

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Redistribuce sialové kyseliny během meiotického
zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách**

Diplomová práce

Bc. Zuzana Hedbávná
Reprodukční biotechnologie

Mgr. Ing. Tereza Krejčová Ph.D

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Redistribuce sialové kyseliny během meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách" 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 14. 4. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Mgr. Ing. Tereze Krejčové Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a především ochotu při práci a v laboratoři i během psaní diplomové práce. Také bych na tomto místě chtěla poděkovat i dalším pracovníkům Katedry veterinárních disciplín, především Ing. Kateřině Havlíkové a Ing. Kristýně Melounové za cenné rady během práce v laboratoři. V neposlední řadě děkuji své rodině, přátelům a příteli za podporu během celého studia.

Souhrn

Meiotické zrání oocytů je charakteristickou fází oogeneze, během níž dochází k mnoha klíčovým strukturním i funkčním změnám v oocytu. Výsledkem těchto komplexních změn je vajíčko připravené k oplození. K významným změnám dochází i ve struktuře glykoproteinového obalu oocytu – *zony pellucidy*. *Zona pellucida* prasečích oocytů je složena ze tří glykoproteinů – ZP2, ZP3 a ZP4, které mohou být během meiotického zrání glykosylovány, sulfatovány a sializovány. Přesný mechanismus těchto změn ovšem zatím není detailně popsán. Tyto změny jsou však nezbytné pro následné druhově specifické rozpoznání gamet a vazbu spermie na vajíčko. Jednou z kandidátních molekul zapojených do procesu rozpoznání gamet a vazby spermie na vajíčko je kyselina sialová. Kyselina sialová je ustáleným označením pro skupinu derivátů kyseliny neuraminové, které se v organismu specificky váží na konce sacharidových struktur glykoproteinů a glykolipidů, a díky svým vlastnostem mohou být regulátory mnoha fyziologických povrchových interakcí. Zda dochází ke změnám v distribuci kyseliny sialové během meiotického zrání prasečích oocytů nebylo doposud objasněno.

Cílem této diplomové práce bylo ověření hypotézy, že během meiotického zrání dochází k redistribuci sialové kyseliny na povrchu *zona pellucida* prasečích oocytů. K potvrzení dané hypotézy byly navrženy experimenty založené na vazbě lektinů specificky rozpoznávajících strukturu sialové kyseliny v sacharidovém řetězci glykoproteinů *zona pellucida*. Byly vybrány dva specifické lektiny – SNA (*Sambucus nigra agglutinin*), který rozpoznává sialovou kyselinu ve vazbě v pozici α -2,6 a lektin WGA (*Wheat germ agglutinin*), který rozpoznává multivalentně vázanou sialovou kyselinu a N-acetylglukosamin.

Výsledky experimentů potvrdily stanovenou hypotézu. V experimentu zaměřeném na detekci sialové kyseliny prostřednictvím lektinu SNA byl patrný statistický významný pokles relativní intenzity signálu SNA mezi prasečími oocyty ve stádiu zárodečného vajíčku (GV) a prasečími oocyty ve stádiu metafáze prvního meiotického dělení (MI). V experimentu zaměřeném na detekci sialové kyseliny prostřednictvím lektinu WGA statisticky významné rozdíly detekovány nebyly. Kyselina sialová může být zapojena do procesu rozpoznání gamet a vazby spermie na vajíčko různými způsoby. Může být přímo vazebným epitopem, ale může být zapojena i jiným způsobem. Díky svým vlastnostem může maskovat vazebný epitop a její odštěpení může být klíčovým dějem pro prezentaci specifického vazebného epitopu. Tuto hypotézu částečně podporují výsledky této diplomové práce. K jejímu definitivnímu potvrzení je však nezbytné realizovat další experimenty.

Klíčová slova: Kyselina sialová, lektiny, meiotické zrání, oocyt, *zona pellucida*

Redistribution of sialic acid during meiotic maturation of porcine oocytes *in vitro*

Summary

Meiotic maturation of oocytes is a characteristic phase of oogenesis when we can observe many crucial structural and functional changes in the oocyte. The result of these complex changes is an egg ready for fertilization. Significant changes also occur in the structure of the glycoprotein envelope of the oocyte, *zona pellucida*. The *zona pellucida* of porcine oocytes is composed of three glycoproteins - ZP2, ZP3, and ZP4, which can be glycosylated, sulfated, and sialized during meiotic maturation. The exact mechanism of these changes, however, has not yet been described in detail. Be that as it may, these changes are necessary for species-specific gamete recognition and sperm binding to the egg. One of the potential molecules involved in the process of gamete recognition and sperm binding to the egg is sialic acid. Sialic acid is a well-established name for a group of neuraminic acid derivatives that specifically bind to the ends of carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids in the body. Due to their properties, these acids can be regulators of many physiological surface interactions. It has not yet been elucidated whether or not the changes in the distribution of sialic acid transpire during the meiotic maturation of porcine oocytes.

This diploma thesis aimed to verify the hypothesis that redistribution of sialic acid on the surface of the *zona pellucida* of porcine oocytes occurs during meiotic maturation. Experiments were designed to confirm this hypothesis based on the binding of lectins specifically recognizing the structure of sialic acid in the carbohydrate chain of *zona pellucida* glycoproteins. Two specific lectins were selected: SNA (*Sambucus nigra agglutinin*) which recognizes sialic acid in the α -2,6 bond; WGA (*Wheat germ agglutinin*) which recognizes multivalent bound sialic acid; and N-acetylglucosamine.

The established hypothesis was confirmed by the results of the experiments. In an experiment focused on the detection of sialic acid by the SNA lectin, a decrease of statistical significance in the relative intensity of SNA signal was observed between porcine oocytes in the germinal vesicle stage (GV) and porcine oocytes in the metaphase stage of the first meiotic division (MI). No statistically significant differences were detected in the WGA lectin sialic acid experiment. Sialic acid can be engaged in the process of gamete recognition and sperm binding to the egg in a variety of ways. Sialic acid can be a direct binding epitope, or it can also be involved in other ways. Due to its properties, sialic acid is capable of masking the binding epitope, thus the bond cleavage plays a key role in the presentation of a specific binding epitope. This hypothesis is partially supported by the results of this thesis. Further experiments are necessary to decisively confirm the hypothesis.

Keywords: sialic acid, lectins, meiotic maturation, oocyte, *zona pellucida*

Obsah

1	ÚVOD	7
2	VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	8
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE	9
3.1	OOGENEZE A FOLIKULOGENEZE	9
3.1.1	<i>Fáze množení</i>	9
3.1.2	<i>Primordiální zárodečné buňky</i>	9
3.1.3	<i>Zahájení meiózy</i>	10
3.1.4	<i>Fáze růstu</i>	11
3.1.5	<i>Fáze zrání</i>	12
3.1.6	<i>Regulace meiotického zrání</i>	14
3.2	ZONA PELLUCIDA (ZP).....	19
3.2.1	<i>Význam zona pellucida</i>	19
3.2.2	<i>Morfologie ZP</i>	20
3.2.3	<i>Rozdělení ZP genů</i>	20
3.2.4	<i>Biosyntéza zony pellucidy</i>	22
3.2.5	<i>Glykosylace ZP glykoproteinů</i>	23
3.2.6	<i>Vazba spermie na zona pellucida</i>	26
3.3	LEKTINY	27
3.3.1	<i>Lektinová cytochemická analýza</i>	27
4	METODIKA	29
4.1	ODBĚR VAJEČNÍKŮ	29
4.2	ZISK OOCYTŮ	29
4.3	KULTIVACE OOCYTŮ.....	29
4.4	IMUNOFLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ KYSELINY SIALOVÉ POMOCÍ LEKTINŮ	29
4.5	VYHODNOCENÍ	29
5	VÝSLEDKY	30
5.1	IMUNOFLUORESCENČNÍ DETEKCE SIALOVÉ KYSELINY POMOCÍ SPECIFICKÝCH LEKTINŮ	30
5.1.1	<i>Detekce sialové kyseliny pomocí lektinu SNA</i>	30
5.1.2	<i>Detekce sialové kyseliny pomocí lektinu WGA</i>	32
6	DISKUZE	34
7	ZÁVĚR	36
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37

1 Úvod

Oocyty jsou samičí pohlavní buňky, které vznikají v procesu zvaném oogeneze. Na jejich povrchu se nachází struktura glykoproteinového obalu – *zona pellucida*, která je pro oocyt klíčová, jelikož se podílí nejenom na ochraně samotného oocytu, ale hraje důležitou roli i při mnoha biologických dějích souvisejících s fertilizací. Svůj význam má zejména při rozpoznání a druhově specifické vazbě spermie na *zona pellucida*, účastní se také bloku polyspermie při oplození a chrání časně se vyvíjející embryo při průchodu vejcovodem do dutiny dělohy, kde posléze dochází k jejímu zániku a embryo niduje do děložní sliznice.

Zona pellucida prasete se skládá ze tří různých glykoproteinů, které se označují jako ZP2, ZP3 a ZP4. Glykoproteiny *zona pellucida* jsou díky bohatým posttranslačním modifikacím velmi heterogenní, a to především glykosylacemi na serin/threoninových (O – glykosylace) a asparaginových (N – glykosylace) míst. K těmto posttranslačním modifikacím dochází i během meiotického zrání oocytů a jsou klíčové pro možnost následného oplození. Konkrétní skladba sacharidových struktur glykoproteinů na povrchu *zona pellucida*, na které se váží spermie, se u jednotlivých živočišných druhů může výrazně lišit, a tak zajistit druhově specifické rozpoznání gamet a následnou primární vazbu spermie k vajíčku. Tato vazba je zprostředkována povrchovými proteiny spermie a specifickými sacharidovými strukturami na povrchu *zona pellucida*.

Přesný mechanismus této vazby zatím nebyl i vzhledem k velké druhové variabilitě zcela objasněn. U skotu se rozpoznání gamet pravděpodobně účastní sialové kyseliny (Sia), u prasat tento mechanismus nebyl ještě dostatečně popsán. Kyselina sialová je ustáleným označením pro skupinu derivátů kyseliny neuraminové, které se v organismu specificky váží na konce sacharidových struktur glykoproteinů a glykolipidů, a díky svým vlastnostem mohou být regulátory mnoha fyziologických povrchových interakcí. Zda dochází ke změnám v distribuci kyseliny sialové během meiotického zrání prasečích oocytů nebylo doposud objasněno.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo ověření hypotézy, že během meiotického zrání dochází k redistribuci sialové kyseliny na povrchu *zona pellucida* prasečích oocytů.

K potvrzení dané hypotézy byly navrženy experimenty založené na vazbě lektinů specificky rozpoznávajících strukturu sialové kyseliny v sacharidovém řetězci glykoproteinů *zona pellucida*. Byly vybrány dva specifické lektiny – SNA (*Sambucus nigra agglutinin*), který rozpoznává sialovou kyselinu ve vazbě v pozici α -2,6 a lektin WGA (*Wheat germ agglutinin*), který rozpoznává multivalentně vázanou sialovou kyselinu a N-acetylglukosamin.

3 Literární rešerše

3.1 Oogeneze a folikulogeneze

Oogeneze označuje vývoj samičích pohlavních buněk – oocytů. Oocyty jsou jedny z největších buněk organismu a jsou vysoce specializované.

Celý proces oogeneze začíná již během prenatálního vývoje samice, kde je pozastaven a pokračuje až během puberty, dokončen je pouze pokud dojde k oplození (Wassarman 1988).

Meióza je rozdělena do dvou fází, mezi nimiž neprobíhá replikace. První fáze je heterotypická a dochází při ní k redukci počtu chromozomů z $2n$ (diploidní) na $1n$ (haploidní). Druhá fáze je homeotypická, dochází k rozdělení chromatid jednotlivých chromozomů a jejich počet zůstává stejný, nápadně se podobá mitóze (Hunt et Hassold 2008).

Budoucí oocyty se diferencují z PGC (primordiální zárodečné buňky). Z jedné oogonie vzniká pouze jeden oocyt a dvě až tři pólová tělíska (Wassarman 1988).

3.1.1 Fáze množení

Oogeneze začíná fází množení, kdy se totipotentní PGC mitoticky dělí, a dávají za vznik oogoniím, které mají již jádro umístěné v centru buňky, jejich cytoplazma je zredukovaná a obsahuje pouze malé množství organel, glykogen přítomný v PGC je využíván. Během tohoto období jsou spolu oogonie schopné komunikovat (Guraya 2007).

3.1.2 Primordiální zárodečné buňky

Všechny oocyty mají původ v PGC. Ty se tvoří během prvních dnů embryonálního vývoje, ještě před tvorbou gonád, z nediferencovaných buněk žlutkového váčku. Tyto buňky migrují do zadní části embrya, kde osídlují urogenitální lištu (24. den embryonálního vývoje). Již v průběhu migrace podléhají opakovanému mitotickému dělení (Verlhac 2010).

Jejich velikost se pohybuje mezi 15–20 μm . Jádro PGC není umístěno ve středu buňky a obsahuje jedno až dvě jadérka. Cytoplazma obsahuje pouze malé množství organel, nachází se zde oválné mitochondrie s úzkými kristami, Golgiho aparát, hrubé endoplazmatické retikulum umístěné blízko jádru a ribozomy umístěné volně v cytoplazmě. Přítomné jsou i mikrotubuly a centrioly. Jako zdroj energie se zde nachází molekuly glykogenu a lipidové kapénky, ty jsou přítomné zejména v době migrace PGC do zárodečné lišty (Guraya 2007).

Regulace přeměny původních buněk epiblastu v PGC spočívá v morfogenetických faktorech BMP (*bone morphogenic protein*), ty jsou produkovány okolní extraembryonální tkání a dávají signál k tvorbě PGC. BMP také dávají signál k transkripci genu pro transmembránový protein *Ifitm3*. Prekurzory PGC dále produkují E-kadherin, který hraje významnou roli v mezibuněčné komunikaci při diferenciaci samotných PGC (Verlhac 2010).

