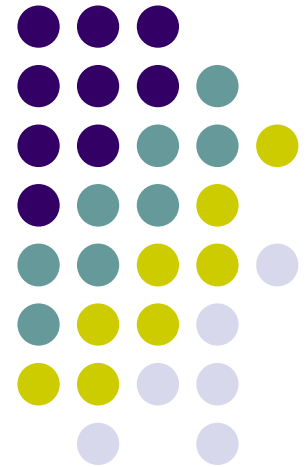


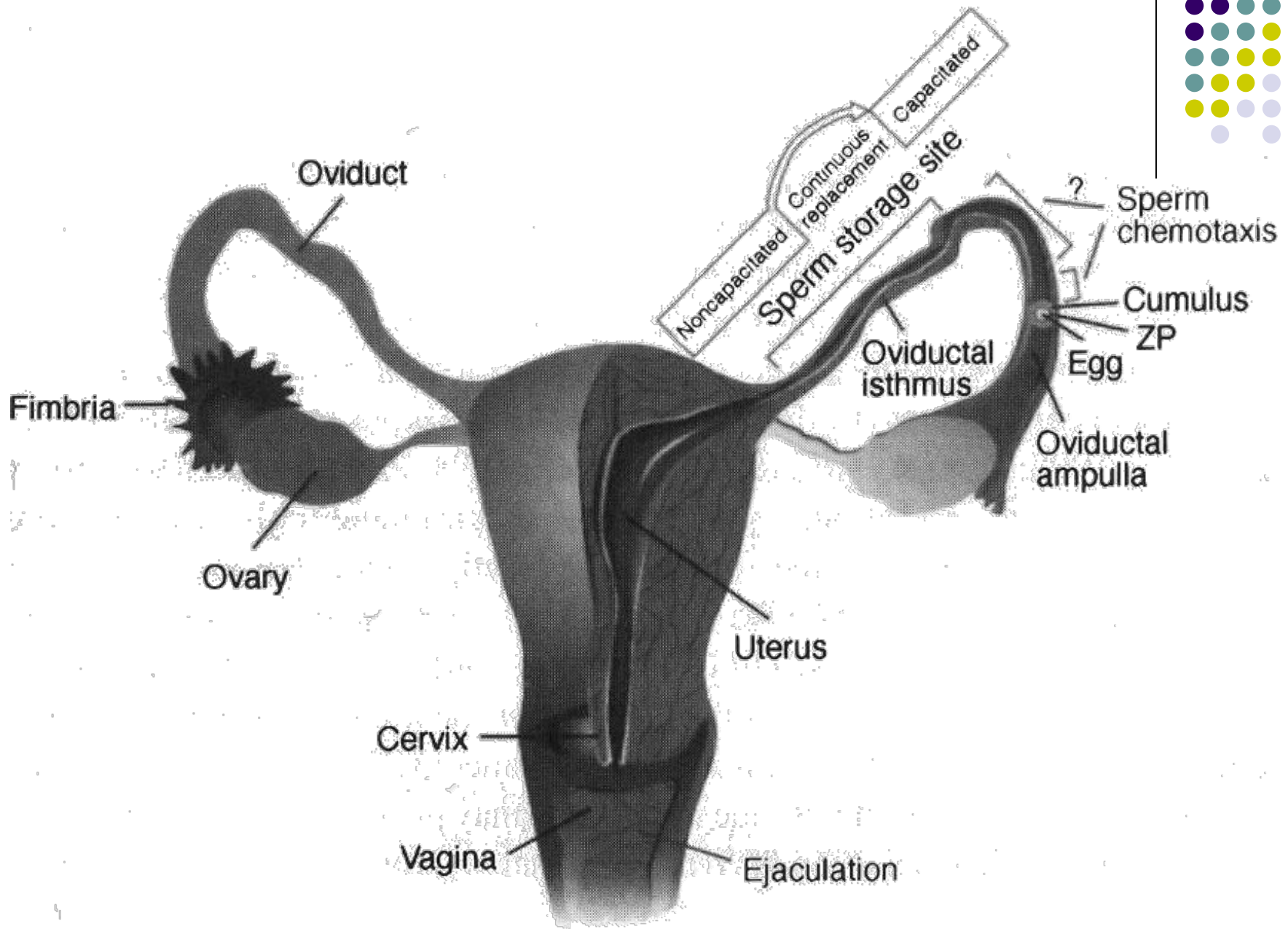
Interakcja plemnik-oocyt

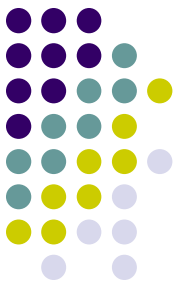


Ricardo Faundez



Katedra Chorób Dużych Zwierząt z Kliniką
Zakład Rozrodu Zwierząt, Andrologii i Biotechnologii Rozrodu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW





Cuadro 4. Lugar de la deposición de semen en diferentes especies. Adaptado de Palma (1986)

Especie	Lugar de la eyaculación
Humana	Vagina
Bovina	
Leporina	
Ovina	
Equina	Uterina
Porcina	
Canina	
Murina	

Transporte y migración de los espermatozoides a través de la vagina

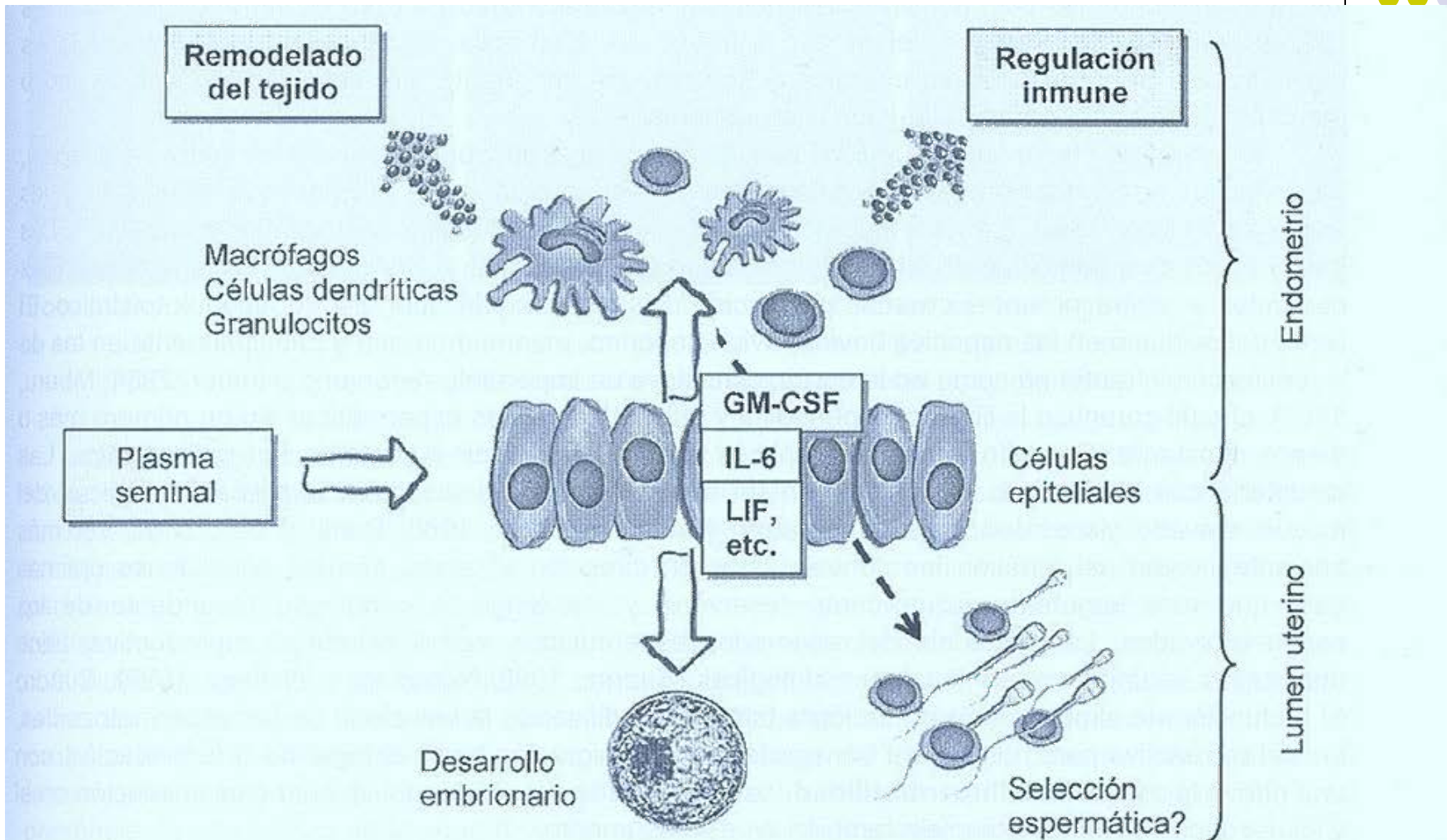
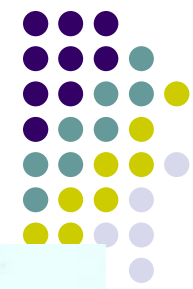
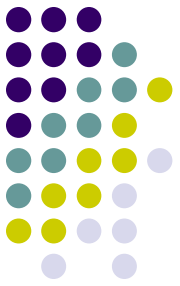


Fig 18. Esquema de la acción de las señales del plasma seminal en el tracto reproductor femenino (Robertson, 2005)

Interakcje plemnik - oocyt



- Chemotaksja i termotaksja plemników
- Przejście plemnika przez macierz pozakomórkową wieńca promienistego oocytu
- Wstępne związanie plemnika z osłonką przejrzystą oocytu
- Reakcja akrosomowa i wtórne związanie plemnika z osłonką przejrzystą
- Przejście plemnika przez osłonkę przejrzystą i interakcja z błona komórkową oocytu
- Fuzja błony komórkowej plemnika z błona komórkową oocytu i wniknięcie plemnika do ooplazmy

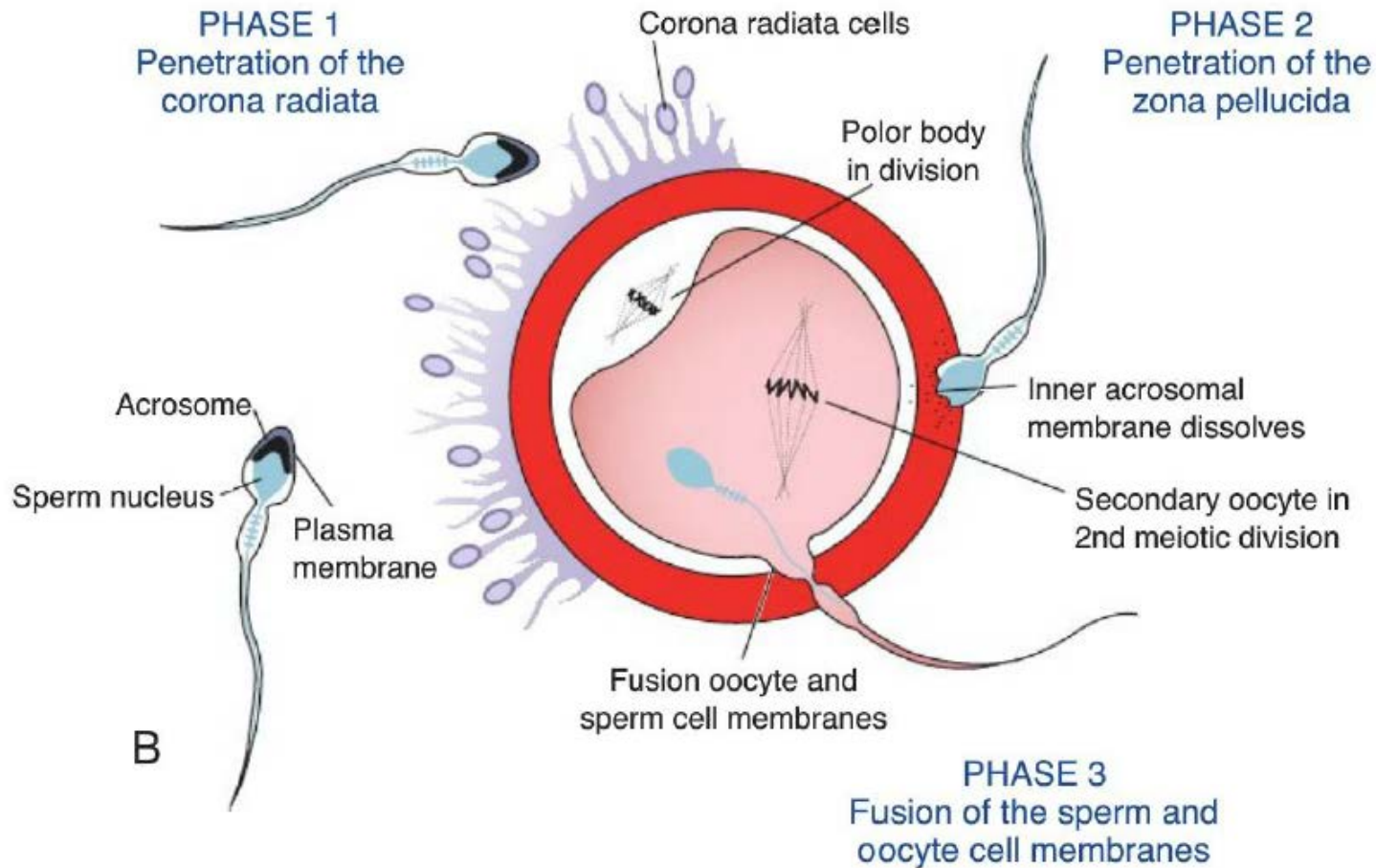
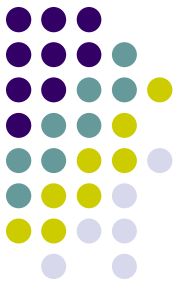


FIGURE 3.5 A. Scanning electron micrograph of sperm binding to the zona pellucida. **B.** The three phases of oocyte penetration. In phase 1, spermatozoa pass through the corona radiata barrier; in phase 2, one or more spermatozoa penetrate the zona pellucida; and in phase 3, one spermatozoon penetrates the oocyte membrane while losing its own plasma membrane. *Inset* shows normal spermatocyte with acrosomal head cap.

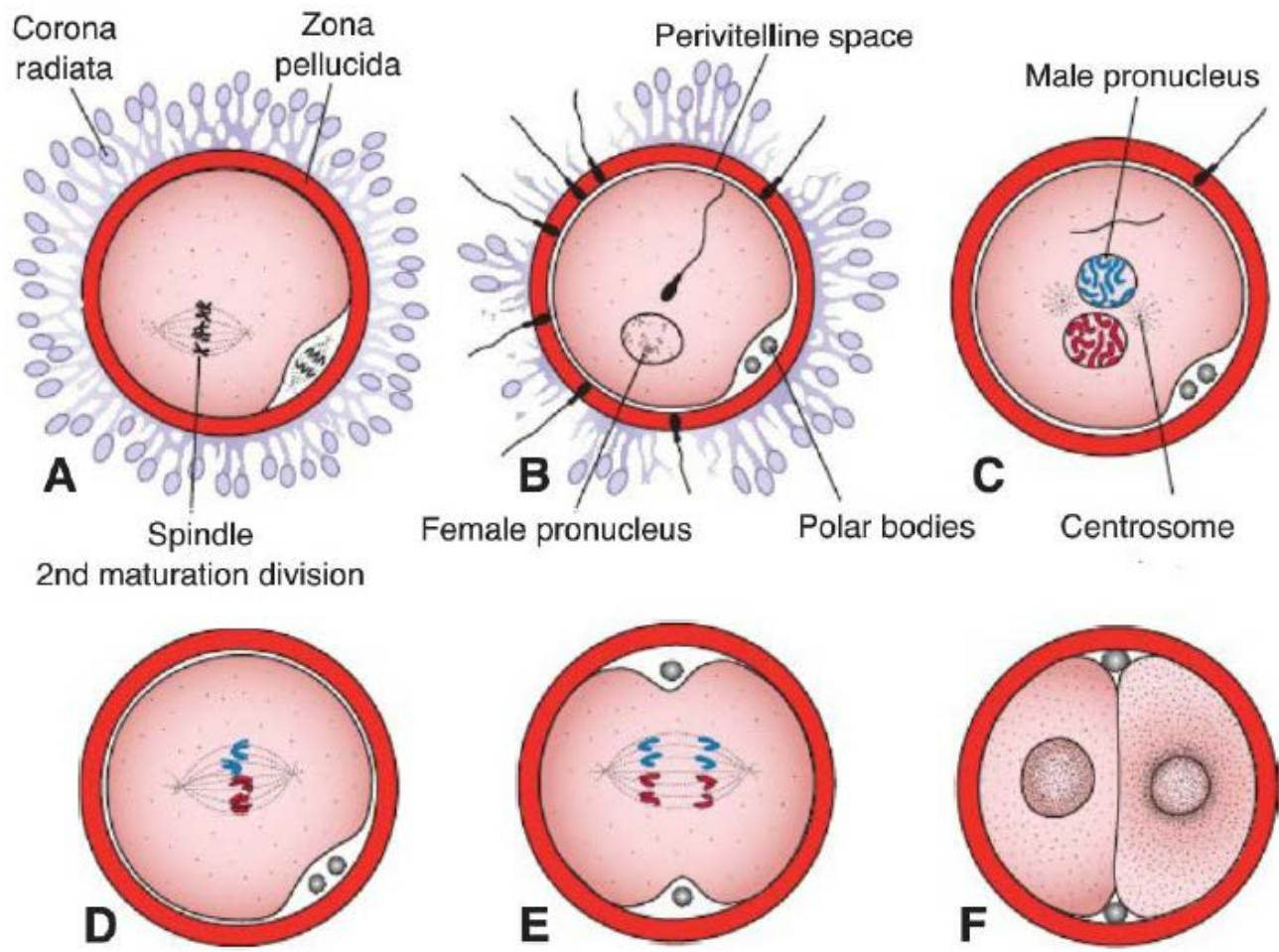
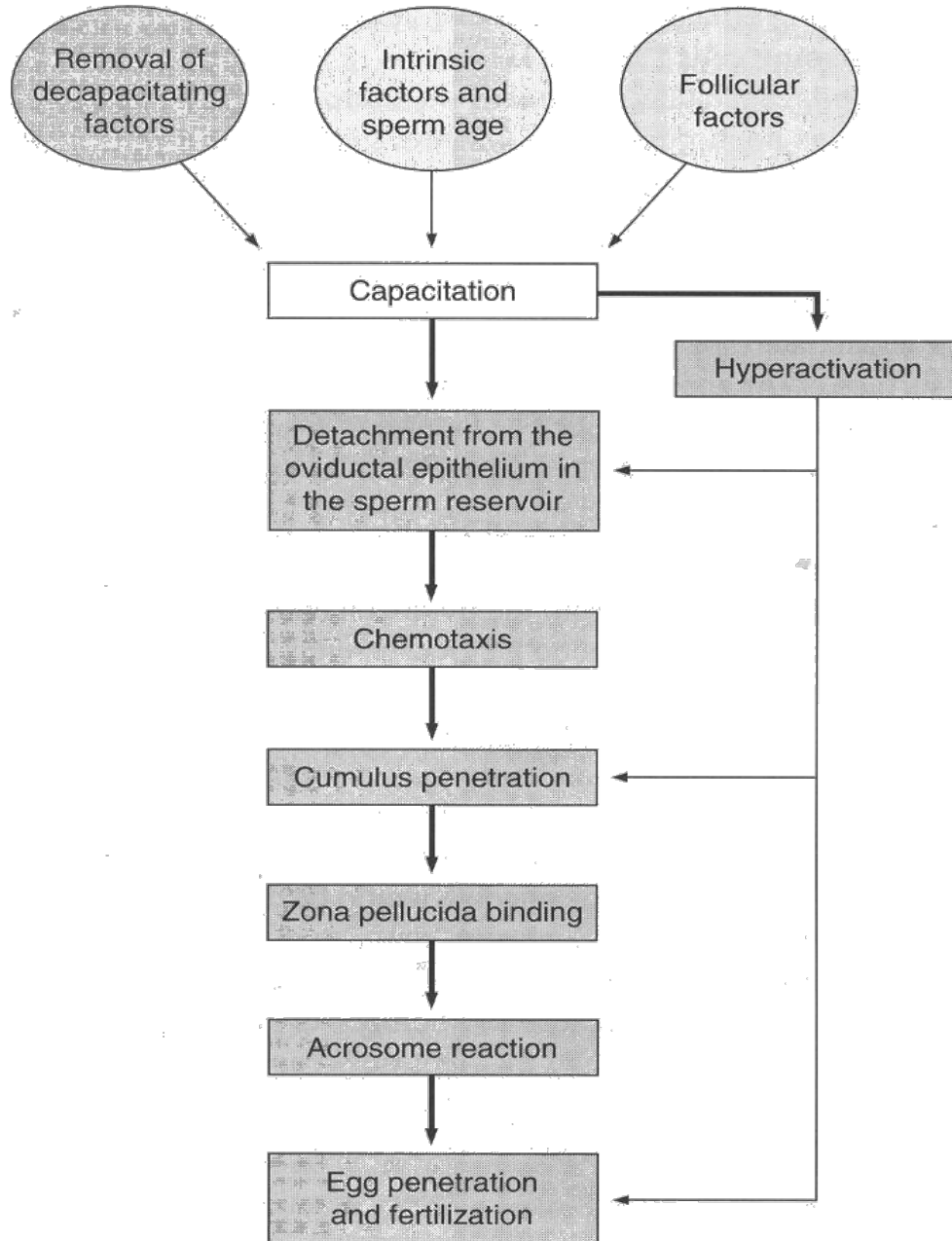
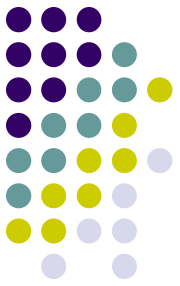


FIGURE 3.6 **A.** Oocyte immediately after ovulation, showing the spindle of the second meiotic division. **B.** A spermatozoon has penetrated the oocyte, which has finished its second meiotic division. Chromosomes of the oocyte are arranged in a vesicular nucleus, the female pronucleus. Heads of several sperm are stuck in the zona pellucida. **C.** Male and female pronuclei. **D,E.** Chromosomes become arranged on the spindle, split longitudinally, and move to opposite poles. **F.** Two-cell stage.



