

РАСТВОРИМЫЕ ФОРМЫ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗ СПЕРМАТОЗОИДОВ

© А. О. Шпаков,¹ К. В. Деркач

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург;

¹*электронный адрес: alex_shpakov@list.ru*

Растворимые (цитозольные) формы аденилатциклазы (АЦ) — фермента, катализирующего превращение АТФ во вторичный посредник цАМФ, играют ключевую роль в регуляции сперматогенеза, контролируют созревание сперматозоидов в придатке яичка и их капацитацию в женском половом тракте, что определяет их способность к оплодотворению. В последние годы достигнуты значительные успехи в изучении структурно-функциональной организации и регуляторных свойств растворимой АЦ (рАЦ), их локализации в сперматозоидах, а также в исследовании функционально сопряженных с рАЦ внутриклеточных каскадов, включающих в себя протеинкиназу А, цАМФ-зависимую фосфодиэстеразу, нерецепторные тирозинкиназы, тирозинфосфатазы и транскрипционные факторы семейства CREB/CREM. Расшифрованы молекулярные механизмы, участвующие в регуляции внутриклеточной концентрации бикарбонат-анионов, основных эндогенных активаторов рАЦ. Получены многочисленные данные о том, что снижение функциональной активности рАЦ и сопряженных с ней сигнальных каскадов и эффекторных белков, а также транспортеров бикарбонат-анионов приводит к нарушениям процесса сперматогенеза, вследствие чего разработка подходов для контроля активности рАЦ в сперматозоидах является одним из приоритетных путей для лечения дисфункций мужской репродуктивной системы. Достижения в изучении растворимых форм АЦ и функционально связанных с ними сигнальных каскадов и эффекторных белков в сперматозоидах, а также нерешенным вопросам в этой области посвящен настоящий обзор.

Ключевые слова: аденилатциклаза, анионный транспортер, бикарбонат-анион, капацитация, протеинкиназа А, сперматозоид, сперматогенез, транскрипционный фактор CREM

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклаза, ПКА — цАМФ-зависимая протеинкиназа, цАМФ-ФДЭ — цАМФ-зависимая фосфодиэстераза, рАЦ — растворимая АЦ, АСТ — тестикулярный активатор фактора CREM (activator of cAMP-responsive element modulator (CREM) in testis), CFTR — регулятор трансмембранной проводимости муковисцидоза (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), CREM — цАМФ-ответственный элемент (cyclic AMP-responsive element modulator).

Структурная организация и механизмы регуляции функциональной организации сперматозоидов, которые из яичек поступают в эпидидимис и затем, после эякуляции, в женский половой тракт, подвергаются значительным изменениям (Visconti et al., 1995a, 1995b; Gadella et al., 2000; Flesch et al., 2001). В наибольшей степени меняется их подвижность. Так, сперматозоиды, покидающие яички, обладают минимальной подвижностью и ограниченной способностью к оплодотворению. Затем в течение эпидидимального транзита и особенно при движении по женским половым путям — влагалищу, матке и маточным трубам — сперматозоиды приобретают способность к прямолинейному поступательному движению и становятся способными к оплодотворению. Как показали исследования последних лет, ключевую роль в этих процессах играют чувствительные к анионам бикарбоната и катионам марганца растворимые (цитозольные) формы аденилатциклазы (рАЦ), которые катализируют синтез важнейшего внутриклеточного вторичного посредника цАМФ (Buck et al., 1999; Chen et al., 2000; Hess et al., 2005; Buck, Levin, 2011; Деркач и др., 2013). Следует отметить, что еще 40 лет назад были получены первые дан-

ные о том, что анионы HCO_3^- в значительной степени усиливают подвижность сперматозоидов во время эпидидимального транзита и необходимы для успешного оплодотворения яйцеклетки, хотя молекулярные механизмы действия анионов бикарбоната тогда были неизвестны (David et al., 1969, 1973).

В настоящее время достигнут значительный прогресс в изучении структурно-функциональной организации, молекулярных механизмов функционирования и регуляции бикарбонат-чувствительных рАЦ сперматозоидов и контролируемых ими внутриклеточных цАМФ-зависимых каскадов. Получены убедительные доказательства в пользу участия рАЦ и синтезируемого ими цАМФ в контроле таких процессов, как сперматогенез, созревание сперматозоидов в придатке яичка и их капацитация в женском половом тракте, включающая в себя приобретение способности к гиперподвижности, направленному движению и акросомальной реакции, что в конечном итоге определяет способность сперматозоидов к оплодотворению. В основе этого лежит регуляция цАМФ-зависимых факторов транскрипции, в первую очередь транскрипционного фактора CREM (cyclic AMP-responsive

element modulator) (Blendy et al., 1996; Nantel et al., 1996; Don, Stelzer, 2002; Wu et al., 2010). Все вышесказанное свидетельствует о том, что разработка подходов для контроля активности рАЦ в сперматозоидах является одним из перспективных направлений для лечения дисфункций мужской репродуктивной системы и имеет большое значение для повышения эффективности искусственного оплодотворения. Достижениям в изучении растворимых форм АЦ и функционально связанных с ними сигнальных каскадов и эффекторных белков, а также нерешенным вопросам в этой области посвящен настоящий обзор.

Структура и регуляторные свойства растворимых форм аденилатциклаз сперматозоидов

Длительное время считали, что контроль цАМФ-зависимых сигнальных каскадов в клетках млекопитающих осуществляется в основном с помощью мембранно-связанных форм АЦ, которые через посредство $\alpha\beta\gamma$ -гетеротримерных G-белков функционально сопряжены с рецепторами серпантинного типа, семь раз пронизывающими плазматическую мембрану. В 1975 г. появилось первое сообщение о том, что в семенниках крыс присутствует рАЦ, которая, как и мембранно-связанная форма фермента, стимулируется катионами магния и марганца, но не ассоциирована с мембранной фракцией тестикулярных клеток (Braun, Dods, 1975). В дальнейшем было показано, что растворимые формы АЦ сперматозоидов активируются анионами бикарбоната, к которым мембранно-связанные формы АЦ не чувствительны (Hune, Garbers, 1979; Garbers et al., 1982; Okamura et al., 1985; Garty, Salomon, 1987; Visconti et al., 1990; Chen et al., 2000; Jaiswal, Conti, 2003; Деркач и др., 2013; Шпаков и др., 2013), а также АТФ (Litvin et al., 2003). При этом активаторы мембранно-связанных форм АЦ, такие как форсколин, гуаниновые нуклеотиды и гормоны различной природы, действующие на АЦ через сопряженные с G-белками рецепторы серпантинного типа, не влияют на активность рАЦ (Braun et al., 1977; Forte et al., 1983; Garty, Salomon, 1987; Buck et al., 1999; Шпаков и др., 2013).