3.1.3 Zahájení meiózy

Oogonie se zanořují do kůry vaječníku. Po zanoření do vaječnicků se dál dělí a postupně tvoří shluky buněk, které jsou propojeny cytoplazmatickými můstky zajišťujícími vzájemnou komunikaci (Wassarman 1988, Bielanska-Osuchova 2006).

Oogonie mají kulovité jádro, obsahují volné ribozomy a mitochondrie, které se nacházejí především v perinukleárním prostoru. Jádro obsahuje heterochromatin (Wassarman 1988, Bielanska-Osuchova 2006).

Následně jsou jednotlivé oogonie obklopeny pregranulózními buňkami a tvoří tak primordiální folikul. Tyto buňky mají původ v povrchových buňkách epitelu vaječníku (Slípka 2019).

V tomto primordiálním folikulu oogonie vstupuje do meiózy (k tomu dochází u prasete kolem 64. dne prenatalního vývoje) (Sládeček, 1986). Meióza je u samic rozdělena do dvou fází. První probíhá ještě během fetálního vývoje, kdy buňky postupně vstupují do heterotypického dělení, ale zastavují se v diplotene profáze I (Otová et al. 2020). Profáze I meiózy se nápadně liší od mitózy.

- 1) Proleptotene – dokončení replikace DNA
- 2) Leptotene – zkracování a spiralizace chromozomů
- 3) Zygotene – párování homologních chromozomů a tvorba synaptonemálního komplexu
- 4) Pachytene – v tomto období tvoří chromatidy rozeznatelné tetrády, mezi nesesterskými chromatidami vznikají rekombinační uzlíky a dochází k jejich překřížení (crossing-over)
- 5) Diplotene – zde se ve fázi dictyate meióza zastaví, chromatidy se uvolní z tetrad a synaptonemální komplex se rozpadá
- 6) Diakineze – chiasmata (místa kde proběhl crossing over) se postupně terminalizují a bivalenty se oddalují a postupují směrem k jaderné membráně, na konci diakineze dochází k rozpadu jaderné membrány a napojení centromer na mikrotubuly

(Vacek 2006, Otová 2020)

Dříve se předpokládalo, že fáze množení probíhá pouze v prenatalním období. Novější výzkumy ovšem ukázaly, že k množení a tedy i vzniku nových oocytů dochází v omezené míře také u dospělých samic (Johnson et al. 2004). Podle Johnsona (2005) mohou mít původ v krevních elementech nebo kostní dřeni.

Současně s meiózou dochází k přeměně primordiálního folikulu na primární. Děje se tak mitotickým dělení plochých pregranulózních buněk. Primární folikul je tedy obklopen jednou vrstvou kubických folikulárních buněk (Senbon et al. 2003).

Během tohoto stádia velké množství oocytů podléhá atrezii a pouze malá část z nich dosáhne další fáze. Důvodem k tomu může být poškození jaderného nebo mitochondriálního genomu (Junqueira et al. 1997).

3.1.4 Fáze růstu

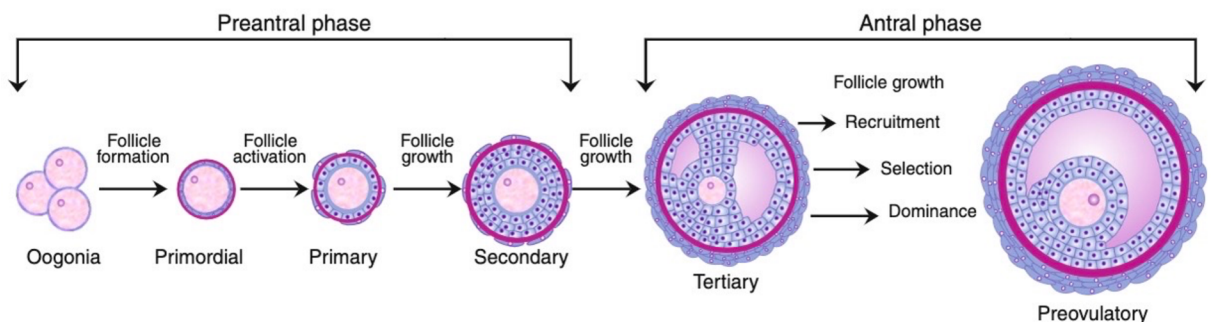
Do této fáze vstupují oocyty postupně v postnatálním období. Gametické buňky se už nemnoží, pouze zvětšují svou velikost. Typická je zvýšená intenzita transkripce uvnitř zárodečné buňky, tak si hromadí zásobní proteiny, organely, všechny typy RNA a další. Buňka získává meiotickou kompetenci, tedy schopnost znovuzahájit a dokončit meiotické dělení a je schopná zajistit vývoj embrya v prvních dnech po oplození. Po fázi růstu už transkripce neprobíhá (Thibault 1987).

Charakteristické je také progresivní mitotické dělení folikulárních buněk, díky kterému se primární folikul mění na sekundární, s více vrstvami kubických folikulárních buněk, které se označují jako *membrana granulosa*. Povrch vajíčka pokrývají granulózní buňky, které tvoří *cumulus oophorus*. Pod ním se těsně nad plazmatickou membránou nachází glykoproteinová vrstva *zona pellucida*. Povrch *membrana granulosa* pokrývá *theca folliculi*, která zajišťuje cévní zásobení folikulu (Senbon et al. 2003).

Dalším dělením folikulárních buněk se postupně formuje uvnitř folikulu dutina, do které se z folikulárních buněk secernuje folikulární tekutina. Folikul s touto antrální dutinou se označuje jako terciární - Graafův folikul (Senbon et al. 2003). V antrální dutině je oocyt na vejconosném hrbolku těsně obklopen vrstvou buněk označovaných *corona radiata* (Junqueira et al. 1997).

Antrální folikul obsahuje dva typy granulózních buněk, jejich rozdělení je závislé na vzdálenosti od oocytu, diferenciace probíhá pod vlivem FSH. Prvním typem jsou kumulární buňky, které se nachází blíže k oocytu a spolu s ním vyváří COC (cumulus-oocyte complex), zůstávají s vajíčkem asociovány i po ovulaci. Druhým typem je murální granulóza, ta se nachází blíže k théce. Receptory pro LH, který stimuluje znovuzahájení meiózy a uvolnění COC z folikulu, se nachází pouze na buňkách murální granulózy (Assidi et Sirard 2013, Mehlmann 2013).

Graafův folikul je řízen gonadotropními hormony. Působením FSH se tvoří antrum vyplněné folikulární tekutinou a folikuly se vyvíjí až do preovulační fáze, kde dojde k dominanci jednoho folikulu, ten u některých druhů v tento moment po stimulaci luteinizačním hormonem ovuluje (Schatten et Sun 2011).



Obr. 1. Folikulogeneze (převzato a upraveno podle Araújo et al. 2014)

3.1.4.1 Meiotická kompetence

Jedná se o schopnost znovuzahájit a dokončit meiózu. Oocyty v různých fázích vývoje se mohou v těchto schopnostech lišit. Nejprve dochází k GVBD, oocyt vstupuje do metafáze I, ze které je schopný postoupit do metafáze II (Wassarman 1988).

Pokud oocyt není schopný znovuzahájit meiózu a zůstává v profázi I, označujeme ho jako zcela meioticky nekompetentní. To je spojené s neukončeným růstem oocyty a s nedostačenou koncentrací cyklinu B (Blanco et al., 2011). Meiotická kompetence může být i pouze částečná, oocyt je schopný znovuzahájit meiózu, ale není způsobilý ji dokončit. Za zcela meioticky kompetentní jsou označovány oocyty, které jsou schopné znovuzahájit meiózu a dokončit fázi zrání a dosáhnout stádia metafáze druhého meiotického dělení (Motlík et al. 1984).

Meioticky kompetentní oocyty prasete mají velikost 120 μm , ty jsou schopné znovuzahájit meiózu a dozrát až do metafáze II (Mehlmann 2005).

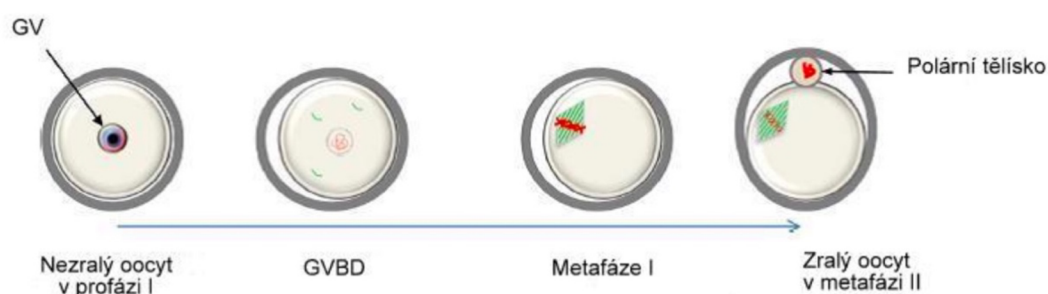
3.1.5 Fáze zrání

Schopnost vstupu a korektního průběhu fáze zrání mají jen oocyty plně dorostlé a meioticky kompetentní. Dokončit tuto fázi u prasete mohou oocyty o velikosti 120 μm (Hunter 2000). Stimulem pro zahájení fáze zrání a znovuzahájení meiózy, je zvýšení koncentrace gonadotropních hormonů, a to především luteinizačního hormonu (LH) (Mehlmann 2013), dále také aktivace MPF a MAPK a dalších regulačních faktorů.

Znovuzahájení meiózy začíná rozpadem zárodečného – GVBD (Mehlmann 2005), současně s ním se v buňce vytváří dělicí vřeténko, na jehož mikrotubuly se chromozomy váží pomocí proteinového komplexu v oblasti centromery – kinetochor, každá ze sesterských chromatid je ale připojena k opačnému pólu dělicího vřeténka. Tato vazba je nezbytná pro správný rozchod chromozomů do dceřiných buněk (Jones et al. 2013).

Po napojení chromozomů na dělicí vřeténko oocyt vstupuje do metafáze, kdy se chromozomy řadí do ekvatoriální roviny a v anafázi se postupně začínají oddalovat (Jones et al. 2013). Současně dochází i k expanzi kumulu díky produkci hyaluronanu do mezibuněčných prostor (Kawashima et al. 2012).

Ve fázi zrání probíhají dva důležité procesy – zrání jádra a zrání cytoplazmy. In vivo probíhají současně, *in vitro* může dojít k porušení synchronizace a buňka ztrácí vývojový potenciál (Opiela et Katska 2004).



Obr. 2. Schématické znázornění zrání oocytů (převzato a upraveno podle Adhikari et Liu 2014)

3.1.5.1 Zrání jádra

Jádro se na začátku této fáze označuje jako zárodečný váček (GV – germinal vesicle), je ohraničeno membránou a obsahuje jadérko obklopené chromatinem. Znovuzahájení meiózy iniciuje rozpad zárodečného váčku (**GVBD** – germinal vesicle breakdown), u prasete k němu dochází po LH peaku (Kurimoto et al 2021).

Důležitou roli v prolomení meiotického bloku hraje MPF (Maturation promoting factor). Ten je složen ze dvou podjednotek – katalytické podjednotky CDK1 a regulační podjednotky cyklinu B1. Jejich spojením vzniká pre-MPF, který je aktivován složitými fosforylačními a defosforylačními procesy. Zvýšená hladina MPF je důležitá pro GVBD – stimuluje rozpad jaderné membrány a kondenzaci chromatinu. Klíčovou roli má i v organizaci organel v cytoplazmě a formování dělicího vřeténka (Katska-Ksiazkiewicz 2006).

Následuje poslední část profáze I – diakineze, kde dojde k terminalizaci homologních chromozomů směrem k jaderné membráně. Anafáze je typická rozchodem chromozomů k opačným pólům oocytu, tím se zredukuje diploidní sada chromozomů na haploidní. Posledním krokem prvního meiotického dělení je telofáze. Buňka vyděluje pólové tělísko s haploidním počtem chromozomů. Vznikají tedy dvě dceřiné buňky – sekundární oocyt a první pólové tělísko (PB1), které je oproti oocytu výrazně menší (Jones et al. 2013, Velhrac et Breuer 2013).

Sekundární oocyt přechází plynule bez interfáze do druhého meiotického dělení, kde se zastavuje v metafázi II a čeká na oplození (Alberts et al. 2006).

3.1.5.2 Zrání cytoplazmy

Spočívá zejména ve změnách cytoskeletárních filament, správné redistribuci organel a hromadění a skladování molekul mRNA, samotných proteinů a transkripčních faktorů, které hrají klíčovou roli v dosažení meiotické kompetence. Tyto látky budou totiž nezbytné během embryonálního vývoje do doby, než bude aktivován embryonální genom (Ferreira et al. 2009).

Hromadění a skladování molekul

Po GVBD až do rané embryogeneze už v oocytu neprobíhá žádná transkripce, proto musí být molekuly mRNA obzvlášť chráněny před degradací. Z tohoto důvodu jsou skladovány ve formě inaktivních deadenylovaných transkriptů spojených s molekulami proteinů (Moor a Dai 2001). Jejich aktivace probíhá různými mechanismy, například polyadenylací, fosforylací nebo defosforylací (Colgan 1996).

Organizace organel

Klíčová je distribuce organel a cytoskeletu (Stojkovic et al, 1999). Mitochondrie jsou v průběhu fáze zárodečného vajíčku umístěny poblíž jádra, během GVBD se postupně rozprostírají po celé buňce a ve druhém meiotickém bloku se přesunují opět poblíž jádra, za jejich distribuci v rámci cytoplazmy jsou odpovědná aktinová a intermediální filamenta (Crozet et al. 1981).