Yanagimachi, 1999



Table 1. Candidate molecules involved in sperm-oocyte interaction

Interaction sites	Candidate molecules in		
	Sperm	Oocyte/cumulus	Others
Cumulus	Spam1?	Hyaluronic acid	
	Basigin	?	
	?		Progesterone
	?		Prostaglandins
Zona	?	ZP1	
	Proacrosin?	ZP2	
	ZRK?	ZP3	
	β -galactosyltransferase?	ZP3	
	sp56?	ZP3	
	SED-1	?	
	Zonadhesin	?	
	ADAM2	?	
	ADAM3	?	
	Oolemma	SLLP1	?
ADAMs2 and 3		Integrin $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha 9\beta 1$?	
		?	DE
Izumo		?	
Equatorin		?	
?		CD9	
	GPI anchored proteins		

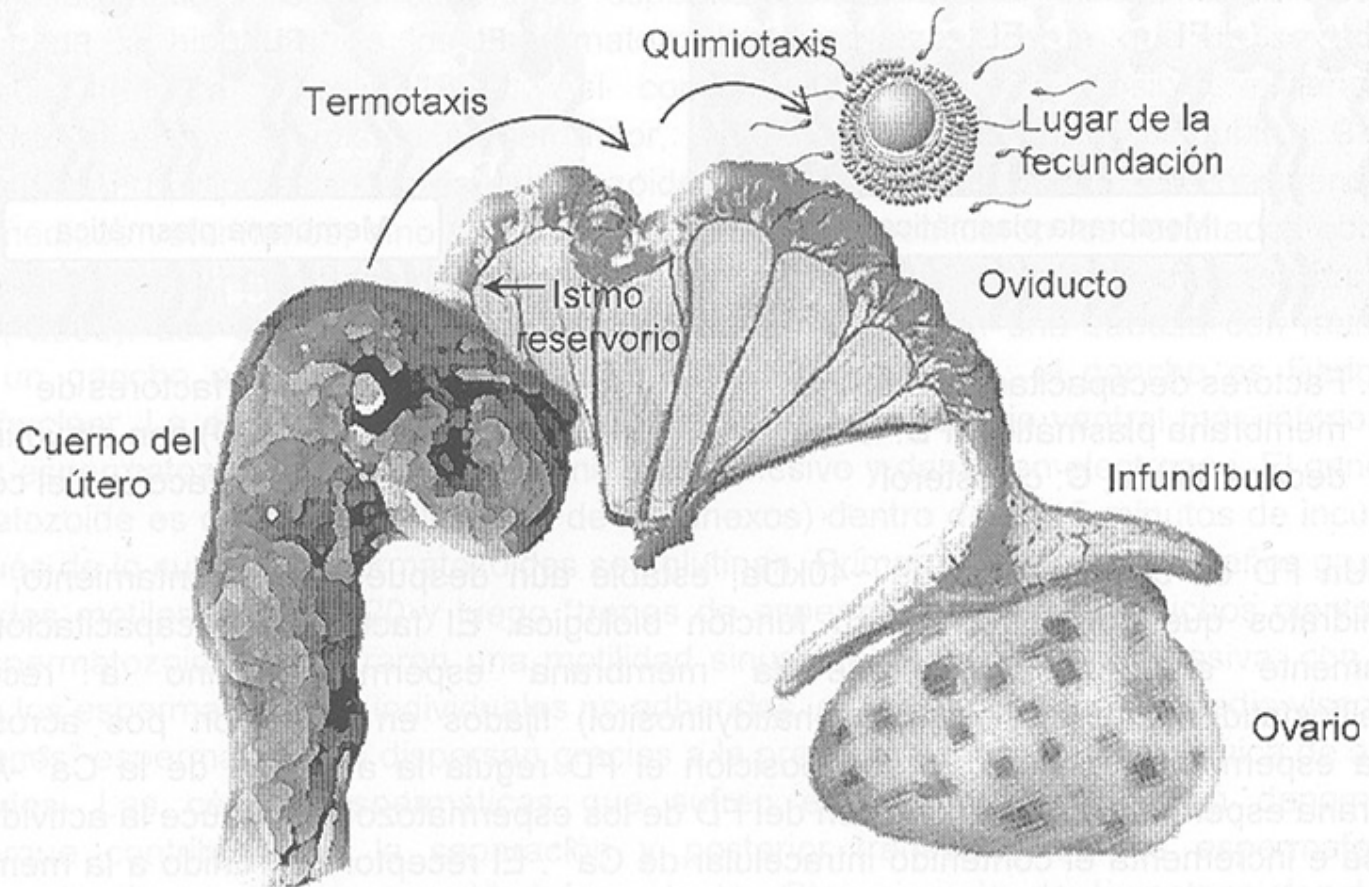
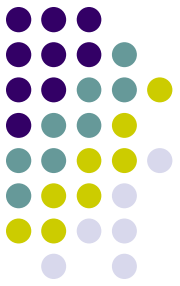
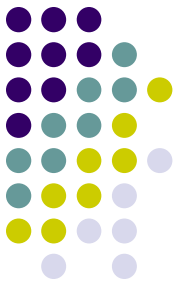


Fig 4. Esquema de los mecanismos de orientación espermática (Bahat y Eisenbach, 2006)

Chemotaksja plemników



- Chemotaksja, definiowana jako reakcja na chemoatraktant lub chemorepelent, jest migracją komórki lub organizmu do / ze źródła chemicznego
- Chemotaksja plemników u ssaków jest skierowana do płynu pęcherzykowego u myszy i płynu jajowodu u ludzi, jak również w kierunku płynu w którym hodowano oocyty i komórek wzgórka
- U ludzi i królika, bardzo małe stężenia progesteronu (1-100 pmol / L) zdają się przyciągać plemniki.
- Płyn pęcherzyków jajnikowych zawiera progesteron, jednak tylko niewielka ilość płynu pęcherzykowego wydostaje się podczas owulacji. Po owulacji, komórki wzgórka jajonośnego kontynuują syntezę i wydzielanie progesteronu oraz jego nośników białkowych, które utrzymują progesteron w postaci rozpuszczalnej.
- U królika, wzgórek jajonośny wydaje się również wydzielać progesteron jako czynnik chemotaktyczny.
- Progesteron wydzielany przez komórki wzgórka również wydaje się być chemoatraktantem dla plemników ludzkich
- Obecnie, progesteron jest uznawany jako silny kandydat na chemoatraktant plemników u ssaków / ludzi, podczas gdy inne mechanizmy mogą działać z nim w synergii.



Cuadro 2. Confirmados y posibles quimioattractantes de espermatozoides mamíferos (Eisenbach y Giojalas, 2006)

Sustancia	Síntesis en la hembra	Especie
Confirmada		
Péptido natriurético atrial	FF	Humana
Bourgeonal	Desconocido	Humana
Lyril	Desconocido	Murina
Péptidos (<1.3 y 13 kDa)	FF	Humana
Progesterona	CO, FF, FO	Humana, leporina
RANTES	FF	Humana
Posibles		
Acetilcolina	FF	Murina
Adrenalina	FF	Murina
Antitrobina III	FF	Porcina
Calcitonina	FF	Murina
Heparina	FF	Humana, porcina
Acido hialurónico	CO	Humana
Oxytocina	FF	Murina
Beta-endorfina	FF	Murina
Péptido (8.6 kDa)	FF	Porcina
Sustancia P	FF	Murina

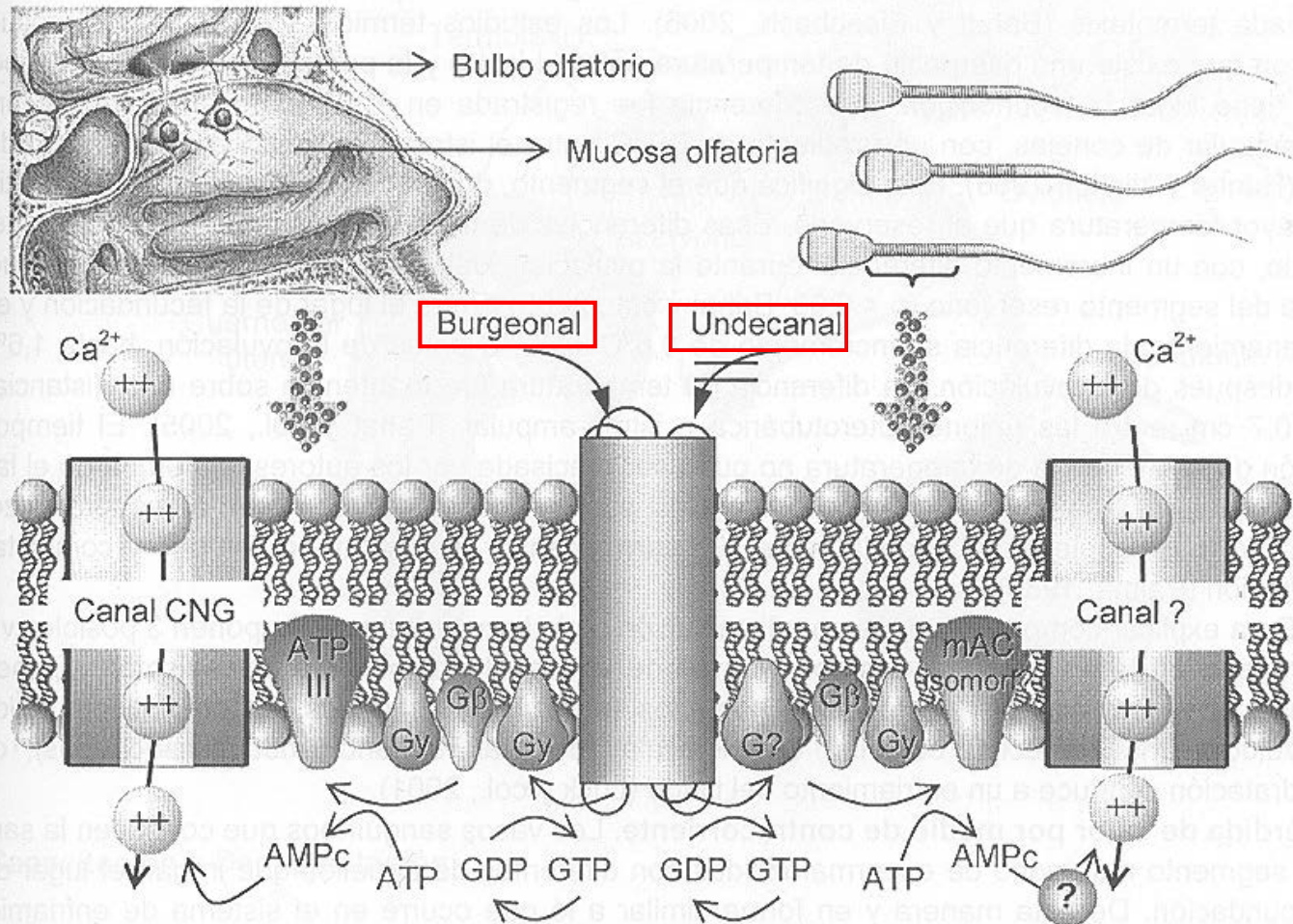
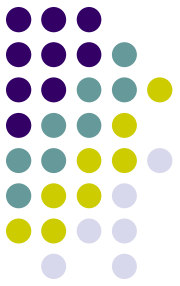


Fig 3. Modelo propuesto del receptor bifuncional olfatorio, expresado tanto en la membrana ciliar de la mucosa nasal, como en la pieza intermedia del espermatozoide capacitado (Spehr y col., 2006, *Odorant receptors and olfactory-like signaling mechanisms in mammalian sperm Mol Cell Endocrinol* 250, 128-36, con permiso de Elsevier), hOR17-4 (OR1D2) es activado por el perfume sintético floral **bourgeonal** e inhibido competitivamente por **undecanal**. En ambos sistemas la activación de receptor activa el AMPc dependiente de la cascada de señales

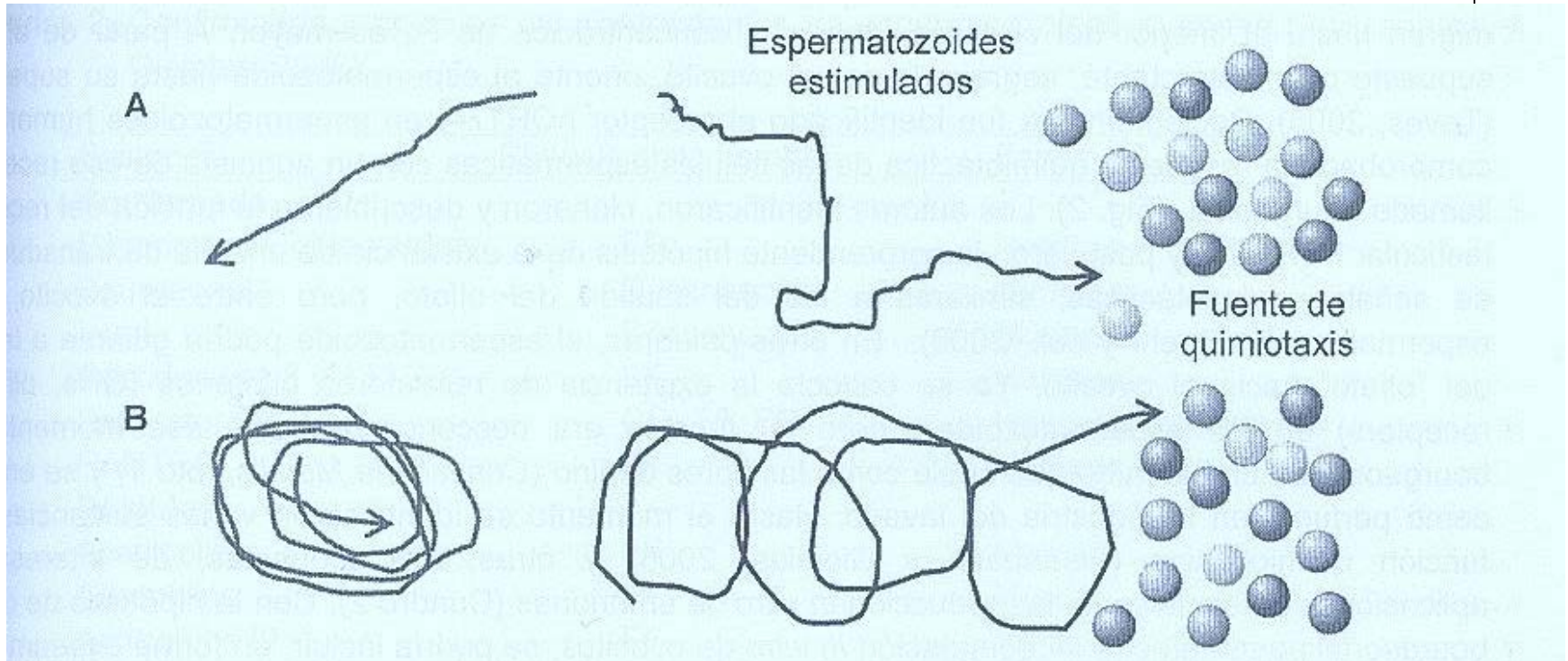


Fig 1. Descripción de los 2 tipos de respuesta a los quimioattractantes, según el movimiento de los espermatozoides. Adaptado de Eisenbach y Giojalas (2006) **A)** Los espermatozoides no estimulados que migran en forma casi recta o describiendo pequeñas curvas, su dirección cambia abruptamente en dirección a la fuente quimioattractante **B)** Los espermatozoides no activados, que se desplazan en círculos concéntricos, cambian a un movimiento en forma de tirabuzón en dirección a la fuente, cuando son estimulados

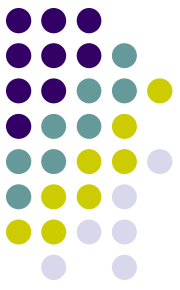
Termotaksja plemników



- Plemniki kapacytowane reagują na gradient temperatury. Reakcja ta, zwana termotaksją, występuje również w innych typach komórek.
- Termotaksja u plemników ssaków odgrywa ważną rolę, kierując plemniki z chłodnego zbiornika plemników w jajowodzie do cieplejszego odcinka gdzie następuje zapłodnienie. Różnica temperatur wynosi około 2 ° C.
- Termotaksja i chemotaksja działają synergicznie na plemniki, prowadząc je w stronę miejsca zapłodnienia w pobliżu cieśni jajowodu.
- Termotaksja jest mechanizmem kierowania dalekiego zasięgu, natomiast chemotaksja - kierowania krótkiego zasięgu.
- Różnicę temperatur pomiędzy miejscem przechowywania nasienia, a miejscem zapłodnienia obserwuje się podczas owulacji. Występuje wzrost temperatury od chłodniejszego miejsca przechowywania nasienia ku cieplejszemu miejscu zapłodnienia.
- U królika zaobserwowano ok. 2 ° C różnicy między cieśniną, a połączeniem cieśniny z bańką jajowodu oraz u świń, 0,7 ° C różnicy między cieśniną, a bańką jajowodu.
- U królika i człowieka plemniki reagują nawet na niewielkie różnice temperatury (0,5 ° C).
- Kilka mechanizmów zostało zaproponowanych jako odpowiedzialne za spadek temperatury na cieśninie. Sugerowano, że endotermiczne nawodnienie, proces, w którym kwaśne glikoproteiny śluzu w cieśninie włączają cząsteczki wody dzięki działaniu krążących hormonów steroidowych, powoduje spadek temperatury podczas owulacji.
- Zimna krew z jajnika może zmniejszyć temperaturę krwi w naczyniach otaczających miejsce przechowywania plemników.

Interakcja plemnik-wzgórek jajonośny

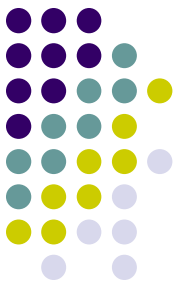
część I



- Macierz wzgórka
 - Kwas hialuronowy
 - Inhibitor trypsyny α
 - Siarczan proteinoglikanu
 - PTX3
- Plemniki przechodzą dzięki własnemu ruchowi oraz obecności hialuronidazy, PH-20 i białka Hyal5.
- Komórki wzgórka wytwarzają progesteron.
- Progesteron (człowiek $1\mu\text{g/ml}$) in vitro indukuje RA, macierz i komórki wzgórka zatrzymują progesteron.
- Usunięcie komórek wzgórka jajonośnego oocytu obniża odsetka zapłodnienia in vitro u większości ssaków.

Interakcja plemnik-wzgórek jajonośny

część II



- Podczas wzrostu oocytu, komórki wzgórka jajonośnego odgrywają ważną rolę w utrzymaniu mejotycznego aresztu oocytu.
- Po szczycie przedowulacyjnym LH, komórki wzgórka przekazują sygnały dla wznowienia procesu mejozy i wspierania jądrowego oraz cytoplazmatycznego dojrzewania oocytów.
- Komórki wzgórka jajonośnego są osadzone w macierzy pozakomórkowej (ECM), bogatej w wodę wiążącego glikan i hialuronian.
- Plemniki ssaka wykazują receptory na hialuronian i wiążą się z bogatą w hialuronian ECM. Plemniki przed zapłodnieniem tworzą zamknięte koło dookoła kompleksu oocyt-wzgórek jajonośny.
- Egzocytoza akrosomu (AE) może być wywołana przez ko-inkubację plemnika z komórkami wzgórka. Również medium, w którym hodowano ludzkie wzgórki jajonośne indukuje zmian w akrosomie.
- Wzgórek wydziela progesteron, a kwas hialuronowy obecny jest w macierzy wgórka. Mogą one zwiększać wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia plemników.
- Fakty przedstawione powyżej potwierdzają, że wzgórek jajonośny odgrywa ważną rolę w zapłodnieniu.

Interakcja plemnik-osłonka przejrzysta



Wiązanie się plemnik-osłonka przejrzysta

- ❖ Po penetracji przez wzgórek jajonośny dochodzi do wiązania plemników do osłonki przejrzystej (ZP).
ZP składa się z trzech (większość ssaków) lub czterech (gryzonie, naczelné) ZP-glikoprotein, dzieląc między sobą immunoglobulinę jak domenę ZP. Na podstawie podobieństwa sekwencji, białka ZP myszy (m) i człowieka (h) nazwane są mmZP1 (hZPB), mZP2 (hZPA), mZP3 (hZPC) i ZP4 (hZPB2)
- ❖ Wzór ogólny struktury osłonki przejrzystej myszy sugeruje, że ZP2-ZP3 (ZPA-ZPC) włókna heterodimeru są usieciowane z cząsteczką ZP1 (ZPB), a hZPC służy jako podstawowy receptor plemnika na oocyście.
- ❖ U świń, złożone heterodimerycznie ZPB/ZP3alpha (homolog hZPB2/ZP4) oraz ZPC wydają się działać razem jako receptor plemników. Taka synergia może również istnieć między ZP3 i ZP4 u ludzi.
- ❖ Receptor plemnika ma podwójną funkcję: wiązanie plemnik-ZP i indukcja AR. Ta ostatnia może rozpocząć się jeszcze przed wiązaniem plemnik-ZP, ale wydaje się kończyć w trakcie tego procesu. Ta podwójna funkcja jest trochę, ale nie powszechnie, gatunkowo specyficzna.
- ❖ Wyniki różnych badań sugerują, że rozgałęzione triantennary i tetraantennary N-glikanów i O-glikanów otaczają receptor plemników, a nie jego szkielet białkowy, pośrednicząc w wiązaniu plemnik-ZP.

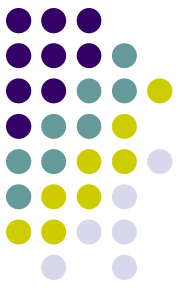
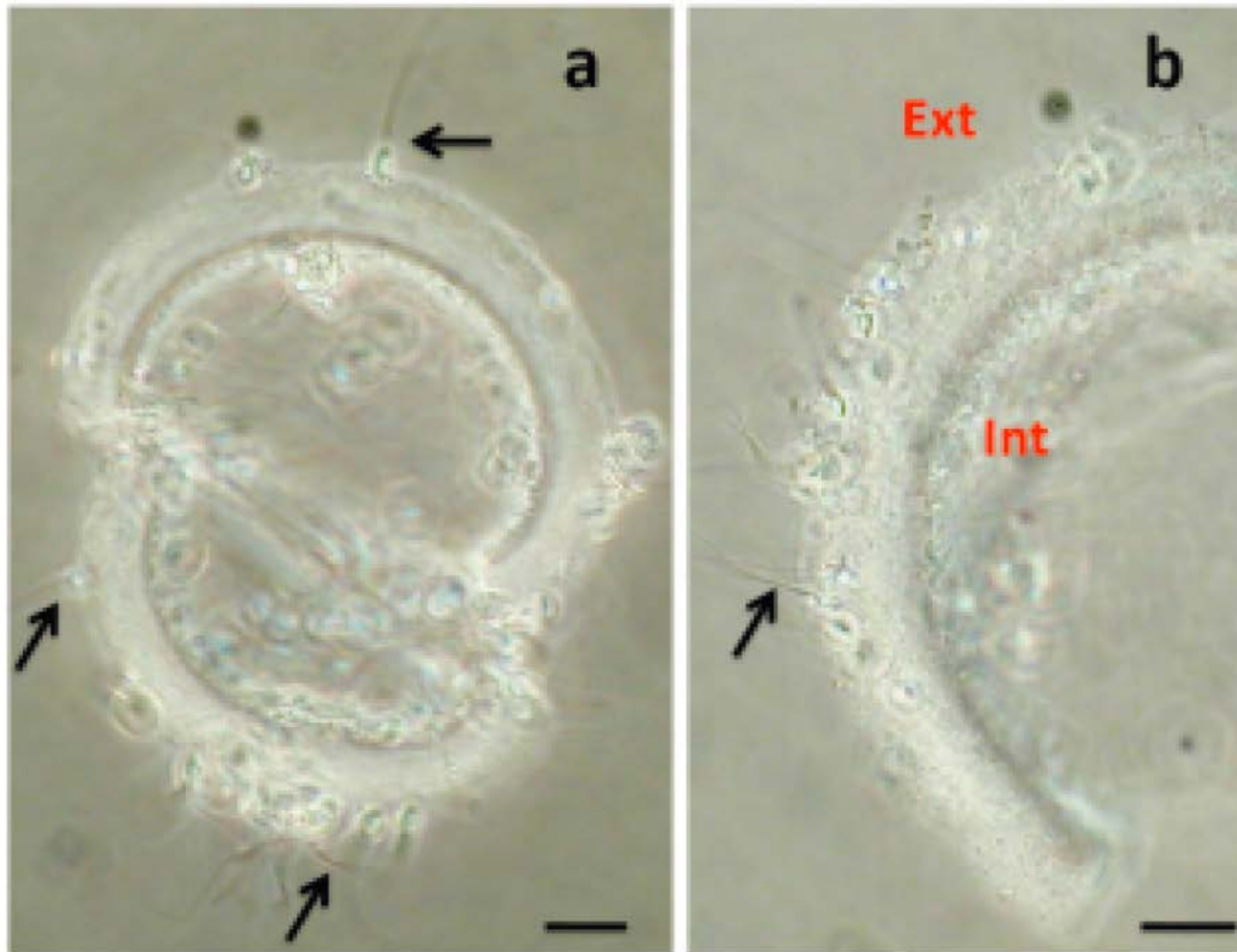
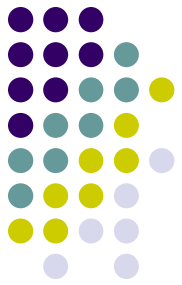
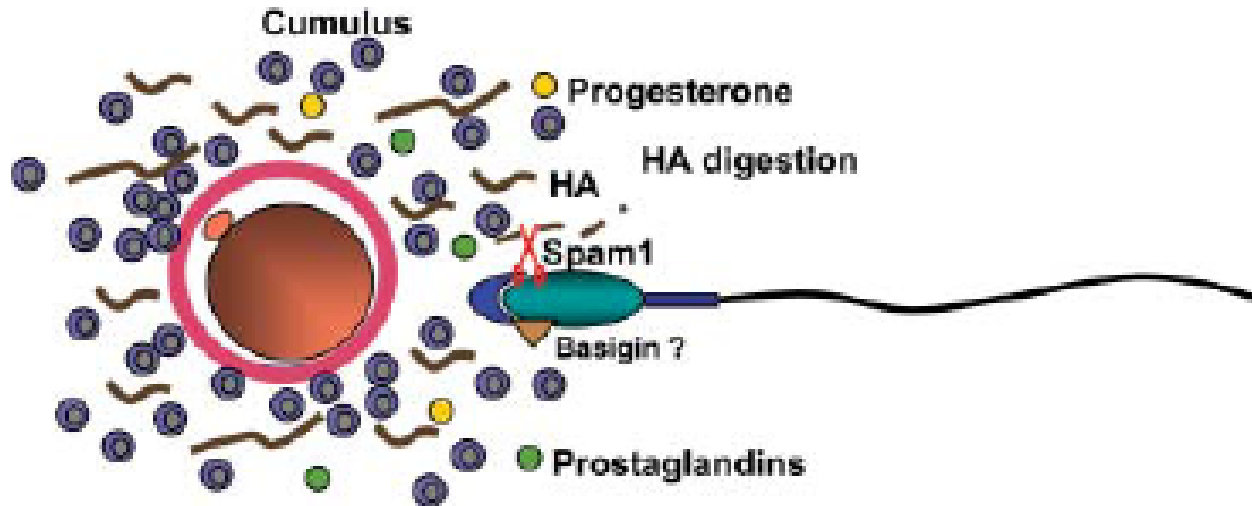


