

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Fred Väärtnõu

**Guaniini nukleotiidivahetusfaktori RIC8A lokalisatsioon ja ekspressioon inimese
spermides kapatsitatsiooni protsessis**

Magistritöö

Juhendajad: PhD Tambet Tõnissoo

MSc Merly Saare

TARTU 2013

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. G-valkude vahendatud signaaliülekanne	8
1.2. Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC-8	9
1.2.1. RIC-8 osalemine rakusiseses signaaliülekanDES.....	10
1.2.2. RIC-8 roll rakujagunemises.....	13
1.2.3. RIC-8 kui molekulaarne tsäperon.....	15
1.2.4. RIC-8 ja rakkude migratsioon	15
1.3. Spermatogenees imetajatel	16
1.3.1. Spermiatsioon	20
1.4. Spermide epididümaalne küpsemine	21
1.5. Kapatsitatsioon	22
1.6. Akrosomaalreaktsioon (AR).....	26
1.7. Valgu translatsioon spermis.....	27
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	30
2.1. Töö eesmärgid	30
2.2. Materjal ja meetodika.....	30
2.2.1. Spermide ettevalmistus kapatsitatsiooniks	30
2.2.2. Spermide <i>in vitro</i> kapatsitatsioon	31
2.2.3. Spermide <i>in vitro</i> akrosomaalreaktsioon	31
2.2.4. Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qRT-PCR).....	32
2.2.4.1. Spermidest totaalse RNA eraldamine	32
2.2.4.2. cDNA süntees	33
2.2.4.3. Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qRT-PCR).....	33
2.2.5. Immuunotsütokeemiline analüüs	34
2.2.6. <i>Western blot</i> valguanalüüs	35
2.2.7. Rakkude immuunotsütokeemiline märgistamine ja läbivoolu tsütofluoromeetriline (FAC) analüüs	36

2.2.8. Mikroskoopia ja pilditöötlus.....	37
2.3. Tulemused	38
2.3.1. Geeni <i>RIC8A</i> mRNA suhteline ekspressiooni tase inimese spermides	38
2.3.2. Valgu <i>RIC8A</i> lokalisatsioon ja ekspressioon inimese spermides	38
2.3.2.1. <i>RIC8A</i> immunotsütokeemiline analüüs	38
2.3.2.2. Valgu <i>RIC8A</i> lokalisatsiooni dünaamika spermide kapatsitatsiooni protsessis..	41
2.3.3. Valgu <i>RIC8A</i> kontsentratsiooni kvantitatiivne analüüs kapatsitatsiooni protsessis .	44
2.3.3.2. Läbivoolu tsütofluoromeetiline (FAC) analüüs	45
2.4. Arutelu	47
KOKKUVÕTE	51
SUMMARY	52
TÄNUAVALDUSED.....	53
KIRJANDUSE LOETELU.....	53
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	67
LIHTLITSENTS.....	68

KASUTATUD LÜHENDID

AGS3 - *activator of G-protein signaling 3*

AR – *acrosome reaction* - akrosomaalreaktsioon

AR – *androgen receptor* - androgeeni retseptor

AT1-R – *angiotensin II Type I receptor* - angiotensiin II tüüp I retseptor

BSA – *bovine serum albumin* – veise seerumalbumiin

cAMP – *cyclic adenosine monophosphate* – tsükliline adenosiinmonofosfaat

CP – *chloramphenicol* - klooramfenikool

DAG – *diacylglycerol* - diatsüülglütserool

DAPI - 4,6-diamidino-2-fenüülindool

DAZ - *deleted in azoospermia-associated protein 1*

DEPC - dietüülpürokarbonaat

EGFR - *epidermal growth factor receptor* - epidermaalse kasvufaktori retseptor

ES - *ectoplasmic specialization* - ektoplasmaatiline spetsialiseeritus

ES - *embryonic stem cells* - embrüonaalsed tüvirakud

FAC analüüs – *fluorescence-activated cell analyse*– läbivoolu tsütofluoromeetriline analüüs

FSH - *follicle-stimulating hormone* - folliikuleid stimuleeriv hormoon

GAP – *GTPase-activating protein* – GTPaasi aktiveeriv valk

GDI - *guanosine nucleotide dissociation inhibitors* – guaniini nukleotiidi dissotsiatsiooni inhibiitor

GEF - *guanine nucleotide exchange factor* – guaniini nukleotiidivahetusfaktor

GnRH - *gonadotropin-releasing hormone*

GPCR – *G-protein coupled receptor* - G valkudega seotud retseptor

GPR-1/2 - G protein regulator 1/2

HEPES - *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HPRT - *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase* - hüpoksantiin guaniin fosforibosüül transferaas

HSA – *human serum albumin* – inimese seerumalbumiin

LGN - *G-protein signalling modulator 2*

LH - *luteinizing hormone* - luteiniseerivat hormooni

LHR - *luteinizing hormone receptor* - luteiniseeriva hormooni retseptor

MAP kinaas - *mitogen-activated protein kinase* - mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaasid

NFDM - *non-fat dry milk*

NuMA - *nuclear Mitotic Apparatus Protein*

PAR - *partitioning defective protein*
PBS - *phosphate buffered saline*
PBT – phosphate buffered saline + Tween 20
PFA - paraformaldehüüd
PGC - *primordial germ cells* - ürgsed idurakud
PI3K - *phosphoinositide 3-kinase* - fosfatidüülinositol-3-kinaas
PINS - *partner of inscuteable*
PIP₃ - *Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate* - fosfatidüülinositol-3,4,5-trifosfaat
PKA - *protein kinase A* – proteiinkinaas A
PKC – *protein kinase C* - proteiinkinaas C
PLC – *phospholipase C* - fosfolipaas C
PLD – *phospholipase D* - fosfolipaas D
PP1 γ 2 – *protein phosphatase 1 γ 2* - proteiin fosfataas 1 γ 2
PR – *progesteron receptor* - progesterooni retseptor
RGS - *regulator of G-protein signaling* – G valkude signaliseerimise regulaator
RGS14 – *regulator of G protein signaling 14*
RIC-8 - *Resistance to Inhibitors of Cholinesterase 8*
sAC – *soluble adenylate cyclase* - lahustuv adenüültsüklaas
SCF - *stem Cell Factor*
SDS - *sodium dodecyl sulfate*
SOC - *store-operated calcium*
SSC – *spermatogonial stem cells* - spermatogoonsed tüvirakud
ZP – *zona pellucida*
ZP3 - *zona pellucida glycoprotein 3*
ZP4 - *zona pellucida glycoprotein 4*
ZRK - *zona receptor kinase*
TBC - *tubulobulbar complexes* - tubulobulbaarsed kompleksid
TBS - *tris buffered saline*

SISSEJUHATUS

Elujõulise embrüo arenemise kõige tähtsamaks eelduseks on terved isas- ja emassugurakud. Isassuguraku ehk spermi ja emassuguraku ehk munaraku ühinemine saab teoks vaid juhul kui nende rakkude areng on toimunud normaalsel tingimustel ja selles puuduvad kõrvalekalded. Hälbed sugurakkude normaalses arengus võivad tuleneda nii organismi ümbritsevast keskkonnast, kui olla põhjustatud geneetiliste tegurite poolt. Kõrvalekallete tulemusena võib isasorganismide viljatus väljenduda näiteks vähenenud seemnerakkude huljana ehk oligozoospermiana või seemnerakkude täieliku puudumisena ehk azoospermiana.

Selleks, et sperm suudaks edukalt läbida emassuguteed, jõuda küpse munarakuni ning selle viljastada, peab ta olema suuteline läbima munarakku ümbritseva kiirpärja ehk *cumulus*'e rakud ja rebukesta ehk *zona pellucida*. Selle keerulise teekonna läbimine ja munaraku viljastamine on sõltuv spermi-spetsiifilistest protsessidest nagu kapatsitatsioon ja akrosomaalreaktsioon. Kapatsitatsiooni käigus toimuvad spermides keerulised biokeemilised ja füsioloogilised muutused, mille tulemusena muutub sperm viljastamisvõimeliseks. Peale kapatsitatsioonil toimuvate ümberkorralduste, peab sperm lisaks läbima ka akrosomaalreaktsiooni, mille tulemusena vabanevad spermi peaosas asuvast akrsoomist hüdrolüütilised ensüümid, mis tagavad tema läbitungimise munarakku ümbritsevast rebukestast. Nende protsesside edukaks kulgemiseks peavad omavahel koordineeritult funktsioneerima hulk erinevaid molekulaarseid faktoreid.

RIC-8 on valk, mis toimib organismides guaniini nukleotiidivahetusfaktorina G- valkude α -subühiku suhtes, seondudes GDP vormis oleva $G\alpha$ subühikuga ning stabiliseerides selle üleminekuvormi. Varasemalt on teada, et RIC-8 mängib olulist rolli mitmetes bioloogiliselt tähtsates protsessides nagu näiteks rakujagunemine, singaaliülekanne, närvisüsteemi areng ning rakkude migratsioon. Vaatamata üha uutele avastustele RIC8 funktsiooni kohta erinevates mudelorganismides on hetkel väga vähe teada tema rollist imetajatel. Hiirel on RIC8 olemasolu varajases embrüogeneesis absoluutselt vajalik. RIC8 puudus on embrüonaalselt letaalne. Hilisemas arengus mängib RIC8 rolli närvisüsteemi arengus ja täiskasvanud närvisüsteemis signalisatsiooni regulatsioonis.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida RIC8A valku inimese isassugurakkudes. Täpsemalt kirjeldada RIC-8 valgu inimese homoloogi RIC8A funktsiooni ja ekspressiooni inimese spermides kapatsitatsiooni protsessi käigus.

Magistritöö teoreetilises osas antakse erialase kirjanduse põhjal ülevaade imetajate spermatogeneesist, spermiogeneesist, kapatsitatsioonist ja akrosomaalreaktsioonist. Eraldi

käsitletakse valgu translatsiooni spermides. Lisaks antakse ülevaade GEF RIC-8 peamistest bioloogilistest funktsioonidest erinevates mudelorgansimides.

Magistritöö eksperimentaalses osas iseloomustatakse detailselt RIC8A ekspressiooni ja lokalisatsiooni dünaamikat spermide kapatsitatsiooni protsessi erinevatel etappidel.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. G-valkude vahendatud signaaliülekanne

G-valgud on guaniini nukleotiidi siduvad valgud, mis toimides molekulaarse lülitina vahendavad väliskeskkonnast tulnud signaali ülekannet rakku. G-valkude seondumine guanosiin trifosfaadiga (GTP) muudab valgu aktiivseks ning seondumine guanosiin difosfaadiga (GDP) inaktiveerib valgu. G-valgud omavad sisemist GTP-aasset aktiivsust ning nad võivad esineda monomeerse α - subühikuna või moodustada heterotrimeerse kompleksi, mis koosneb α -, β -, γ - subühikutest (Offermanns, 2003). G- valkude aktiivsust reguleerivad membraanis asuvad G-valkudega seotud retseptorid (GPCR), mis ligandi seondumisel toimivad temaga seondunud G-valgu α -subühiku suhtes guaniini nukleotiidi vahetusfaktorina (GEF). GTP seondumise tagajärjel heterotrimeerne kompleks laguneb, eralduvad $G\alpha$ ning $G\beta\gamma$ - subühikud (Wall jt., 1995), mis osalevad näiteks fosfolipaas C, adenüültsüklaasi, ionikanalite ja teiste signaaliradade komponentide regulatsioonil (Logothetis jt., 1987; Smrcka ja Sternweis, 1993; Hippe jt., 2013). Signaaliülekanne lakkab, kui $G\alpha$ GTP-aasne aktiivsus hüdrolyüsib GTP ülemineku GDP'ks ning inaktiveeritud $G\alpha$ on uuesti võimeline moodustama heterotrimeerse kompleksi $G\beta\gamma$ 'ga.

Paljud GPCR poolt aktiveeritavad heterotrimeersed G-valgud on α - ja γ - subühikute kaudu ankurdatud plasmamembraani sisemise osa külge. Selleks on nende subühikute aminoterminus kovalentselt modifitseeritud müristiinhappe jäägiga (Preininger jt., 2012). Membraanile seostumist võimendab lisaks müristüleerimisele ka tsüsteiinijääkide palmitüleerimine (Evanko jt., 2001).

G-valke klassifitseeritakse vastavalt nende koosseisus oleva α -subühiku aminohappelise järjestuse alusel rühmadesse G_s , G_i , G_q ja G_{12} (Simon jt., 1991). Iga rühm sisaldab endas paljusid erinevaid α - subühiku isovorme. Näiteks $G\alpha_s$ subühikud aktiveerivad adenüültsüklaasi ja Ca^{2+} kanaleid (Watts jt., 2001). Siia rühma kuulub ka haistmisepiteelis ekspresseeruv $G\alpha_{olf}$ (Chan jt., 2011). Laialdaselt ekspresseeritud $G\alpha_i$ subühikud inhibeerivad adenüültsüklaasi ja reguleerivad ionikanaleid. $G\alpha_q$ subühikud aktiveerivad fosfolipaas $C\beta$ (Taylor jt., 1991). G_{12} rühma kuuluvad $G\alpha_{12}$ ja $G\alpha_{13}$ osalevad RhoGEF – Rho signaalirajas, mis kontrollib raku motiilsust (Suzuki jt., 2009).

$G\alpha$ GTP-aasne aktiivsus on reguleeritud RGS (*Regulators of G-protein Signaling*) valkude poolt, mis sisaldavad endas G-valkude vahendatud signalisatsiooni regulaatoridomeeni ning seovad eelistatult $G\alpha$ -GTP vormi (Berman jt., 1996). Nad omavad $G\alpha$ suhtes GTP-aasi aktiveerivat (GAP) aktiivsust, kiirendavad GTP hüdrolyüsi ning sellega ka

signaali lakkamist. Selle tulemusena saab GDP-vormis olev $G\alpha$ alustada uut tsükli (Berman jt., 1996).

1.2. Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC-8

Neuronite tsütoplasmas paiknevat RIC-8 (ka Synembryn, RIC-8A; *Resistance to Inhibitors of Cholinesterase*) valk avastati esmakordselt mudelorganismi *Caenorhabditis elegans*'i mutante uurides, kus kasutati atsetüülkoliinesteraasi inhibiitorina ravimit Aldicarb (Miller jt., 2000). Aldicarb-resistentsete nematoodide geneetilised uuringud näitasid, et RIC-8 on võtmekomponendiks $G\alpha_o$ - $G\alpha_q$ valkude poolt vahendatud neurotransmitterite sekretsioonis. Sarnaselt $G\alpha_q$ ja $G\alpha_s$ mutantsetele nematoodidele on *ric-8* mutantidel liikumine, munemine ja kehapainutusvõime vähenenud (Miller et al., 2000; Schade et al., 2005)

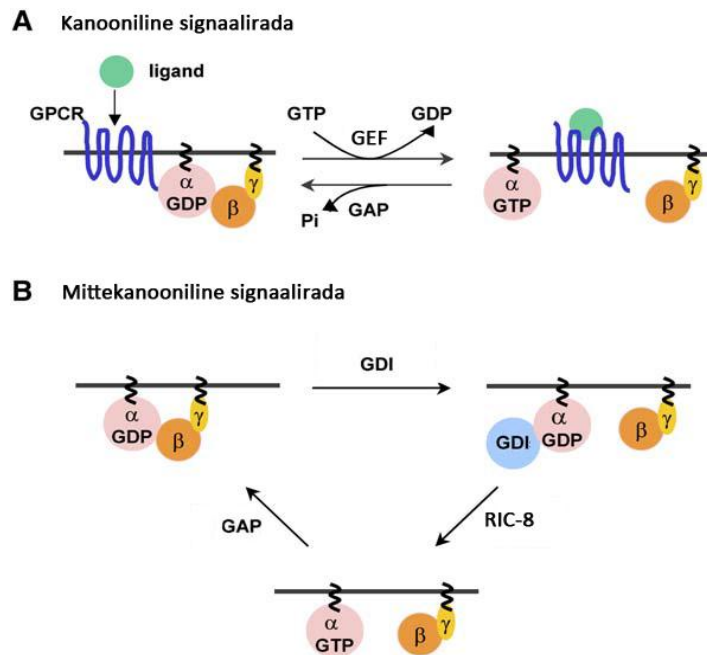
RIC-8 on konserveerunud valk, mis talitleb organismides guaniini nukleotiidivahetusfaktorina (Tall et al., 2003). GEF'id seonduvad inaktiivsete GDP vormis olevate G-valkudega ja stimuleerivad neis GDP vabanemise, stabiliseerides sellega $G\alpha$ subühiku nukleotiidivaba üleminekuvormi (Coleman jt., 1994). Multifunktsionaalne RIC-8 osaleb mitmetes bioloogilistes protsessides, nagu signaali-ülekanne (Miller jt., 2000; Malik jt., 2005; Reynolds jt., 2005; Schade jt., 2005; Nishimura jt., 2006; Wang jt., 2007; Fenech jt., 2009; Oner jt., 2013), rakujagunemine (Miller ja Rand, 2000; Afshar jt., 2004; Couwenbergs jt., 2004; Afshar jt., 2005; David jt., 2005; Hampoelz jt., 2005; Wang jt., 2005; Woodard jt., 2010), varane areng (Nagayoshi jt., 2008; Tõnissoo jt., 2010; Kanasaki jt., 2013), närvisüsteemis (Tõnissoo jt., 2003; Vellano jt., 2010; Maldonado-Agurto jt., 2011), rakkude migratsioonis (Wang jt., 2011), adhesioonis (Amoureux jt., 2012 ; Ma jt., 2012) ning lisaks funktsioneerib ka G-valkude molekulaarse tsaperonina (Gabay jt., 2011; Thomas jt., 2011; Chan jt., 2013).

Imetajates on kirjeldatud kaks RIC-8 ortoloogi - RIC8A ja RIC8B. RIC8B omab sarnaselt RIC8A'ga retseptor-sõltumatut GEF aktiivsust, seondues monomeersete GDP-vormis olevate $G\alpha$ -subühikutega ja katalüüsides neis nukleotiidivahetust. Erinevalt RIC8A'st, mis omab GEF aktiivsust $G\alpha_{i/o/q/12/13}$ - subühikute suhtes, katalüüsib RIC8B nukleotiidivahetust $G\alpha_{s/q/olf/13}$ - subühikute suhtes (Tall jt., 2003; Chan jt., 2011). RIC8B ja $G\alpha_{olf}$ ekspresseeruvad mõlemad sellistes aju piirkondades nagu *striatum*, *nucleus accumbens*, haistekõrvestes ning haistmisepiteelis (Von Dannecker jt., 2005; Chan jt., 2011). Olfaktoorne signaaliülekanne käivitub, kui olfaktoorses neuronites toimub lõhnamolekuli seondumine retseptoriga. Retseptori aktiveerimisel seondub sellega spetsiifiline $G\alpha_{olf}$ valk, mis omakorda aktiveerib adenüültsüklaasi (Buck, 2000). RIC8B funktsioneerib selles

signaalirajas signaali võimendajana, aktiveerides $G\alpha_{olf}$ valku ja soodustades sellega cAMP tootmist (Von Dannecker jt., 2005).

1.2.1. RIC-8 osalemine rakusiseses signaaliülekanandes

G-valkude vahendatud signaaliülekannderajad jaotatakse vastavalt mehhanismile kanooniliseks ja mittekanooniliseks signaalirajaks. Kanooniline G-valgu vahendatud signaaliülekanne toimub membraani seitse korda läbiva G-valguga seotud retseptori (GPCR) vahendusel, kus ligandi seondumine käivitab retseptori GEF aktiivsuse, mis põhjustab G-valgu α -subühikuga seotud GDP ülemineku GTP vormi ja dissotsieerumise $G\beta\gamma$ heterodimeerist (Neer, 1995). Eraldunud subühikud seonduvad järgmiste efektormolekulidega ja vahendavad sellega signaaliülekanne. Seejärel hüdrolüüsib $G\alpha$ - subühiku sisemine GTP-aasne aktiivsus GTP ja tekkinud $G\alpha$ -GDP assotsieerub uuesti $G\beta\gamma$ dimeeriga, moodustub $G\alpha$ -GDP- $G\beta\gamma$ kompleks ning signaaliülekanne lakkab (joonis 1A). Mittekanooniline signaaliülekanne toimub retseptor-sõltumatult, kus $G\alpha$ -subühiku nukleotiidivahetust viivad läbi tsütoplasmaatilised GEF aktiivsuset omavad valgud (joonis 1B). Üheks selliseks valguks on RIC-8, mis seondub GDP vormis oleva $G\alpha$ -subühikuga. RIC-8 GEF aktiivsus aitab vabastada GDP, tekitades stabiilse nukleotiidivaba ülemineku kompleksi kuni GTP seondumiseni, mis omakorda vabastab RIC-8 kompleksist ja aktiveerib uuesti $G\alpha$ (joonis 1B; Tall jt., 2003; Tall ja Gilman, 2004; Wilkie ja Kinch, 2005; Fenech jt., 2009). Kuna Ric-8A ei tunne ära heterotrimeereses olekus $G\alpha$ -GDP'd, siis ta otseselt ei konkureeri G-valk seoselise retseptoriga (Tall jt., 2003). GEF RIC-8 võib toimida G valkude poolt vahendatud signaali võimendajana. Seondudes monomeerse $G\alpha$ -GDP'ga enne heterotrimeerse $G\alpha$ -GDP- $\beta\gamma$ kompleksi tekkimist ja signaali lõpetamist, reaktiveerib RIC-8 $G\alpha$ pikendades ja võimendades üksiku G-valgu poolt vahendatud signaali (Tall jt., 2003). Hiire maitserakkudes on näidatud, et RIC-8 interakteerub otseselt $G\alpha$ -gustduktiini ja $G\alpha_{i2}$ 'ga, võimendades hTas2R16 (*Human receptor for bitter tastant salicin*) signaali transduktsiooni (Fenech jt., 2009). RIC-8 imetajate homoloogi RIC8A sarnast rolli signaalivõimendajana on näidatud $G\alpha_q$ -seotud GPCR- vahendatud signaaliülekanandes intaktsetes inimese 293T rakkudes (Nishimura jt., 2006).

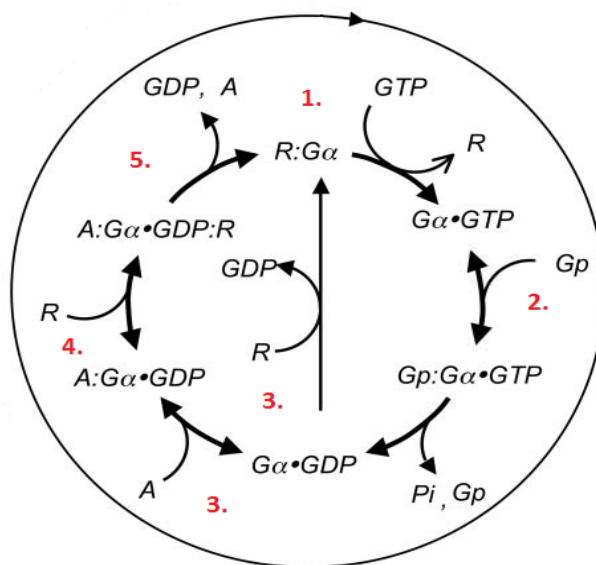


Joonis 1. Kanooniline ja mittekanooniline G- Valkude poolt vahendatud signaalirada. A. Kanoonilises signaalirajas aktiveeritakse heterotrimeerne G- Valk ligandi seandumisel GPCR'ga retseptori GEF aktiivsuse poolt. Gα GTP-aasset aktiivsust aktiveerivad GAP valgud. B. Mittekanoonilises signaalirajas aktiveeritakse heterotrimeerne G- Valk retseptor- sõltumatult. GDI valgud seonduvad Gα-GDP'ga ning α-subühiku aktiveerimist viib läbi GEF aktiivsust omav RIC8. Gα GTP-aasset aktiivsust aktiveerivad GAP valgud. Lühendid: GPCR, G- Valk seotud retseptor; GEF, guaniini nukleotiidivahetusfaktor; GAP, GTPaasi aktiveeriv Valk; GDI, guaniini nukleotiidi dissotsiatsiooni inhibiitor (modifitseeritud Yu jt., 2006 järgi).

Retseptor-sõltumatu G- Valkude vahendatud signalisatsiooni ülekande regulaatorid, nagu näiteks imetajate Valk LGN (*G-protein signalling modulator 2*) (Mochizuki jt., 1996) ja selle paraloog AGS3 (*Activator of G-protein signaling 3*), talitlevad guaniini dissotsiatsiooni inhibiitoritena (GDI), seondades GDP vormis oleva Gα-subühiku ning aktiveerides sellega Gβγ-vahendatud signaaliülekanne (joonis 1). Need valgud sisaldavad amino-terminuses tetratrikopeptiid-kordusi (TPR), mis vahendavad Valk-Valk interaktsioone, ja karboksü-terminuses G-Valgu reguleerivaid (GPR) ehk GoLoco kordusi, mille vahendusel toimub seondumine G- Valkude α-subühikuga (Peterson jt., 2000; Adhikari ja Sprang, 2003).

Kasutades rekombinantseid valke, on leitud, et Ric8A katalüüsib nukleotiidivahetust Gα_{i1}-GDP-AGS3 kompleksist. Kusjuures Ric8A on võimeline seonduma nii Gα_{i1}-GDP kui ka AGS3-Gα_{i1}-GDP kompleksidega (joonis 2; Thomas jt., 2008). Ric8A vahendatud Gα_{i1}-subühiku guaniini nukleotiidi seondamistsükkel toimub viie-astmelise mudeli järgi: 1) GTP lisandumisel Ric8A-Gα_{i1} kompleksile moodustub Gα_{i1}-GTP ja vaba Ric8A (Joonis 2¹); 2) järgnevalt toimub GAP Valgu seondumine ja GTP hüdrolyüs, GAP Valk eraldub, mille tulemusena tekib Gα_{i1}-GDP (Joonis 2²); 3) Gα_{i1}-GDP kompleks seondab AGS3 või Ric8A

(kui toimub seondumine Ric8A'ga, siis algab tsükkel uuesti esimesest etapist; joonis 2³); 4) vaba Ric8A seondub AGS3-Gα_{i1}-GDP kompleksiga (joonis 2⁴); 5) kolmikkompleks laguneb, Ric8A katalüüsib GDP vabanemise ning moodustub uuesti Ric8A-Gα_{i1} kompleks (Joonis 2⁵; Thomas jt., 2008).