Спустя четверть века после идентификации рАЦ в семенниках был клонирован ген *ADCY10* для этого фермента. Было установлено, что в результате альтернативного сплайсинга генерируются две формы рАЦ — длинная (с мол. массой около 187 кДа) и короткая (около 50 кДа) (Buck et al., 1999; Jaiswal, Conti, 2001). Длинная форма рАЦ состоит из N-концевого домена (50 кДа), который содержит два гетерологичных каталитических субдомена С1 и С2, и значительного по размерам некаталитического С-концевого домена (140 кДа), включающего в себя несколько регуляторных субдоменов, в том числе аутоингибирующий субдомен, локализованный сразу вслед за С2-субдоменом, и ДНК-связывающий субдомен, представленный α -спиральной последовательностью и относящийся к типу лейциновых застежек (leucine zipper) (Buck et al., 1999; Chaloupka et al., 2006). Укороченная форма рАЦ по структуре соответствует N-концевому домену длинной формы фермента (Jaiswal, Conti, 2001). Она не содержит аутоингибирующего субдомена, вследствие чего ее специфическая циклазная активность на порядок выше, чем у длинной формы рАЦ. Исследования кинетики очищенной рекомбинантной рАЦ показали, что аутоингибирующий субдомен вызывает снижение величины

максимальной скорости работы рАЦ (V_{max}), но не приводит к изменению аффинности фермента к субстрату и не влияет на его регуляцию ни одним из известных модуляторов активности рАЦ (Chaloupka et al., 2006). Обе формы рАЦ активируются анионами бикарбоната и чувствительны к широкому набору ингибиторов растворимых форм фермента (Kamenetsky et al., 2006).

Каталитические субдомены С1 и С2 рАЦ сперматозоидов по первичной структуре в большей степени сходны с таковыми АЦ миксобактерий и цианобактерий, а также с растворимыми формами АЦ рыб и иглокожих, чем с каталитическими доменами мембранно-связанных форм АЦ позвоночных животных, что является прямым доказательством сходства и генетической связи рАЦ эукариот и прокариот (Buck et al., 1999; Chen et al., 2000; Cann et al., 2003; Nomura et al., 2005; Tresguerres et al., 2010b). Достаточно много сходства также выявлено между рАЦ сперматозоидов и растворимыми формами фермента у жгутиконосцев, что послужило основанием для гипотезы об эволюционном и функциональном родстве между рАЦ млекопитающих и жгутиконосцев (Шпаков, 2007; Oberholzer et al., 2007; Shpakov, Pertseva, 2008).

Молекулярные механизмы реакции, катализируемой рАЦ, в наибольшей степени изучены для фермента цианобактерии *Spirulina platensis* (Steebhorn et al., 2005). Поскольку ключевые аминокислотные остатки, формирующие каталитические сайты рАЦ млекопитающих и *S. platensis*, высококонсервативны, имеются веские основания полагать, что и молекулярные механизмы катализируемых ими реакций превращения АТФ в цАМФ также являются сходными (Tresguerres et al., 2011). Растворимая форма АЦ является магнийзависимым ферментом. Ее активность модулируется катионами кальция, повышающими аффинность фермента к субстрату, что иллюстрируется снижением значения K_m для Mg^{2+} -АТФ, и стимулируется ионами HCO_3^- , которые повышают значение V_{max} для фермента, но слабо влияют на значение K_m для Mg^{2+} -АТФ (Litvin et al., 2003; Kamenetsky et al., 2006). АТФ взаимодействует с каталитическим сайтом рАЦ в Ca^{2+} -связанной форме, в которой катионы кальция образуют ионные связи с γ -фосфатной группой АТФ, что приводит к так называемому открытому состоянию рАЦ. Затем уже катион магния связывается с α -фосфатной группой АТФ. Это приводит к изменению конформации участвующих во взаимодействии с АТФ аминокислотных остатков каталитического сайта фермента и переводит его в закрытое состояние. Переход из «открытого» в «закрытое» состояние сопровождается образованием сложноэфирной связи между α -фосфатной группой и гидроксильной группой рибозы в аденозине, что и приводит к синтезу циклического продукта — цАМФ. Бикарбонат-анионы способствуют конформационным перестройкам в каталитическом сайте фермента, переводя его в «закрытое» состояние, облегчают доставку катионов Mg^{2+} и ускоряют реакцию циклизации, что и приводит к значительному повышению в их присутствии значения V_{max} для рАЦ (Steebhorn et al., 2005; Tresguerres et al., 2011).

Обе формы рАЦ, длинная и короткая, найдены как в семенниках, так и в сперме млекопитающих (Xie, Conti, 2004; Hess et al., 2005; Wang et al., 2007). Помимо сперматозоидов растворимые формы АЦ идентифицированы в сосудистом сплетении и почках — в тканях, где наблюдаются контролируемые различными факторами колебания концентрации анионов HCO_3^- (Mittag et al., 1993; Chen et al., 2000). Главный из этих факторов — кислотность

среды (рН), даже незначительные колебания которой вне или внутри клетки влияют на равновесную систему $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$, H^+ и как следствие — на концентрацию и доступность анионов бикарбоната (Tresguerres et al., 2011). Недавно было показано, что рАЦ играет важную роль в функционировании сердечно-сосудистой системы (Chen et al., 2012b). С одной стороны, рАЦ и синтезируемый ими цАМФ регулируют апоптотические процессы в кардиомиоцитах и эндотелиальных клетках коронарных сосудов, с другой — контролируют активность электрон-транспортной цепи в митохондриях кардиомиоцитов, регулируя, таким образом, их метаболизм (Acin-Perez et al., 2009; Kumar et al., 2009; Chen et al., 2012b).

Показано, что длинная форма рАЦ локализована не только в цитоплазме, но и в мембранной фракции и оргanelлах сперматид и сперматозоидов, находящихся в пахитене профазы мейоза (Xie, Conti, 2004). Исследование распределения рАЦ в других клетках также указывает на локализацию фермента в ядре, митохондриях и микротубулярном аппарате, что формально противоречит одному из принятых для фермента названий — цитозольная АЦ (Feng et al., 2006).

В мужских генеративных клетках рАЦ в значительных количествах обнаруживается только на поздних стадиях сперматогенеза — от стадии круглых сперматид до стадии ранних удлинённых сперматид (Chen et al., 2000; Sinclair et al., 2000; Xie, Conti, 2004). В семенниках крыс длинная форма рАЦ выявляется на 25-е сут развития, затем ее экспрессия экспоненциально нарастает, достигая максимума к 35 сут, и в дальнейшем у взрослых животных уже существенно не меняется (Xie, Conti, 2004). Анионы бикарбоната начинают оказывать выраженное стимулирующее влияние на активность обеих форм рАЦ в сперматозоидах крыс в возрасте старше 25 сут (Jaiswal, Conti, 2001).

