

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Vývoj metody stanovení relativní exprese genu CD151
kódujícího tetraspaninový protein ve varleti a nadvarleti
koně domácího s využitím termocykleru LightCycler®
Nano (Roche)**

Diplomová práce

**Bc. Natálie Poláková
Reprodukční biotechnologie**

doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vývoj metody stanovení relativní exprese genu CD151 kódujícího tetraspaninový protein ve varleti a nadvarleti koně domácího s využitím termocykleru LightCycler® Nano (Roche)" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.04.2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za odborné vedení, pomoc při laborním výzkumu a hodnocení výsledků. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Martině Melounové, Ph.D. a Ing. Daniele Čílové za pomoc a rady při práci v laboratoři. Mé díky patří také zaměstnancům Katedry veterinárních disciplín za zajištění biologického materiálu.

Vývoj metody stanovení relativní exprese genu **CD151** kódujícího tetraspaninový protein ve varleti a nadvarleti koně domácího s využitím termocykleru **LightCycler® Nano (Roche)**

Souhrn

Tetraspaniny jsou transmembránové proteiny vyskytující se v membránách téměř všech eukaryotických buněk. Prostřednictvím reorganizace membránových komplexů se podílí na mnohých fyziologických i patologických procesech. Jedním z těchto procesů je oplodnění. Přestože jsou mechanismy skrývající se za fúzí gamet během oplodnění stále předmětem zkoumání, předpokládá se, že ze všech 33 tetraspaninových proteinů exprimovaných u savců se do oplození zapojují tři – CD9, CD81 a CD151. Výzkum exprese genu *CD151* je důležitým krokem v odhalení fyziologické funkce kódovaného proteinu.

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout metodu pro stanovení relativní genové exprese *CD151* ve tkáni varlete a nadvarlete koně a dále detekovat exprimované transkripční varianty genu. U koňského genu *CD151* byla na základě referenčního genomu předpokládána exprese šesti transkripčních variant X1-X6. Tkáně varlete a tří anatomických částí nadvarlete – hlavy (*caput*), těla (*corpus*), ocasu (*cauda*) – byly odebrány ve dvou biologických replikátech. Celkem bylo analyzováno 40 vzorků. Z těchto tkání byla izolována RNA, proběhla reverzní transkripce a následovala kvantitativní Real-Time PCR (qRT-PCR) za použití specifických primerů. Jako housekeepingový gen byl vybrán gen *ACTB*.

Byly navrženy specifické primery, jejichž amplifikace byla ověřena analýzou teploty tání, určením efieience reakce, separací amplikonů v elektroforéze, restričním štěpením amplikonu a sekvenací. Všechny primery byly specifické. Jeden pár primerů byl vybrán pro hodnocení obecné relativní exprese genu *CD151* a čtyři páry primerů byly vybrány pro detekci a rozlišení transkripčních variant. Všechny sestřihové varianty s výjimkou X1 byly detekovány ve varleti i nadvarleri. Expres varianty X1 je předpokládána, ale nebylo možné navrhnout primery tak, aby byla možná její detekce. Sekvence amplikonů primerů určených pro stanovení relativní exprese prokázala, že je amplifikace vysoce specifická a že primery amplifikují stejnou sekvenci ve všech zkoumaných tkáních. Získaná sekvence odpovídala sekvenci genu *CD151* v referenčním genomu nejen koně domácího, ale také dalších zástupců rodu *Equus*.

Relativní exprese *CD151* byla vyhodnocena na základě qRT-PCR, jejíž výsledky byly dále statisticky zpracovány. Gen *CD151* byl exprimován ve všech tkáních, ale vyskytovaly se rozdíly v míře exprese. Ve všech třech částech nadvarlete byla relativní exprese zřetelně nižší než ve varleti. V nadvarleti byla nejvyšší exprese naměřena v hlavě nadvarlete. Expres v těle a ocasu nadvarlete byla srovnatelná. Při porovnání míry exprese mezi jednotlivými hřebci byly hodnoty srovnatelné vždy mezi dvojicí jedinců. Rozdíly v genové expresi mezi hřebci mohly být způsobeny nevhodnou manipulací se vzorky a degradací vstupní RNA.

Řešení diplomové práce bylo podpořeno projekty GA FAPPZ Studium geneticky podmíněných vlastností s využitím molekulárně-genetických, bioinformatických a statistických metod (SV20-9-21360), Molekulární analýza nukleových kyselin rostlin a živočichů a možnosti jejího hodnocení s využitím metod bioinformatiky a biostatistiky (SV19-07-21360) a projektu CIGA Zlepšení mrazitelnosti hřebčích spermií přidáním proteinů semenné plazmy do kryokonzervačního média (2018200).

Klíčová slova: kůň domácí, *Equus caballus*, gen CD151, tetraspaniny, exprese, qRT-PCR, transkripční varianty

Development of a method for determining the relative expression of the CD151 gene encoding the tetraspanin trotein in the testis and epididymis of a domestic horse using the LightCycler® Nano (Roche) thermocycler

Summary

Tetraspanins are transmembrane proteins found in the membranes of almost all eukaryotic cells. Through the reorganization of membrane complexes, they participate in many physiological and pathological processes. One of these processes is fertilization. Although the mechanisms behind gamete fusion during fertilization are still under investigation, it is assumed that out of all 33 tetraspanin proteins expressed in mammals, three are involved in fertilization – CD9, CD81 and CD151. Research focused on the expression of gene *CD151* is an important step in revealing the physiological function of the encoded protein.

The aim of this diploma thesis was to develop a method for determining the relative gene expression of *CD151* in the testis and epididymis of a horse and to further detect transcript variants of the gene expressed in the tissue. Based on the reference genome, the equine *CD151* gene was predicted to be expressed in the form of six transcript variants X1-X6. Tissue of the testis and three anatomical parts of the epididymis – head (*caput*), body (*corpus*), tail (*cauda*) were collected in two biological replicates. A total of 40 samples were analyzed. RNA was isolated from the tissue, reverse transcribed and analyzed by quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) using specific primers. The *ACTB* gene was selected as the housekeeping gene.

Specific primers were designed. The amplification was verified by melting curve analysis, determination of reaction efficiency, separation of amplicons by electrophoresis, restriction digestion of the amplicon and sequencing. All primers were specific. One primer pair was selected to assess the general relative expression of the *CD151* gene and four primer pairs were selected to detect and distinguish transcript variants. All splice variants except X1 were detected in the testis and the epididymis. Expression of the X1 variant is expected, but it was not possible to design the primers to specifically detect only this variant. Sequencing of amplicons synthesizes by the primers, which were chosen as a marker of relative gene expression, showed that the amplification was highly specific and that the primers amplified the same sequence in all examined tissues. The obtained sequence corresponded to the sequence of the *CD151* gene in the reference genome of the horse and also of other members of the *Equus* genus.

The relative expression of *CD151* was evaluated by qRT-PCR, the results were further statistically analyzed. The *CD151* gene was expressed in all tissues but there were differences in the level of expression. In all three parts of the epididymis, the relative expression was significantly lower than in the testis. In the epididymis, the highest expression was measured in the head of the epididymis. The expression in the body and the tail of the epididymis was comparable. When comparing the level of expression between individual stallions, the values were comparable between a pair of individuals. Differences in gene expression between stallions could be due to improper sample handling and degradation of input RNA.

The solution of the diploma thesis was supported by projects GA FAFNR Study of genetic conditions using molecular-genetic, bioinformatic and statistical methods (SV20-9-21360), Molecular analysis of nucleic acids of plants and animals and the possibility of its evaluation using methods of bioinformatics and biostatistics (SV19- 07-21360) and the CIGA project Improving the freezing ability of stallion sperm by adding seminal plasma proteins to the cryopreservation medium (2018200).

Keywords: the horse, *Equus caballus*, CD151 gene, tetraspanins, expression, qRT-PCR, transcript variants

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecké hypotézy a cíle práce	2
2.1 Vědecké hypotézy	2
2.2 Cíle práce	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Kůň domácí	3
3.1.1 Genom koně domácího	3
3.1.2 Kůň jako modelový organismus	4
3.1.3 Reprodukce v chovu	4
3.1.4 Pohlavní žlázy hřebce	4
3.1.4.1 Varle	4
3.1.4.2 Nadvarle	6
3.2 Spermatogeneze	7
3.2.1 Spermatocytogeneze	7
3.2.2 Spermioogeneze	8
3.3 Post-testikulární dozrávání spermií	8
3.4 Oplození	10
3.4.1 Kapacitace	10
3.4.2 Interakce gamet a akrozomální reakce	11
3.4.3 Fúze gamet	12
3.4.3.1 Vazba spermie na oolemu	12
3.4.3.2 Blok polyspermie	14
3.5 Tetraspaninové proteiny	15
3.5.1 CD151	17
3.5.1.1 Gen CD151 Equus caballus	17
3.5.1.2 Genová exprese CD151	18
3.5.1.3 Funkce a stavba kódovaného proteinu	20
3.5.1.4 CD151 v reprodukci	20
3.5.2 Další tetraspaniny podílející se na reprodukci	21
3.6 Metody stanovení exprese genů	24
3.6.1 Izolace RNA z tkání a buněk savců	24
3.6.1.1 Fenol-chloromormová metoda	24
3.6.1.2 Chromatografická metoda	25
3.6.1.3 Silikátová metoda	25
3.6.1.4 Kvantifikace celkové RNA	25

3.6.2	Reverzní transkripce mRNA.....	26
3.6.3	Kvantitativní Real-Time PCR.....	26
3.6.3.1	Fluorescenční značení	28
3.6.3.2	Referenční gen jako interní kontrola	28
3.6.3.3	Analýzy pro účely kvantifikace	29
4	Metodika	31
4.1	Biologický materiál	31
4.2	Izolace RNA	31
4.3	Koncentrace celkové RNA.....	32
4.4	Syntéza cDNA	33
4.5	Navrhování primerů	33
4.6	Kvantitativní Real-Time PCR.....	38
4.7	Výběr primerů pro vlastní analýzy	39
4.7.1	Analýza teploty tání T_m	39
4.7.2	Eficiency qRT-PCR amplifikace	39
4.7.3	Ověření amplifikace sestřihových variant pomocí elektroforézy	40
4.7.4	Rozlišení transkripčních variant X2 a X5 pomocí PCR-RFLP	40
4.8	Sekvenační analýza qRT-PCR amplikonů.....	40
4.8.1	Purifikace amplikonů.....	41
4.8.2	Sekvenační reakce.....	41
4.8.3	Sekvenace pomocí kapilární elektroforézy	41
4.9	Statistické hodnocení výsledků	42
5	Výsledky	43
5.1	Koncentrace celkové izolované RNA.....	43
5.2	Testování navržených primerů	45
5.2.1	Vyhodnocení analýzy teploty tání	45
5.2.2	Eficiency amplifikace	46
5.2.3	Detekce sestřihových variant CD151 pomocí elektroforézy	47
5.2.4	Restrikční štěpení amplikonu F3+R5 (PCR-RFLP)	47
5.2.5	Sekvenace amplikonu F1+R1	48
5.2.6	Výběr primerů a rozlišení transkripčních variant	50
5.3	Vyhodnocení průběhu qRT-PCR	51
5.4	Statistické analýzy	52
5.4.1	Vstupní hodnoty Ratio ΔCq pro statistické analýzy	52
5.4.2	Test normality a test homogenity rozptylu	53
5.4.3	Hodnocení vlivu efektů na variabilitu Ratio ΔCq	54
6	Diskuze	57
6.1	Biologický materiál	57
6.2	Izolace RNA a její kvalita.....	58

6.3	Primery	59
6.4	Detekce transkripčních variant	60
6.5	Podmínky qRT-PCR.....	60
6.6	Hodnocení relativní exprese.....	61
7	Závěr	63
8	Literatura.....	64
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	80

1 Úvod

Oplození je komplikovaný proces, jehož se účastní zralé spermie a oocyty v samičím reprodukčním traktu. Pro získání plné kompetence k oplodnění musí gamety podstoupit řadu morfologických, strukturních a molekulárních změn. Jen za těchto podmínek jsou gamety schopné spolu interagovat, adherovat a fúzovat.

Na straně spermie dochází k potřebným modifikacím v průběhu téměř celého životního cyklu buňky. Formování spermií začíná ve varleti během spermatogeneze. Zde spermie získávají svou typickou morfologickou stavbu (O'Donnell 2014). V nadvarletí dochází v rámci post-testikulárního zrání ke změnám na cytoplazmatické membráně, včetně proteinového složení (Skerget et al. 2015). Po ejakulaci spermie v samičím reprodukčním traktu kapacitují, mění se vlastnosti membrány a jsou aktivovány signální dráhy vedoucí ke změnám v intracelulárním prostředí (Ritagliati et al. 2018; Tumova et al. 2021). Kapacitované spermie rozpoznávají ovulovaný oocyt a interagují s jeho obaly. Interakce spouští akrozomální reakci, která spočívá ve vylití enzymatického obsahu akrozomového váčku spermie do okolního prostředí a neméně důležité relokizaci membránových proteinů v hlavičce spermie. V tomto stavu je spermie schopná navázat se na plazmatickou membránu oocytu a splynout s ním (Jankovicova et al. 2020b).

Mechanismy vedoucí k fúzi gamet nebyly dosud přesně popsány. Na straně oocytu i spermie byly navrženy mnohé kandidátní adhezní i fúzní molekuly, u většiny z nich však byla v průběhu let vyvrácena jejich nepostradatelnost. Bylo prokázáno, že pro adhezi je naprosto nezbytný vazebný protein Izumo1 na membráně spermie (Inoue et al. 2005) a receptor Juno na membráně oocytu (Bianchi et al. 2014). Dále jsou dávány do spojitosti s oplozením tetraspaniny CD9, CD81 a CD151.

Tetraspaniny jsou transmembránové proteiny vyskytující se v membránách téměř všech eukaryotických buněk. Skládají se typicky ze čtyř transmembránových domén, dvou extracelulárních smyček a jedné intracelulární smyčky (Hemler 2014). Tetraspaniny interagují s dalšími transmembránovými a intracelulárními proteiny, čímž se podílí na regulaci řady buněčných dějů (Hemler 2008). V reprodukci se předpokládá jejich účast při reorganizaci membránových komplexů během oplození (Jankovicova et al. 2020b).

O tetraspaninu CD151 a jeho funkci při oplození toho není v současnosti mnoho známo. Protein byl detekován na oocytu i na spermiích. Na lidských oocytech byla popsána interakce s integriny v plazmatické membráně (Ziyyat et al. 2006). Na myších a býčích spermiích byla popsána redistribuce CD151 v průběhu akrozomální reakce (Jankovicova et al. 2020a). Měření exprese mRNA genu *CD151* v tkáních reprodukčního traktu samce proběhlo dosud pouze u člověka (Uhlén et al. 2015) a u myši (Jankovicova et al. 2020a).

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout efektivní metodu pro stanovení exprese genu *CD151* ve varleti a nadvarletí koně domácího za účelem využití této metody k dalšímu výzkumu.

2 Vědecké hypotézy a cíle práce

2.1 Vědecké hypotézy

Byly stanoveny následující vědecké hypotézy:

- U genu *CD151* lze předpokládat bazální expresi. Množství transkribované mRNA tohoto genu bude dostatečné pro detekci metodou qRT-PCR s využitím SYBR Green barviva (Roche).
- U koňského *CD151* bylo popsáno 6 transkripčních variant. Lze předpokládat, že alespoň jedna z nich bude exprimována ve varleti či nadvarleti.
- Sekvence jednotlivých transkripčních variant genu *CD151* budou vykazovat takovou homologii, která umožní navrhnout marker, schopný hodnotit obecně relativní expresi genu *CD151* bez ohledu na konkrétní transkripční variantu.
- Mezi transkripčními variantami budou identifikovány inzerčně-deleční polymorfismy, které umožní potvrdit či vyvrátit přítomnost některých konkrétních variant ve varleti a nadvarleti koně.

2.2 Cíle práce

Ze zmíněných vědeckých hypotéz vyplývají tyto cíle diplomové práce:

- Ověřit platnost výše uvedených hypotéz.
- Na základě studia vědecké literatury bude zpracována ucelená literární rešerše.
- Bude provedena bioinformatická analýza koňského genu *CD151* s cílem identifikovat exonové oblasti a varianty sestříhu.
- Budou navrženy primerové páry umístěné v jednotlivých exonech genu *CD151* vhodné pro následné stanovení relativní exprese metodou qRT-PCR s využitím SYBR Green barviva (Roche).
- Bude vybrán vhodný "housekeeping" gen.
- Bude získána cDNA z varlete a z různých oblastí nadvarlete 5 hřebců.
- Z každé tkáně budou hodnoceny 2 biologické replikáty.
- Bude provedeno statistické vyhodnocení výsledků.

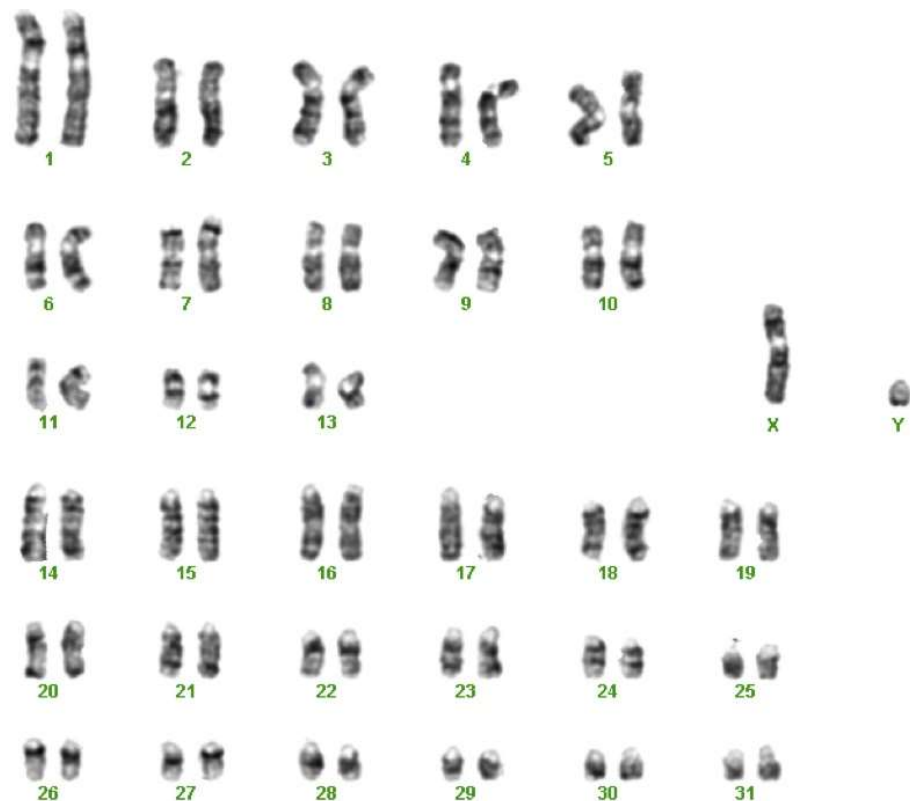
3 Literární rešerše

3.1 Kůň domácí

3.1.1 Genom koně domácího

Po vzoru Human Genome Project, který byl dokončen v roce 2003, proběhlo sekvenování koňského genomu, a to pod názvem Horse Genome Project. Projekt vznikl již v roce 1995, kdy se na něm podílelo 70 vědců z 22 laboratoří z 12 zemí světa. V roce 2006 projevil zájem o sekvenování genomu koně americký National Human Genome Research Institute, který si vybral koně jako zástupce řádu lichokopytníků v rámci studia funkčního genomu savců. Iniciativu převzal Broad Institute spadající pod MIT, který pomocí shotgun metody dokončil projekt v roce 2007 a vznikl tak první referenční genom koně, konkrétně klisny anglického plnokrevníka (Brosnahan et al. 2010). Postupem času byly znalosti vycházející z referenčního genomu rozšířeny o identifikaci mnohých genetických variant (SNP, CNV, indel) u dalších plemen i jednotlivců (Wade et al. 2009; Doan et al. 2012).

Karyotyp koně se skládá z 31 párů autozomů a 1 páru gonozomů (viz Obr. 1). Genom tvoří 20 300 strukturních genů, z nichž je okolo 17 000 ortologních s člověkem, myší a psem. 15 027 genů představuje přímé ortology s člověkem. Velikost genomu činí 2,5 – 2,7 Gb (Wade et al. 2009).



Obr. 1: Karyotyp samce koně domácího skládající se ze 32 párů chromozomů (převzato a upraveno dle MacLeod & Kalbfleisch 2020).

3.1.2 Kůň jako modelový organismus

Z důvodu nepopíratelné podobnosti genomů savců vyvstala i v případě koně otázka, zda by byl vhodný do role modelového organismu pro studium humánních onemocnění.

Na základě množství dostupné literatury není koňský model zcela běžný v porovnání s malými savci, kteří jsou hojně využíváni k výzkumu onemocnění a vývoji léčby. Nějaké uplatnění přeci jen ale nachází. Jedná se např. o osteoartritidu (McIlwraith et al. 2012), astma (Bullone & Lavoie 2019; Klier et al. 2019), nádorová onemocnění (Van Der Weyden et al. 2016; Suárez-Bonnet et al. 2018) nebo léčbu degenerativních onemocnění pomocí regenerativní terapie (Meng et al. 2020). Dále nachází kůň využití jako behaviorální model ve výzkumu kognice, temperamentu, mozkové laterality, evoluce a adaptability (Hausberger et al. 2019).

3.1.3 Reprodukce v chovu

Způsob reprodukce koně domácího se odráží od sezónnosti estrálního cyklu klisen. Jejich hormonální aktivita silně závisí na délce dne neboli fotoperiodě. S prodlužující se délkou fotoperiody na jaře stoupá ovariální aktivita a s klesající délkou dne na podzim aktivita zase ustupuje (Mair et al. 2013). V zimních měsících jsou klisny reprodukčně inaktivní vlivem krátké fotoperiody, kdy dochází k vysoké produkci melatoninu a následně inhibici gonadotropin releasing hormonu (GnRH), syntetizovaného neurony hypothalamu. GnRH přímo stimuluje v adenohipofýze tvorbu gonadotropních hormonů – folikulostimulačního (FSH) a luteinizačního (LH), které se podílejí na vývoji ovariálních folikulů a samotné ovulaci (Aurich 2011). Toto období ovariální inaktivity klisen je označováno jako zimní anestrus. Od jara do podzimu již probíhá estrální cyklus ustáleně. Klisny jsou polyestrická zvířata, jejichž cyklus se skládá ze dvou opakujících se fází – estru, trvajícího 5-7 dnů, a diestru, trvajícího 14-15 dnů (Mair et al. 2013).

Sezónnost však ovlivňuje také reprodukční schopnosti samců. Přestože v minulosti byl vliv fotoperiody na kvalitu hřebčích spermií zpochybňován (Aurich 2016), Crespo et al. (2020) zaznamenali efekt hned na několik ukazatelů kvality spermatu. Konkrétně progresivní motilitu, integritu membrán a fragmentaci spermatické DNA (SDF). Fragmentací je v tomto kontextu míněno narušení integrity DNA v jádře gamety, a to primárně vlivem chybného průběhu zrání nebo působením oxidativního stresu. Riziko dále představují také faktory vnějšího prostředí nebo nepříznivý zdravotní stav (Agarwal et al. 2020). Nejvyšší kvalitu semene pro účely inseminace či přípuštění klisny vykazovaly u většiny sledovaných hřebců vzorky odebrané na jaře, kdy byla naměřena nejvyšší motilita spermií a integrita plazmatických membrán, a naopak nejnižší hodnota SDF (Crespo et al. 2020). Stejně výsledky byly publikovány ve studii Greiser et al. (2020), která probíhala na větším vzorku jedinců.

3.1.4 Pohlavní žlázy hřebce

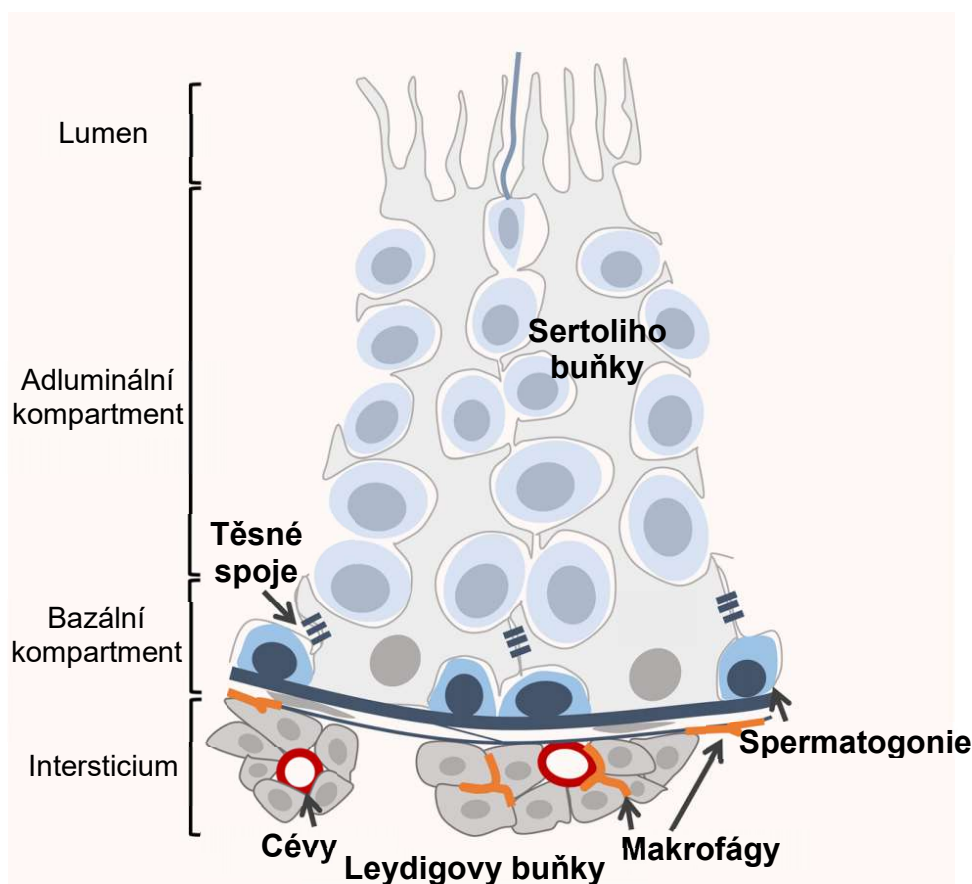
3.1.4.1 Varle

Varle (*testis*) je párová samčí pohlavní žláza, jejíž hlavní funkcí je tvorba samčích pohlavních buněk, spermií, a produkce androgenů. Parenchym varlete se skládá z dlouhých stočených semenotvorných kanálků a vmezeřeného vaziva (Yoshida 2010; Yang et al. 2015).

Semenotvorné kanálky dospělého jedince jsou široké 150-200 μm (Yoshida 2010). V epitelu semenotvorných kanálků se vyskytují dva typy buněk – spermatogenní a Sertoliho. Sertoliho buňky plní podpůrnou, imunoprotektivní, nutriční a regulační funkci pro vyvíjející se spermie (Rato et al. 2012). Svou základnou nasedají na bazální membránu na periferii kanálků a výběžky dosahují k jejich lumen. Sertoliho buňky spojují těsné spoje dělicí epitel na bazální a adluminální kompartment. Zároveň zde těsné spoje plní funkci hematotestikulární bariéry (Cheng & Mruk 2009; Yoshida 2010; La & Hobbs 2019).

Dále jsou součástí epitelu semenotvorných kanálků spermatogenní buňky. Ty představují různá vývojová stadia spermií, jak je blíže vysvětleno v kapitole věnované spermatogenezi. Při bazální membráně probíhá dělení zárodečných epitelových buněk – spermatogonií. Tím je zajištěna obměna a další postupný vývoj spermatogenních buněk, které během své diferenciace prostupují spoji Sertoliho buněk až k lumen kanálků (Pui & Saga 2017; Staub & Johnson 2018).

Vnější povrch semenotvorných kanálků vyztužují peritubulární myoidní buňky, produkující růstové faktory. Prostor mezi semenotvornými kanálky vyplňuje vmezežené vazivo – intersticiu, jehož součástí jsou roztroušené Leydigovy buňky, makrofágy a krevní cévy (viz Obr. 2). Všechny tyto složky svou činností podporují spermatogenezi (La & Hobbs 2019).



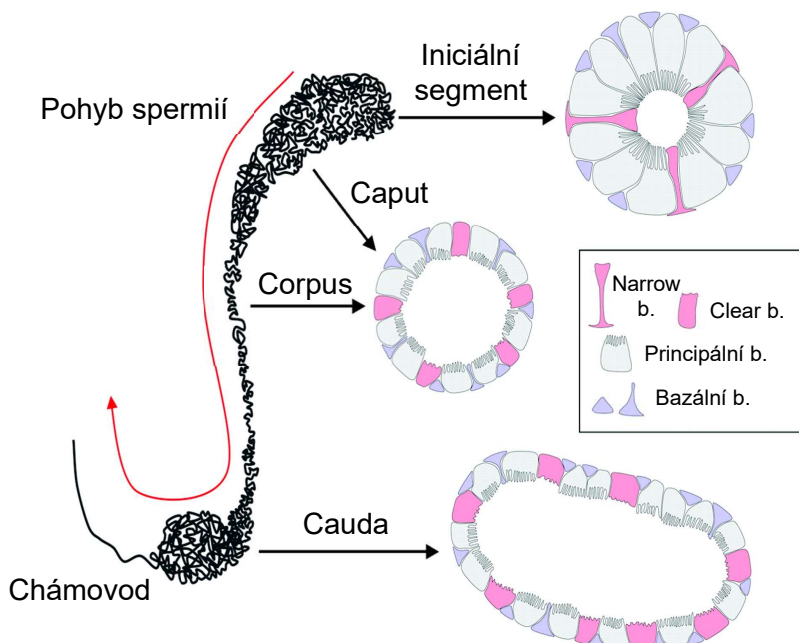
Obr. 2: Stavba semenotvorného kanálku. Spermatogonie v průběhu diferenciace migrují od bazální membrány k lumen kanálku. Bazální a adluminální kompartment kanálků je oddělen těsnými spoji Sertoliho buněk, které vytváří hematotestikulární bariéru. V intersticiu se nachází Leydigovy buňky, cévy a makrofágy (La & Hobbs 2019).

3.1.4.2 Nadvarle

Nadvarle (*epididymis*) představuje rezervoár spermií a zároveň zde spermie podstupují maturaci potřebnou k získání motility a schopnosti fertilizace (Caballero et al. 2011).

Epididymis se dělí na tři anatomické části – hlavu (*caput*), tělo (*corpus*) a ocas (*cauda*). U myši byl v proximální části popsán iniciální segment (viz Obr. 3). V každé z těchto částí probíhá exprese rozdílných genů, čímž vzniká specifické mikroprostředí ovlivňující zrání spermií (Cornwall 2009; Dacheux et al. 2016; Wu et al. 2021). Spermie jsou přiváděny odvodnými kanálky varlete do hlavy nadvarlete společně s testikulární tekutinou, která je následně resorbována (Hansen et al. 2004; Cornwall 2009). V ocasu nadvarlete se spermie shromažďují do doby ejakulace (Jones & Murdoch 1996).

Kanálek nadvarlete je vystlán cylindrickým epitelem, který se skládá z šesti typů buněk v různém zastoupení v závislosti na konkrétní anatomické oblasti. Až z 80 % epitelu tvoří hlavní (principální) buňky, jejichž primární funkcí je syntéza proteinů a následně jejich transport pomocí merokrinní či apokrinní sekrece. Apokrinní sekrecí jsou do nadvarlete vylučovány membránové váčky epididymosomy, nesoucí proteiny podílející se na zrání spermií. Dále jsou principální buňky schopné fagocytovat nezralé spermie předčasně uvolněné z varlete. Apikální buňky, „narrow“ (v překladu těsné) buňky a „clear“ (v překladu čiré) buňky regulují pH v lumen kanálku. „Clear“ buňky vykazují vysokou endocytickou aktivitu, a to především v hlavě nadvarlete, čímž se také podílí na dozrávání spermií. Dále jsou v epitelu lokalizovány imunitní „halo“ buňky a zárodečné bazální buňky. Epitel je obklopen hustou sítí dendritických buněk a vrstvou hladké svaloviny. Mikrokilky na apikálním pólu některých typů epitelálních buněk umožňují pasivní transport spermií kanálkem až do ocasu nadvarlete (Caballero et al. 2011; Joseph et al. 2011; Belleannée et al. 2012; Ramos-Ibeas et al. 2013; Pinel et al. 2019).



