsky P. 2011. Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction* **142**:1.
- Sutovsky P & Manandhar G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. *The sperm cell: Production, maturation, fertilization, regeneration* **1**:1-30.

- Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko, T, Thompson WE, Schatten G. 2001. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *Journal of cell science* **114**:1665-1675.
- Szabó C. 2007. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature reviews Drug discovery* **6**:917-935.
- Šmelcová M & Tichovska H. 2011. Gasotransmitters in the reproductive system: a review. *Scientia Agriculturae Bohemica* **42**:188-198.
- Talbot P & Kleve MG. 1978. Hamster sperm cross react with antiactin. *Journal of Experimental Zoology* **204**:131-136.
- Tan BH, Wong PTH, Bian JS. 2010. Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the central nervous system. *Neurochemistry international* **56**:3-10.
- Tanaka H, Baba T. 2005. Gene expression in spermiogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **62**:344-354.
- Tantibhedhyangkul J, Weerachayanukul W, Carmona E, Xu H, Anupriwan A, Michaud D, Tanphaichitr N. 2002. Role of sperm surface arylsulfatase A in mouse sperm-zona pellucida binding. *Biology of reproduction* **67**:212-219.
- Tao B, Wang R, Sun C, Zhu Y. 2017. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase, not cystathionine beta-synthase nor cystathionine gamma-lyase, mediates hypoxia-induced migration of vascular endothelial cells. *Front Pharmacol* **8**:657.
- Teague B, Asiedu S, Moore PK. 2002. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *British journal of pharmacology* **137**:139-145.
- Teng H, Wu B, Zhao K, Yang G, Wu L, Wang R. 2013. Oxygen-sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine β -synthase mediated by Lon protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**:12679-12684.
- Teves ME & Roldan ER. 2022. Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. *Physiological Reviews* **102**:7-60.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P. 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction* **59**:768-776.
- Töpfer-Petersen E. 1999. Molecules on the sperm's route to fertilization. *Journal of Experimental Zoology* **285**:259-266.
- Toshimori K & Ito C. 2003. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Archives of histology and cytology* **66**:383-396.

- Tosti E & Ménézó Y. 2016. Gamete activation: basic knowledge and clinical applications. *Human Reproduction Update* **22**:420-439.
- 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
- Vitvitsky V, Prudova A, Stabler S, Dayal S, Lentz SR, Banerjee R. 2007. Testosterone regulation of renal cystathionine β -synthase: implications for sex-dependent differences in plasma homocysteine levels. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **293**:594-600.
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W. 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual Review of Biochemistry*. 68:1015-1068. • Yokota N, Sawada H. 2007. Sperm proteasomes are responsible for the acrosome reaction and sperm penetration of the vitelline envelope during fertilization of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Developmental Biology* **308**:222-231.
- Wandernoth PM, Raubuch M, Mannowetz N, Becker HM, Deitmer JW, Wandernoth PM, Raubuch M, Mannowetz N, Becker HM, Deitmer JW, Sly WS, Wennemuth G, 2010. Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm. *PLoS ONE* **5** (e15061) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015061>
- Wang J, Wang W, Li S, Han Y, Zhang P, Meng G, Ji Y. 2018. Hydrogen sulfide as a potential target in preventing spermatogenic failure and testicular dysfunction. *Antioxidants & redox signaling* **28**:1447-1462.
- Wang R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter. *The FASEB journal* **16**:1792-1798.
- Wang R. 2012. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological reviews* **92**:791-896.
- Wen YD, Wang H, Zhu YZ. 2018. The drug developments of hydrogen sulfide on cardiovascular disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2018**.
- Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu SH, Siau JL, Bhatia M, Moore PK. 2006. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochemical and biophysical research communications* **343**:303-310.
- Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevaillier P, Sautière P. 1998. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* **80**:117-128.
- Wu A, Anupriwan A, Iamsaard S, Chakrabandhu K, Santos DC, Rupaar T, Tanphaichitr N. 2007. Sperm surface arylsulfatase A can disperse the cumulus matrix of cumulus oocyte complexes. *Journal of cellular physiology* **213**:201-211.
- Wu B, Gao H, Liu C, Li W. 2020. The coupling apparatus of the sperm head and tail. *Biology of Reproduction* **102**:988-998.

- Wu Y, Ding R, Zhang X, Zhang J, Huang Q, Liu L, Shen H. 2021. Meet-in-metabolite analysis: A novel strategy to identify connections between arsenic exposure and male infertility. *Environment International* **147**:106360.
- Yanagimachi R. 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* **2**:371-372.
- Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Wang R. 2008. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. *Science* **322**:587-590.
- Yogo K. 2022. Molecular basis of the morphogenesis of sperm head and tail in mice. *Reproductive Medicine and Biology* **21**:12466.
- Zaichko NV, Melnik AV, Yoltukhivskyy MM, Olhovskiy AS, Palamarchuk IV. 2014. Hydrogen sulfide: metabolism, biological and medical role. *Ukr. Biochem.* **86**:5-25.
- Zamboni L & Stefanini M. 1971. The fine structure of the neck of mammalian spermatozoa. *The Anatomical Record* **169**:155-172.
- Zhao K, Li H, Li S, Yang G. 2014. Regulation of cystathionine gamma-lyase/H₂S system and its pathological implication. *Front Biosci (Landmark Ed)* **19**:1355-1369.
- Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *The EMBO journal* **20**:6008-6016.
- Zhao Y, Zhang WD, Liu XQ, Zhang PF, Hao YN, Li L, Meng QS. 2016. Hydrogen sulfide and/or ammonia reduces spermatozoa motility through AMPK/AKT related pathways. *Scientific reports* **6**:37884.
- Zhu H, Blake S, Chan KT, Pearson RB, Kang J. 2018. Cystathionine β -synthase in physiology and cancer. *BioMed research international, PLoS* 2018 <https://doi.org/10.1155/2018/3205125>.
- Zhu W, Lin A, Banerjee R. 2008. Kinetic properties of polymorphic variants and pathogenic mutants in human cystathionine γ -lyase. *Biochemistry* **47**:6226-6232.