Механизмы регуляции концентрации анионов бикарбоната — эндогенных активаторов растворимых форм аденилатциклаз

Анионы бикарбоната в концентрации 15 мМ вызывают значительное возрастание частоты биения жгутика сперматозоидов, с 2—3 до 7 Гц и более, причем их действие является обратимым (Wennemuth et al., 2003). Анионы HCO_3^- эффективны и в более низких концентрациях. Их стимулирующее влияние на частоту биения жгутика выявляется уже через 5 с после помещения сперматозоидов в бикарбонатную среду и достигает максимума через 30 с. Время достижения полумаксимального эффекта составляет 9 с при действии 15 мМ HCO_3^- и 17.5 с при концентрации 1 мМ. Удаление анионов HCO_3^- приводит к постепенному снижению частоты биения жгутика и возвращению ее к нормальным значениям через 10 мин. В пользу определяющей роли рАЦ и контролируемых ею цАМФ-зависимых каскадов в вызываемой HCO_3^- -стимуляции биения жгутиков сперматозоидов свидетельствуют следующие факты. В присутствии 3-изобутил-1-метилксантина, неселективного ингибитора цАМФ-зависимой фосфодиэстеразы (цАМФ-ФДЭ) — фермента, ответственного за деградацию цАМФ, действие HCO_3^- усиливается, в то время как в присутствии Н89, ингибитора цАМФ-зависимой протеинкиназы (ПКА) — фермента, опосредующего стимулирующее влияние цАМФ на внут-

риклеточные эффекторные белки, он, напротив, исчезает (Wennemuth et al., 2003). Кроме того, 30-минутная инкубация сперматозоидов в присутствии 60 мкМ ацетоксиметилового эфира цАМФ, проникающего через мембрану синтетического аналога цАМФ, приводит к усилению частоты биения жгутиков до 7 Гц.

Источником анионов бикарбоната в сперматозоидах могут быть как внеклеточное пространство, где анионы HCO_3^- являются одним из компонентов жидкости организма или внешней среды, так и метаболические превращения углекислого газа внутри клетки, приводящие к синтезу HCO_3^- (Tresguerres et al., 2010a). Внутрь клетки HCO_3^- может поступать через мембранные анионообменные белки, наиболее важными из которых являются $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, котранспортер NBC и регулятор трансмембранной проводимости муковисцидоза CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Demarco et al., 2003; Florman et al., 2007; Xu et al., 2007). В регуляцию трансмембранного транспорта HCO_3^- в клетку могут быть вовлечены и другие белки и транспортеры, которые сами не транспортируют анионы бикарбоната, но взаимодействуют с транспортерами NBC и CFTR. К ним, в частности, относится недавно открытый тестикулярный анионный транспортер TAT1 (SLC26A8), образующий функционально активный комплекс с CFTR (Rode et al., 2012).

Основным механизмом, приводящим к повышению концентрации бикарбонатных анионов как в цитоплазме, так и вне клетки, является активация цитозольных или внеклеточных форм фермента карбоангидразы, а также синтез HCO_3^- этим ферментом внутри митохондрий (Ziprin et al., 2003; Acin-Perez et al., 2009; Wandernoth et al., 2010). У млекопитающих идентифицировано 16 типов карбоангидраз, активность которых зависит от катионов Zn^{2+} , связывающихся с каталитическим сайтом фермента. Карбоангидразы катализируют реакцию гидратации молекулы CO_2 , в результате чего синтезируются катионы водорода и анионы HCO_3^- (Supuran, 2008). В репродуктивном тракте млекопитающих превалирует карбоангидраза IV, которая обычно ассоциирована с внеклеточной поверхностью мембраны и осуществляет синтез внеклеточного HCO_3^- , лежащего в основе активации сперматозоидов при их прохождении по протокам эпидидимиса (Parkkila et al., 1993; Kaunisto et al., 1999; Ekstedt et al., 2004; Wandernoth et al., 2010). У мышей, лишенных функционально активного гена карбоангидразы IV, базальная активность АЦ в сперматозоидах снижена на 32 %, вследствие чего наблюдается значительное ослабление вызываемой действием CO_2 стимуляции частоты биения жгутика. Так, у мышей дикого типа в присутствии CO_2 частота биения жгутика возрастает в 2.4 раза, у мышей, нокаутных по гену карбоангидразы IV, — только в 1.7 раза. При этом проникающий через мембрану аналог цАМФ — cBIMPS — с одинаковой эффективностью стимулирует частоту биения жгутика у мышей дикого типа и у нокаутных животных, что указывает на расположение карбоангидразы IV выше АЦ в механизме регуляции подвижности сперматозоидов (Wandernoth et al., 2010). Следует, однако, отметить, что ингибиторы карбоангидразы IV лишь частично снижают стимулирующий эффект CO_2 на частоту биения жгутиков, что может свидетельствовать о компенсаторном синтезе анионов бикарбоната карбоангидразами, расположенными внутри сперматозоида, в первую очередь карбоангидразой II (Kaunisto et al., 1999; Mannowetz et al., 2012).

Повышенный уровень бикарбоната выявлен не только в эпидидимисе самца, но и в половых путях самки, причем синтез анионов HCO_3^- осуществляется в основном в матке, как это показано на примере мышей (Mannowetz et al., 2011). Количество анионов HCO_3^- , которое выделяется маткой, контролируется гормонами, регулирующими эстральный цикл, и зависит от функциональной активности анионообменного белка CFTR. Так, концентрация анионов бикарбоната в матке у мышей на стадии эструса в 2 раза выше, чем на стадии диэструса, и в 4 раза выше, чем у неполовозрелых животных. Показано, что стимулирующее влияние маточной жидкости на частоту биения жгутика у сперматозоидов положительно коррелирует с содержанием в ней анионов HCO_3^- . Это указывает на то, что изменение баланса анионов бикарбоната в половых путях самки может влиять на оплодотворяющую способность сперматозоидов и быть одной из причин стерильности.

Важным фактором, вызывающим повышение уровня бикарбонатных анионов в эпидидимисе и семенной жидкости, является глюкоза. Действуя в физиологической концентрации (5 мМ), глюкоза в течение 10 мин в 2 раза повышает частоту биения жгутика у сперматозоидов, и этот эффект сохраняется в течение 60 мин (Mannowetz et al., 2012). Действие глюкозы зависит от значения pH и наиболее выражено при $\text{pH} \sim 7.1$, причем добавление энергетических субстратов (лактата и пирувата в концентрациях, близких к физиологическим), которое вызывает сравнительно небольшое снижение значения pH, полностью блокирует стимулирующий эффект глюкозы на частоту биения жгутика. Сходный результат наблюдается при добавлении специфичных ингибиторов карбоангидраз (ацетазоламида и этоксизоламида), рАЦ (КН-7) и ПКА (Н89). Это указывает на то, что потребление сперматозоидами глюкозы приводит к повышению синтеза и секреции анионов бикарбоната, что в конечном итоге и активирует внутриклеточные цАМФ-зависимые сигнальные каскады (Mannowetz et al., 2012). В основе влияния глюкозы на внутриклеточный уровень HCO_3^- и активность АЦ, как полагают, лежит недавно открытый механизм, в соответствии с которым углекислый газ, поступающий в митохондриях в цикле Кребса, с помощью митохондриальной карбоангидразы превращается в бикарбонат-анионы, которые активируют локализованные внутри митохондрий рАЦ (Acin-Perez et al., 2009). Как и в случае вызываемого глюкозой повышения частоты биения жгутиков, ингибиторы карбоангидраз и рАЦ полностью подавляют индуцированное глюкозой повышение уровня цАМФ внутри митохондрий сперматозоидов, что свидетельствует об исключительной роли рАЦ в синтезе цАМФ внутри митохондрий.