Obr. 3: Stavba nadvarlete. Dělí se na tři části – hlava (*caput*), tělo (*corpus*), ocas (*cauda*). V průběhu nadvarlete se mění velikost lumen kanálků a zastoupení jednotlivých typů buněk. Znázorněny jsou „narrow“ buňky, „clear“ buňky, principální buňky a bazální buňky (Shum et al. 2009).

3.2 Spermatogeneze

V semenotvorných kanálcích varlete prochází diploidní spermatogenní buňky dělením a složitou diferenciací, během níž dochází k výrazným morfologickým změnám. Tento proces se nazývá spermatogeneze. Do spermatogenního cyklu vstupuje buňka ve stádiu spermatogonie, nacházející se na periférii semenotvorných kanálků. Během vývoje buňky podstupují několik po sobě jdoucích mitotických dělení a dvě meiotická, migrují k lumen kanálku a podstupují strukturní změny. Výsledkem diferenciacie je haploidní samčí gameta – spermie (O'Donnell 2014; Pui & Saga 2017; Staub & Johnson 2018). Poté jsou spermie pasivně unášeny do nadvarlete, kde podstupují v jednotlivých segmentech orgánu tzv. post-testikulární dozrávání. Teprve po zakončení tohoto zrání jsou spermie schopné za vhodných podmínek kapacitovat v samičím reprodukčním traktu a oplodnit samičí oocyt (Sullivan et al. 2005; Nixon et al. 2019).

Prekurzory samčích gamet vznikají během embryonálního vývoje z pluripotentních buněk epiblastu a následně migrují skrze rozmanité embryonální tkáně do oblasti formujících se gonád pomocí tzv. améboidního pohybu. Tyto prekurzory se nazývají primordiální zárodečné buňky (primordial germ cells), zkráceně PGC (Hackett et al. 2018; Grimaldi & Raz 2020).

PGC buňky, které se usadily v místě vyvíjejících se gonád, podstupují několik po sobě jdoucích mitotických dělení. V prenatálním i brzkém postnatálním období vzniká z primordiálních zárodečných buněk několik buněčných stádií, která jsou souhrnně nazývána gonocyty. Gonocyty dále proliferují, diferencují v rané spermatogonie a migrují na periférii varlete k bazální membráně semenotvorného kanálku. Rané spermatogonie buď vstupují do cyklu spermatocytogeneze a podléhají další diferenciaci nebo slouží jako kmenové buňky (Nagano et al. 2000; Culty 2009; Pui & Saga 2017).

Tvorba zralých spermií začíná s nástupem puberty. Na základě komplexní zpětné vazby mezi buňkami varlete, hypothalamem a hypofýzou dochází k produkci gonadotropin releasing hormonu (GnRH), folikulostimulačního hormonu (FSH), luteinizačního hormonu (LH) a androgenů. Mechanismus působení GnRH byl stručně popsán již v dřívější kapitole. FSH působí na Sertoliho buňky, podporuje jejich proliferaci a růst. Receptory pro LH se nachází na Leydigových buňkách produkujících testosteron. Androgeny, především testosteron, se podílí na průběhu meiózy, adhezi spermatid k Sertoliho buňkám a poté uvolnění spermií do lumen semenotvorného kanálku (Heckert & Griswold 2002; Holdcraft & Braun 2004; Verhoeven et al. 2010; Smith & Walker 2014).

3.2.1 Spermatocytogeneze

Spermatocytogeneze je první ze dvou fází cyklu spermatogeneze. Obecně je za počáteční stádium buněk vstupujících do této fáze považována spermatogonie A ($2n$, $2c$). V bazálním kompartmentu varlete probíhá opakovaná mitotická proliferace, která dává postupně vzniknout spermatogoniím IM (intermediate), spermatogoniím B, a nakonec primárním spermatocytům. Primární spermatocyty v rámci přípravy na první meiotické dělení replikují svou DNA ($2n$, $4c$) a vstupují do profáze meiózy I. V průběhu meiózy migrují primární spermatocyty z bazálního kompartmentu do adluminálního skrze hematotestikulární bariéru. Výsledkem prvního redukčního dělení jsou sekundární spermatocyty ($1n$, $2c$), které vstupují do meiózy II a stávají

se z nich haploidní spermatidy (1n, 1c) (Bellve et al. 1977; Leeb 2007; Cheng & Mruk 2009; Larson et al. 2018).

Celý průběh spermatocytogeneze je těsně spjat s aktivitou Sertoliho buněk. Prostřednictvím své signalizace regulují proliferaci a meiotické dělení spermatogenních buněk, ovlivňují dynamiku buněčných spojů a v důsledku také migraci spermatogenních buněk. Dále produkují laktát sloužící jako zdroj výživy pro spermatocyty a spermatidy (Ni et al. 2019).

3.2.2 Spermiogeneze

Do spermiogeneze, někdy nazývané též spermiogenezé nebo spermatogenezé, vstupují haploidní kulovité spermatidy. Vlivem působení hormonů a růstových faktorů testikulárních buněk podstupují postmeiotickou diferenciaci, která spočívá v řadě morfologických změn. Váčky uvolněné z Golgiho aparátu se postupně spojují v blízkosti jádra a vytváří akrozom. Jedná se o sekreční váček obsahující enzymy hyaluronidázu a akrozin, které jsou nezbytné pro průnik spermie k oocyту a oplodnění. Má vlastní vnitřní a vnější membránu. Na opačném pólu buňky se formuje krček a bičík. Dochází ke kondenzaci chromatinu, histony jsou nahrazeny protaminy, spermatidy se zplošťují, protahují a je vytlačována přebytečná cytoplazma. V posledním kroku spermatogeneze jsou přerušeny molekulární vazby zajišťující adhezi spermií k Sertoliho buňkám a spermie jsou uvolněny do lumen semenotvorných kanálků (Flörke et al. 1983; Leeb 2007; O'Donnell 2014).

3.3 Post-testikulární dozrávání spermií

Ze semenotvorných kanálků jsou nepohyblivé spermie pasivně unášeny do nadvarlete. Zde dochází vlivem exprese rozdílných genů v různých oblastech nadvarlete k dalšímu složitějšímu dozrávání, které je naprosto nezbytné pro plodnost spermií. Toto zrání trvá přibližně 10 dnů. Následně jsou spermie s výrazně zpomaleným metabolismem uloženy po určitou dobu v ocasu nadvarlete do chvíle, než dojde k ejakulaci (Caballero et al. 2011; Belleannée et al. 2012).

Spermie postupným průchodem jednotlivými oblastmi nadvarlete přichází do styku s intraluminální tekutinou, která mění složení dle příslušných exprimovaných genů. V důsledku působení tekutiny se mění vlastnosti cytoplazmatické membrány spermií. Dochází ke změně složení fosfolipidů a jejich poměru k cholesterolu, dále ke změně náboje, relokizaci povrchových antigenů a úpravě povrchových proteinů. Některé původní membránové proteiny jsou úplně degradovány proteolytickou aktivitou nebo jsou modifikovány (Sullivan et al. 2005; Dacheux et al. 2016). V membráně spermií se objevují během dozrávání i nové proteiny. V porovnání s původními je však těchto nových méně (Skerget et al. 2015).

Proteiny produkované epitelem nadvarlete jsou sekretovány merokrinní i apokrinní cestou. Apokrinní sekrece je dávana do souvislosti s již zmíněnými epididymosomy (Dacheux et al. 2016; James et al. 2020). Dosud nepopsané vezikuly obklopující spermie poprvé zaznamenali Yanagimachi et al. (1985) u křečka a tehdy se domnívali, že jejich funkce souvisí s transportem cholesterolu mezi membránami váček a spermií. Epididymosomy mají podobnou strukturu jako buněčné exozomy. Jedná se o extracelulární váčky, které mohou mít rozměr od 50 do 500 nm. (Sullivan et al. 2005). Obsah epididymosomů a proteiny exprimované

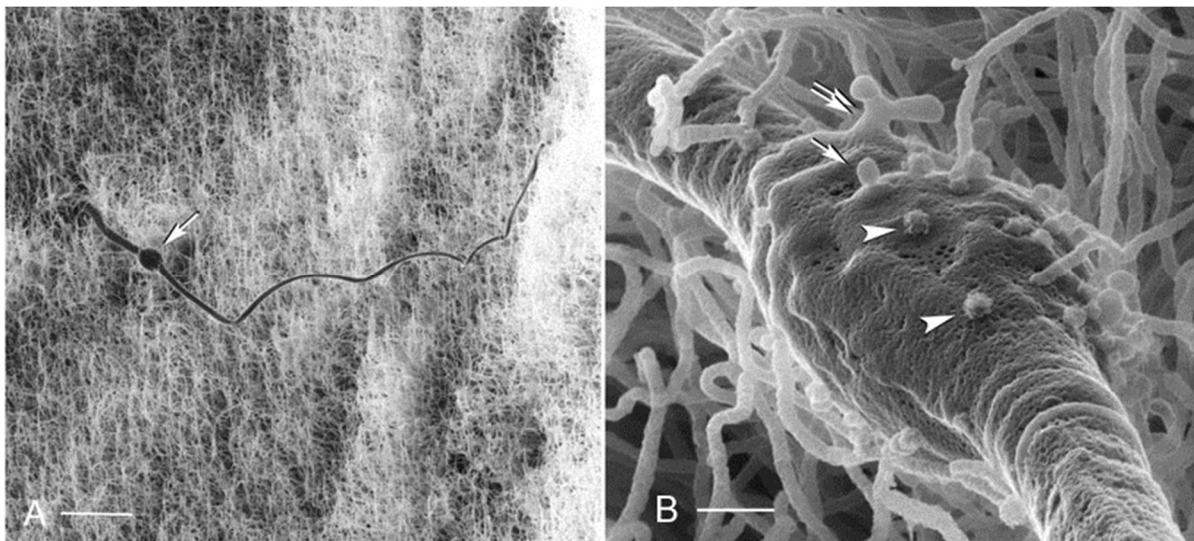
nadvarletem jsou stále předmětem zkoumání. Nejčastěji zmiňovanými proteiny jsou v tomto kontextu díky jejich předešlé detekci např. CD52, enzym glutathion peroxidáza (GPX5), myší adhezni spermatická molekula (SPAM1, sperm adhesion molecule), P25b/P26h, inhibiční faktor migrace mikrořágů (MIF), methylmalonát-semialdehyd dehydrogenáza (MMSDH) a některé proteiny ze skupiny ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) (Sullivan et al. 2007; Dacheux et al. 2016).

Obsah epididymosomů je však mnohem rozmanitější. Girouard et al. (2011) izolovali 555 proteinů z epididymosomů hlavy nadvarlete a 438 proteinů z epididymosomů ocasu nadvarlete býka. Nixon et al. (2019) identifikovali při proteomickém profilování myších epididymosomů z celého nadvarlete 1640 proteinů. Na základě analýzy genetické ontologie se jedná nejen o povrchové molekuly, ale také enzymy, transportní proteiny, strukturní proteiny a chaperony. Mezi molekulami transportovanými epididymosomy jsou mimo jiné také tetraspaniny CD9, CD63, CD81 a CD151 (Nixon et al. 2019; Barranco et al. 2019)

Poměrně novým objevem v souvislosti s epididymosomy je přítomnost nekódujících RNA, především malých molekul RNA (sRNA), pod které spadají microRNA (miRNA), piwiRNA (piRNA), ribozomální malé RNA (rsRNA) a malé molekuly odvozené od tRNA (derived small RNA, tsRNA). U těchto molekul se předpokládá epigenetický vliv na časnou embryogenezi (Reilly et al. 2016; Donkin & Barrès 2018; Trigg et al. 2019; James et al. 2020).

Spermie ztrácí přebytečnou cytoplazmu v podobě cytoplazmatické kapky. Păunescu et al. (2014) se podařilo pomocí heliové iontové mikroskopie zachytit snímek myší spermie uložené v ocasu nadvarlete, jejíž cytoplazmatickou kapku obklopují struktury odpovídající velikostí a tvarem epididymosomům (viz Obr. 4). Je tedy možné, že se epididymosomy podílí i na ztrátě cytoplazmatické kapky.

Nemalým dílem přispívají ke schopnosti fertilizace samce také složky produkované přídatnými pohlavními žlázami. Mezi přídatné pohlavní žlázy koně patří měchýřkovitá žláza, bulbouretrální žláza a předstojná žláza (Schnobrich et al. 2016). Se sekrety těchto žláz přichází spermie do styku při ejakulaci. Sekret produkovaný nadvarletem a těmito žlázami je souhrnně nazýván semenná plazma. Obsažené složky poskytují výživu ejakulovaným spermii, plní ochrannou funkci v reprodukčním traktu samice, dávají podnět k aktivaci metabolismu, indukují motilitu bičíku a podílejí se na kapacitaci v organismu samice před oplodněním. Semenná plazma představuje většinu objemu ejakulátu (Moura et al. 2006; Visconti 2009; Nongbua et al. 2020).



Obr. 4: (A) Snímek myší spermie s hlavičkou uloženou v epitelu nadvarlete. Na bičíku spermie je patrná cytoplazmatická kapka. (B) Cytoplazmatická kapka spermie s vysokým přiblížením (200 nm) heliovým iontovým mikroskopem. Na povrchu kapky se nachází útvary připomínající membranózní vezikuly (převzato a upraveno dle Păunescu et al. 2014).

3.4 Oplození

Během průchodu samičím reprodukčním traktem podstupují spermie kapacitaci a získávají kompetenci k oplození. Kapacitované spermie jsou naváděny chemotaxí a termotaxí k ovulovanému oocytu, který se v tu chvíli nachází ve vejcovodu. Na počátku interakce mezi haploidními gametami musí spermie překonat vrstvu kumulárních buněk obklopujících vajíčko. Poté se spermie váží na *zona pellucida*, glykoproteinový obal oocytu, a probíhá akrozomální reakce. Enzymy uvolněné z akrozomového váčku umožňují spermii penetrovat zonu pellucidu. V průběhu akrozomální reakce jsou na membráně hlavičky spermie odkryty vazebné proteiny zprostředkávající adhezi na plazmatickou membránu oocytu. Po navázání membrán gamet je iniciována fúze. Vazba membrán vyvolává influx Ca^{2+} a dochází ke kortikální reakci, která brání průniku dalších spermií. Do cytoplazmy oocytu postupně vniká celá spermie. Samčí a samičí prvojádra fúzí a dávají vzniknout diploidní zygotě (Alberts et al. 2002; Yu et al. 2006; Roy et al. 2020a).

3.4.1 Kapacitace

Ejakulované spermie podstupují během průchodu reprodukčním traktem samice řadu biochemických a fyziologických změn, nezbytných pro oplodnění. Tyto změny jsou souhrnně nazývané kapacitace. Spermie, které překonají děložní krček, jsou v prostředí dělohy vystaveny akceptorům cholesterolu. Jedná se zejména o albumin, nicméně u koní je role albuminu stále diskutována (Macías-García et al. 2015).

V důsledku působení akceptorů je z plazmatické membrány spermií vyvážen cholesterol a dochází k tzv. cholesterolovému efluxu. Nižší podíl cholesterolu má za následek vyšší fluiditu

a permeabilitu membrány. Důležité jsou v tomto ohledu především ionty HCO_3^- a Ca^{2+} , jejichž transport spouští řetězec biochemických reakcí. Zvyšuje se intracelulární pH a dochází k aktivaci rozpustné adenylátcyklázy v cytozolu, která produkuje cyklický adenosin monofosfát (cAMP). cAMP aktivuje proteinkinázu A (PAK) a ta fosforyluje cílové proteiny v buňce, především jejich tyrozinové zbytky. Mění se aktivita pohybu spermií, které se stávají hyperaktivními. Další modifikace se opět týkají složení membrány. Některé povrchové molekuly semenné plazmy jsou odstraněny a mění se poloha ligandů, které se budou podílet na interakci s receptory oocyty. Důležitými kroky v přípravě na akrozomální reakci jsou zvyšující se koncentrace Ca^{2+} a hyperpolarizace membrány, která v budoucnu umožní exocytózu obsahu akrozomu (Morgan et al. 2008; Visconti 2009; Abou-haila & Tulsiani 2009; Ritagliati et al. 2018; Tumova et al. 2021).

3.4.2 Interakce gamet a akrozomální reakce

Ovulovaný oocyt, vyčkávající ve vejcovodu na oplodnění, je obklopen dvěma vrstvami. Vnější, kumulus, se skládá z kumulárních buněk upevněných v matrix obsahující kyselinu hyaluronovou. Vnitřní, zvaná *zona pellucida*, se skládá z glykoproteinů. Kapacitované hyperaktivované spermie se asymetricky pohybují dělohou a vejcovodem a aktivně vyhledávají oocyt. Cílem těchto spermií je průnik kumulem a vazba na proteiny zony pellucidy.

Hlavní vazebné glykoproteiny zony jsou označovány ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4, z nichž každý je kódován jiným lokusem. Genetická exprese jednotlivých proteinů je druhově odlišná. Všechny čtyři glykoproteiny se vyskytují v zoně člověka, primátů, některých kočkovitých šelem, koně domácího a dalších. Některé druhy savců postrádají buď ZP1 (skot, prase, pes domácí) nebo ZP4 (myš domácí) (Mugnier et al. 2009; Izquierdo-Rico et al. 2021).

Zatím není zcela jasné, jaké mechanismy jsou zapojeny do pohybu spermie skrze expandovaný kumulus. Podle obecného savčího modelu spermie prostupují kumulem s intaktním akrozomem pravděpodobně díky hyperaktivované motilitě a k samotné akrozomální reakci dochází až později při vazbě spermie na ZP3 v zoně pellucidě (Florman et al. 2008). Jin et al. (2011) však ve své studii na myších pozorovali, že spermie přichází do kontaktu se zónou pellucidou již po proběhlé akrozomální reakci. Domnívají se tedy, že jsou to právě kumulární buňky, které dávají spermii prvotní impuls k indukci akrozomální reakce. Hino et al. (2016) zaznamenali u téhož organismu obě zmíněné varianty, nicméně uvádí, že většina spermií prochází kumulem ve fázi proběhlé akrozomální reakce. I za předpokladu, že by zde kumulární buňky hrály pouze podpůrnou roli, nelze na základě výsledků dosavadního výzkumu popřít, že se nějakým způsobem podílí na oplodnění. Vzhledem k tomu, že všechny zmíněné experimenty probíhaly na myších, nelze vyloučit v procesech spouštěcích akrozomální reakci mezidruhové rozdíly.

Za induktor akrozomální reakce je obecně považována tzv. primární vazba spermie na ZP3 glykoprotein v zoně pellucidě. Samotná akrozomální reakce zahrnuje několik na sebe navazujících dějů. Dochází k exocytóze enzymatického akrozomálního obsahu do extracelulárního prostředí. Vnější akrozomální membrána fúzuje s plazmatickou membránou, která ji pokrývá, vznikají vezikuly a jsou odkryty vazebné proteiny na vnitřní akrozomální membráně. Právě některé z těchto molekul dále zprostředkovávají sekundární vazby na zónu pellucidu. Důležité je v kontextu s akrozomální reakcí zmínit také relokaci proteinů

zapojujících se později během fúze gamet, např. Izumo1, CD46, $\beta 1$ integrin a tetraspaniny. Tyto molekuly byly detekovány v různých částech hlavičky spermie v závislosti na své povaze a době kapacitace. (Florman et al. 2008; Klinovska et al. 2014; Frolikova et al. 2016; Breitbart & Shabtay 2018; Tumova et al. 2021)

3.4.3 Fúze gamet

Vlivem působení enzymů obsažených v akrozomu je spermie schopna penetrovat zonu pellucidu, prostoupit do perivitellinního prostoru oocyty a poté adhezuje k plazmatické membráně vajíčka – oolemě (Gadella 2013). Gamety se dostávají do juxtapozice a přiléhají k sobě tak, aby docházelo ke kontaktu mezi ekvatoriálním segmentem hlavičky spermie a oolemou. Vazba obou membrán je naprosto zásadní pro průběh oplodnění (Inoue et al. 2015).

V současnosti stále probíhá aktivní výzkum vazebných molekul podílejících se na fúzi gamet. Ve výzkumu nachází využití myši knockout model. Genetický knockout (KO) spočívá v inaktivaci určitého genu za využití nukleáz a metod genového inženýrství (Hall et al. 2009; Van Campenhout et al. 2019). Studie založené na myším knockout modelu prokázaly u většiny kandidátních proteinů jejich postradatelnost v *in vivo* podmínkách. Za proteiny nezbytné pro fúzi gamet jsou nejčastěji považovány především některé proteiny z rodiny ADAM (dříve označovány jako fertilin), CD9, Izumo a Juno (Okabe 2013; Trebichalská & Holubcová 2020).

Po navázání plazmatických membrán je spermie obklopena mikroklky. Oocyty jsou hustě pokryty mikroklky po celém svém povrchu (Santella et al. 1992; Curcio et al. 2014), avšak u některých druhů, konkrétně myši a křečka, mikroklky chybí ve vypouklé oblasti, kde se nachází dělicí vřetenko. V tomto místě k fúzi gamet nedochází (Phillips & Shalgi 1980). Postupně je pohlcena hlavička, krček i bičík (Wilson & Snell 1998; Alberts et al. 2002).

Úspěšný průnik spermie vyvolává periodické změny koncentrace Ca^{2+} v cytoplazmě oocyty zvané oscilace vápníku, rapidní depolarizaci oolemy a řadu obranných mechanismů proti proniknutí dalších spermií. Oscilace vápníku vede k aktivaci oocyty. Je spuštěn blok proti polyspermii, oocyt vystupuje z druhého meiotického bloku, probíhá selektivní recruitment a degradace maternální mRNA, vznikají prvojádra obou gamet a je iniciována exprese genů potřebných k vývoji embrya (Trebichalská & Holubcová 2020). Jedna z teorií týkající se oscilace vápníku tvrdí, že faktor pro spuštění aktivace přináší do cytoplazmy oocyty samotná spermie. Tato teorie vychází ze dvou pozorování: (1) první vlna Ca^{2+} se v cytozolu šíří od místa vniknutí spermie k opačnému pólu, (2) oscilace vápníku byly zaznamenány bez rozdílu po mikroinjektáži extrahovaného cytosolu spermie. Z mnoha zkoumaných proteinů se jeví fosfolipáza C zeta (PLC ζ), specifická izoforma, jako nejsilnější kandidát. Dle modelových situací by měla působit jako aktivační faktor spouštěcí řadu signálních kaskád potřebných pro aktivaci oocyty, včetně uvolnění vápníku z endoplazmatického retikula vajíčka (Saunders et al. 2002; Sutovsky et al. 2003; Swann et al. 2004; Whitaker 2006). Nozawa et al. (2018) tuto teorii podpořili ve své novější studii opět za využití genetického knockoutu myši.

3.4.3.1 Vazba spermie na oolemu

Poslední překážkou pro spermií k úspěšnému oplodnění je oolema, plazmatická membrána oocyty. Spermie se musí nejprve navázat na oolemu pomocí vazebných molekul. Po navázání fúzují membrány gamet a spermie proniká do cytoplazmy oocyty. Dosud byly

popsaný jen tři pro vazbu opravdu nepostradatelné molekuly – CD9, Juno a Izumo. Kandidátních molekul však bylo navrženo a prozkoumáno mnoho (viz Obr. 5).

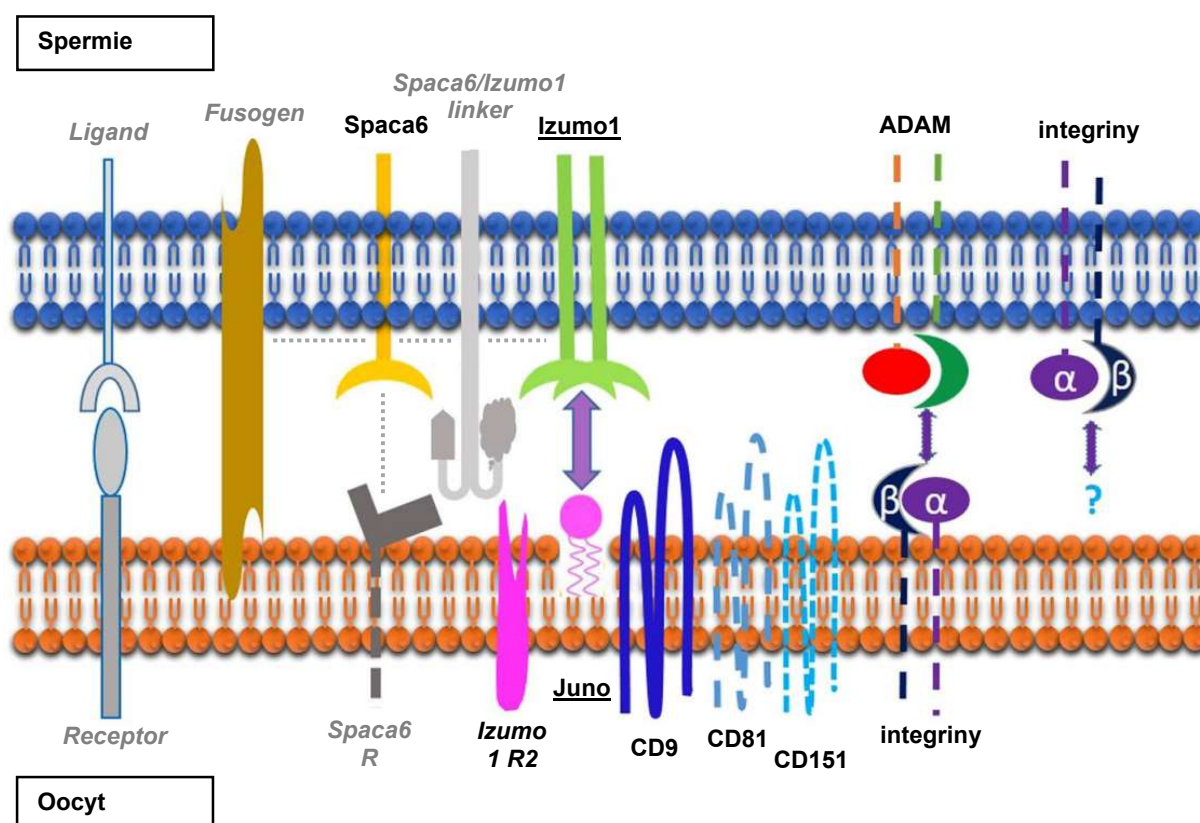
Prvním kandidátem, u něhož se očekávalo zprostředkování vazby, byl transmembránový protein fertilin nacházející se na membráně spermií. Fertilin je heterodimer skládající se z transmembránových glykosylovaných α and β podjednotek, které jsou spojeny nekovalentními vazbami. Předpokládalo se, že se N-terminus extracelulárních domén obou podjednotek váže na $\alpha 6\beta 1$ integriny v plazmatické membráně oocyty (Alberts et al. 2002; He et al. 2003). Později byly obě jednotky rozlišeny a dostaly vlastní označení – ADAM1 (α fertilin) a ADAM2 (β fertilin). Oba proteiny patří do proteinové rodiny ADAM (a disintegrin and metalloproteinase). Pokusy na knockout myších postupně vyvrátily nezbytnost těchto proteinů při fúzi gamet (Kim et al. 2006). Určitou roli však přeci jen mají. Ztráta dimeru ADAM1/ADAM2, ať už částečná nebo úplná, vede u spermie k absenci proteinu ADAM3, který je potřebný pro migraci vejcovodem a vazbu na zonu pellucidu (Nishimura et al. 2004; Okabe 2013). Funkce proteinu ADAM3 byla popsána na myším modelu a opět budou i v tomto případě existovat druhově specifické rozdíly, protože například u člověka je gen pro ADAM3 nekóduje funkční protein (Grzmil et al. 2001). I přesto mohou mít integriny a disintegriny při adhezi a fúzi alespoň podpůrnou funkci.

Inoue et al. (2005) jako první popsali u spermií membránový protein Izumo. Myši s genotypem *Izumo*^{-/-} produkovaly na pohled normální spermie se zachovalou schopností vazby a penetrace zony pellucidy. Postrádaly ale schopnost fúze s oolemou. Tento konkrétní protein byl později pro přesnost označen *Izumo1*. Další proteiny spadající do stejné imunoglobulinové proteinové rodiny jsou *Izumo2-4*. *Izumo1-3* jsou exprimovány ve varleti jako transmembránové proteiny, zatímco *Izumo4* je rozpustný protein postrádající transmembránovou doménu a exprimovaný i v dalších tkáních (Ellerman et al. 2009). Během akrozomální reakce je *Izumo1* na spermii relokalizován z akrozomu do oblasti, která zprostředkovává adhezi k oolemě. Dle tradičního modelu spermie přiléhá ekvatoriálním segmentem hlavičky. Na základě pozorování relokalizace se do tohoto děje zapojují *Izumo1* buď z ekvatoriálního segmentu hlavičky spermie nebo z jejího celého povrchu (Inoue et al. 2011).

Dalším fúzním faktorem pocházejícím ze samčí gamety je *Spaca6*. Jedná se o protein podobný imunoglobulinům, který sdílí některé vlastnosti s *Izumo1*. Po akrozomální reakci se nachází v ekvatoriálním segmentu, stejně jako právě zmíněný *Izumo1*. Fenotyp *Spaca6* knockoutovaných myší dále také připomíná fenotyp knockoutovaných myší *Izumo1* – spermie nejsou schopné adheze k oolemě a zůstávají v perivitellinním prostoru. Relokalizaci samotného *Izumo1* však absence *Spaca6* neovlivňuje. Na základě těchto poznatků byl *Spaca6* navržen jako kandidát pro interakci s *Izumo1*, vedoucí k fúzi gamet (Lorenzetti et al. 2014; Barbaux et al. 2020).

Dlouhá léta se pátralo po vazebném partneru proteinu *Izumo*. Až v roce 2014 objevili Bianchi et al. (2014) v plazmatické membráně oocyty receptor Juno, GPI-ukotvený glykoprotein bohatý na cystein. Zpočátku byl indentifikovaný jako folátový receptor FR4, v porovnání s ostatními folátovými receptory ale postrádá vazebné místo pro tuto látku. Výjimečný je naopak tím, že se tryptofanové zbytky receptoru na povrchu oolemy dokážou navázat na protein *Izumo1* na membráně spermie, čímž je zajištěna adheze samčí i samičí gamety před započítím fúze (Kato et al. 2016). Interakce mezi *Izumo1* a Juno je vysoce konzervovaná napříč druhy (Bianchi et al. 2014; Chalbi et al. 2014).

Další molekulární interakce týkající se komplexu Izumo1-Juno popsali Inoue et al. (2015). Izumo1 existuje v hlavičce spermie v podobě monomeru před akrozomální reakcí i po relokaci, která je s ní spojena. Monomerní Izumo1 na membráně spermie rozpoznává monomerní Juno na oocytu a je iniciována adheze. Po navázání Izumo1 na receptor dávají dva Izumo1 monomery vzniknout společnému dimeru a ten ztrácí afinitu k Juno. Autoři předkládají hypotézu, že je adheze gamet nadále zprostředkována dimerem Izumo1 a dosud neznámým receptorem oocyty, jehož aktivita by se mohla podílet na fúzi membrán.



Obr. 5: Hypotetický model komplexu zprostředkovávajícího adhezi a fúzi savčích gamet. Model zahrnuje již v textu zmíněné molekuly, tetraspaniny a další potenciální adhezní či fúzogenní molekuly a jejich interakce (převzato a upraveno dle Barbaux et al. 2020).