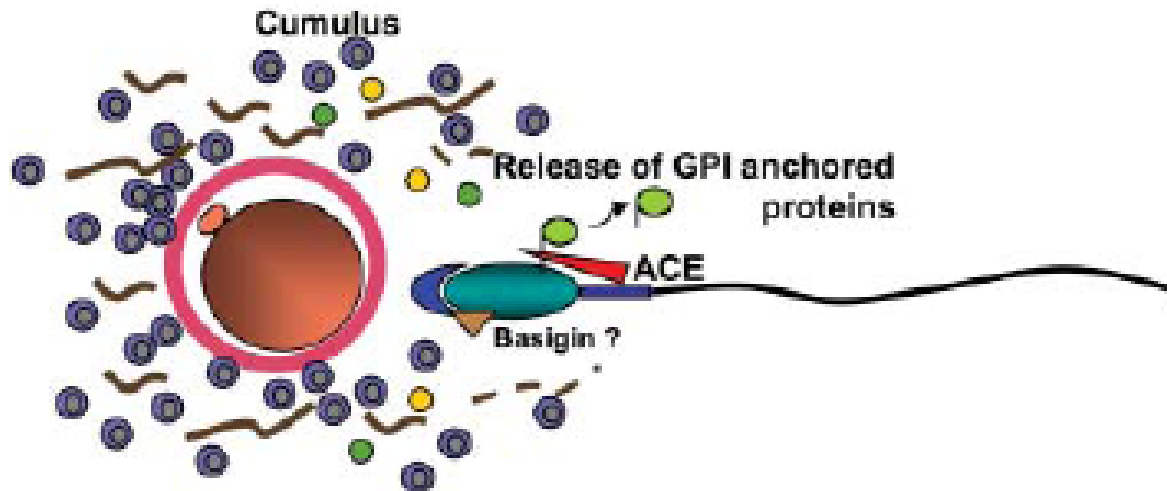
Figura 8.2. Imágenes de microscopía de campo claro mostrando espermatozoides humanos unidos a la zona pelúcida de ovocitos humanos que han sido cortadas en dos partes para realizar un ensayo de la hemizona. a) En esta imagen se pueden ver las dos hemizonas que están muy próximas una de la otra y que presentan espermatozoides unidos (flechas). Barra: 20 micrómetros. b) Imagen de una hemizona vista a mayor aumento. Se puede ver la región interna y externa de la zona pelúcida. Barra: 20 micrómetros.



A. Sperm passage in the cumulus oophorus



B. Preparation for sperm-zona interaction in cumulus oophorus

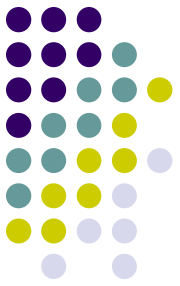


CD9



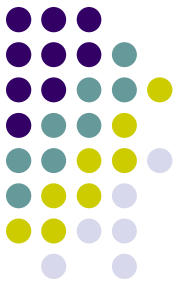
- Białko CD9 odgrywa ważną rolę w zapłodnieniu. Użycie przeciwciał anti-CD9 prowadziło do zahamowania wiązania się gamet w warunkach in vitro.
- Białko CD9 jest rozmieszczone na całej powierzchni oocyta z wyjątkiem regionu obejmującego wrzeciono mejotycznego, a więc w miejscu, w którym bardzo rzadko dochodzi do fuzji komórek.
- Obserwowany wzór rozmieszczenia CD9 pokrywa się z lokalizacją integryny $\alpha 6$. Uważa się, że białka te mogą ulegać wzajemnej interakcji, tworząc specyficzne miejsca wiązania się fertyliny plemnika.
- Brak tego białka był przyczyną zaburzenia procesu fuzji plemnika z oocytem.
- Przy braku białka CD9 proces wiązania się plemnika z komórką jajową przebiega prawidłowo, natomiast bardzo rzadko dochodzi do fuzji komórek, zarówno w warunkach in vivo, jak i in vitro.
- Obserwacje te, sugerują, że CD9 ulega interakcji z innymi białkami odpowiedzialnymi za fuzję plemnika z oocytem.

Białko DE



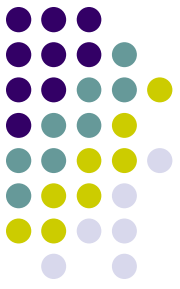
- Białko najądrza (DE), bogate w cysteinę białko wydzielnicze (CRISP1) cząsteczka błony komórkowej plemników. Odpowiedzialne za fuzję z oocytem.
- DE jest białkiem syntetyzowanym w przedniej części najądrza.
- Jego wydzielanie jest regulowane odpowiednim stężeniem androgenów.
- Podczas przechodzenia plemników przez najądrze DE jest umieszczane na ich powierzchni.
- Podczas etapu poprzedzającego reakcję akrosomową DE pokrywa grzbietową częścią akrosomu, a następnie przemieszcza się do części równikowej, która jest miejscem fuzji z oocytem.
- Oczyszczone białko DE może wiązać się w każdym miejscu powierzchni oocytu, z wyjątkiem miejsca, gdzie formuje się wrzeciono mejotyczne.
- Na powierzchni oocytu znajdują się receptory specyficzne dla plemnikowego białka DE.

Białka ADAM



- Fertylina α , β oraz kyrytestina należą do rodziny białek ADAM, określanych, odpowiednio, jako ADAM1, ADAM2 i ADAM3.
- Wszystkie te białka charakteryzują się występowaniem dużej metaloproteazowej domeny.
- Fertylina α posiada charakterystyczną sekwencję aminokwasów, określaną jako białko fuzyjne, które tworzy domenę odpowiedzialną za wiązanie się z integrynami na powierzchni oocytu.
- Funkcja tych białek została określona na drodze doświadczeń zapłodnienia in vitro, stosując przeciwciała anty-ADAM oraz poprzez izolowanie i oczyszczanie tych białek.
- Białka ADAM odgrywają istotną rolę w mechanizmie wiązania się plemnika z oocytem, natomiast nie mają wpływu na fuzję gamet.

Integryny



- Powierzchnia oocytów pokryta jest białkami określanymi jako integryny.
- Sugeruje się, iż tworzą one receptory specyficzne dla ligandów występujących w błonie komórkowej plemników.
- Pierwszym białkiem należącym do tej rodziny, zidentyfikowanym na powierzchni oocytu, była integryna $\alpha 6\beta 1$.
- Integryny ulegające ekspresji na powierzchni oocytów dzieli się na dwie grupy: integryny $\beta 1$, w których skład wchodzi $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ oraz integryny αv : $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$.
- Sugeruje się więc, że występujące na powierzchni oocytów białka integrynowe stanowią jeden z elementów pośredniczących w procesie zapłodnienia.

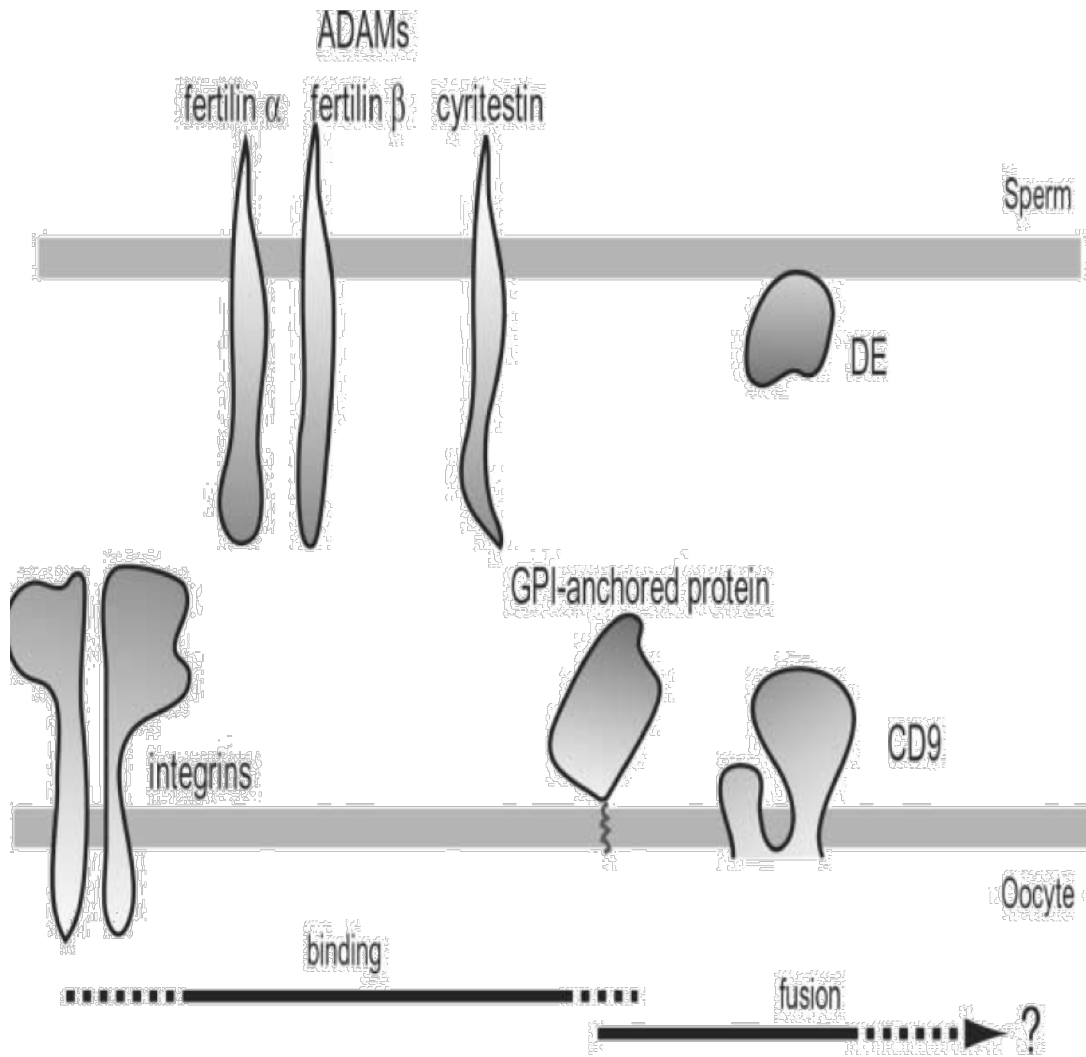
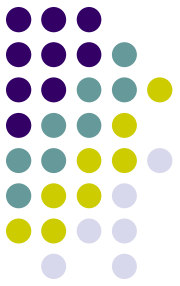
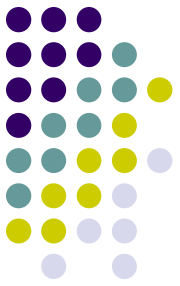


Figure 2 Candidate molecules involved in the sperm–oocyte fusion. Sperm lacking ADAMs shows a severe reduction in their ability to bind to oocytes. Integrins could be a receptor for sperm ADAMs, though no integrin-deficient oocytes examined have a defect in either sperm–oocyte binding or fusion. Lack of GPI-anchored proteins caused by gene targeting of phosphatidylinositol glycan class-A (PIG-A) or by treatment of oocytes with phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) causes a reduced sperm binding activity, resulting in severely decreased fusibility. Antibodies against DE become localized at the sperm surface and inhibit the sperm–oocyte fusion without affecting sperm–oocyte binding. Oocytes from CD9-deficient mice have normal binding ability but severely impaired fusibility with sperm. Because CD9 has the ability to form a multi-molecular complex on the plasma membrane, some other unknown proteins may be involved in the sperm–oocyte fusion.

Białka plemnika odpowiedzialne za fuzję z osłonką przejrzystą



Białko

ACE

ADAM 29

ADAM 30

Arylosulfataza (ARSA)

Fukozylotransferaza 5 (FUT5)

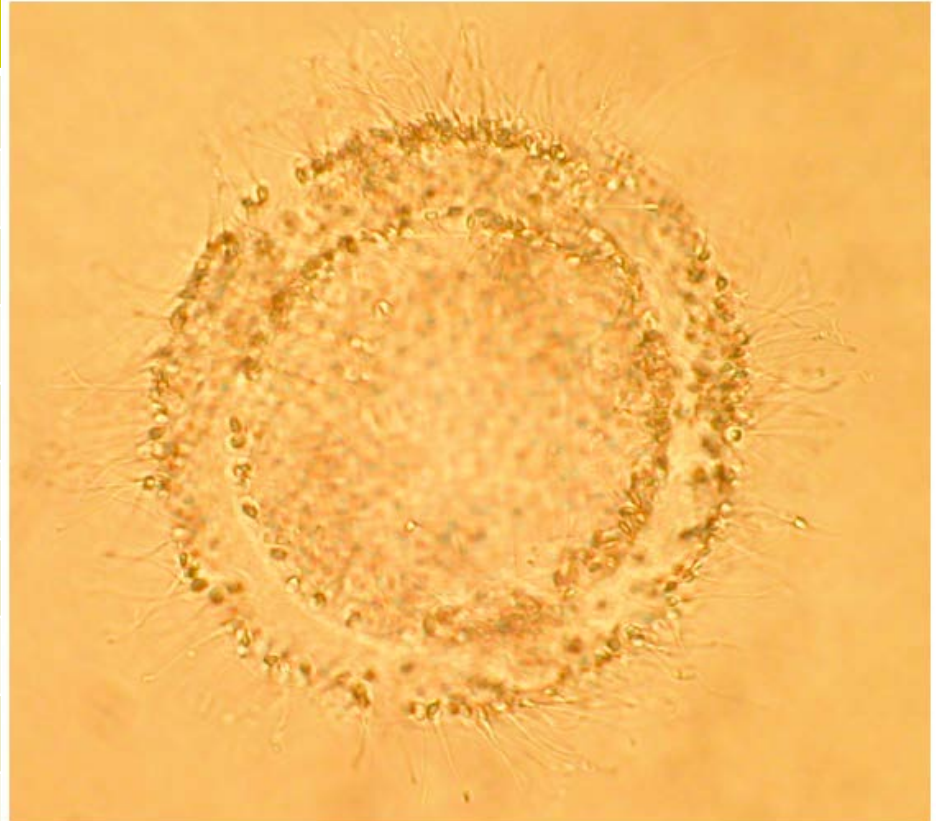
Hialuronidaza PH20, SPAM1

MFGE8, SED1

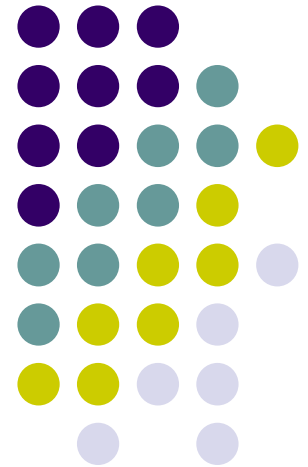
P34H

Spa17

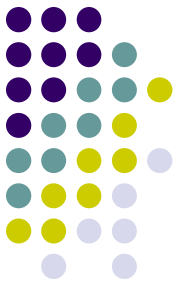
ZPBP1 (IAM38)



Kapacytacja plemnika

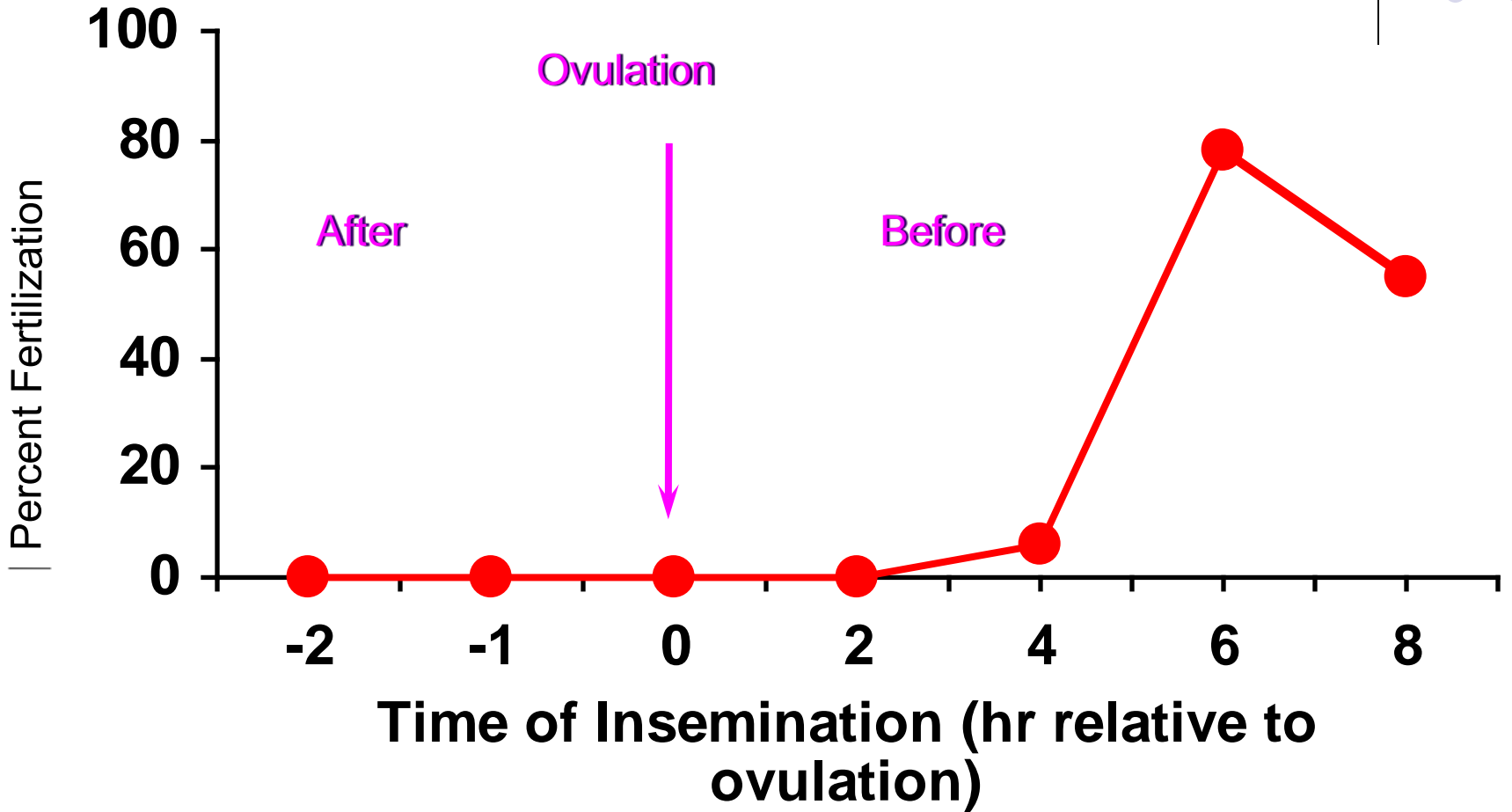


Capacitation

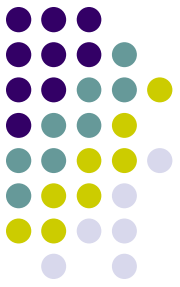


- 1951
- Austin - rat
- Chang - rabbit
- Fertilization does not occur until several hours after sperm are placed in the uterus or oviduct

Chang Experiment - 1951



Kapacytacja, reakcja akrosomalna i hiperaktywacja plemników



KAPACYTACJA

Zmiany w błonie plazmatycznej
główki plemnika

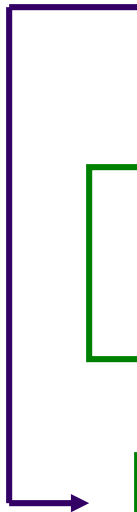
Zmiany w błonie plazmatycznej
witki plemnika

Reakcja akrosomalna

Hiperaktywacja

Przechodzenie plemnika przez
Oślonkę przejrzystą

Wnikanie plemnika do jaja



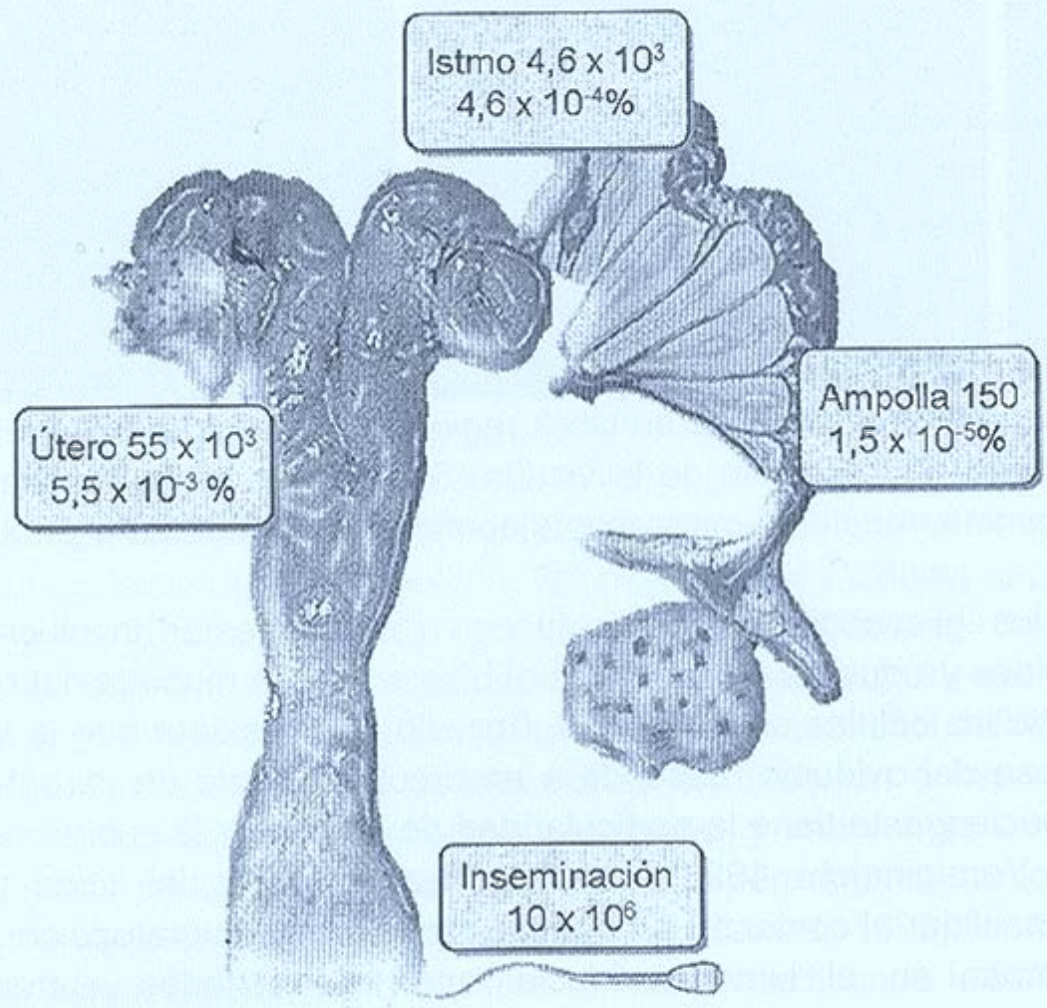


Fig 19. Distribución cuantitativa de los espermatozoides en el tracto genital de la coneja, después de la inseminación con 10×10^6 espermatozoides e inducción de la ovulación (Palma, 1986)