Внутриклеточная концентрация бикарбонатных анионов регулируется специфичным для сперматозоидов Na^+/H^+ -обменным белком NHE, который контролирует кислотно-основное равновесие внутри сперматозоидов (Wang et al., 2007). В сперматозоидах выявлены два NHE-белка — NHE1 и NHE5, причем для функционирования цАМФ-зависимых каскадов наиболее важным является NHE5-белок (Bell et al., 1999). Показано, что при помещении в бикарбонатную среду мышинных сперматозоидов, лишенных генов, кодирующих NHE-белки, повышения внутриклеточного уровня цАМФ не происходит, несмотря на то что активность и регуляторные свойства рАЦ при этом не меняются (Wang et al., 2007). Это указывает на участие NHE-белков в регуляции транспор-

та анионов бикарбоната внутрь сперматозоидов и их внутриклеточной концентрации, которая нарушается у нокаутных мышей. Один из механизмов такой регуляции состоит в том, что NHE-белок обменивает катионы водорода, которые образуются внутри клетки как побочный продукт катализируемой карбоангидразами реакции превращения CO_2 в HCO_3^- , на внеклеточные катионы натрия, что сдвигает равновесие реакции в сторону образования анионов бикарбоната и повышает их стабильность внутри клетки. Сходный механизм описан для NHE1-белка в почечных канальцах и NHE3-белка в эпителии кишечника (Schultheis et al., 1998; Good et al., 2004). Второй механизм заключается в снижении функциональной активности других транспортных белков, контролирующих внутриклеточную концентрацию анионов бикарбоната, таких как $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -котранспортер NBC (Wang et al., 2007). Следует отметить, что NHE-белки концентрируются вблизи основания жгутика сперматозоида, где они создают оптимальную для синтеза бикарбонатных анионов кислотность среды, что способствует активации рАЦ и локальному повышению концентрации цАМФ.

Сигнальные каскады и транскрипционные факторы, регулируемые рАЦ сперматозоидов

Общими нижележащими звеньями в цАМФ-зависимых каскадах, запускаемых через различные формы АЦ, являются ПКА, цАМФ-ФДЭ, обменный белок, активируемый цАМФ (exchange protein activated by cAMP, EPAC), а также регулируемые циклическими нуклеотидами ионные каналы.

Фермент цАМФ-ФДЭ катализирует реакцию превращения цАМФ в неактивный метаболит 5'-АМФ и тем самым снижает уровень внутриклеточного цАМФ. В сперматозоидах обнаружено несколько типов ФДЭ (1-й и 8-й типы), которые характеризуются низкой селективностью и гидролизуют как цАМФ, так и цГМФ, и специфичная для цАМФ ФДЭ 4-го типа. На это указывают данные по экспрессии ФДЭ в сперматозоидах млекопитающих, а также влияние на гидролиз цАМФ селективных регуляторов активности различных типов ФДЭ (Chaudhry, Casillas, 1988; Naro et al., 1996; Fisch et al., 1998; Yan et al., 2001; Tsai, Beavo, 2012). В эякулированных сперматозоидах человека идентифицированы мРНК-транскрипты для ФДЭ 1-, 2-, 3-, 4-, 5- и 8-го типов, хотя интенсивность сигналов для них сильно различается (Richter et al., 1999; Lefièvre et al., 2002). Показано, что скорость гидролиза цАМФ в семенной жидкости в 3 раза выше, чем цГМФ (Lefièvre et al., 2000). Это указывает на преобладание в сперматозоидах форм ФДЭ, селективных к цАМФ, что хорошо согласуется с ключевой ролью цАМФ в регуляции оплодотворяющей способности и подвижности сперматозоидов.

Уже через 60 с после добавления в среду анионов бикарбоната наблюдаются значительное повышение внутриклеточного уровня цАМФ и стимуляция активности ПКА, серинтреониновой протеинкиназы, которая является ключевым эффекторным белком в цАМФ-зависимых сигнальных каскадах, ответственным за фосфорилирование большого числа внутриклеточных мишеней. Одной из мишеней ПКА являются специфичные для сперматозоидов потенциалзависимые кальциевые каналы, относящиеся к семейству CatSper, активация которых вследст-

вие фосфорилирования приводит к быстрому изменению мембранного потенциала и повышению концентрации внутриклеточного Ca^{2+} (Wennemuth et al., 2003). В сперматозоидах экспрессируются только два из четырех CatSper-каналов, CatSper1 и CatSper2, причем стабильная экспрессия гена, кодирующего CatSper1-канал, требует присутствия в сперматозоиде CatSper2-белка, и наоборот. Вследствие этого мышинные сперматозоиды, нокаутные только по одному из генов, кодирующих CatSper1- и CatSper2-каналы, не способны к капацитации, что ведет к потере ими фертильности (Carlson et al., 2005). При этом оба фенотипа сперматозоидов, нокаутных по гену *CatSper1* или гену *CatSper2*, полностью идентичны. Ингибитор ПКА H89 блокирует проводимость CatSper-каналов, препятствует повышению концентрации внутриклеточного кальция и снижает частоту биения жгутика сперматозоида. Активаторы CatSper-каналов прокаин и 4-аминопиридин, а также повышение pH, стимулирующее проводимость CatSper-каналов, приводят к усилению подвижности сперматозоидов (Chang, Suarez, 2011). Важно отметить, что в сперматозоидах, нокаутных по генам *CatSper1* или *CatSper2*, значительно снижен базальный уровень $[Ca^{2+}]_i$, что связано с нарушением его доставки через кальциевые каналы из внеклеточного пространства. Добавление во внеклеточную среду Ca^{2+} -хелатирующего агента ВАРГА-АМ в случае мышинных сперматозоидов дикого типа приводит к тем же нарушениям кальциевой сигнализации, что и в случае сперматозоидов, лишенных функционально активных CatSper-каналов (Marquez et al., 2007).

Другими мишенями ПКА являются тирозиновые протеинкиназы, которые активируются вследствие их фосфорилирования ПКА по остаткам серина и треонина, а также протеинфосфотирозинфосфатазы, активность которых в результате такого фосфорилирования, напротив, снижается. В результате происходит усиление фосфорилирования внутриклеточных эффекторных белков по остаткам тирозина, что в конечном итоге приводит к запуску процесса капацитации сперматозоидов (Salicioni et al., 2007; Bailey, 2010). Взаимосвязь между активацией ПКА, цАМФ-зависимым тирозиновым фосфорилированием и капацитацией впервые обнаружена еще в 1990-е годы в опытах *in vitro* со сперматозоидами человека и мыши (Naz et al., 1991; Visconti et al., 1995b). Повышение уровня тирозинового фосфорилирования наблюдается в основном на поздних стадиях капацитации сперматозоидов и может рассматриваться как биохимическая характеристика этих стадий (Arcelay et al., 2008). Ингибирование активности ПКА полностью блокирует тирозиновое фосфорилирование на поздних стадиях капацитации, вызываемое добавлением анионов HCO_3^- , причем сходный эффект оказывает добавление ингибиторов ПКА как через 90 с, так и через 30 мин после обработки сперматозоидов анионами бикарбоната (Morgan et al., 2008). Последнее указывает на то, что ПКА, будучи длительное время активирована, контролирует тирозиновое фосфорилирование на протяжении всего процесса капацитации. Ингибирование тирозинового фосфорилирования на стадии капацитации приводит к нарушению связывания сперматозоидов с гликопротеиновой оболочкой вокруг плазматической мембраны яйцеклетки (*zona pellucida*) и ведет к потере ими фертильности (Buffone et al., 2009). Показано, что активация ПКА восстанавливает процесс фосфорилирования белков по остаткам тирозина и делает сперматозоиды способными к оплодотворению яйцеклет-

ки (Liu et al., 2009, 2013). Следует также отметить, что наряду с ПКА в регуляцию процесса тирозинового фосфорилирования включены формы протеинкиназы С, чувствительные к форболовым эфирам (Signorelli et al., 2012; Liu et al., 2013).