Poblíž transzonálních výběžků kumulárních buněk se tvoří také kortikální granula, která mají původ v Golgiho aparátu. Obsahují mnoho enzymů a proteinů a během zrání migrují do bezprostřední blízkosti plazmatické membrány. Hrají klíčovou roli v prevenci polyspermie během oplození (Moricard et Moricard 1975).

3.1.6 Regulace meiotického zrání

Pro správný průběh meiotického zrání je potřeba velké množství regulačních faktorů, mezi nejvýznamnější patří cykliny a cyklin dependentní kinázy, fosfatázy a další signální molekuly jako je například Ca^{2+} a další. Tyto regulační faktory nepracují samostatně, ale dohromady tvoří složité regulační kaskády, kde je prvním krokem obvykle snížení koncentrace cAMP (cyklický adenosin monofosfát) (Cho et al. 1974).

3.1.6.1 Cyklické nukleotidy

Faktory, které jsou důležité pro regulaci fáze meiotického zrání jsou cGMP (cyklický guanosin monofosfát) a cAMP (cyklický adenosin monofosfát), které se do oocyty dostávají přes gap junction z kumulárních buněk (Masui and Clarke 1979, Sela-Abramovich et al. 2006).

Přeměnou z GTP vzniká pomocí guanylátcyklázy cGMP, který je důležitý při mnoha dějích uvnitř buňky, mimo jiné zvyšuje hladinu cAMP. Přeměnou ATP vzniká cAMP, a to pomocí adenylátcyklázy. Za jejich degradaci je naopak zodpovědná fosfodiesteráza, která katalyzuje přeměnu cAMP na AMP (Masui and Clarke 1979).

Hladina cAMP může být ovlivněna kofeinem, který jejich koncentraci zvyšuje a tím brání GVBD (Křen, 2004). Malé množství cyklických nukleotidů je také spojováno s působením hormonu LH (Mehlmann 2013).

Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)

Cyklický adenosin-3', 5' - monofosfát je produkován granulózními buňkami. Signálem pro syntézu cAMP jsou extracelulární signály, které působí na G-proteiny, tím je aktivována adenylátcykláza, která je odpovědná za tvorbu cAMP (Mehlmann et al. 2002). Vysoká koncentrace cAMP katalyzuje aktivitu PKA (protein kináza A), jejíž aktivita napomáhá k udržení prvního meiotického bloku. Nízká aktivita PKA naopak umožňuje zahájení meiózy (Wassarman 1988).

Hladina cAMP během meiózy kolísá, ke snížení dochází již na přechodu z G2, naopak vysoká koncentrace cAMP umožňuje inhibici GVBD a udržuje tak oocyt v profázi MI (Masui and Clarke 1979).

Před ovulací je přerušena komunikace a transport molekul, včetně cAMP, mezi oocytem a granulózními buňkami, to je způsobeno LH vlnou (vlna luteinizačního hormonu), která navozuje morfologické změny v obalech oocytů a následné přerušení *gap junctions*. Tím dochází k poměrně prudkému poklesu koncentrace cAMP, na který má vliv také aktivita fosfodiesterázy, která je odpovědná za jeho štěpení (Hurk et Zhao 2005).

Cyklický guanosinmonofosfát (cGMP)

Obecně se dá říct, že v zásadě se svojí strukturou a mechanismem působení neliší od cAMP. Jeho aktivita je závislá na enzymu guanylátcykláze, která přeměňuje GTP na cGMP (Hubbard et Terranova 1982, Vaccari et al. 2009).

Jeho hlavní funkcí je pravděpodobně inhibice degradace cAMP fosfodiesterázou a tím zvýšení koncentrace cAMP uvnitř oocytu, které vede k udržení prvního meiotického bloku (Adhikari et Liu 2014).

3.1.6.2 MPF – Maturation promoting factor

MPF (M-phase promoting factor) je proteinový komplex, který reguluje fázi meiotického zrání, kde je nezbytný pro GVBD, klíčový je ale i během průběhu fáze zrání (Kishimoto, 2003, Thibault, 1987). Přesněji se jedná o komplex, který se skládá ze dvou podjednotek (Ito et Kashiwazaki 2012).

- CDK1/p34^{cdc2} – Threonin/serin kináza. Katalytická jednotka komplexu MPF.
- Cyklin B – v buňkách se vyskytují tři typy – B1 (u savců nejčastěji), B2, B3. Jedná se o regulační jednotku tohoto komplexu

(Jones 2004)

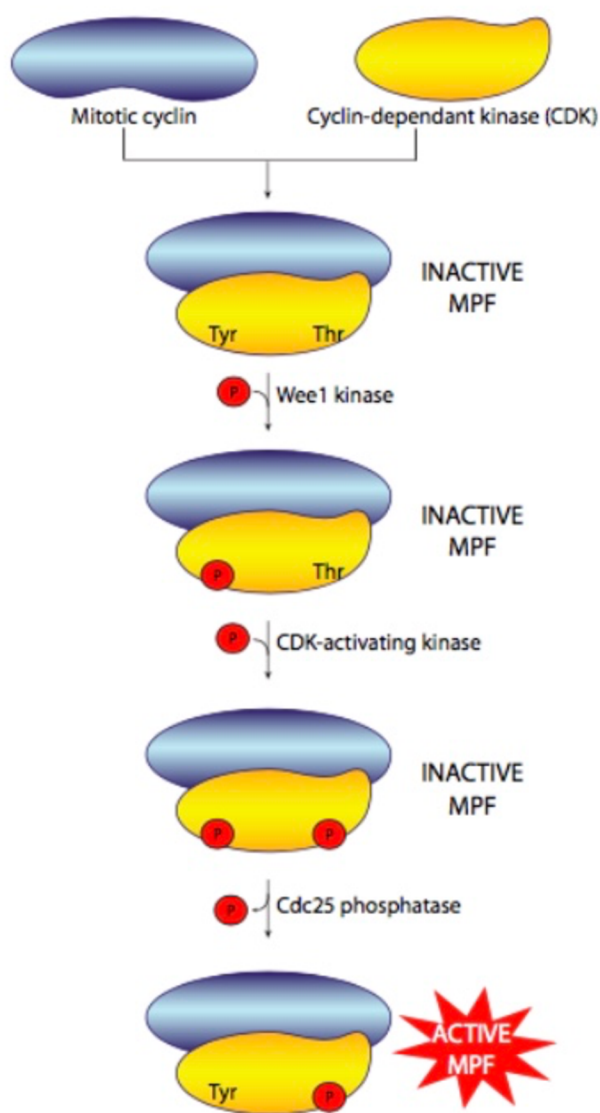
MPF je nezbytný při rozpadu jaderné laminy, což vede k GVBD (Hurk et Zhao 2005). Dále se významně účastní při kondenzaci chromatinu (Jones 2004), nezbytný je i při tvorbě dělicího vřeténka (Peter et al. 1990).

V nezralém oocytu se komplex MPF objevuje ve formě pre-MPF. Tato neaktivní forma je zajištěna fosforylací katalytické podjednotky CDK1 na Thr14 a Tyr15, za kterou jsou odpovědné kinázy Myt1 a Wee1. Za aktivaci MPF je odpovědná fosfatáza Cdc25, ta způsobuje

aktivační defosforylaci Thr14 a Tyr15 (Jones 2004). Aktivace fosfatázy Cdc25 je ovlivněna proteinkinázou A, která způsobuje její inhibiční fosforylaci (Pirino et al. 2009).

Aktivační fosforylace Cdc25 může být způsobena i MPF, tím dochází k masivnímu zvýšení koncentrace MPF pozitivní zpětnou vazbou (Alberts et al. 2005). Další možnost aktivace spočívá v produkci cyklinu B (Sun et Nagai 2003). Vysoká hladina MPF je nezbytná pro vstup do M-fáze buněčného cyklu (Alberts et al. 2005).

CDK1 se ve vajíčku vyskytuje během celého buněčného cyklu, ale její aktivita je ovlivňována regulačními proteiny, které je aktivují na krátkou dobu, poté jsou opět deaktivovány (Alberts 2002). Cyklin B je tvořený v oocyty na konci S-fáze (Murray 2004) při níž se hromadí (Glotzer 1991). Pro přechod do anafáze je nutná degradace cyklinu B, díky tomu dochází k inaktivaci MPF. Před jeho degradací je nutné kovalentní navázání molekul ubiquitinu, tím je cyklin označen k degradaci v proteazomech (Alberts et al. 2005). Polyubiquitinaci zajišťuje APC/C a pro svou funkci vyžaduje přítomnost dalších molekul jako je Cdh1 a Cdc20 (Homer 2013).



Obr. 3. Aktivace MPF (převzato a upraveno podle Wong 2020)

3.1.6.3 MAPK – Mitogenem aktivovaná protein kináza

MAPK (MAP kináza, Mitogen-Activated protein kinase) je dalším faktorem, který je důležitý při regulaci fáze meiotického zrání. Řadí se mezi serin/treonin kinázy. Pro regulaci meiotického zrání jsou v savčích oocytech důležité především její dvě izoformy: ERK1(p44) a ERK2 (p42) (Fan et Sun 2004, Fan et al. 2002).

ERK1 i ERK2 se v neaktivní formě v cytoplazmě oocyty nachází již v průběhu prvního meiotického bloku. Krátce před GVBD se přesouvají do zárodečného váčku (Inoue et al. 1998). Ve stádiu zárodečného váčku (GV) se u prasete vyskytuje pouze malé množství těchto molekul, zvýšení jejich koncentrace a jejich aktivace je doprovázena GVBD (Inoue et al. 1995).

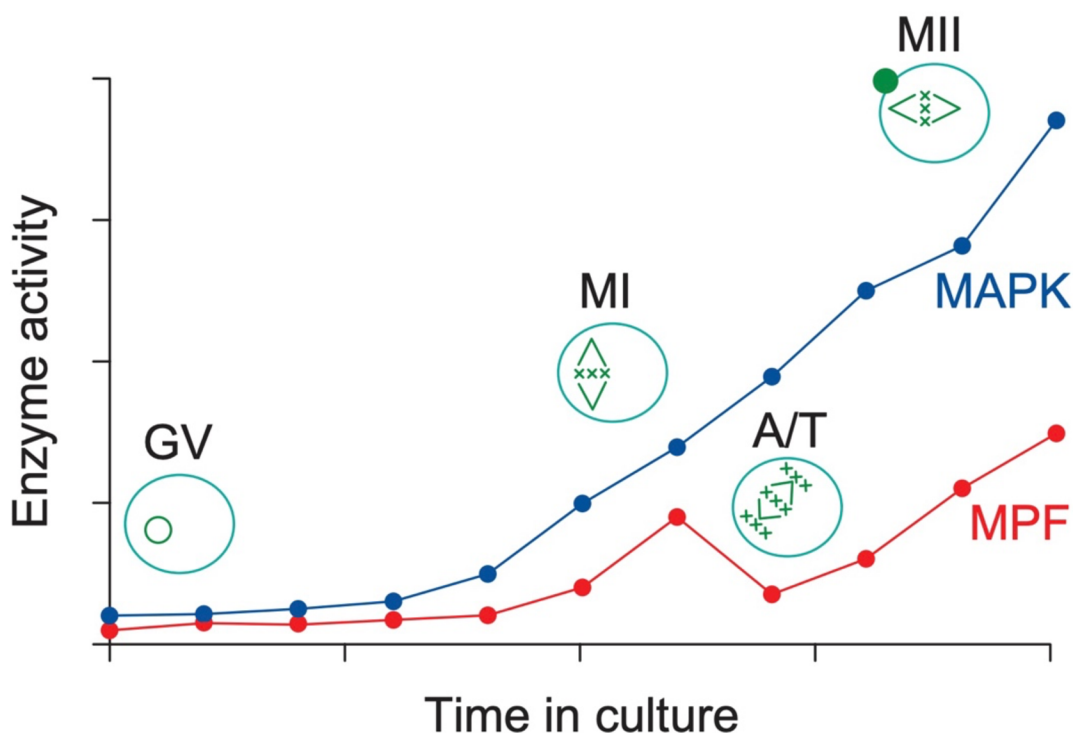
Samotná aktivace MAPK je odpovědí na složité signální kaskády, a to pomocí MEK (MAPKK), která způsobuje fosforylaci tyrosinu 185 a treoninu 183. Aktivita MEK je dále regulována pomocí MOS (MAPKKK), což je také kináza (Kosako, 1994).

MAPK se podílí na fosforylaci proteinů mikrotubulů a tím i vzniku dělicího vřeténka, klíčová je i při zastavení meiózy v metafázi II. Své uplatnění má během přechodu z MI do MII a při druhém meiotickém bloku, účastní se dějů po oplození a při aktivaci vajíčka (Fan et Sun, 2004).

MAPK se účastní a reguluje děje v cytoplazmě, kde ovlivňuje zejména cytoskeletární struktury, ale podílí se i na regulaci procesů v samotném jádře (Hurk et al. 2005). Účastní se znovuzahájení meiózy, a to společně s aktivací MPF. Mechanismus procesu aktivace MPF probíhá pravděpodobně přes p90^{Rsk} (Ribozomální protein kináza), která je součástí MAPK kinázové signální dráhy a zajišťuje inaktivaci Myt1, ta je odpovědná za inhibiční fosforylaci, a její inaktivace tedy umožňuje aktivaci MPF (Palmer et al. 1998, Gross et al. 2000, Fan et al. 2002).

V jádře se dále účastní kondenzace chromozomů. V cytoplazmě je MAPK klíčová při organizaci dělicího vřeténka, kdy fosforyluje MTOC (mikrotubuly organizující centra). Organizace dělicího vřeténka je také klíčová pro přechod do anafáze, kde funguje jako kontrolní bod buněčného cyklu (Fan et al., 2002).