3.4.3.2 Blok polyspermie

Oocyt ovládá ochranné mechanismy bránící oplodnění více než jednou spermií, tzv. polyspermii. V průběhu fúze plazmatických membrán gamet je rapidně depolarizována oolema a dochází k náhlému vzrůstu koncentrace Ca^{2+} v cytosolu oocyty. Influx vápenatých iontů je prvním impulsem k aktivaci oocyty a zároveň vyvolává kortikální reakci, během níž je exocytózou uvolňován enzymatický obsah kortikálních granul měnících strukturu zony pellucidy. Tyto strukturální změny zahrnují například proteolytické štěpení ZP2 a hydrolyzu glykosylových skupin ZP3. Zona tvrdne a je blokována vazba dalších spermií (Alberts et al. 2002; Liu 2011).

Na tvrnutí zony pellucidy se kromě kortikálních granul podílí také eflux zinku v ději zvaném „zinc spark“ (v překladu zinková jiskra). Zinkové ionty jsou v oocytu akumulovány fyziologicky za účelem udržení druhého meiotického bloku. Vrstující koncentrace vápenatých iontů během fúze gamet indukuje nejen kortikální reakci, ale také exocytózu zinkových vezikulů do perivitelinního prostoru. (Duncan et al. 2016). Vlivem působení zinku houstne *zona pellucida*, mění se její struktura a snižuje se afinita spermií. Pokles intracelulárního zinku je dalším faktorem ovlivňujícím aktivaci oocytu a iniciaci dokončení meiotického dělení (Que et al. 2017).

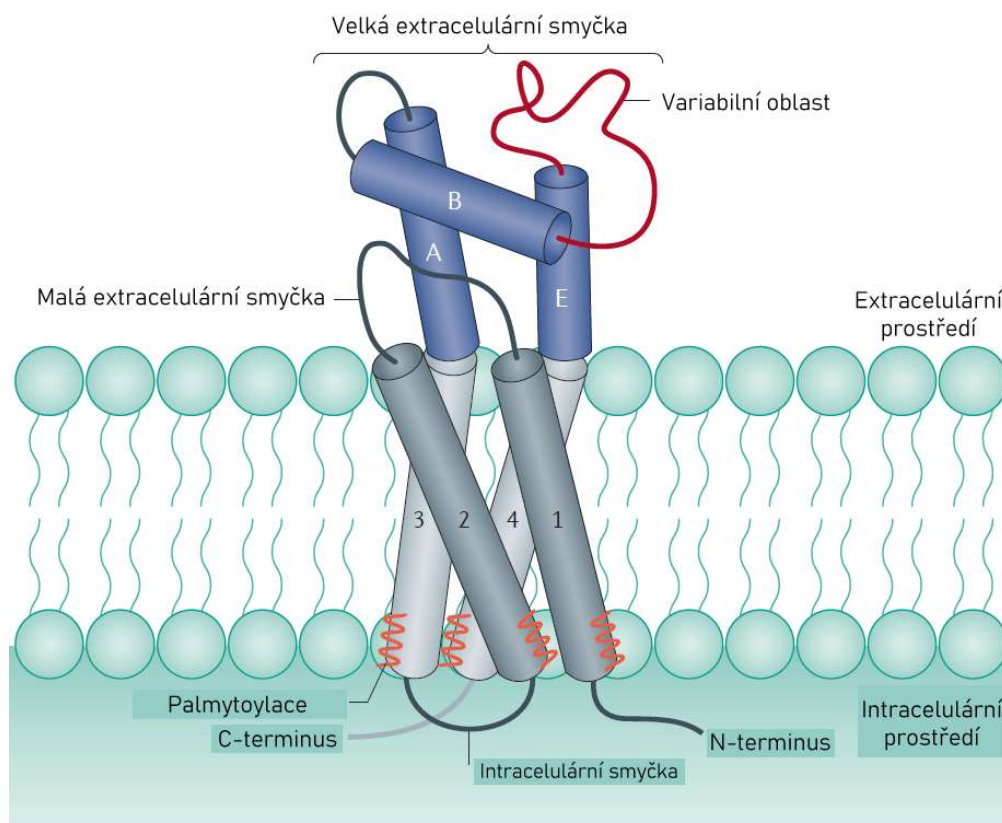
Na úrovni oolemy k bloku polyspermie přispívá vyštěpení receptorů Juno z oolemy a jejich transport do perivitelinního prostoru jako součást vezikulů. Ty by zde mohly sloužit také jako návnada pro další spermie. K odstranění Juno a efektivní kortikální reakci nedochází při *in vitro* oplození pomocí ICSI (intracytoplasmic sperm injection) metody, kdy je spermie uměle vpravena do oocytu (Bianchi et al. 2014).

3.5 Tetraspaninové proteiny

Z dosavadního výzkumu je zřejmé, že ve fúzi membrán gamet během oplodnění hrají klíčovou roli membránové proteiny tetraspaniny – jak na straně spermie, tak na straně oocytu.

Tetraspaniny jsou proteiny patřící do transmembránové 4 nadrodiny (TM4SF). Jedná se o transmembránové proteiny o délce 200-350 aminokyselin a velikosti 20-30 kDa. Tetraspaniny jsou přítomny v membránách téměř všech eukaryotických buněk, endozomech a lysozomech. U savců spadá do nadrodiny 33 proteinů, u *Drosophila melanogaster* bylo detekováno 37 proteinů a u *Caenorhabditis elegans* 20 proteinů (Hemler 2003, 2008, 2014).

Typicky je jejich struktura tvořena čtyřmi transmembránovými doménami, dvěma extracelulárními smyčkami a jednou intracelulární smyčkou (viz Obr. 6). Transmembránové domény 1-4 nesou polární skupiny neznámé funkce. Malá extracelulární smyčka (EC1, SEL) dlouhá 13-30 aminokyselin spojuje transmembránové domény 1 a 2. Velká extracelulární smyčka (EC2, LEL) se skládá ze 70-130 aminokyselin a spojuje transmembránové domény 3 a 4. Dělí se na konzervovanou oblast, skládající se z α -helixů A, B a E, a variabilní oblast spojující helixy B a E. Variabilní oblast určuje specifitu interakcí s dalšími molekulami, jako jsou např. imunoglobuliny, signální enzymy a intergriny. Bývá stabilizována dvěma až čtyřmi disulfidovými vazbami. Malá intracelulární smyčka má délku 4 aminokyselin. Konce transmembránových domén 1 a 4 tvoří N-terminální a C-terminální konce na cytozolické straně membrány. Obecná struktura tetraspaninů je znázorněna na Obr. 6. Během posttranslačních úprav podléhají cysteiny v proximální části membrány palmitoylaci. Palmitoylace je zásadní pro organizaci tetraspaninů a jejich vazebných partnerů, které spolu laterálně interagují, shlukují se a dávají vzniknout membránovým mikrodoménám obohaceným o tetraspaniny (TEM, tetraspanin-enriched microdomain). Společně tvoří dynamickou tetraspaninovou síť. (Berditchevski et al. 2002; Stipp et al. 2003; Hemler 2005, 2014; Levy & Shoham 2005; Klinovska et al. 2014).



Obr. 6: Obecná struktura tetraspaninu (Hemler 2014).

Tetraspaniny komunikují prostřednictvím mikrodomén TEM s dalšími transmembránovými či intracelulárními proteiny a regulují tak řadu buněčných dějů. Podílí se na buněčné signalizaci, morfologii buněk, migraci, fúzi a adhezi. Ovlivňují dynamiku membrán, malignitu, funkci imunitního systému a oplození. Velkou nadějí především v onkologické léčbě představuje zaměření na tetraspaniny například monoklonálními protilátkami nebo aplikací RNA interference (Hemler 2008; Charrin et al. 2009; Ke et al. 2016).

Interakce tetraspaninů lze na základě funkce v tetraspaninové síti rozdělit následovně: (1) intramolekulární interakce zachovávající strukturu tetraspaninů, (2) interakce mezi dvěma tetraspaniny zachovávající strukturu sítě, (3) interakce mezi tetraspaninem a funkčním partnerským proteinem, (4) interakce v cytosolu regulující intracelulární signalizaci (van Deventer et al. 2017).

Některé tetraspaniny nesou původní označení CD (cluster of differentiation) dle nomenklatury založené na výzkumu monoklonálních protilátek a jejich schopnosti rozpoznat podobné antigeny, který aktivně probíhal v 80. letech 20. století. Konkrétně byly takto popsány CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82 a CD151. Ostatní CD molekuly se neřadí mezi tetraspaniny. Postupně přibývaly další tetraspaninové proteiny s různými jmény. U člověka jsou dnes všechny sjednoceny pod systematickým názvem Tspan1-33, nicméně stále jsou používány také názvy původní (Chan et al. 1988; Bassani & Cingolani 2012).

V reprodukci jsou to konkrétně tetraspaniny CD9, CD81 a CD151, které jsou spojovány s organizací membránových komplexů uplatňujících se při vazbě a fúzi gamet. Často jsou tetraspaninové proteiny dávány také do spojitosti s extracelulárními vezikuly, viz již zmíněné

epididymosomy. Lokalizace tertraspaninů v hlavičce spermie se mění v průběhu akrozomální reakce (Sabetian et al. 2014; Barranco et al. 2019; Jankovicova et al. 2020b).

Dalším CD proteinem zásadně se podílejícím na oplodnění je CD46, který prostřednictvím vazby na $\beta 1$ integrin v membráně hlavičky spermie ovlivňuje organizaci cytoskeletárního aktinu a zachovává integritu akrozomu. Během akrozomální reakce jsou CD46 a $\beta 1$ integrin relokalizovány do fúzogenní oblasti ekvatoriálního segmentu. Nejedná se však o tertraspanin, ale o regulační protein komplementu (Inoue et al. 2003; Frolikova et al. 2016).

3.5.1 CD151

3.5.1.1 Gen *CD151* *Equus caballus*

Gen *CD151* koně domácího se nachází na chromozomu 12. Kóduje protein *CD151* neboli Tspan24. Podle databáze Ensembl se skládá ze 7 exonů a 6 intronů a je dlouhý 2142 bp. Transkript je dlouhý 762 bp a kóduje protein o délce 253 aminokyselin. Gen má 265 ortologů. Data jsou založena na automatickém genovém anotačním systému Ensembl, verze 103 (Yates et al. 2020).

Některé živočišné druhy jsou anotovány i manuálně v rámci projektu Havana, vedeného stejnojmenným týmem pro databázi Ensembl. To se týká člověka, myši, dánia pruhovaného a krysy. Manuální anotace je citlivější a přesnější v odhalení možných existujících transkriptů. Výstupy obou typů anotací jsou následně propojeny a výsledky zveřejněny v databázi Ensembl.

V porovnání s koněm, u kterého byla při automatické anotaci popsána jen jedna transkripční varianta, bylo například u lidského genu *CD151* na chromozomu 11 díky kombinaci obou postupů identifikováno 23 transkripčních variant, z nichž některé nekódují žádný protein. Gen o velikosti 6945 bp obsahuje 9 exonů a 8 intronů.

Dalším zdrojem informací o genu jsou stránky výzkumného centra National Center for Biotechnology Information (NCBI). Tento portál sdružuje několik databází – NCBI Reference Sequence (RefSeq), GenBank, PDB, Ensembl, UniProtKB a SWISS-Prot, propojuje jejich data a poskytuje je uživatelům k nahlédnutí a výzkumnému účelu. Na základě dat z anotace koňského genomu publikované Hestand et al. (2015) a automatické anotace genomu *Equus caballus* NCBI, verze 103 z r. 2018, která využívá metodu genetické predikce Gnomon, vznikla na NCBI modelová referenční sekvence koňského genomu. Konkrétně se jedná o samici anglického plnokrevníka. Podle této referenční sekvence je koňský gen *CD151* velký 5068 bp, obsahuje 9 exonů a 8 intronů. Největším rozdílem mezi záznamy v obou databázích je počet transkripčních variant. Zatímco Ensembl uvádí 1 transkripční variantu, NCBI uvádí 6 predikovaných transkripčních variant X1-6. Bližší informace k transkripčním variantám a kódujícím proteinům jsou uvedeny v Tab. 1.

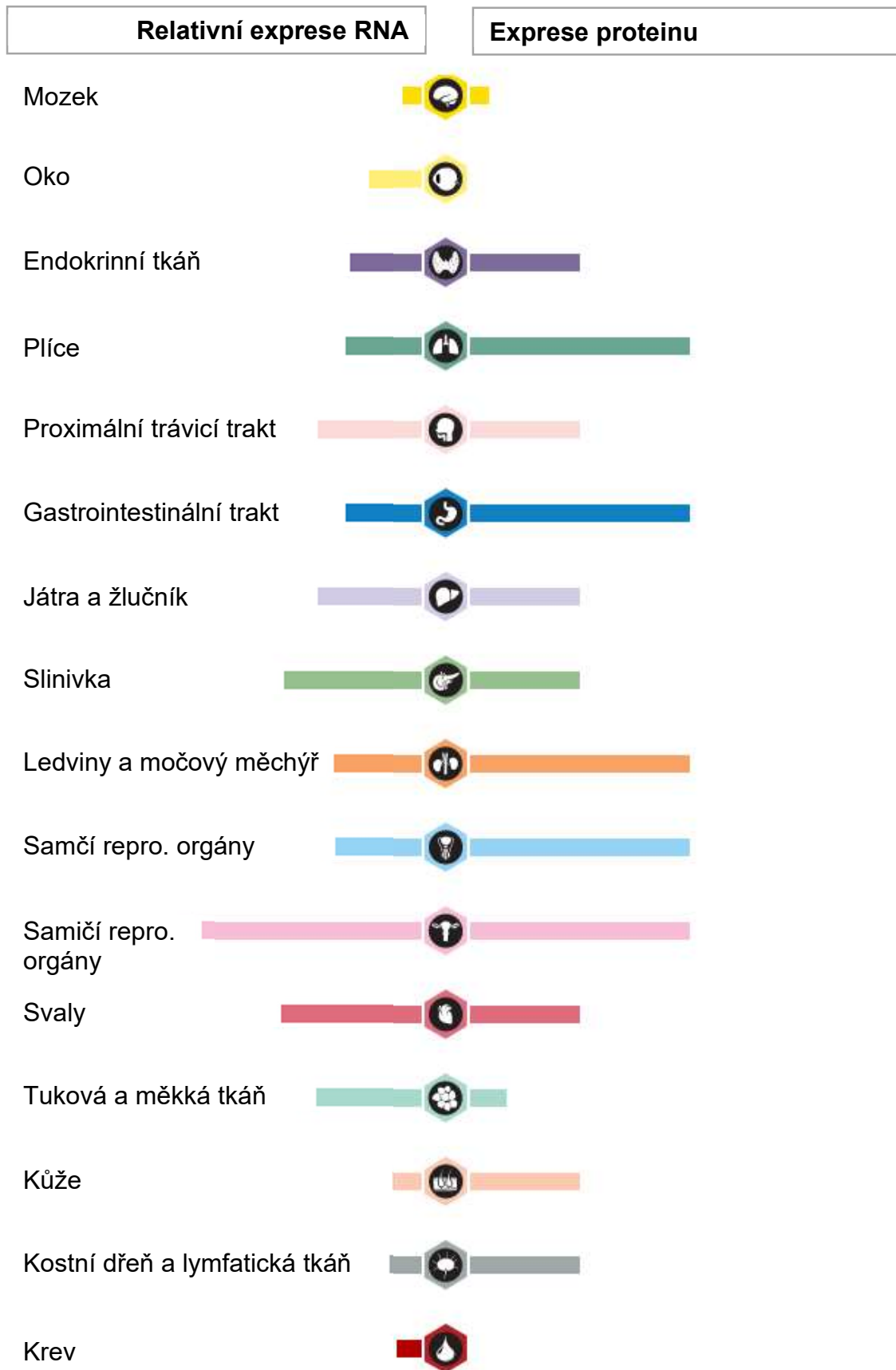
Tab. 1: Transkripční varianty genu *CD151 Equus caballus* a kódované proteiny dle databáze NCBI

Transkripční varianta	Označení mRNA sekvence	Délka mRNA	Označení proteinové sekvence	Délka proteinu
X1	XM_023654800.1	1853 bp	XP_023510568.1	253 aa
X2	XM_005598401.3	1919 bp	XP_005598458.1	254 aa
X3	XM_023654801.1	1848 bp	XP_023510569.1	255 aa
X4	XM_023654802.1	1808 bp	XP_023510570.1	256 aa
X5	XM_023654803.1	1915 bp	XP_023510571.1	257 aa
X6	XM_005598402.3	1875 bp	XP_005598459.1	258 aa

3.5.1.2 Genová exprese *CD151*

Tetraspaniny se vyskytují v membránách téměř všech eukaryotických buněk, avšak exprese jednotlivých molekul se liší v závislosti na typu tkáně a fyziologické či potažmo patologické funkci. Dosud bylo publikováno velice malé množství informací ohledně genové exprese *CD151* v souvislosti s reprodukcí. Konkrétně u koně tyto informace nejsou dostupné vůbec. Relativní exprese mRNA a proteinu *CD151* byla komplexně zkoumána v různých tkáních člověka v rámci projektu The Human Protein Atlas (viz Obr. 7). Mezi tkáně patřily také mužské a ženské reprodukční orgány, u nichž byla naměřena nízká až střední relativní exprese mRNA. Výjimkou byla prostata, kde byla naměřena vysoká exprese. Mezi zkoumanými tkáněmi nebyly žádné pohlavní buňky (Uhlén et al. 2015). Dalším druhem, u nějž proběhlo měření exprese mRNA v reprodukčních orgánech, je myš. Exprese byla detekována ve varleti, spermatogoniích a spermatidách (Jankovicova et al. 2020a).

Míra exprese *CD151* a její vliv na fyziologické procesy v organismu se odvíjí od primárních funkcí kódovaného proteinu, kterými jsou adheze a migrace buněk. Podílí se tak pozitivně například při hojení a reepitelizaci (Cowin et al. 2006). Větší pozornost ale bývá v literatuře věnována patologiím. U zvýšené exprese jde především o vývoj nádorů a metastáz (Matsumoto et al. 2014; Brzozowski et al. 2018; Li et al. 2019). Snížená exprese byla zaznamenána například u preeklamptických pacientek ve tkáni placenty, která je následně vystavena oxidativnímu stresu a dochází k inhibici ERK/Nrf2 signalizace (Wang et al. 2021).



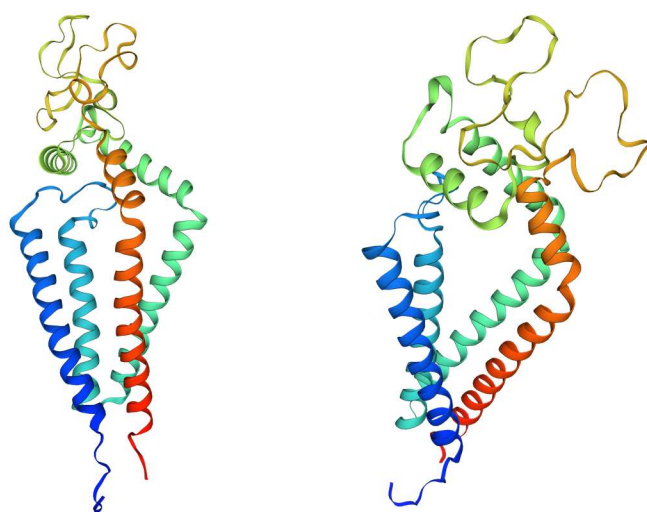
Obr. 7: Relativní exprese *CD151* ve tkáních člověka, upraveno dle The Human Protein Atlas (Uhlén et al. 2015)

3.5.1.3 Funkce a stavba kódovaného proteinu

CD151 interaguje v rámci membránových mikrodomén TEM s mnoha proteiny, včetně dalších tetraspaninů, proteáz, signálních molekul a integriny $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ a $\alpha 7\beta 1$. Kvůli shlukování proteinů v mikrodoménách je složité rozpoznat funkci konkrétní molekuly. Dosavadní výzkum věnovaný roli CD151 byl z velké části zaměřen na signalizaci v epiteliální tkáni a neoplazii (Sterk et al. 2002; Crew et al. 2004; Nishiuchi et al. 2006).

Determinace reálné terciární struktury proteinu je velmi náročná a u mnohých proteinů nebyla zatím vůbec popsána. K těmto účelům slouží programy pro modelaci proteinů na základě aminokyselinové sekvence. Tyto programy jsou založeny na vyhledávání homologie s již popsanými strukturami proteinů, dostupných z databází, které jsou následně použity jako templáty pro modelaci a predikci vazeb a interakcí mezi jednotlivými aminokyselinami a proteinovými podjednotkami v požadované aminokyselinové sekvenci. Jedná se o tzv. homologní modelování. Nadějí na poli proteomiky je vývoj softwaru, který by měl být schopný určit s vysokou přesností za využití metody deep learning umělé inteligence sbalování (folding) proteinů. Prostorové uspořádání je jedním z faktorů, které dávají proteinu jeho funkci, proto je toto pro modelaci důležité. Získané znalosti by se daly využít nejen v modelování, ale také v syntéze nových proteinů např. k terapeutickým účelům (Gao et al. 2020).

Přesná struktura molekuly CD151 zatím nebyla u žádného druhu popsána. Na Obr. 8 je zobrazen predikovaný model vygenerovaný volně dostupným webovým serverem Swiss-Model, využívajícím homologní modelování (Waterhouse et al. 2018).



Obr. 8: Predikovaný 3D model proteinu CD151 *Equus caballus* dle aminokyselinové sekvence sestřihové varianty X1, vygenerovaný Swiss-Model

3.5.1.4 CD151 v reprodukci

V porovnání s CD9 a CD81 je toho známo o funkci CD151 v reprodukci ztelně méně. Na základě fenotypizace knockoutovaných myší CD151^{-/-} provedené Wright et al. (2004) ztráta funkčního genu nevede ke sterilitě. Molekula má však i přesto nepopiratelnou roli díky klíčovým interakcím na povrchu gamet.

Jeden z mechanismů byl odhalen na lidských oocytech. CD9, CD151 a $\alpha 6\beta 1$ integrin jsou rovnoměrně rozprostřeny v oolemě. Za základě studií protilátek blokujících buď zmíněný integrin nebo CD151 bylo zjištěno, že blokace $\alpha 6$ podjednotky integrinu zcela inhibuje fúzi gamet. Mechanické odstranění zony pellucidy vedlo ke shluku CD151 a $\alpha 6\beta 1$ integrinu, ale nemělo žádný vliv na lokalizaci CD9. Shluky se ovšem netvoří v případě, že je před odstraněním zony pellucidy CD9 zablokován specifickou protilátkou. CD9 by tedy mohl být spouštěčem tvorby komplexu CD151/integrin $\alpha 6\beta 1$ při odhalení oolemy (Wolf et al. 2003; Ziyat et al. 2006). Vzhledem ke schopnosti CD151 vytvářet komplexy s několika různými integriny, nemusí tyto interakce probíhat jen mezi molekulami oocyty (cis interakce), ale také s integriny obsaženými na spermii (trans interakce). Cis interakce v tomto kontextu představují interakce mezi molekulami jedné gamety. Trans interakce jsou takové, které probíhají mezi molekulami samčí i samičí gamety (Jankovicova et al. 2020b).

Jankovicova et al. (2020a) jako první popsali expresi CD151 v samčích gametách a jeho distribuci v membráně spermií myši a býků v průběhu dospívání. Během spermatogeneze ve varleti a dozrávání v nadvarleti je CD151 lokalizován v ekvatoriálním segmentu spermie. Po akrozomální reakci byly tyto CD molekuly detekovány také na vnitřní akrozomální membráně, která obklopuje jádro. Frolikova et al. (2019) ve své studii identifikovali přesnou lokalizaci integrinových podjednotek, nacházejících se na membráně myších spermií, kterými jsou $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ a $\beta 4$. Podjednotky tvoří heterodimery $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 3\beta 1$ a $\alpha 6\beta 1$. Integrin $\alpha 6\beta 4$ se nachází ve stejné oblasti jako CD151, jejichž interakce by mohla vést ke stabilizaci ekvatoriálního segmentu (Jankovicova et al. 2020b). Otázkou nyní zůstává, které heterodimery se účastní cis interakcí a které trans interakcí s oocytem během fúze gamet.

3.5.2 Další tetraspaniny podílející se na reprodukci

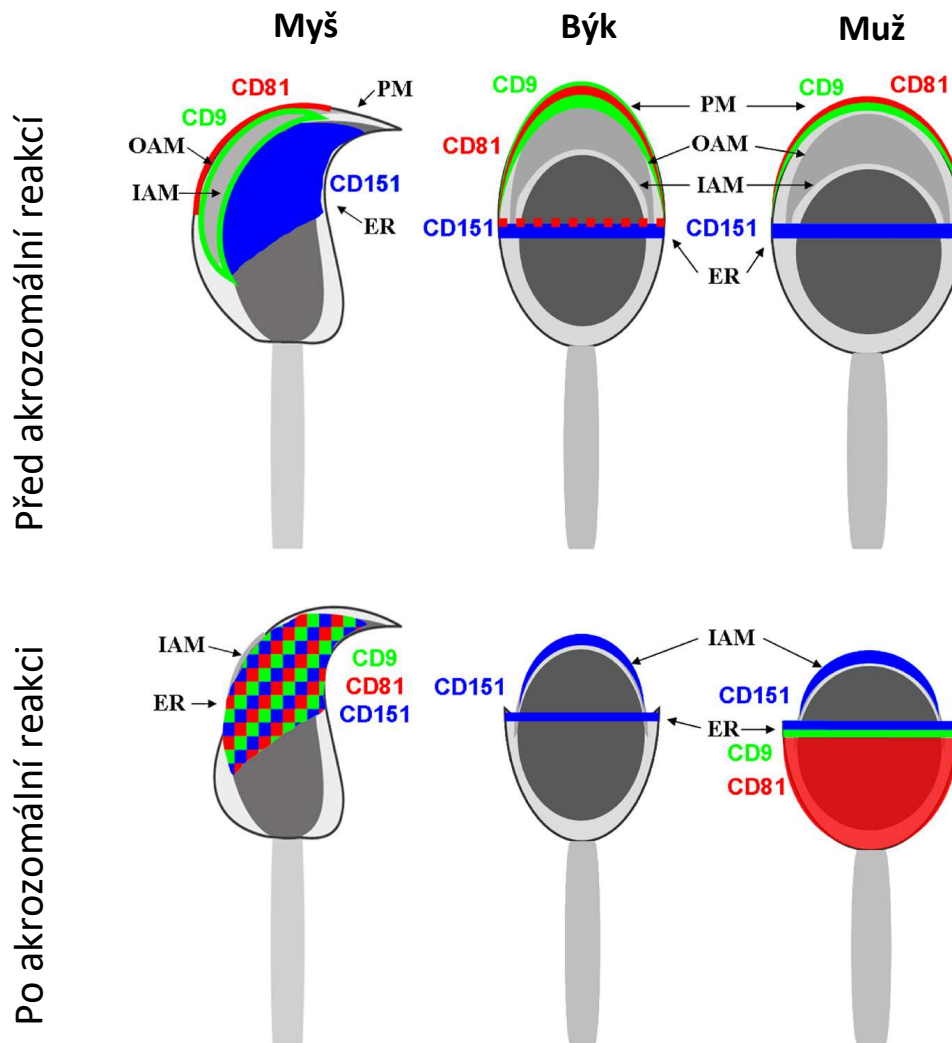
Velmi důležitými tetraspaniny pro fúzi gamet jsou CD81 a CD9. Obě molekuly jsou v oocytech lokalizovány na plazmatické membráně a na membránách vezikulů sekretovaných do perivitelninního prostoru. Oba tetraspaniny byly detekovány v hlavičce spermie člověka, myši, křavy a býka. Přítomnost CD9 byla potvrzena i v kančích spermiích (Jankovicova et al. 2019).

Myši bez exprimovaného proteinu CD9 jsou z velké části subfertilní. Spermie se nedokáží navázat na oolemu a zůstávají tak v perivitelninním prostoru (Miyado et al. 2000; Le Naour et al. 2000). Během oplodnění interaguje CD9 v oolemě s receptorem Juno a řadou integrinů β , včetně $\alpha 6\beta 1$. Při iniciaci adheze spermie a oocyty prostřednictvím Izumo1 a receptoru Juno v oolemě je CD9 akumulován v místě kontaktu. Vzhledem k povaze tetraspaninů je možné, že CD9 v průběhu fúze ovlivňuje řadu faktorů spojených s reorganizací membrán, jako jsou například uspořádání mikroklků na oolemě, obnovení místa adheze a tvorba vezikulů uvolněných do perivitelninního prostoru (Ziyat et al. 2006; Chalbi et al. 2014; Jankovicova et al. 2020b).

Dle Ito et al. (2010) se CD9 u myších samců nachází nejprve v cytoplazmě spermatogenních buněk. U zralých spermií byl tento tetraspanin detekován na vnitřní akrozomální membráně a v průběhu akrozomální reakce relokalizován do ekvatoriálního segmentu. Frolikova et al. (2018) odhalili CD9 na vnitřní i vnější akrozomální membráně. Autoři dále navrhují možný průběh cis i trans interakcí mezi CD9 a CD81.

Samotný CD81 se zdá být pro oplození důležitý, ne však naprosto nezbytný. Knockoutované myši samice mají o 40 % sníženou plodnost (Rubinstein et al. 2006). Tento tetraspanin byl v samičích gametách myši detekován na oolemě (Takahashi et al. 2001) a na vnitřní straně ZP (Ohnami et al. 2012). U ženských intaktních oocytů je rovnoměrně rozprostřen po celé oolemě a po odstranění ZP se molekuly shlukují (Ziyyat et al. 2006). Na oocytech krav byl CD81 detekován na oolemě a po oplození v perivitelinním prostoru zygoty (Jankovicova et al. 2016). Na oolemě, vnitřní straně ZP a vezikulech v perivitelinním prostoru po oplození byl detekován u prasnic (Jankovicova et al. 2019). Blokace CD81 protilátkou snižuje oplozeníschopnost pouze oocytů prostých ZP (Takahashi et al. 2001), intaktních oocytů nikoliv (Ohnami et al. 2012). V souvislosti s CD9 je často zmiňována kolokalizace a možnost případné interakce či tvorby komplexů.

V samčích gametách byl CD81 lokalizován u myši, skotu a člověka. Na epididymálních myších spermiích se nachází CD81 v plazmatické membráně apikálního akrozomu, během akrozomální reakce se šíří na celou hlavičku. Na býčích spermiích byl tento tetraspanin detekován také v apikální oblasti akrozomu a částečně v ekvatoriální oblasti. Po akrozomální oblasti zcela mizí z hlavičky spermie (Jankovicova et al. 2016). Na mužských ejakulovaných spermiích se CD81 také nachází v apikální části akrozomu a post-akrozomální oblasti. Do okamžiku, než proběhne akrozomální reakce, je kolokalizován s CD9, poté ale mizí z apikální části hlavičky. Tato kolokalizace je předpokládána na základě lidského modelu i u dalších druhů s výjimkou myších spermií, jejichž hlavička má odlišnou, zcela specifickou, morfologii (Frolikova et al. 2018). Důležité je zde zmínit také schopnost lidského CD81 navázat cholesterol (Zimmerman et al. 2016). Přítomnost či nepřítomnost cholesterolu mění kompaktnost transmembránové oblasti molekuly a její konformaci (Frolikova et al. 2018). Lokalizace jednotlivých tetraspaninů je znázorněna na Obr. 9.



Obr. 9: Relokalizace tetraspaninů v průběhu akrozomální reakce v hlavičce spermie myši, býka a muže. U spermií s intaktním akrozomem byly popsány oblasti výskytu CD9, CD81 i CD151, a to plazmatická membrána (PM), vnější akrozomální membrána (OAM), vnitřní akrozomální membrána (IAM) a ekvatoriální segment (ER). Během akrozomální reakce jsou tetraspaniny relokalizovány nebo se z hlavičky spermie úplně ztrácí. Rozmístění jednotlivých molekul je druhově specifické (Jankovicova et al. 2020b).