Основной мишенью цАМФ-зависимых каскадов, запускаемых вследствие активации рАЦ, являются цАМФ-зависимые транскрипционные факторы, относящиеся к семейству CREB/CREM, которые с высокой интенсивностью экспрессируются в клетках Сертоли и в гаплоидных сперматидеах и контролируют транскрипцию большого числа генов, ответственных за сперматогенез и капацитацию сперматозоидов (Don, Stelzer, 2002; Martianov et al., 2010; Gómez et al., 2012). Наиболее важную роль среди них играет транскрипционный фактор CREM- τ , который на постмейотических стадиях регулирует транскрипцию генов, ответственных за реорганизацию хроматина и удлинение сперматид, что необходимо для их созревания. У мышей, лишенных фактора CREM- τ или АСТ (activator of cAMP-responsive element modulator (CREM) in testis), специфичного для тестикул активатора фактора CREM, созревание сперматозоидов останавливается на ранних стадиях спермиогенеза, возникают морфологические нарушения, такие как неправильно сформированный, функционально неактивный жгутик и неправильная форма головки сперматозоида, что делает сперматозоиды стерильными (Blendy et al., 1996; Nantel et al., 1996; Kotaja et al., 2004). Следует отметить, что ко-активатор АСТ взаимодействует со специфичным для семенников кинезином KIF17b, а также с ассоциированным со сперматозоидами антигеном 8 (SPAG8, sperm associated antigen 8), которые повышают функциональную активность АСТ и играют, таким образом, важную роль в контроле транскрипции генов, опосредуемой через CREM/АСТ-комплекс (Krausz, Sassone-Corsi, 2005; Wu et al., 2010).

Формы рАЦ сперматозоидов и дисфункции мужской репродуктивной системы

Первые данные о взаимосвязи между активностью рАЦ и нарушением тестикулярной функции относятся к 1981 г., когда было показано, что у крыс с экспериментальным односторонним крипторхидизмом наблюдается сильное снижение активности Mg^{2+} -зависимой рАЦ в сперматидеах (Jahnsen et al., 1981). Уже через 3 сут после операции активность фермента снижалась на 82 %. В дальнейшем были получены убедительные доказательства того, что рАЦ совершенно необходима для нормального созревания сперматозоидов и их фертильности (Esposito et al., 2004; Xie et al., 2006, 2013). При этом к снижению или полному блокированию фертильности сперматозоидов приводили нарушения на различных стадиях регуляции активности рАЦ и зависимых от нее внутриклеточных эффекторных систем. Это и транспорт регуляторов активности рАЦ — анионов бикарбоната и катионов кальция, и собственно каталитическая активность фермента, и функциональная активность нижележащих цАМФ-зависимых звеньев — ПКА, тирозинкиназ, протеинтирозинфосфатаз и транскрипционных факторов. Так, например, еще в 1995 г. было установлено, что 95 % мужчин, страдающих муковисцидозом, являются стерильными, причем причинами бесплодия являются тяжелые

формы олигоспермии и азооспермия, а также нарушение формирования семявыносящих протоков (Chillon et al., 1995; Chan et al., 2009; Chen et al., 2012a). Одним из факторов, ведущих к муковисцидозу, являются мутации в гене, кодирующем регулятор трансмембранной проводимости муковисцидоза CFTR, который ответствен за транспорт анионов бикарбоната. При этом нарушения наблюдаются как в генеративных клетках, так и в клетках Сертоли, что, как полагают, зависит от типа мутации в гене *Cftr*. Нокаут гена *Cftr* у мышей вызывает значительное снижение массы яичек и сильно выраженное уменьшение выработки спермы, что сопровождается снижением базальной активности рАЦ и подавлением экспрессии цАМФ-зависимых транскрипционных факторов семейства CREB/CREM в семенниках животных (Xu et al., 2011).

Необходимо отметить, что формы рАЦ вовлечены в развитие заболеваний, не затрагивающих репродуктивную систему. Показана взаимосвязь между нарушением функционирования рАЦ и сердечно-сосудистыми заболеваниями. Здесь выделяют два основных механизма — вовлечение рАЦ в митохондриальный апоптоз в коронарных эндотелиальных клетках (Kumar et al., 2009) и их влияние на окислительное фосфорилирование в митохондриях кардиомиоцитов (Chen et al., 2012a). Это существенно расширяет актуальность изучения форм рАЦ как важнейших регуляторов широкого спектра физиологических и биохимических процессов в организме.

Заключение

Таким образом, представленные в обзоре данные свидетельствуют о ключевой роли рАЦ в регуляции сперматогенеза и мужской фертильности, что привлекает к этим ферментам пристальное внимание со стороны специалистов, работающих в области фундаментальной биологии и клинической медицины. Однако в отношении функционирования рАЦ и их роли в регуляции сперматогенеза остается много нерешенных вопросов, среди которых можно выделить следующие. В настоящее время плохо изучены функциональные взаимосвязи между рАЦ и мембранно-связанными формами АЦ, активность которых регулируется гормональными агентами и которые, так же как и рАЦ, вовлечены в контроль процессов дифференцирования, капацитации и подвижности сперматозоидов. Установление этих взаимосвязей тем более важно, что оба класса ферментов катализируют синтез одного вторичного посредника — цАМФ — и соответственно способны регулировать одни и те же цАМФ-зависимые сигнальные каскады в сперматозоидах. Выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе функционального взаимодействия между рАЦ и гормоночувствительными мембранно-связанными АЦ, позволит исследовать пути гормональной регуляции активности рАЦ, что в дальнейшем может быть использовано для коррекции нарушений в сигнальных каскадах, контролируемых рАЦ. Другая проблема состоит в изучении распределения рАЦ и функционально связанных с ними белков в различных компартментах (цитоплазме, ядре, митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме) сперматозоидов на различных стадиях развития и созревания сперматозоидов. Сравнительно недавно были начаты исследования по выяснению того, как меняется уровень анионов бикарбоната в маточной жидкости, что непосредственно влияет на активность рАЦ в эякулированных сперматозоидах и как

следствие на их фертильность. Однако эти исследования проводили только на экспериментальных животных, а в отношении человека подобные данные отсутствуют. Решение этих и других вопросов позволит существенно продвинуться в плане понимания молекулярных механизмов функционирования и регуляции одной из самых древних сигнальных систем — HCO_3^- -рАЦ-цАМФ, которая сформировалась еще на уровне прокариот и одноклеточных эукариот, и функционирует, хотя и в существенно усложненном виде, в сперматозоидах высших позвоночных животных, осуществляя контроль репродуктивных функций.