Pro udržení druhého meiotického bloku v metafázi II je nutný CSF (cytostatický faktor), který je složený z MOS, MAPK a p90^{Rsk} (Fan et al, 2002).



Obr. 4. Aktivita MPF a MAPK během kultivace prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách (Převzato a upraveno podle Hunter 2000)

3.1.6.4 Ca^{2+} ionty

Vápníkové ionty slouží buňkám jako signální molekuly a druzí poslové. V cytoplazmě se za normální situace udržuje poměrní nízká hladina těchto molekul, a to pomocí aktivního odčerpávání do extracelulárních prostor nebo jejich přesunem do organel jako jsou mitochondrie nebo endoplazmatické retikulum (Clapham 1995, Alberts et al. 2002), v průběhu buněčné signalizace se vápenaté ionty uvolňují zpět do cytoplazmy z těchto struktur (Wang et Machaty 2013). Do vajíčka se Ca^{2+} dostává pomocí dvou typů speciálních receptorů: IP_3R (inositol-1,4,5-trifosfátový receptor) nebo RyR (ryanodinový receptor) (Petr et al. 2002).

Mechanismus působení vápníkových iontů probíhá nepřímo přes kalmodulin (Alberts et al. 1998). Celá signální dráha začíná extracelulárním signálem, který se váže na receptory spřažené s G-proteiny, ty aktivují fosfolipázu C (PLC), to má za následek tvorbu druhých poslů IP_3 a DAG. IP_3 jsou odpovědné za otevření iontových kanálů a zvýšení intracelulárního vápníku (Alberts et al. 2005, Flores 1998).

Vápenaté ionty se v buňce váží na kalmodulin, který je s navázaným vápníkem schopný aktivace kalmodulin dependentní kinázy II (CaMKII), která patří mezi serin/threonin protein kinázy (Schworer et al. 1988, Fan et al. 2003, Alberts et al. 2005).

Vápenaté ionty jsou nezbytné před i po oplození vajíčka spermií. Podílí se na GVBD i při vydělení pólového tělíska (Fan et al. 2003). Po oplození dochází k jejich uvolnění z endoplazmatického retikula po vniku spermie do vajíčka, to vede ke znovuzahájení meiózy a tvorbě prvojader (Miyazaki et Ito, 2006). Stimulem pro oscilaci Ca^{2+} je fosfolipáza C ζ , která pochází ze spermie (Nomikos et al. 2013). Dále se účastní prevence polyspermie jelikož vzestup koncentrace Ca^{2+} v cytoplazmě po oplození způsobuje vylití kortikálních granul (Kline et al. 1992, Liu 2011).

3.2 *Zona pellucida (ZP)*

Jedná se o extracelulární vrstvu obklopující savčí oocyty, která významně ovlivňuje jednotlivé kroky vedoucí k úspěšnému oplození vajíčka, především vazbu spermie na vajíčko a prevenci polyspermie (Song, 1999), účastní se i raného embryonálního vývoje. Tato vrstva odděluje vajíčko od kumulárních buněk (Moros-Nicolás, 2021).

Skládá se z jednotlivých vrstev glykoproteinů, je elastická a vysoce porézní. Tloušťka se u jednotlivých savčích druhů může lišit, obvykle se pohybuje 1 – 25 μ m, během ovulace může být slabší než během oogeneze (Moros-Nicolás, 2021).

Matrix *zona pellucida* je tvořena glykoproteiny, které obsahují polypeptidový řetězec a oligosacharidy, které jsou druhově specifické. Právě tato druhová specifita hraje významnou roli ve vazbě spermie na vajíčko (Song 1999).

Struktura ZP byla poprvé popsána na myším modelu, kde byla zjištěna přítomnost třech typů ZP glykoproteinů – ZP1, ZP2, ZP3. Pozdější výzkumy prokázaly, že některé savčí druhy mohou mít ZP složenou i ze čtyř různých glykoproteinů. Druhové rozdíly ve složení glykoproteinů se vysvětlují evolucí ZP genových rodin, jejich různou pseudogenizací a duplikacemi (Moros-Nicolás, 2021).

Proteiny obsažené v ZP savců jsou vysoce konzervované, napříč druhy se zde objevuje jen velmi malé množství jejich variant, i tyto různé varianty mezi sebou vykazují vysokou homologii (Sinowatz, 2001).

3.2.1 Význam *zona pellucida*

Jedním z hlavních úkolů ZP je prevence mezidruhového oplození. ZP totiž poskytuje receptory pro spermie a zajišťuje druhově specifickou primární vazbu. Tato vazba následně vyvolává akrozomální reakci spermie, která je nezbytná k penetraci spermie skrz ZP a samotnou fúzi gamet (Wassarman 1999, Flesch et Gadela 2000).

Jakmile dojde k proniknutí spermie do vajíčka, její struktura se mění, což zabraňuje vazbě a proniknutí další spermie (Rankin 2000).

Svůj význam má i během časně embryogeneze, ZP totiž embryo chrání během průchodu reprodukčním traktem až do stádia blastocysty. Bez ZP by docházelo k vazbě na epitel oviduktu a vývoji mimo dělohu, který není slučitelný se životem (Rankin 2000).

3.2.2 Morfologie ZP

U prasete se jedná o přibližně 13 – 16 μm silnou vrstvu složenou z glykoproteinů s velkým množstvím O- a N- glykanů (Sinowatz, 2001). Tyto glykoproteiny se nazývají ZP2, ZP3 a ZP4 (Tůmová 2021).

Jsou uspořádány do typické fibrogranulární struktury pomocí nekovalentních interakcí. (Sinowatz 2001). Glykoproteiny tvoří jemná vlákna, která se vzájemně proplétají a na povrchu tvoří strukturu síťoviny (Gupta et al. 2012). Tato dlouhá vlákna jsou u prasete tvořena glykoproteiny ZP3 a ZP4, které se v jejich struktuře pravidelně střídají a tvoří až 80 % všech glykoproteinů prasete, ZP2 slouží jako crosslinker, který jednotlivá vlákna vzájemně propojuje. (Vildová et al. 2014). ZP1 je v prasečím modelu pouze jako pseudogen a neexprimuje se (Tůmová 2021).

Na povrchu *zony pellucidy* jsou patrné výrazné póry, které se směrem dovnitř zužují, ty jsou pravděpodobně významné pro afinitu a pronikání spermií (Gupta et al. 2012).

Pod optickým mikroskopem se na ZP dají odlišit různé oblasti, které s pravděpodobně liší jejich různou afinitou ke spermiím. Dále se pomocí polarizačního mikroskopu dají rozeznat i různé vrstvy – například ZP králíka nebo skotu je složena ze tří vrstev, bylo prokázáno, že vnější vrstvy vykazují vyšší poréznost, než ty nacházející se blíže k oocytu (Moros-Nicolas 2021). Přítomnost pórů je klíčová při penetraci různých molekul, bylo dokázáno, že relativně velké molekuly jako jsou imunoglobuliny prostupují skrz ZP bez významnějších problémů, zatímco menší molekuly jako je heparin skrz póry procházet nemůžou. Z toho vyplývá, že schopnost penetrovat ZP není primárně závislá na velikosti ale na biochemických vlastnostech, zejména na náboji (Sinowatz 2001).

Samotná architektura *zony pellucidy* se mění během meiotického zrání a oplození – nezralé oocyty jsou charakteristické strukturou sítě, kde jsou jednotlivá vlákna daleko od sebe, povrch je pokryt hlubokými póry. Jakmile oocyt dozrává, síť glykoproteinů začíná být hustší a póry nejsou tak hluboké. *Zona pellucida* oplozeného vajíčka je tvořena hustou sítí hustě uspořádaných glykoproteinových vláken, póry nejsou přítomné téměř vůbec, tento fakt je pravděpodobně způsoben splynutím jednotlivých vrstev ZP (Sinowatz 2001).

3.2.3 Rozdělení ZP genů

Goudet (2008) uvedl, že ZP geny se dělí do šesti podrodin – ZP1, ZP2, ZP3, ZP4, ZPX, ZPD. Fylogeneticky se ZP1, ZP2, ZP4, ZPAX a ZPD řadí do jedné skupiny, další skupinu tvoří geny ze ZP3 podrodiny.

Většina savců, vykazuje přítomnost ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4 genových podrodin. Některé druhy dokonce pouze tři z nich (absence ZP1 nebo ZP4). Obojživelníci jsou typičtí přítomností ZPAX a ZPD, z toho se dá odvodit, že tyto dvě genové podrodiny jsou fylogeneticky starší. V genové podrodině ZP3 byly objeveny tři různé duplikované geny – ZP3-a, ZP3-b a ZP3-c (Moros-Nicolás 2021).

Ve studii z roku 2018 (Feng 2018) byly geny tvořící ZP rozděleny do minimálně osmi podrodin:

- ZP1/4
- ZP2
- ZPAX
- ZPY
- ZPD
- ZP3-1 – sem patří dříve objevené geny ZP3-a, ZP3-b a ZP3-c
- ZP3-2
- ZP3-3

U prasete jsou popisovány celkem 3 proteiny kódované 3 různými geny, a to (Tůmová 2021):

- ZP2/ZPA
- ZP3/ZPC
- ZP4/ZPB

3.2.3.1 ZP2

Jeho nezralou formu tvoří polypeptidový řetězec složený z 716 aminokyselin (AA). Pro vznik zralého proteinu je nutné odštěpit signální peptid (1-35 AA) z N-konce a propeptid 77 AA (639-716 AA) z C- konce. Zralý protein je tvořen 603 AA a bez navázaných cukerných zbytků je velký přibližně 80kDa (Uniprot 2014).

ZP2 je nezbytný pro sekundární vazbu spermie, kdy váže spermie po akrozomální reakci (Gupta 2012). Během kortikální reakce je štěpen na dva fragmenty, tím brání polyspermiu oplození. Štěpení jeho N-terminální oblasti je spojováno s blokem polyspermie. K tomu dochází po oplození oocyty vylitím metaloendopeptidázy ASLT z kortikálních granul. Vzniká tak N-terminální peptid a C-terminální peptidy, které jsou vzájemně spojeny disulfidovým můstkem (Uniprot 2014).

3.2.3.2 ZP3

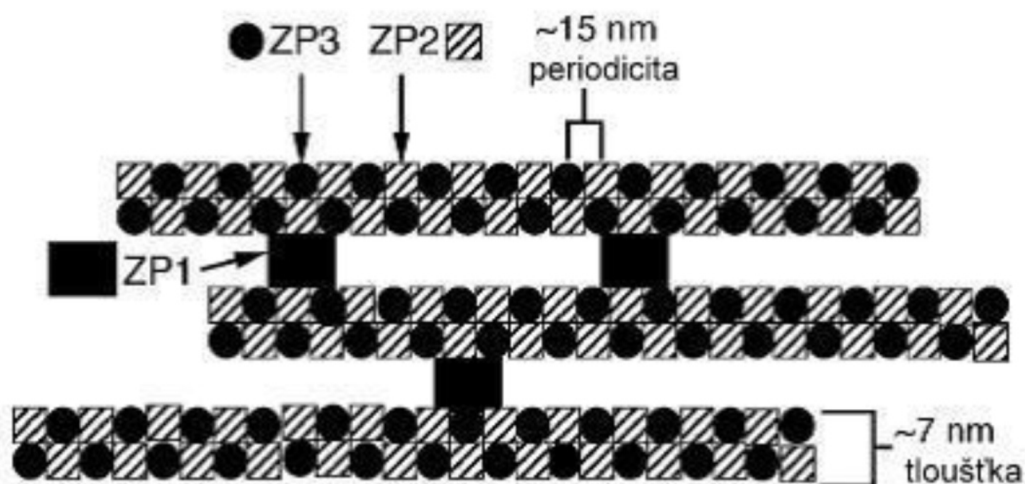
Jedná se o pravděpodobný primární receptor pro spermie, ačkoli u prasete se zdá, že jeho vazebná aktivita pro spermie je zesílená komplexem ZP3 a ZP4. Molekulární velikost je 46 kDa (Gupta 2012).

Jeho nezralá forma je tvořena 421 AA, zralá forma po odštěpení signálního peptidu (1-22 AA) a propeptidu (333-421 AA) obsahuje 310 AA. (Kanai 2008, Vildová 2014).

3.2.3.3 ZP4

ZP4 se účastní primární vazby spermie společně se ZP3, tím, že zesiluje jeho vazebnou aktivitu (Velasquez 2007).

Jeho velikost je 60 kDa a zralá forma je složena ze 441 AA. Vzniká z nezralé formy, která obsahuje 636 AA, a to odštěpením signálního peptidu (1-18 AA) a propeptidu (463-540 AA) (Uniprot 2014).



Obr. 5. Organizace ZP myši (převzato a upraveno podle Wassarman 2005)

3.2.4 Biosyntéza zony pellucidy

Extracelulární matrix ZP je tvořena během růstové fáze oogeneze (Moros-Nicolás 2021). Její syntéza je zajištěna oocytem i okolními granulózními buňkami a celý proces trvá pouze 2 – 3 týdny (Wassarman 2005). Její tvorba se využívá jako marker folikulárního růstu (Moros-Nicolás 2021).

Buněčný původ ZP proteinů může být u savců různý. U myši, křečka a potkana je jejich syntéza zajišťována výhradně oocytem, proto se u těchto druhů jedná o relativně tenkou vrstvu. U většiny savčích druhů, včetně prasete, je ale jejich syntéza zajištěna oocytem společně s granulózními buňkami. U většiny savců převládá exprese ZP3, který je nejvíce exprimovaným genem. Nejméně exprimovaným genem je naopak ZP1 (Moros-Nicolás 2021).