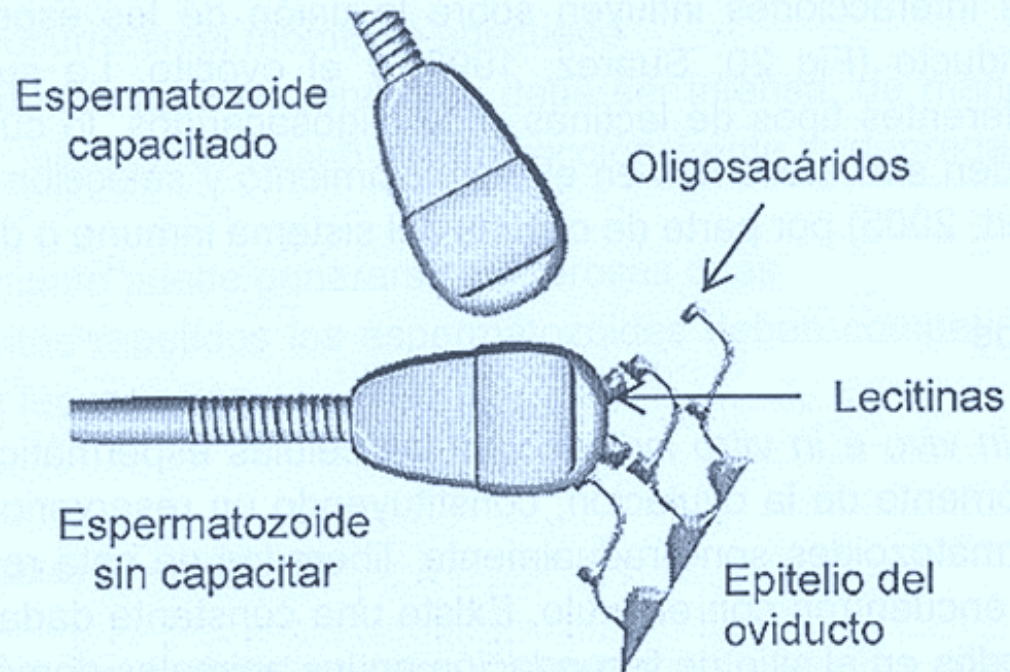
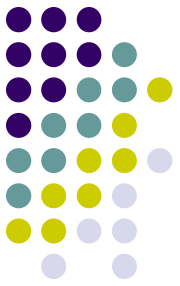
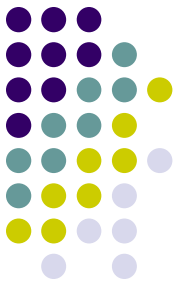


Fig 20. Hipótesis de la formación del reservorio espermático y su eventual liberación según Suarez (1998)



Capacitation

- The changes within sperm that confer upon the sperm the ability to acrosome react in response to the appropriate stimulus.
 - Zona Pellucida
 - Cumulus Cells
 - Follicular Fluid

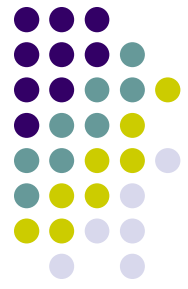


Table 3.1. *Survival parameters of mammalian gametes in vivo.*

	Time required for capacitation (h)	Duration of sperm Motility (h)	Fertility (h)	Fertilizable life of oocytes (h)
Mouse	< 1	13	6	15
Sheep	1-5	48	30-48	12-15
Rat	2-3	17	14	12
Hamster	2-4	—	—	9-12
Pig	3-6	50	24-48	10
Rabbit	5	43-50	28-36	6-8
Rhesus monkey	5-6	—	—	23
Man	5-6	48-60	24-48	6-24
Dog	—	268	134	24

From Gwatkin (1974).

Effect of Capacitation



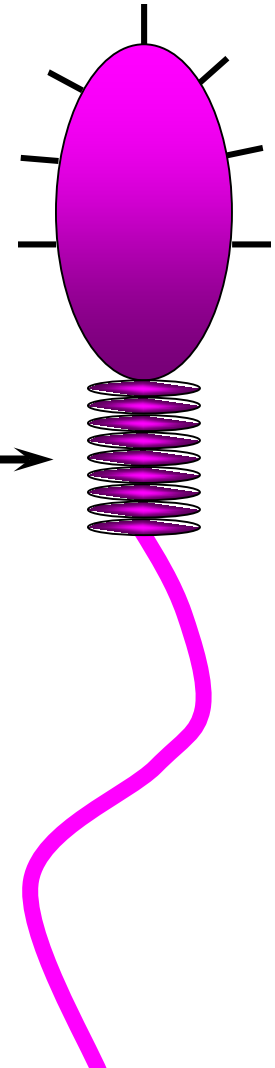
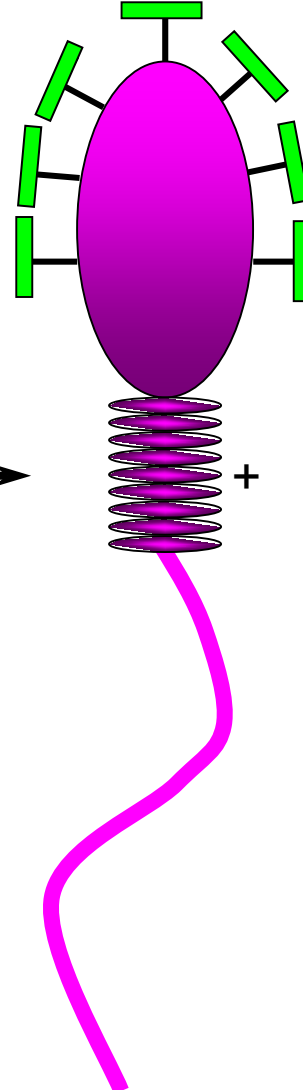
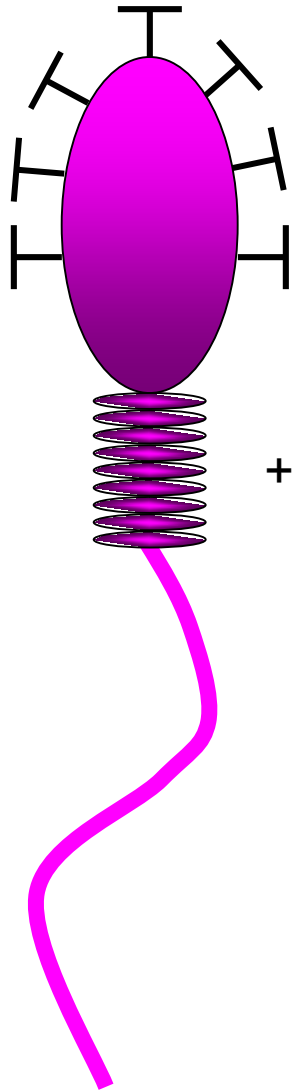
Epididymal

Ejaculated

Capacitated

Seminal Plasma
and/or
Epididymal
Secretions

Female
Tract



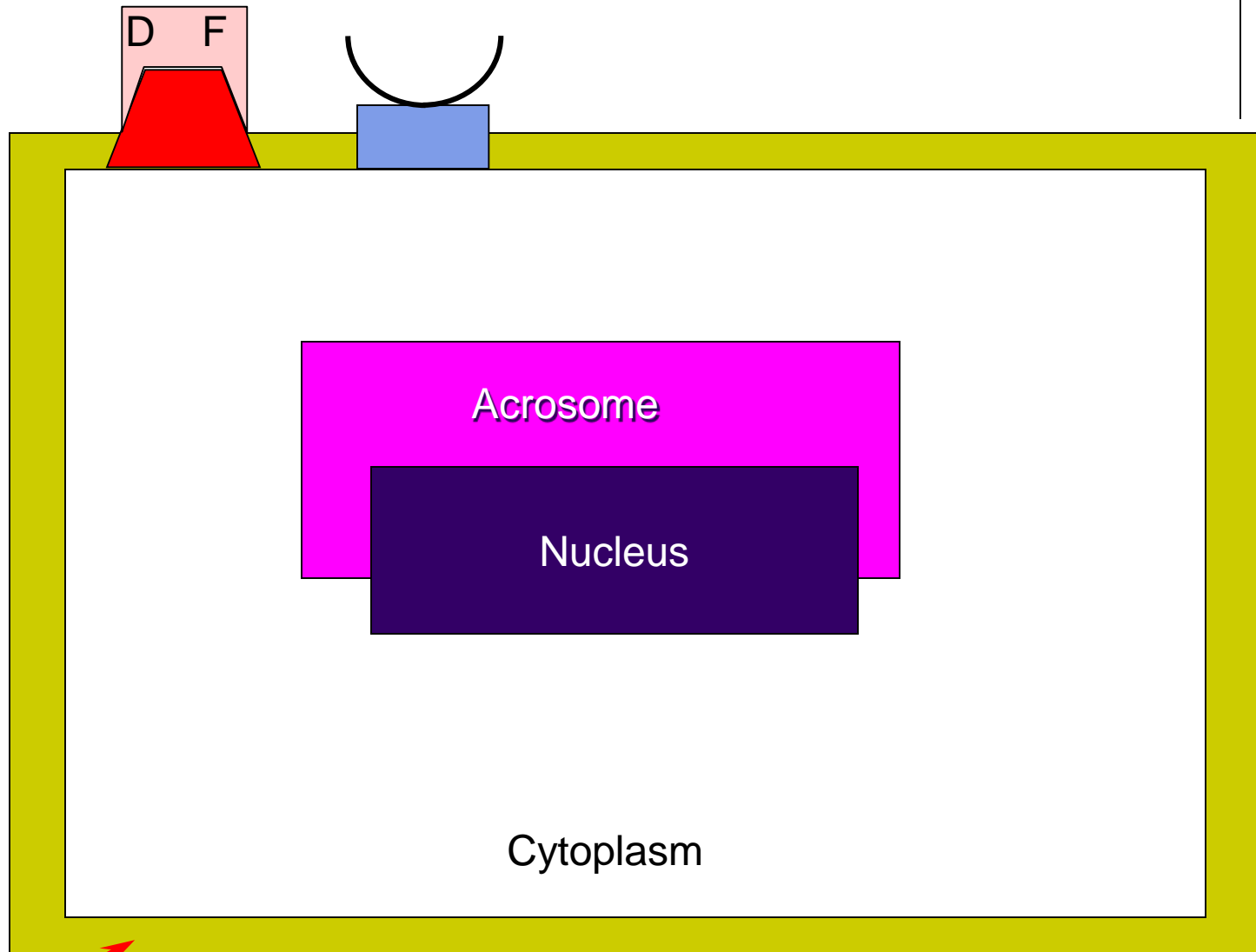
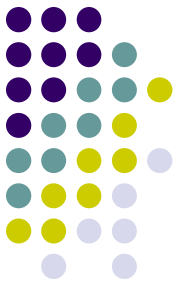
+

+

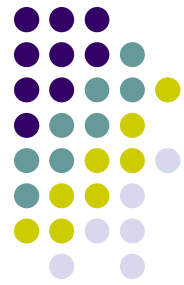
+



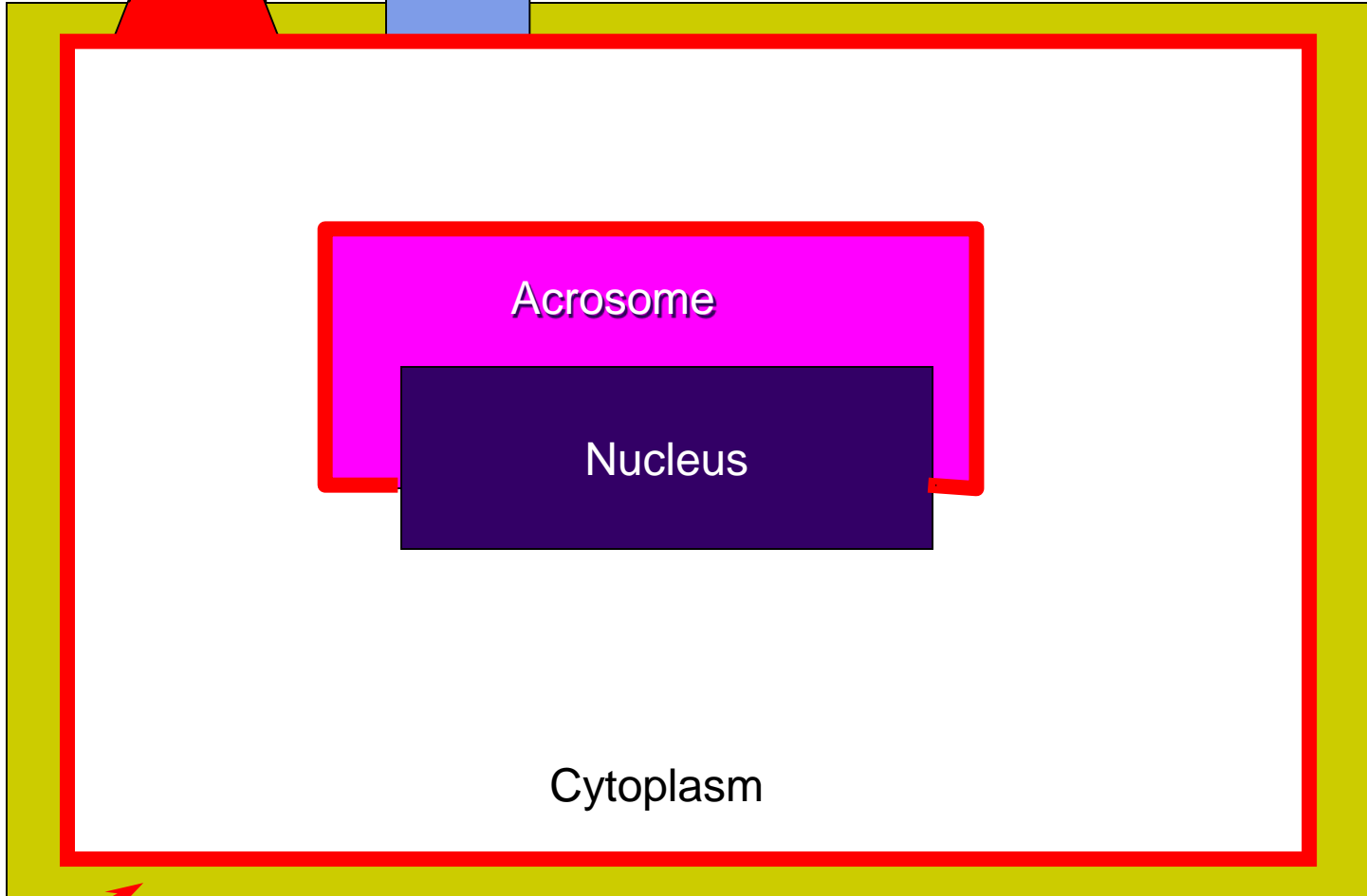
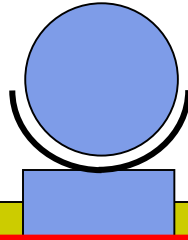
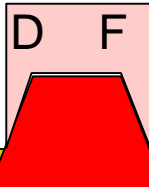
Model of Capacitation



Plasma Membrane

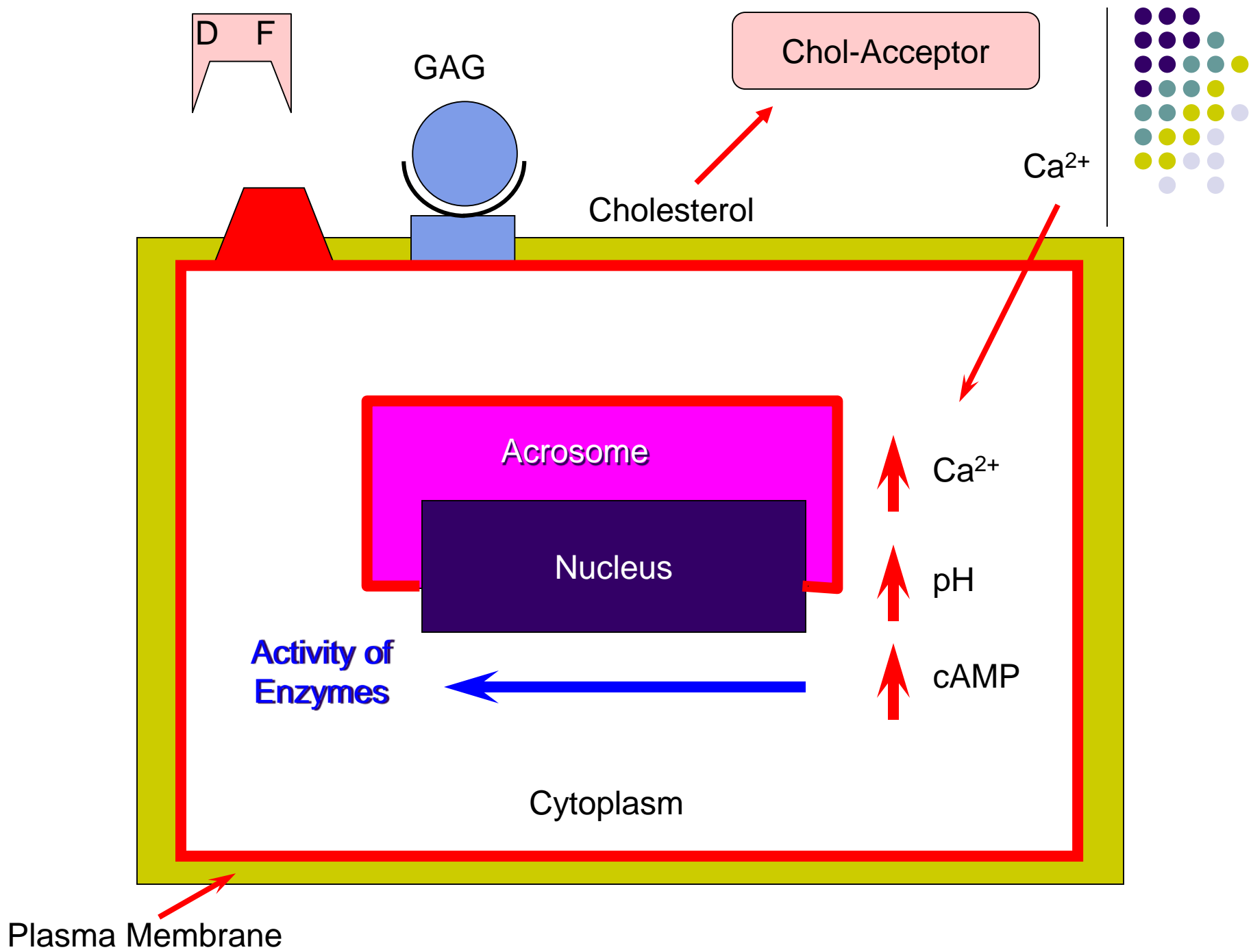


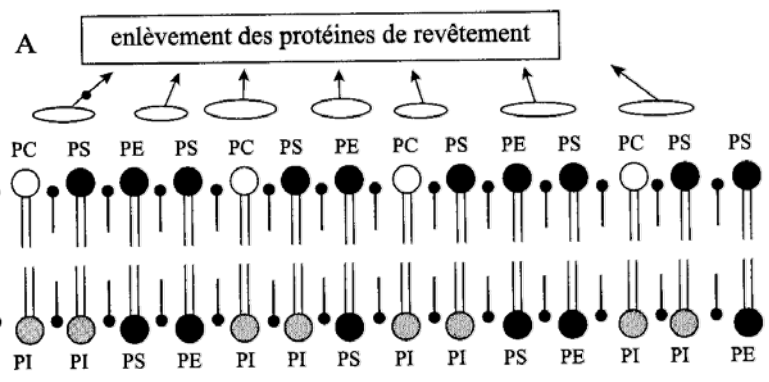
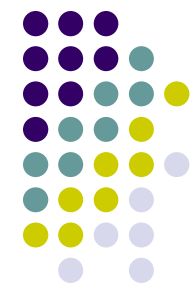
GAG



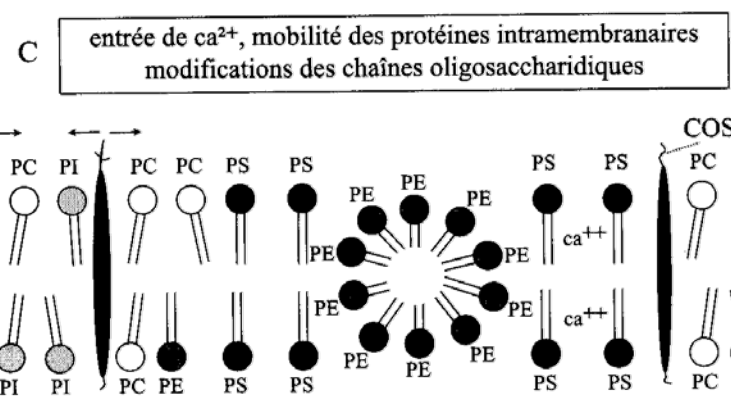
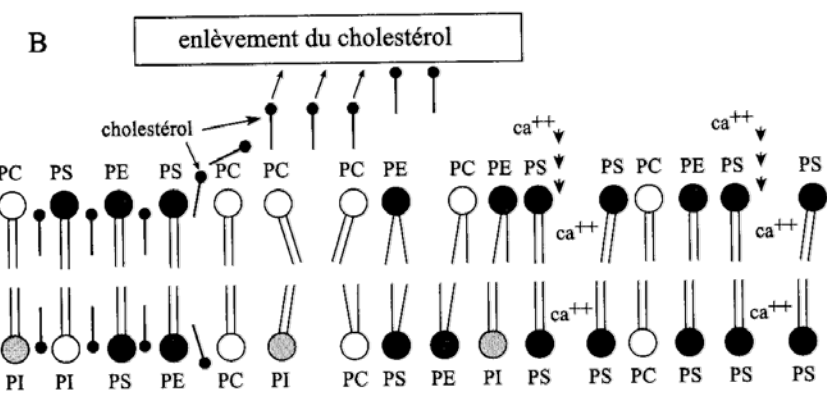
Plasma Membrane







PS phosphatidylserine
 PE phosphatidylethanolamine
 PI phosphatidylinositol
 PC phosphatidylcholine



COSac chaînes oligosaccharidiques modifiées

Trois mécanismes entrent en jeu :

- l'enlèvement par les glycosaminoglycane des voies génitales femelles des protéines liées à la membrane plasmique du spermatozoïde possédant un récepteur pour ces glycanes ; d'autres protéines, non liées à la membrane par des liaisons covalentes, sont détachées et fixées par l'albumine ; le pH bas du milieu utérin ($\leq 6,5$) facilite aussi leur détachement (figure 17-01 A) ;
- l'enlèvement du cholestérol libre par l'albumine et la lipoprotéine HDL, présentes dans les sécrétions génitales, qui sont des accepteurs du cholestérol (figure 17-01 B) ;
- le remaniement de chaînes oligosaccharidiques de protéines intramembranaires par des enzymes présentes dans le milieu génital et l'entrée de Ca^{2+} (figure 17-01 C).