3.6 Metody stanovení exprese genů

Studium genové exprese je naprosto zásadní pro pochopení biologických dějů, odehrávajících se v buňce, tkáních a celém organismu. Expresi ovlivňuje mnoho regulačních mechanismů – transkripční faktory, methylace (Roundtree et al. 2017), struktura chromatinu, nekódující RNA a další (Wang et al. 2011; Deniz & Erman 2017).

Míru genové exprese lze stanovit přímo na úrovni transkribované mRNA nebo na úrovni syntetizovaného proteinu. Mezi nejznámější metody stanovení exprese RNA patří Northern blot, kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) a využití hybridizačních cDNA čipů (Moody 2001). K detekci požadované RNA ve fixovaných tkáních slouží *in situ* hybridizace preparátu se sondou, která je značena fluorescenčně (FISH) nebo enzymaticky. Fluorescence je zaznamenávána fluorescenčním mikroskopem. Enzym, alkalická fosfatáza nebo křenová peroxidáza, vyvolává chromogenní reakci (Wang et al. 2012). Genovou expresi lze zkoumat také pomocí sekvenování RNA (RNAseq), klasicky za využití reverzní transkripce a technik sekvenování nové generace (NGS). Jedná se o metodu kvalitativní i kvantitativní, umožňující identifikaci i kvantifikaci jednotlivých transkripčních variant či sekvenování celého transkriptomu (Ozsolak & Milos 2011; Stengel et al. 2020). Zlatým standardem je už řadu let kvantitativní real-time PCR, kombinující reverzní transkripci molekul mRNA a polymerázovou řetězovou reakci (Moody 2001; Adamski et al. 2014).

Běžnou metodou pro studium proteinové exprese je Western blot, sloužící k detekci a případně i kvantifikaci. Proteiny obsažené v buněčném lyzátu jsou separovány elektroforézou, přeneseny na membránu a poté označeny příslušnou protilátkou (Diller et al. 2021). Další metodou je například využití reportérového fúzního fluorescenčního proteinu (GFP, RFP, mCherry, tdTomato). Gen pro fluorescenční protein je vložen do promotoru studovaného genu, tudíž jsou oba geny exprimovány současně. Tento způsob značení nachází uplatnění *in vitro* i *in vivo* podmínkách na úrovni buňky, tkáně i celého organismu. Množství fluorescence je kvantifikováno průtokovou cytometrií. Vizualizovat lze i několik exprimovaných proteinů v jedné buňce najednou (Soboleski et al. 2005; Shaner et al. 2005; Shcherbo et al. 2007; Han et al. 2019).

3.6.1 Izolace RNA z tkání a buněk savců

Prvním krokem při stanovení genové exprese v tkáních či buněčných kulturách je izolace a purifikace mRNA. V intaktní živé buňce je přítomno mnoho různých druhů RNA, transkripty strukturních genů kódujících proteiny představují pouze molekuly mRNA. U ribonukleových kyselin je velmi důležitá kvalita materiálu, proto je třeba jej důkladně purifikovat od ostatních buněčných složek, především proteinů a DNA, a od enzymatických inhibitorů, případně fenolu či alkoholu, které by mohly ovlivnit výsledky dalších analýz. Nejčastější metody izolace RNA jsou: (1) fenol-chloroformová, (2) chromatografická, (3) silikátová (Bustin & Nolan 2004; Tavares et al. 2011).

3.6.1.1 Fenol-chloroformová metoda

Fenol-chloroformová extrakce je klasická, finančně méně náročná, metoda izolace RNA. Její výhodou je vysoká výtěžnost, její nevýhodou je vysoká pravděpodobnost kontaminace

proteiny a dalšími buněčnými složkami, fenolem, chloroformem nebo solemi. Nejprve je k buněčnému lyzátu přidán pufr ekvilibrovaný fenolem a poté chloroform. Po promíchání a centrifugaci se obsah zkumavky rozdělí na dvě fáze rozdělené interfází, v níž jsou obsaženy kontaminanty, především proteiny. RNA je vždy obsažena v lehčí vodné fázi. Následuje precipitace izopropanolem, do kterého se přenesou vodná fáze. Po promíchání a centrifugaci lze na dně zkumavky již pozorovat pelet izolované RNA. Dalším krokem je promývání ethanolem. Po odstranění supernatantu se nechá ethanol vypařit a pelet se rozpustí ve vodě bez RNáz (Tavares et al. 2011; Toni et al. 2018)

3.6.1.2 Chromatografická metoda

Tato metoda je založena na imobilizaci nukleových kyselin na vazebné membráně chromatografických kolonek. Lyzát je nanášen do centrifugační mikrozkuavky s vazebnou kolonkou a díky centrifugaci dochází k filtraci veškerého nežádoucího obsahu. Pro účely purifikace se vyrábí kolonky využívající gelovou chromatografii a afinitní chromatografii. Princip afinitní chromatografie, která bývá používána nejčastěji, spočívá v interakci mezi makromolekulami vzorku a membránou kolonky. Afinita RNA k membráně může být založena na interakcích elektrické povahy nebo interakcích 3'poly(A) konce, který je typický pro mRNA, s komplementárními oligo-dT sekvencemi upevněných na zrnkách membrány. Tento princip využívá i purifikace pomocí magnetických částic. V posledním kroku jsou nukleové kyseliny eluovány z vazebné membrány do mikrozkuavky. Výhodou afinitní selekce je velký podíl mRNA v konečném vzorku. Vysoce abundantní ribonukleovou kyselinou v buňce je rRNA, jejíž přítomnost a kontaminace je nežádoucí (Šmarda et al. 2005; Farrell 2010; Clark et al. 2019).

3.6.1.3 Silikátová metoda

Další technologií využívající vazebné kolonky a centrifugaci jsou kolonky se silikátovým filtrem. Nukleové kyseliny se za přítomnosti chaotropních solí vážají na silikátovou membránu, zatímco ostatní složky lyzátu prostupují membránou do mikrozkuavky. Po několika cyklech promývání membrány je purifikovaný materiál eluován roztokem s velmi nízkým podílem solí (Farrell 2010).

Silikátové kolonky ani chromatografie nepředstavují v porovnání s fenolovou metodou žádná zdravotní rizika. Jejich použití je snadné, efektivní a výsledkem je výtěžek intaktních molekul RNA s nízkou úrovní proteinové kontaminace. Rizikem je kontaminace DNA, proto je vždy třeba membránu kolonky ošetřit enzymem DNázou (Tavares et al. 2011).

3.6.1.4 Kvantifikace celkové RNA

Pro účely další analýzy je třeba změřit koncentraci a čistotu získané RNA. To se provádí nanášením malého množství preparátu na čidlo spektrofotometru, který měří absorbanci UV světla látkami obsaženými v nanášeném vzorku. Měří se jak absorbance samostatné RNA, na základě čehož se následně udává koncentrace, tak míra kontaminace proteiny a dalšími nukleovými kyselinami. Dusíkaté báze nukleových kyselin vykazují absorpční maximum při 260 nm. Pro stanovení koncentrace nukleových kyselin se tedy využívá vlnové délky 260 nm.

I přes všechny kroky provedené během izolace RNA může být vzorek kontaminován určitým množstvím proteinů, které mají absorbanci při 280 nm. Podíl nukleových kyselin ve vzorku je určen poměrem absorbancí A260/A280. Na základě výsledné hodnoty se určuje čistota vzorku. Vliv má také roztok, ve kterém je RNA uchovávána. Při slabě zásaditém pH 7,5 – 8,5 je měření přesnější. Hodnota čisté RNA by se měla pohybovat okolo čísla 2,0 (Wilfinger et al. 1997; Clark et al. 2019).

3.6.2 Reverzní transkripce mRNA

V rámci příprav na qRT-PCR je třeba mRNA získanou z buněk či tkání přepsat do komplementární DNA (cDNA). K tomu slouží enzym reverzní transkriptáza (RNA-dependentní DNA polymeráza) původně získaný z retrovirů. Vzhledem k tomu, že syntéza cDNA probíhá dle templátové mRNA, obsahuje výsledná sekvence jen exony, nikoliv introny.

Základem syntézy nového cDNA vlákna reverzní transkriptázou jsou primery, krátké oligonukleotidové fragmenty DNA. Primery nasedají na templátové vlákno mRNA a enzym syntetizuje nové vlákno DNA komplementární k mRNA sekvenci za využití volných deoxyribonukleotidů (dNTP). Výsledná hybridní dvouvláknová molekula DNA-RNA je poté ošetřena dvěma možnými způsoby. Buď je denaturována teplotou, čímž se od sebe oddělí obě vlákna, do reakce jsou přidány specifické primery a následuje polymerázová řetězová reakce (PCR), během níž je dosyntetizováno druhé vlákno cDNA (Clark et al. 2019), nebo zde přichází na řadu aktivita RNázy H. RNáza H vytváří ve vláknu mRNA nicky a místo souvislého vlákna jsou na cDNA připojeny jen krátké úseky mRNA. Tyto úseky poté slouží jako primery pro syntézu druhého komplementárního vlákna cDNA (Farrell 2010).

Pro reakci je zásadní volba primerů a jejich případná kombinace. Lze použít buď specifické primery, oligo(dT) primery nebo random primery. Specifické primery amplifikují jen požadovanou genovou sekvenci. Oligo(dT) primery se váží výhradně na poly(A) 3' konec mRNA molekul, což umožňuje přepis do cDNA všech mRNA bez ohledu na konkrétní gen. Random primery, složené z náhodných hexanukleotidů, nasedají na molekuly mRNA zcela náhodně v závislosti na komplementaritě s templátovým vláknem. Výsledkem jsou fragmenty cDNA pocházející z veškeré mRNA ve vzorku. Nejvyšší celkové výtěžnosti lze dosáhnout použitím kombinace oligo(dT) primerů a random primerů ve stejné reakci (Farrell 2010; Clark et al. 2019).

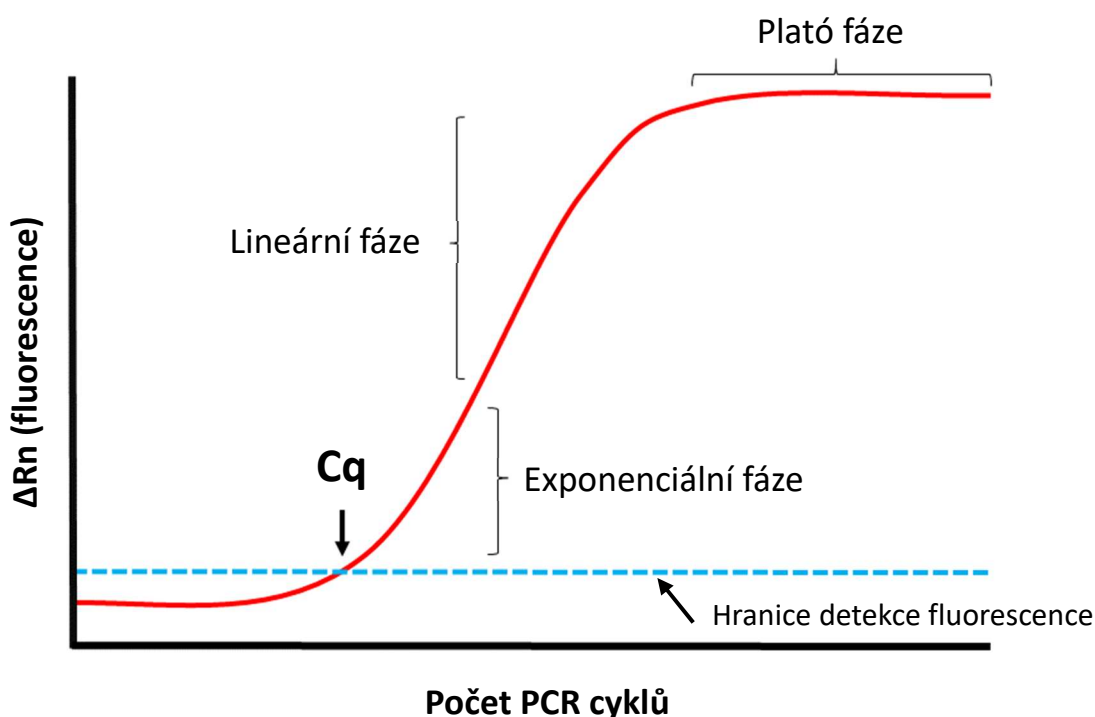
3.6.3 Kvantitativní Real-Time PCR

Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) je polymerázová řetězová reakce obohacená o možnost zaznamenávat amplifikaci konkrétních úseků cDNA v každém cyklu v reálném čase. Kvantifikace je založená na měření množství světla emitovaného buď fluorescenčně značenou sondou (např. TaqMan) nebo zabudovaným interkalačním fluorescenčním barvivem (např. SYBR Green I), které se přidávají do reakční směsi (Navarro et al. 2015).

Real-Time PCR lze rozdělit do tří fází. Na počátku reakce množství PCR produktů exponenciálně stoupá, jedná se o tzv. exponenciální fázi. S přibývajícím cykly klesá výkonnost enzymu, jsou vyčerpávány zásoby nukleotidů a klesá koncentrace primerů za stále zvyšujícího se množství amplikonů a fluorescence. Tato fáze se nazývá lineární. Nakonec vstupuje reakce

do fáze plato, během které se již nesyntetizuje žádný nový produkt, nebo jen minimální množství, a fluorescence tak zůstává konstantní (viz Obr. 10) (Farrell 2010).

Jedním z nejdůležitějších parametrů je C_q (někdy též C_t nebo C_p), což je hodnota cyklu, ve kterém emitovaná fluorescence barviva zabudovaného v nově nasyntetizovaných amplikonech překračuje výchozí hranici detekce fluorescence, tzv. background, nastavenou uživatelem nebo softwarem termocykleru. Hranice je nastavena tak, aby nebyl zaznamenáván šum na pozadí, ale až vyšší míra fluorescence emitovaná rostoucím množstvím amplikonů v exponenciální fázi amplifikační křivky. Čím více templátu je přítomno na počátku reakce, tím dříve začne stoupat fluorescence v daném vzorku. Míru genové exprese lze vyhodnotit na základě absolutní kvantifikace nebo relativní kvantifikace (Pfaffl 2004; Schefe et al. 2006; Pabinger et al. 2014). Oba postupy jsou blíže popsány v podkapitole 3.6.3.3 Analýzy pro účely kvantifikace.



Obr. 10: Amplifikační křivka qRT-PCR (převzato a upraveno dle Nassiri et al. 2017).

Průběh celé reakce a všech jejích cyklů zaznamenávají speciální real-time termocykly, které umí cyklicky měnit teplotu podle nastaveného programu a jsou vybaveny excitačním zdrojem světla (laserem, lampou či LED), fluorimetrem pro měření a zaznamenávání fluorescence a softwarem, který zpracovává získaná data. Výstupem softwaru je amplifikační křivka (Navarro et al. 2015; Köppel et al. 2020). Výrobce prvního termocykleru tohoto typu byla firma Applied Biosystems v roce 1996. V současnosti jsou na trhu dostupné různé modely přístroje od mnoha firem (Applied Biosystems, Roche, Stratagene, Cepheid, Corbett, Eppendorf a BioRad). Termocykly se mohou odlišovat různými prvky, jako např. technickým vybavením přístroje, formátem (96 jamková destička, jednotlivé 0,2 ml zkumavky, PCR strip s 8 zkumavkami), maximálním možným množstvím cyklů, požadovaným objemem reakční

směsi, podporou multiplexové analýzy, způsobem fluorescenčního značení nebo dodaným softwarem (Navarro et al. 2015).

3.6.3.1 Fluorescenční značení

Amplikony mohou být značené sondami nebo interkalačním barvivem. SONDY se skládají z oligonukleotidů a jsou značené vždy dvěma molekulami, kterými jsou reportér nebo donor a zhášeč nebo akceptor. Donorový fluorofor přichází vlivem působení světla do excitovaného stavu. Tato energie je u sondy v intaktním stavu přenesena na akceptorovou molekulu a je buď přeměněna nefluorescenčním zhášečem na teplo nebo je emitována v podobě fluorescence, pokud je akceptorem další fluorofor (Didenko 2001; Juskowiak 2011).

Jedním z prvních typů sond byly sondy hydrolyzační, jejichž funkce je založena na 5' nukleázové aktivitě enzymu Taq polymerázy. Do této kategorie patří například TaqMan sondy značené reportérem a zhášečem. SONDY v průběhu každého PCR cyklu komplementárně nasedají na denaturované vlákno DNA. Dokud je sonda intaktní, pohlcuje fluorescenční emitované světlo zhášeč. Ve fázi elongace cyklu polymerázové řetězové reakce je vystřižen nukleázovou 5'-3' aktivitou DNA polymerázy nejprve reportér a poté zbytek sondy se zhášečem. Ve chvíli vystřižení reportéru polymerázou dochází k emisi fluorescence reportérem a termocykler zaznamenává emitované světlo. S každým cyklem PCR tak lze sledovat a měřit, kolik světla emitují nově nasyntetizované fragmenty DNA (Heid et al. 1996).

Druhým, hojně využívaným, způsobem fluorescenčního značení je interkalační barvivo, např. SYBR Green I, SYBR Gold, SYTO, BOXTO nebo EvaGreen (Navarro et al. 2015). Barvivo je inaktivní v roztoku, avšak emituje světlo ve chvíli, kdy je interkalačně zabudováno mezi dvěma vlákny DNA. K tomu dochází ve fázi elongace, kdy DNA polymeráza dosyntetizovává druhé vlákno DNA. Při následném zvýšení teploty a denaturaci jsou vodíkové můstky mezi vlákny DNA rozrušeny a interkalační barvivo je uvolněno do reakční směsi. Během elongace se barvivo opět zabudovává mezi báze komplementárních vláken DNA, emituje světlo a real-time termocykler na základě stoupajícího počtu amplikonů zaznamenává zvyšující se míru fluorescence (Clark et al. 2019).

Nejběžněji používaným barvivem je SYBR Green I, který absorbuje modré světlo a emituje zelené. Aby byla zajištěna co nejvyšší specifita detekce amplikonů, je u barviva žádoucí vysoká afinita k dvouvláknové DNA a nízká k jednovláknové DNA a krátkým fragmentům. Pro ověření specifity amplifikace je třeba provést analýzu teploty tání (Mao et al. 2007; Navarro et al. 2015)

3.6.3.2 Referenční gen jako interní kontrola

Pro úspěšné vyhodnocení genové exprese je třeba metodu normalizovat. K tomu slouží referenční (housekeepingový) gen jako interní kontrola. Kvantifikace poté vychází z porovnávání exprese housekeepingového genu a exprese studovaného genu (Bustin et al. 2009).

Housekeepingové geny jsou stabilně exprimované geny, jejichž činnost zajišťuje základní buněčné procesy (Houkpe et al. 2021). Jejich exprese by měla být konstantní ve všech buňkách všech tkání, bez ohledu na vnější podmínky a experimentální postupy (Dheda et al. 2004). Z tohoto důvodu je výběr housekeepingového genu zásadní pro možnost porovnání míry exprese mezi jednotlivými vzorky a opakovatelnost experimentu (Roy et al. 2020b). Pro

porovnání expresí referenčního i studovaného genu musí být oba geny vystaveny stejným podmínkám. Templáty pro amplifikaci obou genů jsou přítomny v jednom vzorku ve stejné reakci (Radonic et al. 2004).

Výběr referenčního genu pro účely qRT-PCR je vždy třeba řádně zvážit s ohledem na typ buněk či tkáně a na základě výběru genu optimalizovat metodu. Přestože se předpokládá, že je exprese housekeepingových genů konstatní ve všech buňkách za jakýchkoliv podmínek, výzkumy dokázaly, že tomu tak nemusí vždy být. Pro kontrolu lze aplikovat i vícero referenčních genů v rámci jedné analýzy (Dheda et al. 2004; Zhang et al. 2015; Panina et al. 2018). Mezi nejznámější referenční geny patří například β -aktin (*ACTB*), glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (*GAPDH*), ribozomální protein L13a (*RPL13a*), ribozomální protein S18 (*RPS18*), albumin nebo tubuliny (Pfaffl 2001; Roy et al. 2020b).

3.6.3.3 Analýzy pro účely kvantifikace

Prvním důležitým parametrem při práci s daty pro účely kvantifikace je C_q udávající hodnotu cyklu, ve kterém fluorescence amplifikace překročila výchozí hranici detekce. C_q je stanovena pro referenční i studovaný gen. Druhým parametrem je eficeience PCR (E). Za ideálních podmínek by se v průběhu jednoho cyklu PCR měl zdvojnásobit počet amplikonů. V takovém případě by platilo, že $E=1=100\%$. Ve skutečnosti se hodnota eficeience vlivem působení PCR inhibitorů (fenol, ethanol, hemoglobin, heparin a další) pohybuje mezi 0,65 a 0,9. Eficienci je vždy třeba zohlednit ke správnému vyhodnocení exprese. Původní matematické modely pro výpočet absolutní a relativní exprese nebraly v potaz variabilní E . Platil zde vždy předpoklad, že $E=1$ nebo je stanovena průměrná E , což může vést k nadhodnocení či podhodnocení míry genové exprese (Scheffe et al. 2006). Eficeience je měřena v každém cyklu PCR a se stoupajícím počtem cyklů klesá (Peirson et al. 2003). E nabývá hodnot 0 až 1 (0 – 100 %) nebo 1 až 2 (Nassiri et al. 2017). Eficienci PCR lze stanovit buď podle standardní křivky a ředící řady nebo podle sklonu amplifikační křivky v exponenciální fázi (Tuomi et al. 2010).

3.6.3.3.1 Analýza teploty tání

Analýza teploty tání (T_m) je důležitým krokem při optimalizaci metody. Umožňuje rozeznat žádoucí produkty amplifikace od primer-dimerů a jiných artefaktů, a tím ověřit specifickou amplifikaci. Teplota tání (T_m) je definována jako teplota, při níž je z 50 % narušena struktura dvouvláknové DNA. T_m DNA molekuly se odvíjí od její velikosti a poměru nukleotidů. Amplikony bohaté na CG páry mají vyšší teplotu tání než amplikony s vyšším podílem AT. Real-Time termocykler průběžně zaznamenává fluorescenci každého vzorku, zatímco se vzorky postupně zahřívají z výchozí nastavené teploty na teplotu vyšší než T_m amplikonů (50 °C až 95 °C). Ve fázi denaturace fluorescenční barvivo disociuje z dvouvláknové DNA a dochází k rychlému poklesu fluorescence. Výsledkem je křivka tání (tzv. melting curve) pouze s jedním vrcholem (tzv. peak), který dokazuje specifickou amplifikaci jednoho konkrétního produktu. Nespecifické produkty a primer-dimery denaturují při nižších teplotách než specifické produkty (Ririe et al. 1997; Nolan et al. 2006; Navarro et al. 2015).

3.6.3.3.2 Kvantifikace genové exprese

Míru genové exprese lze vyhodnotit na základě absolutní kvantifikace nebo relativní kvantifikace. Absolutní kvantifikace slouží ke stanovení skutečného množství kopií templátu v porovnání s DNA standardy za využití kalibrační (standardní) křivky. Ta je tvořena na základě ředící řady. Absolutní kvantifikace by měla být prováděna v případě, že je nutné spočítat přesný počet kopií transkriptu (Livak & Schmittgen 2001; Pabinger et al. 2014).

Relativní kvantifikace porovnává expresi studovaného genu a expresi referenčního genu. Tento postup nevyžaduje kalibrační křivku a výsledné hodnoty jsou porovnatelné napříč experimenty. Vyhodnocení relativní kvantifikace je založené na hodnotě eficiency amplifikace, výpočtu exprese studovaného genu a referenčního genu na základě matematického modelu a porovnání Cq hodnot mezi dvěma skupinami vzorků, většinou se jedná o ošetřenou skupinu a kontrolní skupinu (Nassiri et al. 2017).

Pro výpočet poměru relativní genové exprese bylo vyvinuto několik matematických modelů, z nichž dva jsou nejpoužívanější. Prvním je model zohledňující eficiency a druhým je model Delta-delta Cq ($\Delta\Delta Cq$) (Schmittgen & Livak 2008).

Matematický model zohledňující eficiency podle Pfaffl (2001):

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Cq_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Cq_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

$$\Delta Cq_{\text{target}} = Cq_{\text{control}} - Cq_{\text{sample}}$$

$$\Delta Cq_{\text{ref}} = Cq_{\text{control}} - Cq_{\text{sample}}$$

Vzorec vyjadřuje podíl (ratio) genové exprese studovaného neboli cílového (target) genu ve vzorku (sample) oproti kontrole (control) v porovnání s referenčním (ref) genem. Pro výpočet rovnice je nutné znát všechny potřebné hodnoty eficiency (E) a Cq naměřené Real-Time termocyklem. E_{target} představuje eficiency studovaného genu a E_{ref} eficiency referenčního genu. $\Delta Cq_{\text{target}}$ je hodnota získaná odečtením Cq hodnoty studovaného genu od Cq hodnoty kontrolního vzorku. ΔCq_{ref} je hodnota získaná odečtením Cq hodnoty referenčního genu od Cq hodnoty kontrolního vzorku.

Druhým modelem je Delta-delta Cq ($\Delta\Delta Cq$) metoda. U této metody se předpokládá, že jsou eficiency amplifikace studovaného i referenčního genu téměř stejné. Platí tedy, že $E_{\text{target}} = E_{\text{ref}} = 2$. Výsledná rovnice potom zní následovně (Nassiri et al. 2017):

$$\text{ratio} = 2^{-[\Delta Cq_{\text{ref}} - \Delta Cq_{\text{target}}]}$$

$$\text{ratio} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

Pro účely porovnání exprese studovaného a referenčního genu ve dvou vzorcích může být vzorec upraven takto (Schmittgen & Livak 2008):

$$2^{-\Delta\Delta Cq} = [(Cq_{\text{target}} - Cq_{\text{ref}}) \text{ sample A} - (Cq_{\text{target}} - Cq_{\text{ref}}) \text{ sample B}]$$

4 Metodika

4.1 Biologický materiál

Ve spolupráci s Katedrou veterinárních disciplín FAPPZ ČZU v Praze byl získán materiál pro účely této diplomové práce. Tkáně byly odebrány veterinářem při kastraci pěti hřebců. Jednalo se o varle (T – testes), hlavu nadvarlete (C1 – caput), tělo nadvarlete (C2 – corpus) a ocas nadvarlete (C3 – cauda), které byly odebrány ve dvou biologických replikátech (A, B) o velikosti 2x2 cm (viz Tab. 2). Ihned po odebrání byl materiál uchováván na suchém ledu a převezen z místa kastrace do prostor ČZU. Následně byly vzorky uloženy v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C.

Tab. 2: Označení tkání hřebčího varlete a nadvarlete v replikátech A a B

Tkáň	Varle (<i>testis</i>)		Nadvarle (<i>epididymis</i>)					
			Hlava (<i>caput</i>)		Tělo (<i>corpus</i>)		Ocas (<i>cauda</i>)	
Replikát	A	B	A	B	A	B	A	B
Hřelec 1	Ta	Tb	C1a	C1b	C2a	C2b	C3a	C3b
Hřelec 2	Ta	Tb	C1a	C1b	C2a	C2b	C3a	C3b
Hřelec 3	Ta	Tb	C1a	C1b	C2a	C2b	C3a	C3b
Hřelec 4	Ta	Tb	C1a	C1b	C2a	C2b	C3a	C3b
Hřelec 5	Ta	Tb	C1a	C1b	C2a	C2b	C3a	C3b

4.2 Izolace RNA

Z důvodu prevence degradace RNA byly všechny použité zkumavky RNase Free a všechny povrchy laboratoře, skalpely, pinzety, pipety a rukavice byly ošetřeny inhibitorem RNáz RNase ZAPTM (Sigma). Biologický replikát A izolovala Bílková (2020), replikát B jsem izolovala já.

Z každé tkáně byl odebrán vzorek o hmotnosti 25-40 mg. Vzorky byly následně přeneseny do homogenizačních zkumavek Precellys (Bertin Instruments) o objemu 1,5 ml a vloženy do tekutého dusíku, aby se zabránilo degradaci RNA.

K izolaci RNA byl použit kit GenEluteTM Mammalian Total RNA Miniprep (Sigma) využívající metodu vazebných kolonek. Postup izolace byl následující:

1. Termoblok Bio TDB-120 (Biosan) byl nastaven na 55 °C.
2. Vzorky 25-40 mg v 1,5 ml zkumavkách byly vyjmuty z tekutého dusíku.
3. Do zkumavek bylo přidáno 300 µl lyzačního roztoku Lysis Solution/2-ME a poté byly vzorky homogenizovány v homogenizátoru Minilys (Bertin Instruments) po dobu 180 s.

4. Bylo přidáno 590 μl H_2O (RNase-free) a 5 μl proteinázy K.
5. Vzorek byl promíchán a inkubován v termobloku při teplotě 55 $^{\circ}\text{C}$ po 10 minut.
6. Do 2 ml zkumavek s filtrační kolonkou bylo přeneseno 700 μl homogenizovaného vzorku a následovala centrifugace při rychlosti 12 000 otáček za minutu (RPM) po dobu 2 minut
7. Se zbylým lyzátem byl zopakován krok 6. Poté byly filtráty spojeny.
8. K filtrátům bylo přidáno 450 μl ethanolu a zkumavky byly důkladně prochány pomocí vibrační třepačky (vortexu).
9. Na vazebnou kolonku v nové 2 ml zkumavce bylo napipetováno 700 μl lyzátu (s přidaným ethanolem). Následovala centrifugace při rychlosti 12 000 otáček za minutu (RPM) po dobu 15 s. Filtrát byl vylit.
10. Zbylý lyzát (s přidaným ethanolem) byl přenesen na stejnou vazebnou kolonku a byl zopakován krok 9.
11. Na vazebnou kolonku bylo aplikováno 250 μl Wash Solution I (promývací pufr), proběhla centrifugace při rychlosti 12 000 otáček za minutu (RPM) po dobu 15 s a filtrát byl opět vylit.
12. Pro odstranění DNA byla kolonka ošetřena 80 μl roztoku: 10 μl DNáza a 70 μl DNáza pufru. Enzym se nechal působit 15 minut při laboratorní teplotě.
13. Kolonka byla opět promyta dle instrukcí v kroku 11 a nakonec byla přenesena do nové zkumavky.
14. Na kolonku bylo přeneseno 500 μl Wash Solution II a následovala centrifugace při rychlosti 12 000 otáček za minutu (RPM) po dobu 15 s. Filtrát byl vylit.
15. Byl zopakován krok 14. Centrifugace probíhala 2 minut do sucha.
16. Kolonka byla přendána do nové 2 ml zkumavky.
17. Pro finální eluci RNA bylo na kolonku aplikováno 50 μl Elution Solution (eluční pufr). Zkumavka byla poté centrifugována při 12 000 otáčkách za minutu (RPM) po dobu 1 minuty.
18. Výsledným produktem byla vyizolovaná RNA ve zkumavce.

4.3 Koncentrace celkové RNA

Pro další postupy bylo nutné určit koncentraci a čistotu celkové vyizolované RNA v každém vzorku. Toho bylo dosaženo pomocí spektrofotometrické analýzy za využití UV spektrofotometru NanoPhotometer (Implen). Přístroj byl nejprve kalibrován nanesením 3 μl Elution Solution na kyvetu a poté byly postupně měřeny parametry každého vzorku nanesením také 3 μl . Na základě absorbance vyhodnocuje spektrofotometr koncentraci RNA a čistotu pomocí parametrů A260/A280 a A260/A230. A260/A280 představuje znečištění proteiny a A260/A230 znečištění nukleovými kyselinami. U RNA by se měla hodnota parametrů blížit 2.

4.4 Syntéza cDNA

Z jednovláknové molekuly mRNA vzniká prostřednictvím enzymu reverzní transkriptáza komplementární cDNA v procesu zvaném reverzní transkripce. K přepisu mRNA na cDNA byl použit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche).