Formování savčí ZP začíná v moment, kdy oocyt vstoupí do fáze růstu a začne zvětšovat svůj objem a dochází k syntéze a redistribuci nových organel. Proteiny ZP od fáze růstu prochází také posttranslačními modifikacemi, zejména glykosylacemi, sulfatacemi a sializacemi. Syntéza různých ZP proteinů je lokalizována v různých oblastech cytoplazmy, proto musí být celý proces včetně posttranslačních modifikací vysoce regulovaný a koordinovaný ve všech částech matrix (Moros-Nicolás 2021).

Proteiny tvořící ZP musí být tedy dále zpracovány, a kromě glykosylace je také nutné upravit jejich primární strukturu na obou koncích. V N-terminální oblasti se odštěpuje signální peptid. Dále musí být odštěpena C-terminální oblast s transmembránovou doménou a cytoplazmatickým koncem pomocí endoproteinázy (Moros-Nicolás 2021).

Regulace tvorby ZP je nutná zejména k tomu, aby docházelo ke správnému skládání proteinů a jako prevence předčasné polymerace. Bylo zjištěno, že proteiny se ZP doménou mohou být směřovány do různých subapikálních oblastí plazmatické membrány, to svědčí o nutnosti vysoce regulované distribuce do různých membránových subdomén (Moros-Nicolás 2021).

Glykoproteiny ZP jsou tvořeny v endoplazmatickém retikulu, odsud jsou transportovány do Golgiho aparátu a baleny do sekrečních vezikul, které přechází k olemě a fúzí s ní. Tím je obsah sekrečních vezikul vypuštěn do extracelulárních prostor, kde jsou nové glykoproteiny zabudovávány do vnitřního povrchu ZP (Wassarman et al. 2005).

Proteiny musí být během přenosu do plazmatické membrány zpracované a v inaktivovaném stavu, toho je docíleno interakcí dvou hydrofobních prvků IHP a EHP, které zabraňují jejich intracelulární polymeraci (Moros-Nicolás 2021).

3.2.5 Glykosylace ZP glykoproteinů

Právě sacharidové struktury hrají zásadní roli ve vzájemné interakci gamet a jsou odpovědné za druhově specifickou vazbu spermie na vajíčko (Pastor 2008).

Byla zjištěna druhově závislá diference v expresi a distribuci sacharidových zbytků glykoproteinů ZP, a také i jednotlivé vrstvy ZP jsou specifické odlišným zastoupením sacharidových zbytků (Shalgi et al. 1991).

Samotné glykoproteiny lze pomocí elektroforézy rozdělit na glykoproteiny o molekulové hmotnosti: 55 kDa a 90kDa (Hendrick a Wardrip, 1986). Glykoproteiny o molekulové hmotnosti 55 kDa tvoří až 80 % obsahu bílkovin v prasečí ZP a tvoří je proteiny ze skupiny ZPB a ZPC (Sinowatz 2001).

Podle zjištěné sekvence ZP bílkovin (ZPB a ZPC) bylo zjištěno, že každá z nich poskytuje až pět možných N-glykosylačních míst, ve skutečnosti na ně ale bývají navázány tři až čtyři N-vázané oligosacharidy. Zároveň ZPB umožňuje vazbu až tří O-vázaných glykanů, ZPC potom až šesti takto vázaných cukerných řetězců (Yurewicz et al. 1992).

Významná heterogenní glykosylace polypeptidových řetězců může být zprostředkována vazbou na asparagin (N- vázané oligosacharidy) nebo na serin/threonin (O- vázané oligosacharidy) (Wassarman et al. 1998).

Přítomné oligosacharidy mohou být tedy O- i N- vázané. Po odštěpení N-vázaných glykanů pomocí endo-beta-N-acetyl-D-glukosaminu z glykoproteinu ZP3 myši *zony pellucidy* bylo zjištěno, že schopnost vazby a vyvolání akrozomální reakce spermie zůstala zachována. Naopak odštěpením O-vázaných glykanů byla tato schopnost narušena. Bylo také zjištěno, že tyto důležité O-vázané glykany jsou dále terminálně sialovány – na jejich konec byla navázána kyselina sialová (Gupta et al. 2012).

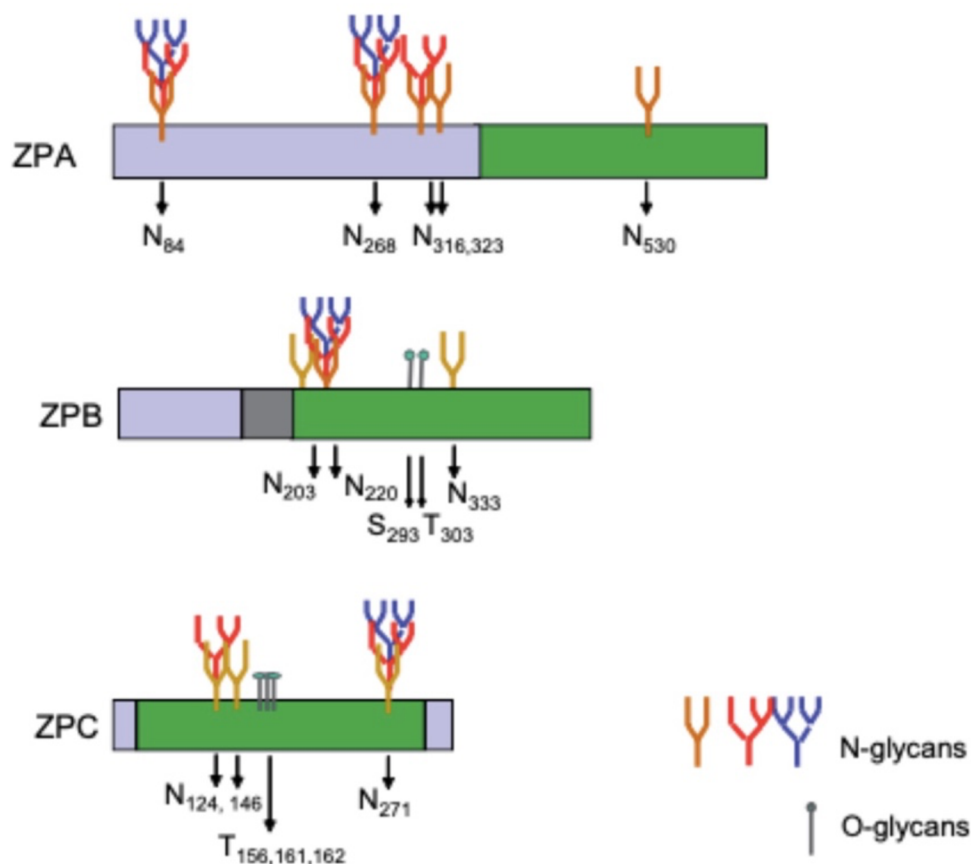
N-vázané oligosacharidy se dělí na neutrální (28 %) a kyselé (72 %) (Noguchi et al. 1992). Do neutrální frakce bylo zařazeno více než 30 N-vázaných oligosacharidů. Kyselé N-vázané oligosacharidy se vyskytují ve formě di-, tri-, nebo tetraantenárních struktur a ve většině případů bývají sulfátovány nebo sialovány. Sializace probíhá zejména na biantenárním nebo -4,2 rozvětveném triantenárním kyselém řetězci. Sialovány jsou také kratší řetězce s pouze jednou N-acetyllaktosaminovou jednotkou, případně ty, které ji postrádají úplně. Sulfátové skupiny jsou pak vázány výhradně na 1,6-N-acetylglukosaminové zbytky. Právě množství sulfátových repetit a stupeň sializace přispívají k vysoké heterogenitě sacharidových struktur ZP (Sinowatz 2001).

ZP podléhá během vývoje oocyty četným změnám, to se týká i jejích oligosacharidů. Po ovulaci dochází ke změně vlastností ZP zejména adicí glykoproteinů oviduktálního původu případně působením glykosidáz v oviduktu přítomných (Moros-Nicolás 2020).

3.2.5.1 Glykosylace ZP prasat

Sacharidové struktury jsou i u prasat pravděpodobně zodpovědné za druhově specifickou vazbu gamet. Bylo zjištěno, že spermie prasat s neporušeným akrozomem vykazují nejvyšší afinitu k β -Gal a α -Man zbytkům. Přesněji před akrozomovou reakcí (AR) můžeme pozorovat vyšší afinitu k β -Gal, ta se ale po AR zvyšuje pro α -Man. Vazba akrozom intaktních spermií, ale u spermií po AR se snižuje po trypsinizaci, a to vzhledem k tomu, že látky, které se váží na sacharidy ZP jsou proteinové povahy (Takahashi 2013).

U prasat se jako receptor pro spermie jeví zejména terminální β -Gal zbytky v tri nebo tetraantenárních řetězcích glykoproteinů ZP. Zároveň se ukázalo, že roli hrají také O-vázané oligosacharidy a sialové kyseliny na N- nebo O- vázaných řetězcích (Takahashi 2013).



Obr. 6. Znárodnění glykosylačních míst *zona pellucida* prasete (Převzato a upraveno podle Topfer-Petersen et al. 2008)

3.2.5.2 Kyselina sialová

Samčí i samičí gamety jsou pokryty glykoproteinovými vrstvami, u spermií můžeme pozorovat glykokalyx, u oocytů potom *zonu pellucidu*. Glykokonjugáty obou struktur jsou velmi významné a u savců jsou zakončeny krátkými a negativně nabitými monosacharidy, které nazýváme sialové kyseliny (Sia). Toto koncové postavení jim umožňuje interakci s okolním prostředím, ale i okolními buňkami. (Fernandez-Fuertes 2018). U prasete bylo pozorováno, že až 75 % všech N-glykanů může být sialováno, na jejich konec je navázána kyselina sialová a zvyšují tak kyselou povahu glykoproteinů ZP (Rath et al. 2005).

Sialové kyseliny (Sia) jsou látky ze skupiny kyselých devítiuhlíkatých monosacharidů, které se často nachází na povrchu buněk vázané na neredukující konce glykokonjugátů. Můžeme rozpoznávat její dva izomery - d3-X-Gal- α -2,3-Neu5Gc a d3-X-Gal- α (Cai 2019).

Kyseliny sialové jsou velmi důležité při různých dějích, zejména při rozpoznání buněk, adhezi buněk navzájem, při přenosu signálů zprostředkovaných receptory na povrchu buněk. Tato funkce se odvíjí zejména od typu buňky, na kterém se Sia nachází (Fernandez-Fuertes 2018, Cai 2019).

Bylo prokázáno, že primární vazba spermií na ZP je pravděpodobně možná právě díky Sia u člověka a krávy, kde se receptor na spermiích váže právě na α -2,3-vázanou Sia. Pro tuto vazbu je nezbytné odstranění určitého množství Sia z povrchu spermií, u kterých až 80% zůstává po kapacitaci intaktních. Ztráta Sia z povrchu spermií je pravděpodobně zajištěna sialidázami z oocyty a samičího reprodukčního traktu (Fernandez-Fuertes 2018)

Tvrzení o vlivu Sia během fertilizace bylo prokázáno studiemi (Fernandez-Fuertes 2018), které tvrdí, že ztráta Sia na spermiích i oocyty snížila množství polyspermií oplození. Zároveň studie (Velásquez 2007) prokázala, že se odstraněním Sia z vajíčka výrazně snížila oplození schopnost (Fernandez-Fuertes 2018).

Kyselina sialová se pravděpodobně účastní také prevence polyspermií, a to pomocí neuraminidázy z kortikálních granul, která odstraňuje Sia z povrchu vajíčka (Velásquez 2007).

3.2.6 Vazba spermií na *zona pellucida*

Vazba spermií na *zona pellucida* je vysoce druhově specifická a zabraňuje tak mezidruhovému oplození. Za tyto vlastnosti ZP jsou odpovědné receptory pro spermiích na jejím povrchu. Důkazem druhově specifické vazby mezi oocytem a spermií jsou pokusy, kdy došlo k odstranění ZP z vajíčka pomocí proteináz nebo roztoků s nízkým pH. Spermií bez její přítomnosti volně fúzí s vajíčkem a druhová specifita nezůstává zachována (Wassarman 2005). Klíčová je kapacitace spermií, která u spermií vede změnám, které jim dávají schopnost se plně vázat na glykoproteiny ZP (Khalil et al. 2006).

Interakce mezi spermií a ZP probíhá ve třech fázích: primární vazba, která indukuje akrozomální reakci, následuje sekundární vazba a konečná penetrace spermií skrz *zona pellucida* do perivitellinního prostoru. U myši jsou receptorem pro primární vazbu oligosacharidy na ZP3, tato vazba je relativně slabá a málo druhově specifická, následuje jí přibližně po deseti minutách mnohem silnější sekundární vazba, která již vyžaduje druhovou specifitu, jako receptor zde slouží ZP2, s nímž interaguje proakrozín/akrozín na spermiích (Howes 2001, Redgrove 2012).

U prasečího modelu bylo zjištěno, že samotný ZP3 glykoprotein není schopný indukovat AR, toho je schopný jen heterokomplex složený právě ze ZP3 ve vazbě se ZP4. Stejně jako u myši se zde ZP2 chová jako sekundární receptor pro spermiích po AR (Gupta 2012).

Novější studie předpokládají, že vazba spermií na ZP je vysoce druhově specifická, míra specifity pravděpodobně nemusí být tak výrazná. Bylo zjištěno, že spermií lidí se mohou vázat na ZP samic gibbona, ale i prasete, ale ne na ZP samic nižších primátů, králíka, morčete apod. Mezidruhová interakce gamet může probíhat i mezi spermií prasat a oocyty skotu. Tyto studie ovšem nebyly zaměřeny právě na sacharidové struktury, při IVF (oplození *in vitro*) je tato druhová specifita zachována (Takahashi 2013).