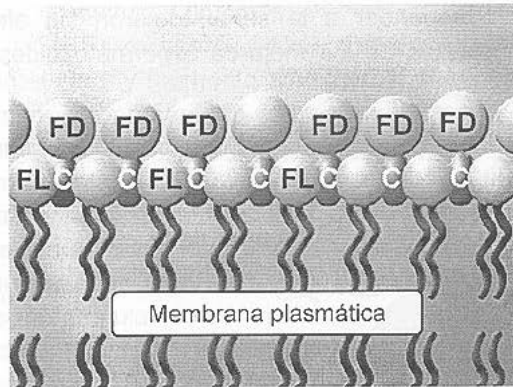


Fig 5. Factores decapacitantes sobre la membrana plasmática; FD: factor decapacitante, C: colesterol

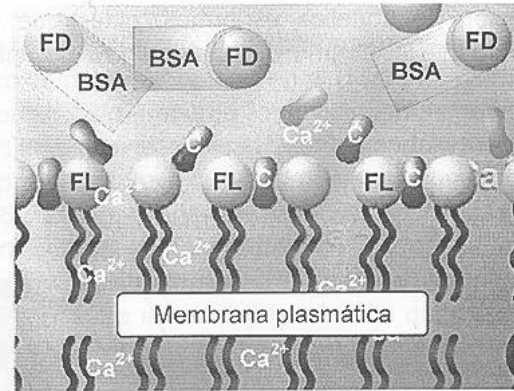
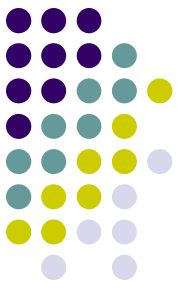


Fig 6. Eliminación de los factores de decapacitación (FD) con albúmina de suero bovino (BSA) y extracción del colesterol (C)

Cuadro 3. Componentes y moduladores de señales de transducción localizados en el capuchón acrosómico y el flagelo (Fraser y col., 2006)

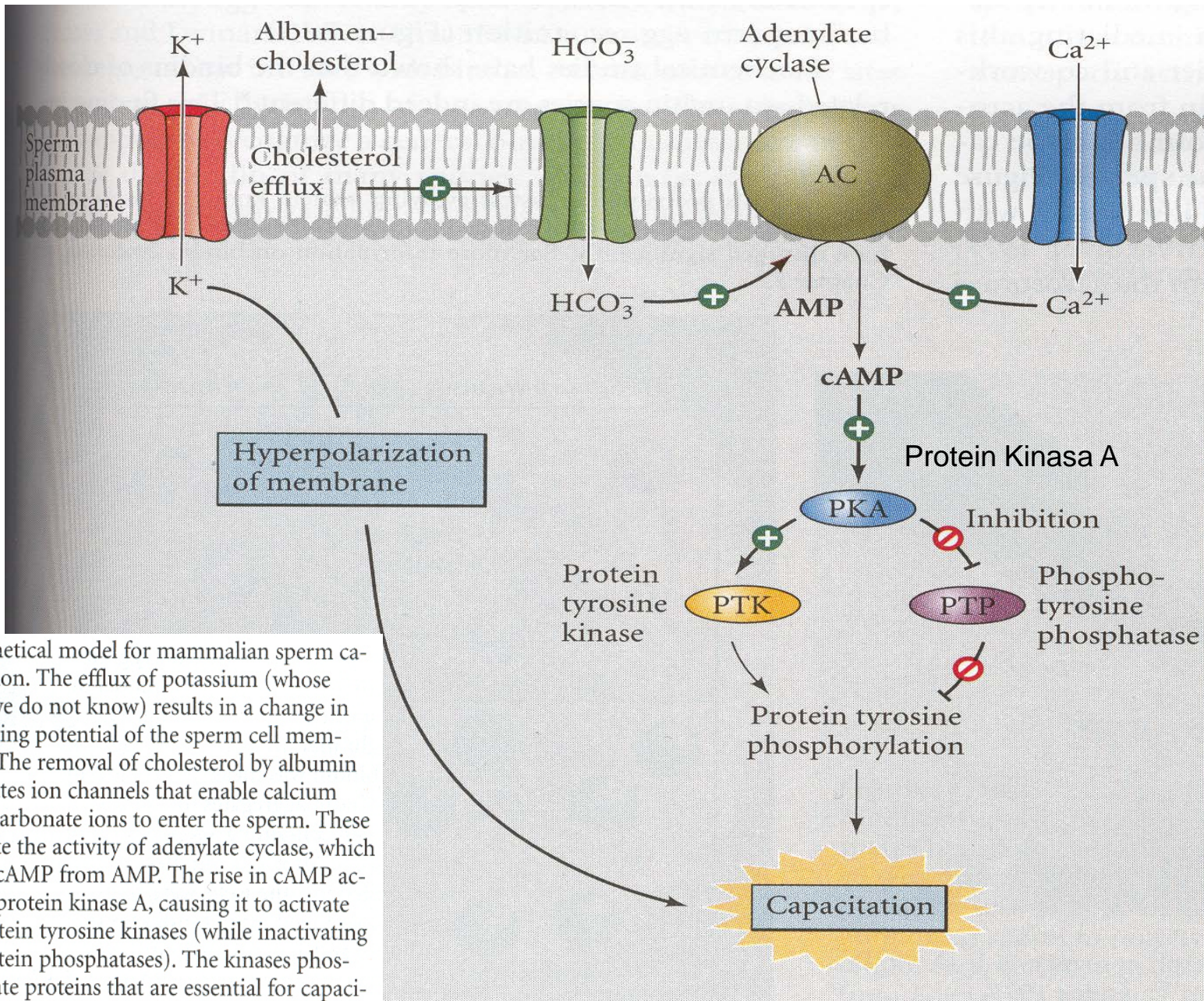
Receptores	Acción
● Adenosina A _{2A}	Estimulador
● Adenosina A ₁	Inhibidor
● Angiotensina II	Estimulador
● Calcitonina	Estimulador y luego inhibidor
● TCP11	Estimulador y luego inhibidor
Proteínas G	
● G alfa s	Estimulador
● G alfa olf	Estimulador
● G alfa i2	Inhibidor
mACs	
● mAC3	
● mAC8	
● mAC4 (solamente en el acrosoma)	
PDEs	
● PDE 4D	
● PDE 10A	
● PDE 11A (solamente en el acrosoma)	
Receptor del factor de decapacitación	





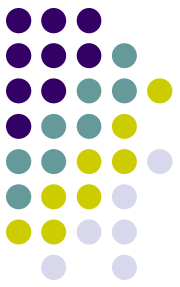
KAPACYTACJA PLEMNIKÓW

- a. Plemniki osiągają zdolność do zapłodnienia po pewnym czasie pobytu w drogach rodnych samicy
- b. Proces kapacytacji powoduje usunięcia lub zmiany warstwy osłaniającej i stabilizującej błony plazmatycznej plemnika. Zmiany te dokonują się pod kontrolą hormonalną i nerwową
- c. W żeńskim układzie rozrodczym plemniki znajdują się w ścisłym kontakcie z komórkami nabłonka cieśni jajowodu i przejścia jajowodowo macicznego
- d. Większość zmian kapacytacyjnych dokonuje się w końcowym odcinku cieśni jajowodu gdzie plemniki zdolne do zapłodnienia są przechowywane. Kapacytacja w tym odcinku przebiega szybszej kiedy samica zostaje kryta po owulacji niż przed owulacją
- e. Proces kapacytacji jest ułatwiony przez pozbywanie się adsorbowanych na powierzchni plemników cząsteczek „dekapacytujących” (białka plazmy nasienia) dzięki działaniu śluzu szyjkowego
- f. Plemniki mogą przechodzić całkowitą kapacytację przebywając w macicy bez konieczności dostania się do jajowodów. Również kapacytacja może zachodzić w jamie otrzewnej lub bańce jajowodu. Kapacytacja nie jest procesem specyficzo-narządowym. Proces kapacytacji przebiega wolniej w plemnikach przylegających do nabłonka cieśni jajowodu.



Hypothetical model for mammalian sperm capacitation. The efflux of potassium (whose cause we do not know) results in a change in the resting potential of the sperm cell membrane. The removal of cholesterol by albumin stimulates ion channels that enable calcium and bicarbonate ions to enter the sperm. These promote the activity of adenylate cyclase, which makes cAMP from AMP. The rise in cAMP activates protein kinase A, causing it to activate the protein tyrosine kinases (while inactivating the protein phosphatases). The kinases phosphorylate proteins that are essential for capacitation. (After Visconti and Kopf 1998.)

Kapacytacja *in vitro*



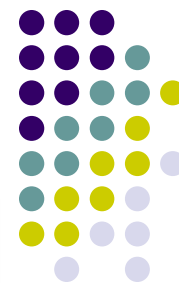
Indukcja kapacytacji *in vitro* dokonuje się przy pomocy różnych komercyjnych płynów do hodowli tkanek lub zmodyfikowanych roztworów jak roztwór Tyrode'a lub Krebs-Ringer'a z dodatkiem substancji energetycznych (glukoza, mleczan i pirogronian sodowy) i albuminy. U ludzi płyn Ham F10 z dodatkiem surowicy krwi.

U buhaja heparyna ułatwia kapacytację *in vitro* plemników poprzez aktywne usuwanie cząsteczek pochodzących z plazmy nasienia z powierzchni plemnika. Istotne zmiany w strukturze błony plazmatycznej plemnika dokonują się podczas ich kapacytacji.



Table 3.1. Approaches to the artificial capacitation of bovine sperm *in vitro*.

Method	Author(s)
High-ionic-strength medium (HIS)	Brackett <i>et al.</i> (1982)
Bovine follicular fluid	Fukui <i>et al.</i> (1983b)
Standard-ionic-strength medium	Iritani <i>et al.</i> (1984)
Heparin	Parrish <i>et al.</i> (1984)
Elevated pH	Cheng (1985)
Ionophore A23187	Hanada (1985b)
Liposomes	Graham <i>et al.</i> (1986)
Percoll gradient/hypotaurine	Utsumi <i>et al.</i> (1988)
Oviductal cell monolayer	Guyader <i>et al.</i> (1989)
TEST yolk	Ijaz and Hunter (1989c)
Caffeine	Niwa <i>et al.</i> (1988)
Oviductal fluid	Parrish <i>et al.</i> (1989a)



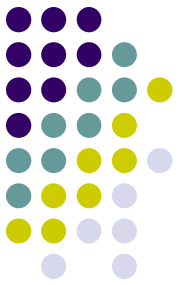
Skład pożywek w oparciu o zmodyfikowany płyn Tyrod'a TALP dla kapacytacji plemników i do zapłodnienia in vitro (Greve i wsp., 1987; Gordon, 1994)

Składniki (mM/l)	S-TALP*	S-TALP	O-TALP	F-TALP
NaCl	112.0	100.0	114.0	114.0
KCl	2.7	3.1	3.1	3.1
NaHCO ₃	25.1	25.0	2.0	25.0
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.4	0.2	0.3	0.3
CaCl ₂	—	2.0	2.0	2.0
MgCl ₂ × 6H ₂ O	0.5	1.5	0.5	0.5
Hepes	5.0	10.0	10.0	—
glukoza	13.9	—	—	—
mleczan sodu	10.0	21.6	10.0	10.0
pirogonian sodu	1.0	1.0	0.25	0.25
BSA (frakcja V, faf)	6 %	6 %	3 %	6 %
gentamicina 50 µg/ml		+	+	+

pożywki S-TALP* i S-TALP dla kapacytacji plemników; żywka F-TALP do zapłodnienia; żywka O-TALP do przemywania oocytów; osmolarność 290-300; pH 7.4

TABLE 3.1 Methods for Identifying Capacitated Spermatozoa

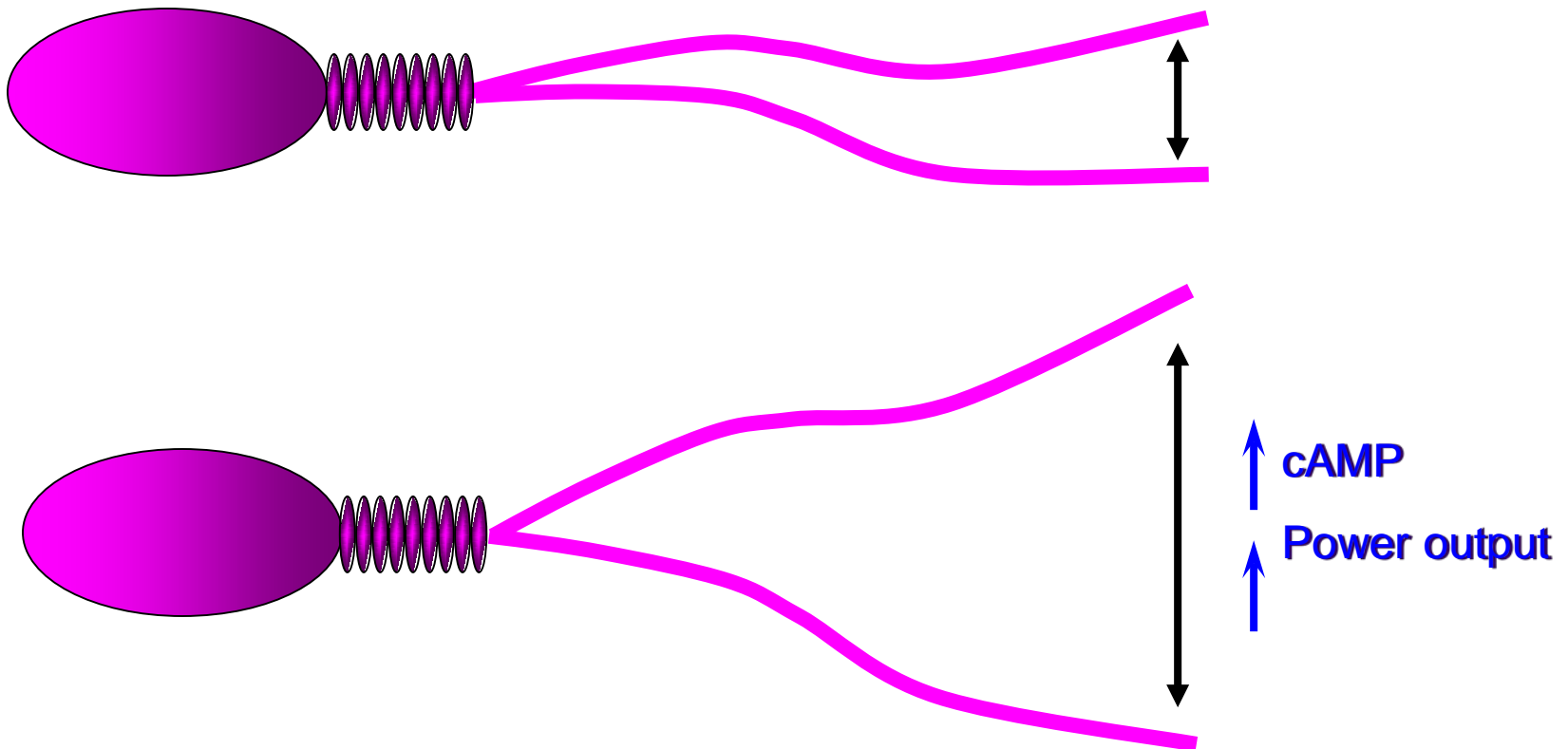
Method	Species	Advantage
Empirical methods		
Chlortetracycline (CTC) assay	Human, monkey, bull, goat, mouse	Distinguishes not only between capacitated and noncapacitated cells, but also between acrosome-reacted and acrosome-intact cells
Functional methods		
Ability to undergo <i>in vitro</i> fertilization	Bull, mouse	Applies the most physiological definition of capacitation
Ability to undergo an induced acrosome reaction	Human, bull	Easy to perform
Ability to bind and penetrate the zona pellucida	Hamster, mouse	—



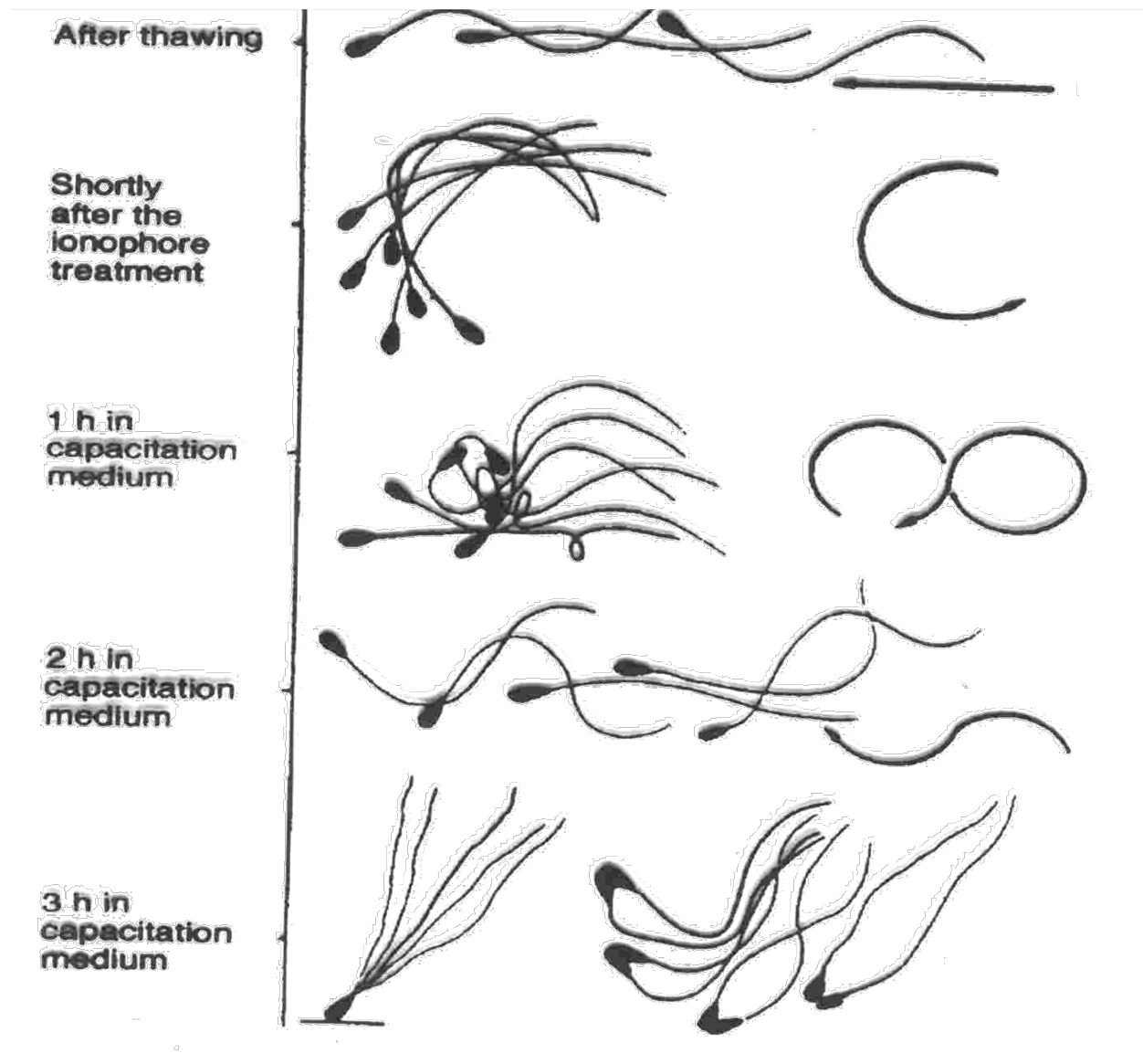
Capacitation



- No change in sperm morphology
- Motility change
 - hyperactivation



Hiperaktywacja plemników buhaja



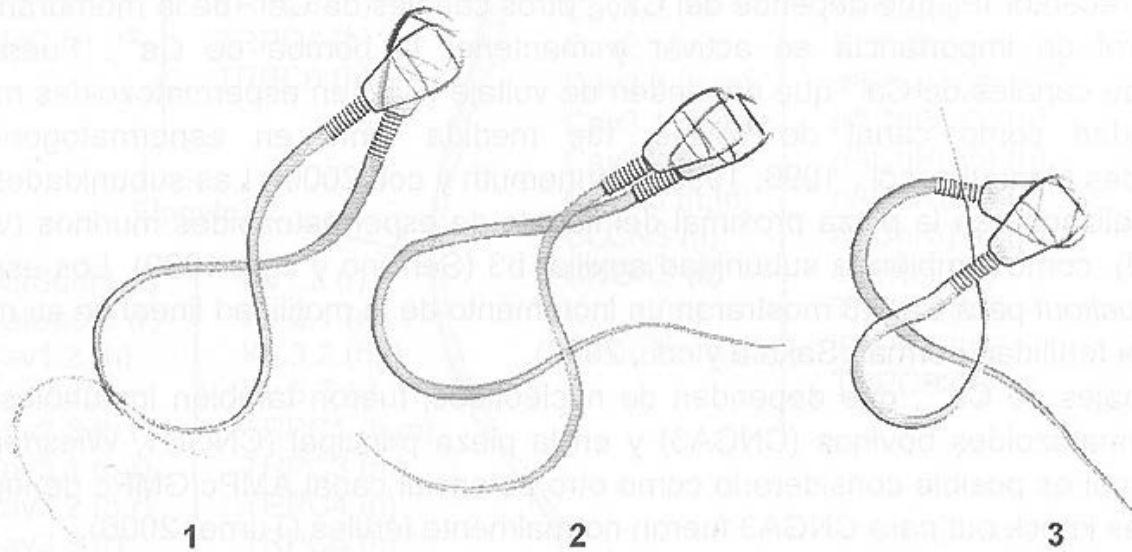
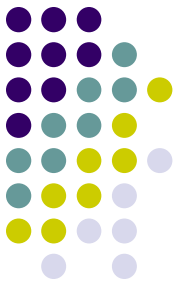


Fig 8. Esquema de los patrones de motilidad espermática de la especie bovina adaptado de Marquez y col., (2004) 1) Espermatozoide activado, describe el patrón de movimiento flagelar en forma de 8. 2) Espermatozoide hiperactivo, describe un movimiento flagelar de gran amplitud y 3) Movimiento exacerbado de hiperactivación. Ver simulación digital animada (según Suárez y col., 2003) en el CD

- Disminuir la posibilidad de quedar atrapado en los repliegues de la mucosa
- Incrementar la posibilidad de alcanzar al ovocito a través de la motilidad no lineal
- Mantenimiento del microambiente, a través de la agitación del fluido con la cola
- Contribuir entrar en el cúmulo, para atravesarlo cambia de movimiento y lo recupera cuando superó las barreras celulares
- Contribuir a la penetración de la zona

Czynniki pobudzające ruchliwości plemników



- **Metyl ksantyny**
 - Kafeina**
 - Teofilina**
 - Aminofilina**
 - Pentoksyfilina**
- **Nukleotydy**
 - Dibutyryl cAMP**
- **Steroidy**
 - 17 β estradiol**
- **Kalikreina**
- **Aminokwasy**
 - Arginina**
 - Metionina**
- **Inne**

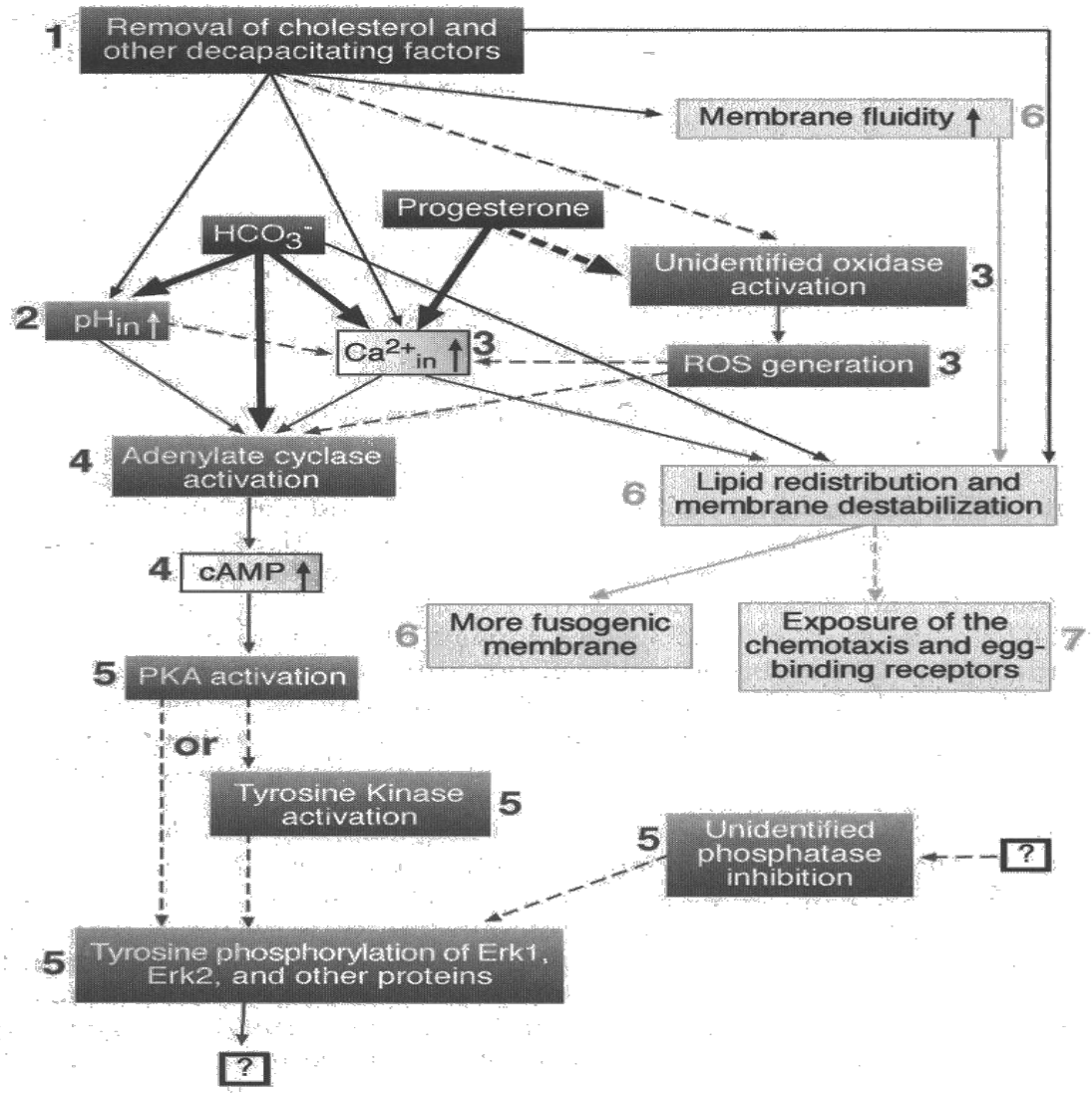
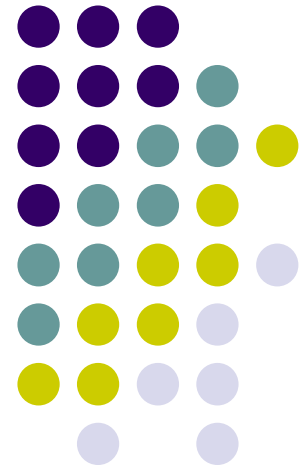


FIGURE 3.2 A schematic model for the sequence of the main molecular events that occur during capacitation. External processes and factors are shown in black. Dark and light gray represent sequences of events that presumably occur in parallel; it is not known, however, how these pathways are linked. Framed boxes represent key elements of signal transduction. Bold black arrows represent modulation of a process by external factors. Thin arrows represent the sequence of events. Solid and dashed arrows represent documented and hypothesized stimulatory pathways, respectively. The numbers correspond to the itemized sequence of events in Section III.E.