Список литературы

- Деркач К. В., Шпаков А. О., Грязнов А. Ю. 2013. Функциональная активность аденилатциклазы и гуанилатциклазы в сперматозоидах человека с различной подвижностью. Цитология. 55 (2) : 123—130.
- Шпаков А. О. 2007. Структурно-функциональная организация аденилатциклазы одноклеточных эукариот. Цитология. 49 (2) : 91—106.
- Шпаков А. О., Деркач К. В., Грязнов А. Ю., Мотовилова Н. О. 2013. Регуляторные свойства аденилатциклазы и гуанилатциклазы в сперматозоидах человека. Журн. эволюц. биохим. физиол. 49 (1) : 30—38.
- Acin-Perez R., Salazar E., Brosel S., Yang H., Schon E. A., Manfredi G. 2009. Modulation of mitochondrial protein phosphorylation by soluble adenylyl cyclase ameliorates cytochrome oxidase defects. EMBO Mol. Med. 1 : 392—406.
- Arcelay E., Salicioni A. M., Wertheimer E., Visconti P. E. 2008. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. Int. J. Develop. Biol. 52 : 463—472.
- Bailey J. L. 2010. Factors regulating sperm capacitation. Syst. Biol. Reprod. Med. 56 : 334—348.
- Bell S. M., Schreiner C. M., Schultheis P. J., Miller M. L., Evans R. L., Vorhees C. V., Shull G. E., Scott W. J. 1999. Targeted disruption of the murine *Nhe1* locus induces ataxia, growth retardation, and seizures. Amer. J. Physiol. 276 : C788—C795.
- Blendy J. A., Kaestner K. H., Weinbauer G. F., Nieschlag E., Schutz G. 1996. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. Nature. 380 : 162—165.
- Braun T., Dods R. F. 1975. Development of a Mn^{2+} -sensitive, «soluble» adenylyl cyclase in rat testis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72 : 1097—1101.
- Braun T., Frank H., Dods R., Sepsenwol S. 1977. Mn^{2+} -sensitive, soluble adenylyl cyclase in rat testis: differentiation from other testicular nucleotide cyclases. Biochim. biophys. acta. 481 : 227—235.
- Buck J., Levin L. Natl. R. 2011. Physiological sensing of carbon dioxide/bicarbonate/pH via cyclic nucleotide signaling. Sensors (Basel). 11 : 2112—2128.
- Buck J., Sinclair M. L., Schapal L., Cann M. J., Levin L. R. 1999. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 96 : 79—84.
- Buffone M. G., Verstraeten S. V., Calamera J. C., Doncel G. F. 2009. High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies. J. Androl. 30 : 552—558.
- Cann M. J., Hammer A., Zhou J., Kanacher T. 2003. A defined subset of adenylyl cyclases is regulated by bicarbonate ion. J. Biol. Chem. 278 : 35 033—35 038.
- Carlson A. E., Quill T. A., Westenbroek R. E., Schuh S. M., Hille B., Babcock D. F. 2005. Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm. J. Biol. Chem. 280 : 32 238—32 244.
- Chaloupka J. A., Bullock S. A., Iourgenko V., Levin L. R., Buck J. 2006. Autoinhibitory regulation of soluble adenylyl cyclase. Mol. Reprod. Develop. 73 : 361—368.