Joonis 2. Retseptor-sõltumatu Ric8A vahendatud Gα_{i1}- subühiku guaniini nukleotiidi seondamise ja hüdroolüüsi tsükkel. Tsüklis osalevad G₁₁ (Gα), Ric8A (R), AGS3 (A) ja GAP (Gp). Kineetiliselt pöörduvad reaktsioonid on näidatud kahesuunalise noolega (modifitseeritud Thomas jt., 2008 järgi).

RIC-8 seondumispartner RGS14 valk omab kahte Gα'ga seondumise domeeni: RGS domeeni, mis kiirendab aktiveeritud Gα_{i/o}- subühikute GTP hüdroolüüsi ja GPR domääni, mis moodustab kompleksi inaktiivsete Gα_{i1/3}- subühikutega (Traver jt., 2000; Hollinger jt., 2001; Vellano jt., 2011). RGS14 valgu puhul on näidatud selle osalemine nii kanoonilises GPCR kui ka mittekanoonilises G-valk vahendatud signaalirajas (Vellano jt., 2011). Agonisti seondumisel GPCR retseptoriga dissotsieerub GPCR-Gα_i-RGS14 kompleksist RGS14-Gα_i. Seda protsessi aitab vahendada RIC8A, mis dissotsieerib aktiveeritud retseptorist Gα_{i1} olemasolul RGS14 valgu, moodustub RIC8A – Gα_i-GDP kompleks ning indutseeritakse Gα nukleotiidivahetus (Vellano jt., 2011). Mittekanoonilises retseptor-sõltumatus signaalirajas moodustab RGS14 plasmamembraanis GPR motiivi vahendusel kompleksi Gα_i-subühikuga, mille tunneb samuti ära RIC8A, mis dissotsieerib kompleksi ning indutseerib Gα-GDP vahetuse (Vellano jt., 2011).

1.2.2. RIC-8 roll rakujagunemises

Asümmeetriline rakujagunemine on protsess, mis on vajalik erinevate rakutüüpide tekkeks. Selle toimumiseks on vajalik raku saatust määravate determinantide ebavõrdne jaotumine tütarakkudesse. Need määrava tähtsusega regulaatorvalgud otsustavad rakkude edasise differentseerumise suuna. Mitoosi faasis olevas rakus määrab determinantide erineva jaotuse tütarakkude vahel jagunemistasapinna ja mitoosikävi korrektne paigutus (Hawkins ja Garriga, 1998). GPR-1/2 ja Pins (*Partner of Inscuteable*) on valgud, mis sisaldavad GPR/GoLoco motiivi ja reguleerivad retseptor-sõltumatut G-valk vahendatud signaaliülekannet asümmeetrilises rakujagunemises vastavalt *C. elegans*'i embrüos ja *D. melanogaster*'i neuroblastis (Schober jt., 1999; Afshar jt., 2004). Imetajates on kirjeldatud mikrotoobuleid seondav valk NuMA (*Nuclear Mitotic Apparatus Protein*) ning sellega seonduv LGN, mis moodustavad kompleksi $G\alpha_i$ 'ga (Woodard jt., 2010). Lisaks nendele valkudele on asümmeetrilisel rakujagunemisel oluliseks regulaatoriks ka $G\alpha$ 'ga seonduv GEF RIC-8.

RIC-8 ja GOA-1($G\alpha_o$) osalemist tsentrosoomi vahendatud mitoosikävi korrektse orientatsiooni tagamisel näidati esmakordselt *C. elegans*'i varajases embrüogeneesis (Miller ja Rand, 2000). Couwenbergs jt. (2004) näitasid, et kui *wild-type C. elegans*'i 1-rakulise embrüo mitoosikääv omab asümmeetrilist morfoloogiat, siis *ric-8* mutandis oli käävi korrektne positsioneerimine häiritud, mille tõttu toimus sümmeetriline rakujagunemine (Couwenbergs jt., 2004). *C. elegans*'i embrüo esimesel rakujagunemisel on mitoosikävi paigutus anteriorse-posterioorse telje suhtes asümmeetriline (Afshar jt., 2004). Selline asümmeetria on põhjustatud käävipoolustele mõjuvatest erinevatest tõmbejõududest, kus tugevam tõmbejõud mõjub posterioorse pooluse suunas (Grill jt., 2001). On näidatud, et kääviniitide tõmbejõud *C. elegans*'i embrüos on PAR (*partitioning-defective*) valkude kontrolli all (Grill jt., 2001) ning selle reguleerimises osalevad GOA-1 ning GPR-1/2 (Gotta jt., 2003; Srinivasan jt., 2003). *C. elegans*'i *ric-8* mutantsetel isenditel on mitoosikävile mõjuvad tõmbejõud vähenenud (Colombo jt., 2003; Couwenbergs., 2004; Afshar jt., 2004; Afshar jt., 2005). Nematoodi RIC-8 interakteerub eelistatult just GDP vormis oleva GOA-1 valguga (Couwenbergs jt., 2004). Sellest järeldub, et RIC-8 osaleb käävi positsioneerimises muutes $G\alpha$ aktiivsust. Valkude lokaliseerimise määramisel selgus, et nii RIC-8 kui GOA-1 lokaliseeruvad raku korteksisse ja käävi piirkonda, RIC-8 lisaks tsentraalkäävi ning GPR-1/2 tuumaümbrisesse ja kromatiini ümbrusesse (Afshar jt., 2004; Couwenbergs jt., 2004). *ric-8* mutantides ei ole võrrelduna *wt* nematoodidega GPR-1/2 asümmeetriliselt paigutunud ning lisaks ka nende valkude tase oli nii anteriorises kui ka posterioorses korteksis vähenenud. See

näitab, et aktiivses vormis $G\alpha$ on vajalik GPR-1/2 asümmeetrilise paigutuse jaoks (Couwenbergs jt., 2004).

Äädikakärbses *Drosophila melanogaster* on asümmeetriline rakujagunemine tagatud Par valkude, G-valkude ja GPR/GoLoco motiivi sisaldavate valkude poolt (Wodarz ja Huttner, 2003). GPR/GoLoco motiivi vahendusel $G\alpha_i$ 'ga seondub GPR-1/2 homoloog Pins (Shaefer jt., 2001). *Drosophila* neuroblasti apikaalses rakukorteksis moodustavad asümmeetrilise rakujagunemise regulaatorvalgud kaks kompleksi: anterioorselt lokaliseeruv Pins- $G\alpha_i$ ning posterioorses osas Baz-Par6-DaPKC (Bellaiche jt. 2001). RIC-8 interakteerub $G\alpha_i$ -GDP'ga ja aktiveerib selle, samas kui $G\beta\gamma$ tagab $G\alpha_i$ ning Pins valkude paiknemise apikaalses korteksis, kus need tagavad asümmeetrilise käävi moodustumise (Hampolez jt., 2005; Wang jt., 2005). Jagunevas sensoorsetes eellasrakkudes (pI rakkudes) on RIC-8 vajalik Pins, Baz ja Numb valkude asümmeetriliseks lokaliseerimiseks ning mitoosikäävi korrektseks orienteerimiseks (David jt., 2005). Pins valgu *knock-out* tagajärjel on ebakorrekne nii determinantide jaotus rakus kui ka käävi moodustumine (Yu jt., 2000; Schaefer jt., 2001). Samuti on näidatud, et $G\alpha_i$ üleekspressioon inhibeerib determinantide asümmeetrilist paigutust ja põhjustab mitoosikäävi ebakorrekset orientatsiooni (Schaefer jt., 2001). Asümmeetrilisel rakujagunemisel reguleeritakse mitoosikäävi orientatsiooni antero-posterioorse suuna ja epiteliaalse tasandi suhtes. *D. melanogaster*'i sensoorsetes eellasrakkudes (pI rakkudes) on need kaks orientatsiooni kontrollitud kahe omavahel vastanduva jõu balansseerimisega, kus Frizzled (Fz) valgu aktiivsus orienteerib käävi piki antero-posteriorset telge ning RIC-8, Pins ning $G\alpha_i$ -sõltuv aktiivsus orienteerib käävi paralleelseks epiteliaalse tasapinnaga (David jt., 2005). RIC-8 on vajalik ka $G\alpha_i$ ja $G\beta 13F$ valkude kortikaalseks lokaliseerimiseks nii pI kui ka epiteliaalsetes rakkudes (David jt., 2005).

Imetaja mitootilises rakus reguleerivad tsentrosoomidele mõjuvaid mikrotuubulite tõmbejõude GPR/GoLoco domääni sisaldav LGN valk, LGN'i ja mikrotuubuleid seondav valk NuMA ning $G\alpha_i$ -subühik. Need valgud moodustavad omavahel kompleksi $G\alpha_i$ -LGN-NuMA, mille suhtes omab olulist reguloorset rolli imetajate RIC-8 ortoloog RIC8A (Woodard jt., 2010). *In vitro* tunneb imetajate RIC8A ära GDP vormis oleva $G\alpha_{i1}$, mis on moodustanud kompleksi kas LGN või AGS3 valguga. Vaatamata sellele, et GDP vormis olev $G\alpha_{i1}$ on seotud GDI'ga, suudab RIC8A kompleksi dissotsieerida ning aktiveerida $G\alpha_{i1}$ -subühiku (Tall ja Gilman, 2005; Thomas jt., 2008). Mitoosis on LGN valgu aminotermiinaalne osa seotud NuMA valguga ja karboksü-terminaalne osa GDP- $G\alpha_i$ 'ga ning trimolekulaarne kompleks on lokaliseerunud raku korteksisse. Seendumisel mikrotuubulitega omab NuMA mikrotuubulite suhtes stabiliseerivat toimet, kuid seendumisel LGN'ga tema stabiliseeriv toime kaob (Du jt., 2001; Kisurina-Evgenieva jt., 2004). Korteksis aktiveerib

RIC8A $G\alpha_i$, mille tulemusena vabanevad kompleksist nii GTP- $G\alpha_i$ kui ka NuMA. Seega on rakujagunemisel astraalsetele mikrotuubulitele mõjuvad jõud reguleeritud NuMA dünaamilise vabastamisega nende plasmamembraanile või tsentrosoomile kinnitumise piirkonnas (Du jt., 2001; Du ja Macara, 2004; Tall ja Gilman, 2005; Nipper jt. 2007). RIC8A olulisust mitoosikävi positsioneerimisel on näidatud ka imetaja HeLa ja MDCK rakukultuurides (Woodard jt., 2010). $G\alpha_i$ -LGN-NuMA kompleksi paigutumine käävipooluste naabrusesse raku korteksisse on RIC8A puudulikes rakkudes häiritud, mistõttu on mitoosikävi orientatsioon ebakorrekne (Woodard jt., 2010). Lisaks on RIC8A puudulikes rakkudes võrreldes kontrolliga vähenenud mitoosikävi liikumine ja selle tõttu pikenenud ka mitoosi läbimise aeg (Woodard jt., 2010).

1.2.3. RIC-8 kui molekulaarne tšaperon

RIC-8 omab raku tšaperoni funktsiooni. *C. elegans*'i mutantide puhul on näidatud, et RIC-8 hulga vähenemine kahandas märgatavalt ka GPA-16 ($G\alpha_i$) valgu hulka, mis viitab RIC-8 võimalikule funktsioonile molekulaarse tšaperonina (Afshar jt., 2004). RIC-8 tšaperoni funktsiooni on näidatud ka äädikakärbses, kus G-valgu mRNA translatsioon oli soodustatud RIC-8 poolt (Wang jt., 2005). Katsetes rakuwabade translatsioonisüsteemidega (küüliku retikulotsüüdi lüsaat, nisuidu ekstrakt) on näidatud, et RIC8A stimuleerib korrektse konformatsiooniga ja funktsionaalsete $G\alpha_{i/q/13}$ subühikute produtseerimist (Chan jt., 2013). Lisaks on näidatud, et RIC8A osaleb otseselt posttranslatsioonilises $G\alpha$ subühikute pakkimises soodustades sellega G-alkude biosünteesi (Gabay jt., 2011; Thomas jt., 2011; Chan jt., 2013).

1.2.4. RIC-8 ja rakkude migratsioon

RIC-8 osalemist rakkude migratsioonis on näidatud nii hiire embrüonaalsetes fibroblastides (MEF) kui ka inimese rinnavähi MDA-MB-231 rakkudes (Wang jt., 2011). Kasvufaktorid indutseerivad rakkudes dünaamiliste struktuuride nagu dorsaalsete membraanikurdude (*dorsal ruffle*) ja membraansete jätkete ehk lamellipoodide tekke (Krueger jt., 2003). Nende moodustumise tagab aktiini tsütoskeleti reorganiseerumine, mille tulemusena muutub staatiline rakk motiilseks (Krueger jt., 2003). Kui normaalses raku moodustusid trombotsüütidest-pärit kasvufaktoriga (PDGF) indutseerimisel peale dorsaalsete membraanikurdude kadumist perifeersed membraansed jätked, siis *Ric8A knock-out* rakkudes oli see üleminek märgatavalt hilinenud (Wang jt., 2011). Samuti oli *RIC8A knock-out* MEF ja

rinnavähi MDA-MB-231 rakkude migratsioonivõime nii PDGF'ga kui ka epidermaalse kasvufaktoriga (EGF) indutseerimisel puudulik (Wang jt., 2011). Kokkuvõtvalt leiti, et RIC8A osalemine migratsioonis toimub järgmise skeemi järgi: kasvufaktorite, nagu PDGF tulemusena tõuseb RIC8A GEF aktiivsus. RIC8A reguleerib $G\alpha_{13}$ translokatsiooni raku korteksisse ning aktiveerib selle. Aktiveeritud $G\alpha_{13}$ reguleerib dorsaalsete membraanikurdude ülemineku perifeerseteks lamellipoodideks, mille tulemusena saab rakk migreeruda (Wang jt., 2011).

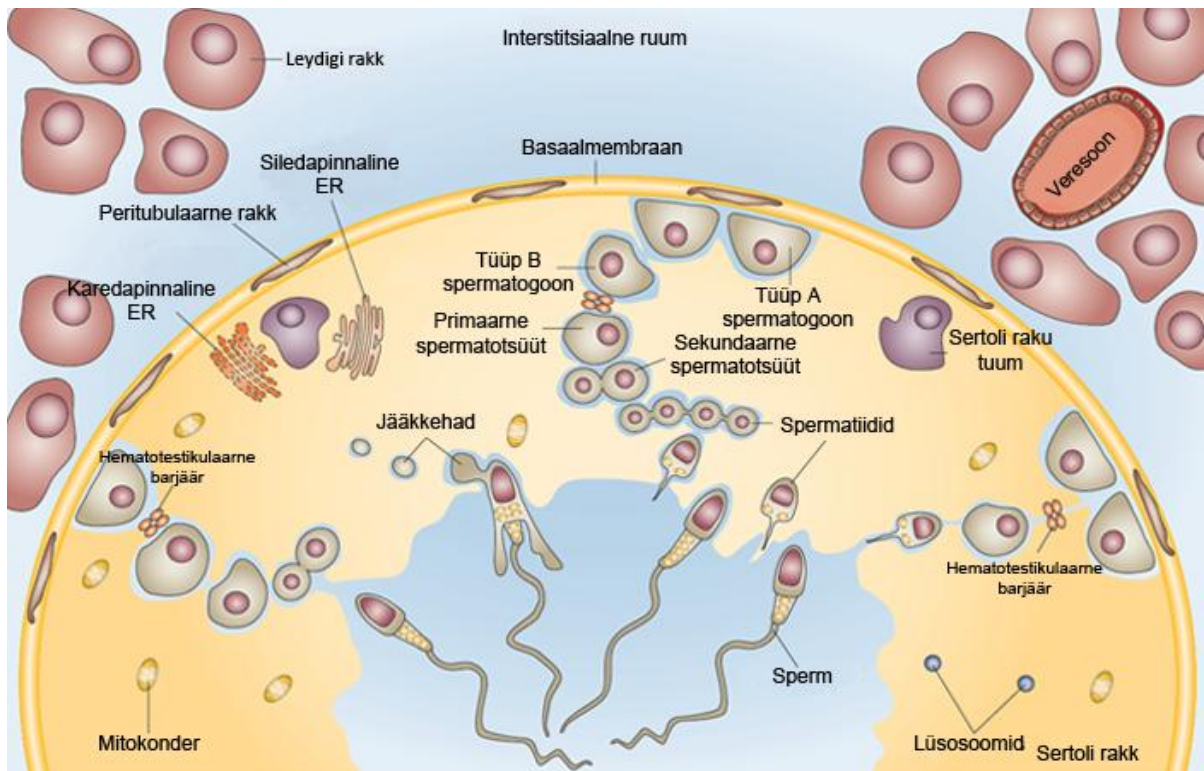
1.3. Spermatogenees imetajatel

Üldjoontes on erinevate imetajate spermatogenees ehk isassugurakkude areng väga sarnane, kõrgelt organiseeritud protsess, mille kompleksne endokriinne ning genoomne regulatsioon on tagatud somaatiliste rakkude poolt. Spermatogeneesi lõppeesmärgiks on mobiilsete ning kompaksete rakkude tootmine, mis on spetsialiseerunud ühinema munarakuga ning selle viljastama. Spermide arenemine toimub testise parenhüümi moodustavates väänilistes seemnetoruketes, mille käigus areneb vähese spetsialiseeritusega diploidsest spermatogoonist kõrgelt spetsialiseerunud motiilne haploidne sperm (joonis 3). Spermatogenees hõlmab endas paljunemist, kasvamist, küpsemist ja transformatsiooni ehk spermiogeneesi. Spermatogeneesi lõppedes liiguvad küpsed spermid munandimanusesse ehk epididüümis, kus toimub nende lõplik küpsemine. Lisaks saavutatakse spermatogeneesis soo-spetsiifiline DNA metülatsioonimuster, mis tagab alleelspetsiifilise imprintitud geenide ekspressiooni somaatilistes rakkudes (Wistuba jt., 2007).

Spermatogenees saab alguse primordiaalistest idutee rakkudest (PGC), mis peale migreerumist testistesse arenevad spermatogoonideks. PGC'd sünteesivad parakriinset faktorit prostaglandiin D2, mis indutseerib embrüonaalse emasgonaadi tugirakkude arengu Sertoli rakkudeks (Adams ja McLaren, 2002). Spermatogenees saab alata vaid siis, kui spermatogoonsed tüvirakud hakkavad diferentseeruma ning uute rakukloonide tootmiseks mitootiliselt jagunema (Hess jt., 2006). Spermatogoone on kahte liiki: tüüp A ja tüüp B spermatogoonid (joonis 3). Tüüp A spermatogoonid jaotatakse omakorda tiheda tsütoplasma ja suure ovaalse tuumaga diferentseerumata A1 spermatogoonideks, mille üheks ülesandeks on enese taastootmine ja sellega spermatogoonsete tüvirakkude (SSC) populatsiooni säilitamine. Lisaks panevad nad aluse A2 spermatogoonidele, mis hakkavad diferentseeruma ja arenevad esmalt tüüp B spermatogoonideks ning edasi primaarseteks spermatotsüütideks (joonis 3). Primaarsed spermatotsüüdid teevad läbi I meiootilise rakujagunemise, mille tulemuseks on sekundaarsed spermatotsüüdid, mis omakorda läbivad II meiootilise

jagunemise, mille tulemuse saadakse haploidse genoomiga spermatiidid (joonis 3). Spermatiidid läbivad transformatsiooni, kus nende DNA kondenseerub, väheneb tsütoplasma hulk, moodustub akrosoom ning toimub ümarate rakkude elongeerumine piklikeks. Selle tulemusena arenevad spermatiididest küpsed spermid, mis koosnevad pea- ja vaheosast ning viburist (joonis 3). Spermide vabanemist Sertoli rakkudest seemnetorukese valendikku nimetatakse spermiatsiooniks (de Rooij ja Russell, 2000).

Väänilised seemnetorukesed sisaldavad endas tugi- ehk Sertoli rakke ning spermatogeense epiteeli rakke (joonis 3). Sertoli rakud algavad laia alusega seemnetorukeste basaalmembraanilt moodustades sellega seemnetorukeste hematotestikulaarse barjääri ning ulatuvad tsütoplasmarikaste jätketega seemnetorukeste valendikuni (joonis 3). Lisaks idurakkude arengut toetavale funktsioonile on neil tähtis roll ka väljastpoolt seemnetorukesi tulevate androgeensete signaalide vahendamisel arenevatele idurakkudele (Sharpe jt., 2003). Erinevates arenguastmes spermatogeensed rakud asuvad kihiti tugirakkude vahel ning nende areng toimub seemnetorukese perifeeriast valendiku suunas. Muutused seemnetorukeste iduepiteeli kindlas paigas moodustavad spermatogeense epiteeli tsükli, mis koosneb raku arenguastmete spetsiifilisest kombinatsioonist ning näiteks inimesel koosneb kuuest staadiumist (Hess ja Chen, 1992). Seemnetorukeste mitmekihilises sidekoelises seinas asuvad peritubulaarsed rakud ning seemnetorukeste vahel asuvas veresoonerikkas intertubulaarses sidekoes paiknevad interstitsiaal- ehk Leydigi rakud (joonis 3). Peritubulaarsed rakud on müoidsed rakud, mis tekitavad seemnetoruketes peristaltika mille tagajärjel elongeerunud, kuid mittemotiilsed spermid vabanevad Sertoli rakkudest ja liiguvad epididümisesse (Bressler ja Ross, 1972). Samuti vahendavad peritubulaarsed rakud Sertoli ja Leydigi rakkude vahelist kommunikatsiooni. Leydigi rakud vastutavad androgeenide, prostaglandiinide, angiotensiini ja oksütotsiini sünteesi eest (Khanum ja Dufau, 1988; Einspanier ja Ivell, 1997; Svechnikov jt., 2010). Lisaks paiknevad interstiitsiumis veel makrofaagid, lümfotsüüdid, nuumrakud ja fibroblastid (Hussein jt., 2005).



Joonis 3. Spermatogenees. Spermatogenees on protsess, mille tulemusena moodustuvad diploidsetest spermatogoonidest haploidsed küpsed isassugurakud ehk spermid. Seemnetorukeste epiteel koosneb Sertoli rakkudest ja erinevates areguastmetes olevatest idurakkudest. Leydigi rakud ja veresooned asuvad interstiitsiumis. Sertoli rakud kinnituvad basaalmembraanile, kuhu on kinnitunud ka spermatogoonid. Tüüp A spermatogoonid jagunevad ja arenevad tüüp B spermatogoonideks, mis sisenevad meioosi profaasi ning diferentseeruvad primaarseteks spermatotsüütideks. Primaarsed spermatotsüüdid läbivad meioosi I jagunemise, mille tulemusena saadakse haploidsed sekundaarsed spermatotsüüdid. Meioosi II jagunemise tulemusena saadakse spermatiidid, mis eloneeruvad ja vabanevad küpsete spermidena seemnetorukeste luumenisse (modifitseeritud Rato jt., 2012 järgi).

Spermatogenees on reguleeritud mitmete geenide poolt ning mutatsioonid nendes geenides võivad põhjustada erinevates etappides kogu protsessi peatumise. Spermatogeneesi peatumine näiteks spermatogooni staadiumis võib olla põhjustatud mutatsioonidest geenides, mis kodeerivad membraanset retseptorit c-kit (Yoshinaga jt., 1991; Ohta jt., 2000) ning vastavaid c-kit'i ligande- tüviraku faktor (SCF) (Ohta jt., 2000) ning ERM (*Ets-related molecul*) (Hess jt., 2006), mis on olulised spermatogoonide diferentseerumisel. Spermatotsüütide meiootilises jagunemises mängib olulist rolli CDC25, mille puudumine inimese testises võib esile kutsuda azoospermia (Luetjens jt., 2004). Spermatiidide arengus on tähtis transkriptsioonifaktor *CREM* (*cAMP response element modulator*) ekspressioon idurakkudes ja Sertoli rakkudes, mis on vahendatud folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) poolt (Weinbauer jt., 1998; Wistuba jt., 2002). Lisaks on näidatud, et varajases spermatogeneesis on vajalikud *DAZ* ja *DAZ-like* geenide produktid (Dann jt., 2006).

Muutused geeniekspressioonis võivad viia olukorrani, kus seemnetorukestes esinevad vaid Sertoli rakud ning puuduvad idurakud (Jain ja Halder, 2012).

Spermatogenees on reguleeritud kompleksse endokriinse süsteemi poolt milles osalevad aju, hüpotaalamus, hüpofüüs ja gonaadid. Gonadotropiini vabastava hormooni (GnRH) sekretsiooniks hüpotaalamusest on vajalik ajus Kiss-1⁺ neuronitest kisspeptiini vabanemine (Gottsch jt., 2004). GnRH stimulatsioonil hakatakse hüpofüüsist sekreteerima folliikuleid stimuleerivat hormooni (FSH) ja luteiniseerivat hormooni (LH). FSH omakorda stimuleerib spermatogeneesi mõjudes Sertoli rakkudele (Simoni jt., 1997). FSH mõjutab Sertoli rakkudes väga paljusid signaaliradu, osaledes näiteks cAMP (cyclic AMP)-PKA (*protein kinase A*), MAP kinaasi (*mitogen-activated protein kinase*), fosfatidüülinositol 3 kinaasi, fosfolipaaas A2 ja kaltsiumi signaalirajas (Walker ja Cheng, 2005). LH indutseerib Leydigi rakke tootma testosterooni, mis on isassoo kujunemisel tähtsaim hormoon (Keeney jt., 1990). Tõstes LH sekretsiooni taset stimuleerib hüpofüüs LH-retseptori (LHR) vahendusel Leydigi rakke tootma testosterooni ning selle tagajärel kasvab spermide produktsioon. Lisaks spermatogeneesi parakriinse modulaatori funktsioonile, reguleerib testosteroon organismis paljude organite arengut ja talitlust. Androgeenid testosteroon ja DHT (dihüdrottestosteroon) seonduvad androgeeni retseptori (AR) vahendusel Sertoli rakkudega initsieerides ning hoides alal spermatogeneesi (Chang jt., 2004). On näidatud, et Sertoli rakkude AR *knock-out* hiirtel toimub spermatogenees kuni esimese meiootilise jagunemiseni (Tsai jt., 2006), kuid funktsionaalse AR'i puudumisel Leydigi rakkudes toimub hiirel spermatogeneesi arest spermatiidi tasemel (Tsai jt., 2006). Androgeenide käivitatud signaalid Sertoli rakkudes aitavad neil säilitada oma morfoloogiat, on vajalikud basaalmembraani arenguks ning tagavad seemnetorukeste epiteeli terviklikkuse (Wang jt., 2006). Samuti on idurakkude arenguks vajalikud testosterooni stimulatsioonil Sertoli rakkude poolt sekreteeritavad valgud ja peptiidid (Wang jt., 2006).