Do každé zkumavky PCR stripu bylo rozpipetováno po 12 μ l RNA a ke každému vzorku byl přidán 1 μ l oligo(dT) primeru. Poté byla směs inkubována v termocykleru DNA Engine (Biorad) při teplotě 65 °C po dobu 10 minut. Oligo(dT) primer nasedá na polyA konec mRNA molekul, čímž jsou vyselektovány od ostatních molekul RNA a připraveny na reverzní transkripci.

V dalším kroku byl připraven master mix. Pro reakci v jedné zkumavce byly potřeba 4 μ l pufru Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 0,5 μ l Protector RNase Inhibitor, 2 μ l směsi dNTP a 0,5 μ l enzymu Transcriptor Reverse Transcriptase. Pro každou reakci bylo potřeba 7 μ l namíchaného master mixu.

Ke vzorku RNA byl přidán master mix a celkový objem tak činil 20 μ l. Takto připravené vzorky byly přesunuty do termocykleru na dobu 60 minut. při teplotě 50 °C. Za těchto podmínek proběhla reverzní transkripce.

Výsledná cDNA byla uložena při teplotě -20 °C. Pro účely qRT-PCR byla z důvodu vysoké koncentrace cDNA naředěna tak, aby v 1 μ l roztoku bylo obsaženo množství cDNA, které odpovídá množství nasyntetizovanému z 0,75ng celkové RNA při reverzní transkripci.

4.5 Navrhování primerů

Pomocí programu Primer3 Input 0.4.0 bylo navrženo pět primerových párů pro gen *CD151* a jeho šest sestřihových variant. Primery dostaly označení F1-4 a R1-5. Dále byl navržen jeden primerový pár pro housekeepingový gen β -aktin (ACBT).

Specifita všech primerových párů, jejich pozice v referenčním genomu a predikovaná délka produktu byly vyhodnoceny programem Primer BLAST, jež je součástí databáze NCBI. Výstupy z programu Primer BLAST jsou k nahlédnutí na Obr. 11-15.

K navržení a vyhodnocení specifity primerů pro gen *CD151* a jeho sestřihové varianty X1-6 byla použita sekvence genu *CD151* z referenčního genomu *Equus caballus* 3.0 (GCF_002863925.1), NC_009155.3, chromozomu 12, plemene plnokrevník, izolátu Twilight, zveřejněného v databázi NCBI.

K navržení a vyhodnocení specifity primerů pro housekeepingový gen ACBT byla použita sekvence příslušného genu z referenčního genomu *Equus caballus* 3.0 (GCF_002863925.1), NC_009156.3, chromozomu 13, plemene plnokrevník, izolátu Twilight, zveřejněného v databázi NCBI.

Bylo ověřeno, že primery nasedají na specifická místa v referenčním genomu (viz Obr. 11-15). Protože má však gen *CD151* 6 sestřihových variant, nebylo možné z principu navrhnout primery tak, aby byla jedna sestřihová varianta vždy amplifikována jedním párem primerů. Toto bylo zohledněno při výběru primerů, kdy byly vyvinuty postupy pro detekci sestřihových variant. Přehled navržených primerů a jejich sekvencí je k nahlédnutí v Tab. 3.

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTCACCTTCAACTGCTGCTTCTG	23	61.55	47.83	3.00	1.00
Reverse primer	GGTGTCTTCAGGTTCTCCTTGA	23	61.83	52.17	4.00	2.00

Products on target templates

>[XM_005598402.3](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X6, mRNA

```
product length = 327
Forward primer 1   TTCACCTTCAACTGCTGCTTCTG 23
Template       347 ..... 369

Reverse primer 1   GGTGTCTTCAGGTTCTCCTTGA 23
Template       673 ..... 651
```

>[XM_023654803.1](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X5, mRNA

```
product length = 327
Forward primer 1   TTCACCTTCAACTGCTGCTTCTG 23
Template       387 ..... 409

Reverse primer 1   GGTGTCTTCAGGTTCTCCTTGA 23
Template       713 ..... 691
```

>[XM_023654802.1](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X4, mRNA

```
product length = 327
Forward primer 1   TTCACCTTCAACTGCTGCTTCTG 23
Template       280 ..... 302

Reverse primer 1   GGTGTCTTCAGGTTCTCCTTGA 23
Template       606 ..... 584
```

>[XM_023654801.1](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X3, mRNA

```
product length = 327
Forward primer 1   TTCACCTTCAACTGCTGCTTCTG 23
Template       320 ..... 342

Reverse primer 1   GGTGTCTTCAGGTTCTCCTTGA 23
Template       646 ..... 624
```

>[XM_005598401.3](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X2, mRNA

```
product length = 327
Forward primer 1   TTCACCTTCAACTGCTGCTTCTG 23
Template       391 ..... 413

Reverse primer 1   GGTGTCTTCAGGTTCTCCTTGA 23
Template       717 ..... 695
```

>[XM_023654800.1](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X1, mRNA

```
product length = 327
Forward primer 1   TTCACCTTCAACTGCTGCTTCTG 23
Template       325 ..... 347

Reverse primer 1   GGTGTCTTCAGGTTCTCCTTGA 23
Template       651 ..... 629
```

Obř. 11: Primerov pr F1+R1, vyhodnocení dle BLAST. Tento pr vytvr produkt o stejn dlce pro vschny sestřihov varianty.

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CATTCCCGGCGCTCAGA	17	59.44	64.71	4.00	3.00
Reverse primer	TCTGTAGAACAGGTGGACGGAAG	23	61.62	52.17	5.00	0.00

Products on target templates

>[XM_023654802.1](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X4, mRNA

```
product length = 100
Forward primer 1 CATTCCCGGCGCTCAGA 17
Template       94 ..... 110

Reverse primer 1 TCTGTAGAACAGGTGGACGGAAG 23
Template       193 ..... 171
```

>[XM_023654801.1](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X3, mRNA

```
product length = 100
Forward primer 1 CATTCCCGGCGCTCAGA 17
Template       94 ..... 110

Reverse primer 1 TCTGTAGAACAGGTGGACGGAAG 23
Template       193 ..... 171
```

Obr. 12: Primerový pár F2+R2, vyhodnocení dle BLAST. Amplifikuje sekvenci X3 a X4.

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAACTATTTCTGGCCGCCCTTT	22	60.82	45.45	5.00	0.00
Reverse primer	GCAGGCAGCTCCTCTGTAGAACA	23	64.36	56.52	6.00	3.00

Products on target templates

>[XM_005598402.3](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X6, mRNA

```
product length = 137
Forward primer 1 AAACATTTTCTGGCCGCCCTTT 22
Template       136 ..... 157

Reverse primer 1 GCAGGCAGCTCCTCTGTAGAACA 23
Template       272 ..... 250
```

>[XM_023654803.1](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X5, mRNA

```
product length = 137
Forward primer 1 AAACATTTTCTGGCCGCCCTTT 22
Template       136 ..... 157

Reverse primer 1 GCAGGCAGCTCCTCTGTAGAACA 23
Template       272 ..... 250
```

>[XM_005598401.3](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X2, mRNA

```
product length = 137
Forward primer 1 AAACATTTTCTGGCCGCCCTTT 22
Template       135 ..... 156

Reverse primer 1 GCAGGCAGCTCCTCTGTAGAACA 23
Template       271 ..... 249
```

Obr. 13: Primerový pár F3+R3, vyhodnocení dle BLAST. Amplifikuje sekvenci X2, X5 a X6.

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGAACTTCGGTCCACCTGTTCTA	23	61.88	52.17	7.00	2.00
Reverse primer	GACACCGGTCACCATGACAAC	21	61.47	57.14	6.00	2.00

Products on target templates

>[XM_005598402.3](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X6, mRNA

product length = 281

Forward primer 1 GGAACTTCGGTCCACCTGTTCTA 23
 Template 234

Reverse primer 1 GACACCGGTCACCATGACAAC 21
 Template 514

>[XM_023654803.1](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X5, mRNA

product length = 321

Forward primer 1 GGAACTTCGGTCCACCTGTTCTA 23
 Template 234

Reverse primer 1 GACACCGGTCACCATGACAAC 21
 Template 554

>[XM_023654802.1](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X4, mRNA

product length = 281

Forward primer 1 GGAACTTCGGTCCACCTGTTCTA 23
 Template 167

Reverse primer 1 GACACCGGTCACCATGACAAC 21
 Template 447

>[XM_023654801.1](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X3, mRNA

product length = 321

Forward primer 1 GGAACTTCGGTCCACCTGTTCTA 23
 Template 167

Reverse primer 1 GACACCGGTCACCATGACAAC 21
 Template 487

>[XM_005598401.3](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X2, mRNA

product length = 326

Forward primer 1 GGAACTTCGGTCCACCTGTTCTA 23
 Template 233

Reverse primer 1 GACACCGGTCACCATGACAAC 21
 Template 558

Obr. 13: Primerový pár F4+R4, vyhodnocení dle BLAST. Amplifikuje sekvenci X2, X3, X4, X5 a X6.

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAACTATTTCTGGCCGCCCTTT	22	60.82	45.45	5.00	0.00
Reverse primer	CTGAGGCCAGCAGACTGATGTAG	23	62.60	56.52	7.00	1.00

Products on target templates

>[XM_005598402.3](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X6, mRNA

```
product length = 314
Forward primer 1  AAACTATTTCTGGCCGCCCTTT 22
Template       136  ..... 157

Reverse primer 1  CTGAGGCCAGCAGACTGATGTAG 23
Template       449  ..... 427
```

>[XM_023654803.1](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X5, mRNA

```
product length = 354
Forward primer 1  AAACTATTTCTGGCCGCCCTTT 22
Template       136  ..... 157

Reverse primer 1  CTGAGGCCAGCAGACTGATGTAG 23
Template       489  ..... 467
```

>[XM_005598401.3](#) PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X2, mRNA

```
product length = 359
Forward primer 1  AAACTATTTCTGGCCGCCCTTT 22
Template       135  ..... 156

Reverse primer 1  CTGAGGCCAGCAGACTGATGTAG 23
Template       493  ..... 471
```

Obr. 14: Primerový pár F3+R5, vyhodnocení dle BLAST. Amplifikuje sekvenci X2, X5 a X6.

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGTGTGACGTCGACATCCGTAAG	23	62.49	52.17	8.00	2.00
Reverse primer	TGTGATCTCCTTCTGCATCCTGT	23	61.39	47.83	4.00	0.00

Products on target templates

>[NM_001081838.1](#) Equus caballus actin beta (ACTB), mRNA

```
product length = 104
Forward primer 1  AGTGTGACGTCGACATCCGTAAG 23
Template       851  ..... 873

Reverse primer 1  TGTGATCTCCTTCTGCATCCTGT 23
Template       954  ..... 932
```

Obr. 15: Primerový pár pro housekeepingový gen *ACTB*, vyhodnocení dle BLAST.

Tab. 3: Primery navržené pomocí programu Primer3 pro účely stanovení obecné genové exprese *CD151* a detekce transkripčních variant.

Gen	Primer	Délka	T _m [°C]	Sekvence
<i>CD151</i>	F1	23	61,55	TTCACCTTCAACTGCTGCTTCTG
	R1	23	61,83	GGTGCCTTCAGGTTCTCCTTGA
	F2	17	59,33	CATCCCCGGCGCTCAGA
	R2	23	61,62	TCTGTAGAACAGGTGGACGGAAG
	F3	22	60,82	AAACTATTTCTGGCCGCCCTTT
	R3	23	64,36	GCAGGCAGCTCCTCTGTAGAACA
	F4	23	61,88	GGAACTTCCGTCCACCTGTTCTA
	R4	21	61,47	GACACCGGTCACCATGACAAC
	R5	23	62,60	CTGAGGCCAGCAGACTGATGTAG
<i>ACTB</i>	F	23	62,49	AGTGTGACGTCGACATCCGTAAG
	R	23	61,39	TGTGATCTCCTTCTGCATCCTGT

4.6 Kvantitativní Real-Time PCR

Pro přípravu vzorků byl použit kit FastStart Essential DNA Green Master (Roche). Kit obsahuje FastStart SYBR Green Master, 2x koncentrovaný master mix skládající se ze všech složek potřebných pro reakci s výjimkou templátové DNA a primerů. Dodaný master mix obsahuje reakční pufr, nukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), FastStart Taq DNA polymerázu a SYBR Green I.

Nejprve byl připraven premix z 5 µl master mixu, 0,5 µl forwardového primeru (10 µM) a 0,5 µl reverzního primeru (10 µM) na reakci. Poté bylo do každé jamky PCR stripu napipetováno 6 µl master mixu a 4 µl cDNA o koncentraci 0,75 ng/1 µl. Se vzorky byl amplifikován i housekeepingový gen *ACTB*. Jako kontrola byla použita voda PCR kvality.

Kvantitativní Real-Time PCR proběhla v termocykleru LightCycler Nano (Roche) za těchto podmínek:

1. Aktivace polymerázy při 95 °C po dobu 10 minut, při rychlosti změny teploty 5 °C/s
2. Denaturace při 95 °C po dobu 20 s, při rychlosti změny teploty 5 °C/s
3. Annealing při 64 °C po dobu 20 s, při rychlosti změny teploty 4 °C/s
4. Elongace při 72 °C po dobu 20 s, při rychlosti změny teploty 5 °C/s

Amplifikace probíhala ve 45 cyklech. Každý cyklus se skládal z kroků (2) denaturace, (3) annealing a (4) elongace.

4.7 Výběr primerů pro vlastní analýzy

U všech navržených primerů bylo třeba ověřit specifičnost amplifikace a podle výsledků vybrat vhodné páry pro účely (a) obecného hodnocení exprese *CD151* a (b) detekce jednotlivých sestřihových variant.

Specifičnost primerů byla vyhodnocena na základě:

- Analýzy teploty tání T_m
- Eficiency
- Délkového polymorfismu při elektroforetické separaci
- Polymorfismu délky restrikčních fragmentů (PCR-RFLP)
- Sekvenační analýzy

Pro obecné hodnocení exprese *CD151* byl zvolen primerový pár F1+R1, který amplifikuje sekvenci cDNA společnou pro všechny sestřihové varianty. Pro identifikaci sestřihových variant bylo třeba vyhodnotit délkový polymorfismus amplikonů a provést restrikční štěpení. Specifičnost primerů byla ověřena na tkáni varlete hřebce 5.

4.7.1 Analýza teploty tání T_m

Analýza teploty tání ověřuje specifičnost vybraného primerového páru a dokáže odhalit případnou tvorbu nespecifických produktů. Analýzu provádí software real-time termocyklieru. Výstupem je křivka tání (melting curve), která by při amplifikaci čistě specifických produktů měla být tvořena pouze jednou amplitudou, z níž se stanovuje teplota tání (T_m). Pro účely této analýzy byl použit termocyklier LightCycler Nano (Roche).

Nejprve byly vzorky v termocyklieru zahřáty na teplotu 60 °C po dobu 1 minuty při rychlosti změny teploty 4 °C/s. Následně byla rychlost změny teploty snížena na 0,1 °C/s a vzorky se zahřívaly na 95 °C. Tato teplota byla udržována 20 s a poté opět snížena na 40 °C.

4.7.2 Eficiency qRT-PCR amplifikace

Eficiency amplifikace (E) může být stanovena buď podle standardní křivky, vytvořené na základě ředící řady, nebo amplifikační křivky. V tomto postupu byla zvolena metoda standardní křivky. Výsledné hodnoty eficiency zkoumaného genu i housekeepingového genu si musí být co nejvíc podobné.

Byla připravena ředící řada o objemu 10 μ l a čtyřech koncentracích templátové cDNA: 312,5 pg, 1250 pg, 5000 pg, 20 000 pg.

Eficienci vyhodnotil software termocyklieru LightCycler Nano (Roche). Pro každý vzorek z ředící řady byla stanovena hodnota C_q . Tyto hodnoty byly graficky zobrazeny jako body, jejichž proložení přímkou za použití lineární regrese tvoří graf, který se nazývá standardní křivka. Na základě sklonu křivky software termocyklieru vypočítal eficiency amplifikace podle vzorce:

$$E = [10^{(-1/\text{sklon})}]$$

Hodnota E stanovená tímto způsobem nabývá hodnot 1-2.

4.7.3 Ověření amplifikace sestřihových variant pomocí elektroforézy

Specifičnost amplifikace všech primerových párů byla ověřena pomocí elektroforetické separace. Zároveň byly na základě délkového polymorfismu identifikovány jednotlivé sestřihové varianty.

Produkty qRT-PCR byly separovány ve 3% agarózovém gelu v TBE pufru a byly obarveny ethidium bromidem. Do každé jamky v gelu bylo nanášeno 10 µl RT-PCR produktu, 8 µl H₂O a 2 µl barviva. Pro porovnání velikostí fragmentů byl použit velikostní standard GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Produkty primerů F1+R1, které byly určeny pro stanovení obecné exprese, a primerů pro housekeepingový gen *ACTB* byly separovány v horizontální elektroforéze při 120 V po dobu 60 minut.

Amplikony primerů F2+R2, F3+R3, F4+R4 a F3+R5, které byly určeny pro detekci a rozlišení exprese jednotlivých sestřihových variant X2-X6, byly separovány v horizontální elektroforéze při 120 V po dobu 120 minut.

4.7.4 Rozlišení transkripčních variant X2 a X5 pomocí PCR-RFLP

Predikovaná délka amplikonů variant X2 (359 bp) a X5 (354 bp) při použití primerů F3+R5 je velice podobná. Bylo tedy potřeba amplikon odpovídající této délce vyizolovat z agarózového gelu a naštěpit restriční enzymem podle metody PCR-RFLP. Podle výsledné separace v gelu lze zjistit, zda daná dvojice primerů amplifikuje obě sestřihové varianty nebo jen jednu z nich.

K výběru restričního enzymu pro štěpení sestřihové varianty X5 byl použit program Webcutter 2.0, který je schopný na základě požadované sekvence DNA určit specifické restriční oblasti a navrhnout konkrétní enzymy restriční endonukleázy, které štěpí DNA v tomto specifickém místě. Pro restriční analýzu byl vybrán enzym *BseNI* (*BsrI*), který rozpoznává v amplikonu X5 (354 bp) alelu ACTGG a štěpí amplikon na fragmenty 318 bp a 36 bp. Amplikony X2 si zachovávají původní velikost 359 bp.

Štěpící reakce měla pro každý vzorek následující složení: 10 µl PCR produktu, 18 µl dd H₂O, 2 µl 10x pufru B, 2 µl enzymu *BseNI* (*BsrI*) (Thermo Fisher Scientific). Štěpení probíhalo v termocykleru při teplotě 65 °C po dobu 12 hodin. Následně byl enzym inaktivován inkubací při 80 °C po dobu 20 minut. Produkty štěpení byly separovány elektroforézou ve 4% agarózovém gelu při napětí 120 V po dobu 50 minut.

4.8 Sekvenační analýza qRT-PCR amplikonů

Další hodnocení specifičnosti proběhlo na základě sekvenační analýzy PCR produktu. Ověřována byla amplifikace za použití primerů F1+R1. Osekvenované byly amplikony pocházející ze všech čtyř tkání hřebce 5. Každý amplikon byl osekvenován od forwardového primeru i od reverzového primeru ve třech replikátech.

Produkty qRT-PCR byly separovány v 1,5% agarózovém gelu. Poté byly fragmenty vyříznuty sterilním skalpelem tak, aby odebraná část obsahovala co nejméně gelu. Vyjmuté fragmenty byly zváženy a vloženy do 1,5 ml zkumavek.

4.8.1 Purifikace amplikonů

Izolované fragmenty byly purifikovány od gelu, primerů a volných nukleotidů pomocí kitu MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen) v následujících krocích:

1. Ke každému fragmentu byl přidán Binding buffer v poměru 1:1 a směs byla inkubována při 50 °C do chvíle úplného rozpuštění gelu.
2. 800 µl výsledné směsi bylo přeneseno do zkumavky s vazebnou kolonkou, která byla centrifugována při 12 000 otáčkách za minutu (RPM) po dobu 1 minuty. Filtrát byl vylit.
3. Na vazebnou kolonku bylo přeneseno 100 µl Binding bufferu a opakovala se centrifugace za podmínek v předchozím kroku.
4. Kolonka byla promytá nanesením 700 µl Wash bufferu a centrifugací při 12 000 otáčkách za minutu (RPM) po dobu 1 minuty. Filtrát byl vylit.
5. Aby byla kolonka zbavena všech zbytků Wash bufferu, byla zkumavka opět centrifugována při 12 000 otáčkách za minutu (RPM) po dobu 1 minuty.
6. Pro eluci cDNA z vazebné kolonky bylo použito 25 µl H₂O (pH 8,1). Eluce probíhala při pokojové teplotě po dobu 2 minut. Poté byla zkumavka s kolonkou centrifugována při 12 000 otáčkách za minutu (RPM) po dobu 1 minuty.
7. Veškerá purifikovaná DNA se nacházela ve zkumavce.

Úspěšnost purifikace byla ověřena kvantifikací DNA ve spektrofotometru NanoPhotometer (Implen). Přístroj musí být vždy nakalibrován na eluční roztok analyzovaného vzorku. V tomto případě se jednalo o H₂O.

4.8.2 Sekvenační reakce

Vzorky DNA byly připraveny na sekvenaci pomocí kitu BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Každá reakce se skládala z 7,5 µl izolované DNA s koncentrací 6,5 mg/µl, 4 µl 5X sekvenačního pufru, 3,2 µl primeru F či R s koncentrací 3,2 pmol x 20 µl⁻¹, 2 µl BigDyeTM Terminator Ready Reaction mixu a 3,3 µl H₂O.

4.8.3 Sekvence pomocí kapilární elektroforézy

Před samotnou sekvenací bylo nutné purifikovat produkty sekvenančí reakce. Ke každému vzorku byly přidány 2 µl glykogenu, 2 µl 3M octanu sodného a 50 µl 96% ethanolu. Směs byla inkubována v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BIO RAD) při 25 °C po dobu 15 minut. Vzorky byly odstředěny v centrifuze vychlazené na 15 °C při 12 000 otáčkách za minutu (RPM) po dobu 30 minut. Supernatant byl odstaněn a pelet usazený na dně zkumavky byl propláchnut 250 µl 70% ethanolu. Následně byla opakována centrifugace i propláchnutí ethanolem. Pelet byl poté vysušen v termobloku při 50 °C po dobu 30 minut a po vysušení byl rozpuštěn v 15 µl Hi-Di formamidu. Vzorky byly denaturovány v termocykleru při 95 °C po dobu 5 minut a následně ochlazeny na 4 °C.

Sekvence proběhla v kapilární elektroforéze ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) s těmito parametry: délka kapiláry 50 cm, modul SeqPOP6 (1 ml) E,

virtuální filtr E, doba nástřiku 30 s, napětí nástřiku 2,5 kV. Separace probíhala za teploty 50 °C a napětí 11,3 kV po dobu 120 minut.

Sekvence byly vyhodnoceny a porovnány s referenční sekvencí z databáze NCBI pomocí programu BioEdit version 7.2.5.

4.9 Statistické hodnocení výsledků

Nejprve byly pro každý vzorek získány parametry ΔCq , které vyjadřují rozdíl mezi Cq *CDI51* a housekeepingového genu *ACTB*. Na základě těchto parametrů byly následně vypočítány hodnoty Ratio ΔCq , které normalizují relativní expresi genu *CDI51* vůči genu *ACTB*. Pro účely hodnocení relativní exprese genu *CDI51* byla použita data získaná při qRT-PCR za využití primerového páru F1+R1, nebyly tedy zohledněny jednotlivé sestřihové varianty. Výsledné hodnoty Ratio ΔCq byly použity jako vstupní hodnoty pro statistické analýzy. Cílem statistických analýz bylo vyhodnotit statisticky průkazný vliv faktorů (efektů) (I) hřeben, (II) tkáň, (III) biologický replikát na hodnotu Ratio ΔCq .

Normalita rozdělení vstupních dat byla testována prostřednictvím Kolmogorov–Smirnovova testu homogenity, znázorněného graficky histogramem, a p-grafu při hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Homogenita rozptylů vstupních dat pro jednotlivé efekty byla hodnocena na základě Levenova testu při hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Pro posouzení statistické významnosti vlivu jednotlivých efektů na variabilitu hodnot Ratio ΔCq byl použit test GLM-ANOVA hlavních efektů při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky testu byly graficky znázorněny v podobě krabicových grafů s vyznačeným 0,95 intervalem spolehlivosti. Podrobnější vyhodnocení efektů se statisticky významným vlivem na hodnoty Ratio ΔCq bylo provedeno prostřednictvím post hoc testu, konkrétně Tukeyova HSD testu, při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky testu byly graficky znázorněny v podobě homogenních skupin. Statistické šetření bylo provedeno v programu Dell Statistica 13.

5 Výsledky

5.1 Koncentrace celkové izolované RNA

Průměrná výtěžnost RNA vyizolované z tkáně varlete (Ta, Tb) všech hřebců byla 31 ng. Parametr A260/A280 dosahoval v průměru hodnoty 2,03 a parametr A260/230 hodnoty 2,07.

Průměrná výtěžnost izolované RNA z tkáně nadvarlete (C1a-C3b) byla 45 ng. Parametr A260/A280 nabýval průměrné hodnoty 1,98 a parametr A260/230 hodnoty 2,01. Věškeré hodnoty koncentrace a absorbance naměřené UV spektrofotometrem jsou shrnuté v Tab. 4-8. Biologický replikát A izolovala Bílková (2020), replikát B byl izolován pro účely této práce mnou.

Tab. 4: Hodnoty koncentrace a absorbance izolované celkové RNA ve tkáních hřebce 1.

Hřelec 1			
Tkáň	Koncentrace RNA [ng/μl]	A260/280	A260/230
Ta	28	2,00	2,30
Tb	35	2,04	2,15
C1a	46	2,02	2,06
C1b	54	2,12	2,10
C2a	44	2,08	1,99
C2b	51	1,97	1,96
C3a	27	2,03	2,00
C3b	33	1,96	2,14

Tab. 5: Hodnoty koncentrace a absorbance izolované celkové RNA ve tkáních hřebce 2.

Hřelec 2			
Tkáň	Koncentrace RNA [ng/μl]	A260/280	A260/230
Ta	39	2,16	2,25
Tb	41	1,83	1,98
C1a	61	2,21	2,07
C1b	52	1,85	1,91
C2a	65	2,05	2,00
C2b	42	1,99	1,85
C3a	31	1,81	2,14
C3b	28	1,89	2,07

Tab. 6: Hodnoty koncentrace a absorbance izolované celkové RNA ve tkáních hřebce 3.

Hřelec 3			
Tkáň	Koncentrace RNA [ng/μl]	A260/280	A260/230
Ta	29	1,97	1,89
Tb	22	2,05	2,03
C1a	43	1,87	1,95
C1b	58	2,05	2,14
C2a	50	2,11	2,04
C2b	61	2,00	1,95
C3a	41	1,92	1,99
C3b	35	1,86	2,01

Tab. 7: Hodnoty koncentrace a absorbance izolované celkové RNA ve tkáních hřebce 4.

Hřelec 4			
Tkáň	Koncentrace RNA [ng/μl]	A260/280	A260/230
Ta	31	1,96	2,08
Tb	28	1,89	1,9
C1a	53	1,9	2,03
C1b	41	2,16	2,22
C2a	40	1,93	2,01
C2b	47	1,95	1,99
C3a	25	1,87	1,89
C3b	32	2,01	1,85

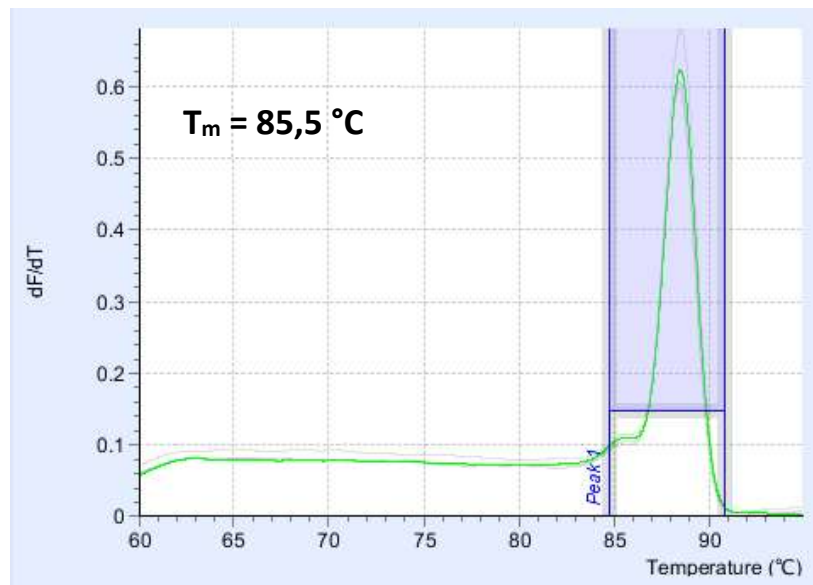
Tab. 8: Hodnoty koncentrace a absorbance izolované celkové RNA ve tkáních hřebce 5.

Hřelec 5			
Tkáň	Koncentrace RNA [ng/μl]	A260/280	A260/230
Ta	26	2,18	1,95
Tb	34	2,21	2,17
C1a	61	1,88	1,98
C1b	69	2,14	2,10
C2a	65	1,96	1,89
C2b	48	1,87	2,01
C3a	32	1,86	2,00
C3b	24	1,99	1,91

5.2 Testování navržených primerů

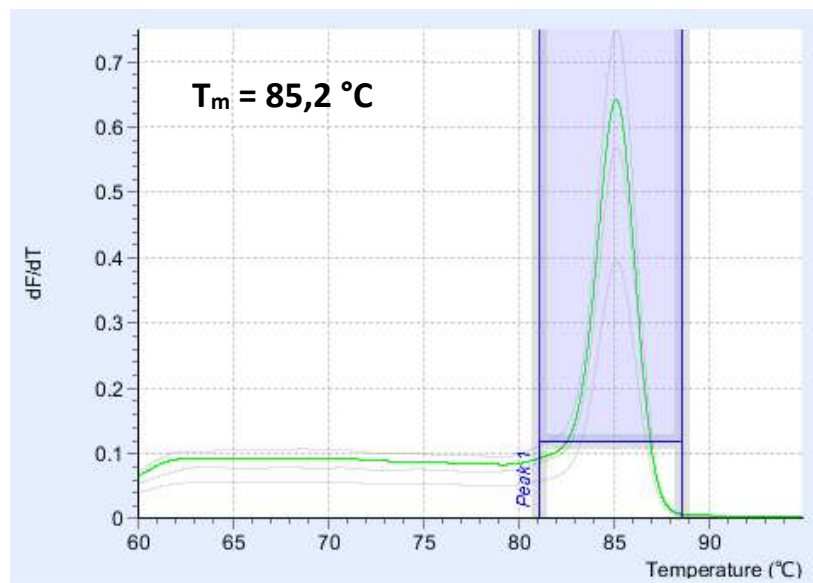
5.2.1 Vyhodnocení analýzy teploty tání

Jedním z vybraných způsobů ověření specifčnosti amplifikace byla analýza teploty tání (T_m). Tato analýza byla provedena u amplikonu primerového páru F1+R1, který byl určen pro hodnocení exprese *CD151* bez ohledu na sestřihovou variantu. Dále byla tato analýza provedena také u amplikonu primerů housekeepingového genu *ACTB*.



Obě křivky mají tvar jednoho symetrického píku značícího specifickou amplifikaci. U *CD151* byla naměřena $T_m = 85,5\text{ °C}$. V případě *ACTB* byla naměřena $T_m = 85,2\text{ °C}$.

Obr. 16: Křivka tání amplikonu *CD151* (primery F1+R1), tkáň varlete hřebce 5. Výstup z programu LightCycler® Nano (Roche).