3.3 Lektiny

Lektiny jsou látky proteinového charakteru, které váží sacharidové struktury na povrchu buněk. Mají neimunitní původ a díky svým vlastnostem jsou používány pro detekci glykokonjugátů. Inkubace oocytů s lektiny blokuje vazbu spermií na ZP (Song 1999).

Odlišují se velikostí, uspořádáním, trojrozměrnou strukturou, ale i počtem podjednotek (Goldstein 1980). Důležitá je zejména doména, která váže sacharidy (CRD) a umožňuje tak jejich specifickou vazbu (Sharon 2009). Tato doména je vysoce konzervovaná a na sacharidové struktury se váže zejména vodíkovými můstky, iontovými vazbami, Van der Waalsovými silami a hydrofobními interakcemi (Weis 1996, Ghazarian 2011). Na jedné molekule lektinu se může nacházet dvě a více vazebných míst pro sacharidové jednotky (Ghazarian et al. 2011).

Vazba mezi jednoduchými i komplexními sacharidy a lektiny je reverzibilní a je nekovalentního charakteru (Cavada 2019), obvykle také vyžaduje přítomnost Ca^{2+} a Mn^{2+} (Sharon et Lis 1990).

Lektiny můžeme rozdělit na několik druhů podle toho, z jakého organismu pocházejí, můžeme tedy klasifikovat lektiny virové, bakteriální, rostlinné a živočišné. Zde se účastní regulace širokého spektra biologických procesů, jako je obranyschopnost, vývoj buněk, migrace, fagocytóza, endocytóza nebo aglutinace erytrocytů (Sharon et Lis 1990, Mishra et al. 2019).

3.3.1 Lektinová cytochemická analýza

Lektinovou cytochemickou analýzu používáme pro studium sacharidových struktur na povrchu buněk, díky ní je možné mapovat změny a přesné umístění a množství glykokonjugátů (Brooks 1997, Brooks 2017).

Zona pellucida je tvořena až z 20–30 % sacharidy, a všechny výše zmíněné proteiny ZP obsahují určité množství postranních sacharidových řetězců. Lektiny se v tomto případě využívají jako sondy, které se na sacharidové řetězce váží a umožňují studovat jejich složení (Shimitzu et Dean 1982).

Díky kombinaci s imunohistochemií a fluorescenčním barvením lze získat charakterizaci a přesnou distribuci glykanů v různých typech buněk, včetně oocytů. Během celého procesu musí být vzorek chráněn před přímým světlem a obarvené tkáně by měly být zobrazeny do 4 dnů, aby zůstala zachovaná specifická vazba (Rabelo 2021).

Pomocí lektinů je možné analyzovat pouze terminální zbytky glykoproteinů a glykolipidů (Varki et al. 2009) a nelze tedy charakterizovat celou strukturu oligosacharidového řetězce. Některé lektiny mají širokou vazebnou specifitu, jejich využití je tedy značně omezeno (Rabelo 2021).

3.3.1.1 Lektin SNA (*Sambucus nigra agglutinin*)

Sambucus nigra lectin byl izolovaný z kůry černého bezu a váže se především na sialovou kyselinu navázanou na galaktózu vazbou α -2. Skládá se ze dvou řetězců, které jsou

k sobě vázány disulfidovými můstky. Jeho struktura je bohatá na aminokyseliny asparagin/asparagová kyselina a glutamin/glutamová kyselina (Broekaert 1984).

3.3.1.2 Lektin WGA (*Wheat germ agglutinin*)

Wheat germ agglutinin byl izolovaný z obilných klíčků. Skládá se ze dvou identických podjednotek a jeho molekulární hmotnost je 36 kDa. Specificky se váže na N-acetylglukosaminové zbytky a sialové kyseliny glykoproteinů na povrchu buněk (Hage et Cazes 2005).

Lektin	Původ	Specifita
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	Neu5Aca2,6-Gal/GalNAc
WGA	<i>Wheat germ</i>	β -D-GlcNAc/Neu5Ac

Tabulka 1. Původ a specifita lektinů (Převzato a upraveno podle Pastor 2008, Takahashi 2013)

4 Metodika

4.1 Odběr vaječníků

Na jatkách byly odebrány vaječnický z od poražených prasniček. Odebrané vaječnický byly převáženy do laboratoře ve vyhřáté termolahvi (38°C) ve fyziologickém roztoku (0,9 % chlorid sodný).

4.2 Získ oocytů

Meioticky kompetentní oocyty pochází z folikulů o průměru 2-5 mm. Z nich aspirací pomocí 20 ml stříkačky s 20 G jehlou byly získávány oocyty o velikosti 120 μm. Pro následné experimenty byly vybírány pouze oocyty s nepoškozenou cytoplazmou a kompaktním obalem kumulárních buněk. Manipulace s oocyty probíhala v modifikovaném médiu M199, s přidavkem laktátu vápenatého (0,06 mg/ml), gentamicinu (0,0025 mg/ml), pyruvátu sodného (0,25 mg/ml), HEPES (1,5 mg/ml) a 10% bovinního fetálního séra (BFS).

4.3 Kultivace oocytů

Oocyty byly třikrát promyty v médiu M199 a přeneseny tenkostěnnou kapilárou do čtyř-důlkových misek s 1 ml modifikovaného média M199 obohaceného o 0,03 ml gonadotropinů (P. G. 600). Kultivace probíhala při 39 °C a 5 % CO₂. Pro získání oocytů ve stádiu GV oocyty kultivovány nebyly. Do fáze MI byly oocyty kultivovány 24h, do stádia metafáze druhého meiotického dělení potom kultivace probíhala 46h.

4.4 Imunofluorescenční značení kyseliny sialové pomocí lektinů

Pro tento pokus byly použity lektiny SNA a WGA, které mají oba vazebnou specifitu pro sialovou kyselinu. Po ukončení doby kultivace byly oocyty pomocí tenkostěnné kapiláry zbaveny kumulárních buněk a fixovány v 3,7% paraformaldehydu (40 minut). Poté byly oocyty několikrát promyty v 0,5% BSA/PBS. Následovala inkubace s příslušným lektinem (ředění 1:50) po dobu 30 minut. Poté byly oocyty opět třikrát promyty v 0,5% BSA/PBS. Po proplachu byly oocyty inkubovány 15 minut v Ultra Avidin – Fluorescein ve tmě a následně 5x promyty v 0,5 % BSA/PBS. Oocyty byly montovány do roztoku Vectashieldu s DAPI na podložní sklíčko. Negativní kontrola byla inkubována pouze se sekundární protilátkou (Ultra Avidin – Fluorescein).

4.5 Vyhodnocení

Obarvené oocyty byly snímány konfokálním mikroskopem (Zeiss LSM 800) se zvětšením 400x a vlnovou délkou laseru 488 nm.

Intenzita a denzita fluorescence v oblasti *zona pellucida* byla analyzována v programu NIS Elements 2003. Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny pomocí statistické metody ANOVA v programu STATISTICA.

5 Výsledky

5.1 Imunofluorescenční detekce sialové kyseliny pomocí specifických lektinů

Z každé skupiny oocytů – GV, MI a MII bylo hodnoceno 20 oocytů. Byla hodnocena relativní intenzita signálu navázaných biotinem značených lektinů. Výsledky byly analyzovány pomocí statistické metody jednofaktorová ANOVA. Hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

Fáze meiotického zrání	GV	MI	MII
n	20	20	20

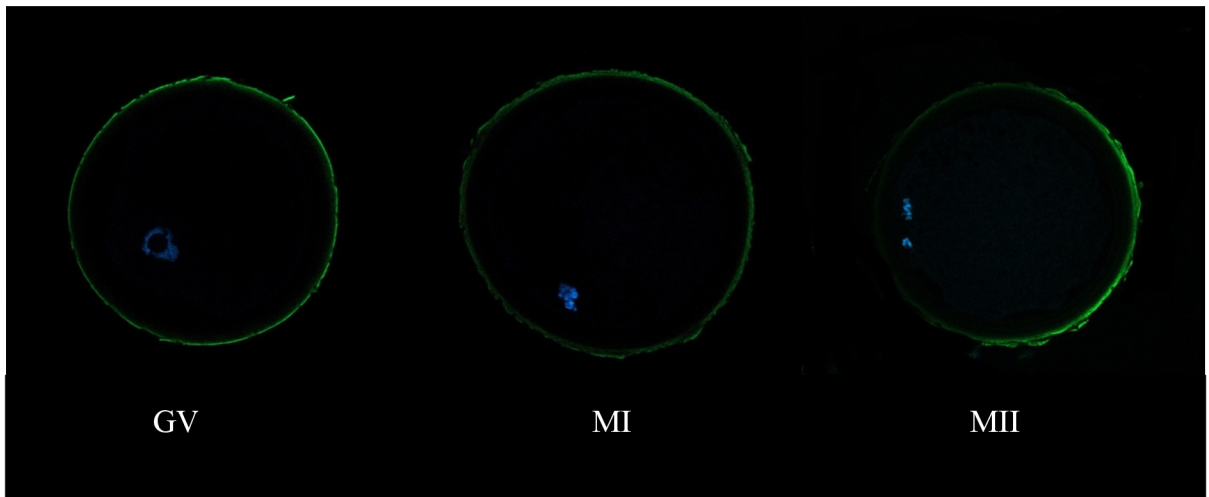
Tabulka 2. Znázornění počtu hodnocených oocytů. GV = oocyty ve fázi zárodečného vajíčku, MI = oocyty ve fázi MI, MII = oocyty ve fázi MII, n = počet oocytů.

5.1.1 Detekce sialové kyseliny pomocí lektinu SNA

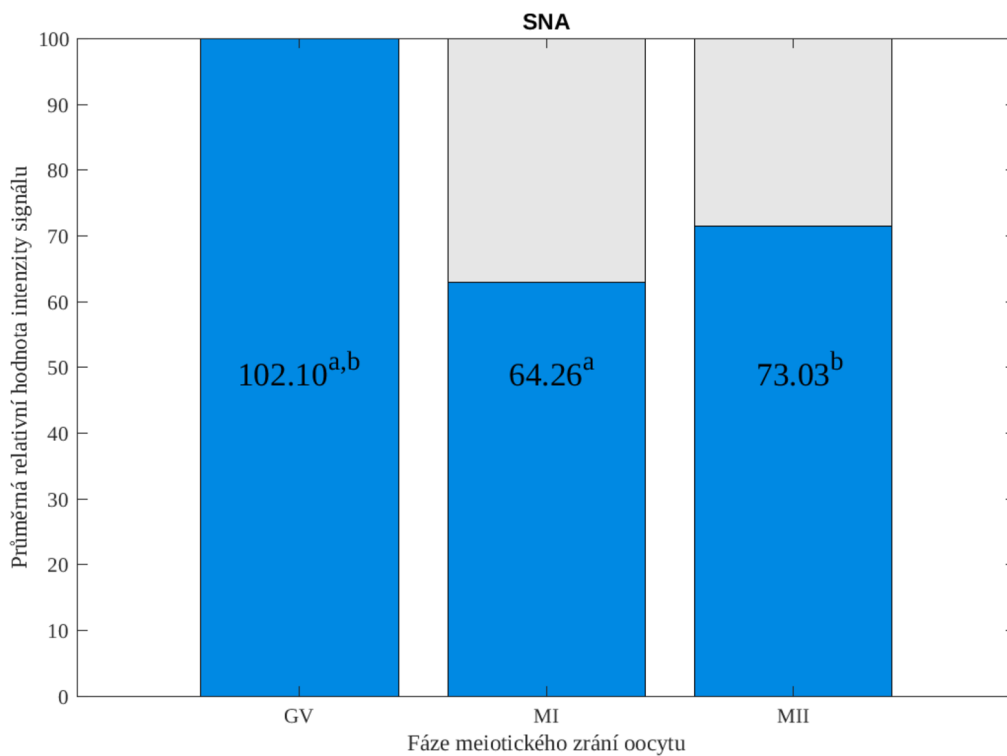
Přítomnost sialové kyseliny byla detekována pomocí vazby s biotinem značeným lektinem SNA. Ve všech sledovaných skupinách kultivovaných oocytů, tedy GV, MI a MII, byl pomocí konfokálního mikroskopu v oblasti *zona pellucida* zaznamenán fluorescenční signál. Relativní intenzita tohoto signálu byla hodnocena pomocí počítačového programu NIS Elements.

	GV	MI	MII
SNA	102,10	64,26	73,03
Směrodatná odchylka	±16,58	±15,01	±23,17

Tabulka 3. Průměrné relativní intenzity lektinu SNA



Obr. 7. Lokalizace sialové kyseliny na povrchu *zona pellucida* pomocí navázaného značeného lektinu SNA. Oocyty byly snímány přibližně ve středové rovině pod zvětšením 400x. Zeleně je označen lektin SNA (FITC), modře je znázorněn chromatin (DAPI).



Graf 1. Průměrná relativní intenzita lektinu SNA. Statisticky významný rozdíl mezi GV a MI je znázorněn rozdílnými superskripty.

Nejvyšší relativní intenzita signálu lektinu SNA byla zaznamenána u oocytů ve stádiu GV, kdy průměrná naměřená hodnota byla 102,1, poté došlo k signifikantnímu poklesu relativní intenzity signálu lektinu SNA u oocytů ve stádiu MI na průměrnou hodnotu 64,26.