Reakcja akrosomowa



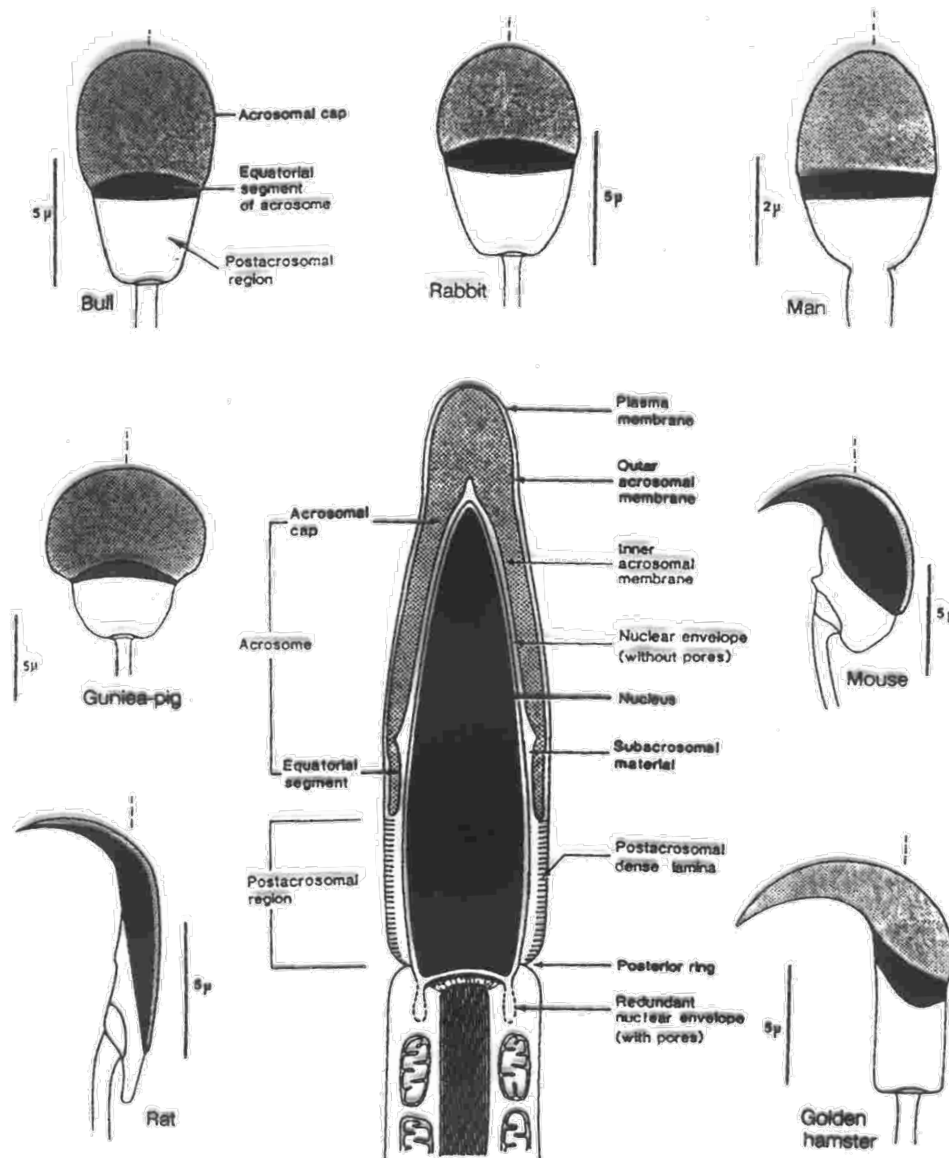
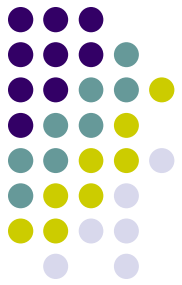


FIG. 15. Diagrams illustrating the relative size and topographical relationship between the acrosomal cap and the equatorial segment of the spermatozoa of seven different species. Although shapes and relative size of these two regions of the acrosome vary from species to species, their basic structures are the same. The central figure is a schematic representation of the sagittal section (---) through the head. (Modified slightly from ref. 530.)

The Acrosome Reaction



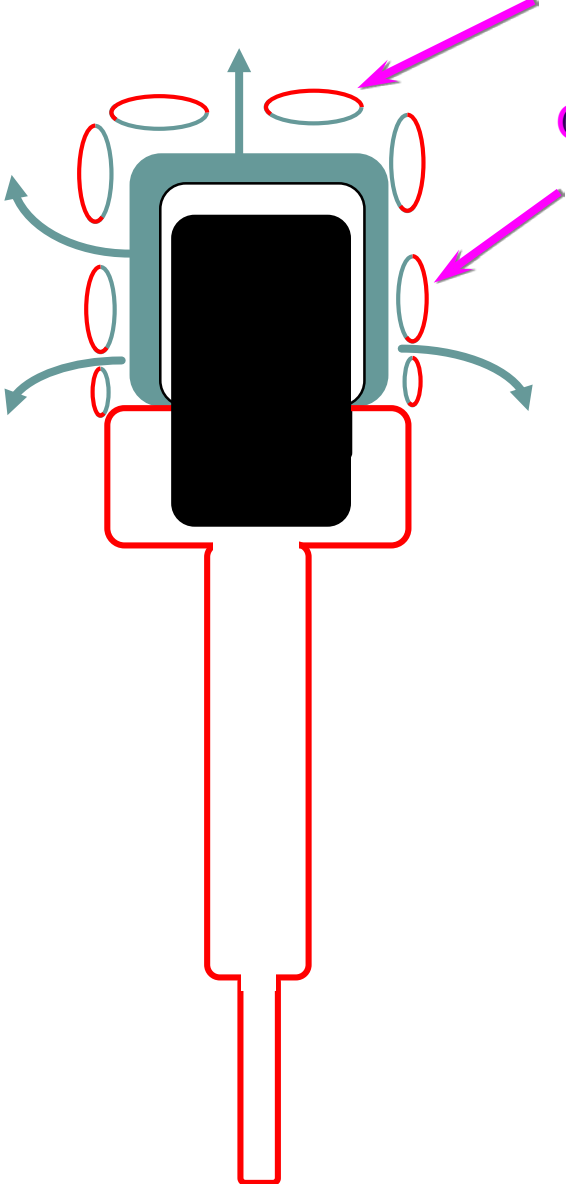
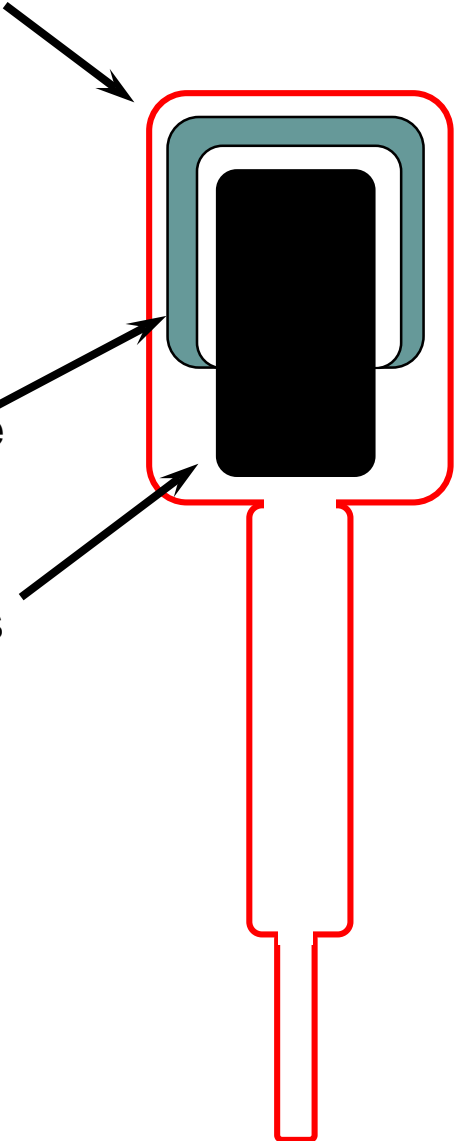
Plasma Membrane

Acrosome

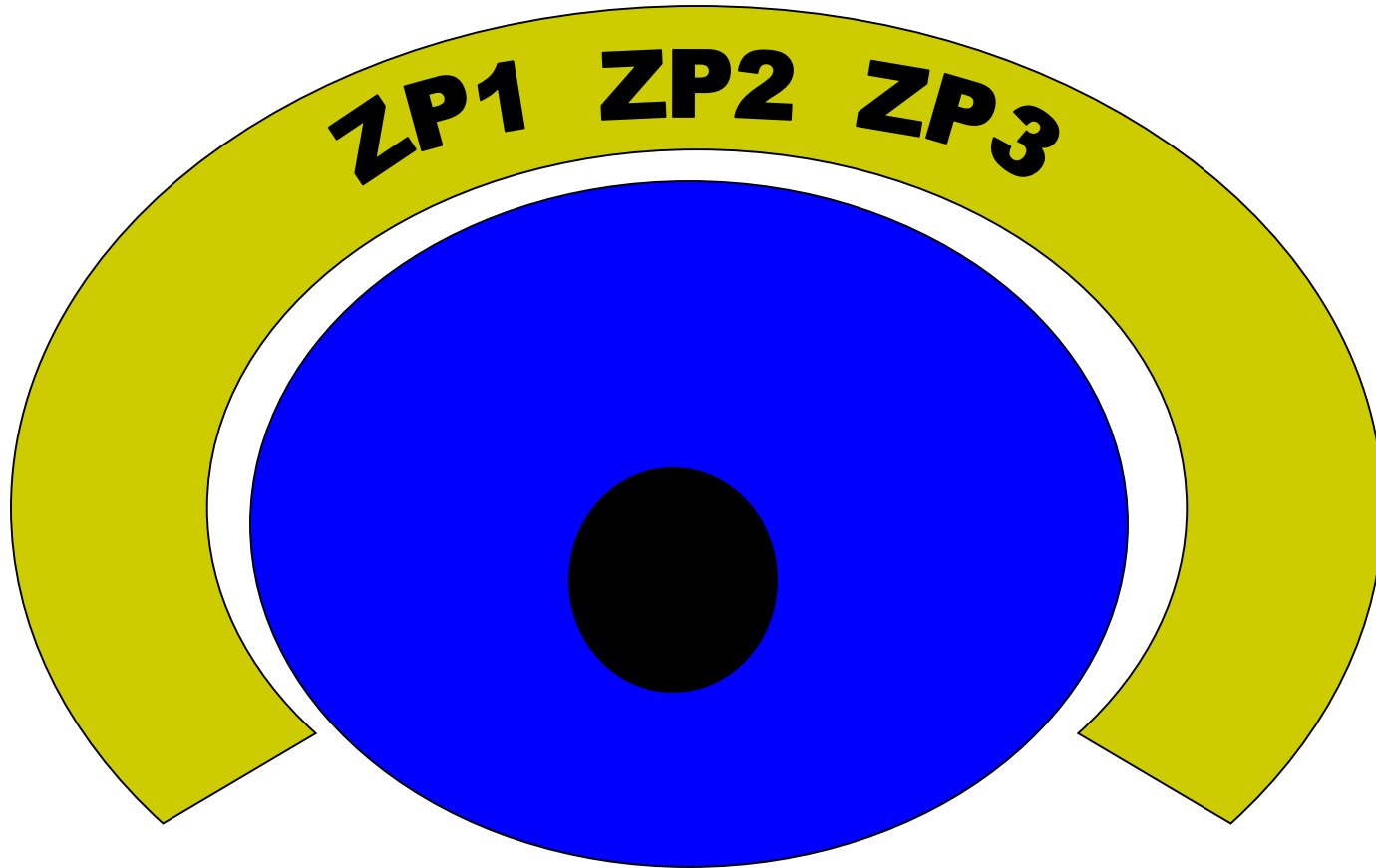
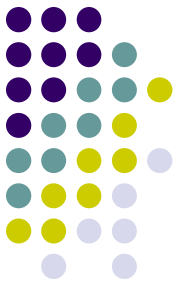
Nucleus

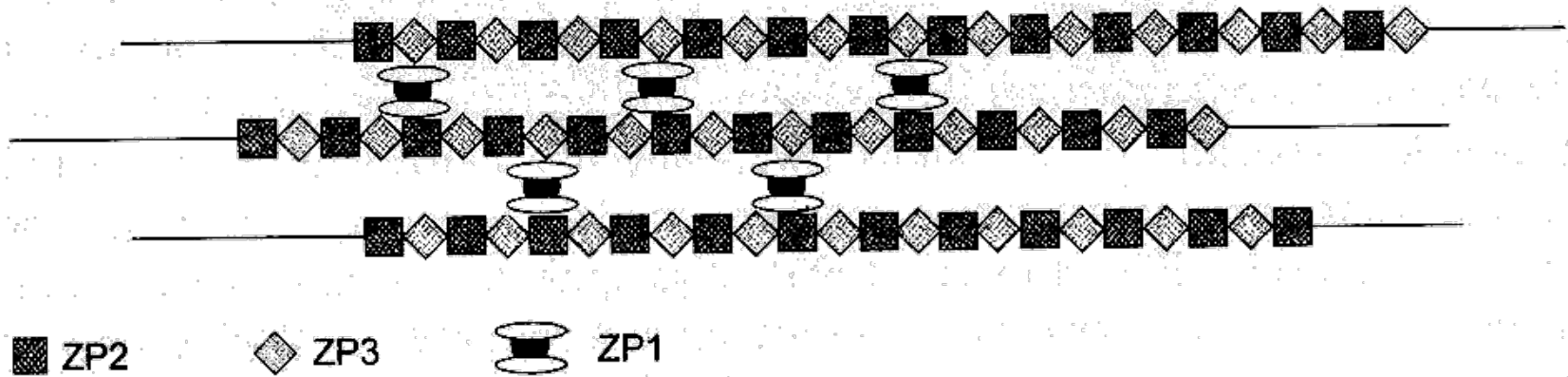
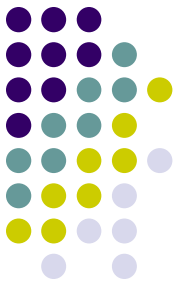
Fused Plasma Membrane and Outer Acrosomal Membrane

Acrosin
Hyaluronidase



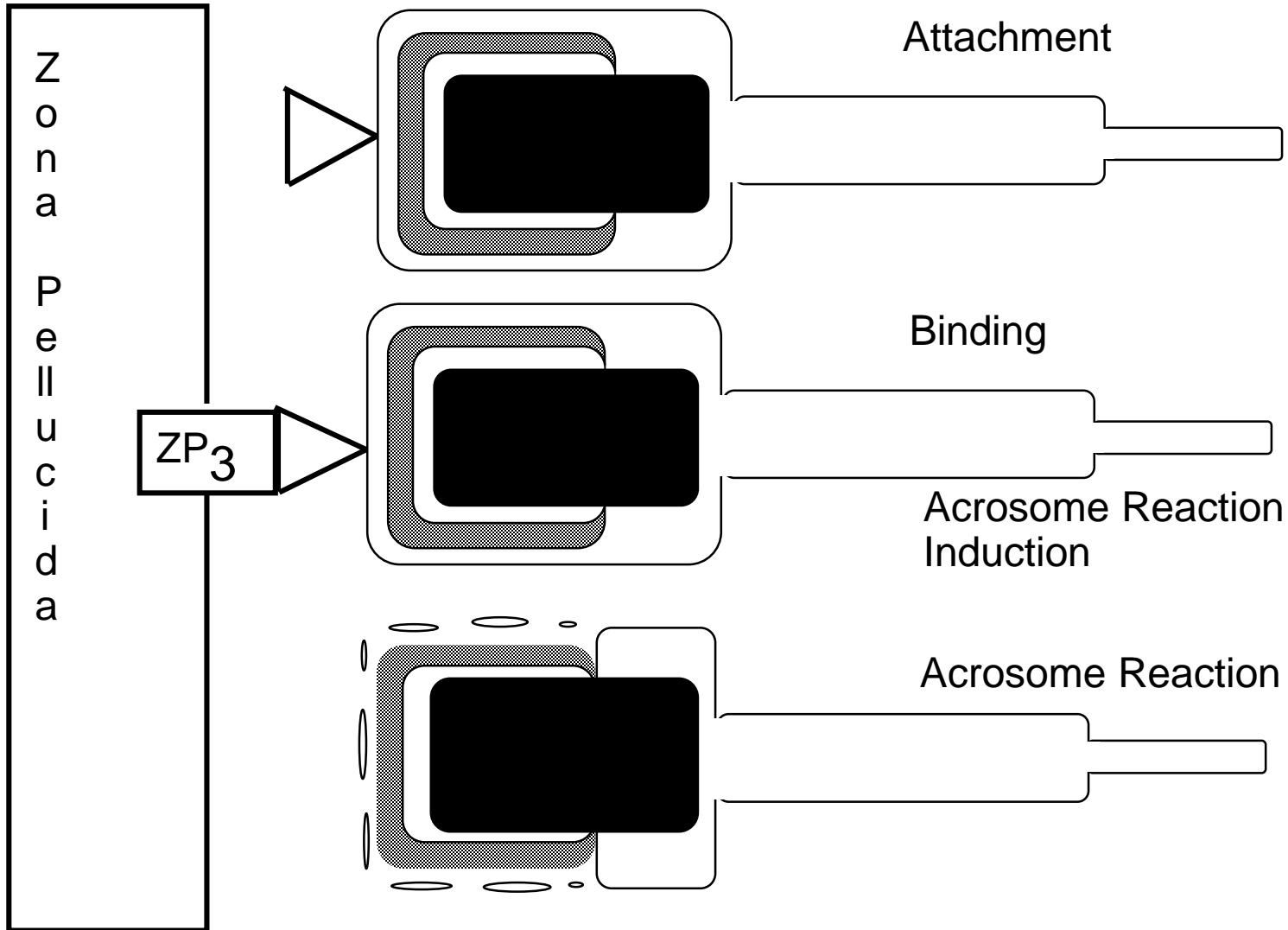
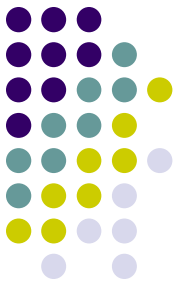
The Zona Pellucida

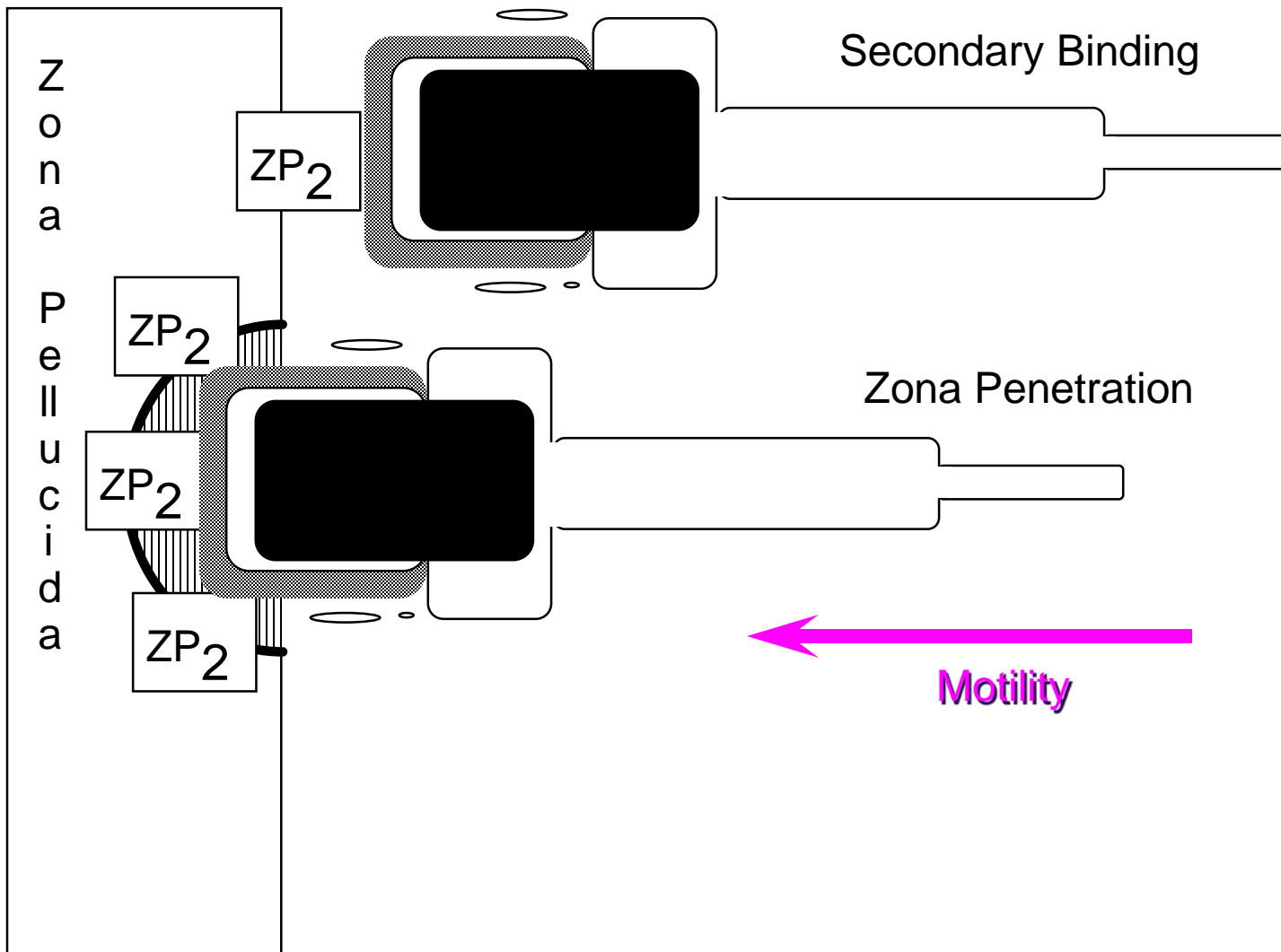




III.1.3. Schemat budowy osłonki przejrzystej myszy. Symbole pokazują rozmieszczenie białek ZP1, ZP2 i ZP3