Üheks spetsiifiliseks protsessiks spermatogeneesis on transitsiooni valkude (TP) vahendatud histoonide väljavahetamine protamiinidega ja sellega täiendava DNA kondenseerumise saavutamine. On näidatud, et transitsiooni valkude puudumisel on DNA transkriptsioon represseritud, kromatiini kondenseerumine häiritud ning esinevad DNA katked, mille tagajärjeks on defektsed spermid ja steriilsus (Zhao jt., 2004).

1.3.1. Spermiatsioon

Spermiatsiooniks nimetatakse küpsete spermatiidide vabanemist Sertoli rakkude seemnetorukeste valendikku. Näiteks rotil algab spermiatsioon spermatogeneesi VII staadiumis (vastab inimese II staadiumile), lõpeb VIII staadiumis ning kestab ligikaudu 81,9 tundi (O'Donnell jt., 2011). Selle protsessi käigus toimuvad ulatuslikud muutused spermatiidi ehituses ning spermiatsioon lõpeb spermatiidide tsütoplasma fagotsüteerimisega Sertoli rakkude poolt ja nende vabanemisega seemnetorukeste luumenisse.

Spermiatsiooni käigus toimuvad ümberkorraldused nii spermatiidi tuumas kui ka tsütoplasmas ning toimub Sertoli rakkude tsütoplasma taandumine ja spermatiidi pikenemine. Lisaks eemaldatakse Sertoli rakke ja spermatiide ühendavad ektoplasmaatilised spetsialiseerituspiirkonnad (ES). ES piirkond on Sertoli rakkude plasmamembraani lähedal asuv modifikatsioon, mis ümbritseb spermatiidi tuuma ja mille vahendusel on omavahel ühenduses Sertoli rakk ja eloneeruv spermatiid (O'Donnell jt., 2011). ES koosneb Espin valgu vahendusel heksagoonselt pakitud aktiinifilamentidest, mis on surutud Sertoli raku membraani ja selle all oleva endoplasmaatilise retiikulumi (ER) vahele (Bartles jt., 1996). See piirkond seondab mikrotuubuleid ja mootorvalke ning vahendab spermatiidi liikumist läbi Sertoli raku epiteeli (Guttman jt., 2000). Selleks, et saaks toimuda spermatiidide vabanemine seemnetorukese luumenisse, toimub spermiatsiooni lõppfaasis ES piirkondade eemaldamine (Yan jt., 2008). Siiski on näidatud, et peale ES piirkondade eraldamist ja enne spermatiidide vabanemist luumenisse jäävad spermatiidid ja Sertoli rakk omavahel veel ühendusse ligikaudu 22,5 tunniks (O'Donnell jt., 2011). On tõendeid, et peale ES adhesiooni piirkonna eemaldamist jääb spermatiid ja Sertoli rakk omavahel seotuks integriinidel põhinevate ühenduste abil (Beardsley jt., 2006).

Spermiatsioonil moodustuvad spermatiidide peaosa ja Sertoli rakkude vahele ES vabadesse piirkondadesse ka tubulobulbaarsed kompleksid (TBC) (Russell, 1979). TBC'd kujutavad endast spermatiidi perinukleaarse ala tsütoplasma väljasopistusi, mis invagineeruvad Sertoli rakkude tsütoplasmasse, moodustades pikliku, topelt membraaniga tubulaarse struktuuri. Tuubul koosneb Sertoli raku plasmamembraanist, seda ääristavatest aktiinifilamentidest ja tihedalt selle vastas olevast spermatiidi plasmamembraanist (Vogl jt., 1989). Tubulaarsest osast struktuuri tipu poole jääb bulbaarne osa, mida ümbritseb Sertoli raku ER ning klatriiniga kaetud TBC tipp (*bristel-coated pit*) (Young jt., 2009). TBC tipust toimub vesiikulite moodustumine ja nende liitumine lüsoosoomidega (Russell, 1979). Need vesiikulid sisaldavad endas Nektiin-2 ja Nektiin-3 molekule, lüsoosomaalseid markereid (Guttman jt., 2004) ning varajase endosoomi antigeeni EEA-1 (Young jt., 2009). TBC'de

vahendusel toimub spermatiidi tsütoplasma eemaldamine (Sprando ja Russell, 1987). Lisaks on TBCde üheks oluliseks funktsiooniks Sertoli rakkude ja spermatiidide vaheliste ES piirkondade eemaldamine (Guttman jt., 2004).

Spermiatsiooni arenedes toimub mikrotoubulite vahendatud Sertoli raku apikaalse tsütoplasma pikenemine, mis põhjustab spermatiidi lükkamise luumenisse (O'Donnell jt., 2011). Roti puhul on VII faasi lõpuks spermatiidi tsütoplasma kondenseerunud ja ankurdatud Sertoli raku epiteeli ning sellest hetkest alates nimetatakse seda tsütoplasma sagaraks ning hiljem jääkkehaks (Sprando ja Russell, 1987). Enne spermatiidide vabanemist luumenisse on veel väikene osa Sertoli rakkude tsütoplasmast seostunud spermatiidi peaosaga ning spermatiidi vaheosaga jääb seotuks vaid vähene osa tsütoplasmast (O'Donnell jt., 2011). Sellele järgneb Sertoli rakkude poolt reguleeritud spermatiidide vabanemine luumenisse, kust alates nimetatakse neid küpseteks spermideks ning sealt liiguvad nad peritubulaarsete rakkude tekitatud jõudude poolt edasi munandivõrku (*rete testis*) ning järgnevalt munandimanusesse ehk epididümisesse (Russell jt., 1989). Peale spermatiidide vabanemist toimub mikrotoubulite vahendusel jääkkehade transport Sertoli rakkude epiteeli alusele ja nende fagotsütoos (Russell jt., 1989).

Sertoli rakkudele mõjuvad FSH ja androgeen on peamised spermiatsiooni endokriinsed regulaatorid (O'Donnell jt., 2009). On näidatud, et androgeeni ja FSH puudumine testistes põhjustab spermiatsiooni nurjumise ja seda just ebaõnnestunud Sertoli rakkudest eraldumise näol (Beardsley ja O'Donnell, 2003; O'Donnell jt., 2009). Samuti on näidatud, et spermide vabanemisel Sertoli rakkudest mängib olulist rolli ka seriini ja treoniini fosforüleerimine (Chapin jt., 2001).

1.4. Spermide epididümaalne küpsemine

Erinevalt madalamatest selgroogsetest saavad kõrgemate selgroogsete spermid funktsionaalselt küpseks alles peale munandimanuse ehk epididümise läbimist. Munandimanus jaotatakse anatoomilisteks osadeks, milleks on initsiaalsegment, peaos (*caput*), kehaosa (*corpus*) ja sabaosa (*cauda*) (Benoit, 1926). See on organ, kus toimub spermide edasine, posttestikulaarne küpsemine. Munandimanuse peamisteks funktsioonideks on spermide transport ning nende motiilsuse ja viljastamisvõime saavutamiseks vajaliku keskkonna loomine. Munandimanust ümbritsevad silelihaskiud (Baumgarten jt., 1971), mille rütmilised kokkutõmbed tagavad spermide transpordi läbi luumeni (Talo jt., 1979; Jaakkola ja Talo, 1982; Jaakkola, 1983). Munandimanuses saavutavad spermid võime tunda ära, seonduda ja seejärel fuseeruda munarakku ümbritseva *zona pellucida*'ga (Hinrichsen ja

Blaquier, 1980; Saling, 1982) ning samuti võime läbida akrosomaalreaktsioon (Lakoski jt., 1988; Yeung jt., 1997). Lisaks toimub epididümist läbides spermidel tsütoplasma tilgakese migratsioon piki viburit, akrosoomi kuju muutus, muutused kromatiinis ning plasmamembraanis (Bedford, 2004).

Spermidega toimuvad epididüümise erinevates osades spetsiifilised muutused, mis on vahendatud erinevate valkude sekretsiooniga. Näiteks omandab sperm vajaliku progressiivse liikumisvõime sisenedes munandimanuse peapoolsesse ossa. Kuid selliste cAMP sõltuvate protsesside nagu hüperaktivatsiooni, *zona pellucida*'ga seondumise ja akrosomaalreaktsiooni kompetentsus saavutatakse alles munandimanuse sabaosas ning viimajuhas (*vas deferens*) (Asquith jt., 2004; Aitken jt., 2007).

Spermide kapatsitatsioonil toimuv hüperaktiveerumine on seotud epididümaalsel küpsemisel toimuva türosiini fosforüleerimisega türosiini kinaaside poolt (Baker jt., 2006). cAMP indutseerib juba epididüümise peaosas türosiini fosforüleerimist küpsevate spermide sabaosas ning alates epididüümise kehaosast lisaks ka spermide vaheosa fosforüleerimise (Lin jt., 2006). Maksimaalne fosforüleerituse tase spermides saavutatakse epididüümise sabaosas, kus spermid omandavad täieliku funktsionaalsuse ja hüperaktiveerumise võime (Asquith jt., 2004).

Zona pellucida (ZP) äratundmine ja sellega seondumine on sõltuv kapatsitatsioonist. Kapatsiteerumata spermid ei ole suutelised ZP'd ära tundma ja sellega seonduma. On teada, et hiire spermid saavutavad ZP'ga seondumisvõime proksimaalses epididüümise kehaosas ja see langeb ajaliselt kokku nende liikumispotentsiaali saavutamise (Asquith jt., 2004). Arvatakse, et ZP retseptorite õige paigutus spermi pinnal, piirkonnas kus initsieeritakse seondumine ZP'ga, on reguleeritud fosforüleeritud molekulaarsete tsäperonidega (Asquith jt., 2004; Asquith jt., 2005).

1.5. Kapatsitatsioon

Selleks, et spermid muutuksid viljastamisvõimeliseks, peavad nad emassuguteedes läbi tegema mitmeid ümberkorraldusi. Neid spermidega toimuvad ümberkorraldusi tähistatakse üldnimetusega kapatsitatsioon (Austin, 1951; Chang, 1951). Kapatsitatsiooni käigus toimuvad spermides biokeemilised ja füsioloogilised muutused, mille tulemusena omandavad nad munaraku viljastamisvõime. Kapatsitatsioonil toimub kolesterooli eemaldamine plasmamembraanist, Ca^{2+} ja HCO_3^- ionide sissevool rakku, plasmamembraani hüperpolarisatsioon, proteiini kinaaside aktiveerimine ja valkude fosforüleerimine, tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (cAMP) taseme tõus rakus ning spermide hüperaktivatsioon (joonis 4;

Ho ja Suarez, 2001; Galantino-Homer jt., 2004; Hernandez-Gonzalez jt., 2006; Arcelay jt., 2008). Nende protsesside tagajärjel on sperm võimeline läbima akrosomaalreaktsiooni (AR) ning viljastama munaraku.

Spermide plasmamembraanis toimuvad migreerumisel läbi emassuguteede mitmed muutused. Üks tähtsamaid sündmusi kapatsitatsioonil on kolesterooli ja glütserofosfolipiidide eemaldamine membraanist, kus kolesterooli peamised seondajad on keskkonnas leiduv albumiin (joonis 4) ja lipiidi transportvalk 1 (Feki jt., 2004; Hamdi jt., 2010). Seemnevedelikus leiduv kolesterool on peamine kapatsitatsiooni inhibiitor (Cross, 1996). Rakusisese HCO_3^- - ionide tõus põhjustab membraanseid fosfolipiide ümberorganiseerivate ensüümide aktiveerumise, mille tulemusena on hõlbustatud kolesterooli sidumine väliste aktseptorite poolt (joonis 4; Cross, 2004). Kolesterooli eemaldamise tulemusena kasvab membraani viskoossus, mis on vajalik membraanide fusiooniks akrosomaalreaktsioonil (Zarintash ja Cross, 1996). Samuti toimub membraanis oksüdatiivsete kahjustuste eest kaitsva α -tokoferooli (vitamiin E) hulga vähenemine (Feki jt., 2004). On näidatud, et ainuüksi membraani viskoossusest ei piisa kapatsitatsiooni stimuleerimiseks, vaid vajalik on ka kindlate lipiidsete mikrodomäänide moodustumine (Cross, 2003).

Rakusisese Ca^{2+} - ionide kontsentratsiooni tõus on iseloomulik nii kapatsitatsioonile kui ka AR'le (joonis 4). Prostatoomid on eesnäärme poolt seemnevedelikku sekreteerivad kolesterooli rikkad ja kaltsiumit ladestavad vesiikulid (Palmerini jt., 1999). Need on kapatsitatsiooniks vajamineva Ca^{2+} - ionide üheks allikaks (Arienti jt., 1997). Membraanilipiidid vastutavad ionikanalite modifitseerimise eest, mis normaalsetes tingimustes säilitavad elektrokeemilise tasakaalu. Näiteks stimuleerib Ca^{2+} - ionide sissevoolu ning AR'i follikulaarvedelikus esinev ja *cumulus*'e rakkude poolt sekreteeritav progesteron (Kirkman-Brown jt., 2000; Harper jt., 2004). *In vitro* katsed on näidanud, et prostatoomide lisamine spermidele progesterooni juuresolekul stimuleerib AR'i (Palmerini jt., 2003). Rakusisese Ca^{2+} kontsentratsiooni tõusuga on seotud ka emakas esinev SABP (*Sialic acid-binding protein*) valk. SABP on kaltsiumit siduv valk, mis seondub kapatsiteerumata spermide peasaga ning vahendab sellega Ca^{2+} sissevoolu rakku (Banerjee ja Chowdhury, 1997).

$\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotransporterite vahendusel toimuva HCO_3^- ionide sissevoolu tagajärjel tõuseb rakusisene pH ning plasmamembraan hüperpolariseerub (joonis 4; Arnoult jt., 1999; Demarco jt., 2003). Suurenenud pH tase rakus aktiveerib kaalium kanali SLO3 (ka Ksper), mis põhjustab membraani depolarisatsiooni ning spermi-spetsiifiliste CatSper kaltsium kanalite aktivatsiooni (Ren jt., 2001; Navarro jt., 2007).

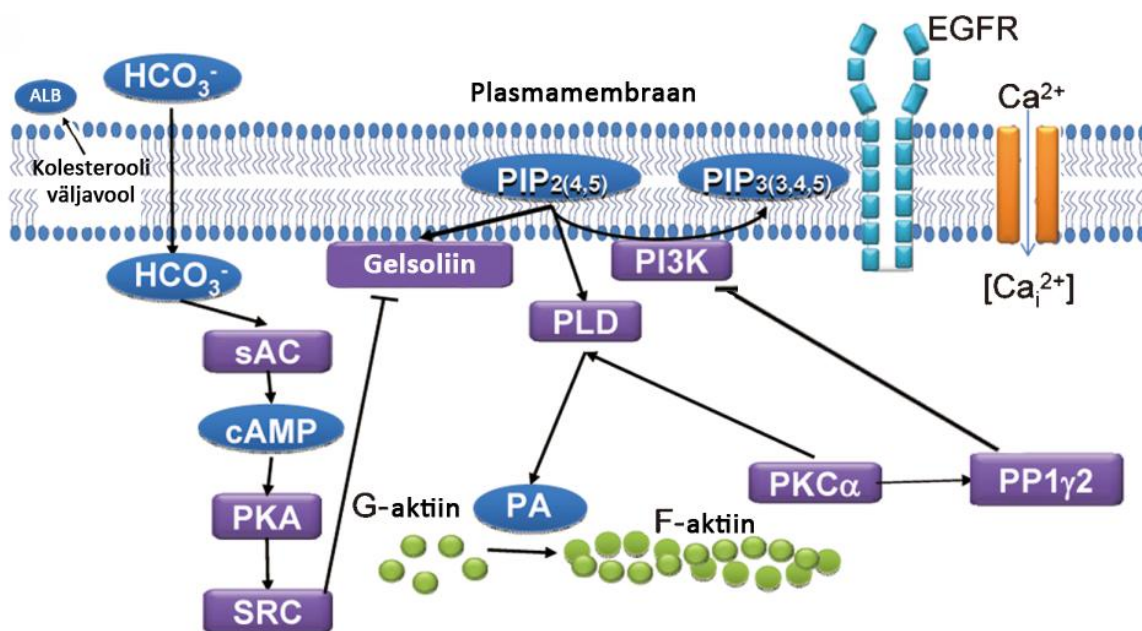
Üheks tähtsaimaks posttranslatsiooniliseks modifikatsiooniks kapatsitatsioonil on proteiinkinaas A (PKA) vahendusel toimuv türosiini fosforüleerimine (Baker jt., 2009). PKA fosforüleerib mitmeid sihtmärkvalke, mis initsieerivad paljusid kapatsitatsiooniks vajalikke signaaliradu (joonis 4). Ca^{2+} - ja HCO_3^- ionide sissevool rakku käivitab membraanis asuva lahustuva adenüültsüklaasi (sAC), mille tagajärjel tõuseb rakusisene cAMP tase (joonis 4). Hiire spermidel on näidatud, et inimese seemneplasma esinev valk FPP (*Fertilization promoting peptide*) stimuleerib G-valguga seotud retseptori vahendusel membraanset adenüültsüklaasi ja selle kaudu cAMP tootmist (Fraser ja Adeoya-Osiguwa, 1999; Adeoya-Osiguwa ja Fraser, 2002). FPP mõjutab kapatsiteerumata spermides positiivselt cAMP tootmist, kuid kapatsiteerunud spermides negatiivselt. cAMP omakorda aktiveerib PKA (joonis 4). PKA inhibiitorid blokeerivad valkude türosiini fosforüleerimise tõusu ning sellega ka kapatsitatsiooni (Leclerc jt., 1996). PKA fosforüleerib mitmete valkude seriini- ja treoniinijääke ning samal ajal inhibeerib fosfataase. Mitmete kinaaside otsese või kaudse aktiveerimise tulemusena PKA poolt kasvab rakus ka kapatsitatsioonil vajalike valkude türosiinijääkide fosforüleerimine (Bajpai ja Doncel, 2003; Luconi jt., 2005). PKA aktivatsioon põhjustab näiteks spermi viburi lõõgisageduse kasvu ning omab rolli hüperaktivatsiooni saavutamisel kapatsitatsioonil (Shahar jt., 2011). Samuti aktiveerib PKA välises akrosomaalses membraanis asuva Ca^{2+} - kanali, mille kaudu pääsevad akroosoomis olevad Ca^{2+} ionid tsütosooli (Spungin ja Breitbart, 1996).

Proteiini kinaas C'd (PKC) on seriin/treoniin kinaasid, mis osalevad raku signalisatsioonil eelkõige Ca^{2+} - ioone seondavate ligandide suhtes. PKC'de aktiveerimine on Ca^{2+} - sõltuv protsess, mille tagajärjel indutseeritakse AR (Breitbart jt., 1992). PKC'de aktivaator fosfolipaaas $\text{C}\gamma$ ($\text{PLC}\gamma$) on samuti Ca^{2+} - sõltuv ensüüm, mis aktiveeritakse kapatsitatsioonil (Finkelstein jt., 2010). Spermi plasmamembraan sisaldab Ca^{2+} - kanalit, mille aktiveerib PKC (Spungin ja Breitbart, 1996).

Samuti osaleb kapatsitatsioonil ja AR'il fosfatidüülinositol-3-kinaas (PI3K), mis vastutab fosfatidüülinositol-3,4,5-trifosfaadi (PIP_3) sünteesi eest (joonis 4; Fisher jt., 1998; Etkovitz jt., 2007). PI3K aktivaatoriks kapatsitatsioonil on PKA ning inhibiitoriks PKC α (Etkovitz jt., 2007). On teada, et PI3K aktivatsioon põhjustab ka aktiini polümeriseerumist (Etkovitz jt., 2007).

Kapatsitatsiooni käigus muutub spermi liikumismuster sümmeetrilisest asümmeetriliseks. Sellist üleminekut nimetatakse hüperaktivatsiooniks (Goodson jt., 2011). Hüperaktiveerunud liikumist iseloomustab asümmeetriline viburi liikumine, mille tagajärjel hakkab rakk kiiremini ja jõulisemalt liikuma võimaldades tema läbitungimise kiirpärja rakkudest ja *zona pellucida*'st (Ho ja Suarez, 2001). Inimese ja hiire spermides on näidatud, et

kapatsitatsiooni käigus toimuv rakkude hüperaktiveerumine on seotud akrosoomi piirkonda ja spermi sabaossa lokaliseeruva fosfolipaas D (PLD) reguleeritava aktiini polümeriseerumisega (joonis 4; Itach jt., 2012). Aktiini polümeriseerumine on protsess, kus globulaarse G-aktiini monomeerid ühinevad omavahel, moodustades F-aktiini filamente (Virtanen jt., 1984). Ca^{2+} -sõltuv valk gelsoliin katkestab F-aktiini filamente ja seondub nende pluss otsaga. Filamentide lagundamise ärahoidmiseks seonduvad gelsoliiniga fosfoinositiidid, mille tulemusena saavad aktiini monomeerid liituda ja moodustuda filamente (joonis 4). On näidatud, et gelsoliin on kapatsitatsioonil inaktiivses olekus, kuid tema aktivatsioon toimub $\text{PLC}\gamma$ vahendusel vahetult enne AR'i (Finkelstein jt., 2010). Gelsoliini aktiivsus on inhibeeritud ka tema fosforüleerimisel SRC kinaasi poolt (joonis 4; Finkelstein jt., 2010). Lisaks osaleb aktiini polümeriseerumisel ja AR'i indutseerimisel ka epidermaalse kasvufaktori retseptor (EGFR) (joonis 4; Brenner jt., 2003).



Joonis 4. Kapatsitatsioon. Kolesterooli eemaldamine keskkonnas leiduva albumiini poolt ja rakusisene HCO_3^- ja Ca^{2+} - ionide tõus põhjustab sAC ja PKA aktivatsiooni. PKA aktivatsioon põhjustab SRC vahendatud gelsoliini fosforüleerimist (inaktiveerimist). $\text{PKC}\alpha$ fosforüleerib (aktiveerib) $\text{PP1}\gamma_2$, mis defosforüleerimise kaudu inhibeerib PI3K. Selle tulemusena tõuseb $\text{PIP}_{2(4,5)}$ tase ning aktiveeritakse PLD. PLD omakorda toodab AP, mis põhjustab aktiini polümeriseerumist. Lühendid: ALB, albumiin; cAMP, tsükliline adenosiin monofosfaat; DAG, diatsüülgütserool; EGFR, epidermaalse kasvufaktori retseptor; PA, fosfatiidhape; PI3K, fosfatidüülinositol-3-kinaas; $\text{PIP}_{2(4,5)}$, fosfatidüülinositol-2,5-bisfosfaat, $\text{PIP}_{3(3,4,5)}$, fosfatidüülinositol-3,4,5-trisfosfaat; PKA, proteiini kinaas A; $\text{PKC}\alpha$, proteiini kinaas $\text{C}\alpha$; PLC, fosfolipaas C; PLD, fosfolipaas D; sAC, lahustuv adenüül tsüklaas; $\text{PP1}\gamma_2$, proteiin fosfataas 1 γ_2 ; SRC, SRC türosiini kinaas (modifitseeritud Ickowicz jt., 2012 järgi).

Spermi jõudmist ootsüüdini stimuleerivad kemoatraktantide poolt vahendatud signaalid. Üheks selliseks signaaliks on follikulaarses vedelikus paiknev ANP peptiid (*Atrial natriuretic peptide*) (Zamir jt., 1993). Spermi plasmamembraanis paikneb ANP retseptor, mis ligandi seondamisel aktiveerib guanülültsüklaas-sõltuva signaaliraja, mõjutab spermi liikumiskiirust ning toimib kemoatraktandina (Zamir jt., 1993; Anderson jt., 1995). On näidatud, et ka kiirpärja rakud omavad stimuleerivat toimet spermi suhtes (Hong jt., 2004). Kiirpärja rakke hoiab peamiselt koos hüaluroonhape ning spermi plasmamembraanis asub hüaluronidaasset aktiivsust omav PH-20 valk, mis tagab spermi läbitungimise rakkudest (Lin jt., 1994).

1.6. Akrosomaalreaktsioon (AR)

Vaid akrosomaalreaktsiooni läbi teinud spermid on võimelised läbi tungima *zona pellucidast*, seonduma ootsüüdi plasmamembraaniga ning sellega fuseeruma (Schuffner jt., 2002). Akrosoom on anterioorselt spermi peas osas paiknev Golgi kompleksi derivaat, mis sisaldab endas erinevaid hüdroolüütilisi ja proteolüütilisi ensüüme. AR'i käigus toimuv ensüümide vabanemine tagab spermi tungimise ootsüüdini ja haploidse genoomi transportimise munarakku. Akrosomaalreaktsioon saab toimuda tingimusel, et eelnevalt on sperm läbinud kapatsitatsiooni (Arnoult jt., 1999). Kuid erinevalt kapatsitatsioonist on AR pöördumatu protsess (Mayorga jt., 2007).

Peamiseks AR'i tunnuseks on rakusisese kaltsiumi kontsentratsiooni kasv (Brewis jt., 1996). AR'i toimumiseks on vajalik Ca^{2+} -ioonide sissevool raku, mis võib olla pärit nii raku sisestest kui ka välistest reservuaaridest. Akrosomaalseks eksotsütoosiks on vajalik ka Ca^{2+} -ioonide väljavool akrosoomist (De Blas jt., 2002; De Blas jt., 2005). Kaltsiumi kontsentratsiooni tõus indutseerib välise akrosomaalmembraani ja plasmamembraani fuseerumise, mille tagajärjel toimub hübriidsete membraanete vesiikulite teke ning eksotsütoos (Mayorga jt., 2007). F-aktiin takistab sekretoorsete graanulite fuseerumist plasmamembraaniga ja eksotsütoosi toimumist ning on näidatud, et kapatsiteerunud spermides toimub enne AR'i kiire F-aktiini depolümeerisumise (Spungin jt., 1995).