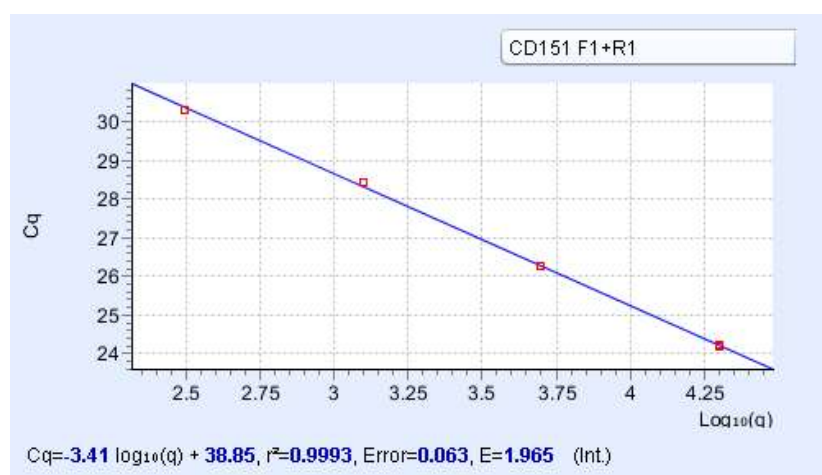


Obr. 17: Křivka tání amplikonu *ACTB*, tkáň varlete hřebce 5. Výstup z programu LightCycler® Nano (Roche).

5.2.2 Eficiency amplifikace

Eficiency amplifikace byla rovněž analyzována pro primery *CD151* (F1+R1) a *ACTB* (F+R). Tentokrát bylo využito ředící řady ve čtyřech ředěních templátu cDNA a poté byly pro každý vzorek ředící řady měřeny a zaznamenávány parametry C_q v průběhu amplifikace. Na základě zaznamenaných parametrů vypočítal program termocyklieru LightCycler® Nano (Roche) několik ukazatelů, z nichž jsou pro hodnocení efficiency stěžejní sklon standardní křivky (C_q) a efficiency (E). Výstupy analýz v podobě standardní křivky a všech příslušných parametrů jsou zobrazeny na Obr. 18 a 19.

Sklon standardní křivky *CD151* (F1+R1) byl vyjádřen jako $C_q = -3,41$. Efficiency reakce byla vyčítána na hodnotu $E = 1,965$. Sklon standardní křivky *ACTB* byl vyjádřen hodnotou $C_q = -3,39$. Efficiency amplifikace byla vyčítána na hodnotu $E = 1,971$. Efficiency obou primerových párů jsou si velmi blízké a obě se blíží hodnotě $E = 2$.



Obr. 18: Standardní křivka amplifikace vzorků ředící řady za použití primerů F1+R1 pro gen *CD151*. Tkáň varlete hřebce 5. Výstup z programu LightCycler® Nano (Roche).

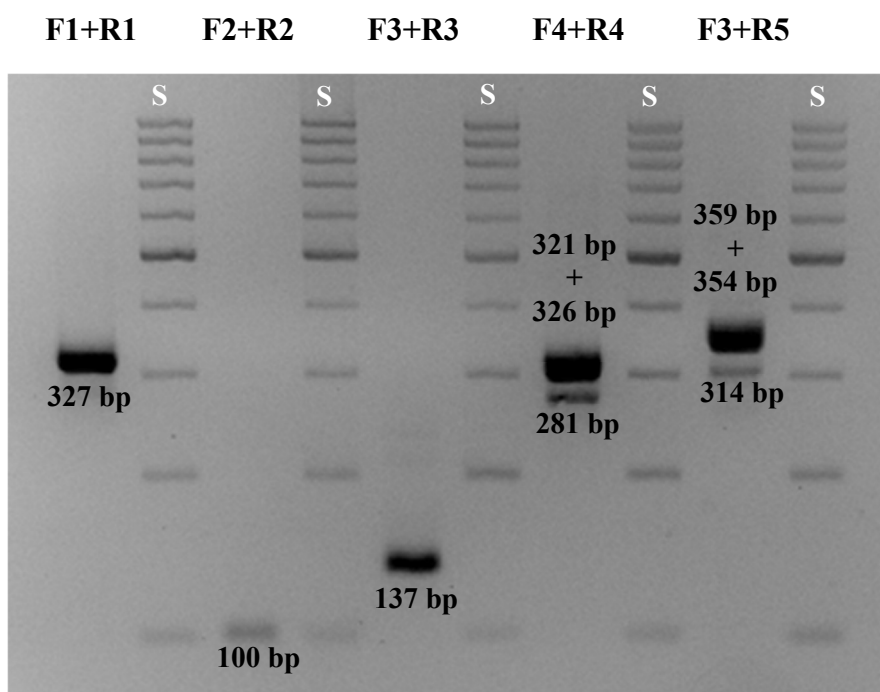


Obr. 19: Standardní křivka amplifikace vzorků ředící řady za použití primerů F+R pro housekeepingový gen *ACTB*. Tkáň varlete hřebce 5. Výstup z programu LightCycler® Nano (Roche).

5.2.3 Detekce sestřihových variant *CD151* pomocí elektroforézy

Detekce jednotlivých sestřihových variant proběhla pomocí elektroforetické separace PCR produktů. Touto cestou byla ověřena také specifita amplifikace každým navrženým párem primerů pro gen *CD151* i housekeepingový gen *ACTB*. Pro tyto účely byly použity vzorky tkání hřebce 5.

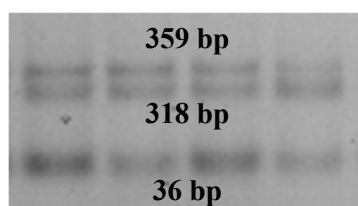
Do výsledků byl vybrán elektroforeogram amplikonů syntetizovaných všemi primerovými páry pro gen *CD151*. Velikost amplikonů byla odvozena od hmotnostního standardu (S) Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. Elektroforeogram a velikost PCR produktů tvořených za použití každého příslušného primerového páru je vyobrazen na Obr. 20. Primery F1+R1, F2+R2 a F3+R3 tvoří jeden produkt. Každá dvojice primerů F4+R4 a F3+R5 tvoří tři různě dlouhé produkty, které však na agarózovém gelu vypadají jako dva proužky (tzv. „bandy“).



Obr. 20: Elektroforeogram cDNA amplikonů všech primerových párů pro *CD151* v 3% agarózovém gelu. S = Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder.

5.2.4 Restrikční štěpení amplikonu F3+R5 (PCR-RFLP)

Predikovaná velikost amplikonu sestřihových variant X2 a X5 genu *CD151* za využití primerů F3+R5 byla velmi podobná. Pro detekci konkrétních variant a jejich rozlišení byl větší „band“ vyřezán z gelu a bylo provedeno restrikční štěpení enzymem *BseNI* (*BsrI*). Poté byly produkty restrikčního štěpení opět naneseny na agarózový gel. Na výsledném gelu byly patrné 3 fragmenty cDNA. Největší amplikon si zachoval délku 359 bp odpovídající variantě X2. Amplikon X5 byl naštěpen na dva restrikční fragmenty – 318 bp a 36 bp (viz Obr. 21).



Obr. 21: Elektroforeogram produktů restričního štěpení ampliconů X2 (359 bp) a X5 (318 + 36 bp) restričním enzymem *BseNI* (*BsrI*).

5.2.5 Sekvence ampliconu F1+R1

Pro úplné ověření specifičnosti amplifikace a získání přesné sekvence cDNA syntetizované pomocí primerů F1+R1 byl sekvenován amplicon těchto primerů pocházející z tkání *testes*, *caput epididymis*, *corpus epididymis* a *cauda epididymis* hřebce 5.

Získaná sekvence byla porovnána se sekvencí referenčního genomu koně domácího uvedené v databázi NCBI. Výsledkem porovnání byla 100% shoda mezi získanou sekvencí a sekvencí cDNA transkripční varianty X1 z NCBI (viz Obr. 22).

Dále byl v programu BioEdit version 7.2.5. proveden alignment sekvencí ampliconů pocházejících z jednotlivých typů tkání. Všechny čtyři sekvence vykazují shodu, primery F1+R1 tedy spolehlivě amplifikují požadovanou část genu *CD151* ve všech zkoumaných reprodukčních tkáních bez rozdílu (viz Obr. 23).

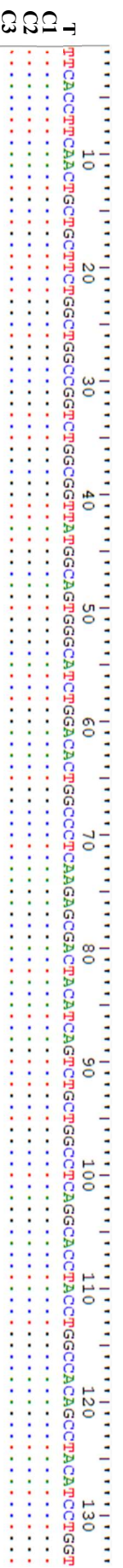
Sekvence byla také porovnána s genomy dalších zástupců rodu *Equus* v databázi NCBI. Na základě porovnání je získaná sekvence 100% homologní se sekvencí *CD151* osla domácího (*Equus asinus*) a koně převalského (*Equus przewalskii*) (viz Obr. 24).

PREDICTED: *Equus caballus* CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant X1, mRNA

Sequence ID: [XM_023654800.1](#) Length: 1853 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
604 bits(327)	9e-169	327/327(100%)	0/327(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTCACCTTCAACTGCTGCTTCTGGCTGGCCGGTCTGGCGGTATGGCAGTGGGCATCTGG	60		
Sbjct 325	TTCACCTTCAACTGCTGCTTCTGGCTGGCCGGTCTGGCGGTATGGCAGTGGGCATCTGG	384		
Query 61	ACACTGGCCCTCAAGAGCGACTACATCAGTCTGCTGGCCTCAGGCACCTACCTGGCCACA	120		
Sbjct 385	ACACTGGCCCTCAAGAGCGACTACATCAGTCTGCTGGCCTCAGGCACCTACCTGGCCACA	444		
Query 121	GCCTACATCCTGGTGGTGGCTGGCGTTGTTGTCATGGTGACCGGTGTCCTGGGCTGCTGC	180		
Sbjct 445	GCCTACATCCTGGTGGTGGCTGGCGTTGTTGTCATGGTGACCGGTGTCCTGGGCTGCTGC	504		
Query 181	GCCACCTTCAAGGAGCGGCGGAACCTGCTGCGCCTGTAATTCATCCTGCTCCTCATCATC	240		
Sbjct 505	GCCACCTTCAAGGAGCGGCGGAACCTGCTGCGCCTGTAATTCATCCTGCTCCTCATCATC	564		
Query 241	TTTCTGCTGGAGATCATTGCTGGCGTCTGGCCTACGTGTAATACCAGCAGCTGAACGCA	300		
Sbjct 565	TTTCTGCTGGAGATCATTGCTGGCGTCTGGCCTACGTGTAATACCAGCAGCTGAACGCA	624		
Query 301	GAGCTCAAGGAGAACCTGAAGGACACC	327		
Sbjct 625	GAGCTCAAGGAGAACCTGAAGGACACC	651		

Obr. 22: Porovnání získané sekvence ampliconu se sekvencí sestřihové varianty X1 z databáze NCBI.



Obř. 23: Alignment sekvenční ampikonů F1+R1 pocházějících z tkání *Testes* (T), *Caput epididymis* (C1), *Corpus epididymis* (C2) a *Cauda epididymis* (C3). Výstup programu BioEdit version 7.2.5.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group).(CD151)_transcript variant X6_mRNA	<u>Equus caballus</u>	604	604	100%	9e-169	100.00%	1875	<u>XM_005598402.3</u>
PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group).(CD151)_transcript variant X5_mRNA	<u>Equus caballus</u>	604	604	100%	9e-169	100.00%	1915	<u>XM_023654803.1</u>
PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group).(CD151)_transcript variant X4_mRNA	<u>Equus caballus</u>	604	604	100%	9e-169	100.00%	1808	<u>XM_023654802.1</u>
PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group).(CD151)_transcript variant X3_mRNA	<u>Equus caballus</u>	604	604	100%	9e-169	100.00%	1848	<u>XM_023654801.1</u>
PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group).(CD151)_transcript variant X2_mRNA	<u>Equus caballus</u>	604	604	100%	9e-169	100.00%	1919	<u>XM_005598401.3</u>
PREDICTED: Equus caballus CD151 molecule (Raph blood group).(CD151)_transcript variant X1_mRNA	<u>Equus caballus</u>	604	604	100%	9e-169	100.00%	1853	<u>XM_023654800.1</u>
PREDICTED: Equus asinus CD151 molecule (Raph blood group).(CD151)_transcript variant X6_mRNA	<u>Equus asinus</u>	604	604	100%	9e-169	100.00%	1669	<u>XM_014831510.1</u>
PREDICTED: Equus asinus CD151 molecule (Raph blood group).(CD151)_transcript variant X5_mRNA	<u>Equus asinus</u>	604	604	100%	9e-169	100.00%	1878	<u>XM_014831509.1</u>
PREDICTED: Equus asinus CD151 molecule (Raph blood group).(CD151)_transcript variant X4_mRNA	<u>Equus asinus</u>	604	604	100%	9e-169	100.00%	1708	<u>XM_014831508.1</u>
PREDICTED: Equus asinus CD151 molecule (Raph blood group).(CD151)_transcript variant X3_mRNA	<u>Equus asinus</u>	604	604	100%	9e-169	100.00%	1910	<u>XM_014831507.1</u>
PREDICTED: Equus asinus CD151 molecule (Raph blood group).(CD151)_transcript variant X2_mRNA	<u>Equus asinus</u>	604	604	100%	9e-169	100.00%	1716	<u>XM_014831506.1</u>
PREDICTED: Equus asinus CD151 molecule (Raph blood group).(CD151)_transcript variant X1_mRNA	<u>Equus asinus</u>	604	604	100%	9e-169	100.00%	1923	<u>XM_014831505.1</u>
PREDICTED: Equus przewalskii CD151 molecule (Raph blood group).(CD151)_mRNA	<u>Equus przewalskii</u>	604	604	100%	9e-169	100.00%	1927	<u>XM_008541895.1</u>

Obř. 24: Porovnání sekvenční genu CD151 koně domácího získané sekvenováním pro účely této práce a sekvenčními zástupci rodu *Equus* uvedených v databázi NCBI.

5.2.6 Výběr primerů a rozlišení transkripčních variant

Specifita amplifikace všech navržených primerů byla náležitě ověřena. Velikost PCR produktů odečtená z elektroforézy odpovídala výstupům z programu Primer BLAST (Obr. 11-15), na základě čehož byl vytvořen klíč k detekci sestřihových variant genu *CD151* (viz Tab. 9).

Tab. 9: Primerové páry a délka ampliconů (bp) jednotlivých sestřihových variant X1-X6, včetně délky ampliconů genomické DNA (gDNA).

Primery	X1	X2	X3	X4	X5	X6	gDNA
F1+R1	327	327	327	327	327	327	1356
F2+R2	-	-	100	100	-	-	1057
F3+R3	-	137	-	-	137	137	574
F4+R4	-	326	321	281	321	281	1369
F3+R5	-	359	-	-	354	314	1839

Pro obecné hodnocení exprese *CD151* byl zvolen primerový pár F1+R1. Tento pár primerů amplifikuje sekvenci cDNA, která je společná pro všechny sestřihové varianty X1-X6. Syntetizovaný PCR fragment má vždy stejnou velikost.

Transkripční variantu X1 nebylo možné přímo detekovat a ani nebylo možné navrhnout primery tak, aby amplifikovaly sekvenci pouze této transkripční varianty.

Transkripční varianta X2 byla detekována a rozlišena amplifikací cDNA za použití primerů F3+R5 a následně restričním štěpením enzymem *Bse*NI (*Bsr*I). Amplicon X2 si zachovával velikost 359 bp.

Transkripční varianta X3 byla detekována a rozlišena amplifikací za použití primerů F2+R2, kdy byl v gelu patrný produkt 100 bp, a dále pomocí primerů F4+R4, kdy byl produkt velký 321 bp.

Transkripční varianta X4 byla, stejně jako varianta X3, detekována a rozlišena amplifikací za použití primerů F2+R2, kdy byl v gelu patrný produkt 100 bp, a následně pomocí primerů F4+R4, kdy byl produkt velký 281 bp.

Transkripční varianta X5 byla detekována a rozlišena amplifikací cDNA za použití primerů F3+R5 a následně restričním štěpením enzymem *Bse*NI (*Bsr*I). Vzniklé restriční fragmenty měly délku 318 bp a 36 bp.

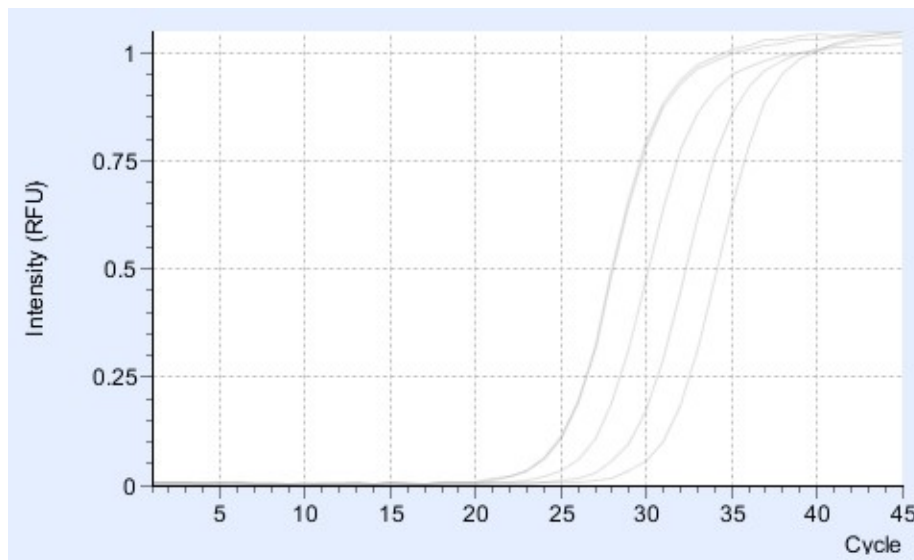
Transkripční varianta X6 byla detekována amplifikací za použití primerů F3+R5, kdy vznikl produkt o velikost 314 bp.

Navrhovaný primerový pár F+R pro housekeepingový gen *ACTB* se také prokázal jako vhodný a tvořil produkt shodný s výstupem z programu Primer BLAST, tedy 104 bp.

5.3 Vyhodnocení průběhu qRT-PCR

Kvantifikace relativní exprese *CD151* a stanovení parametru ΔC_q ve všech tkáních všech hřebců byly provedeny pomocí programu termocykleru LightCycler® Nano Roche. Výsledné hodnoty ΔC_q byly zpracovány do Tab. 10 a data byla dále analyzována v rámci statistického šetření.

Průběh amplifikace znázorňují amplifikační křivky, na kterých lze sledovat exponenciální růst množství cDNA s postupujícími cykly. Amplifikační křivky genu *CD151* (primery F1+R1) měly plynulý průběh a standardní tvar. Na Obr. 25 jsou zobrazeny amplifikační křivky, které byly získány při qRT-PCR vzorků ředící řady pro stanovení účinnosti reakce.



Obr. 25: Amplifikační křivky genu *CD151* (primery F1+R1).

5.4 Statistické analýzy

5.4.1 Vstupní hodnoty Ratio ΔCq pro statistické analýzy

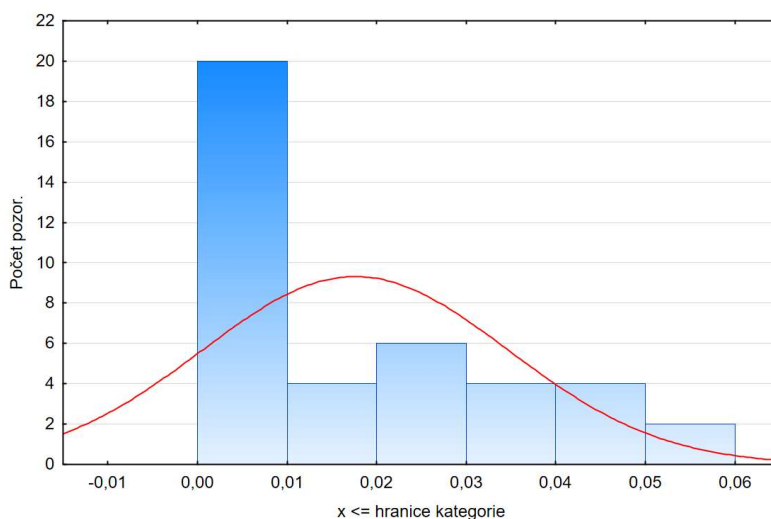
Tab. 10: Vstupní hodnoty Ratio ΔCq získané v průběhu amplifikace za využití primerů F1+R1. *Testes* = varle, *Caput* = hlava nadvarlete, *Corpus* = tělo nadvarlete, *Cauda* = ocas nadvarlete.

	Hřelec	Tkáň	Replikát	Ratio ΔCq
1	1	Testes	A	0,032
2			B	0,033
3		Caput	A	0,019
4			B	0,017
5		Corpus	A	0,004
6			B	0,003
7		Cauda	A	0,001
8			B	0,001
9	2	Testes	A	0,048
10			B	0,046
11		Caput	A	0,026
12			B	0,024
13		Corpus	A	0,007
14			B	0,006
15		Cauda	A	0,002
16			B	0,002
17	3	Testes	A	0,029
18			B	0,031
19		Caput	A	0,012
20			B	0,013
21		Corpus	A	0,002
22			B	0,003
23		Cauda	A	0,001
24			B	0,001
25	4	Testes	A	0,043
26			B	0,044
27		Caput	A	0,021
28			B	0,023
29		Corpus	A	0,006
30			B	0,006
31		Cauda	A	0,001
32			B	0,002
33	5	Testes	A	0,057
34			B	0,056
35		Caput	A	0,029
36			B	0,031
37		Corpus	A	0,009
38			B	0,008
39		Cauda	A	0,003
40			B	0,003

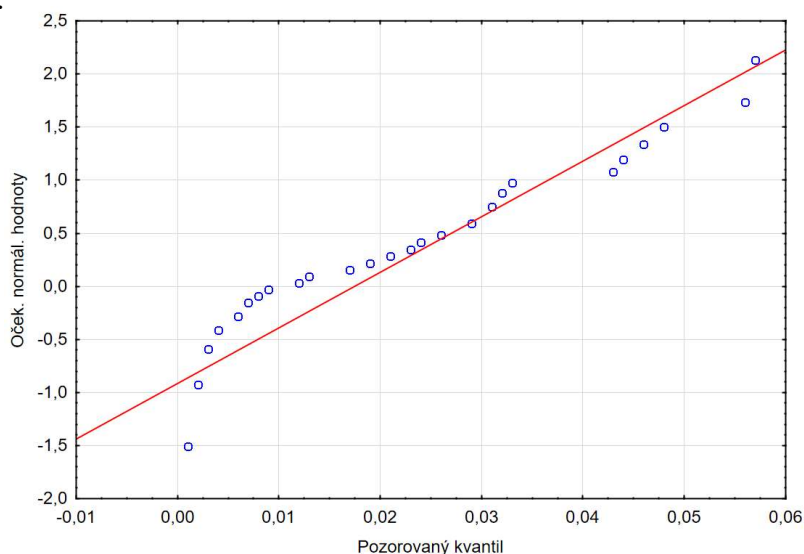
5.4.2 Test normality a test homogenity rozptylu

Nejprve bylo provedeno ověření předpokladů normality dat a homogenity rozptylů pomocí metod popisné statistiky. Pokud data pochází z normálního rozdělení, lze dále postoupit k parametrickému testu ANOVA. Parametrický test se provádí i v případě, že data nemají normální rozdělení, ale počet pozorování je vyšší než 30. V tomto případě může být analýza zatížena mírnými chybami.

Normalita rozdělení vstupních dat byla testována prostřednictvím Kolmogorov–Smirnovova testu homogenity, na základě jehož výstupu platí, že $D = 0,19272$ a $p > 0,05$. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyl podle tohoto testu prokázán statisticky významný rozdíl mezi rozdělením naměřených dat a normálním rozdělením. Grafické provnání s normálním rozdělením ukazuje histogram (Graf 1) a p-graf (Graf 2).



Graf 1: Rozdělení vstupních dat Ratio ΔCq podle histogramu neodpovídá normálnímu rozdělení.



Graf 2: Podle p-grafu se s výjimkou nejnižších hodnot pohybují naměřené hodnoty v blízkosti přímky znázorňující normální rozdělení.

Homogenita rozptylu pomocí Levenova testu při hladině významnosti $\alpha=0,05$ byla potvrzena pro tyto efekty:

- replikát ($p = 0,965528568$), $p > 0,05$
- hřebec ($p = 0,204705063$), $p > 0,05$

Homogenita rozptylu nebyla potvrzena pro efekt:

- tkáň ($p = 0,00000660819642$), $p < 0,05$

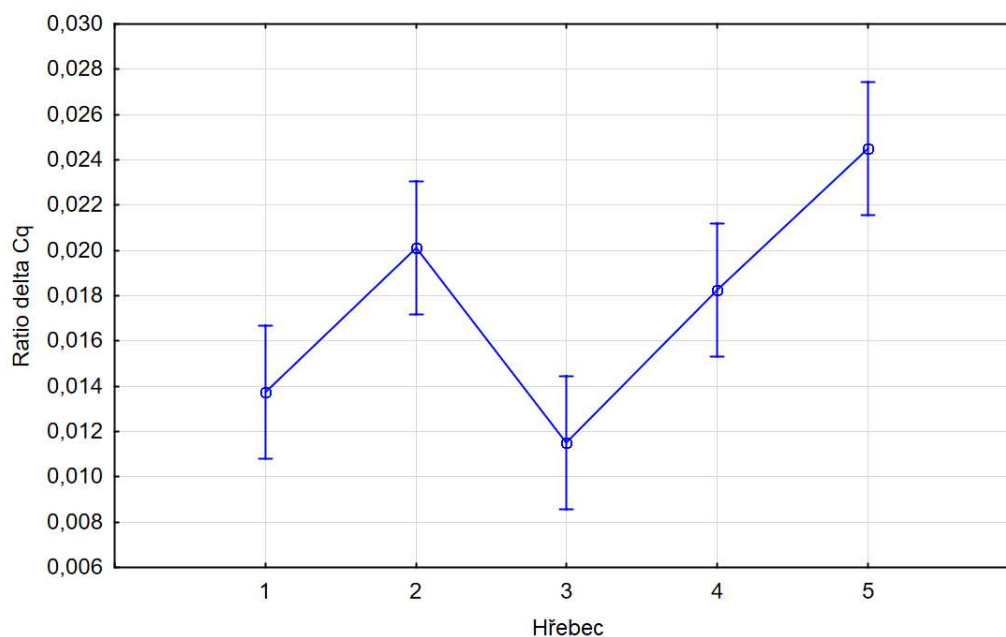
5.4.3 Hodnocení vlivu efektů na variabilitu Ratio ΔCq

Pro hodnocení vlivu efektů hřebec, tkáň a replikát na variabilitu hodnot Ratio ΔCq byl proveden parametrický test GLM-ANOVA hlavních efektů. Test byl proveden při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Výsledky testu jsou zobrazeny v Tab. 11. Červeně jsou označeny efekty, které mají vliv na variabilitu Ratio ΔCq ($p < 0,05$).

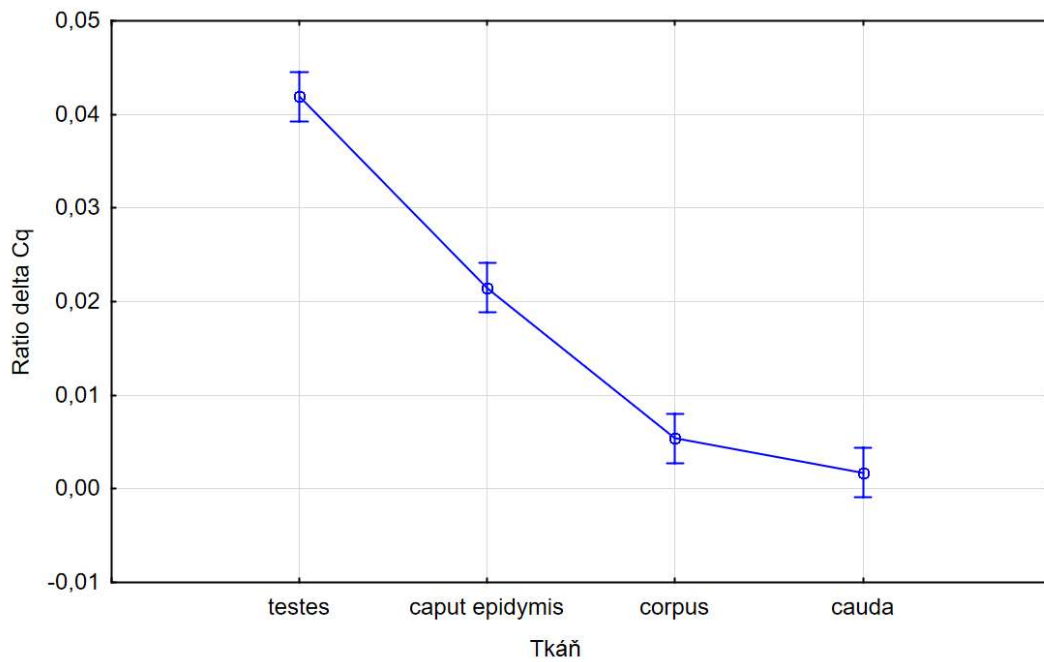
Na základě ANOVY byly vypracovány krabicové grafy (Graf 3-5) pro každý ze tří efektů. Grafy porovnávají rozdíly hodnot mediánů Ratio ΔCq mezi již zmíněnými třemi efekty. Vertikály vyznačují 0,95 interval spolehlivosti.

Tab. 11: Výstup analýzy ANOVA. Červeně jsou vyznačené efekty hřebec a tkáň.

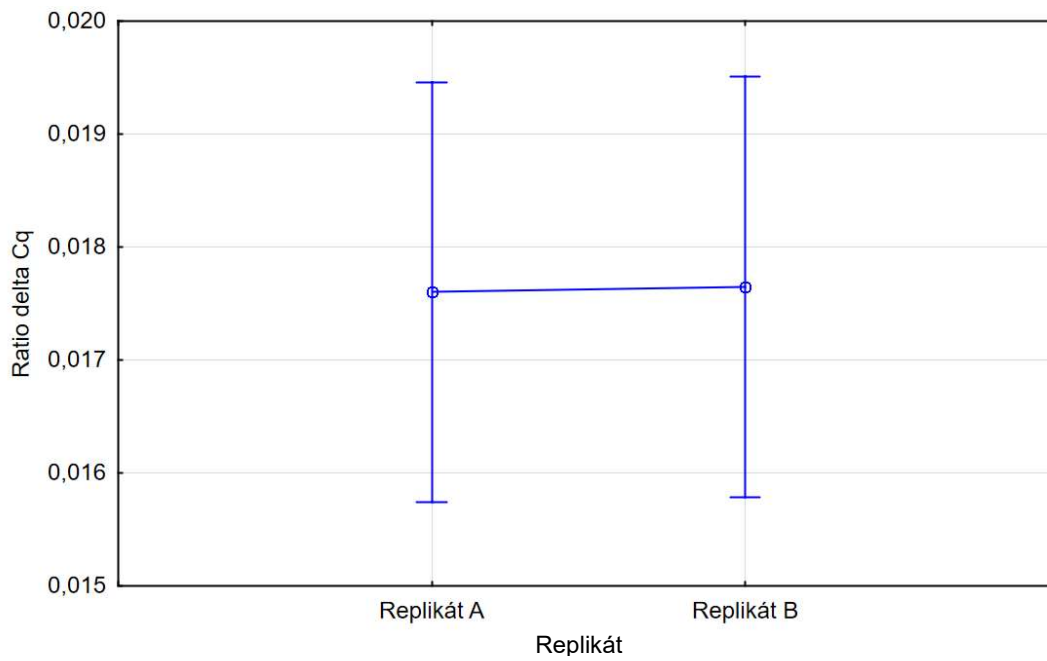
Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. Člen	0,012426	1	0,012426	745,9586	0,000000
Replikát	0,000000	1	0,000000	0,0015	0,969345
Hřebec	0,000852	4	0,000213	12,7797	0,000003
Tkáň	0,010073	3	0,003358	201,5833	0,000000
Chyba	0,000516	31	0,000017		



Graf 3: Krabicový graf pro efekt hřebec.