Sperm Interaction with the Zona





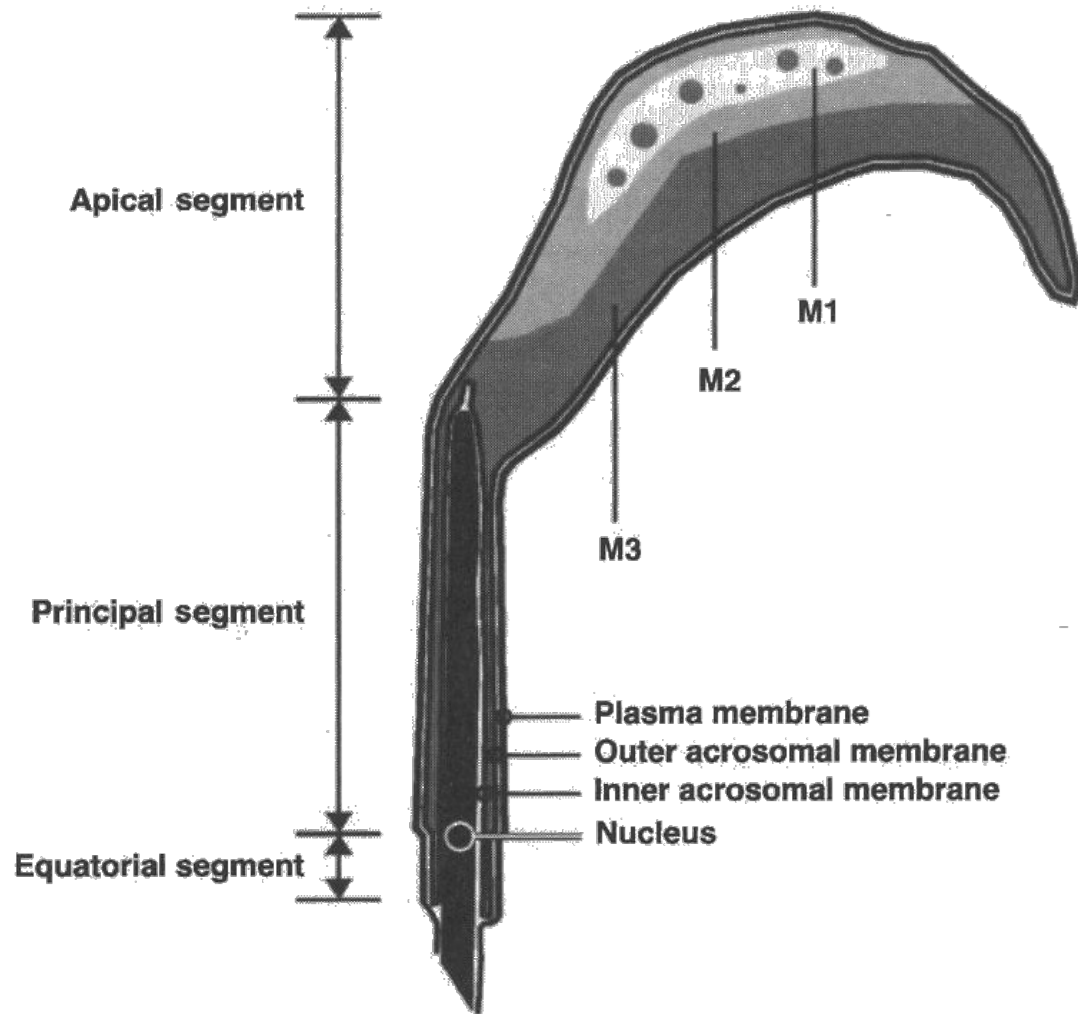
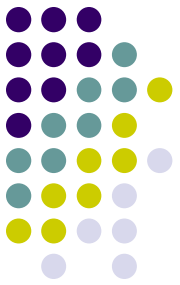


FIGURE 8.2 Graphical illustration of the domain structure of the guinea pig sperm acrosome. The acrosome of this species' sperm is quite large and is partitioned into clear morphological domains (M1, M2, M3). As cited in the text and listed in Table 8.1, spermatozoa of other mammals, including mouse, rat, human, bull, and hamster, have detectable domains within the acrosomes.



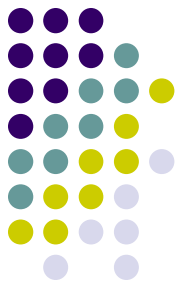


TABLE 8.1 Examples of Proteins Found within Specific Acrosomal Domains

Species	Protein name	Domain
Guinea pig	Proacrosin	M2, M3
	AM50	M3
	AM67 (sp 56 ortholog)	M1 (absent from spherical zones)
	CRISP-2 (autoantigen 1)	M1, M2, M3
	Dipeptidyl peptidase II	M1 (absent from spherical zones)
	Acrin 1 (MN7 antigen)	M1 spherical zones and outer acrosomal matrix-associated materials posterior to the dorsal bulge but not on the ventral outer acrosomal membrane
Mouse	mMC101 antigen	Anterior acrosome
Mouse, rat, human, hamster	Equatorin	Equatorial segment
Hamster	AM29 and AM22 antigens	M1 and M2 (excluded from the equatorial segment)
Bovine	OMC32 (SP-10 homolog)	Outer acrosomal membrane-associated matrix complex and the inner acrosomal membrane or the equatorial segment
Human	SP-10	Principal segment and posterior bulb of equatorial segment

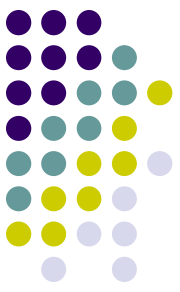


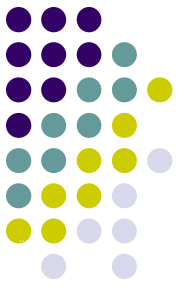
Table 2.1 Enzymes from mammalian sperm reported to be of acrosomal origin (Reproduced with permission from Yanagimachi, 1994)

First reported before 1980

Hyaluronidase
Acrosin
Proacrosin
Acid proteinase
Esterase
Neuraminidase
Phosphatase
Phospholipase A
N-acetylglucosaminidase
Arylsulfatase
Arylamidase
Collagenase

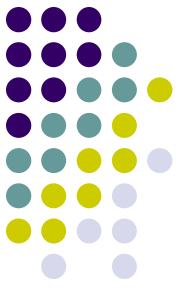
First reported after 1980

N-acetylexosaminidase
Galactosidase
Glucuronidase
L-fucosidase
Phospholipase C
Cathepsin D
Cathepsin L
Ornithin decarboxylase
Calpain II
Metalloendoprotease
Caproyl esterase
Peptidyl peptidase



REAKCJA AKROSOMOWA

- a. Akrosom zawiera różne enzymy hydrolityczne. Białka strukturalne akrosomu przyczyniają się do utrzymania specyficznej przestrzennej funkcjonalnej struktury różnych komponentów znajdujących się wewnątrz akrosomu. Ta przestrzenna uporządkowana struktura jest potrzebna do zapewnienia uwalniania różnych komponentów zawartych w akrosomie w bardzo precyzyjnym porządku zgodnie z porządkiem przechodzenia główki plemnika poprzez różne struktury oocytu.
- b. Dla zapewnienia zapłodnienia oocytu plemnik musi wykazać bardzo silną ruchliwość jak i w odpowiednim momencie reakcja akrosomowa musi zachodzić, tzn w momencie przylegania główki plemnika do osłonki przejrzystej..
- c. Reakcja akrosomowa jest pewnym wskaźnikiem zakończenia procesu kapacytacji. Plemnik, który nie przeszedł przez kapacytację nie wykazuje reakcji akrosomowej
- d. Znaczne przechodzenie jonów wapnia przez błonę plazmatyczną ma miejsce podczas reakcji akrosomowej. Stężenie Ca^{2+} w plemnikach jest niskie zarówno w główce jak i w ogonku, jest to spowodowane mechanizmem, w którym pośredniczy ATPaza regulująca transport Ca^{2+} oraz systemem wymiany Ca^{2+}/H^{+} w błonie plazmatycznej.
- e. Węglowodany wchodzi w skład zawartości akrosomu. Podczas reakcji akrosomowej warstwa glikoprotein pokrywająca wewnętrzną powierzchnię zewnętrznej błony akrosomowej ulega pęcherzykowaniu. Pęcherzykowanie to doprowadzi do powstania otworów, co umożliwia uwalnianie zawartości enzymatycznej akrosomu.
- f. Nieaktywna postać enzymu akrozyna zawarta w akrosomie, pod wpływem glikosaminoglikanów wydzielin macicy i jajowodów uaktywnia się.



GalT – galactosyltransferase

ZP3-COS chaîne oligosaccharidique de la ZP3

ZP3-Pr – partie protéique ZP3

SP 95 – récepteur spermatique

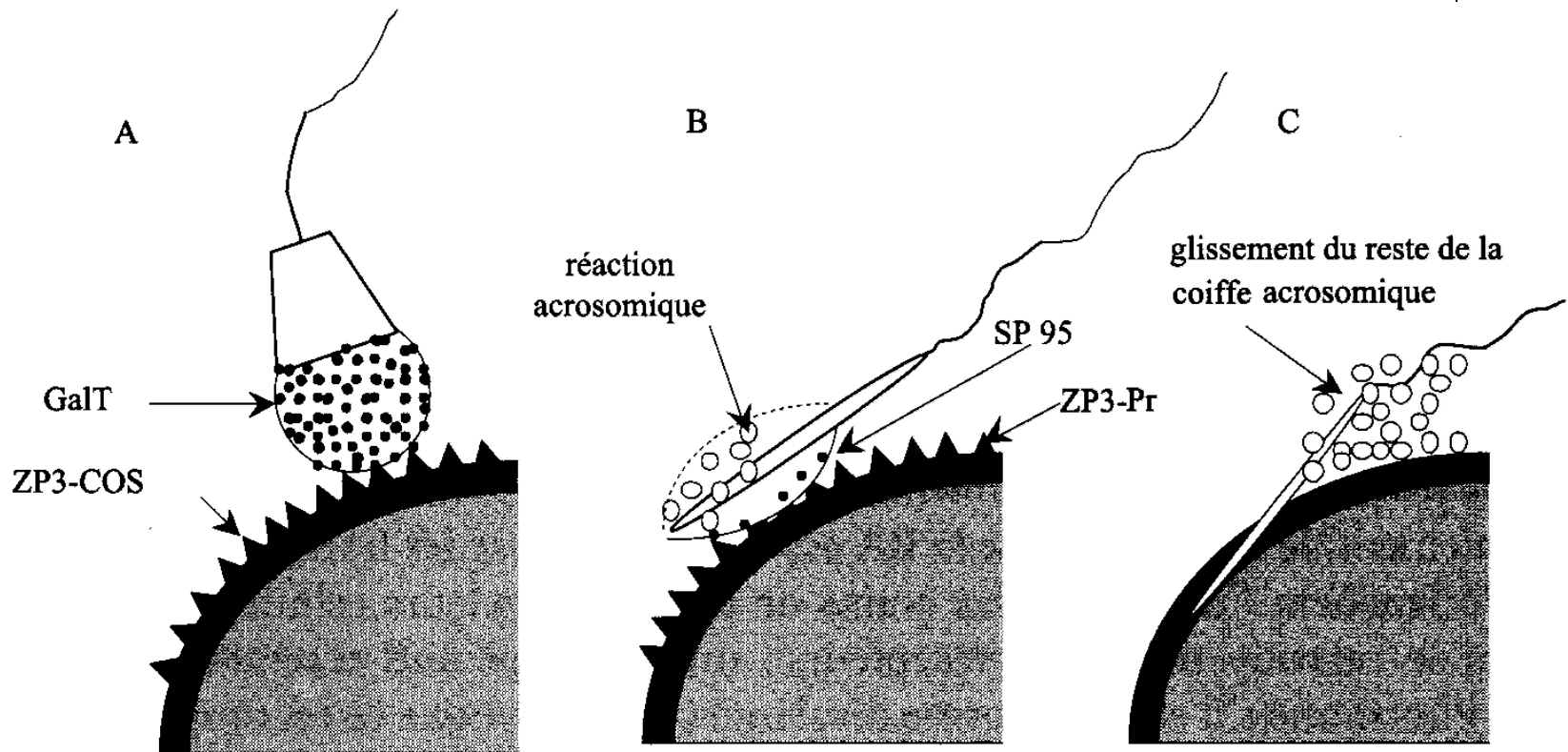
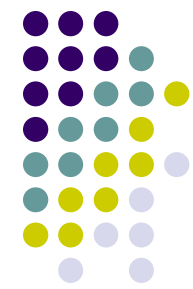
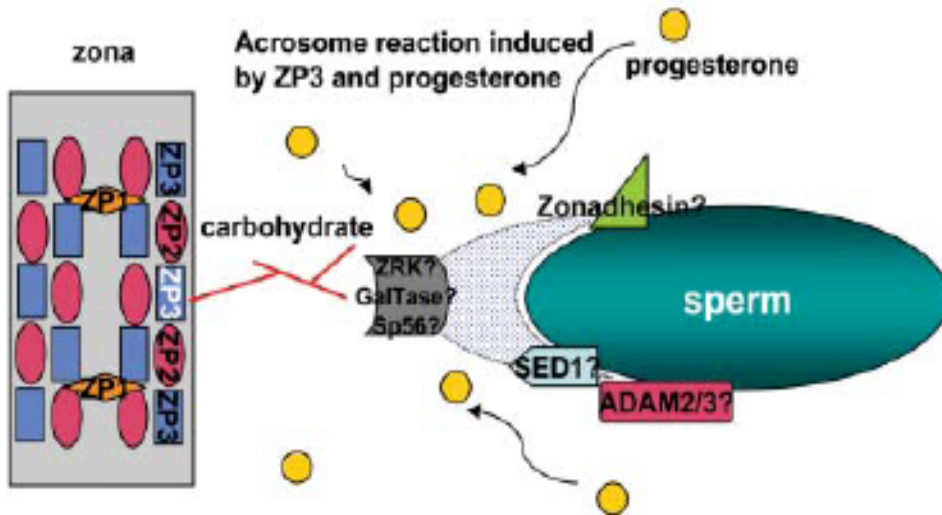


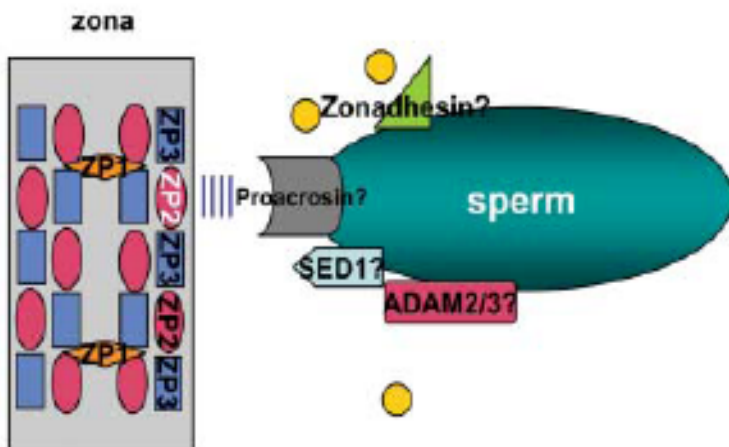
Figure I7-02. A. Fixation du spermatozoïde de souris à une chaîne oligosaccharidique de la ZP3 (ZP3-COS) par sa galactosyltransférase (GalT). **B.** Fixation progressive de toute la surface antérieure de la tête du spermatozoïde (vue de profil). Des récepteurs spermatiques se fixent à la partie protéique de la ZP3 (ZP3-Pr) ; cette fixation induit la réaction acrosomique. **C.** Les membranes acrosomique externe et plasmique fusionnent ponctuellement formant un capuchon perforé qui glisse jusqu'à la pièce intermédiaire.



A. Primary sperm binding to zona pellucida



B. Secondary sperm binding to zona pellucida



Schematic diagrams of molecular interaction during sperm-zona interaction. A) Primary binding of sperm to the zona. Oligosaccharides on ZP3 recognize sperm proteins (p95, GalTase, sp56?), initiating the acrosome reaction. Progesterone trapped in the cumulus oophorus also triggers the acrosome reaction. B) Secondary binding of sperm to the zona. ZP2 is thought to bind to sperm proteins (proacrosin) to sustain the acrosome-reacted sperm on the zona. The other sperm proteins such as zonadhesin, SED1 and ADAM2/3 may participate in either primary or secondary binding.

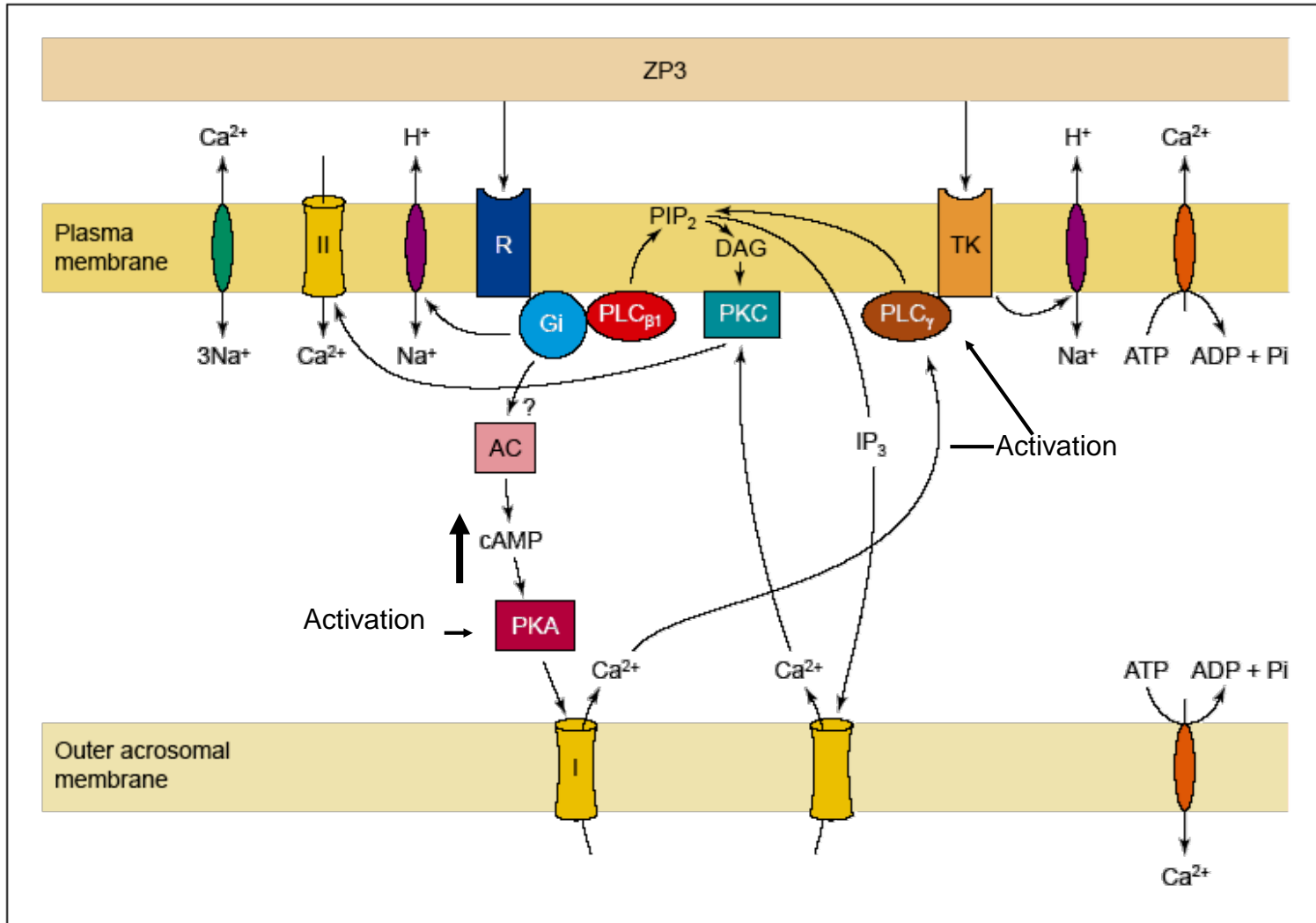
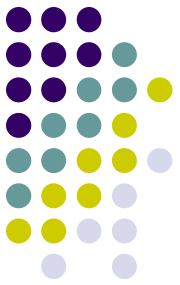
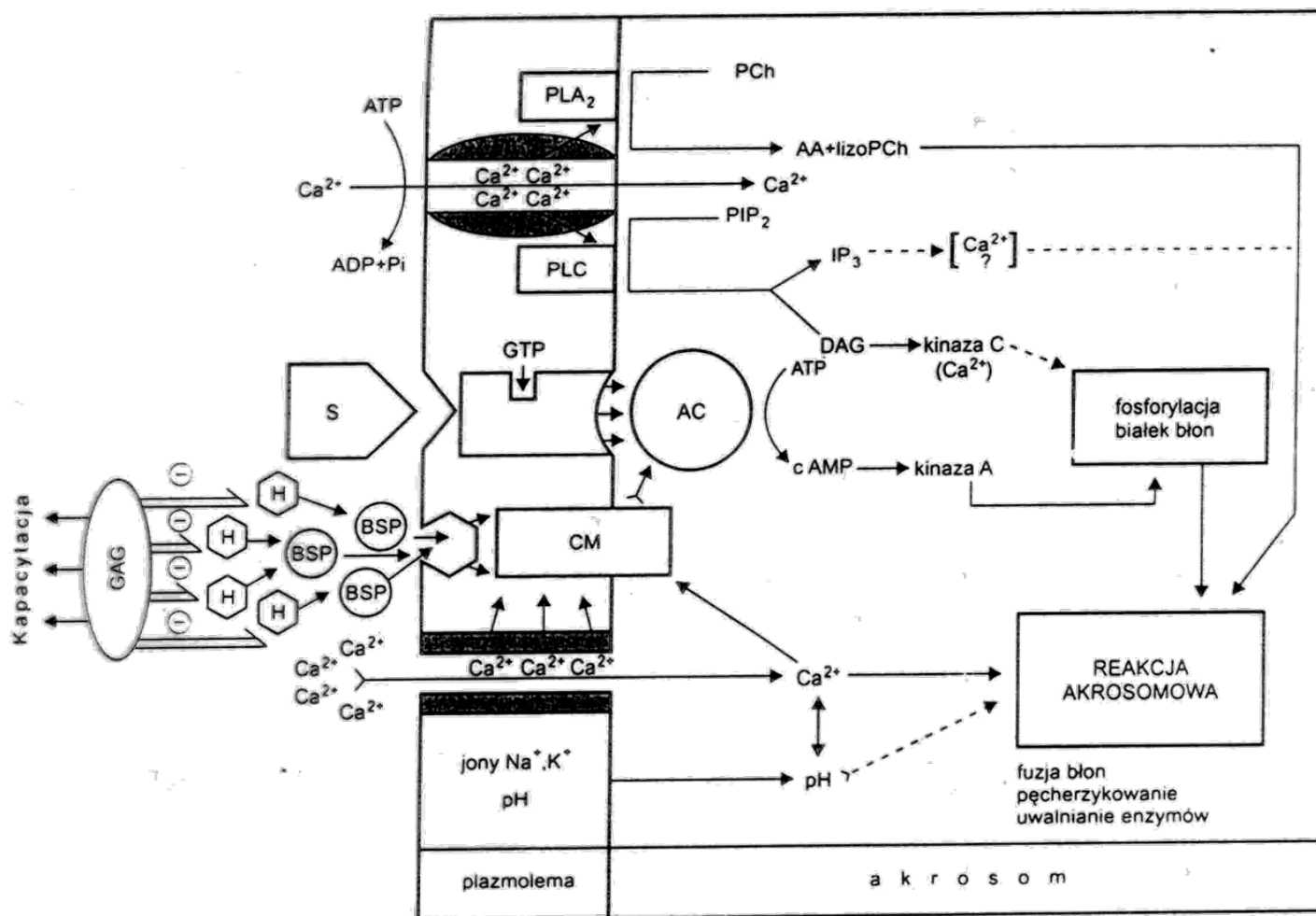


Fig. 2. Possible interactions among the activities invoked during the acrosome reaction. The glycoprotein, ZP3, binds to at least two different receptors in the plasma membrane. One (R) is a G_i coupled receptor that activates phospholipase C β_1 (PLC β_1). The other (TK) is a tyrosine kinase receptor coupled to PLC γ . Binding to R would regulate adenylate cyclase (AC) leading to increased cAMP and protein kinase A (PKA) activation. The PKA activates a voltage dependent Ca²⁺ channel in the outer acrosomal membrane which releases Ca²⁺ from the interior of the acrosome to the cytosol. This is the first (I), relatively small, rise in intracellular Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) which leads to activation of the PLC γ . The products of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂) hydrolysis by PLC diacylglycerol (DAG) and inositol-triphosphate (IP₃) will lead to PKC translocation to the plasma membrane and its activation. Protein kinase C opens a voltage dependent Ca²⁺ channel (L) in the plasma membrane, leading to the second (II), higher, increase in [Ca²⁺]_i. The G_i or TK can also activate a Na⁺/H⁺ exchanger, leading to alkalinization of the cytosol. The increase in [Ca²⁺]_i and pH will lead to membrane fusion and acrosomal exocytosis.