AR on *in vivo* indutseeritud *zona pellucida* (ZP) glükoproteiinide poolt (Dong jt., 2001; Bray jt., 2002; Chiu jt., 2008). ZP valgud on ligandiks spermi pea anterioorses osas olevatele retseptoritele (Burks jt., 1995). On näidatud, et ZP indutseeritud Ca^{2+} taseme tõus algab spermi sabaosast ja kulgeb peaosa suunas (Xia ja Ren, 2009). Peamine AR'i indutseeriv glükoproteiin on ZP3, seondudes spermi membraanis oleva retseptoriga ZRK (*Zona receptor kinase*) (Burks jt., 1995). ZP3 signaaliülekanes osaleb G-valk (Lee jt., 1992; Bastiaan jt.,

1999), mida toetab fakt, et hiire spermidel toimub AR'i käigus G_{i1} , G_{i2} valkude aktivatsioon (Ward jt., 1994). ZP3 seondumine retseptoriga põhjustab adenüültsüklaasi aktiveerumise ja cAMP taseme tõusu. Sellega kaasneb membraani depolarisatsioon, Na^+/H^+ transporteri aktivatsioon ja rakusisese pH kasv ning pingest sõltuvate kaltsiumi kanalite (*voltage operated calcium channels*) vahendusel rakusisese kaltsiumi ionide kontsentratsiooni tõus. Lisaks ZP3 valgule indutseerib inimesel AR'i ja rakusisese Ca^{2+} -ioonide kontsentratsiooni kasvu ka ZP4 valk (Caballero-Campo jt., 2006; Chakravarty jt., 2008), mille indutseeritud signaaliülekanne ei ole vahendatud G_i valgu poolt (Chakravarty jt., 2005; Chiu jt., 2008). Samuti indutseerib inimese spermides G_i valgust sõltumatut AR'i *cumulus*'e rakkude poolt sekreteeritav progesteron (Tesarik jt., 1993; Meizel jt., 1997; Bronson jt., 1999). Progesteroni poolt indutseeritud Ca^{2+} sissevool inimese spermides toimub CatSper ionkanali valkude vahendusel (Lishko jt., 2011; Strunker jt., 2011). ZP3 ja progesteron indutseerivad kahefaasilise rakusisese kaltsiumi taseme tõusu, millest esimene on seotud pingest sõltuvate kaltsiumi kanalitega (Jimenez-Gonzalez jt., 2006) ja teine spermi pinnal asuvate SOC (*store-operated calcium*) kanalitega (O'Toole jt., 2000). SOC kanalite aktiveerimine tagab AR'i initsieerimiseks vajaliku rakusisese Ca^{2+} -ioonide kontsentratsiooni (O'Toole jt., 2000). Peamiseks rakusiseseks kaltsiumi reservuaariks on akrosoom ning akrosmaalsete kaltsiumivarude ammendumisel aktiveeritakse plasmamembraanis asuvad SOC kanalid (De Blas jt., 2002; Herrick jt., 2005), mis põhjustavad rakus kiire kaltsiumi taseme tõusu ja AR'i käivitamise (Mayorga jt., 2007).

1.7. Valgu translatsioon spermis

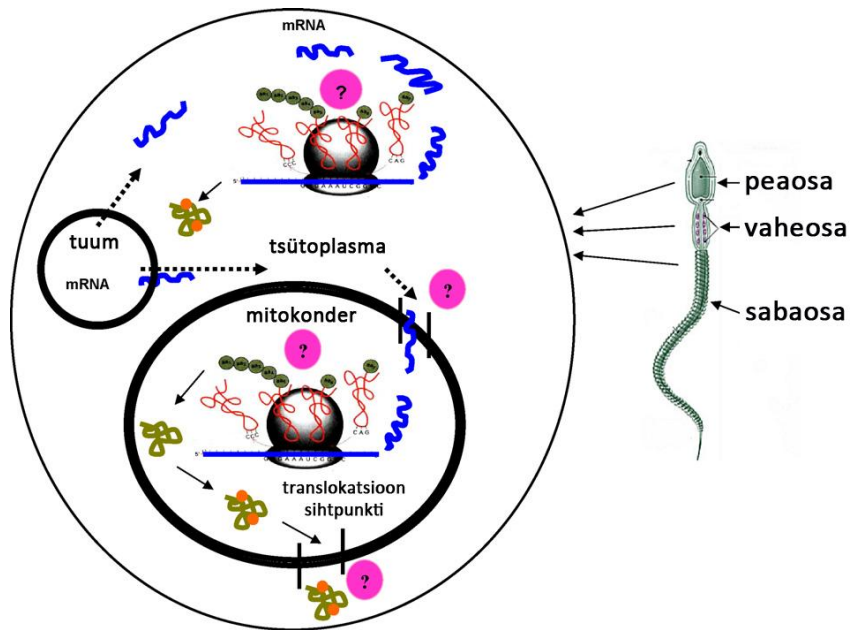
Kui traditsiooniliselt on küpseid sperme peetud translatsiooniliselt inaktiivseteks, siis nüüdseks on tõendeid, et kapatsitatsiooni käigus toimub rakus teatud valkude ekspressioon (Gur ja Breitbart 2006). Märgistatud aminohapete abil on näidatud, et kapatsitatsiooni käigus toimub *de novo* polüpeptiidide süntees inimese, hiire, veise ja roti spermides (Gur ja Breitbart 2006; Gur ja Breitbart 2008).

Arvatakse, et seda translatsiooni viib läbi spermi vaheosas asuv mitokondriaalne translatsioonisüsteem (joonis 5). Mitokondriaalsed 55S ribosoomid koosnevad väikesest 28S ja suurest 39S subühikust (O'Brien, 1971). Suur subühik sisaldab 16S ja väike subühik 12S rRNA-d (Sharma jt., 2003). Spermi polüsomaalsetes fraktsioonides on tuvastatud 12S rRNA koos AKAP110 mRNA-ga ja see näitab 55S ribosoomide aktiivset osalust translatsioonis (Gur ja Breitbart, 2006). Mitoribosoomide osalust kinnitab fakt, et valgu süntees on inhibeeritud mitokondriaalse translatsiooni inhibiitorite D-klooramfenikooli (CP), tetratsükliini ja

gentamütsiini poolt, kuid mitte tsütoplasmaatilise translatsiooni inhibiitori tsükloheksimiidi poolt (Gur ja Breitbart, 2006). Spermide CP töötlus vähendab kapatsitatsioonil, akrosomaalreaktsioonil ja viljastumisel osalevate valkude nagu proteiini kinaas C (PKC) (Breitbart ja Naor, 1999), angiotensiin II tüüp I retseptor (AT1-R) (Gur jt., 1998), epidermaalse kasvufaktori retseptor (EGFR) (Lax jt., 1994), progesterooni retseptor (PR) (Meizel ja Turner, 1991) ja CatSper (Ren jt., 2001) taset rakus. Immuunofluorestsentsanalüüsiga on näidatud, et viljastumisel vajalikud retseptorid nagu AT1-R ja PR paiknevad kapatsitatsiooni alguses spermi vaheosas, kuid kapatsitatsiooni käigus lokaliseeruvad need valgud ka teistesse spermi piirkondadesse (Gur ja Breitbart 2006). Valgusünteesi olulisust kapatsitatsioonil kõnetab ka fakt, et CP töötlus vähendab märgatavalt spermide motiilsust, AR toimumise taset, aktiini polümeriseerumist ning *in vitro* viljastumise taset (Gur ja Breitbart, 2006). Kasutades CP'd, identifitseerisid Zhao jt., 2009 kapatsitatsioonil 44 valku, mille tase oli CP töötamise tagajärjel madalam kui CP töötlemata spermides ning bioinformaatilisel analüüsil tehti kindlaks, et nendest valkudest 26 osalevad otseselt viljastumise protsessis (Zhao jt., 2009).

Katsetes spermidega on näidatud, et transkriptsiooni inhibiitor aktinomütsiin D ei mõjuta valgusünteesi, seega transleeritav mRNA on tõenäoliselt rakus olemas juba varem (Gur ja Breitbart, 2006). Varasemalt on teada, et imetajate küpsed spermid sisaldavad hulgaliselt mRNA'd (Miller jt., 1994; Kramer ja Krawetz, 1997; Miller jt., 1999; Richter jt., 1999). Elektronmikroskoopia ja antikehade abil on kindlaks tehtud, et veise AT1-R, hiire PKA-C'd ja CatSper mRNA'd lokaliseeruvad spermi mitokondritesse ning nende aktiivsaitidesse väljaspool mitokondreid (Gur ja Breitbart, 2006). Samuti on teada, et mitokondrid vajavad funktsioneerimiseks üle 700 tuumas kodeeritud valgu (Neupert, 1997). Selleks, et saaks toimuda mitokondriaalne translatsioon, on vaja need tuumas sünteesitud mRNA'd transportida mitokondritesse (joonis 5).

Mitokondriaalseid 55S ribosome on leitud ka merisiiliku munarakus väljaspool mitokondreid tsütosoolis (Oka jt., 1999). Seega võib translatsioon mitoribosoomide abil spermis toimuda ka mujal kui mitokondrites. Arvatakse, et translatsioon CP- tundlike ribosoomide abil toimub kas mitokondris sees või selle pinnale kinnitunud mitoribosoomides (joonis 5; Gur ja Breitbart, 2008). Lisaks on näidatud nii hiire kui inimese spermides 16S ja 12S rRNA molekulide lokaliseerumist rakutuumas, mis annab aluse oletusele, et translatsioon 55S ribosoomide vahendusel võib toimuda ka tuumas (Villegas jt., 2000; Villegas jt., 2002).



Joonis 5. Võimalik translatsiooni mudel imetaja spermides. Imetajate spermides võib toimuda tuumas kodeeritud mRNA translatsioon mitokondriaalsete ribosoomide poolt kas tsütoplasmas või mitokondrites, peale mida toimub valgu translokatsioon sihtpunkti (modifitseeritud Gur ja Breitbart, 2008 järgi).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Antud magistritöö eksperimentaalse töö eesmärkideks olid:

1. Teha kindlaks *RIC8A* mRNA olemasolu ja suhteline tase kapatsiteerumata ja kapatsiteerunud inimese spermides.
2. Määrata *RIC8A* valgu lokalisatsiooni piirkonnad inimese spermides kapatsitatsiooni protsessis.
3. Iseloomustada *RIC8A* lokalisatsiooni ja ekspressiooni dünaamikat kapatsitatsiooni protsessis.
4. Uurida *RIC8A* translatsiooni võimalikku toimumist inimese spermides kapatsitatsiooni protsessis.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Spermi ettevalmistus kapatsitatsiooniks

Anonüümsetelt tervelt meesdoonoritelt saadud värske ejakulaat lasti esmalt 15 minutit toatemperatuuril vedelduda. Seejärel jaotati ejakulaat kolme gruppi: I spermid, mis läksid analüüsimisele otse ejakulaadist; II spermid, millega tehti läbi *swim-up* meetodika; III spermid, mis läksid peale *swim-up*'i *in vitro* kapatsiteerumisele. I rühma kuuluvad spermid tsentrifugeeriti toatemperatuuril 300 g juures 5 min. Seejärel pesti neid Whittens-HEPES (WH) või Ham's F-10 söötmes ja tsentrifugeeriti uuesti. Edasi toimetati vastavalt peatükkidele 2.2.2 ja 2.1.3 Rühm II ja III spermidele teostati nn. *swim-up* meetodika, et eraldada aktiivsed spermid vähemaktiivsetest spermidest, muudest keharakkudest ja seemnevedeliku koagulaatidest. Selleks pipeteeriti 15 ml tuubi 1 ml vedeldatud ejakulaati, millele lisati aeglaselt peale 1,2 ml eelsoendatud (37° C) Ham's F-10 söödet (168,8 mM NaCl; 19 mM NaHCO₃; 5 mM KCl; 1,4 mM Na₂HPO₄; 0,8 mM MgSO₄* 7H₂O; 0,8 mM KH₂PO₄; 0,4 mM CaCl₂* 2H₂O; 8 mM D-glükoos. Samuti lisati söötmesse 20 mM HEPES puhvrit. Söötme pH 7,4 korrigeerimiseks kasutati 1 M NaOH). Alternatiivina kasutati ka Whittens-HEPES söödet (100 mM NaCl; 4,4 mM KCl; 1,2 mM KH₂PO₄; 1,2 mM MgSO₄; 5,4 mM glükoos; 0,8 mM Na-püruvaat; 4,8 mM Na-laktaat; 20 mM HEPES; mQ vesi. Söötme pH korrigeeriti 7,2-7,4 kasutades 1 M NaOH). Klooramfenikooli (CP) töötuse puhul lisati söötmesse 10 mg/ml CP'd. Järgnevalt asetati 15 ml tuub prooviga 45° nurga all 1 h 37° C juurde termostaatkappi

(Incubator INP 500, Memmert). Peale *swim-up* protsessi eemaldati proovist ettevaatlikult 1 ml pealmisest kihist, mis sisaldas aktiivseid motiilseid sperme ning mida kasutati edasistes kapatsitatsiooni protsessides. Spermide liikuvust enne ja pärast *swim-up*'i hinnati visuaalselt valgusmikroskoobi Olympus CK2 (Olympus Corporation) abil. Nii rühm I kui ka rühm II ja III spermid (peale *swim-up*'i) loendati kasutades hemotsütomeetrit (Gorjaev *camera model* 851). Rakud fikseeriti eelnevalt 4% PFA'ga. Loendamiskambrisse pipeteeriti 10 µl sperme ning loendati vähemalt 200 raku. Spermide ligikaudne hulk 1 ml kohta arvutati vastavalt valemile $N \cdot d \cdot C$, kus N on loetud rakkude keskmine arv hemotsütomeetri ühe väikese ruudu (pindala 0,0025 mm² ja ruumala 0,25 nl) kohta, d on lahjendusfaktor ja C hemotsütomeetri konstant ($4 \cdot 10^6$). Katsete tegemisel arvestati 2010 aastal WHO (World Health Organization) poolt kehtestatud piirväärtusega, kus normaalseks loetakse rakkude arvu 15 miljonit/ml (Cooper jt., 2010).

2.2.2. Spermide *in vitro* kapatsitatsioon

Swim-up meetodikaga eraldatud aktiivsetele spermidele (1 ml) lisati eelsoendatud (37° C) 1 ml Ham's F-10 söödet ja seejärel tsentrifuugiti rakke 300 g juures 5 min. Põhja tsentrifuugitud rakkudele lisati 1,5 ml kapatsitatsioonisöödet [50 ml Ham's F-10 söötmele lisati 300 mg inimese seerumi albumiini (HSA, Bio-Pure Human Serum Albumin, Biological Industries); 1,5 mg Na-püruvaati; 0,18 ml 60% (v/v) Na-laktaati ning 100 mg NaHCO₃) või Whittens HEPES söötme puhul 30 mM NaHCO₃, 10 mg/ml BSA (Sigma, rasvhapete vaba), 2 mM CaCl₂] ning inkubeeriti 3 h 37° C juures. Klooramfenikooliga proovile lisati kapatsitatsioonisöötmesse 0,1 mg/ml CP'd ja inkubeeriti samuti 3 h 37°C juures. Spermide hüperaktiveerumist hinnati ka valgusmikroskoobiga Olympus CK2 (Olympus Corporation).

2.2.3. Spermide *in vitro* akrosomaalreaktsioon

Spermide kapatsitatsiooni edukuse hindamiseks kasutati *in vitro* akrosomaalreaktsiooni (AR). Spermid, mis on eelnevalt läbinud kapatsitatsiooni protsessi on võimelised läbima adekvaatselt ka akrosomaalreaktsiooni. AR'i indutseerimiseks lisati spermidele Ca-ionofoori A23187 (Sigma Aldrich, Sigma C7522) lõppkontsentratsiooniga 10 µM ja inkubeeriti 30 min 37° C juures. Negatiivse kontrollina inkubeeriti rakke samadel tingimustel ilma Ca-ionofoorita. Peale inkubeerimist lahjendati proovid 1:1 1x PBS'ga. Rakud fikseeriti 1,5 ml Eppendorfi tuubis lisades 1:1 10% formaliini ning lasti 10 minutit toatemperatuuril fikseeruda. Preparaatide tegemiseks kanti adhesiivsele alusklaasile (Thermo Scientific,

Polysine® slides, Menzel-Gläser) 60 µl proovi, tõmmati katteklaasiga laiali ja lasti 30 minutit toatemperatuuril kuivada. Preparaate säilitati 4°C juures.

Akrosoomi intaktsuse hindamine toimus Coomassie'1 põhineva Page Blue (Fermentas) valke värviva lahuse abil. Preparaate pesti 1x PBS'ga, seejärel lisati 200 µl Page Blue värvilahust ja lasti seista 20 minutit. Üleliigse värvi eemaldamiseks pesti klaasid 1x PBS'ga ning seejärel sulundati 50% glütserool/PBS'ga ning kaeti katteklaasiga, mille servad pitseeriti läbipaistva küünelakiga.

2.2.4. Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qRT-PCR)

RIC8A mRNA suhtelise ekpressiooni taseme hindamiseks inimese spermides enne ja pärast kapatsitatsiooni, viidi läbi qRT-PCR analüüs.

2.2.4.1. Spermidest totaalse RNA eraldamine

Peatükkides 2.2.1. ja 2.2.2. kirjeldatud viisil viidi läbi aktiivsete spermide eraldamine *swim-up* meetodil ning *in vitro* kapatsitatsioon. Totaalse RNA eraldamiseks lisati rakkudele (ligikaudu 10×10^6 rakku) nende lüüsimiseks ja homogeniseerimiseks 1 ml Trizol reagenti (TRIZOL® Reagent, Life Technologies). Selleks, et toimuks täielik nukleoproteiin komplekside lagunemine inkubeeriti homogeniseeritud proove 30 minutit toatemperatuuril. Faasi separatsiooniks lisati 1 ml Trizol reagenti kohta 0,2 ml kloroformi ja inkubeeriti 3 min toatemperatuuril. Seejärel tsentrifugiti proove 12000 g juures 15 minutit. Moodustunud faasidest kanti kõige pealmine, RNA'd sisaldav vesifaas uude 1,5 ml Eppendorfi tuubi. Totaalse RNA sadestamiseks lisati 8 µg RNAasi vaba glükogeeni (Invitrogen) ning 0,5 ml 100% isopropanooli. Sadestamisel inkubeeriti proove esmalt 10 minutit toatemperatuuril ning seejärel 10 minutit jääl. Järgnevalt tsentrifugiti proove 12000 g juures 10 minutit ning eemaldati supernatant. Põhja tsentrifugitud RNA pesti 1 ml 75% etanooliga 20 sekundit ning kuivatati õhu käes 10 minutit. RNA sade resuspendeeriti 20 µl dietüülpürokarbonaadiga (DEPC) - töödeldud mQ's. Eraldatud totaalse RNA proovidele teostati RNA sisalduse määramiseks analüüs NanoDrop 8000 spektrofotomeetriga (Thermo Scientific). Kapatsiteerumata *swim-up* proovis oli RNA sisaldus 214 ng/µl ($260/280 = 1,67$) ja kapatsiteerunud proovis 232,7 ng/µl ($260/280 = 1,71$).

2.2.4.2. cDNA süntees

Spermidest eraldatud totaalse RNA proovidest võeti cDNA sünteesiks 8 µl (1,712 µg kapatsiteerumata spermide puhul ja 1,8616 µg kapatsiteerunud spermide puhul). Sellele lisati 0,5 µl 100 µM oligo(dT)₁₇ (TAG Copenhagen A/S) praimereid, 1 µl 100 mM dNTP mix'i ja 0,5 µl DEPC – mQ'd. Seejärel denatureeriti proove 65° C juures 5 minutit ning hoiti 1 minut jääl. cDNA sünteesiks valmistati cDNA sünteesi segu, mis sisaldas 4 µl 5x RT puhvrit, 2 µl 50 mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT (ditiotreitool) (Invitrogen), 1 µl rRNasin ribonukleaasi inhibiitorit (40 U/µl) (Promega) ning 1 µl SuperScript™ III RT (200 U/µl) (Invitrogen) revertaasi. cDNA sünteesi segu lisati eelnevalt valmistatud RNA/praimerite segule ja pöördtranskriptsiooni toimumiseks inkubeeriti proove 50 minutit 50° C juures. Reaktsiooni termineerimiseks hoiti proove 5 minutit 85° C juures ning jahutati jääl. Proove säilitati -20° C juures.

2.2.4.3. Kvantitatiivne reaalaja PCR (qRT-PCR)

Kapatsiteerumata ja kapatsiteerunud proovidest sünteesitud cDNA'ga viidi läbi qRT-PCR, kus kasutati järgnevaid praimereid:

Ric_h_RT F 5'- GTG TCT GGA TGT TCT CCT CAC C – 3'
R 5' – GCT ACA CTC TCC TTC AGC CTG T – 3'

HPRT F 5'- GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG - 3'
R 5'- AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG- 3'

qRT-PCR analüüsiks kasutati StepOnePlus Real-Time PCR System masinat (Applied Biosystems) ja StepOne Software v2.0 tarkvara. Reaktsioon viidi läbi 10 µl mahus, kus 1 µl cDNA proovile lisati 2 µl HOT FirePol®EvaGreen qPCR Mix Plus segu (1,5 mM MgCl₂, HOT FIREPol® DNA Polümeraas, dNTP-d, 5x EvaGreen® qPCR puhver, EvaGreen® värv ja ROX värv) (Solis BioDyne), 2,8 µl kumbagi praimerit ja mQ vett. Iga proov kanti PCR plaadile kolmekordse kordusena. Kogu katset viidi läbi kahes korduses.

RIC8A ekspressioonitaseme hindamiseks arvutati suhe referentsgeeni *HPRT* (hüpoksantiin guaniin fosforibosüül transferaas) suhtes. Kasutati järgmist qRT-PCR programmi:

95° C 12 minutit
95° C 15 sekundit
60° C 1 minut

} 40 tsüklit

RIC8A mRNA ekspressiooni suhtelise taseme arvutamiseks kasutati $\Delta\Delta C_t$ meetodit (Pfaffl jt., 2001). Kapatsiteerumata ja kapatsiteerunud spermide *RIC8A* mRNA tasemete erinevuse statistilise olulisuse määramiseks teostati *Student's T-test* kasutades Microsoft Exceli (Microsoft Corporation) funktsiooni TTEST.

2.2.5. Immuunotsütokeemiline analüüs

Immuunotsütokeemilisse analüüsi võeti spermid vastavalt peatükkides 2.2.1 - 2.2.2 toodud metoodikale. Enne adhesiivsetele alusklaasidele (Thermo Scientific, Polysine® slides, Menzel-Gläser) kandmist lahjendati rakke 1:1 1x PBS's, alusklaasile kanti 30 μ l lahjendatud rakke, millele lisati fikseerimiseks 30 μ l 4% PFA/PBS, tõmmati katteklaasiga laiali ja lasti 30 minutit toatemperatuuril kuivada. Preparaate säilitati 4° C juures.

Immuunotsütokeemilise analüüsi jaoks permeabiliseeriti preparaate 0,01% Triton X-100/PBS lahusega 3x 5 minutit ja seejärel 10 minutit 0,1% Triton X-100/PBS lahuses. Sellele järgnes pesu 1x PBS'ga 3x 5 minutit. Antikeha ebaspetsiifilise seondumise vältimiseks inkubeeriti preparaate 1% veise seerumi albumiini (BSA, Sigma-Aldrich)/ PBS lahusega, mis sisaldas 5% kitseseerumit toatemperatuuril niiskuskambris 1 h. Seejärel inkubeeriti preparaate küülikus valmistatud anti-*RIC8A* (Proteintech Group) polükloonaalse antikehaga, mis oli lahjendatud 1:70 1% BSA/PBS'is. Kapatsitatsiooni kontrollimiseks kasutati teise primaarse antikehana hiires valmistatud anti-angiotensiin II tüüp 1 retseptori vastast monoklonaalset antikeha (Abcam PLC) lahjendatuna 1:15 1% BSA/PBS'is. Preparaate inkubeeriti primaarse antikehaga üleöö 4° C juures niiskuskambris. Kõikidel negatiivsetel kontrollidel oli primaarne antikeha asendatud 1% BSA/PBS lahusega. Enne sekundaarse antikeha lisamist pesti preparaate 1xPBT'ga (1xPBS, millele oli lisatud 20% Tween 20 detergenti) 3x10 minutit. Sekundaarsete antikehadena kasutati anti-*RIC8* puhul Alexa fluor 555 konjugeeritud küüliku IgG vastast kitses tehtud antikeha (Invitrogen) lahjendusega 1:800 1% BSA/PBS'is ja anti-angiotensiin II tüüp 1 retseptori puhul Alexa fluor 555 konjugeeritud hiire IgG vastast kitses tehtud antikeha (Invitrogen) lahjendusega 1:800 1% BSA/PBS'is. Preparaate inkubeeriti sekundaarse antikehaga 1 h toatemperatuuril pimendatud niiskuskambris. Järgnevalt teostati pesu 1x PBT'ga 3x10 minutit. Tuumade visualiseerimiseks värviti preparaate 3 minutit DAPI (4,6-diamidino-2-fenüülindool, Sigma Aldrich) lahusega 1:1000 1x PBS'is. Üleliigne DAPI lahust pesti maha 1x PBS'ga 2x 5 minutit ning lisaks veel ka mQ veega. Fluorestsentsi säilitamiseks sulundati preparaadid Fluoroshield (Fluoroshield™, Sigma-Aldrich) sulundusvedelikuga ning seejärel kaeti katteklaasiga, mille servad pitseeriti läbipaistva küünelakiga.

RIC8A valgu lokalisatsiooni dünaamika määramisel kapatsitatsiooni protsessis teostati rühmadevaheliste erinevuste statistilise olulisuse määramiseks Microsoft Exceli (Microsoft Corporation) programmis *Single Factor ANOVA* analüüs.