- Chan H. C., Ruan Y. C., He Q., Chen M. H., Chen H., Xu W. M., Chen W. Y., Xie C., Zhang X. H., Zhou Z. 2009. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in reproductive health and disease. *J. Physiol.* 587 : 2187—2195.
- Chang H., Suarez S. S. 2011. Two distinct Ca²⁺ signaling pathways modulate sperm flagellar beating patterns in mice. *Biol. Reprod.* 85 : 296—305.
- Chaudhry P. S., Casillas E. R. 1988. Calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases in plasma membranes of bovine epididymal spermatozoa. *Arch. Biochem. Biophys.* 262 : 439—444.
- Chen H., Ruan Y. C., Xu W. M., Chen J., Chan H. C. 2012a. Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility. *Hum. Reprod. Update.* 18 : 703—713.
- Chen J., Levin L. R., Buck J. 2012b. Role of soluble adenylyl cyclase in the heart. *Amer. J. Physiol.* 302 : H538—H543.
- Chen Y., Cann M. J., Litvin T. N., Iourgenko V., Sinclair M. L., Levin L. R., Buck J. 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science.* 289 : 625—628.
- Chillon M., Casals T., Mercier B., Bassas L., Lissens W., Silber S., Romey M. C., Ruiz-Romero J., Verlingue C., Claustres M. et al. 1995. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N. Engl. J. Med.* 332 : 1475—1480.
- David A., Brackett B. G., Garcia C. R., Mastroianni L. 1969. Composition of rabbit oviduct fluid in ligated segments of the Fallopian tube. *J. Reprod. Fertil.* 19 : 285—289.
- David A., Frenkel G., Kraicer P. F. 1973. Chemical composition of rabbit follicular fluid. *Fertil. Steril.* 24 : 227—229.
- 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—7009.
- Don J., Stelzer G. 2002. The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 187 : 115—124.
- Ekstedi E., Holm L., Ridderstrale Y. 2004. Carbonic anhydrase in mouse testis and epididymis; transfer of isozyme IV to spermatozoa during passage. *J. Mol. Histol.* 35 : 167—173.
- Esposito G., Jaiswal B. S., Xie F., Krajnc-Franken M. A., Robben T. J., Strik A. M., Kuil C., Philipsen R. L., van Duin M., Conti M., Gossen J. A. 2004. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101 : 2993—2998.
- Feng Q., Zhang Y., Li Y., Liu Z., Zuo J., Fang F. 2006. Two domains are critical for the nuclear localization of soluble adenylyl cyclase. *Biochimie.* 88 : 319—328.
- Fisch J. D., Behr B., Conti M. 1998. Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors. *Hum. Reprod.* 13 : 1248—1254.
- Flesch F. M., Wijnand E., van de Lest C. H., Colenbrander B., van Golde L. M., Gadella B. M. 2001. Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. *Mol. Reprod. Develop.* 60 : 107—115.
- Florman H. M., Jungnickel M. K., Sutton K. A. 2007. What can we learn about fertilization from cystic fibrosis? *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104 : 11 123—11 124.
- Forte L. R., Bylund D. B., Zahler W. L. 1983. Forskolin does not activate sperm adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 24 : 42—47.
- Gadella B. M., Harrison R. A. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development.* 127 : 2407—2420.
- Garbers D. L., Tubb D. J., Hyne R. V. 1982. A requirement of bicarbonate for Ca²⁺-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 257 : 8980—8984.
- Garty N. B., Salomon Y. 1987. Stimulation of partially purified adenylyl cyclase from bull sperm by bicarbonate. *FEBS Lett.* 218 : 148—152.
- Gómez M., Manzano A., Figueras A., Vinals F., Ventura F., Rosa J. L., Bartrons R., Navarro-Sabate A. 2012. Sertoli-secreted FGF-2 induces PFKFB4 isozyme expression in mouse spermatogenic cells by activation of the MEK/ERK/CREB pathway. *Amer. J. Physiol.* 303 : E695—E707.
- Good D. W., Watts B. A., 3rd, George T., Meyer J. W., Shull G. E. 2004. Transepithelial HCO₃⁻ absorption is defective in renal thick ascending limbs from Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 null mutant mice. *Amer. J. Physiol.* 287 : F1244—F1249.
- Hess K. C., Jones B. H., Marquez B., Chen Y., Ord T. S., Kamenetsky M., Miyamoto C., Zippin J. H., Kopf G. S., Suarez S. S., Levin L. R., Williams C. J., Buck J., Moss S. B. 2005. The «soluble» adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Develop. Cell.* 9 : 249—259.
- Hyne R. V., Garbers D. L. 1979. Regulation of guinea pig sperm adenylyl cyclase by calcium. *Biol. Reprod.* 21 : 1135—1142.
- Jahnson T., Gordeladze J. O., Haug E., Hansson V. 1981. Changes in rat testicular adenylyl cyclase activities and gonadotrophin binding during unilateral experimental cryptorchidism. *J. Reprod. Fertil.* 63 : 381—390.
- Jaiswal B. S., Conti M. 2001. Identification and functional analysis of splice variants of the germ cell soluble adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 276 : 31 698—31 708.
- Jaiswal B. S., Conti M. 2003. Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 100 : 10 676—10 681.
- Kamenetsky M., Middelhaufe S., Bank E. M., Levin L. R., Buck J., Steegborn C. 2006. Molecular details of cAMP generation in Mammalian cells: a tale of two systems. *J. Mol. Biol.* 362 : 623—639.
- Kaunisto K., Fleming R. E., Kneer J., Sly W. S., Rajaniemi H. 1999. Regional expression and androgen regulation of carbonic anhydrase IV and II in the adult rat epididymis. *Biol. Reprod.* 61 : 1521—1526.
- Kotaja N., De Cesare D., Macho B., Monaco L., Brancorsini S., Goossens E., Tournaye H., Gansmuller A., Sassone-Corsi P. 2004. Abnormal sperm in mice with targeted deletion of the act (activator of cAMP-responsive element modulator in testis) gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101 : 10 620—10 625.
- Krausz C., Sassone-Corsi P. 2005. Genetic control of spermiogenesis: insights from the CREM gene and implications for human infertility. *Reprod. Biomed. Online.* 10 : 64—71.
- Kumar S., Kostin S., Flacke J. P., Reusch H. P., Ladilov Y. 2009. Soluble adenylyl cyclase controls mitochondria-dependent apoptosis in coronary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 284 : 14 760—14 768.
- Lefèvre L., de Lamirande E., Gagnon C. 2000. The cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor, sildenafil, stimulates human sperm motility and capacitation but not acrosome reaction. *J. Androl.* 21 : 929—937.
- Lefèvre L., de Lamirande E., Gagnon C. 2002. Presence of cyclic nucleotide phosphodiesterases PDE1A, existing as a stable complex with calmodulin, and PDE3A in human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 67 : 423—430.
- Litvin T. N., Kamenetsky M., Zarifyan A., Buck J., Levin L. R. 2003. Kinetic properties of «soluble» adenylyl cyclase: synergism between calcium and bicarbonate. *J. Biol. Chem.* 278 : 15 922—15 926.
- Liu D. Y., Liu M. L., Baker H. W. 2009. Enhancement of sperm-zona pellucida (ZP) binding capacity by activation of protein kinase A and C pathways in certain infertile men with defective sperm-ZP binding. *Hum. Reprod.* 24 : 20—27.
- Liu D. Y., Liu M. L., Baker H. W. 2013. Defective protein kinase A and C pathways are common causes of disordered zona pellucida (ZP)-induced acrosome reaction in normozoospermic infertile men with normal sperm-ZP binding. *Fertil. Steril.* 99 : 86—91.
- Mannowitz N., Wandernoth P., Hornung J., Ruffing U., Raubach M., Wennemuth G. 2011. Early activation of sperm by HCO₃⁻ is regulated hormonally in the murine uterus. *Int. J. Androl.* 34 : 153—164.