Graf 4: Krabicový graf pro efekt tkáň.



Graf 5: Krabicový graf pro efekt replikát.

ANOVA prokázala statisticky významný vliv efektů hřebec a tkáň na variabilitu hodnot Ratio ΔCq . Tyto efekty byly dále analyzovány prostřednictvím post hoc testu, konkrétně Tukeyova HSD testu, jehož výstupem byly homogenní skupiny těchto efektů. Test proběhl opět při hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Homogenní skupinu tvoří vždy dvojice hřebců. První skupinu tvoří hřelec 3 a 1. Druhou hřelec 1 a 4. Třetí tvoří hřelec 4 a 2. Čtvrtou homogenní skupinu tvoří hřelec 2 a 5. Mezi hodnotami Ratio ΔCq hřebců uvnitř homogenní skupiny nejsou statisticky významné rozdíly. Statisticky významný rozdíl existuje mezi jednotlivými homogenními skupinami.

Pro efekt tkáň platí, že první homogenní skupinu tvoří *cauda* a *corpus*. Své vlastní homogenní skupiny tvoří *caput* a *testes*. Mezi hodnotami Ratio ΔCq *cauda* a *corpus epididymis* neexistuje statisticky významný rozdíl. Statisticky významný rozdíl je mezi jednotlivými homogenními skupinami.

Tab. 12: Tukeyův HSD test pro efekt hřelec.

Hřelec	Ratio ΔCq Průměr	1	2	3	4
3	0,011500	****			
1	0,013750	****	****		
4	0,018250		****	****	
2	0,020125			****	****
5	0,024500				****

Tab. 13: Tukeyův HSD test pro efekt tkáň.

Tkáň	Ratio ΔCq Průměr	1	2	3
<i>cauda epididymis</i>	0,001700	****		
<i>corpus epididymis</i>	0,005400	****		
<i>caput epidymis</i>	0,021500		****	
<i>testes</i>	0,041900			****

6 Diskuze

Tetraspaniny jsou transmembránové proteiny vyskytující se v membránách téměř všech eukaryotických buněk (Hemler 2014). Podílí se na mnohých fyziologických i patologických procesech. Přestože jejich role v reprodukci stále nebyla plně odhalena, dosavadní výzkumy naznačují tomu, že tetraspaniny díky své schopnosti reorganizace membránových komplexů napomáhají fúzi gamet při oplodnění (Jankovicova et al. 2020b).

CD151 je obecně považován za jednu z kandidátních molekul podílejících se na oplodnění. Nedílnou součástí studia role tohoto tetraspaninu v reprodukci je zkoumání jeho genové exprese, transkripčních variant a potenciálních proteinových izoform, které by teoreticky mohly mít různé fyziologické funkce. Základním předpokladem pro studium genové exprese je vývoj efektivní metody, s jejíž pomocí lze stabilně měřit expresi na úrovni mRNA.

Cílem diplomové práce bylo vyvinout metodu vhodnou pro stanovení relativní genové exprese *CD151* v tkáních varlete a nadvarlete koně, z čehož vyplývá, že samotné kroky metodiky jsou zároveň součástí výsledků. Tato práce předkládá nejen spolehlivou metodu pro tyto účely vytvořenou na základě bioinformatické analýzy a postupů molekulární biologie. Zabývá se také detekcí všech šesti transkripčních variant, jejichž syntéza byla dosud jen predikována na základě anotace koňského genomu. Zároveň je tato práce jedinečná tím, že se zabývá koňským modelem, o kterém dosud nebyla ve spojitosti s molekulou CD151 publikována žádná data.

6.1 Biologický materiál

Volba biologického materiálu byla dána zadáním. Varle představovalo jeden typ tkáně, tkáně nadvarlete byly tři – hlava (*caput*), tělo (*corpus*), ocas (*cauda*). Každý typ tkáně byl odebrán pěti hřebcům ve dvou biologických replikátech, čímž byla zajištěna vyšší spolehlivost výstupů analýz a umožněna případná opakovatelnost. Dostupnost biologických replikátů dává také prostor pro optimalizaci metod. Veterinářem odebrané tkáně byly od chvíle odběru a následně po celou dobu převozu uchovávány na suchém ledu. Poté byly uloženy při v hlubokomrazícím boxu teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z teploty $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly vzorky tkání ihned vloženy do tekutého dusíku, ze kterého byly vyjmuty vždy až v okamžik přípravy na homogenizaci tkáně. Tento postup se ukázal jako vhodný pro zachování integrity RNA molekul pro další analýzy.

Citlivost RNA k degradaci je opakovaně diskutována. Pro účely stabilizace RNA v čerstvě odebraných tkáních byl vyvinut roztok RNAlater, který má v současnosti několik komerčních výrobců (např. Sigma, Thermo Fisher Scientific). RNAlater byl před zmrazením při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aplikován při manipulaci se vzorky biopsie varlete (Das et al. 2010) i nadvarlete (Johnston et al. 2005). Avšak komparativní studie Wang et al. (2018) prokázala, že vysoké kvality totální RNA je možné dosáhnout i bez stabilizátorů, a to buď z čerstvých vzorků nebo ze vzorků zmrazených tekutým dusíkem. V této studii byla výtěžnost celkové RNA izolované z tkáně varlete, která byla uložena v tekutém dusíku, dokonce o něco vyšší v porovnání s RNA izolované z tkáně ošetřené RNAlaterem. Vystala také otázka, zda nemůže použití stabilizátoru způsobit nežádoucí změny ve tkáni, které by působily v některých ohledech inhibičně. Suhovskih et al. (2019) například zaznamenali snížení imunoreaktivity histologických preparátů a změnu morfologie tkání mozku, jater a ledvin. Degradaci proteinů v mozkové tkáni

pozorovali také Wang et al. (2018). Tito autoři nicméně uvádí, že na průběh qRT-PCR neměl způsob uchovávání tkání vliv. Při správné manipulaci je tedy postup navrhovaný v této práci adekvátní.

6.2 Izolace RNA a její kvalita

Veškeré povrchy a nástroje byly preventivně ošetřeny ethanolem a inhibitorem RNázy RNase ZAPTM (Sigma), čímž bylo zabráněno enzymatické degradaci RNA molekul. Vzorky tkání byly homogenizovány v lyzačním roztoku za použití homogenizátoru. K izolaci totální RNA byl použit komerční kit Gen EluteTM Mammalian Total RNA Miniprep, využívající technologii vazebných kolonek. Výrobcem je doporučováno pro optimální výsledky použít vzorek tkáně o hmotnosti 25-40 mg. Tento požadavek byl splněn a byl dodržen postup protokolu, včetně navrhovaných preventivních kroků. RNA byla z vazebných kolonek eluována elučním roztokem dodaným v kitu. Koncentrace izolované RNA a její kvalita byla změřena UV spektrofotometrem, jehož výstupy zobrazují Tab. 4-8. Koncentrace totální RNA, tedy veškeré RNA izolované z tkáně, se u tkáně varlete pohybovala mezi hodnotami 22 až 41 ng/μl a u tkáně nadvarle mezi hodnotami 24 až 69 ng/μl. Kvalitu popisují parametry A260/A280 a A260/A230, které byly u obou typů tkání přibližně stejné. Hodnoty A260/A280 se pohybovaly mezi 1,88 až 2,21. Parametr A260/A230 nabýval hodnot 1,85 až 2,30. Průměrná hodnota však byla 2,03 pro A260/A280 a 2,07 pro A260/230.

Vzhledem k tomu, že by se tyto parametry značící čistotu měly přibližovat hodnotě 2 (Wilfinger et al. 1997), lze schopnost kitu eliminovat kontaminaci proteiny a DNA vyhodnotit pozitivně. K příznivým hodnotám měření absorpance A260/230 jistě přispělo také ošetření vazebné kolonky enzymem DNázou.

Posouzení naměřené koncentrace izolované RNA je spíše subjektivní. Neexistují totiž žádné obecné zásady týkající se požadovaného množství RNA. Koncentrace vstupní RNA vždy závisí na senzitivitě metod, které jsou použity k dalšímu zpracování nukleových kyselin. Proto je při studiu genové exprese důležité vždy optimalizovat postupy a podmínky pro konkrétní gen (Imbeaud et al. 2005). Pro účely reverzní transkripce a měření genové exprese *CD151* i housekeepingového genu *ACTB* pomocí qRT-PCR bylo množství vstupní mRNA i cDNA dostačující, o čemž vypovídá standardní průběh amplifikačních křivek.

Na trhu existuje mnoho kitů určených k izolaci celkové RNA, avšak některé nemusí být vhodné k práci se samčími reprodukčními tkáněmi. K izolaci RNA z tkáně varlete koně použili Das et al. (2010) kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Anderson et al. (2015) použili pro tkáň nadvarlete koně kit Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research). Častou metodou izolace je také komerčně vyráběný roztok TRIzol, fungující na základě fenol-chloroformové metody. RNA byla tímto způsobem izolována například z varlete a nadvarlete berana (Jin et al. 2015), z myšího nadvarlete (Johnston et al. 2005) a nadvarlete jaha (Zhao et al. 2019). Johnston et al. (2005) vzorky ještě dále purifikovali vazebnými kolonkami z kitu RNeasy Mini Kit, aby byla zajištěna čistota RNA, která může představovat při fenol-chloroformové metodě problém (Toni et al. 2018). Přesnou výtěžnost uvádí z těchto autorů jen Das et al. (2010), kteří za použití stabilizátoru RNAlateru a zmíněného izolačního kitu získali z tkáně varlete 376-428 ng/ul totální RNA. Jak již bylo ale řečeno, takto vysoké koncentrace nejsou pro účely měření exprese *CD151* nutné.

Komerční kit Gen Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep byl vyhodnocen jako optimální prostředek k izolaci RNA z varlete a nadvarlete koně.

6.3 Primery

Na základě sekvence genu *CD151* v referenčním genomu *Equus caballus* 3.0 (GCF_002863925.1) z databáze NCBI bylo v programu Primer3 Input 0.4.0 navrženo pět primerových párů pro *CD151* a jeho sestřihové varianty X1-X6. Primery byly označeny jako F1-4 a R1-5. Pro housekeepingový gen *ACTB*, který byl použit jako kontrola při stanovení genové exprese, byly navrženy dva primery F+R. Sekvence všech primerů, jejich délka a T_m jsou k nahlédnutí v Tab. 3. Oblast nasedání v referenčním genomu, specifita a očekávaná délka amplikonů byly vyhodnoceny v programu Primer BLAST, jehož výstupy ukazují Obr. 11-15.

Pro stanovení obecné genové exprese *CD151* byl vybrán primerový pár F1+R1, který nasedá na cDNA v oblasti, která je společná pro všechny transkripční varianty. Tato sekvence zároveň odpovídá transkripční variantě X1. Použití těchto primerů tedy umožňuje kvantifikovat expresi genu bez ohledu na transkripční variantu exprimovanou v dané tkáni. Protože jde o primery, na kterých je postavena kvantifikace amplifikace při qRT-PCR a tím pádem také hodnocení exprese *CD151* v daných tkáních pomocí metody Ratio ΔCq , bylo velice důležité spolehlivost tohoto páru primerů náležitě otestovat. Stejně nároky byly kladeny i na primery F+R housekeepingového genu *ACTB*.

Nejprve byly primery *CD151* (F1+R1) a *ACTB* (F+R) podrobeny analýze teploty tání T_m , při které byla prokázána amplifikace jednoho specifického produktu (viz Obr. 16, 17). Dále byla měřena eficeience reakce na základě ředící řady za vzniku standardní křivky (viz Obr. 18, 19). Hodnotícím parametrem při této metodě je sklon křivky vyjádřený jako Cq a eficeience (E). Sklon křivky *CD151* byl $Cq = -3,41$ a křivky *ACTB* $Cq = -3,39$. Hodnota $Cq = -3,32$ představuje perfektní 100% eficeienci, cílem tedy je přiblížit se této hodnotě co nejblíže (Nassiri et al. 2017). Eficeience (E) primerů *CD151* byla stanovena na hodnotu $E = 1,965$. U primerů genu *ACTB* byla hodnota $E = 1,971$. Hodnota E studovaného i housekeepingového genu by si měla být co nejpodobnější a zároveň by se měla blížit hodnotě $E = 2$, která vyjadřuje 100% eficeienci amplifikace (Nassiri et al. 2017). Na základě parametrů Cq a E byla eficeience těchto dvou primerových párů hodnocena příznivě. Primery byly vyhodnoceny jako specifické a byly použity k dalšímu zkoumání genové exprese pomocí qRT-PCR.

Přesnost amplifikace *CD151* za využití primerů F1+R1 byla dále ověřena sekvenováním syntetizovaných amplikonů, které pocházely ze všech čtyř typů tkání hřebce 5. Na základě porovnání sekvencí z jednotlivých tkání v programu BioEdit version 7.2.5 (viz Obr. 23) bylo prokázáno, že tato dvojice primerů amplifikuje požadovanou část genu *CD151* ve všech tkáních stejně. Primery F1+R1 jsou tedy vhodné pro hodnocení relativní exprese ve varleti i nadvarleti. Sekvence umožnila také provedení dalších bioinformatických analýz zasahujících do oboru genomiky. Získaná nukleotidová sekvence prokázala 100% shodu se sekvencí transkripční varianty X1 genu *CD151* v referenčním genomu koně domácího (*Equus caballus*) (Hestand et al. 2015) v databázi NCBI (viz Obr. 22). To znamená, že navržené primery opravdu amplifikují oblast, podle které byly navrženy. Navíc vykazovala tato sekvence také 100% homologii se sekvencí odpovídající *CD151* v referenčním genomu dvou dalších zástupců rodu *Equus*, konkrétně osla domácího (*Equus asinus*) (Huang et al. 2015) a koně převalského (*Equus*

przewalskii) (Huang et al. 2014) (viz Obr. 24). Primery F1+R1 jsou tím pádem vhodné pro výzkum *CD151* i u těchto druhů.

6.4 Detekce transkripčních variant

Na základě anotace referenčního genomu koně domácího v databázi NCBI byla predikována možná exprese šesti transkripčních variant X1-X6 genu *CD151* (viz Tab. 1) (Hestand et al. 2015). Pro účely amplifikace a detekce sestřihových variant byly navrženy primery F2+R2, F3+R3, F4+R4 a F3+R5. Protože se jedná o sestřihové varianty jednoho genu a amplicony cDNA jsou syntetizovány podle templátové mRNA, obsahují sekvence cDNA jen exony, nikoliv introny. Složení exonů v jednotlivých transkripčních variantách se překrývá, nebylo tedy možné navrhnout primery tak, aby jeden pár amplifikoval jen jednu variantu X.

Zvoleným postupem pro identifikaci transkripčních variant bylo porovnání délkového polymorfismusu ampliconů v gelové elektroforéze, kde byly separovány PCR produkty z pěti reakcí (viz Obr. 20). V každé reakci byl použit jeden pár primerů, které byly zmíněny výše. Dodatečně bylo třeba provést restriční štěpení produktu primerů F3+R5. Tyto primery měly tvořit amplicon varianty X2 a X5 o délce odlišující se jen pěti páry bází. Separace pomocí elektroforézy v agarózovém gelu nedokáže rozlišit takto malé rozdíly, proto bylo provedeno štěpení restričním enzymem, který rozpozná specifické restriční místo v ampliconu jen jedné z těchto dvou transkripčních variant. Po separaci restričních fragmentů a nenaštěpeného ampliconu v elektroforéze byly detekovány obě varianty X2 a X5 (viz Obr. 21). Jen při společném vyhodnocení těchto reakcí lze detekovat transkripční varianty podle postupu popsaného v podkapitole 5.2.6 Výběr primerů a rozlišení transkripčních variant.

Expresi transkripční varianty X1 nelze dokázat. Sekvence varianty X1 v sobě zahrnuje sekvence všech ostatních transkripčních variant X2-X6, není proto možné navrhnout primery tak, aby amplifikovaly část cDNA unikátní pro X1. Její exprese je však předpokládána.

Všechny ostatní transkripční varianty X2, X3, X4, X5 a X6 byly úspěšně detekovány prostřednictvím popsaných metod ve tkáních varlete i nadvarlete.

6.5 Podmínky qRT-PCR

Pro reverzní transkripci byl použit kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Výsledná cDNA byla naředěna na požadovanou koncentraci a buď rovnou použita pro reakci kvantitativní Real-Time PCR nebo uložena při teplotě 20 °C. Pro qRT-PCR byl použit kit FastStart Essential DNA Green Master (Roche). Gen *CD151* byl amplifikován pomocí primerů F1+R1 a zároveň byl amplifikován také housekeepingový gen *ACTB* jako interní kontrola. Amplifikace probíhala termocyklem LightCycler® Nano (Roche) za využití fluorescenčního barviva SYBR Green I. Amplifikační křivky měly standardní tvar, vstupní množství mRNA bylo tedy dostačující a cDNA vhodně naředěna. Měření exprese proběhlo ve všech tkáních a replikátech, které dohromady tvořily 40 vzorků (viz Tab. 2). Gen pro β -aktin (*ACTB*) byl vyhodnocen jako optimální pro normalizaci Cq hodnot genu *CD151* a stanovení relativní genové exprese ve tkáni varlete a nadvarlete koně.

Jankovicova et al. (2020a) v rámci svého výzkumu provedli stanovení relativní exprese mRNA *CD151* v myších spermatogoniích, spermatocytech, spermatidách a ve varleti. Jako housekeepingový gen úspěšně použili *Rps2*.

Více relevantních zdrojů pro porovnání výsledků a postupů není dostupných. Publikované studie zabývající se tetraspaninem *CD151* v reprodukčním traktu jsou založené buď na genovém knockoutu (Wright et al. 2004) nebo detekci v membráně oocyty jinými metodami (Wolf et al. 2003; Ziyat et al. 2006).

6.6 Hodnocení relativní exprese

Výstupem kvantitativní Real-Time PCR byly hodnoty Ratio ΔCq vycházející z hodnot Cq genu *CD151* a housekeepingového genu *ACTB*. Hodnoty Ratio ΔCq všech tkání a replikátů sloužily jako vstupní data pro hodnocení genové exprese a statistické analýzy (viz Tab. 10). Kromě vývoje samotné metody stanovení relativní exprese *CD151* byla zároveň vyhodnocena obecná relativní exprese na základě získaných dat. Dále byly posouzeny možné vlivy na variabilitu exprese *CD151* – hřebec, typ tkáně a replikát.

Vliv na variabilitu genové exprese byl prokázán ($p < 0,05$) u faktorů tkáně a hřebec. Ve všech třech tkáních nadvarlete byla relativní exprese minimální v porovnání s varletem, kde byla exprese znatelně vyšší. V nadvarleti byly nejvyšší hodnoty naměřeny v hlavě (*caput*) tohoto orgánu (viz Graf 4). V těle (*corpus*) a ocasu (*cauda*) nadvarlete byla exprese nižší a zároveň byla mezi těmito dvěma tkáněmi srovnatelná (viz Tab. 13). Výrazný rozdíl v expresi mezi varletem a nadvarletem se projevil také na histogramu (viz Graf 1) a vyšší hodnotou rozptylu, který proto nebyl vyhodnocen jako homogenní. Histogramem nebylo nepotvrzeno normální rozdělení z důvodu znatelně vyššího podílového zastoupení vzorků nadvarlete oproti vzorkům varlete a již zmíněné rozdílné exprese. To se projevilo vysokým prvním sloupcem v histogramu.

U hřebců byla exprese srovnatelná vždy mezi dvojicí jedinců. Nejvyšší exprese byla naměřena u hřebce 5 a nejnižší u hřebce 3 (viz Graf 3, Tab. 3). Jedním z možných důvodů nižších hodnot je degradace RNA ve tkáni způsobená nevhodnou manipulací či uchováváním vzorků při odběru v průběhu kastrace, při převozu nebo v laboratoři. Degradace RNA by vedla k nižšímu množství vstupní mRNA a následně cDNA. Neexistují průkazné důvody k předpokladu, že by se za fyziologických podmínek exprese *CD151* v reprodukčních tkáních odlišovala mezi jedinci. Vzhledem k tomu, že se integrita membrán hřebčích spermií snižuje v závislosti na fotoperiodě (Crespo et al. 2020), lze však spekulovat, že by mohla být vlivem vnějších podmínek a hormonální regulace ovlivněna i exprese membránových proteinů jako jsou tetraspaniny. Patologické příčiny jsou v tomto případě nepravděpodobné, protože ačkoliv je exprese *CD151* u hřebce 3 nejnižší z pěti zkoumaných jedinců, stále je na základě statistických analýz srovnatelná s hodnotami naměřenými u hřebce 1.

Zda se jednalo o replikát A či B nemělo na expresi vliv ($p > 0,05$), a to zřejmě z důvodu, že oba replikáty pocházely vždy ze stejné tkáně. Izolace RNA byla provedena většinou pro oba replikáty v jeden den, takže byly oba replikáty vystaveny stejným podmínkám při manipulaci.

Jankovicova et al. (2020a) naměřili u myší ve varleti expresi *CD151* srovnatelnou s housekeepingovým genem *Rps2*, zatímco ve spermatogoniích byla exprese tohoto genu zvýšená. Ve spermatocytech byla detekována nízká exprese. Toto by mohlo naznačovat, že se

CD151 zabudovává do membrány spermií spíše v rámci spermatocytogeneze než v průběhu post-testikulárního zrání. Tuto hypotézu podporují i výsledky této práce, tedy vyšší exprese ve varleti a znatelně nižší v nadvarleti. Otázkou potom zůstává, zdali dochází k transportu této membránové molekuly i prostřednictvím epididymosomů, ve kterých byly detekovány transkripty *CD151* (Nixon et al. 2019). V souladu s našimi výsledky by se mohlo jednat buď o CD151 exprimované v malé míře epitelem nadvarlete a sekretované v epididymosomech do lumen orgánu za účelem transportu molekul k dozrávajícím spermiím nebo o CD151, které se fyziologicky vyskytují v membráně epididymosomů jakožto transmembránová molekula udržující integritu a zprostředkovávající membránové interakce.

Dále byla relativní exprese *CD151* na úrovni RNA stanovena u člověka v rámci projektu The Human Protein Atlas (Uhlén et al. 2015). Exprese ve varleti byla měřena v buňkách semenotvorných kanálků a v Leydigových buňkách, v obou případech byla exprese nízká. V nadvarleti byla relativní exprese také nízká. Na stránkách atlasu nejsou k dispozici žádné bližší detaily ohledně použité metodiky a ani housekeepingového genu, ke kterému bylo měření exprese vztaženo, proto mají tato data spíše informační charakter.

7 Závěr

Literární rešerše se zabývala koňským modelem, spermatogenezí, zráním spermií v nadvarletí a oplozením. Dále byly blíže popsány tetraspaninové proteiny a jejich funkce v reprodukci. Konkrétně byla tato práce zaměřena na tetraspanin CD151 a jeho gen. V poslední části literární rešerše byly vysvětleny principy, na základě kterých fungují metody použité v experimentální části.

V experimentální části diplomové práce byly identifikovány exonové oblasti a varianty sestříhu pomocí bioinformatické analýzy koňského genu *CD151*. Následně byly navrženy primerové páry vhodné pro následné stanovení relativní exprese metodou qRT-PCR s využitím fluorescenčního barviva SYBR Green (Roche). Byla získána cDNA z varlete a ze tří anatomických oblastí nadvarlete 5 hřebců. Každá tkáň byla odebrána ve dvou replikátech. Jako housekeepingový gen pro normalizaci hodnocení relativní genové exprese byl vybrán gen *ACTB*, který se prokázal jako vhodný pro měření exprese ve varletí a nadvarletí koně domácího. Výsledky měření exprese qRT-PCR a vliv možných faktorů na expresi byly statisticky vyhodnoceny. Cíle práce byly tedy splněny.

Vlastní závěry práce lze formulovat jako odpovědi na vyslovené hypotézy:

- Gen *CD151* vykazuje expresi ve tkáni varlete i nadvarlete koně, a to v takové míře, která je detekovatelná metodou qRT-PCR s využitím barviva SYBR Green barviva (Roche).
- Všech 6 popsaných transkripčních variant koňského genu *CD151* je exprimováno ve všech zkoumaných tkáních varlete i nadvarlete. Transkripční varianty X2-X6 byly přímo detekovány. Transkripční variantu X1 jako jedinou nelze detekovat, avšak její exprese je předpokládána.
- Sekvence transkripčních variant vykazovaly homologii dostatečnou na to, aby mohl být navržen marker vhodný pro hodnocení obecné relativní exprese *CD151* bez ohledu na transkripční variantu exprimovanou ve tkáni. Bylo prokázáno, že exprese je závislá na tkáni.
- Identifikace inzerčně-delečních polymorfismů umožnila navrhnout specifické primery pro amplifikaci a potvrdit pomocí separace amplikonů v elektroforéze a restrikčního štěpení přítomnost všech transkripčních variant s výjimkou varianty X1.

Tato diplomová práce předkládá nově vyvinutou metodu, s jejíž pomocí lze spolehlivě hodnotit relativní expresi genu *CD151* a rovněž detekovat všech šest transkripčních variant ve varletí a nadvarletí koně domácího. CD151 je obecně považován za jednu z kandidátních molekul, která by se mohla skrývat za stále nepopsanými mechanismy vedoucími k fúzi gamet. Na tomto poli stále probíhá aktivní výzkum a modelem koně se ve spojitosti s tetraspaniny dosud nikdo nezabýval. Zde vyvinutá metoda je jednoznačně přínosem pro výzkum exprese genu *CD151*, jeho transkripčních variant, kódovaného proteinu a případných proteinových izoform, které by mohly v procesu oplodnění plnit různé fyziologické funkce.

8 Literatura

- Abou-haila A, Tulsiani DRP. 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **485**:72–81.
- Adamski MG, Gumann P, Baird AE. 2014. A Method for Quantitative Analysis of Standard and High-Throughput qPCR Expression Data Based on Input Sample Quantity. *PLoS ONE* **9** (e103917) DOI: 10.1371/journal.pone.0103917.
- Agarwal A et al. 2020. Sperm DNA fragmentation: A new guideline for clinicians. *The World Journal of Men's Health* **38**:412–471.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. Garland Science, New York.
- Anderson AL, Stanger SJ, Mihalas BP, Tyagi S, Holt JE, Mclaughlin EA, Nixon B. 2015. Assessment of microRNA expression in mouse epididymal epithelial cells and spermatozoa by next generation sequencing. *Genomics Data* **6**:208–211.
- Aurich C. 2011. Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science* **124**:220–228.
- Aurich C. 2016. Reprint of: Seasonal Influences on Cooled-Shipped and Frozen-Thawed Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* **43**:S1–S5.
- Barbaux S, Ialy-Radio C, Chalbi M, Dybal E, Homps-Legrand M, Do Cruzeiro M, Vaiman D, Wolf JP, Ziyat A. 2020. Sperm SPACA6 protein is required for mammalian Sperm-Egg Adhesion/Fusion. *Scientific Reports* **10** (5335) DOI: 10.1038/s41598-020-62091-y.
- Barranco I, Padilla L, Parrilla I, Álvarez-Barrientos A, Pérez-Patiño C, Peña FJ, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J. 2019. Extracellular vesicles isolated from porcine seminal plasma exhibit different tetraspanin expression profiles. *Scientific Reports* **9** (11584) DOI: 10.1038/s41598-019-48095-3 .
- Bassani S, Cingolani LA. 2012. Tetraspanins: Interactions and interplay with integrins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **44**:703–708.
- Belleannée C, Thimon V, Sullivan R. 2012. Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell and Tissue Research* **349**:717–731.
- Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. 1977. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *Journal of Cell Biology* **74**:68–85.
- Berditchevski F, Odintsova E, Sawada S, Gilbert E. 2002. Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of $\alpha 3\beta 1$ integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *Journal of Biological Chemistry* **277**:36991–37000.

- Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* **508**:483–487.
- Bílková A. 2020. Vývoj metody stanovení relativní exprese genů CD9 a CD81 kódujících tetraspaninové proteiny ve varleti a nadvarleti koně domácího s využitím termocyklu LightCycler® Nano (Roche). [MSc. Thesis]. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Breitbart H, Shabtay O. 2018. Sperm acrosome reaction. Pages 284–288 in M. Skinner, editor. *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press.
- Brosnahan MM, Brooks SA, Antczak DF. 2010. Equine clinical genomics: A clinician's primer. *Equine Veterinary Journal* **42**:658–670.
- Brzozowski JS et al. 2018. Extracellular vesicles with altered tetraspanin CD9 and CD151 levels confer increased prostate cell motility and invasion. *Scientific Reports* **8** (8822) DOI: 10.1038/s41598-018-27180-z.
- Bullone M, Lavoie JP. 2019. The equine asthma model of airway remodeling: from a veterinary to a human perspective. *Cell and Tissue Research* **380**:223–226.
- Bustin SA et al. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* **55**:611–622.
- Bustin SA, Nolan T. 2004. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* **15**:155–166.
- Caballero J, Frenette G, Sullivan R. 2011. Post testicular sperm maturational changes in the bull: Important role of the epididymosomes and prostasomes. *Veterinary Medicine International* **2011** (757194) DOI: 10.4061/2011/757194.
- Chalbi M et al. 2014. Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor jun0 drives cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. *Development* **141**:3732–3739.
- Chan JKC, Ng CS, Hui PK. 1988. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. *Histopathology* **12**:461–480.
- Charrin S, Le Naour F, Silvie O, Milhiet P-E, Boucheix C, Rubinstein E. 2009. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J* **420**:133–154.
- Cheng CY, Mruk DD. 2009. An intracellular trafficking pathway in the seminiferous epithelium regulating spermatogenesis: A biochemical and molecular perspective. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **44**:245–263.
- Clark DP, Pazdernik NJ, McGehee MR. 2019. *Molecular Biology*. Academic Cell.
- Cornwall GA. 2009. New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update* **15**:213–227.

- Cowin AJ, Adams D, Geary SM, Wright MD, Jones JCR, Ashman LK. 2006. Wound healing is defective in mice lacking tetraspanin CD151. *Journal of Investigative Dermatology* **126**:680–689.
- Crespo F, Wilson R, Díaz-Jimenez M, Consuegra C, Dorado J, Barrado BG, Gosálvez J, Smit RL, Hidalgo M, Johnston S. 2020. Effect of season on individual stallion semen characteristics. *Animal Reproduction Science* **223** (106641) DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106641.
- Crew VK, Burton N, Kagan A, Green CA, Levene C, Flinter F, Brady RL, Daniels G, Anstee DJ. 2004. CD151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin. *Blood* **104**:2217–2223.
- Culty M. 2009. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Research (Part C) - Embryo Today: Reviews* **87**:1–26.
- Curcio BR, Gastal MO, Pereira GR, Corcini CD, Landim-Alvarenga FC, Barros SS, Nogueira CEW, Deschamps JC, Gastal EL. 2014. Ultrastructural morphology and nuclear maturation rates of immature equine oocytes vitrified with different solutions and exposure times. *Journal of Equine Veterinary Science* **34**:632–640.
- Dacheux JL, Dacheux F, Druart X. 2016. Epididymal protein markers and fertility. *Animal Reproduction Science* **169**:76–87.
- Das PJ, Paria N, Gustafson-Seabury A, Vishnoi M, Chaki SP, Love CC, Varner DD, Chowdhary BP, Raudsepp T. 2010. Total RNA isolation from stallion sperm and testis biopsies. *Theriogenology* **74**:1099–1106.
- Deniz E, Erman B. 2017. Long noncoding RNA (lincRNA), a new paradigm in gene expression control. *Functional and Integrative Genomics* **17**:135–143.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* **37**:112–119.
- Didenko V V. 2001. DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications. *BioTechniques* **31**:1106–1121.
- Diller T, Thompson J, Steer B. 2021. Biological validation of a novel process and product for quantitating western blots. *Journal of Biotechnology* **326**:52–60.
- Doan R, Cohen ND, Sawyer J, Ghaffari N, Johnson CD, Dindot S V. 2012. Whole-Genome sequencing and genetic variant analysis of a quarter Horse mare. *BMC Genomics* **13** (78) DOI: 10.1186/1471-2164-13-78.
- Donkin I, Barrès R. 2018. Sperm epigenetics and influence of environmental factors. *Molecular Metabolism* **14**:1–11.