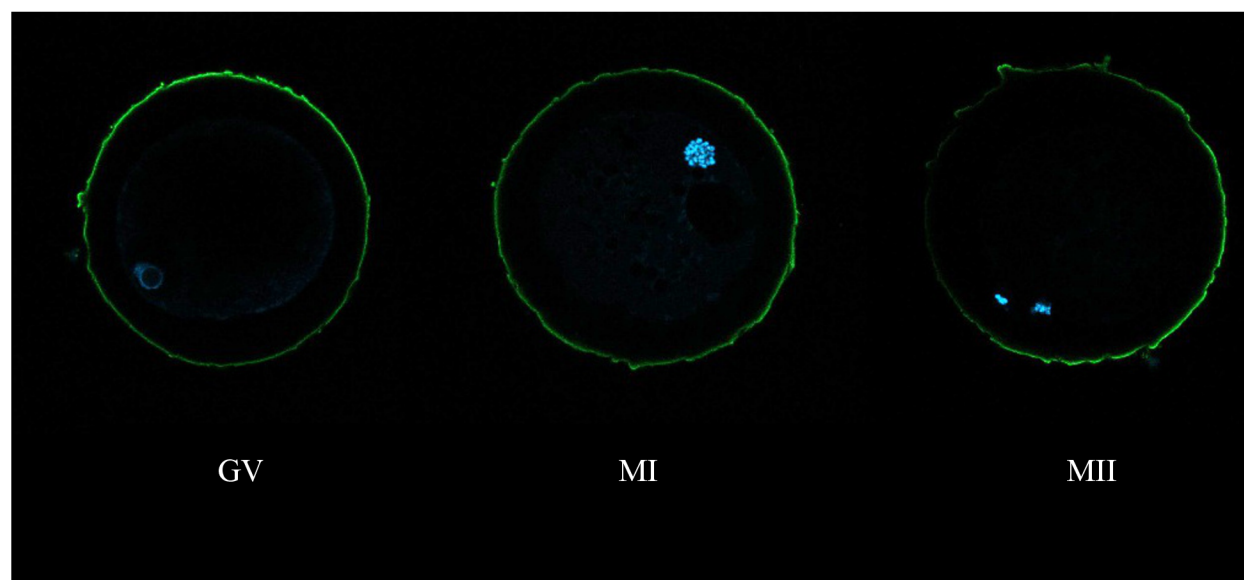
Mezi oocyty ve stádiu MI a oocyty ve stádiu MII, nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl. Tyto výsledky jsou znázorněny v grafu 1.

5.1.2 Detekce sialové kyseliny pomocí lektinu WGA

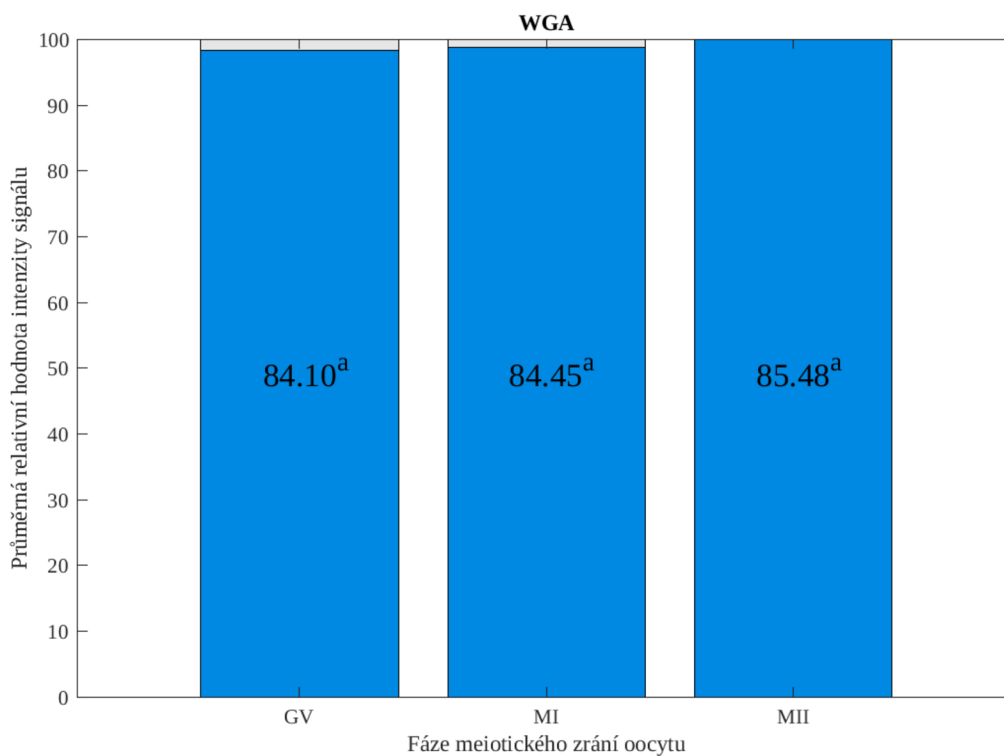
Pomocí biotinem značeného lektinu WGA byla opět přítomnost sialové kyseliny prokázána v oblasti *zona pellucida* u oocytů ve všech fázích meiotického zrání tedy GV, MI a MII.

	GV	MI	MII
WGA	84,10	84,45	85,48
Směrodatná odchylka	±13,38	±23,70	±11,90

Tabulka 4. Průměrné relativní intenzity značeného lektinu WGA



Obr. 8. Lokalizace sialové kyseliny na povrchu *zona pellucida* pomocí navázaného značeného lektinu WGA. Oocyty byly snímány přibližně ve středové rovině pod zvětšením 400x. Zeleně je označen lektin SNA (FITC), modře je znázorněn chromatin (DAPI).



Graf 2. Průměrná relativní intenzita signálu lektinu WGA. Statisticky významné rozdíly zde nebyly pozorovány.

U oocytů v jednotlivých fázích meiotického zrání byly detekovány podobné relativní intenzity signálu navázaného lektinu WGA a rozdíly mezi těmito intenzitami nebyly statisticky významné. Ve stádiu GV byla zaznamenána průměrná intenzita fluorescence 84,10, velmi mírně se zvýšila na průměrné hodnoty 84,45 ve stádiu MI, následně ve stádiu MII opět průměrná relativní intenzita stoupla na 85,48. Výsledky jsou znázorněny v grafu 2.

6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo potvrdit hypotézu, že během meiotického zrání prasečích oocytů dochází k redistribuci sialové kyseliny na povrchu glykoproteinů *zona pellucida*. *Zona pellucida* prasečích oocytů je složena ze tří glykoproteinů – ZP2, ZP3 a ZP4, které mohou být během meiotického zrání glykosylovány, sulfatovány a sializovány. Přesný mechanismus těchto změn ovšem zatím není detailně popsán. Tyto změny jsou však nezbytné pro následné druhově specifické rozpoznání gamet a vazbu spermie na vajíčko. Jednou z kandidátních molekul zapojených do procesu rozpoznání gamet a vazby spermie na vajíčko je kyselina sialová. Kyselina sialová je ustáleným označením pro skupinu derivátů kyseliny neuraminové, které se v organismu specificky váží na konce sacharidových struktur glykoproteinů a glykolipidů, a díky svým vlastnostem mohou být regulátory mnoha fyziologických povrchových interakcí. Zda dochází ke změnám v distribuci kyseliny sialové během meiotického zrání prasečích oocytů nebylo doposud objasněno.

Výsledky experimentů této diplomové práce potvrdily stanovenou hypotézu. V této studii byly použity lektiny SNA (*Sambucus nigra agglutinin*) WGA (*Wheat germ agglutinin*), které vykazují vysokou specifitu k sialové kyselině. Lektin SNA rozpoznává sialovou kyselinu navázanou v poloze α -2,6 nebo α -2,3 vazbou na galaktózu. Lektin WGA rozpoznává sialovou kyselinu navázanou do různých vazebných míst glykoproteinového řetězce a dále vykazuje specifitu k N-acetylglukosaminu (GlcNAc). V experimentu zaměřeném na detekci sialové kyseliny prostřednictvím lektinu SNA byl patrný statistický významný pokles relativní intenzity signálu SNA mezi prasečími oocyty ve stádiu zárodečného váčku (GV) a prasečími oocyty ve stádiu metafáze prvního meiotického dělení (MI). Kyselina sialová je pravděpodobně dosud přesně nepopsaným způsobem zapojena do rozpoznání a primární vazby spermie na *zona pellucida* oocytu, a to u širokého množství živočišných druhů, včetně prasete. Kyselina sialová může být zapojena do procesu rozpoznání gamet a vazby spermie na vajíčko různými způsoby. Může být přímo vazebným epitopem, ale může být zapojena i jiným způsobem. Díky svým vlastnostem může maskovat vazebný epitop a její odštěpení může být klíčovým dějem pro prezentaci specifického vazebného epitopu. Její další funkcí může být dále pravděpodobná účast při prevenci polyspermie, kdy pravděpodobně po oplození dochází k jejímu odštěpení z povrchu *zona pellucida*.

Kyselina sialová je krátkým devítiuhlíkatým monosacharidem, který je negativně nabitý a zvyšuje tak aciditu povrchu *zona pellucida*. Nachází se u savců na koncích glykokonjugátů, na které je obvykle navázán α -2,6- nebo α -2,3- vazbou. U prasete se nachází na N i O vázaných glykoproteinech (Takahashi et al. 1999).

V experimentu zaměřeném na detekci sialové kyseliny prostřednictvím lektinu WGA statisticky významné rozdíly detekovány nebyly. Bylo již dřívějšími studiemi prokázáno, že lektin WGA specificky interaguje s vnější i vnitřní částí ZP většiny savčích druhů včetně prasete (Stradaioli 1996). Mimo jiné bylo dokázáno, že lektin WGA u oocytů viskači prostupoval i přes *zomu pellucidu* a oolemu do cytoplazmy (Pastor et al. 2008). V experimentech této diplomové práce toto pozorováno nebylo. Acuna et al. (2018), ve své studii také nepopisují statisticky významné rozdíly ve vazbě lektinu WGA u rostoucích

oocytů během jejich folikulárního vývoje. Přítomnost vazebných partnerů pro lektin WGA, tedy N-acetylglukosaminu a sialové kyseliny byla prokázána ve všech hodnocených stádiích. Tyto molekuly na povrchu *zona pellucida* oocytů potkana jsou klíčové pro rozpoznání gamet a primární vazbu spermie na oocyt, které se účastní enzym z povrchu samčích gamet 1,4-galaktosyltransferáza (GalTase), sialové kyseliny zůstávají na povrchu *zóny pellucidy* oocytů potkana až do splnutí gamet (Acuna 2018).

Takahashi (2013) uvádí, že není rozdíl v detekci kyseliny sialové prostřednictvím lektinu WGA mezi nezralými oocyty (rostoucí oocyty) a oocyty po meiotickém zrání (oocyty ve stádiu MII). Závěry studie výsledky této diplomové práce potvrzují. Podle studie Pastor (2008) jsou vazebné epitopy lektinu WGA přítomny i v buňkách uvolněných ve folikulární tekutině. To bylo potvrzeno i ve studii Lay (Lay et al. 2011).

Kultivace oocytů společně s lektinem WGA v *in vitro* podmínkách vedla ke snížení vazby spermií na *zona pellucida* oocytu prasete. Důvodem bylo pravděpodobně obsazení vazebných míst, v tomto případě GlcNAc a sialové kyseliny, které by mohly být tedy kandidátními receptory v rozpoznání a primární vazbě spermie na oocyt u prasat (Lay et al. 2011).

Intenzita signálu navázaného lektinu SNA na sialovou kyselinu na povrchu *zona pellucida* u oocytů v průběhu meiotického zrání se statisticky významně lišila. V provedených experimentech bylo prokázáno statisticky významné snížení intenzity signálu navázaného lektinu SNA mezi fázemi GV a MI. K podobným výsledkům dospěli i ve studii Desantis (2009), kde intenzita signálu navázaného lektinu SNA klesala s mírou expanze kumulu a průběhem meiotického zrání prasečích oocytů. Zároveň popisují vyšší afinitu lektinu SNA k vnějšímu regionu *zona pellucida*. Jinak je tomu patrně u lidských oocytů, kde byla prokázána poměrně slabá vazba lektinu SNA na sialovou kyselinu, to je pravděpodobně dáno nízkou přítomností Sia vázané α -2,3- na glykoproteiny, která se u lidských oocytů nachází (Movilla 2004).

Při experimentu porovnávající oocyty různých živočišných druhů před inkubací s neuraminidázou, specifickým enzymem, který štěpí jen konkrétní glykosidické vazby, byl pozorován výrazný pokles intenzity fluorescenčního signálu lektinu SNA u oocytů po této inkubaci, což svědčí o striktní specifitě daného lektinu (Chapman 2000).

Vazba na sialové kyseliny a tedy i její přítomnost byla prokázána u obou zkoumaných lektinů ve fázích GV, MI i MII meiotického zrání prasečích oocytů. Intenzita signálu se u lektinu WGA ze statistického pohledu signifikantně neměnila, což lze vysvětlit nezměněným množstvím sialové kyseliny u všech pozorovaných stádií, je však možné, že díky možnosti vazby lektinu WGA na strukturu N-acetylglukosaminu (GlcNAc) jsou výsledky detekce redistribuce kyseliny sialové zkreslené. Naopak u lektinu SNA, který se specificky váže pouze na sialovou kyselinu vázanou v pozici α -2,6 na galaktózu, se podařilo prokázat statisticky významné rozdíly mezi fázemi GV a MI. V tomto případě byla intenzita nejsilnější ve fázi GV a poté klesla. To by podporovalo teorii, že kyselina sialová díky svým vlastnostem může maskovat vazebný epitop a její odštěpení může být klíčovým dějem pro prezentaci specifického vazebného epitopu.

7 Závěr

Zona pellucida prasečích oocytů je složena ze tří glykoproteinů – ZP2, ZP3 a ZP4, které mohou být během meiotického zrání glykosylovány, sulfatovány a sializovány. Tyto posttranslační úpravy jsou patrně nezbytné pro následné druhově specifické rozpoznání gamet a vazbu spermie na vajíčko. Jednou z kandidátních molekul zapojených do procesu rozpoznání gamet a vazby spermie na vajíčko je kyselina sialová. Kyselina sialová je ustáleným označením pro skupinu derivátů kyseliny neuraminové, které se v organismu specificky váží na konce sacharidových struktur glykoproteinů a glykolipidů, a díky svým vlastnostem mohou být regulátory mnoha fyziologických povrchových interakcí.