2.2.6. Western blot valguanalüüs

RIC8A valgu tuvastamiseks inimese spermides viidi läbi *Western blot* valguanalüüs. Spermid töödeldi vastavalt peatükkides 2.2.1-2.2.2 toodud meetodikale. Proovide ettevalmistamisel tsentrifuugiti spermid 15 minutit 1500 g juures 1,5 ml Eppendorfi tuubi põhja, eemaldati supernatant ja pesti 1x PBS'ga. Seejärel kaaluti põhjas olevad rakud ja rakkude lüüsimiseks lisati kaalu järgi 2x SDS/puhver lüüsilahust (50 mg – 1 ml). Et vältida valkude degradatsiooni ja denaturatsiooni hoiti proove jääl. Peale lüüsipuhvri lisamist sonikeeriti proove 10 minutit sonikaatoriga (Diagenode). Proovid säilitati -20° C juures.

Valkude eraldamiseks viidi läbi SDS-PAGE geelelektroforees, kus kasutati 4% koguvat- ja 10% lahutavat polüakrüülamiidgeeli. Geelid valmistati tabelis 1 toodud skeemi alusel.

Tabel 1. Polüakrüülamiidgeeli valmistamine.

Materjalid	10%	4%
30% akrüülamiid	1,33 ml	333 µl
1,5 M Tris/Tric	pH 8,8 (1/4) 1 ml	pH 6,8 (1/8) 312 µl
10% SDS	(0,1 %) 40 µl	(0,1 %) 25 µl
Milli-Q vesi	1,63 ml	1. 83 ml
NAPS (Na-persulfaat)	40 µl (1:100)	25 µl (1:100)
TEMED	4 µl (1:1000)	2,5 µl (1:1000)
Kokku	4 ml	2,5 ml

Geelile kanti 15 µl proovi ja elektroforees toimus 1 h 120 V juures masinaga PowerPac Basic (Bio-Rad). Valkude pikkusmarkerit (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) lisati 5 µl ja jooksupuhvrina kasutati 1x SDSRB puhvrit (25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 0.1% SDS).

Valgud kanti seejärel geelilt üle nitrotselluloos membraanile (Immobilon™ Transfer Membranes, Millipore). Ülekanne toimus 1 h 60 mA juures masinaga PowerPac Basic (Bio-Rad). Peale valkude ülekandumist membraanile blokeeriti membraan TBS(Tris Buffered Saline) lahusega, mis sisaldas 10% NFDM'i (Non-Fat Dry Milk) ja inkubeeriti 1 h

toatemperatuuril. Blokeerimise järgselt pesti membraani TBS puhvris 2x5 minutit. Seejärel inkubeeriti membraani hiire valmistatud RIC8A vastase (Abcam PLC) monoklonaalse antikehaga lahjendatuna 1:800 1% NFDN/ TBS lahuses üleöö 4° C juures. Referentsina kasutati tsentrosoomide markerit hiire valmistatud gamma tubuliini vastast monoklonaalset antikeha (Abcam PLC) lahjendusega 1:5000 1% NFDN/TBS lahuses, millega inkubeeriti membraani samuti üleöö 4° C juures. Peale inkubeerimist primaarse antikehaga pesti membraani TBS lahusega 4x 5 minutit. Seejärel lisati aluselise fosfataasiga konjugeeritud hobuses valmistatud hiire IgG vastane sekundaarne antikeha (Vector laboratories) lahjendusega 1:1000 1% NFDN/TBS lahuses ja inkubeeriti 1 h toatemperatuuril. Peale inkubeerimist pesti membraani uuesti TBS lahusega 4x5 minutit. Tulemuse visualiseerimiseks loputati membraani aluselise fosfataasi puhvri (100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 100 mM Tris pH 9,5; mQ vesi), NBT (Nitro Blue Tetrazolium) 50 mg/ml ja BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) 50 mg/ml substraadi lahuses. Sobiva värvusreaktsiooni ilmunisel reaktsioon lõpetati hoides membraani 5 minutit mQ vees. *Western blot*'i tulemuse visualiseerimiseks digitaliseeriti see kasutades skannerit (Epson Perfection V700 Photo, Epson). Valgu hulga kvantifitseerimiseks kasutati arvutiprogrammi ImageJ.

2.2.7. Rakkude immuunotsütokeemiline märgistamine ja läbivoolu tsütofluoromeetriline (FAC) analüüs

Läbivoolu tsütofluoromeetriliseks analüüsiks teostati spermide *swim-up* ja kapatsitatsioon sarnaselt kirjeldatule peatükkides 2.2.1 ja 2.2.2 Ainsaks erinevuseks oli *swim-up*'i läbiviimine kapatsitatsioonisöötmes, peale mida inkubeeriti sperme kapatsitatsioonisöötmes veel 2 h 37° C juures. Kapatsiteerumata (otse ejakulaadist välja pestud spermid) ja kapatsiteerunud spermidega proovid tsentrifuugiti 380 g juures 5 minutit, eemaldati supernatant ning fikseeriti 2% PFA/PBS lahusega 15 minutit toatemperatuuril. Seejärel töödeldi rakke veel glütsiin (2 mg/ml)/PBS lahusega toatemperatuuril 15 minutit. Fikseeritud spermidele teostati 1,5 ml Eppendorfi tuubis immuunotsütokeemiline RIC8A valgu märgistamine. Kõikides allpool loetletud etappides kasutati spermide segamiseks Thermomixerit (Eppendorf), mis oli seatud minimaalse rotatsiooni peale 300 rpm. Etappidevahelised tsentrifuugimised teostati 380 g juures 5 minutit (Centrifuge 5417C, Eppendorf). Peale fikseerimist pesti rakke 1x PBS'ga 2x 5 minutit. Spermid permeabiliseeriti jääl 10 minutit kasutades 0,1% Triton X-100/PBS lahust. Seejärel teostati pesu 1xPBS'ga 2x5 minutit. Antikeha ebaspetsiifilise seondumise vältimiseks inkubeeriti 1 h toatemperatuuril rakke 1% veise seerumi albumiini (BSA, Sigma-Aldrich, A-4503)/PBS lahusega, mis sisaldas 5% kitse seerumit. RIC8A märgistamiseks inkubeeriti

proove küülikus valmistatud anti-RIC8A (Proteintech Group) polükloonaalse antikehaga (lahjendus 1:70) 1% BSA/PBS'is üleöö 4° C juures. Enne sekundaarse antikeha lisamist pesti proove 1x PBS'ga 2x10 minutit. Sekundaarse antikehana kasutati Alexa fluor 488 konjugeeritud küüliku IgG vastast kitses tehtud antikeha lahjendatuna 1:800 1% BSA/PBS'is (Invitrogen). Proove inkubeeriti sekundaarse antikehaga 1 h toatemperatuuril. Järgnevalt teostati pesu 1x PBS'ga 2x 10 minutit. Tuumade visualiseerimiseks värviti preparaate 5 minutit DAPI (4,6-diamidino-2-fenüülindool, Sigma Aldrich) lahusega 1:1000 1x PBS'is. Enne FAC analüüsi pesti veel proove 1x PBS'ga 2x 5 minutit ning rakud võeti üles 300 µl 1x PBS's. FAC analüüs teostati tehniku poolt kasutades rakusorteri BD FACSAria.

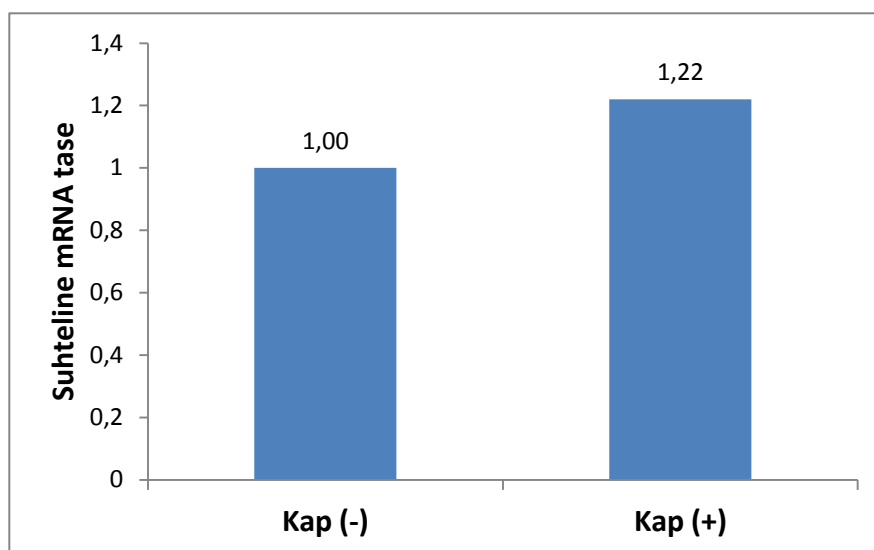
2.2.8. Mikroskoopia ja pilditöötlus

Immuunotsütokeemilise analüüsi preparaatide pildistamiseks kasutati Olympus DP71 digitaalse kaamera varustatud fluorestsents- ja faaskontrastmikroskoopi Olympus BX51 (Olympus Corporation). Samuti kasutati RIC8A lokaliseerimise täpsemaks määramiseks ja pildistamiseks skaneerivat konfokaalmikroskoopi Olympus FluoView 1000 (Olympus Corporation) ja selle pilditöötlustarkvara Olympus FluoView FV1000 Ver.3.0 Viewer'it (Olympus Corporation). Lisaks kasutati piltide järeltöötlemiseks ja rakkude lugemiseks programmi Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Inc.).

2.3. Tulemused

2.3.1. Geeni *RIC8A* mRNA suhteline ekspressiooni tase inimese spermides

RIC8A mRNA ekspressiooni iseloomustamiseks inimese spermides kasutati qRT-PCR analüüsi. Peatükkides 2.2.1 ja 2.2.2 kirjeldatud meetodikat kasutades eraldati aktiivsed spermid (~40 miljonit rakku/ml) ja teostati *in vitro* kapatsitatsioon. Nii kapatsiteerumata kui ka kapatsiteerunud spermidest valmistati *RIC8A* cDNA proovid, millega teostati kvantitatiivne reaalaaja PCR (metoodika käsitletud peatükis 2.2.4). Geeni *RIC8A* mRNA suhtelise ekspressiooni taseme hindamiseks arvutati suhe referentsgeeni *HPRT* suhtes kasutades $\Delta\Delta C_t$ meetodit (Pfaffl, 2001). Katsete tulemusena selgus, et *RIC8A* mRNA on ekspresseeritud nii kapatsiteerumata aktiivsetes kui ka kapatsiteerunud inimese spermides. Statistiliselt olulist erinevust ($P=0,8$) *RIC8A* mRNA ekspressiooni osas kapatsiteerunud ja kapatsiteerumata spermidel ei esinenud (joonis 6).



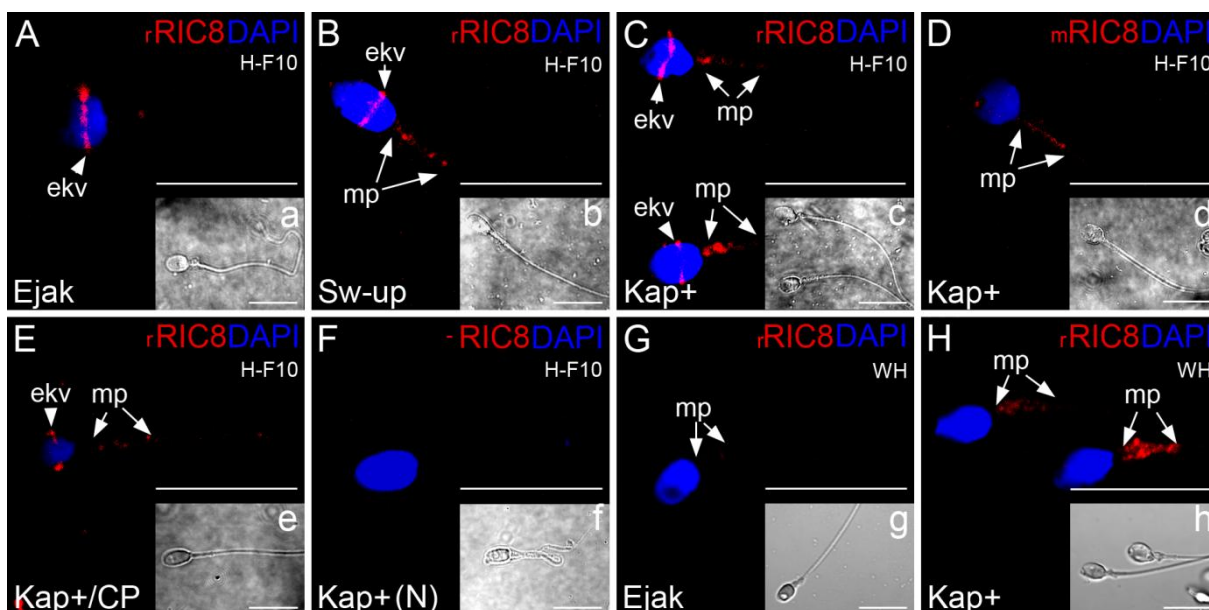
Joonis 6. *RIC8A* mRNA suhteline ekspressiooni tase inimese spermides enne ja pärast kapatsitatsiooni. *RIC8A* mRNA taseme kalkuleerimiseks on kasutatud $\Delta\Delta C_t$ meetodit ning referentsgeeninena *HPRT*. Lühendid: Kap(-), kapatsiteerumata aktiivsed spermid; Kap(+), kapatsiteerunud spermid.

2.3.2. Valgu *RIC8A* lokalisatsioon ja ekspressioon inimese spermides

2.3.2.1. *RIC8A* immunotsütokeemiline analüüs

RIC8A valgu lokalisatsiooni ja ekspressiooni määramiseks inimese spermides viidi läbi immuunotsütokeemiline analüüs. Spermide *in vitro* kapatsitatsiooniks kasutati varasemalt

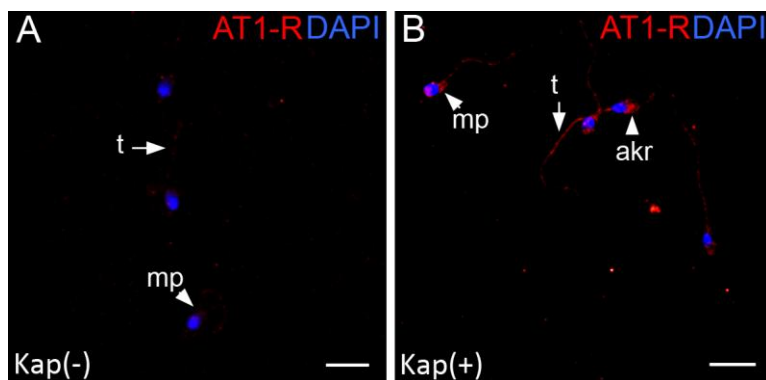
kirjanduses näidatule tuginedes nii Whittens-HEPES (WH) (Escoffier jt., 2012) kui ka Ham's F-10 söötmel (Laflamme jt., 2005) põhinevat kapatsitatsioonisöödet. Spermid jaotati gruppidesse vastavalt peatükis 2.2.1 toodud süsteemile. I rühma moodustasid otse ejakulaadist pärit spermid, II rühma *swim-up* meetodi läbinud spermid, III rühma kapatsitatsiooni protsessi läbi teinud spermid. Nii Ham's F-10 kui ka WH söötme puhul oli märgatav erinevus RIC8A lokaliseerimise ja taseme osas otse ejakulaadist pärinevate spermide ja kapatsitatsiooni protsessi läbinud spermide vahel (joonis 7). Ejakulaadist välja pestud spermidel (I rühm) oli RIC8A lokaliseerunud peamiselt spermide ekvatoriaalses segmendis (joonis 7A). See on piirkond, mis paikneb spermide peas akrosoomi taga, paiknedes rõngana ümber rakutuuma ning omades erilist tähtsust spermide ja munaraku fuseerumisel (Fujihara jt., 2010). Lisaks ekvatoriaalsele segmendile detekteeriti osadel I rühma spermidel mõnevõrra nõrgem RIC8A ekspressioon ka spermide vaheosas (joonis 7A). WH söötme puhul oli I rühma spermides RIC8A ekspressioon, ehkki samades piirkondades kui Ham's F-10 puhul, vaevu märgatav (joonis 7G).



Joonis 7. RIC8A lokaliseerimine inimese spermide *in vitro* kapatsitatsioonil. (A-F) Spermid töödeldud Ham's F-10 (H-F10) söötmes. (G, H) Spermid töödeldud Whittens-HEPES söötmes (WH). RIC8A on visualiseeritud RIC8A antikehadega (rRIC8- *rabbit anti human RIC8A AB*; mRIC8 – *mouse anti human RIC8A AB*) ja AlexaFluor® 555 märgistatud sekundaarse antikehaga (punane). Tuumad on visualiseeritud DAPI'ga (sinine). (A) Värskes ejakulaadis (Ejak) on RIC8A lokaliseerunud peamiselt spermide ekvatoriaalsesse segmendi. (B, C, D, H) *Swim-up*'i (Sw-up) läbinud aktiivsetes spermides ja kapatsitatsiooni läbinud spermides on RIC8A täheldatav märkimisväärselt ka spermide vaheosas. (E) Klooramfenikooliga töödeldud spermides (Kap+/CP) RIC8A lokaliseerimine ja tase oluliselt ei muutunud. (F) Negatiivne kontroll (N), kus on kasutatud ainult sekundaarset antikeha. Lühendid: ekv, ekvatoriaalne segment; mp, vaheosa. Mõõtkava: 10 µm.

Kapatsitatsiooni järgselt tõusis RIC8A tase III rühma spermide vaheosas märgatavalt nii WH kui Ham's F-10 söödet kasutades (joonis 7C, D ja H). Sarnast RIC8A lokaliseerimustrit täheldati ka II rühma spermides (joonis 7B). Nii II kui III rühma spermidel säilis ka ekvatoriaalses segmendis RIC8A ekspressioon (joonis 7B ja C), ehkki osadel spermidel ei olnud selles piirkonnas RIC8A detekteeritav (joonis 7H). Lisaks täheldati mõningatel II ja III rühma spermidel nõrka RIC8A fluorestsentsignaali ka spermi sabaosas (joonis 8D ja F).

Kuna varasemalt oli kirjanduses näidatud, et inimese spermide *in vitro* kapatsitatsiooni käigus toimub hormooni retseptori angiotensiin II tüüp I retseptori (AT1-R) translatsioon (Gur ja Breitbart, 2006; Gur ja Breitbart 2008), siis see andis võimaluse kasutada kapatsitatsiooni hindamiseks anti-AT1-R vastast primaarset antikeha. Sarnaselt Gur ja Breitbarti (2006 ja 2008) töös kirjeldatule tõusis kapatsitatsiooni käigus AT1-R valgu ekspressioon märgatavalt võrrelduna kapatsiteerumata spermidega (joonis 8A ja B). Kapatsiteerunud spermides oli AT1-R ekspresseerunud tugevamalt spermi vaheosas mitokondrite piirkonnas ning samuti akrosoomis, vähemal määral ka spermi sabaosas (joonis 8B). Kuna RIC8A lokaliseerimise katsed toimusid samadel tingimustel paralleelselt AT1-R katsetega, siis võib öelda, et *in vitro* kapatsitatsiooni protsess kulges edukalt.



Joonis 8. Angiotensiin II tüüp I retseptori (AT1-R) lokaliseerimine inimese spermides. AT1-R on visualiseeritud anti-angiotensiin II tüüp I retseptori vastase monoklonaalse antikeha ja AlexaFluor® 555 märgistatud sekundaarse antikehaga (punane). Tuumad on visualiseeritud DAPI'ga (sinine). (A) AT1-R lokaliseerimine kapatsiteerumata (Kap-) spermides. (B) AT1-R ekspressiooni märgatav kasv kapatsiteerunud spermides (Kap+). Lühendid: akr, akrosoom; mp, spermi vaheosa; t, spermi sabaosa. Mõõtkava: 10 µm.

Immuunotsütokeemiliste katsete tulemused näitasid, et RIC8A tase võib kapatsitatsiooni käigus muutuda. Selle kontrollimiseks otsustati uurida kas RIC8 valgu translatsioon võib toimuda mitokondriaalsete 55S ribosoomide vahendusel. Mitokondriaalse translatsiooni masinavärgi inhibiitori D-klooramfenikooli (Gur ja Breitbart, 2006) lisamine

kapatsitatsioonisöötmesse märkimisväärseid erinevusi RIC8A ekspressiooni osas esile ei kutsunud (joonis 7E).

Samuti viidi spermides läbi akrosomaalreaktsioon (AR). Selle *in-vitro* indutseerimiseks inkubeeriti kapatsitatsiooni läbi teinud rakke Ca-ionofoori A23187 juuresolekul (Liu ja Baker, 1998). Reaktsiooni kontrollimiseks värviti rakke Coomassie'1 põhineva Page Blue värviga, mis värvib intaktse akrosoomi puhul selles sisalduvad valgud, kuid värvumine puudub akrosomaalse eksotsütoosi läbi teinud rakkudes. Kuna kapatsiteerumata spermid ei ole võimelised läbima AR'i, siis Ca-ionofoori poolt indutseeritud AR'i toimumine on spermide eduka kapatsitatsiooni läbimise indikaatoriks. Kuigi Page Blue'ga värvimise meetod ei osutunud just parimaks meetodiks AR'i hindamisel, oli akrosomaalsete valkude värvumine enamikes Ca-ionofooriga töötlemata spermides ja värvumise puudumine Ca-ionofooriga töödeldud spermides siiski tuvastatav.

2.3.2.2. Valgu RIC8A lokalisatsiooni dünaamika spermide kapatsitatsiooni protsessis

Kuna RIC8A valgu lokalisatsiooni analüüsil täheldati märgatavaid erinevusi nii rühma siseselt kui rühm I ja rühm III spermide vahel (joonis 7), siis uuriti RIC8A valgu lokalisatsiooni dünaamikat kapatsitatsiooni protsessis täpsemalt kasutades immuunotsütokeemilise reaktsiooni läbinud spermide (rühm I-III) loendamist vastavalt märgisele. Kokku tehti kolm erinevat katset samadel tingimustel, kus loendati spermides RIC8A lokalisatsioonipiirkonnad ning arvutati protsentuaalselt välja nende sagedused populatsioonis.

Analüüsi põhjal jaotati rakud RIC8A lokalisatsiooni piirkondade järgi nelja erinevasse rühma: 1) RIC8A lokaliseerus vaid ekvatoriaalses segmendis (joonis 9B, D, F) 2) RIC8A paiknes lisaks ekvatoriaalsele segmendile ka spermi vaheosas (joonis 9B, D, F) 3) RIC8A lokaliseerus ainult vaheosas 4) RIC8A ekspressioon ei olnud detekteeritav (joonis 9B, kollane nooleots). Kolme katse tulemusena selgus, et RIC8A valgu lokalisatsiooni piirkondade sageduste proportsioonid ning dünaamika olid kõigil katsetel sarnased (tabel 2). Kuigi osadel spermidel oli immuunreaktsioon täheldatav ka nõrgalt spermi sabaosas (joonis 9D, F), jäeti see lokalisatsiooni piirkond edasisest analüüsist välja, kuna see tulemus ei olnud süsteemset reproduutseeruv ja osutus pigem ebaspetsiifiliseks.

Tabel 2. RIC8A lokaliseerimise piirkondade protsentuaalsed sagedused kapatsiteerumata ja kapatsiteerunud inimese spermides.

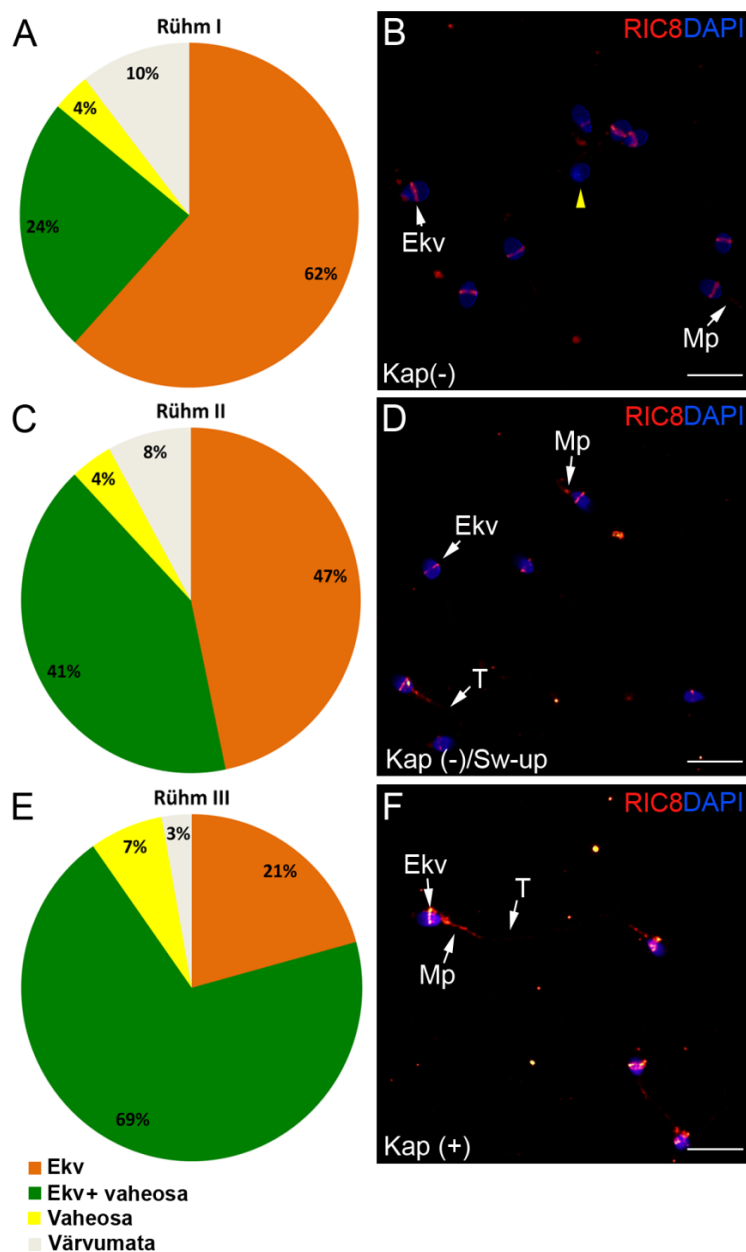
		Loetud rakke	Ekv	Ekv + vah (s)	Vah	Värvumata
Rühm I	Katse II	327	69,1 %	16,5 %	3,4 %	11,0 %
	Katse III	806	54,5 %	31,6 %	3,8 %	10,0 %
	Standardviga		7,3 %	7,6 %	0,2 %	0,5 %
Rühm II	Katse I	560	38,2 %	44,5 %	5,4 %	12,0 %
	Katse II	327	50,8 %	33,9 %	3,7 %	11,6 %
	Katse III	510	50,6 %	42,0 %	3,3 %	4,1 %
	Standardviga		4,2 %	3,2 %	0,6 %	2,6 %
Rühm III	Katse I	50	10,0 %	84,0 %	4,0 %	2,0 %
	Katse II	294	22,4 %	63,6 %	10,9 %	3,1 %
	Katse III	585	20,9 %	72,3 %	4,1 %	2,7 %
	Standardviga		3,9 %	5,9 %	2,3 %	0,3 %
	P - väärtus		0,0036	0,0036	0,4857	0,0460

Lühendid: Ekv, ekvatoriaalne segment; Ekv + vah (s), ekvatoriaalne segment koos vahe- ja sabaosaga; Vah, vaheosa.