Rys. 4.1. Hipotetyczny model wpływu różnych mediatorów biologicznych na reakcję akrosomową plemników ssaków (wg Wassarman, 1987; zmodyfikowany).

(—) wpływ potwierdzony (- - -) wpływ nie udowodniony

S — substancje sygnałowe lub różne bodźce oddziałujące na receptory plazmolemy (np. białka wiążące zony); AC — cyklaza adenylnowa; CM — kalmodulina; BSP — białka plazmy nasienia wiążące kalmodulinę; GAG — glikozoaminoglikany; H — heparyna; PIP₂ — fosfatydyloinozytol(3,4)bisfosforan; PCh — fosfatydylocholina; PLC — fosfolipaza C; PLA₂ — fosfolipaza A₂; IP₃ — inozytol(1,4,5)trifosforan; DAG — diacyloglicerol; lizoPCh — lizofosfatydylocholina



TABLE 3.2 Acrosome-Reaction Inducers

Inducer	Species	Advantage	Disadvantage
Natural inducers^a			
Solubilized ZP ^b	Human, hamster, mouse	The physiological inducer	Commercially unavailable
Progesterone	Human	—	Induces only partial AR
Follicular fluid	Human	—	Induces only partial AR
Platelet-activating factor	Human	—	—
Lysophosphatidyl choline	Human, bull, guinea pig	—	—

TABLE 3.2 (continued)

Inducer	Species	Advantage	Disadvantage
Pharmacological inducers^c			
Ca ²⁺ ionophore (A23187, ionomycin)	Human, hamster, mouse	Induces complete AR; the preferred inducer according to the consensus	—
PKC stimulator (PMA)	Human	Can be used in the absence of extracellular Ca ²⁺	Induces only partial AR
PKA and PKG stimulators (e.g., dbcAMP and dbcGMP)	Human	Can be used in the absence of extracellular Ca ²⁺	

^a By “natural” we mean that the inducer is known to be present in the body.

^b Abbreviations; AR, acrosome reaction; dbcAMP, dibutyl cAMP; dbcGMP, dibutyl cGMP; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PKG, protein kinase G; PMA, phobol 12-myristate 13-acetate [termed also 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)]; ZP, zona pellucida.

^c Pentoxifylline, sometimes considered as an AR inducer (DasGupta *et al.*, 1994b), is not included in the table. This is because it does not induce the AR but it rather sensitizes the response to Ca²⁺ ionophores (Carver-Ward *et al.*, 1994; Mortimer and Fraser, 1996).

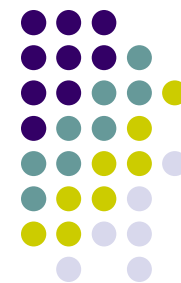




TABLE 3.3 Probes Used to Identify Acrosome-Reacted Spermatozoa

Probe ^a	Target	Comments	References
FITC-PSA ^b	An α -methyl mannoside residue localized in the acrosomal contents	Can detect both partially and completely acrosome-reacted cells, i.e., useful even for early stages of AR; requires sperm permeabilization	Aitken and Brindle (1993); Cohen-Dayag <i>et al.</i> (1995); Cross <i>et al.</i> (1986); Jaiswal <i>et al.</i> (1999a); Kinger and Rajalakshmi (1995); Köhn <i>et al.</i> (1997); Mendoza <i>et al.</i> (1992); Tesarik <i>et al.</i> (1993a)
FITC-ConA	A D-mannose/D-glucose residue in the inner acrosomal membrane	Identifies only completely acrosome-reacted cells	Fierro <i>et al.</i> (1996); Holden <i>et al.</i> (1990); Köhn <i>et al.</i> (1997)
FITC-labeled ^c monoclonal antibodies against the acrosomal contents	Antigens within the acrosomal contents (e.g., CRB9, C11H, HS-19, HS-21, HS-63)	Can detect both partially and completely acrosome-reacted cells, i.e., useful even for early stages of AR; requires sperm permeabilization	Aitken and Brindle (1993); Dorjee <i>et al.</i> (1997); Kallajoki <i>et al.</i> (1986); Moore <i>et al.</i> (1987); Wolf <i>et al.</i> (1985)
The above-mentioned probes coupled to paramagnetic beads instead of FITC	As above	In addition to the above-mentioned comments, the probe-coupled paramagnetic beads can sort out acrosome-reacted cells	Köhn <i>et al.</i> (1996); Ohashi <i>et al.</i> (1992); Okabe <i>et al.</i> (1992)
Chlortetracycline	Outer acrosomal membrane	Can identify acrosome-reacted cells simultaneously with capacitated cells; molecular mechanism not fully understood; potential interference from compounds that modulate Ca ²⁺ -phospholipid complexes, affect CTC absorption spectrum, or quench the fluorescence intensity; does not allow one to distinguish live spermatozoa from dead ones	Amin <i>et al.</i> (1996); Kholkute <i>et al.</i> (1990); Lee <i>et al.</i> (1987); Saling and Storey (1979); Visconti <i>et al.</i> (1998); Yanagimachi (1994)

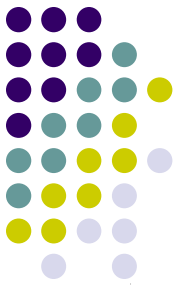


TABLE 3.3 (continued)

Probe ^a	Target	Comments	References
Double or triple stain	Acrosomal contents	Technically difficult, often capricious	De Jonge <i>et al.</i> (1981); Mortimer and F. Chacon (1981)
FITC-PNA	A β -D-galactose residue localized in the outer acrosomal membrane	Can detect even earlier stages of AR than those detected by FITC-PSA; detects both partially and completely acrosome-reacted cells; requires sperm permeabilization	Aitken and Brindl (1986); Kinger Krausz <i>et al.</i> (1981); Mortimer <i>et al.</i> (1981)
FITC-labeled monoclonal antibodies against the inner acrosomal membrane	Antigens in the inner acrosomal membrane (e.g., CD46, GB24, HSA-10)	Can detect only completely acrosome-reacted cells; suitable for objective determination by flow cytometry	Carver-Ward <i>et al.</i> (1992); Dorjee (1989); Jaiswal <i>et al.</i> (1993)
Coomassie blue	Proteins associated with the acrosomal matrix		Aarons <i>et al.</i> (1991); Moller <i>et al.</i> (1991)
FITC-labeled mannosylated BSA	D-Mannose-specific lectins on the sperm head		Benoff <i>et al.</i> (1991)
Quinacrine	Acrosomal contents	Fluorescent due to the acid pH within the intact acrosome; its fluorescence is lost at the onset of the AR as a result of equilibration between the acrosomal compartment and the suspending medium, with a consequent alkalization of the acrosomal compartment	Amin <i>et al.</i> (1996)



TABLE 3.3 (continued)

Probe ^a	Target	Comments	References
Double or triple stain	Acrosomal contents	Technically difficult, often capricious	De Jonge <i>et al.</i> (1989); Köhn <i>et al.</i> (1997); Mortimer and Fraser (1996); Talbot and Chacon (1981)
FITC-PNA	A β -D-galactose residue localized in the outer acrosomal membrane	Can detect even earlier stages of AR than those detected by FITC-PSA; detects both partially and completely acrosome-reacted cells; requires sperm permeabilization	Aitken and Brindle (1993); Kallajoki <i>et al.</i> (1986); Kinger and Rajalakshmi (1995); Krausz <i>et al.</i> (1994); Luconi <i>et al.</i> (1995); Mortimer <i>et al.</i> (1987)
FITC-labeled ^c monoclonal antibodies against the inner acrosomal membrane	Antigens in the inner acrosomal membrane (e.g., CD46, GB24, HSA-10)	Can detect only completely acrosome-reacted cells; suitable for objective determination by flow cytometry	Carver-Ward <i>et al.</i> (1994); D'Cruz and Hass (1992); Dorjee <i>et al.</i> (1997); Fenichel <i>et al.</i> (1989); Jaiswal <i>et al.</i> (1999a); Parinaud <i>et al.</i> (1993)
Coomassie blue	Proteins associated with the acrosomal matrix		Aarons <i>et al.</i> (1993); Miller <i>et al.</i> (1993); Moller <i>et al.</i> (1990)
FITC-labeled mannosylated BSA	D-Mannose-specific lectins on the sperm head		Benoff <i>et al.</i> (1993d)
Quinacrine	Acrosomal contents	Fluorescent due to the acid pH within the intact acrosome; its fluorescence is lost at the onset of the AR as a result of equilibration between the acrosomal compartment and the suspending medium, with a consequent alkalization of the acrosomal compartment	Amin <i>et al.</i> (1996)

^a All the probes were used with human spermatozoa. Chlortetracycline was also used with monkey, bull, goat, and mouse spermatozoa. Coomassie blue was used with mouse and hamster spermatozoa in addition to human spermatozoa.

^b Abbreviations: AR, acrosome reaction; ConA, concanavalin A; CTC, chlortetracycline; FITC, fluorescein isothiocyanate; PNA, peanut agglutinin; PSA, *Pisum sativum* agglutinin.

^c The labeling was either by direct coupling or by using secondary antibodies labeled with FITC.

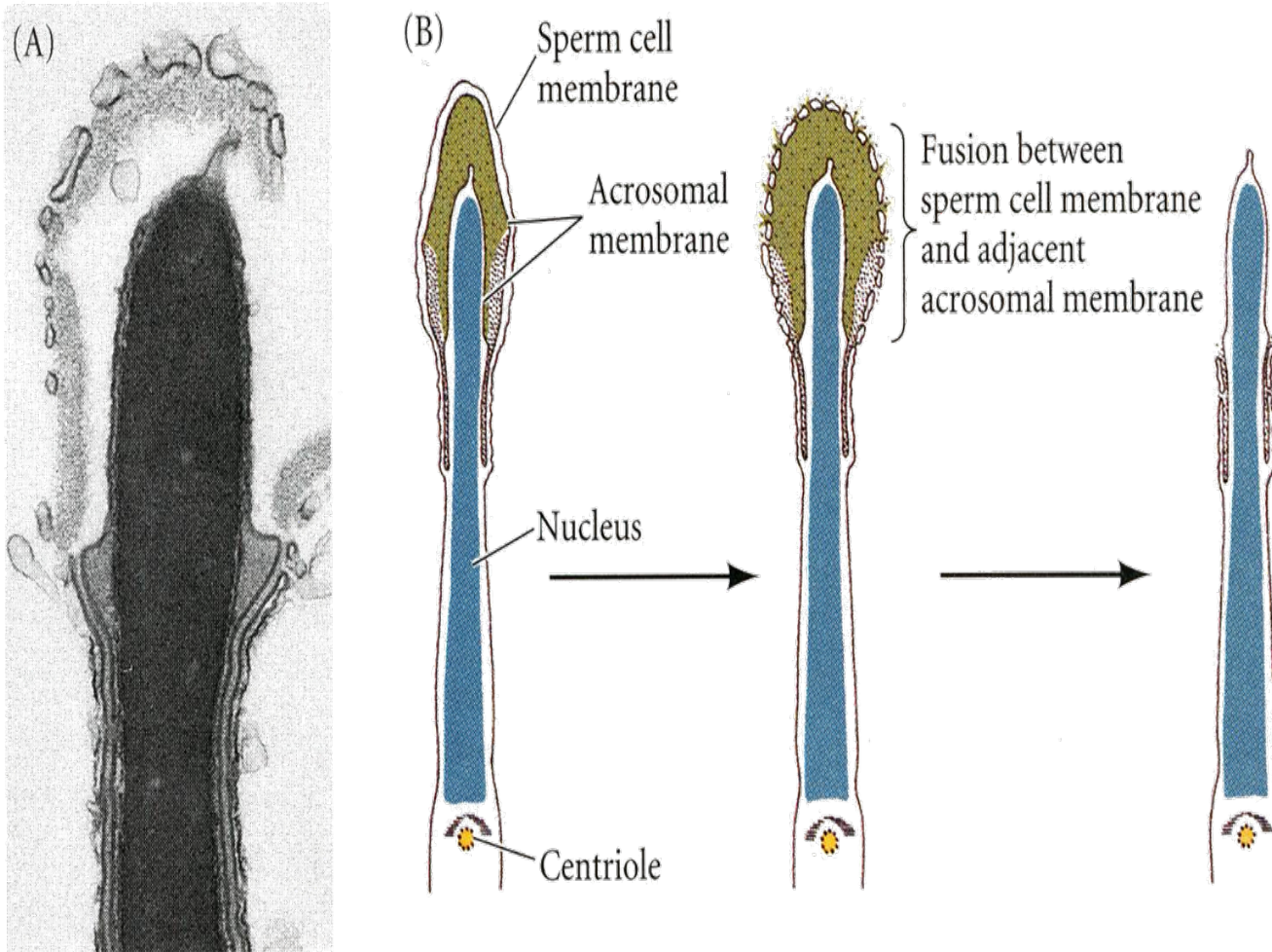
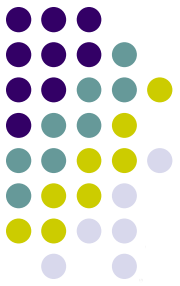
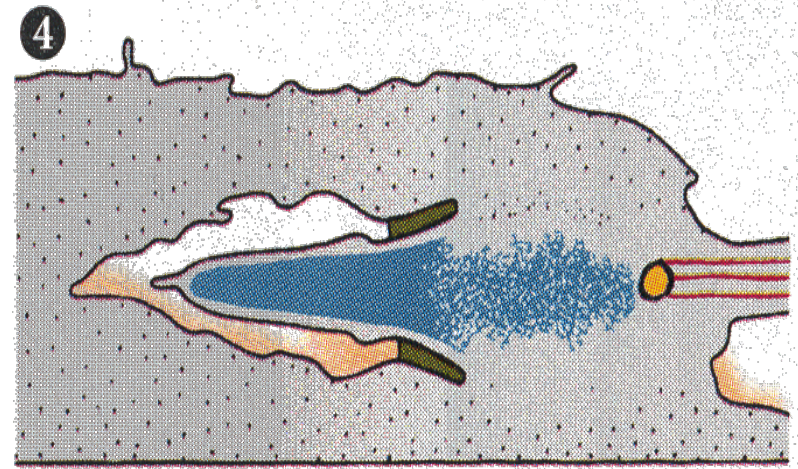
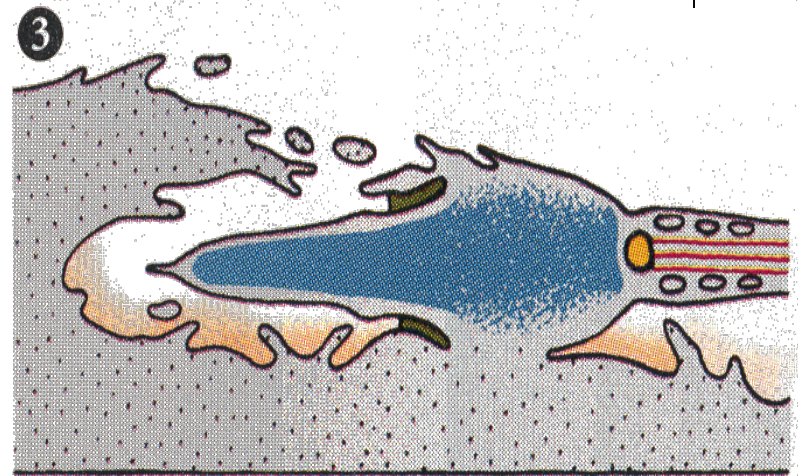
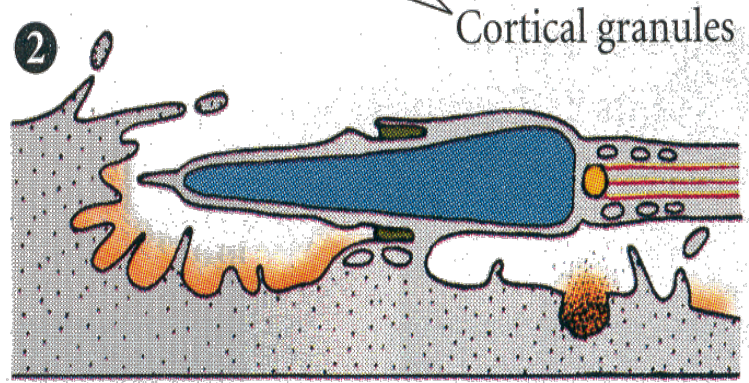
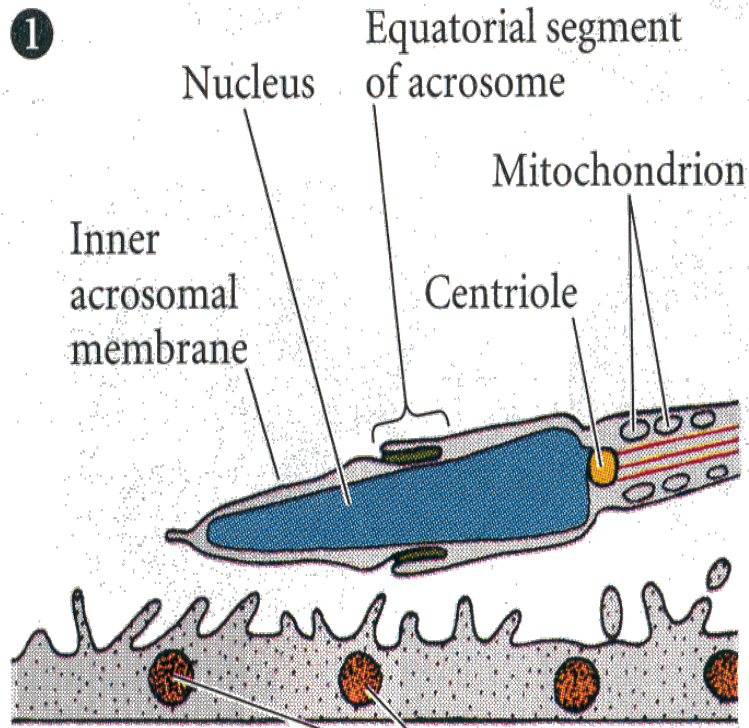
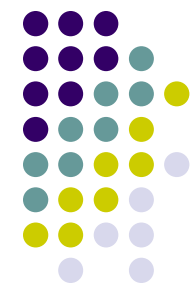


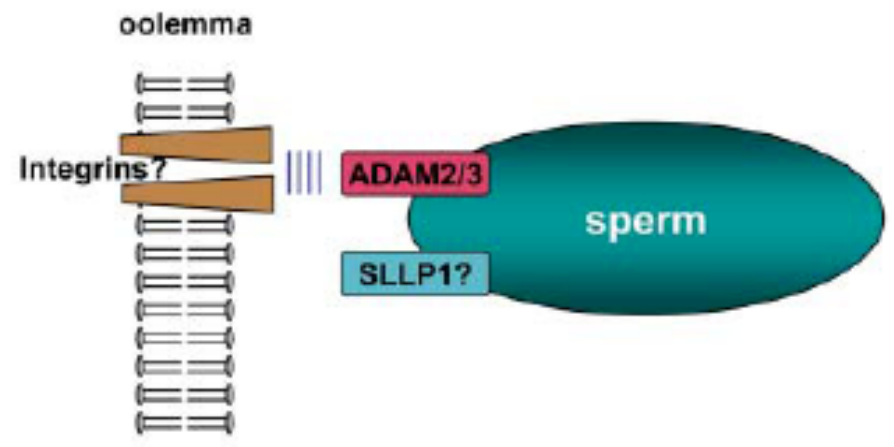
Figure 7.11

Acrosomal reaction in hamster sperm. (A) Transmission electron micrograph of hamster sperm undergoing the acrosomal reaction. The acrosomal membrane can be seen to form vesicles. (B) Interpretive diagram of electron micrographs showing the fusion of the acrosomal and cell membranes in the sperm head. (A from Meizel 1984, courtesy of S. Meizel; B after Yanagimachi and Noda 1970.)

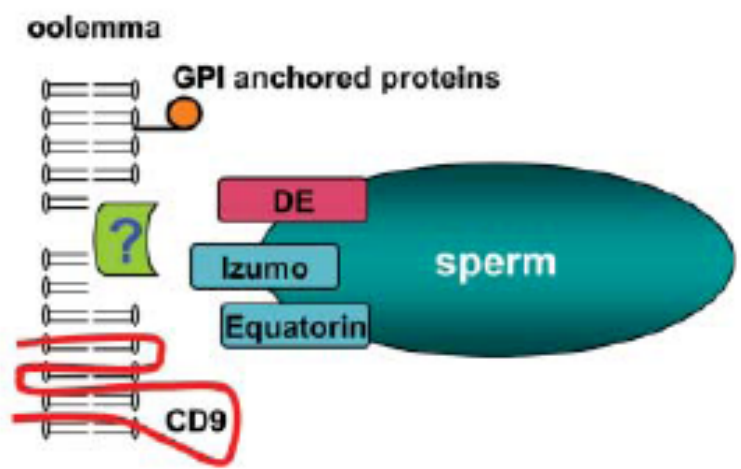




A. Sperm-oolemmal binding



B. Sperm-oolemmal fusion



Schematic diagrams of molecular interactions during the sperm-oolemmal interaction. A) Sperm-oolemmal binding. Sperm ADAMs2 and 3 may stabilize the sperm on the oolemma, and may be able to bind oocyte molecules (integrin $\alpha 6$, $\alpha 9$?). Additionally, SLLP1 acts as a paste to prevent the sperm detaching from the oolemma. B) Sperm-oolemmal fusion. DE originated from seminal plasma, Izumo and/or equatorin may recognize the oolemma and promote sperm-oolemmal fusion. Furthermore, GPI-anchored molecules and CD9 on oocytes support fusion, although the counter-receptors for the candidate molecules have not as yet been identified.