- Duncan FE, Que EL, Zhang N, Feinberg EC, O'Halloran T V., Woodruff TK. 2016. The zinc spark is an inorganic signature of human egg activation. *Scientific Reports* **6** (24737) DOI: 10.1038/srep24737.
- Ellerman DA, Pei J, Gupta S, Snell WJ, Myles D, Primakoff P. 2009. Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. *Molecular Reproduction and Development* **76**:1188–1199.
- Farrell RE. 2010. *RNA Methodologies*. Academic Press.
- Flörke S, Phi-van L, Müller-Esterl W, Scheuber HP, Engel W. 1983. Acrosin in the spermiogenesis of mammals. *Differentiation* **24**:250–256.
- Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. 2008. Regulating the acrosome reaction. *The International Journal of Developmental Biology* **52**:503–510.
- Frolikova M, Manaskova-Postlerova P, Cerny J, Jankovicova J, Simonik O, Pohlova A, Secova P, Antalikova J, Dvorakova-Hortova K. 2018. Molecular Sciences CD9 and CD81 Interactions and Their Structural Modelling in Sperm Prior to Fertilization. *International Journal of Molecular Sciences* **19** (1236) DOI: 10.3390/ijms19041236.
- Frolikova M, Sebkova N, Ded L, Dvorakova-Hortova K. 2016. Characterization of CD46 and β 1 integrin dynamics during sperm acrosome reaction. *Scientific Reports* **6** (33714) DOI: 10.1038/srep33714.
- Frolikova M, Valaskova E, Cerny J, Lumeau A, Sebkova N, Palenikova V, Sanchez-Hernandez N, Pohlova A, Manaskova-Postlerova P, Dvorakova-Hortova K. 2019. Addressing the compartmentalization of specific integrin heterodimers in Mouse sperm. *International Journal of Molecular Sciences* **20** (1004) DOI: 10.3390/ijms20051004.
- Gadella BM. 2013. Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida prior to and after fertilisation. *Reproduction, Fertility and Development* **25**:26–37.
- Gao W, Mahajan SP, Sulam J, Gray JJ. 2020. Deep Learning in Protein Structural Modeling and Design. *Patterns* **1** (100142) DOI: 10.1016/j.patter.2020.100142.
- Girouard J, Frenette G, Sullivan R. 2011. Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis. *International Journal of Andrology* **34**:e475–e486.
- Greiser T, Sieme H, Martinsson G, Distl O. 2020. Breed and stallion effects on frozen-thawed semen in warmblood, light and quarter horses. *Theriogenology* **142**:8–14.
- Grimaldi C, Raz E. 2020. Germ cell migration—Evolutionary issues and current understanding. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **100**:152–159.
- Grzmil P, Kim Y, Shamsadin R, Neesen J, Adham IM, Heinlein UAO, Schwarzer UJ, Engel W. 2001. Human cyritestin genes (CYRN1 and CYRN2) are non-functional. *Biochemical Journal* **357**:551–556.

- Hackett JA, Huang Y, Günesdogan U, Gretarsson KA, Kobayashi T, Surani MA. 2018. Tracing the transitions from pluripotency to germ cell fate with CRISPR screening. *Nature Communications* **9** (4292) DOI: 10.1038/s41467-018-06230-0
- Hall B, Limaye A, Kulkarni AB. 2009. Overview: Generation of Gene Knockout Mice. *Current Protocols in Cell Biology* **44**:19.12.1-19.12.17.
- Han J, Xia A, Huang Y, Ni L, Chen W, Jin Z, Yang S, Jin F. 2019. Simultaneous Visualization of Multiple Gene Expression in Single Cells Using an Engineered Multicolor Reporter Toolbox and Approach of Spectral Crosstalk Correction. *ACS Synthetic Biology* **8**:2536–2546.
- Hansen LA, Dacheux F, Man SY, Clulow J, Jones RC. 2004. Fluid Reabsorption by the Ductuli Efferentes Testis of the Rat Is Dependent on Both Sodium and Chlorine 1. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* **71**:410–416.
- Hausberger M, Stomp M, Sankey C, Brajon S, Lunel C, Henry S. 2019. Mutual interactions between cognition and welfare: The horse as an animal model. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **107**:540–559.
- He ZY, Brakebusch C, Fässler R, Kreidberg JA, Primakoff P, Myles DG. 2003. None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Developmental Biology* **254**:226–237.
- Heckert LL, Griswold MD. 2002. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Progress in Hormone Research* **57**:129–148.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986–994.
- Hemler ME. 2003. Tetraspanin Proteins Mediate Cellular Penetration, Invasion, and Fusion Events and Define a Novel Type of Membrane Microdomain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **19**:397–422.
- Hemler ME. 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**:801–811.
- Hemler ME. 2008. Targeting of tetraspanin proteins - Potential benefits and strategies. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**:747–758.
- Hemler ME. 2014. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nature Reviews Cancer* **14**:49–60.
- Hestand MS, Kalbfleisch TS, Coleman SJ, Zeng Z, Liu J, Orlando L, MacLeod JN. 2015. Annotation of the protein coding regions of the equine genome. *PLoS ONE* **10** (e0124375) DOI: 10.1371/journal.pone.0124375.

- Hino T, Muro Y, Tamura-Nakano M, Okabe M, Tateno H, Yanagimachi R. 2016. The behavior and acrosomal status of mouse spermatozoa in vitro, and within the oviduct during fertilization after natural mating. *Biology of Reproduction* **95** (50) DOI: 10.1095/biolreprod.116.140400
- Holdcraft RW, Braun RE. 2004. Hormonal regulation of spermatogenesis. *International Journal of Andrology* **27**:335–342.
- Houkpe BW, Chenou F, de Lima F, de Paula EV. 2021. HRT Atlas v1.0 database: Redefining human and mouse housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets. *Nucleic Acids Research* **49**:D947–D955.
- Huang J et al. 2014. Analysis of horse genomes provides insight into the diversification and adaptive evolution of karyotype. *Scientific Reports* **4** (4958) DOI: 10.1038/srep04958.
- Huang J et al. 2015. Donkey genome and insight into the imprinting of fast karyotype evolution. *Scientific Reports* **5** (14106) DOI: 10.1038/srep14106.
- Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C. 2005. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Research* **33** (e56) DOI: 10.1093/nar/gni054
- Inoue N, Hagihara Y, Wright D, Suzuki T, Wada I. 2015. Oocyte-triggered dimerization of sperm IZUMO1 promotes sperm-egg fusion in mice. *Nature Communications* **6** (8856) DOI: 10.1038/ncomms9858.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* **434**:234–238.
- Inoue N, Ikawa M, Nakanishi T, Matsumoto M, Nomura M, Seya T, Okabe M. 2003. Disruption of Mouse CD46 Causes an Accelerated Spontaneous Acrosome Reaction in Sperm. *Molecular and Cellular Biology* **23**:2614–2622.
- Inoue N, Ikawa M, Okabe M. 2011. The mechanism of sperm-egg interaction and the involvement of IZUMO1 in fusion. *Asian Journal of Andrology* **13**:81–87.
- Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Maekawa M, Miyado K, Toshimori K. 2010. Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: Unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell and Tissue Research* **340**:583–594.
- Izquierdo-Rico MJ, Moros-Nicolás C, Pérez-Crespo M, Laguna-Barraza R, Gutiérrez-Adán A, Veyrunes F, Ballesta J, Laudet V, Chevret P, Avilés M. 2021. ZP4 Is Present in Murine Zona Pellucida and Is Not Responsible for the Specific Gamete Interaction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8** (626679) DOI: 10.3389/fcell.2020.626679.
- James ER, Carrell DT, Aston KI, Jenkins TG, Yeste M, Salas-Huetos A. 2020. The role of the epididymis and the contribution of epididymosomes to mammalian reproduction.

- International Journal of Molecular Sciences **21** (5377) DOI: 10.3390/ijms21155377.
- Jankovicova J et al. 2016. Characterization of tetraspanin protein CD81 in mouse spermatozoa and bovine gametes. *Reproduction* **152**:785–793..
- Jankovicova J et al. 2020a. Expression and distribution of CD151 as a partner of alpha6 integrin in male germ cells. *Scientific Reports* **10** (4374) DOI: 10.1038/s41598-020-61334-2.
- Jankovicova J, Neuerova Z, Secova P, Bartoková M, Bubenickova F, Komrskova K, Postlerova P, Antalikova J. 2020b. Tetraspanins in mammalian reproduction: spermatozoa, oocytes and embryos. *Medical Microbiology and Immunology* **209**:407–425.
- Jankovicova J, Secova P, Manaskova-Postlerova P, Simonik O, Frolikova M, Chmelikova E, Horovska L, Michalkova K, Dvorakova-Hortova K, Antalikova J. 2019. Detection of CD9 and CD81 tetraspanins in bovine and porcine oocytes and embryos. *International Journal of Biological Macromolecules* **123**:931–938.
- Jin H, Huang Y, Jin G, Xue Y, Qin X, Yao X, Yue W. 2015. The vitamin D receptor localization and mRNA expression in ram testis and epididymis. *Animal Reproduction Science* **153**:29–38.
- Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:4892–4896.
- Johnston DS, Jelinsky SA, Bang HJ, DiCandeloro P, Wilson E, Kopf GS, Turner TT. 2005. The Mouse Epididymal Transcriptome: Transcriptional Profiling of Segmental Gene Expression in the Epididymis1. *Biology of Reproduction* **73**:404–413.
- Jones RC, Murdoch RN. 1996. Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of eutherian and marsupial mammals. *Reproduction, Fertility and Development* **8**:553–568.
- Joseph A, Shur BD, Hess RA. 2011. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. *Biology of Reproduction* **84**:207–217.
- Juskowiak B. 2011. Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**:3157–3176.
- Kato K, Satouh Y, Nishimasu H, Kurabayashi A, Morita J, Fujihara Y, Oji A, Ishitani R, Ikawa M, Nureki O. 2016. Structural and functional insights into IZUMO1 recognition by JUNO in mammalian fertilization. *Nature Communications* **7** (12198) DOI: 10.1038/ncomms12198.
- Ke A-W et al. 2016. Generation and characterization of a tetraspanin CD151/integrin $\alpha 6 \beta 1$ -binding domain competitively binding monoclonal antibody for inhibition of tumor progression in HCC. *Oncotarget* **7**:6314–6322.

- Kim E, Yamashita M, Nakanishi T, Park K-E, Kimura M, Kashiwabara S-I, Baba T. 2006. Mouse Sperm Lacking ADAM1b/ADAM2 Fertilin Can Fuse with the Egg Plasma Membrane and Effect Fertilization *. *Journal of Biological Chemistry* **281**:5634–5639.
- Klier J, Bartl C, Geuder S, Geh KJ, Reese S, Goehring LS, Winter G, Gehlen H. 2019. Immunomodulatory asthma therapy in the equine animal model: A dose-response study and evaluation of a long-term effect. *Immunity, Inflammation and Disease* **7**:130–149.
- Klinovska K, Sebkova N, Dvorakova-Hortova K. 2014. Sperm-Egg Fusion: A Molecular Enigma of Mammalian Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences* **15**:10652–10668..
- Köppel R, Tolido I, Ledermann R, Peier M. 2020. Use of a real-time thermocycler for charting bacterial growth. *European Food Research and Technology* **246**:2093–2099.
- La HM, Hobbs RM. 2019. Mechanisms regulating mammalian spermatogenesis and fertility recovery following germ cell depletion. *Cellular and Molecular Life Sciences* **76**:4071–4102.
- Larson EL, Kopania EEK, Good JM. 2018. Spermatogenesis and the Evolution of Mammalian Sex Chromosomes. *Trends in Genetics* **34**:722–732..
- Le Naour F, Rubstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C. 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* **287**:319–321.
- Leeb T. 2007. The horse genome project - Sequence based insights into male reproductive mechanisms. *Reproduction in Domestic Animals* **42**:45–50.
- Levy S, Shoham T. 2005. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology* **20**:218–224.
- Li H et al. 2019. Deletion of tetraspanin CD151 alters the Wnt oncogene-induced mammary tumorigenesis: A cell type-linked function and signaling. *Neoplasia (United States)* **21**:1151–1163.
- Liu M. 2011. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology* **9** (149) DOI: 10.1186/1477-7827-9-149.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**:402–408.
- Lorenzetti D, Poirier C, Zhao M, Overbeek PA, Harrison W, Bishop CE. 2014. A transgenic insertion on mouse chromosome 17 inactivates a novel immunoglobulin superfamily gene potentially involved in sperm-egg fusion. *Mammalian Genome* **25**:141–148.
- Macías-García B, Gonzalez-Fernandez L, Loux SC, Rocha AM, Guimarães T, Pena FJ, Varner DD, Hinrichs K. 2015. Effect of calcium, bicarbonate, and albumin on capacitation-related events in equine sperm. *Reproduction* **149**:87–99.

- MacLeod JN, Kalbfleisch TS. 2020. Genetics, Genomics, and Emergent Precision Medicine 12 Years After the Equine Reference Genome Was Published. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* **36**:173–181.
- Mair TS, Love S, Schumacher J, Smith RKW, Frazer G. 2013. Reproduction. Pages 283–308 in T. Mair, S. Love, J. Schumacher, R. Smith, and G. Frazer, editors. *Equine Medicine, Surgery and Reproduction*, 2nd edition. Saunders Ltd.
- Mao F, Leung WY, Xin X. 2007. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnology* **7** (76) DOI: 10.1186/1472-6750-7-76.
- Matsumoto N et al. 2014. Role of CD151 expression in gallbladder carcinoma. *Surgery (United States)* **156**:1212–1217.
- McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE. 2012. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone & Joint Research* **1**:297–309.
- Meng X, Ziadlou R, Grad S, Alini M, Wen C, Lai Y, Qin L, Zhao Y, Wang X. 2020. Animal Models of Osteochondral Defect for Testing Biomaterials. *Biochemistry Research International* **2020** (9659412) DOI: 10.1155/2020/9659412.
- Miyado K et al. 2000. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* **287**:321–324.
- Moody DE. 2001. Genomics techniques: An overview of methods for the study of gene expression. *Journal of Animal Science* **79**:E128–E135.
- Morgan DJ, Weisenhaus M, Shum S, Su T, Zheng R, Zhang C, Shokat KM, Hille B, Babcock DF, McKnight GS. 2008. Tissue-specific PKA inhibition using a chemical genetic approach and its application to studies on sperm capacitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:20740–20745.
- Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ. 2006. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: A proteomic approach. *Journal of Andrology* **27**:201–211.
- Mugnier S et al. 2009. New Insights into the Mechanisms of Fertilization: Comparison of the Fertilization Steps, Composition, and Structure of the Zona Pellucida Between Horses and Pigs1. *Biology of Reproduction* **81**:856–870.
- Nagano R, Tabata S, Nakanishi Y, Ohsako S, Kurohmaru M, Hayashi Y. 2000. Proliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during spermatogenesis. *The Anatomical Record* **258**:210–220.
- Nassiri M, Elahi Torshizi M, Ghovvati S, Doosti M. 2017. Evaluation of different statistical methods using SAS software: an in silico approach for analysis of real-time PCR data. *Journal of Applied Statistics* **45**:306–319.

- Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* **439**:231–250.
- Ni F Da, Hao SL, Yang WX. 2019. Multiple signaling pathways in Sertoli cells: recent findings in spermatogenesis. *Cell Death and Disease* **10** (541) DOI: 10.1038/s41419-019-1782-z.
- Nishimura H, Kim E, Nakanishi T, Baba T. 2004. Possible function of the ADAM1a/ADAM2 fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. *Journal of Biological Chemistry* **279**:34957–34962.
- Nishiuchi R, Takagi J, Hayashi M, Ido H, Yagi Y, Sanzen N, Tsuji T, Yamada M, Sekiguchi K. 2006. Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: A comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ integrins. *Matrix Biology* **25**:189–197.
- Nixon B et al. 2019. Proteomic profiling of mouse epididymosomes reveals their contributions to post-testicular sperm maturation. *Molecular and Cellular Proteomics* **18**:S91–S108
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* **1**:1559–1582.
- Nongbua T, Guo Y, Ntallaris T, Rubér M, Rodriguez-Martinez H, Humblot P, Morrell JM. 2020. Bull seminal plasma stimulates in vitro production of TGF- β , IL-6 and IL-8 from bovine endometrial epithelial cells, depending on dose and bull fertility. *Journal of Reproductive Immunology* **142** (103179) DOI: 10.1016/j.jri.2020.103179.
- Nozawa K, Satouh Y, Fujimoto T, Oji A, Ikawa M. 2018. Sperm-borne phospholipase C zeta-1 ensures monospermic fertilization in mice. *Scientific Reports* **8** (1315) DOI: 10.1038/s41598-018-19497-6.
- O'Donnell L. 2014. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis* **4** (e979623) DOI: 10.4161/21565562.2014.979623.
- Ohnami N et al. 2012. CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biology Open* **1**:640–647.
- Okabe M. 2013. The cell biology of mammalian fertilization. *Development (Cambridge)* **140**:4471–4479.
- Ozsolak F, Milos PM. 2011. RNA sequencing: Advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics* **12**:87–98.
- Pabinger S, Rödiger S, Kriegner A, Vierlinger K, Weinhäusel A. 2014. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomolecular Detection and Quantification* **1**:23–33.

- Panina Y, Germond A, Masui S, Watanabe TM. 2018. Validation of Common Housekeeping Genes as Reference for qPCR Gene Expression Analysis during iPS Reprogramming Process. *Scientific Reports* **8** (8716) DOI: 10.1038/s41598-018-26707-8.
- Păunescu TG, Shum WWC, Huynh C, Lechner L, Goetze B, Brown D, Breton S. 2014. High-resolution helium ion microscopy of epididymal epithelial cells and their interaction with spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* **20**:929–937.
- Peirson SN, Butler JN, Foster RG. 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic acids research* **31** (e73) DOI: 10.1093/nar/gng073.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**:2002–2007.
- Pfaffl MW. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. Pages 87–112 in S. A. Bustin, editor. *A-Z of quantitative PCR*. International University Line, La Jolla.
- Phillips DM, Shalgi R. 1980. Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucida and oocyte. *Journal of Ultrastructure Research* **72**:1–12.
- Pinel L, Mandon M, Cyr DG. 2019. Tissue regeneration and the epididymal stem cell. *Andrology* **7**:618–630.
- Pui HP, Saga Y. 2017. Gonocytes-to-spermatogonia transition initiates prior to birth in murine testes and it requires FGF signaling. *Mechanisms of Development* **144**:125–139.
- Que EL, Duncan FE, Bayer AR, Philips SJ, Roth EW, Bleher R, Gleber SC, Vogt S, Woodruff TK, O'Halloran T V. 2017. Zinc sparks induce physiochemical changes in the egg zona pellucida that prevent polyspermy. *Integrative Biology* **9**:135–144.
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siebert W, Nitsche A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**:856–562.
- Ramos-Ibeas P, Pericuesta E, Fernández-González R, Ramírez MA, Gutierrez-Adan A. 2013. Most regions of mouse epididymis are able to phagocytose immature germ cells. *Reproduction* **146**:481–489.
- Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE, Oliveira PF. 2012. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nature Reviews Urology* **9**:330–338.
- Reilly JN et al. 2016. Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. *Scientific Reports* **6** (31794) DOI: 10.1038/srep31794.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **245**:154–160.

- Ritagliati C, Baro Graf C, Stival C, Krapf D. 2018. Regulation mechanisms and implications of sperm membrane hyperpolarization. *Mechanisms of Development* **154**:33–43.
- Roundtree IA, Evans ME, Pan T, He C. 2017. Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell* **169**:1187–1200.
- Roy D, Levi K, Kiss V, Nevo R, Eisenbach M. 2020a. Rhodopsin and melanopsin coexist in mammalian sperm cells and activate different signaling pathways for thermotaxis. *Scientific Reports* **10** (112) DOI: 10.1038/s41598-019-56846-5.
- Roy JG, McElhaney JE, Verschoor CP. 2020b. Reliable reference genes for the quantification of mRNA in human T-cells and PBMCs stimulated with live influenza virus. *BMC Immunology* **21**:4.
- Rubinstein E, Ziyat A, Prenant M, Wrobel E, Wolf JP, Levy S, Le Naour F, Boucheix C. 2006. Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Developmental Biology* **290**:351–358.
- Sabetian S, Shamsir MS, Naser MA. 2014. Functional features and protein network of human sperm-egg interaction. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **60**:329–337.
- Santella L, Alikani M, Talansky BE, Cohen J, Dale B. 1992. Is the human oocyte plasma membrane polarized? *Human Reproduction* **7**:999–1003..
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. 2002. PLC ζ : A sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development* **129**:3533–3544.
- Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: Current concepts and the novel “gene expression’s C T difference” formula. *Journal of Molecular Medicine* **84**:901–910.
- Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* **3**:1101–1108.
- Schnobrich MR, Turner RO, Belcher CN, Slack JA. 2016. Transrectal ultrasonographic characterization of the accessory sex glands, pelvic urethra, and ureters in normal geldings. *Theriogenology* **85**:186–192.
- Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* **2**:905–909.
- Shcherbo D et al. 2007. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nature Methods* **4**:741–746.
- Shum WWC, Da Silva N, Brown D, Breton S. 2009. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *Journal of Experimental Biology* **212**:1753–1761.

- Skerget S, Rosenow MA, Petritis K, Karr TL. 2015. Sperm Proteome Maturation in the Mouse Epididymis. *PLOS ONE* **10** (e0140650) DOI: 10.1371/journal.pone.0140650.
- Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J. 2005. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno.
- Smith LB, Walker WH. 2014. The Regulation of Spermatogenesis by Androgens. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **30**:2–13.
- Soboleski MR, Oaks J, Halford WP. 2005. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. *The FASEB Journal* **19**:440–442.
- Staub C, Johnson L. 2018. Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal* **12**:27–35.
- Stengel A, Shahswar R, Haferlach T, Walter W, Hutter S, Meggendorfer M, Kern W, Haferlach C. 2020. Whole transcriptome sequencing detects a large number of novel fusion transcripts in patients with AML and MDS. *Blood Advances* **4**:5393–5401.
- Sterk LM, Geuijen CA, Van Den Berg JG, Claessen N, Weening JJ, Sonnenberg A. 2002. Association of the tetraspanin CD151 with the laminin-binding integrins $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ and $\alpha 7\beta 1$ in cells in culture and in vivo. *Journal of Cell Science* **115**:1161–1173.
- Stipp CS, Kolesnikova T V., Hemler ME. 2003. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **28**:106–112.
- Suárez-Bonnet A, Willis C, Pittaway R, Smith K, Mair T, Priestnall SL. 2018. Molecular carcinogenesis in equine penile cancer: A potential animal model for human penile cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* **36**:159–171.
- Suhovskih A V., Kazanskaya GM, Volkov AM, Tsidulko AY, Aidagulova S V., Grigorieva E V. 2019. Suitability of RNALater solution as a tissue-preserving reagent for immunohistochemical analysis. *Histochemistry and Cell Biology* **152**:239–247.
- Sullivan R, Frenette G, Girouard J. 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian Journal of Andrology* **9**:483–491.
- Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **35**:1–10.
- Sutovsky P, Manandhar G, Wu A, Oko R. 2003. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: Implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microscopy Research and Technique* **61**:362–378.
- Swann K, Larman MG, Saunders CM, Lai FA. 2004. The cytosolic sperm factor that triggers Ca^{2+} oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLC ζ . *Reproduction* **127**:431–439.

- Takahashi Y, Bigler D, Ito Y, White JM. 2001. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: Role of β 1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. *Molecular Biology of the Cell* **12**:809–820.
- Tavares L, Alves PM, Ferreira RB, Santos CN. 2011. Comparison of different methods for DNA-free RNA isolation from SK-N-MC neuroblastoma. *BMC research notes* **4**:3.
- Toni LS, Garcia AM, Jeffrey DA, Jiang X, Stauffer BL, Miyamoto SD, Sucharov CC. 2018. Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX* **5**:599–608.
- Trebichalská Z, Holubcová Z. 2020. Perfect date—the review of current research into molecular bases of mammalian fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **37**:243–256.
- Trigg NA, Eamens AL, Nixon B. 2019. The contribution of epididymosomes to the sperm small RNA profile. *Reproduction* **157**:R209–R223.
- Tumova L, Zigo M, Sutovsky P, Sedmikova M, Postlerova P. 2021. Ligands and Receptors Involved in the Sperm-Zona Pellucida Interactions in Mammals. *Cells* **10** (133) DOI: 10.3390/cells10010133.
- Tuomi JM, Voorbraak F, Jones DL, Ruijter JM. 2010. Bias in the Cq value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. *Methods* **50**:313–322.
- Uhlén M et al. 2015. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347** (1260419) DOI: 10.1126/science.1260419.
- Van Campenhout C, Cabochette P, Veillard A-C, Laczik M, Zelisko-Schmidt A, Sabatel C, Dhainaut M, Vanhollebeke B, Gueydan C, Kruys V. 2019. Guidelines for optimized gene knockout using CRISPR/Cas9. *BioTechniques* **66**:295–302.
- Van Der Weyden L, Patton EE, Wood GA, Foote AK, Brenn T, Arends MJ, Adams DJ. 2016. Cross-species models of human melanoma. *Journal of Pathology* **238**:152–165.
- van Deventer SJ, Dunlock VME, van Spriel AB. 2017. Molecular interactions shaping the tetraspanin web. *Biochemical Society Transactions* **45**:741–750.
- Verhoeven G, Willems A, Denolet E, Swinnen J V., De Gendt K. 2010. Androgens and spermatogenesis: Lessons from transgenic mouse models. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**:1537–1556.
- Visconti PE. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:667–668.
- Wade CM et al. 2009. Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse. *Science* **326**:865–867.

- Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, Wu X, Vo HT, Ma XJ, Luo Y. 2012. RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Diagnostics* **14**:22–29.
- Wang KC et al. 2011. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* **472**:120–124..
- Wang M, Ji X, Wang B, Li Q, Zhou J. 2018. Simultaneous Evaluation of the Preservative Effect of RNA later on Different Tissues by Biomolecular and Histological Analysis. *Biopreservation and Biobanking* **16**:426–433.
- Wang Z et al. 2021. Downregulation of CD151 induces oxidative stress and apoptosis in trophoblast cells via inhibiting ERK/Nrf2 signaling pathway in preeclampsia. *Free Radical Biology and Medicine* **164**:249–257.
- Waterhouse A et al. 2018. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* **46**:W296–W303.
- Whitaker M. 2006. Calcium at fertilization and in early development. *Physiological Reviews* **86**:25–88.
- Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**:474–481.
- Wilson NF, Snell WJ. 1998. Microvilli and cell-cell fusion during fertilization. *Trends in Cell Biology* **8**:93–96.
- Wolf J-P, Monier-Gavelle F, Rubinstein E, Barraud V, Bomsel M, Boucheix C. 2003. Fusion of human gametes requires a CD9 dependent clustering of $\alpha 6 \beta 1$ integrin-CD151 complexes on the oocyte membrane. *Fertility and Sterility* **80** (80)
DOI: doi.org/10.1016/S0015-0282(03)02013-2.
- Wright MD, Geary SM, Fitter S, Moseley GW, Lau L-M, Sheng K-C, Apostolopoulos V, Stanley EG, Jackson DE, Ashman LK. 2004. Characterization of Mice Lacking the Tetraspanin Superfamily Member CD151. *Molecular and Cellular Biology* **24**:5978–5988.
- Wu C, Wang C, Zhai B, Zhao Y, Zhao Z, Yuan Z, Fu X, Zhang M. 2021. Study on the region-specific expression of epididymis mRNA in the rams. *PLoS ONE* **16** (e0245933)
DOI: 10.1371/journal.pone.0245933.
- Yanagimachi R, Kamiguchi Y, Mikamo K, Suzuki F, Yanagimachi H. 1985. Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. *American Journal of Anatomy* **172**:317–330.
- Yang P, Ahmad N, Hunag Y, Ullah S, Zhang Q, Waqas Y, Liu Y, Li Q, Hu L, Chen Q. 2015. Telocytes: novel interstitial cells present in the testis parenchyma of the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **19**:2888–2899.

- Yates AD et al. 2020. Ensembl 2020. *Nucleic Acids Research* **48**:D682–D688.
- Yoshida S. 2010. Stem cells in mammalian spermatogenesis. *Development Growth and Differentiation* **52**:311–317.
- Yu Y, Xu W, Yi YJ, Sutovsky P, Oko R. 2006. The extracellular protein coat of the inner acrosomal membrane is involved in zona pellucida binding and penetration during fertilization: Characterization of its most prominent polypeptide (IAM38). *Developmental Biology* **298**:32–43.
- Zhang Y, Li D, Sun B. 2015. Do Housekeeping Genes Exist?. *PLOS ONE* **10** (e0123691) DOI: 10.1371/journal.pone.0123691.
- Zhao W, Quansah E, Yuan M, Gou Q, Mengal K, Li P, Wu S, Xu C, Yi C, Cai X. 2019. Region-specific gene expression in the epididymis of Yak. *Theriogenology* **139**:132–146.
- Zimmerman B, Kelly B, McMillan BJ, Seegar TCM, Dror RO, Kruse AC, Blacklow SC. 2016. Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell* **167**:1041–1051.
- Ziyyat A, Rubinstein E, Monier-Gavelle F, Barraud V, Kulski O, Prenant M, Boucheix C, Bomsel M, Wolf JP. 2006. CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin $\alpha 6\beta 1$, which are involved in human and mouse gamete fusion. *Journal of Cell Science* **119**:416–424.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

aa	amino acid, v překladu aminokyselina
ACBT	beta-aktin
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
bp	base pair, v překladu pár bází
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementární DNA
CNV	copy number variant
CP	crossing point
Cq	quantification cycle
Ct	threshold cycle
ČZU	Česká zemědělská univerzita
ddPCR	droplet digitální PCR
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
EC1	velká extracelulární smyčka
EC2	malá extracelulární smyčka
FAPPZ	Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU v Praze
FR	folátový receptor
FSH	folikulostimulační hormon
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
Gb	gigabáze
gDNA	genomická DNA
GFP	green fluorescent protein
GnRH	gonadotropin releasing hormon
GPI	glykofosfatidyinositol
GPX5	enzym glutathion peroxidáza
ICSI	intracytoplasmic sperm injection, vpravení spermií do cytoplazmy oocyty in vitro
KO	genový knockout
LED	Light-Emitting Diode, v překladu elektroluminiscenční dioda
LEL	long extracellular loop, v překladu dlouhá extracelulární smyčka
LH	luteinizační hormon
MIF	inhibiční faktor migrace mikrofágů
MIT	Massachusetts Institute of Technology
MMSDH	methylmalonát-semialdehyd dehydrogenáza
mRNA	messenger RNA, též nazývaná mediátorová
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	polymerázová řetězová reakce
PGC	primordial germ cells
piRNA	piwiRNA

qRT-PCR	kvantitativní real-time PCR
RFP	red fluorescent protein
RNA	ribonukleová kyselina
RPL13a	ribosomální protein L13a
RPS18	ribosomální protein S18
RPS2	ribosomální protein S2
rsRNA	ribosomal small RNA
SDF	sperm DNA fragmentation
SEL	malá extracelulární smyčka
SNP	single nucleotide polymorphism
SPAM1	sperm adhesion molecule 1
sRNA	small RNA
TEM	tetraspanin-enriched microdomain
T _m	melting temperature
tRNA	transfer RNA
tsRNA	tRNA-derived small RNA
ZP	zona pellucida
ZP1/2/3	zona pellucida protein 1/2/3