- Mannowetz N., Wandernoth P. M., Wennemuth G. 2012. Glucose is a pH-dependent motor for sperm beat frequency during early activation. *PLoS ONE*. 7 : e41030.
- Marquez B., Ignatz G., Suarez S. S. 2007. Contributions of extracellular and intracellular Ca^{2+} to regulation of sperm motility: release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm. *Develop. Biol.* 303 : 214—221.
- Martianov I., Choukrallah M. A., Krebs A., Ye T., Legras S., Rijkers E., Van Ijcken W., Jost B., Sassone-Corsi P., Davidson I. 2010. Cell-specific occupancy of an extended repertoire of CREM and CREB binding loci in male germ cells. *BMC Genomics*. 11 : 530.
- Mittag T. W., Guo W. B., Kobayashi K. 1993. Bicarbonate-activated adenylyl cyclase in fluid-transporting tissues. *Amer. J. Physiol.* 264 : F1060—F1064.
- Morgan D. J., Weisenhaus M., Shum S., Su T., Zheng R., Zhang C., Shokat K. M., Hille B., Babcock D. F., McKnight G. S. 2008. Tissue-specific PKA inhibition using a chemical genetic approach and its application to studies on sperm capacitation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 105 : 20 740—20 745.
- Nantel F., Monaco L., Foulkes N. S., Masquillier D., LeMeur M., Henriksen K., Dierich A., Parvinen M., Sassone-Corsi P. 1996. Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature*. 380 : 159—162.
- Naro F., Zhang R., Conti M. 1996. Developmental regulation of unique adenosine 3',5'-monophosphate-specific phosphodiesterase variants during rat spermatogenesis. *Endocrinology*. 137 : 2464—2472.
- Naz R. K., Ahmad K., Kumar R. 1991. Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoal function. *J. Cell. Sci.* 99 : 157—165.
- Nomura M., Beltran C., Darszon A., Vacquier V. D. 2005. A soluble adenylyl cyclase from sea urchin spermatozoa. *Gene*. 353 : 231—238.
- Oberholzer M., Bregy P., Marti G., Minca M., Peier M., Seebeck T. 2007. Trypanosomes and mammalian sperm: one of a kind? *Trends Parasitol.* 23 : 71—77.
- Okamura N., Tajima Y., Soejima A., Masuda H., Sugita Y. 1985. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 260 : 9699—9705.
- Parkkila S., Parkkila A. K., Kaunisto K., Waheed A., Sly W. S., Rajaniemi H. 1993. Location of a membrane-bound carbonic anhydrase isoenzyme (CA IV) in the human male reproductive tract. *J. Histochem. Cytochem.* 41 : 751—757.
- Richter W., Dettmer D., Glander H. J. 1999. Detection of mRNA transcripts of cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes in ejaculated human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 5 : 732—736.
- Rode B., Dirami T., Bakouh N., Rizk-Rabin M., Norez C., Lhuillier P., Lorès P., Jollivet M., Melin P., Zvetkova I., Bienvenu T., Becq F., Planelles G., Edelman A., Gacon G., Toure A. 2012. The testis anion transporter TAT1 (SLC26A8) physically and functionally interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel: a potential role during sperm capacitation. *Hum. Mol. Genet.* 21 : 1287—1298.
- Salicioni A. M., Platt M. D., Wertheimer E. V., Arcelay E., Allaire A., Sosnik J., Visconti P. E. 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc. Reprod. Fertil.* 65 : 245—259.
- Schultheis P. J., Clarke L. L., Meneton P., Miller M. L., Soleimani M., Gawenis L. R., Riddle T. M., Duffy J. J., Doetschman T., Wang T., Giebisch G., Aronson P. S., Lorenz J. N., Shull G. E. 1998. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na^+/H^+ exchanger. *Nat. Genet.* 19 : 282—285.
- Shpakov A. O., Pertseva M. N. 2008. Signaling systems of lower eukaryotes and their evolution. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 269 : 151—282.
- Signorelli J., Diaz E. S., Morales P. 2012. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell Tissue Res.* 349 : 765—782.
- Sinclair M. L., Wang, X. Y., Mattia, M., Conti M., Buck J., Wogelmuth D. J., Levin L. R. 2000. Specific expression of soluble adenylyl cyclase in male germ cells. *Mol. Reprod. Develop.* 56 : 6—11.
- Steegborn C., Litvin T. N., Levin L. R., Buck J., Wu H. 2005. Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12 : 32—37.
- Supuran C. T. 2008. Carbonic anhydrases—an overview. *Curr. Pharm. Des.* 14 : 603—614.
- Tresguerres M., Buck J., Levin L. 2010a. Physiological carbon dioxide, bicarbonate, and pH sensing. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 460 : 953—964.
- Tresguerres M., Levin L. R., Buck J. 2011. Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney Int.* 79 : 1277—1288.
- Tresguerres M., Parks S. K., Salazar E., Levin L. R., Goss G. G., Buck J. 2010b. Bicarbonate-sensing soluble adenylyl cyclase is an essential sensor for acid/base homeostasis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 107 : 442—447.
- Tsai L. C., Beavo J. A. 2012. Regulation of adrenal steroidogenesis by the high-affinity phosphodiesterase 8 family. *Horm. Metab. Res.* 44 : 790—794.
- Visconti P. E., Bailey J. L., Moore G. D., Pan D., Olds-Clarke P., Kopf G. S. 1995a. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 121 : 1129—1137.
- Visconti P. E., Moore G. D., Bailey J. L., Leclerc P., Connors S. A., Pan D., Olds-Clarke P., Kopf G. S. 1995b. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*. 121 : 1139—1150.
- Visconti P. E., Muschietti J. P., Flawia M. M., Tezon J. G. 1990. Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochim. biophys. acta*. 1054 : 231—236.
- Wandernoth P. M., Raubuch M., Mannowetz N., Becker H. M., Deitmer J. W., Sly W. S., Wennemuth G. 2010. Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm. *PLoS ONE*. 5 : e15061.
- Wang D., Hu J., Bobulescu I. A., Quill T. A., McLeroy P., Moe O. W., Garbers D. L. 2007. A sperm-specific Na^+/H^+ exchanger (sNHE) is critical for expression and *in vivo* bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 104 : 9325—9330.
- Wennemuth G., Carlson A.E., Harper A.J., Babcock D.F. 2003. Bicarbonate actions on flagellar and Ca^{2+} -channel responses: initial events in sperm activation. *Development*. 130 : 1317—1326.
- Wu H., Chen Y., Miao S., Zhang C., Zong S., Koide S. S., Wang L. 2010. Sperm associated antigen 8 (SPAG8), a novel regulator of activator of CREM in testis during spermatogenesis. *FEBS Lett.* 584 : 2807—2815.
- Xie F., Conti M. 2004. Expression of the soluble adenylyl cyclase during rat spermatogenesis: evidence for cytoplasmic sites of cAMP production in germ cells. *Develop. Biol.* 265 : 196—206.
- Xie F., Eddy E. M., Conti M. 2013. Analysis of signaling pathways controlling flagellar movements in mammalian spermatozoa. *Methods Enzymol.* 524 : 91—104.
- Xie F., Garcia M. A., Carlson A. E., Schuh S. M., Babcock D. F., Jaiswal B. S., Gossen J. A., Esposito G., van Duin M., Conti M. 2006. Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Develop. Biol.* 296 : 353—362.
- Xu W. M., Chen J., Chen H., Diao R. Y., Fok K. L., Dong J. D., Sun T. T., Chen W. Y., Yu M. K., Zhang X. H., Tsang L. L., Lau A., Shi Q. X., Shi Q. H., Huang P. B., Chan H. C. 2011. Defective CFTR-dependent CREB activation results in impaired spermatogenesis and azoospermia. *PLoS ONE*. 6 : e19120.
- Xu W. M., Shi Q. X., Chen W. Y., Zhou C. X., Ni Y., Rowlands D. K., Yi Liu G., Zhu H., Ma Z. G., Wang X. F., Chen Z. H., Zhou S. C., Dong H. S., Zhang X. H., Chung Y. W., Yuan Y. Y., Yang W. X., Chan H. C. 2007. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 104 : 9816—9821.

Yan C., Zhao A. Z., Sonnenburg W. K., Beavo J. A. 2001. Stage and cell-specific expression of calmodulin-dependent phosphodiesterases in mouse testis. *Biol. Reprod.* 64 : 1746—1754.

Zippin J. H., Chen Y., Nahirney P., Kamenetsky M., Wutke M. S., Fischman D. A., Levin L. R., Buck J. 2003. Compartment-

talization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *FASEB J.* 17 : 82—84.

Поступила 1 X 2013

SOLUBLE FORMS OF ADENYLYL CYCLASES OF SPERMATOOZOA

A. O. Shpakov,¹ K. V. Derkach

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg;
e-mail: alex_shpakov@list.ru

Soluble (cytosolic) forms of adenylyl cyclases (sAC), the enzymes catalyzing the conversion of ATP to the second messenger cAMP, play a key role in the regulation of spermatogenesis, control maturation of spermatozoa in the epididymis and their capacitation in the female genital tract, which determines their ability to fertilize. In the last years the significant progress was made in the study of the structural and functional organization and regulatory properties of sAC, their localization in the spermatozoa as well as in the investigation of intracellular cascades functionally coupled with sAC, including protein kinase A, cAMP-dependent phosphodiesterase, non-receptor tyrosine kinases, tyrosine phosphatases, transcription factors of CREB/CREM-family. The molecular mechanisms involved in the regulation of the intracellular concentration of bicarbonate anions, the main endogenous activators of sAC, were deciphered. Many evidences were obtained that the decrease of functional activity of sAC and signaling cascades and effector proteins coupled to it, as well as bicarbonate anion transporters lead to disturbances of spermatogenesis. As a consequence, the development of approaches for controlling the activity of sAC in spermatozoa is one of the priority ways to treat dysfunctions of the male reproductive system. Present review is devoted to advances in the study of soluble forms of AC and functionally coupled to them signaling cascades and effector proteins in the spermatozoa, as well as to the unresolved issues in this area.

Key words: adenylyl cyclase, anion transporter, bicarbonate anion, capacitation, protein kinase A, spermatozoa, spermatogenesis, transcription factor CREM.