Analüüsi tulemustena selgus, et 62% I rühma spermidest lokaliseerus RIC8A vaid ekvatoriaalsesse segmenti (joonis 9A ja B). Peaaegu neljandikul (24 %) selle rühma spermidest lokaliseerus RIC8A nii ekvatoriaalsesse segmenti kui ka vaheosasse (joonis 9A ja B). Suhteliselt väikese osa (4%) moodustasid spermid, kus oli RIC8A täheldatav vaid vaheosas. Kõikidest loendatud spermidest moodustasid värvumata rakud 10% (joonis 9A ja B).

Kapatsiteerumata II rühma spermides lokaliseerus RIC8A 47% loetletud rakkudest ekvatoriaalsesse segmenti (joonis 9C ja D). Võrreldes I rühma spermidega oli mõnevõrra tõusnud ($P=0.1$) selliste rakkude osakaal, kus RIC8A lokaliseerus nii vaheosas kui ekvatoriaalses segmentis, moodustades kõikidest loetud rakkudest 28% (joonis 9C ja D). Värvumata (8%) ja ainult spermi vaheosas (4%) RIC8 lokaliseerimise signaali andnud spermide hulk oluliselt I rühmast ei erinenud (joonis 9C).

Kapatsiteerimise protsessi läbinud III rühma spermides oli võrreldes I ja II grupi spermidega oluliselt ($P<0.01$) kasvanud selliste rakkude osakaal, kus RIC8A lokaliseerus vaheosasse ja ekvatoriaalsesse segmenti, moodustades 69% kogu spermide hulgast (joonis 9E ja F). Proportsionaalselt oluliselt ($P<0.01$) vähem oli populatsioonis sperme, kus RIC8A lokaliseerus vaid ekvatoriaalsesse segmenti (21%) (joonis 9E ja F). Statistiliselt mitte olulisel ($P=0.4$) määral oli mõnevõrra kasvanud spermide osakaal (7%), kus RIC8A ekspressioon oli detekteeritav vaid vaheosas ning võrreldes I ($P<0.01$) ja II rühma ($P=0.06$) spermidega oli vähenenud ka värvumata rakkude (3%) hulk (joonis 9A, C, E).



Joonis 9. Valgu RIC8A lokaliseerimise piirkondade sagedus ja dünaamika spermides *in vitro* kapatsitatsiooni protsessi käigus. (A, C, E) RIC8A peamiste lokaliseerimise piirkondade esinemissagedused protsentides vastavate rühmade (I-III) spermides. (B, D, F) RIC8A (punane) immuunotsütoloogiline analüüs erinevas kapatsitatsiooni järgus (B-I rühm, D-II rühm, F-III rühm) olevatele spermidele. DAPI (sinine) värvusreaktsiooni kasutati DNA visualiseerimiseks. Kollane nooleots tähistab spermide, millel RIC8A signaal ei ole detekteeritav. Lühendid: Ekv, ekvatoriaalsegment; Mp, vaheosa; Kap(-), kapatsiteerumata spermid; Kap (+), kapatsiteerunud spermid; Sw-up, aktiivsed spermid, mis on läbinud *swim-up* töötluste; T, spermide sabaosa. Mõõtskaala 10 µm.

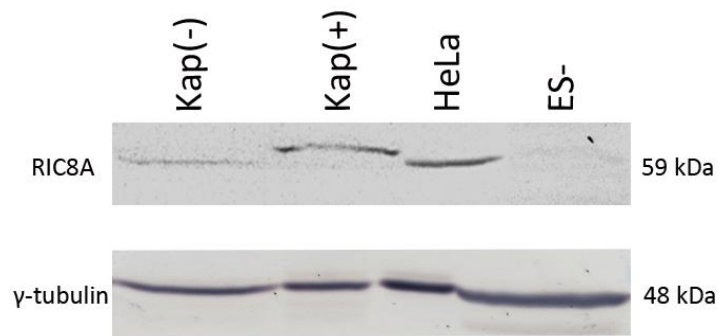
Kokkuvõtvalt antud analüüsi tulemused näitasid, et spermide kapatsitatsioonil toimub RIC8A valgu lokaliseerimise ja ekspressiooni tasemes statistiliselt (tabel 2) olulised muutused. Spermide kapatsitatsiooni käigus lokaliseerub RIC8A lisaks ekvatoriaalsele segmendile ka spermide vaheosas, erinevalt mittekapatsiteerunud spermidest, kus RIC8A paikneb peamiselt ekvaatori piirkonnas. Lisaks lokaliseerimise erinevustele näitasid immuunotsütokeemilised eksperimendid veenvalt ka RIC8A valgu taseme muutusi kapatsitatsiooni käigus.

2.3.3. Valgu RIC8A kontsentratsiooni kvantitatiivne analüüs kapatsitatsiooni protsessis

Kapatsiteerumata ja kapatsiteerunud spermide fluorestsentssignaali võrdlemisel selgus, et kapatsiteerumisel signaal tugevnes ja see andis aluse hüpoteesile, et kapatsiteerumise käigus toimub spermides RIC8A valgu translatsioon. Selleks, et täpsemalt määratleda RIC8A valgukoguse muutust kapatsitatsioonil, viidi järgnevalt läbi nii kvantitatiivne *Western blot* valguanalüüs kui ka FAC analüüs.

2.3.3.1. *Western blot* valguanalüüs

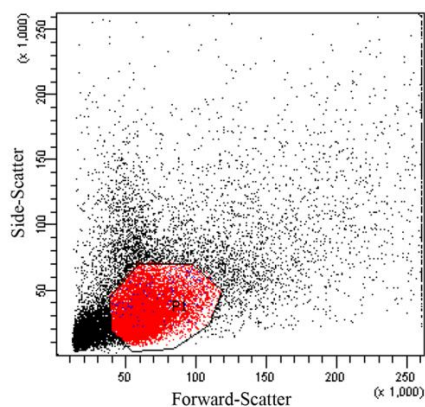
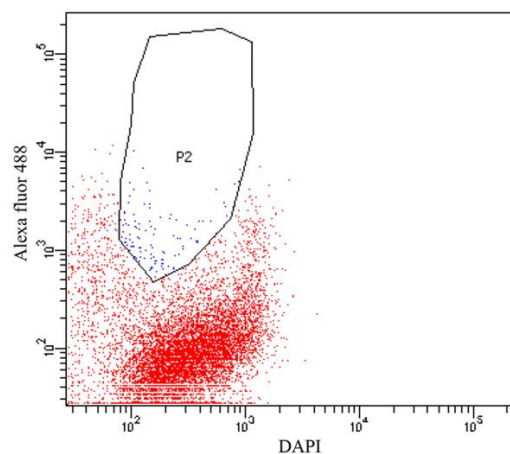
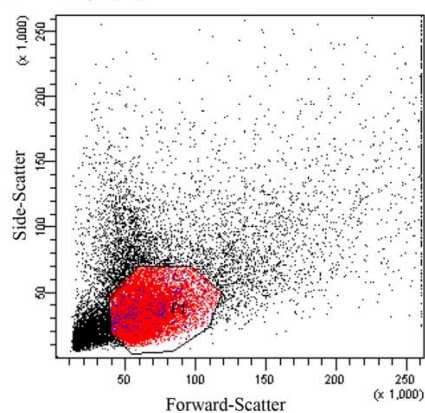
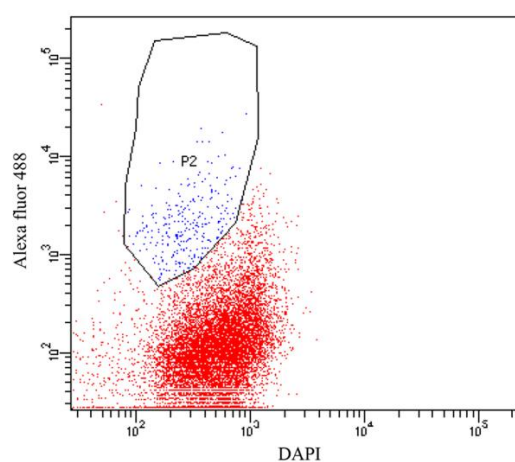
RIC8A valgu ekspressiooni analüüsiks kasutati Whittens-HEPES söötmes kapatsiteeritud sperme. Kapatsiteerumata I rühma ja kapatsiteerunud III rühma spermidest saadud materjali võrdlemisel *Western blot* analüüsiga selgus, et I rühma spermides oli võrreldes III rühma spermidega RIC8A valgu tase märgatavalt (~3,8 korda) tõusnud (joonis 10). Lisaks täheldati, et RIC8A spetsiifiline märgis (~59 kDa) paiknes I rühma spermides mõnevõrra madalamal kui III rühma oma (joonis 10). Antikeha spetsiifilisuse kontrollimiseks kasutati negatiivse kontrollina *Ric8^{-/-}* hiire embüonaalsete tüvirakkude lüsaati ning positiivse kontrollina inimese HeLa kasvajakarakude lüsaati. Ootuspäraselt puudus *Ric8^{-/-}* ES rakkudes RIC8A ekspressioon ning HeLa rakkudes tuvastati bänd suurusega ~59 kDa (joonis 10). Lisaks hinnati lüsaatide valkmaterjali hulka, kasutades kontrollina spermides teadaolevalt ekspresseeritavat γ -tubuliini vastast monoklonaalset antikeha, mis detekteerib valku suurusega ~48 kDa (joonis 10).



Joonis 10. Kapatsiteerumata ja kapatsiteerunud spermide *Western blot* valguanalüüs. Ülemisel real on näidatud RIC8A ekspressioon vastavates rakulüsaatides. I rühma (Kap-) spermides on RIC8A kontsentratsioon märgatavalt madalam kui III rühma (Kap+) spermides. Alumisel real on lüsaatide valgukoguste hindamiseks detekteeritud γ -tubuliini ekspressioon. Lühendid: Kap(+), kapatsiteerunud spermid; Kap(-), kapatsiteerumata spermid; ES-, *Ric8*^{-/-} embrüonaalsed tüvirakud.

2.3.3.2. Läbivoolu tsütofluoromeetiline (FAC) analüüs

Western blotile tulemustele täiendavalt hinnati kapatsitatsiooni käigus toimuva RIC8A valgu taseme tõusu FAC analüüsiga. Kapatsiteerumata (I rühm) ja kapatsiteerunud spermide (III rühm) fluorestsentsisignaali võrdlemiseks loeti FAC analüüsil kokku 20000 sündmust. I rühmast valiti 20000 sündmusest analüüsiks välja 47,1% ehk 9413 sündmust (joonis 11A) ning kapatsiteerunud proovist 57,8% ehk 11555 (joonis 11C). Proovide fluorestsentsisignaali võrdlemisel leiti III rühma spermide populatsiooni *dot plot* graafikul piirkond, kus esines populatsioon, mis puudus I rühma proovis (joonis 11B ja D). Kapatsiteerumata proovis moodustas see piirkond analüüsiks valitud sündmustest 1,1% ehk 108 sündmust, kuid kapatsiteerunud proovis 2,4% ehk 275 sündmust (joonis 11B ja D). Seega FAC analüüsi tulemustest järeldus, et kapatsitatsiooni käigus tõuseb inimese spermides RIC8A valgu hulk ligikaudu 1,3%.

A Kap (-)**B Kap (-)****C Kap (+)****D Kap (+)**

Joonis 11. Kapatsiteerumata ja kapatsiteerunud spermide FAC analüüs. (A) Kapatsiteerumata spermide *forward-* ja *side scatter dot plot* graafik. (B) Kapatsiteerumata spermide fluorestsentsi *dot plot* graafik. (C) Kapatsiteerunud spermide *forward-* ja *side scatter dot plot* graafik. (D) Kapatsiteerunud spermide fluorestsentsi *dot plot* graafik. Punaselt on märgistatud *forward-* ja *side scatter* graafikult analüüsiks valitud populatsioon. Siniselt on märgistatud fluorestsentsi võrdluseks valitud populatsioon. Lühendid: P1, *forward-* ja *side scatter dot plot* graafikult analüüsiks valitud rakkude populatsioon; P2, fluorestsents *dot plot* graafikult võrdlemiseks valitud rakkude populatsioon. Lühendid: Kap (-), kapatsiteerumata spermid; Kap (+), kapatsiteerunud spermid.

2.4. Arutelu

G valkude GEF RIC-8 valk omab olulist rolli mitmetes bioloogilistes ja füsioloogilistes sõlmprotsessides nagu raku signalisatsioon, migratsioon, adhesioon ja rakkude jagunemine. Enamus teadmisi RIC-8 funktsiooni kohta pärinevad katsetest lihtsamate mudelorganismidega nagu *C. elegans*'s ja äädikakärbes. Ehkki loomariigis konserveerunud RIC-8 omab ilmselt sarnaseid funktsioone ka imetajates, on siiski RIC-8 roll imetajates paljuski teadmata. Varasemalt on näidatud, et *Ric8*^{-/-} välja lülitamine on hiire embrüotele letaalne, põhjustades mitmeid varase arengu häireid (Tõnissoo jt., 2010). Lisaks on uuritud RIC8 funktsiooni imetajate närvisüsteemis (Tõnissoo, 2003; Fenech jt., 2009, Vellano jt., 2010; Ma jt., 2012) ning raku jagunemises (Hampoelez jt., 2005; Wang jt., 2005; Woodard jt., 2010). Kuna RIC-8 struktuur sisaldab spetsiifilisi *armadillo* motiive, mis on omased valkudele, millel on mitmeid interaktsioonipartnerid (Figuroa jt., 2009), siis võib RIC8-l olla veel mitmeid avastamata funktsioone.

Antud magistritöö eesmärgiks oli uurida RIC8A võimalikku rolli inimese spermide küpsemisel. Varasemalt oli teada, et hiire spermatogeneesis on *Ric8* ekspresseeritud nii arenevates seemnerakkudes kui Leydigi rakkudes (Pert, 2012). Lisaks on näidatud, et isaste *VasaCreRic8^{lacZ/lox}* hiirte (*Ric8* on neil välja lülitatud spetsiifiliselt idurakkudes) ristamisel *wild type* emastega saadud järglastel esinesid mitmed arenguanomaaliad (Pert 2012; Sillaste, 2012). Tuginedes neile teadmistele keskenduti antud uurimustöös täpsemalt inimese spermide uurimisele kapatsitatsiooni protsessis.

Küpsed inimese spermid sisaldavad hulgaliselt erinevaid mRNA molekule (Ostermeier jt., 2002). Nende seas on tuvastatud ka selliseid, mis kodeerivad viljastumiseks ja embrüonaalseks arenguks vajalikke valke (Ostermeier jt., 2002). Selleks, et uurida kas ka *RIC8A* mRNA esineb inimese küpsetes spermides, teostati qRT-PCR analüüs. Selgus, et *RIC8A* mRNA ekspresseerub sarnaselt nii kapatsiteerunud kui ka kapatsiteerumata spermides ning selle tase kapatsitatsiooni käigus statistiliselt olulisel määral ei muutu. Kuna küpsetes spermides on DNA protamiinide ja histoonide abil tihedalt kokku pakitud, on stabiilne *RIC8A* mRNA tase kapatsitatsioonil kooskõlas faktiga, et küpsetes spermides transkriptsiooni ei toimu (Grunewald jt., 2005).

RIC8A valgu lokalisatsiooni määramiseks kapatsiteerumata ja kapatsiteerunud inimese spermides läbi viidud immuunotsütokeemiline analüüs näitas, et nii otse ejakulaadist pärit kapatsiteerumata kui ka kapatsiteerunud spermides lokaliseerub *RIC8A* valk raku ekvatoriaalsesse segmenti. Ekvatoriaalne segment on akrosoomi üks osadest, mis kulgeb rõngana ümber spermiga. Jäädes spermis intaktseks ka peale akrosomaalreaktsiooni

toimumist, omab ekvatoriaalne segment viljastumisel funktsionaalselt olulist tähtsust (Fujihara jt., 2010). Kuna akrosomaalreaktsiooni käigus toimub plasmamembraani ja välimise akrosomaalse membraani fuseerumine ja eksotsütoos, siis jääb peale akrosomaalreaktsiooni spermi peaosa katma sisemine akrosomaalne membraan ja seda ümbritsev ekvatoriaalne segment. Just selles piirkonnas initsieeritakse viljastumisel fuseerumine munarakuga ning spermi tuumaümbrise lagundamine (Fujihara jt., 2010). Ekvatoriaalses segmendis lokaliseeruvate valkude kohta palju teada ei ole. Varasemalt on kirjeldatud nii inimese kui ka hiire spermide ekvatoriaalses segmendis ja ka postekvatoriaalses piirkonnas spermi ja munaraku fuseerumiseks vajalikku valku IZUMO1 (Inoue jt., 2005). Lisaks on inimese spermide ekvatoriaalses segmendis tuvastatud valk ESP (*equatorial segment protein*) (Wolkowicz jt., 2003) ja hiire spermides valk SPESP1 (*sperm equatorial segment protein 1*) (Fujihara jt., 2010), mis tagavad eduka viljastumise. Kuna enamik teadaolevaid ekvatoriaalsesse segmenti lokaliseerunud valke omavad tähtsat rolli spermi ja munaraku fuseerumisel, siis võib oletada, et ka valk RIC8A omab rolli selles protsessis.

Emassuguteedes toimuva kapatsitatsiooni tulemusena saavutab sperm viljastamisvõime. Üks olulisemaid sündmusi, mis põhjustab erinevate signaaliradade aktiveerumise kapatsitatsioonil on Ca^{2+} -ioonide sissevool rakku. Ca^{2+} -ioonide edasine progresseeruv sissevool rakku käivitab spermides akrosomaalreaktsiooni. RIC8A taseme tõus kapatsitatsioonil ning selle paiknemine ekvatoriaalses segmendis võib viidata tema osalusele akrosomaalreaktsiooni indutseerimisel. Varasemalt on teada, et ZP3 valgu seondumine spermi membraanis asuva retseptoriga ZRK (*Zona receptor kinase*) (Burks jt., 1995) indutseerib spermides akrosomaalreaktsiooni ning see on tundlik pertussis toksiinile (Lee jt., 1992; Bastiaan jt., 1999). Seega on ZP3 valgu poolt akrosomaalreaktsiooni indutseerimine G – valk sõltuv protsess ja antud signaalirajas võib olulist rolli mängida ka guaniini nukleotiidivahetusfaktor, mis on võimeline pikendama ja võimendama G-valgu poolt vahendatud signaali (Tall jt., 2003; Fenech jt., 2009).

Lisaks ekvatoriaalsele segmendile tuvastati immuunotsütokeemilisel analüüsil RIC8A valgu lokaliseerumine ka spermi vaheosa. Spermi vaheosa on piirkond, kus asuvad mitokondrid, mis varustavad motiilset rakku ATP'ga. Üheks oluliseks muutuseks kapatsitatsiooni protsessis oli RIC8A ekspressioonimustri muutus spermi vaheosas. Nimelt kasvas kapatsiteerumise käigus märgatavalt selliste spermide osakaal, kus RIC8A lokaliseerus lisaks ekvatoriaalsele segmendile ka vaheosa. Samuti oli kapatsitatsiooni käigus märkimisväärselt tõusnud RIC8A valgu fluorestsentsisignaal. Sellist RIC8A valgu lokaliseerumise- ja ekspressioonimustrit võib seletada tema rakusisese ümberjaotumise või sünteesi ehk translatsiooniga. Nii immuunotsütokeemilise analüüsi, *Western blot* kui ka FAC

analüüsi tulemused viitavad RIC8A valgusünteesi toimumisele inimese spermides. See ei välista muidugi võimalust, et paralleelselt toimub ka valgu rakusisene ümberjaotumine.

Traditsiooniliselt on sperme peetud translatsiooniliselt inaktiivseteks, kuid on ka tõendeid, mis lükkavad selle väite ümber. Näiteks on Zhao jt., (2009) on näidanud, et hiire spermides tõuseb kapatsitatsiooni käigus 44 valgu tase, millest 26 osalevad spermi ja munaraku ühinemisel (Zhao jt., 2009). Samuti toimub spermides kapatsitatsiooni käigus hormoonireseptori angiotensiin II tüüp I retseptori (AT1-R) translatsioon (Gur ja Breitbart, 2006; Gur ja Breitbart 2008). Kasutades AT1-R vastast antikeha, õnnestus ka meil edukalt näidata, et kapatsitatsioonil toimub AT1-R valgu translatsioon. Translatsiooni eest vastutavate ribosoomide uurimisel avastati, et spermides peaaegu puuduvad tsütoplasmaatilised 28S rRNA molekulid, kuid esinevad 18S rRNA molekulid (Gur ja Breitbart, 2006; Cappallo-Obermann jt., 2011). Kuid tsütoplasmaatilisi ribosome peetakse oma monosomaalse oleku tõttu spermides funktsionaalselt inaktiivseteks (Gur ja Breitbart, 2006; Cappallo-Obermann jt., 2011). Siiski on spermide ribosomaalsete fraktsioonide uurimisel leitud polüsomaalsetes fraktsioonides 12S rRNA molekule ning arvatakse, et valgu translatsiooni viivad spermis läbi mitokondriaalsed 55S ribosoomid (Gur ja Breitbart, 2006). Seega võib RIC8A lokaliseerumine mitokondrite piirkonda spermi vaheossa tuleneda tema translatsioonist selles piirkonnas. Mitokondriaalsete ribosoomide osalust translatsioonil näitab ka see, et AT1-R valgu süntees on mõjutatud mitokondriaalse ja mitte tsütoplasmaatiliste translatsiooni inhibiitorite poolt (Gur ja Breitbart, 2006). Selleks, et uurida 55S ribosoomide osalust RIC8A valgu sünteesil, kasutasime mitokondriaalsete ribosoomide spetsiifilist inhibiitorit D-klooramfenikooli (CP), mis peaks peatama kapatsitatsiooni käigus toimuva valgusünteesi. Normaalsel tingimustel kapatsiteerunud spermide ja CP juuresolekul kapatsiteerunud spermide võrdluses ei ilmnunud RIC8A ega ka AT1-R valgu koguse muutus sellisel määral nagu seda on näidanud Gur ja Breitbart (2006) AT1-R valgu puhul. Valgusünteesi uurimisel spermis CP abil on leitud ka valke, mille tase tõuseb kapatsitatsioonil vaatamata töötlustest CP'ga (Zhao jt., 2009), kuid AT1-R valgu puhul on näidatud selle inhibeerivat toimet (Gur ja Breitbart, 2006). Sellest võib järeldada, et meie poolt läbi viidud spermide CP töötlus ei olnud täielikult õnnestunud kas mittefunktsionaalse CP või teiste teadmata põhjuste tõttu.

Toetudes kirjandusele, kasutasime spermide kapatsiteerimisel kahte erinevat söödet: Whittens-HEPES (Escoffier jt., 2012) ja Ham's F-10 söödet (Laflamme jt., 2005). Whittens-HEPES söödet kasutatakse üldjuhul hiire spermide kapatsiteerimiseks ning Ham's F-10 söödet peamiselt inimese spermide puhul. Mõlema söötmega kapatsiteerimisel olid RIC8A lokalisatsioonipiirkonnad sarnased, ehkki esines mõningaid erinevusi signaali tugevuse osas. Vahe RIC8A ekspressiooni osas spermide vaheosas otse ejakulaadist pärit kapatsiteerumata ja

kapatsiteerunud spermide vahel oli Whittens-HEPES söötme puhul märgatavalt ilmekam. Selle põhjuseks võib olla söötmete koostise erinevus ja ka mõningane erinevus koostisosade kontsentratsioonis.

RIC8A valgu detekteerimiseks kasutati kahte erinevat antikeha: hiires valmistatud RIC8A vastast monoklonaalset antikeha ja küülikus valmistatud RIC8A vastast polükloonaalset antikeha. Mõlemad antikehad detekteerisid immuunotsütokeemilisel analüüsil RIC8A valgu spermide vaheosas, kuigi monoklonaalne antikeha märgatavalt nõrgemalt. Selle põhjuseks võib olla antikehade võime ära tunda erinevaid RIC8A valgul olevaid antigeenseid epitoope. Kuigi immuunotsütokeemilisel analüüsil detekteeris polükloonaalne antikeha RIC8A valgu paremini, siis teadmata põhjustel tundis *Western blot* valguanalüüsil denatureerunud RIC8A valgu ära vaid monoklonaalne antikeha.

Lisaks võib antikehade erinevat seondumist põhjustada RIC8A valgu konformatsiooni muutus, mille tulemusena muutub epitoobi äratuntavus. *Western blot* valguanalüüsil täheldati kapatsiteerunud spermide puhul RIC8A valguriba mõnevõrra kõrgemal kui kapatsiteerumata spermide puhul. Seega võib kapatsitatsioonil suurenda RIC8A valgu molekulmass. Kuna RIC8A sisaldab mitmeid seriini, treoniini ja türosiini jääke, siis on teada, et rakkudes toimub fosforüleerimise näol ka posttranslatsiooniline RIC8A valgu modifitseerimine (Yang jt., 2007). Seega võib RIC8A fosforüleerimise tagajärjel toimuva valgu konformatsioonilise muutuse tõttu tunda antikeha erinevalt ära antigeenseid epitoope. Kuna on teada, et spermide kapatsitatsioonil toimub valkude fosforüleerimine (Signorelli jt., 2012), siis on võimalik, et protsessi käigus toimub ka RIC8A valgu fosforüleerimine.

Kokkuvõtvalt antud magistritöös näidatud tulemused viitavad RIC8A tähtsale funktsioonile inimese spermide küpsemisel. Kapatsitatsiooni protsessi käigus transleeritud valgud on olulised spermide motiilsuse tagamisel, metabolismis, signalisatsiooni reguleerimisel ja viljastumisel ning muutused nende valkude osas võivad olla viljatuse põhjuseks (Zhao jt., 2009). Millistes protsessides RIC8A spermide küpsemisel täpsemalt osaleb on järgmine väljakutse tulevaste uuringute jaoks. RIC8A võib ka reproduktiivmeditsiinilises käsitluses olla huvipakkuv valk. Seni teadaolevalt on näidatud, et idiopaatilise azoospermia, krüptozoospermia ja azoospermia patsientide testise biopsiast pärit materjalil on *RIC8A* ekspressiooni tase madalam kui kontroll indiviididel (NextBio DiseaseAtlas; Ellis jt., 2007). Kuna inimese normaalses ejakulaadis on suur osa sperme kas morfoloogiliselt või funktsionaalselt defektsed (Cooper jt., 2010), siis tuleks edaspidi kaasata uuringutesse rohkem doonoreid ja võtta arvesse ka need spermid, mis antud töös *swim-up* i järgselt eemale jäid. Lisaks oleks huvitav uurida RIC8A võimalikke muutusi viljatutel meesdoonoritel.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida guaniini nukleotiidivahetusfaktori RIC8A ekspressiooni ja lokalisatsiooni inimese spermides kapatsitatsiooni protsessis ning lisaks välja selgitada, kas kapatsitatsiooni käigus võib toimuda RIC8A valgu translatsioon. Selle raames viidi kapatsiteerumata ja kapatsiteerunud inimese spermide lüsaadis oleva *RIC8A* mRNA suhtelise taseme määramiseks läbi kvantitatiivne reaalaaja PCR. RIC8A rakulise lokalisatsiooni ja ekspressiooni määramiseks enne ja peale spermide kapatsiteerumist kasutati immuunotsütokeemilist meetodit. Translatsiooni võimaliku toimumise uurimiseks kapatsitatsiooni protsessis viidi RIC8A valgukoguse kvantitatiivseks määramiseks läbi *western blot* ning läbivoolu tsütofluoromeetiline (FAC) analüüs.

Katsete tulemustest tehti kokkuvõtvalt järgmised järeldused:

- 1) *RIC8A* mRNA on ekspresseeritud nii kapatsiteerumata kui ka kapatsiteerunud inimese spermides ning selle suhteline tase neis statistiliselt olulisel määral ei erine.
- 2) RIC8A valk lokaliseerub kapatsiteerumata spermides eelkõige spermi ekvatoriaalsesse segmenti.
- 3) Kapatsitatsiooni käigus lokaliseerub RIC8A valk lisaks ekvatoriaalsele segmendile ka spermi vaheosas.
- 4) Kapatsitatsiooni käigus RIC8A valgu tase suureneb.

SUMMARY

Localization and expression of guanine nucleotide exchange factor RIC8A in human sperm cells in capacitation process

Fred Väärtnõu

RIC-8 is a guanine exchange factor for G-proteins and in organisms it has important role in important biological and physiological processes like cell signalling, cell migration, adhesion, cell division, early development, development of nervous system and is also functioning as a molecular chaperon. Most of the conducted studies has been made with *C. elegans* and *D. melanogaster*, but less is known about the role of mammalian homologue of RIC-8.

The aim of this study was to investigate the possible role of RIC8A, the human homologue of RIC-8, in maturation of human sperm cells. The final maturation of sperm cells takes place in female genital tract, where sperm cells undergo complex process termed capacitation. As a result of capacitation sperm cells acquire hyperactivated motility and are fully competent to fertilize the oocyte. The main goal of this study was to determine the localization and expression pattern of RIC8A in uncapacitated and capacitated sperm cells and to scrutinize the possibility of translation of RIC8A protein in capacitation process.

To investigate the occurrence of *RIC8A* mRNA in human sperm cells, qRT-PCR analysis was performed. The results of qRT-PCR revealed that the mRNA of *RIC8A* is expressed in both, the uncapacitated and capacitated human sperm cells and there is no considerable difference in the amount of *RIC8A* mRNA between these two groups. Immunocytochemical analysis revealed that in uncapacitated sperm cells RIC8A is mainly localized to the equatorial segment of the cell and in capacitation process it localizes in addition to the equatorial segment also to the sperm midpiece. To investigate the possible translation of RIC8A protein in capacitation process, western blot and FAC (*Fluorescence-activated cell*) analyses were performed. Both methods confirmed the possibility that during capacitation takes place the translation of RIC8A protein.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada professor Margus Poogat ning juhendajaid Tambet Tõnissood ja Merly Saaret. Lisaks lähuvad suured tänusõnad Riho Meierile, Katrin Ruisule, Toomas Jagomäele ja kõikidele teistele kolleegidele nõuannete ja meeldiva töökeskkonna loomise eest.

KIRJANDUSE LOETELU

- Adams I.R. & McLaren A. (2002) Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* 129, 1155-64.
- Adeoya-Osiguwa S.A. & Fraser L.R. (2002) Capacitation state-dependent changes in adenosine receptors and their regulation of adenylyl cyclase/cAMP. *Mol Reprod Dev* 63, 245-55.
- Adhikari A. & Sprang S.R. (2003) Thermodynamic characterization of the binding of activator of G protein signaling 3 (AGS3) and peptides derived from AGS3 with G alpha i1. *J Biol Chem* 278, 51825-32.
- Afshar K., Willard F.S., Colombo K., Johnston C.A., McCudden C.R., Siderovski D.P. & Gonczy P. (2004) RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent Galpha function during asymmetric division of *C. elegans* embryos. *Cell* 119, 219-30.
- Afshar K., Willard F.S., Colombo K., Siderovski D.P. & Gonczy P. (2005) Cortical localization of the Galpha protein GPA-16 requires RIC-8 function during *C. elegans* asymmetric cell division. *Development* 132, 4449-59.
- Aitken R.J., Nixon B., Lin M., Koppers A.J., Lee Y.H. & Baker M.A. (2007) Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl* 9, 554-64.
- Amoureux M.C., Nicolas S. & Rougon G. (2012) NCAM180 regulates Ric8A membrane localization and potentiates beta-adrenergic response. *PLoS One* 7, e32216.
- Anderson R.A., Jr., Feathergill K.A., Rawlins R.G., Mack S.R. & Zaneveld L.J. (1995) Atrial natriuretic peptide: a chemoattractant of human spermatozoa by a guanylate cyclase-dependent pathway. *Mol Reprod Dev* 40, 371-8.
- Arcelay E., Salicioni A.M., Wertheimer E. & Visconti P.E. (2008) Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol* 52, 463-72.
- Arienti G., Carlini E. & Palmerini C.A. (1997) Fusion of human sperm to prostasomes at acidic pH. *Journal of Membrane Biology* 155, 89-94.
- Arnoult C., Kazam I.G., Visconti P.E., Kopf G.S., Villaz M. & Florman H.M. (1999) Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6757-62.
- Asquith K.L., Baleato R.M., McLaughlin E.A., Nixon B. & Aitken R.J. (2004) Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J Cell Sci* 117, 3645-57.

- Asquith K.L., Harman A.J., McLaughlin E.A., Nixon B. & Aitken R.J. (2005) Localization and significance of molecular chaperones, heat shock protein 1, and tumor rejection antigen gp96 in the male reproductive tract and during capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction* 72, 328-37.
- Austin C.R. (1951) Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B* 4, 581-96.
- Bajpai M. & Doncel G.F. (2003) Involvement of tyrosine kinase and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. *Reproduction* 126, 183-95.
- Baker M.A., Hetherington L. & Aitken R.J. (2006) Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *J Cell Sci* 119, 3182-92.
- Baker M.A., Hetherington L., Curry B. & Aitken R.J. (2009) Phosphorylation and consequent stimulation of the tyrosine kinase c-Abl by PKA in mouse spermatozoa; its implications during capacitation. *Dev Biol* 333, 57-66.
- Banerjee M. & Chowdhury M. (1997) Localization of a 25 kDa human sperm surface protein: its role in in-vitro human sperm capacitation. *Molecular Human Reproduction* 3, 109-14.
- Bartles J.R., Wierda A. & Zheng L. (1996) Identification and characterization of espin, an actin-binding protein localized to the F-actin-rich junctional plaques of Sertoli cell ectoplasmic specializations. *J Cell Sci* 109 (Pt 6), 1229-39.
- Bastiaan H., Franken D. & Wranz P. (1999) G-protein regulation of the solubilized human zona pellucida-mediated acrosome reaction and zona pellucida binding. *J Assist Reprod Genet* 16, 332-6.
- Baumgarten H.G., Holstein A.F. & Rosengren E. (1971) Arrangement, ultrastructure, and adrenergic innervation of smooth musculature of the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens of man. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 120, 37-79.
- Beardsley A. & O'Donnell L. (2003) Characterization of normal spermiation and spermiation failure induced by hormone suppression in adult rats. *Biology of Reproduction* 68, 1299-307.
- Beardsley A., Robertson D.M., O'Donnell L. (2006) A complex containing alpha6beta1-integrin and phosphorylated focal adhesion kinase between Sertoli cells and elongated spermatids during spermatid release from the seminiferous epithelium. *J Endocrinol* 190:759-70.
- Bedford J.M. (2004) Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79, 429-60.
- Bellaiche Y., Gho M., Kaltschmidt J.A., Brand A.H. & Schweisguth F. (2001) Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* 3, 50-7.
- Benoit J. (1926). Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétrices du testicule chez les mammifères. *Arch. Anat. Histol. Embryol. (Strasb)*. 5, 173–412.
- Berman D.M., Wilkie T.M. & Gilman A.G. (1996) GAIP and RGS4 are GTPase-activating proteins for the Gi subfamily of G protein alpha subunits. *Cell* 86, 445-52.
- Bray C., Son J.H., Kumar P., Harris J.D. & Meizel S. (2002) A role for the human sperm glycine receptor/Cl(-) channel in the acrosome reaction initiated by recombinant ZP3. *Biology of Reproduction* 66, 91-7.
- Breitbart H. & Naor Z. (1999) Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reviews of Reproduction* 4, 151-9.

- Breitbart H., Lax J., Rotem R. & Naor Z. (1992) Role of Protein-Kinase-C in the Acrosome Reaction of Mammalian Spermatozoa. *Biochemical Journal* 281, 473-6.
- Brener E., Rubinstein S., Cohen G., Shternall K., Rivlin J. & Breitbart H. (2003) Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction* 68, 837-45.
- Bressler R.S. & Ross M.H. (1972) Differentiation of peritubular myoid cells of the testis: effects of intratesticular implantation of newborn mouse testes into normal and hypophysectomized adults. *Biology of Reproduction* 6, 148-59.
- Bressler R.S. & Ross M.H. (1972) Differentiation of peritubular myoid cells of the testis: effects of intratesticular implantation of newborn mouse testes into normal and hypophysectomized adults. *Biology of Reproduction* 6, 148-59.
- Brewis I.A., Clayton R., Barratt C.L., Hornby D.P. & Moore H.D. (1996) Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 2, 583-9.
- Bronson R.A., Peresleni T. & Golightly M. (1999) Progesterone promotes the acrosome reaction in capacitated human spermatozoa as judged by flow cytometry and CD46 staining. *Molecular Human Reproduction* 5, 507-12.
- Buck L.B. (2000) The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell* 100, 611-8.
- Burks D.J., Carballada R., Moore H.D.M. & Saling P.M. (1995) Interaction of a Tyrosine Kinase from Human Sperm with the Zona-Pellucida at Fertilization. *Science* 269, 83-6.
- Caballero-Campo P., Chirinos M., Fan X.J., Gonzalez-Gonzalez M.E., Galicia-Chavarria M., Larrea F. & Gerton G.L. (2006) Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function. *Biology of Reproduction* 74, 760-8.
- Cappallo-Obermann H., Schulze W., Jastrow H., Baukloh V. & Spiess A.N. (2011) Highly purified spermatozoal RNA obtained by a novel method indicates an unusual 28S/18S rRNA ratio and suggests impaired ribosome assembly. *Molecular Human Reproduction* 17, 669-78.
- Chakravarty S., Kadunganattil S., Bansal P., Sharma R.K. & Gupta S.K. (2008) Relevance of glycosylation of human zona pellucida glycoproteins for their binding to capacitated human spermatozoa and subsequent induction of acrosomal exocytosis. *Mol Reprod Dev* 75, 75-88.
- Chakravarty S., Suraj K. & Gupta S.K. (2005) Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C. *Molecular Human Reproduction* 11, 365-72.
- Chan P., Thomas C.J., Sprang S.R. & Tall G.G. (2013) Molecular chaperoning function of Ric-8 is to fold nascent heterotrimeric G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 3794-9.
- Chan P., Gabay M., Wright F.A., Tall G.G. (2011) Ric-8B is a GTP-dependent G protein alpha's guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem.* 286(22):19932-42.
- Chang C., Chen Y.T., Yeh S.D., Xu Q., Wang R.S., Guillouf F., Lardy H. & Yeh S. (2004) Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6876-81.

- Chang M.C. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* **168**, 697-8.
- Chapin R.E., Wine R.N., Harris M.W., Borchers C.H. & Haseman J.K. (2001) Structure and control of a cell-cell adhesion complex associated with spermiation in rat seminiferous epithelium. *J Androl* **22**, 1030-52.
- Chiu P.C., Wong B.S., Chung M.K., Lam K.K., Pang R.T., Lee K.F., Sumitro S.B., Gupta S.K. & Yeung W.S. (2008) Effects of native human zona pellucida glycoproteins 3 and 4 on acrosome reaction and zona pellucida binding of human spermatozoa. *Biology of Reproduction* **79**, 869-77.
- Coleman D.E., Berghuis A.M., Lee E., Linder M.E., Gilman A.G. & Sprang S.R. (1994) Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* **265**, 1405-12.
- Colombo K., Grill S.W., Kimple R.J., Willard F.S., Siderovski D.P. & Gonczy P. (2003) Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Science* **300**, 1957-61.
- Cooper T.G., Noonan E., von Eckardstein S., Auger J., Baker H.W., Behre H.M., Haugen T.B., Kruger T., Wang C., Mbizvo M.T. & Vogelsong K.M. (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update* **16**, 231-45.
- Couwenbergs C., Spilker A.C. & Gotta M. (2004) Control of embryonic spindle positioning and Galpha activity by *C. elegans* RIC-8. *Curr Biol* **14**, 1871-6.
- Cross N.L. (1996) Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: Cholesterol is the major inhibitor. *Biology of Reproduction* **54**, 138-45.
- Cross N.L. (2003) Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biology of Reproduction* **69**, 529-34.
- Cross N.L. (2004) Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biology of Reproduction* **71**, 1367-73.
- Dann C.T., Alvarado A.L., Hammer R.E. & Garbers D.L. (2006) Heritable and stable gene knockdown in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 11246-51.
- David N.B., Martin C.A., Segalen M., Rosenfeld F., Schweisguth F. & Bellaiche Y. (2005) Drosophila Ric-8 regulates Galphai cortical localization to promote Galphai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* **7**, 1083-90.
- De Blas G., Michaut M., Trevino C.L., Tomes C.N., Yunes R., Darszon A. & Mayorga L.S. (2002) The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J Biol Chem* **277**, 49326-31.
- De Blas G.A., Roggero C.M., Tomes C.N. & Mayorga L.S. (2005) Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS Biol* **3**, e323.
- De Rooij D.G, Russell L.D. (2000) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl*. **21**(6):776-98.
- Demarco I.A., Espinosa F., Edwards J., Sosnik J., De La Vega-Beltran J.L., Hockensmith J.W., Kopf G.S., Darszon A. & Visconti P.E. (2003) Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* **278**, 7001-9.
- Dong K.W., Chi T.F., Juan Y.W., Chen C.W., Lin Z., Xiang X.Q., Mahony M., Gibbons W.E. & Oehninger S. (2001) Characterization of the biologic activities of a recombinant human zona pellucida protein 3 expressed in human ovarian teratocarcinoma (PA-1) cells. *Am J Obstet Gynecol* **184**, 835-43; discussion 43-4.

- Du Q.S. & Macara I.G. (2004) Mammalian pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell* 119, 503-16.
- Du Q.S., Stukenberg P.T. & Macara I.G. (2001) A mammalian Partner of inscuteable binds NuMA and regulates mitotic spindle organization. *Nat Cell Biol* 3, 1069-75.
- Einspanier A. & Ivell R. (1997) Oxytocin and oxytocin receptor expression in reproductive tissues of the male marmoset monkey. *Biology of Reproduction* 56, 416-22.
- Einspanier A. & Ivell R. (1997) Oxytocin and oxytocin receptor expression in reproductive tissues of the male marmoset monkey. *Biology of Reproduction* 56, 416-22.
- Ellis P.J., Furlong R.A., Conner S.J., Kirkman-Brown J., Afnan M., Barratt C., Griffin D.K. & Affara N.A. (2007) Coordinated transcriptional regulation patterns associated with infertility phenotypes in men. *J Med Genet* 44, 498-508.
- Escoffier J., Krapf D., Navarrete F., Darszon A. & Visconti P.E. (2012) Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. *J Cell Sci* 125, 473-85.
- Etkovitz N., Rubinstein S., Daniel L. & Breitbart H. (2007) Role of PI3-kinase and PI4-kinase in actin polymerization during bovine sperm capacitation. *Biology of Reproduction* 77, 263-73.
- Evanko D.S., Thiyagarajan M.M., Siderovski D.P. & Wedegaertner P.B. (2001) Gbeta gamma isoforms selectively rescue plasma membrane localization and palmitoylation of mutant Galphas and Galphaq. *J Biol Chem* 276, 23945-53.
- Feki N.C., Therond P., Couturier M., Limea G., Legrand A., Jouannet P. & Auger J. (2004) Human sperm lipid content is modified after migration into human cervical mucus. *Molecular Human Reproduction* 10, 137-42.
- Fenech C., Patrikainen L., Kerr D.S., Grall S., Liu Z., Laugerette F., Malnic B. & Montmayeur J.P. (2009) Ric-8A, a Galpha protein guanine nucleotide exchange factor potentiates taste receptor signaling. *Front Cell Neurosci* 3, 11.
- Figuerola M., Hinrichs M.V., Bunster M., Babbitt P., Martinez-Oyanedel J. & Olate J. (2009) Biophysical studies support a predicted superhelical structure with armadillo repeats for Ric-8. *Protein Sci* 18, 1139-45.
- Finkelstein M., Etkovitz N. & Breitbart H. (2010) Role and regulation of sperm gelsolin prior to fertilization. *J Biol Chem* 285, 39702-9.
- Fisher H.M., Brewis I.A., Barratt C.L.R., Cooke I.D. & Moore H.D.M. (1998) Phosphoinositide 3-kinase is involved in the induction of the human sperm acrosome reaction downstream of tyrosine phosphorylation. *Molecular Human Reproduction* 4, 849-55.
- Fraser L.R. & Adeoya-Osiguwa S. (1999) Modulation of adenylyl cyclase by FPP and adenosine involves stimulatory and inhibitory adenosine receptors and g proteins. *Mol Reprod Dev* 53, 459-71.
- Fujihara Y., Murakami M., Inoue N., Satouh Y., Kaseda K., Ikawa M. & Okabe M. (2010) Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse. *J Cell Sci* 123, 1531-6.
- Gabay M., Pinter M.E., Wright F.A., Chan P., Murphy A.J., Valenzuela D.M., Yancopoulos G.D. & Tall G.G. (2011) Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein alpha subunit membrane association. *Sci Signal* 4, ra79.

- Galantino-Homer H.L., Florman H.M., Storey B.T., Dobrinski I. & Kopf G.S. (2004) Bovine sperm capacitation: Assessment of phosphodiesterase activity and intracellular alkalinization on capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation. *Mol Reprod Dev* 67, 487-500.
- Goodson S.G., Zhang Z.J., Tsuruta J.K., Wang W. & O'Brien D.A. (2011) Classification of Mouse Sperm Motility Patterns Using an Automated Multiclass Support Vector Machines Model. *Biology of Reproduction* 84, 1207-15.
- Gotta M., Dong Y., Peterson Y.K., Lanier S.M. & Ahringer J. (2003) Asymmetrically distributed C. elegans homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo. *Curr Biol* 13, 1029-37.
- Gottsch M.L., Cunningham M.J., Smith J.T., Popa S.M., Acohido B.V., Crowley W.F., Seminara S., Clifton D.K. & Steiner R.A. (2004) A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145, 4073-7.
- Grill S.W., Gonczy P., Stelzer E.H. & Hyman A.A. (2001) Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the Caenorhabditis elegans embryo. *Nature* 409, 630-3.
- Grunewald S., Paasch U., Glander H.J. & Anderegg U. (2005) Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia* 37, 69-71.
- Gur Y. & Breitbart H. (2006) Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev* 20, 411-6.
- Gur Y. & Breitbart H. (2008) Protein synthesis in sperm: Dialog between mitochondria and cytoplasm. *Molecular and Cellular Endocrinology* 282, 45-55.
- Gur Y., Breitbart H., Lax Y., Rubinstein S. & Zamir N. (1998) Angiotensin II induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 275, E87-E93.
- Guttman J.A., Kimel G.H. & Vogl A.W. (2000) Dynein and plus-end microtubule-dependent motors are associated with specialized Sertoli cell junction plaques (ectoplasmic specializations). *J Cell Sci* 113 (Pt 12), 2167-76.
- Guttman J.A., Takai Y. & Vogl A.W. (2004) Evidence that tubulobulbar complexes in the seminiferous epithelium are involved with internalization of adhesion junctions. *Biology of Reproduction* 71, 548-59.
- Hamdi S.M., Vieitez G., Jaspard B., Barbaras R., Perret B., Mieuxset R., Parinaud J. & Collet X. (2010) Effects of human follicular fluid and high-density lipoproteins on early spermatozoa hyperactivation and cholesterol efflux. *Journal of Lipid Research* 51, 1363-9.
- Hampoelz B., Hoeller O., Bowman S.K., Dunican D. & Knoblich J.A. (2005) Drosophila Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. *Nat Cell Biol* 7, 1099-105.
- Harper C.V., Barratt C.L. & Publicover S.J. (2004) Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of [Ca²⁺]_i oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *J Biol Chem* 279, 46315-25.
- Hawkins N. & Garriga G. (1998) Asymmetric cell division: from A to Z. *Genes Dev* 12, 3625-38.
- Hernandez-Gonzalez E.O., Sosnik J., Edwards J., Acevedo J.J., Mendoza-Lujambio I., Lopez-Gonzalez I., Demarco I., Wertheimer E., Darszon A. & Visconti P.E. (2006) Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem* 281, 5623-33.

- Herrick S.B., Schweissinger D.L., Kim S.W., Bayan K.R., Mann S. & Cardullo R.A. (2005) The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *Journal of Cellular Physiology* 202, 663-71.
- Hess R.A. & Chen P. (1992) Computer tracking of germ cells in the cycle of the seminiferous epithelium and prediction of changes in cycle duration in animals commonly used in reproductive biology and toxicology. *J Androl* 13, 185-90.
- Hess R.A. & Chen P. (1992) Computer tracking of germ cells in the cycle of the seminiferous epithelium and prediction of changes in cycle duration in animals commonly used in reproductive biology and toxicology. *J Androl* 13, 185-90.
- Hess R.A., Cooke P.S., Hofmann M.C., Murphy K.M. (2006) Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Cell Cycle*. 2006 Jun;5(11):1164-70.
- Hinrichsen M.J. & Blaquier J.A. (1980) Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *J Reprod Fertil* 60, 291-4.
- Hippe H.J., Ludde M., Schnoes K., Novakovic A., Lutz S., Katus H.A., Niroomand F., Nurnberg B., Frey N. & Wieland T. (2013) Competition for Gbetagamma dimers mediates a specific cross-talk between stimulatory and inhibitory G protein alpha subunits of the adenylyl cyclase in cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 386, 459-69.
- Ho H.C. & Suarez S.S. (2001) Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* 122, 519-26.
- Hollinger S., Taylor J.B., Goldman E.H. & Hepler J.R. (2001) RGS14 is a bifunctional regulator of Galphai/o activity that exists in multiple populations in brain. *J Neurochem* 79, 941-9.
- Hong S.J., Chiu P.C., Lee K.F., Tse J.M., Ho P.C. & Yeung W.S. (2004) Establishment of a capillary-cumulus model to study the selection of sperm for fertilization by the cumulus oophorus. *Human Reproduction* 19, 1562-9.
- Hussein M.R., Abou-Deif E.S., Bedaiwy M.A., Said T.M., Mustafa M.G., Nada E., Ezat A. & Agarwal A. (2005) Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 83, 1447-53.
- Hussein M.R., Abou-Deif E.S., Bedaiwy M.A., Said T.M., Mustafa M.G., Nada E., Ezat A. & Agarwal A. (2005) Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 83, 1447-53.
- Ickowicz D., Finkelstein M. & Breitbart H. (2012) Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl* 14, 816-21.
- Inoue N., Ikawa, M., Isotani, A. and Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily
- Itach S.B.S., Finklestein M., Etkovitz N. & Breitbart H. (2012) Hyper-activated motility in sperm capacitation is mediated by Phospholipase D-dependent actin polymerization. *Dev Biol* 362, 154-61.
- Jaakkola U.M. & Talo A. (1982) Relation of electrical activity to luminal transport in the cauda epididymidis of the rat in vitro. *J Reprod Fertil* 64, 121-6.
- Jaakkola U.M. (1983) Regional variations in transport of the luminal contents of the rat epididymis in vivo. *J Reprod Fertil* 68, 465-70.

- Jain M. & Halder A. (2012) Sertoli cell only syndrome: Status of sertoli cell maturation and function. *Indian J Endocrinol Metab* 16, S512-3.
- Jimenez-Gonzalez C., Michelangeli F., Harper C.V., Barratt C.L.R. & Publicover S.J. (2006) Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. *Human Reproduction Update* 12, 253-67.
- Kanesaki T., Hirose S., Grosshans J. & Fuse N.(2013) Heterotrimeric G protein signaling governs the cortical stability during apical constriction in Drosophila gastrulation. *Mech Dev* **130**, 132-42.
- Keeney D.S., Sprando R.L., Robaire B., Zirkin B.R. & Ewing L.L. (1990) Reversal of long-term LH deprivation on testosterone secretion and Leydig cell volume, number and proliferation in adult rats. *J Endocrinol* **127**, 47-58.
- Khanum A. & Dufau M.L. (1988) Angiotensin II receptors and inhibitory actions in Leydig cells. *J Biol Chem* 263, 5070-4.
- Khanum A. & Dufau M.L. (1988) Angiotensin II receptors and inhibitory actions in Leydig cells. *J Biol Chem* **263**, 5070-4.
- Kirkman-Brown J.C., Bray C., Stewart P.M., Barratt C.L. & Publicover S.J. (2000) Biphasic elevation of [Ca²⁺]_i in individual human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev Biol* 222, 326-35.
- Kisurina-Evgenieva O., Mack G., Du Q.S., Macara I., Khodjakov A. & Compton D.A. (2004) Multiple mechanisms regulate NuMA dynamics at spindle poles. *J Cell Sci* 117, 6391-400.
- Kramer J.A. & Krawetz S.A. (1997) RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome. *Molecular Human Reproduction* 3, 473-8.
- Krueger E.W., Orth J.D., Cao H. & McNiven M.A. (2003) A dynamin-cortactin-Arp2/3 complex mediates actin reorganization in growth factor-stimulated cells. *Mol Biol Cell* 14, 1085-96.
- Laflamme J., Akoum A. & Leclerc P. (2005) Induction of human sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation by endometrial cells and interleukin-6. *Molecular Human Reproduction* 11, 141-50.
- Lakoski K.A., Carron C.P., Cabot C.L. & Saling P.M. (1988) Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigen. *Biology of Reproduction* 38, 221-33.
- Lax Y., Rubinstein S. & Breitbart H. (1994) Epidermal Growth-Factor Induces Acrosomal Exocytosis in Bovine Sperm. *Febs Letters* 339, 234-8.
- Leclerc P., de Lamirande E. & Gagnon C. (1996) Cyclic adenosine 3',5'monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biology of Reproduction* 55, 684-92.
- Lee M.A., Check J.H. & Kopf G.S. (1992) A guanine nucleotide-binding regulatory protein in human sperm mediates acrosomal exocytosis induced by the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 31, 78-86.
- Lin M.J., Lee Y.H., Xu W.A., Baker M.A. & Aitken R.J. (2006) Ontogeny of tyrosine phosphorylation-signaling pathways during spermatogenesis and epididymal maturation in the mouse. *Biology of Reproduction* 75, 588-97.

- Lin Y., Mahan K., Lathrop W.F., Myles D.G. & Primakoff P. (1994) A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *Journal of Cell Biology* 125, 1157-63.
- Lishko P.V., Botchkina I.L. & Kirichok Y. (2011) Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* 471, 387-91.
- Liu D.Y. & Baker H.W.G. (1998) Calcium ionophore induced acrosome reaction correlates with fertilization rates in vitro in patients with teratozoospermic semen. *Human Reproduction* 13, 905-10.
- Logothetis D.E., Kurachi Y., Galper J., Neer E.J. & Clapham D.E. (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 325, 321-6.
- Luconi M., Porazzi I., Ferruzzi P., Marchiani S., Forti G. & Baldi E. (2005) Tyrosine phosphorylation of the a kinase anchoring protein 3 (AKAP3) and soluble adenylate cyclase are involved in the increase of human sperm motility by bicarbonate. *Biology of Reproduction* 72, 22-32.
- Luetjens C.M., Xu E.Y., Rejo Pera R.A., Kamischke A., Nieschlag E. & Gromoll J. (2004) Association of meiotic arrest with lack of BOULE protein expression in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 1926-33.
- Ma S., Kwon H.J. & Huang Z. (2012) Ric-8a, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, regulates bergmann glia-basement membrane adhesion during cerebellar foliation. *Journal of Neuroscience* 32, 14979-93.
- Maldonado-Agurto R., Toro G., Fuentealba J., Arriagada C., Campos T., Albistur M., Henriquez J.P., Olate J., Hinrichs M.V. & Torrejon M. (2011) Cloning and spatiotemporal expression of RIC-8 in *Xenopus* embryogenesis. *Gene Expr Patterns* 11, 401-8.
- Malik S., Ghosh M., Bonacci T.M., Tall G.G. & Smrcka A.V. (2005) Ric-8 enhances G protein betagamma-dependent signaling in response to betagamma-binding peptides in intact cells. *Mol Pharmacol* 68, 129-36.
- Mayorga L.S., Tomes C.N. & Belmonte S.A. (2007) Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life* 59, 286-92.
- Meizel S. & Turner K.O. (1991) Progesterone Acts at the Plasma-Membrane of Human Sperm. *Molecular and Cellular Endocrinology* 77, R1-R5.
- Meizel S., Turner K.O. & Nuccitelli R. (1997) Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Dev Biol* 182, 67-75.
- Miller D., Briggs D., Snowden H., Hamlington J., Rollinson S., Lilford R. & Krawetz S.A. (1999) A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. *Gene* 237, 385-92.
- Miller D., Tang P.Z., Skinner C. & Lilford R. (1994) Differential Rna Fingerprinting as a Tool in the Analysis of Spermatozoal Gene-Expression. *Human Reproduction* 9, 864-9.
- Miller K.G., Emerson M.D., McManus J.R. & Rand J.B. (2000) RIC-8 (synembryn): A novel conserved protein that is required for G(q)alpha signaling in the *C-elegans* nervous system. *Neuron* 27, 289-99.
- Mochizuki N., Cho G., Wen B. & Insel P.A. (1996) Identification and cDNA cloning of a novel human mosaic protein, LGN, based on interaction with G alpha i2. *Gene* 181, 39-43.

- Nagayoshi S., Hayashi E., Abe G., Osato N., Asakawa K., Urasaki A., Horikawa K., Ikeo K., Takeda H. & Kawakami K. (2008) Insertional mutagenesis by the Tol2 transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryn*-like. *Development* **135**, 159-69.
- Navarro B., Kirichok Y. & Clapham D.E. (2007) K_{Sper}, a pH-sensitive K⁺ current that controls sperm membrane potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 7688-92.
- Neer E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249-57.
- Neupert W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **66**, 863-917.
- Nipper R.W., Siller K.H., Smith N.R., Doe C.Q. & Prehoda K.E. (2007) Galphai generates multiple Pins activation states to link cortical polarity and spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14306-11.
- Nishimura A., Okamoto M., Sugawara Y., Mizuno N., Yamauchi J. & Itoh H. (2006) Ric-8A potentiates Gq-mediated signal transduction by acting downstream of G protein-coupled receptor in intact cells. *Genes Cells* **11**, 487-98.
- O'Brien T.W. (1971) The general occurrence of 55 S ribosomes in mammalian liver mitochondria. *J Biol Chem* **246**, 3409-17.
- O'Donnell L., Nicholls P.K., O'Bryan M.K., McLachlan R.I. & Stanton P.G. (2011) Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis* **1**, 14-35.
- O'Donnell L., Pratis K., Wagenfeld A., Gottwald U., Muller J., Leder G., McLachlan R.I. & Stanton P.G. (2009) Transcriptional profiling of the hormone-responsive stages of spermatogenesis reveals cell-, stage-, and hormone-specific events. *Endocrinology* **150**, 5074-84.
- Offermanns S. (2003) G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **83**, 101-30.
- Ohta H., Yomogida K., Dohmae K. & Nishimune Y. (2000) Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development* **127**, 2125-31.
- Oka T., Amikura R., Kobayashi S., Yamamoto H. & Nishida H. (1999) Localization of mitochondrial large ribosomal RNA in the myoplasm of the early ascidian embryo. *Development Growth & Differentiation* **41**, 1-8.
- Oner S.S., Maher E.M., Gabay M., Tall G.G., Blumer J.B. & Lanier S.M. (2013) Regulation of the G-protein regulatory-Galphai signaling complex by nonreceptor guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem* **288**, 3003-15.
- Ostermeier G.C., Dix D.J., Miller D., Khatri P. & Krawetz S.A. (2002) Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* **360**, 772-7.
- O'Toole C.M.B., Arnoult C., Darszon A., Steinhardt R.A. & Florman H.M. (2000) Ca²⁺ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell* **11**, 1571-84.
- Palmerini C.A., Carlini E., Nicolucci A. & Arienti G. (1999) Increase of human spermatozoa intracellular Ca²⁺ concentration after fusion with prostasomes. *Cell Calcium* **25**, 291-6.

- Palmerini C.A., Saccardi C., Carlini E., Fabiani R. & Arienti G. (2003) Fusion of prostasomes to human spermatozoa stimulates the acrosome reaction. *Fertil Steril* 80, 1181-4.
- Pert R. (2012) Guaniini nukleotiivahetusfaktor RIC8 lokaliseerimine hiire ja inimese spermatogeneesis ja idutee-spetsiifilise *VasaCreRic8*^{-/-} konditsionaalse *knock-out* hiireliini tekitamine ning analüüs. Magistritöö
- Peterson Y.K., Bernard M.L., Ma H., Hazard S., 3rd, Graber S.G. & Lanier S.M. (2000) Stabilization of the GDP-bound conformation of G α by a peptide derived from the G-protein regulatory motif of AGS3. *J Biol Chem* 275, 33193-6.
- Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Preininger A.M., Kaya A.I., Gilbert J.A., 3rd, Busenlehner L.S., Armstrong R.N. & Hamm H.E. (2012) Myristoylation exerts direct and allosteric effects on G α conformation and dynamics in solution. *Biochemistry* 51, 1911-24.
- protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434, 234-238.
- Rato L., Alves M.G., Socorro S., Duarte A.I., Cavaco J.E. & Oliveira P.F. (2012) Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nature Reviews Urology* 9, 330-8.
- Ren D., Navarro B., Perez G., Jackson A.C., Hsu S., Shi Q., Tilly J.L. & Clapham D.E. (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413, 603-9.
- Reynolds N.K., Schade M.A. & Miller K.G. (2005) Convergent, RIC-8-dependent G α signaling pathways in the *Caenorhabditis elegans* synaptic signaling network. *Genetics* 169, 651-70.
- Richter W., Dettmer D. & Glander H. (1999) Detection of mRNA transcripts of cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes in ejaculated human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 5, 732-6.
- Russell L.D. (1979) Spermatid-Sertoli tubulobulbar complexes as devices for elimination of cytoplasm from the head region late spermatids of the rat. *Anat Rec* 194, 233-46.
- Russell L.D., Saxena N.K. & Turner T.T. (1989) Cytoskeletal involvement in spermiation and sperm transport. *Tissue Cell* 21, 361-79.
- Saling P.M. (1982) Development of the ability to bind to zonae pellucidae during epididymal maturation: reversible immobilization of mouse-spermatozoa by lanthanum. *Biology of Reproduction* 26, 429-36.
- Schade M.A., Reynolds N.K., Dollins C.M. & Miller K.G. (2005) Mutations that rescue the paralysis of *Caenorhabditis elegans ric-8* (synembryn) mutants activate the G α (s) pathway and define a third major branch of the synaptic signaling network. *Genetics* 169, 631-49.
- Schaefer M., Petronczki M., Dorner D., Forte M. & Knoblich J.A. (2001) Heterotrimeric G proteins direct two modes of asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. *Cell* 107, 183-94.
- Schober M., Schaefer M. & Knoblich J.A. (1999) Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402, 548-51.
- Schuffner A.A., Bastiaan H.S., Duran H.E., Lin Z.Y., Morshedi M., Franken D.R. & Oehninger S. (2002) Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive G(i) protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid. *Molecular Human Reproduction* 8, 722-7.

- Schuffner A.A., Bastiaan H.S., Duran H.E., Lin Z.Y., Morshedi M., Franken D.R. & Oehninger S. (2002) Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive G(i) protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid. *Molecular Human Reproduction* **8**, 722-7.
- Shahar S., Wiser A., Ickowicz D., Lubart R., Shulman A. & Breitbart H. (2011) Light-mediated activation reveals a key role for protein kinase A and sarcoma protein kinase in the development of sperm hyper-activated motility. *Human Reproduction* **26**, 2274-82.
- Sharma M.R., Koc E.C., Datta P.P., Booth T.M., Spremulli L.L. & Agrawal R.K. (2003) Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell* **115**, 97-108.
- Sharpe R.M., McKinnell C., Kivlin C. & Fisher J.S. (2003) Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* **125**, 769-84.
- Signorelli J., Diaz E.S. & Morales P. (2012) Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell Tissue Res* **349**, 765-82.
- Sillaste G. (2012) Ric-8 inaktivatsioon VasaCreRic8lacZ/lox hiireliini gametogeneesis: mõju viljakusele ja järglastele. Bakalaureusetöö
- Simon M.I., Strathmann M.P. & Gautam N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**, 802-8.
- Simoni M., Gromoll J. & Nieschlag E. (1997) The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* **18**, 739-73.
- Smrcka A.V. & Sternweis P.C. (1993) Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C beta by G protein alpha and beta gamma subunits. *J Biol Chem* **268**, 9667-74.
- Sprando R.L. & Russell L.D. (1987) Comparative-Study of Cytoplasmic Elimination in Spermatids of Selected Mammalian-Species. *American Journal of Anatomy* **178**, 72-80.
- Spungin B. & Breitbart H. (1996) Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J Cell Sci* **109**, 1947-55.
- Spungin B., Margalit I. & Breitbart H. (1995) Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J Cell Sci* **108** (Pt 6), 2525-35.
- Srinivasan D.G., Fisk R.M., Xu H. & van den Heuvel S. (2003) A complex of LIN-5 and GPR proteins regulates G protein signaling and spindle function in *C elegans*. *Genes Dev* **17**, 1225-39.
- Strunker T., Goodwin N., Brenker C., Kashikar N.D., Weyand I., Seifert R. & Kaupp U.B. (2011) The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* **471**, 382-6.
- Suzuki N., Hajicek N. & Kozasa T. (2009) Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways. *Neurosignals* **17**, 55-70.
- Svechnikov K., Landreh L., Weisser J., Izzo G., Colon E., Svechnikova I. & Soder O. (2010) Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr* **73**, 93-101.
- Svechnikov K., Landreh L., Weisser J., Izzo G., Colon E., Svechnikova I. & Soder O. (2010) Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr* **73**, 93-101.

- Zamir N., Riven-Kreitman R., Manor M., Makler A., Blumberg S., Ralt D. & Eisenbach M. (1993) Atrial natriuretic peptide attracts human spermatozoa in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 197, 116-22.
- Zarintash R.J. & Cross N.L. (1996) Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone. *Biology of Reproduction* 55, 19-24.
- Zhao C., Guo X.J., Shi Z.H., Wang F.Q., Huang X.Y., Huo R., Zhu H., Wang X.R., Liu J.Y., Zhou Z.M. & Sha J.H. (2009) Role of translation by mitochondrial-type ribosomes during sperm capacitation: an analysis based on a proteomic approach. *Proteomics* 9, 1385-99.
- Zhao M., Shirley C.R., Hayashi S., Marcon L., Mohapatra B., Suganuma R., Behringer R.R., Boissonneault G., Yanagimachi R. & Meistrich M.L. (2004) Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* 38, 200-13.
- Tall G.G. & Gilman A.G. (2004) Purification and functional analysis of Ric-8A: a guanine nucleotide exchange factor for G-protein alpha subunits. *Methods Enzymol* 390, 377-88.
- Tall G.G. & Gilman A.G. (2005) Resistance to inhibitors of cholinesterase 8A catalyzes release of Galphai-GTP and nuclear mitotic apparatus protein (NuMA) from NuMA/LGN/Galphai-GDP complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16584-9.
- Tall G.G., Krumins A.M. & Gilman A.G. (2003) Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G alpha protein guanine nucleotide exchange factor. *Journal of Biological Chemistry* 278, 8356-62.
- Talo A., Jaakkola U.M. & Markkula-Viitanen M. (1979) Spontaneous electrical activity of the rat epididymis in vitro. *J Reprod Fertil* 57, 423-9.
- Taylor S.J., Chae H.Z., Rhee S.G. & Exton J.H. (1991) Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins. *Nature* 350, 516-8.
- Tesarik J., Carreras A. & Mendoza C. (1993) Differential sensitivity of progesterone- and zona pellucida-induced acrosome reactions to pertussis toxin. *Mol Reprod Dev* 34, 183-9.
- Thomas C.J., Briknarova K., Hilmer J.K., Movahed N., Bothner B., Sumida J.P., Tall G.G. & Sprang S.R. (2011) The nucleotide exchange factor Ric-8A is a chaperone for the conformationally dynamic nucleotide-free state of Galphai1. *PLoS One* 6, e23197.
- Thomas C.J., Tall G.G., Adhikari A. & Sprang S.R. (2008) Ric-8A catalyzes guanine nucleotide exchange on G alphai1 bound to the GPR/GoLoco exchange inhibitor AGS3. *J Biol Chem* 283, 23150-60.
- Tonissoo T., Lulla S., Meier R., Saare M., Ruisu K., Pooga M. & Karis A. (2010) Nucleotide Exchange Factor RIC-8 Is Indispensable in Mammalian Early Development. *Developmental Dynamics* 239, 3404-15.
- Tonissoo T., Meier R., Talts K., Plaas M. & Karis A. (2003) Expression of ric-8 (synembryn) gene in the nervous system of developing and adult mouse. *Gene Expr Patterns* 3, 591-4.
- Traver S., Bidot C., Spassky N., Baltauss T., De Tand M.F., Thomas J.L., Zalc B., Janoueix-Lerosey I. & Gunzburg J.D. (2000) RGS14 is a novel Rap effector that preferentially regulates the GTPase activity of galphao. *Biochem J* 350 Pt 1, 19-29.
- Tsai M.Y., Yeh S.D., Wang R.S., Yeh S., Zhang C., Lin H.Y., Tzeng C.R. & Chang C. (2006) Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18975-80.

- Vellano C.P., Maher E.M., Hepler J.R. & Blumer J.B. (2011) G Protein-coupled Receptors and Resistance to Inhibitors of Cholinesterase-8A (Ric-8A) Both Regulate the Regulator of G Protein Signaling 14 (RGS14).G alpha(i1) Complex in Live Cells. *Journal of Biological Chemistry* 286, 38659-69.
- Vellano C.P., Shu F.J., Ramineni S., Yates C.K., Tall G.G. & Hepler J.R. (2010) Activation of the regulator of G protein signaling 14-Galphi1-GDP signaling complex is regulated by resistance to inhibitors of cholinesterase-8A. *Biochemistry* **50**, 752-62.
- Villegas J., Araya P., Bustos-Obregon E. & Burzio L.O. (2002) Localization of the 16S mitochondrial rRNA in the nucleus of mammalian spermatogenic cells. *Molecular Human Reproduction* 8, 977-83.
- Villegas J., Zarraga A.M., Muller I., Montecinos L., Werner E., Brito M., Meneses A.M. & Burzio L.O. (2000) A novel chimeric mitochondrial RNA localized in the nucleus of mouse sperm. *DNA Cell Biol* 19, 579-88.
- Virtanen I., Badley R.A., Paasivuo R. & Lehto V.P. (1984) Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *Journal of Cell Biology* 99, 1083-91.
- Vogl A.W. (1989) Distribution and function of organized concentrations of actin filaments in mammalian spermatogenic cells and Sertoli cells. *Int Rev Cytol* 119, 1-56.
- Von Dannecker L.E.C., Mercadante A.F. & Malnic B. (2005) Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein G alpha olf. *Journal of Neuroscience* 25, 3793-800.
- Walker W.H. & Cheng J. (2005) FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 130, 15-28.
- Wall M.A., Coleman D.E., Lee E., Iniguez-Lluhi J.A., Posner B.A., Gilman A.G. & Sprang S.R. (1995) The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* 83, 1047-58.
- Wang H., Ng K.H., Qian H., Siderovski D.P., Chia W. & Yu F. (2005) Ric-8 controls Drosophila neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. *Nat Cell Biol* 7, 1091-8.
- Wang L., Guo D., Xing B., Zhang J.J., Shu H.B., Guo L. & Huang X.Y. (2011) Resistance to inhibitors of cholinesterase-8A (Ric-8A) is critical for growth factor receptor-induced actin cytoskeletal reorganization. *J Biol Chem* **286**, 31055-61.
- Wang R.S., Yeh S., Chen L.M., Lin H.Y., Zhang C.X., Ni J., Wu C.C., di Sant'Agnese P.A., DeMesy-Bentley K.L., Tzeng C.R. & Chang C.S. (2006) Androgen receptor in sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. *Endocrinology* 147, 5624-33.
- Wang S.C., Lai H.L., Chiu Y.T., Ou R., Huang C.L. & Chern Y. (2007) Regulation of type V adenylylase by Ric8a, a guanine nucleotide exchange factor. *Biochem J* **406**, 383-8.
- Ward C.R., Storey B.T. & Kopf G.S. (1994) Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J Biol Chem* 269, 13254-8.
- Watts V.J., Taussig R., Neve R.L. & Neve K.A. (2001) Dopamine D2 receptor-induced heterologous sensitization of adenylyl cyclase requires Galphas: characterization of Galphas-insensitive mutants of adenylyl cyclase V. *Mol Pharmacol* 60, 1168-72.
- Weinbauer G.F., Behr R., Bergmann M. & Nieschlag E. (1998) Testicular cAMP responsive element modulator (CREM) protein is expressed in round spermatids but is absent or reduced in men with round spermatid maturation arrest. *Molecular Human Reproduction* 4, 9-15.

- Wilkie T.M. & Kinch L. (2005) New roles for Galpha and RGS proteins: communication continues despite pulling sisters apart. *Curr Biol* **15**, R843-54.
- Wistuba J., Schlatt S., Cantauw C., von Schonfeldt V., Nieschlag E. & Behr R. (2002) Transplantation of wild-type spermatogonia leads to complete spermatogenesis in testes of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate response element modulator-deficient mice. *Biology of Reproduction* **67**, 1052-7.
- Wistuba, J., Stukenborg J-B, Luetjens C.M. 2007. Mammalian Spermatogenesis.
- Wodarz A. & Huttner W.B. (2003) Asymmetric cell division during neurogenesis in Drosophila and vertebrates. *Mechanisms of Development* **120**, 1297-309.
- Wolkowicz M.J., Shetty J., Westbrook A., Klotz K., Jayes F., Mandal A., Flickinger C.J. & Herr J.C. (2003) Equatorial segment protein defines a discrete acrosomal subcompartment persisting throughout acrosomal biogenesis. *Biology of Reproduction* **69**, 735-45.
- Woodard G.E., Huang N.N., Cho H., Miki T., Tall G.G. & Kehrl J.H. (2010) Ric-8A and Gi alpha recruit LGN, NuMA, and dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle. *Mol Cell Biol* **30**, 3519-30.
- Woodard G.E., Huang N.N., Cho H., Miki T., Tall G.G. & Kehrl J.H. (2010) Ric-8A and Gi alpha recruit LGN, NuMA, and dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle. *Mol Cell Biol* **30**, 3519-30.
- Xia J.S. & Ren D.J. (2009) Egg Coat Proteins Activate Calcium Entry into Mouse Sperm via CATSPER Channels. *Biology of Reproduction* **80**, 1092-8.
- Yan H.H., Mruk D.D. & Cheng C.Y. (2008) Junction restructuring and spermatogenesis: the biology, regulation, and implication in male contraceptive development. *Curr Top Dev Biol* **80**, 57-92.
- Yang F., Camp D.G., 2nd, Gritsenko M.A., Luo Q., Kelly R.T., Clauss T.R., Brinkley W.R., Smith R.D. & Stenoien D.L. (2007) Identification of a novel mitotic phosphorylation motif associated with protein localization to the mitotic apparatus. *J Cell Sci* **120**, 4060-70.
- Yeung C.H., PerezSanchez F., Soler C., Poser D., Kliesch S. & Cooper T.G. (1997) Maturation of human spermatozoa (from selected epididymides of prostatic carcinoma patients) with respect to their morphology and ability to undergo the acrosome reaction. *Human Reproduction Update* **3**, 205-13.
- Yoshinaga K., Nishikawa S., Ogawa M., Hayashi S.I., Kunisada T., Fujimoto T. & Nishikawa S.I. (1991) Role of C-Kit in Mouse Spermatogenesis - Identification of Spermatogonia as a Specific Site of C-Kit Expression and Function. *Development* **113**, 689-99.
- Young J.S., Guttman J.A., Vaid K.S., Shahinian H. & Vogl A.W. (2009) Cortactin (CTTN), N-WASP (WASL), and Clathrin (CLTC) Are Present at Podosome-Like Tubulobulbar Complexes in the Rat Testis. *Biology of Reproduction* **80**, 153-61.
- Yu F., Kuo C.T. & Jan Y.N. (2006) Drosophila neuroblast asymmetric cell division: recent advances and implications for stem cell biology. *Neuron* **51**, 13-20.
- Yu F., Morin X., Cai Y., Yang X. & Chia W. (2000) Analysis of partner of inscuteable, a novel player of Drosophila asymmetric divisions, reveals two distinct steps in inscuteable apical localization. *Cell* **100**, 399-409.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

NextBio DiseaseAtlas: <https://www.nextbio.com/b/study/ov.nb?id=6091>

LIHTLITSENTS

Mina Fred Väärtnõu

(sünnikuupäev: 23.06.1987)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Guaniini nukelotiidivahetusfaktori RIC8A lokalisatsioon ja ekspressioon inimese spermides kapatsitatsiooni protsessis,

mille juhendajad on Tambet Tõnissoo ja Merly Saare,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **15.06.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013