Cílem této diplomové práce bylo ověření hypotézy, že během meiotického zrání dochází k redistribuci sialové kyseliny na povrchu *zona pellucida* prasečích oocytů. K potvrzení dané hypotézy byly navrženy experimenty založené na vazbě lektinů specificky rozpoznávajících strukturu sialové kyseliny v sacharidovém řetězci glykoproteinů *zona pellucida*. Byly vybrány dva specifické lektiny – SNA (*Sambucus nigra agglutinin*), který rozpoznává sialovou kyselinu ve vazbě v pozici α -2,6 a lektin WGA (*Wheat germ agglutinin*), který rozpoznává multivalentně vázanou sialovou kyselinu a N-acetylglukosamin.

Výsledky experimentů potvrdily stanovenou hypotézu. V experimentu zaměřeném na detekci sialové kyseliny prostřednictvím lektinu SNA byl patrný statistický významný pokles relativní intenzity signálu SNA mezi prasečími oocyty ve stádiu zárodečného vajíčka (GV) a prasečími oocyty ve stádiu metafáze prvního meiotického dělení (MI). V experimentu zaměřeném na detekci sialové kyseliny prostřednictvím lektinu WGA statisticky významné rozdíly detekovány nebyly. Kyselina sialová může být zapojena do procesu rozpoznání gamet a vazby spermie na vajíčko různými způsoby. Může být přímo vazebným epitopem, ale může být zapojena i jiným způsobem. Díky svým vlastnostem může maskovat vazebný epitop a její odštěpení může být klíčovým dějem pro prezentaci specifického vazebného epitopu. Tuto hypotézu částečně podporují výsledky této diplomové práce. K jejímu definitivnímu potvrzení je však nezbytné realizovat další experimenty.

8 Seznam použité literatury

Acuña F, Tano de la Hoz MF, Díaz AO, Portiansky EL, Barbeito CG, Flamini MA. 2019. Histochemistry of the zona pellucida of the ovary of a species with natural polyovulation: *Lagostomus maximus* (Rodentia, Hystricomorpha, Chinchillidae). *Reproduction in Domestic Animals* **54**:207-215.

Adhikari D, Liu K. 2014. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* **382**:480-487.

Alberts B. 2002. *Molecular biology of the cell*. 4 edition. Garland Science, New York.

Alberts B. c1998. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Espero, Ústí nad Labem.

Alberts B, Bray D, Johnson A. 2006. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Espero, Ústí nad Labem.

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2005. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Espero, Ústí nad Labem.

Araújo VR, Gastal MO, Figueiredo JR, Gastal EL. 2014. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* **12**:78.

Assidi M, Sirard MA. 2013. Cumulus Cell Gene Expression as a Marker of Oocyte Quality. *Oogenesis*:231-252. Springer London, London.

Baker DJ, Dawlaty MM, Galardy P, Van Deursen JM. 2007. Mitotic regulation of the anaphase-promoting complex. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**:589-600.

Bielañska-Osuchowska Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology* **6**:161-193.

Blanco MR, Demzda S, Moreno Millán M, Genero E. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Review* **6**:155-165.

Bleil JD, Wassarman PM. 1983. Sperm-egg interactions in the mouse: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Developmental Biology* **95**:317-324.

Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans WJ. 1984. A lectin from elder (*Sabucus nigra* L.). *Biochem J.* **1**;221(1):163-9

Brooks SA, Leathem AJC, Schumacher U. 1997. *Lectin histochemistry: A concise practical handbook*. BIOS Scientific Publishers, Oxford.

Brooks SA. 2017. Lectin Histochemistry: Historical Perspectives, State of the Art, and the Future. *Histochemistry of Single Molecules* **1560**:93-107. Springer New York, New York, NY.

Brooks SA, Hall DMS. 2001. Lectin Histochemistry to Detect Altered Glycosylation in Cells and Tissues. *Metastasis Research Protocols*:49-65. Humana Press, New Jersey.

Cai Z-P et al. 2019. Enzymatic Synthesis of Trideuterated Sialosides. *Molecules* **24**:1368.

Cavada B, Pinto-Junior V, Osterne V, Nascimento K. 2019. ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. *International Journal of Molecular Sciences* **20**:30.

Clapham DE. 1995. Calcium signaling. *Cell* **80**:259-268.

Colgan DF, Murthy KGK, Prives C, Manley JL. 1996. Cell-cycle related regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. *Nature* **384**:282-285.

Crozet N. 1981. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in porcine oocytes during the early stages of antrum formation. *Biol. Cell* **41**:35-42.

Desantis S, Ventriglia G, Zizza S, De Santis T, Di Summa A, De Metrio G, Dell'Aquila ME. 2009. Lectin-binding sites in isolated equine cumulus-oocyte complexes: Differential expression of glycosidic residues in complexes recovered with compact or expanded cumulus. *Theriogenology* **72**:300-309.

Fan H-Y, Huo L-J, Meng X-Q, Zhong Z-S, Hou Y, Chen D-Y, Sun Q-Y. 2003. Involvement of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) in Meiotic Maturation and Activation of Pig Oocytes. *Biology of Reproduction* **69**:1552-1564.

Fan H-Y, Sun Q-Y. 2004. Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals. *Biology of Reproduction* **70**:535-547.

Fan H, Tong C, Chen D, Sun Q. 2002. Roles of MAP kinase signaling pathway in oocyte meiosis. *Chinese Science Bulletin* **47**:1157-1162.

Feng J-M, Tian H-F, Hu Q-M, Meng Y, Xiao H-B. 2018. Evolution and multiple origins of zona pellucida genes in vertebrates. *Biology Open* **7**.

Fernandez-Fuertes B, Blanco-Fernandez A, Reid CJ, Meade KG, Fair S, Lonergan P. 2018. Removal of sialic acid from bull sperm decreases motility and mucus penetration ability but increases zona pellucida binding and polyspermic penetration in vitro. *Reproduction* **155**:481-492.

Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* **71**:836-848.

Flesch FM, Gadella BM. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1469**:197-235.

Flores JA, Aguirre C, Sharma OP, Veldhuis JD. 1998. Luteinizing Hormone (LH) Stimulates Both Intracellular Calcium Ion ([Ca²⁺]_i) Mobilization and Transmembrane Cation

Influx in Single Ovarian (Granulosa) Cells: Recruitment as a Cellular Mechanism of LH-[Ca²⁺]_i Dose Response. *Endocrinology* **139**:3606-3612.

Garrington TP, Johnson GL. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology* **11**:211-218.

Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB. 2011. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica* **113**:236-247.

Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**:132-138.

Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. 1980. What should be called a lectin?. *Nature* **285**:66-66.

Goudet G, Mugnier S, Callebaut I, Monget P. 2008. Phylogenetic Analysis and Identification of Pseudogenes Reveal a Progressive Loss of Zona Pellucida Genes During Evolution of Vertebrates I. *Biology of Reproduction* **78**:796-806.

Gross SD, Schwab MS, Taieb FE, Lewellyn AL, Qian Y-W, Maller JL. 2000. The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90Rsk. *Current Biology* **10**:430-438.

Gupta SK, Bhandari B, Shrestha A, Biswal BK, Palaniappan C, Malhotra SS, Gupta N. 2012. Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell and Tissue Research* **349**:665-678.

Gupta SK, Bhandari B. 2010. Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian Journal of Andrology* **13**:97-105.

Gupta SK. 2021. Human Zona Pellucida Glycoproteins: Binding Characteristics With Human Spermatozoa and Induction of Acrosome Reaction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**.

Guraya S. 2007. *Cellular and Molecular Biology of Human Oogenesis, Ovulation and Early Embryogenesis*. 1st edition. NEW AGE, Ludhiana.

Hage DS, Cazes J. 2005. *Handbook of Affinity Chromatography*. 2. vyd. CRC Press, Boca Raton.

Hedrick JL, Wardrip NJ. 1986. Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. *Analytical Biochemistry* **157**:63-70.

Homer H. 2013. The APC/C in female mammalian meiosis I. *Reproduction* **146**:61-71.

Howes E, Pascall JC, Engel W, Jones R. 2001. Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *Journal of Cell Science* **114**:4127-4136.

Hubbard C, Terranova P. 1982. Inhibitory action of cyclic guanosine 5'-phosphoric acid (GMP) on oocyte maturation: dependence on an intact cumulus. *Biology of Reproduction* **26**:628-632.

Hunt P, Hassold T. 2008. Human female meiosis: what makes a good egg go bad?. *Trends in Genetics* **24**:86-93.

Hunter M. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction* **5**:122-130.

Chapman JA, Wiebkin OW, Breed WG. 2000. Interspecific variation of zona pellucida glycoconjugates in several species of marsupial. *Reproduction* **119**:111-120.

Cho WK, Stern S, Biggers JD. 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *Journal of Experimental Zoology* **187**:383-386.

Inoue M, Naito K, Aoki F, Toyoda Y, Sato E. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote* **3**:265-271.

Inoue M, Naito K, Nakayama T, Sato E. 1998. Mitogen-Activated Protein Kinase Translocates into the Germinal Vesicle and Induces Germinal Vesicle Breakdown in Porcine Oocytes. *Biology of Reproduction* **58**:130-136.

Ito J, Kashiwazaki N. 2012. Molecular mechanism of fertilization in the pig. *Animal Science Journal* **83**:669-682.

Ivell R, Anand-Ivell R. 2021. The Physiology of Reproduction – Quo vadis?. *Frontiers in Physiology*.

Jimenez-Movilla M. 2004. Carbohydrate analysis of the zona pellucida and cortical granules of human oocytes by means of ultrastructural cytochemistry. *Human Reproduction* **19**:1842-1855.

Johnson J et al. 2005. Oocyte Generation in Adult Mammalian Ovaries by Putative Germ Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood. *Cell* **122**:303-315.

Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* **428**:145-150.

Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* **428**:145-150.

Jones KT. 2005. Mammalian egg activation: from Ca² spiking to cell cycle progression. *Reproduction* **130**:813-823.

Jones KT, Lane SIR, Holt JE. 2013. Start and Stop Signals of Oocyte Meiotic Maturation. *Oogenesis*:183-193. Springer London, London.

Jones KT. 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction* **10**:1-5.

Junqueira LCU, Carneiro J, Kelley RO. 1997. *Základy histologie*. Jinočany.

Kanai S, Kitayama T, Yonezawa N, Sawano Y, Tanokura M, Nakano M. 2008. Disulfide linkage patterns of pig zona pellucida glycoproteins ZP3 and ZP4. *Molecular Reproduction and Development* **75**:847-856.

- Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I. 2006. L -Cysteine Inhibits Insulin Release From the Pancreatic β -Cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes* **55**:1391-1397.
- Kątska-Książkiewicz L. 2006. Pig embryo production by in vitro maturation and fertilization of ovarian oocytes. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences* **15**:525-542.
- Kawashima I, Liu Z, Mullany LK, Mihara T, Richards JS, Shimada M. 2012. EGF-Like Factors Induce Expansion of the Cumulus Cell-Oocyte Complexes by Activating Calpain-Mediated Cell Movement. *Endocrinology* **153**:3949-3959.
- Khalil MB et al. 2006. Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylglycerolipid. *Developmental Biology* **290**:220-235.
- Kishimoto T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology* **15**:654-663.
- Kline JT, Kline D. 1994. Regulation of Intracellular Calcium in the Mouse Egg: Evidence for Inositol Trisphosphate-Induced Calcium Release, but not Calcium-Induced Calcium Release I. *Biology of Reproduction* **50**:193-203.
- Knobil E, Neill JD. 1988. *The Physiology of reproduction*. 2. vyd. Raven Press.
- Kosako H, Gotoh Y, Nishida E. 1994. Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. *The EMBO Journal* **13**:2131-2138.
- Kurimoto K, Ikeda H, Kobayashi H. 2021. Epigenome reprogramming in the male and female germ line. *Epigenetics and Reproductive Health*:3-25. Elsevier.
- Lay KM, Ashizawa K, Nakada T, Tatemoto H. 2011. N-glycosylation of zona glycoproteins during meiotic maturation is involved in sperm-zona pellucida interactions of porcine oocytes. *Theriogenology* **75**:1146-1152.
- Liu M. 2011. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology* **9**:149.
- Lorca T, Cruzalegui FH, Fesquet D, Cavadore JC, Méry J, Means A, Dorée M. 1993. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* **366**:270-273.
- Manning JC, Romero A, Habermann FA, García Caballero G, Kaltner H, Gabius H-J. 2017. Lectins: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochemistry and Cell Biology* **147**:199-222.
- Masui Y, Clarke HJ. 1979. Oocyte Maturation. *International Review of cytology*:185-282.
- Mehlmann LM. 2013. Signaling for Meiotic Resumption in Granulosa Cells, Cumulus Cells, and Oocyte. *Oogenesis*:171-182. Springer London, London.

Mehlmann LM. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* **130**:791-799.

Mehlmann LM, Jones TLZ, Jaffe LA. 2002. Meiotic Arrest in the Mouse Follicle Maintained by a G s Protein in the Oocyte. *Science* **297**:1343-1345.

Mishra A et al. 2019. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food and Chemical Toxicology* **134**:110827.

Miyazaki S, Ito M. 2006. Calcium Signals for Egg Activation in Mammals. *Journal of Pharmacological Sciences* **100**:545-552.

Monsingy, M., Roche, A.-C., Sene, C., Maget-Dana, R. and Delmotte, F. 1980, Sugar-Lectin Interactions: How Does Wheat-Germ Agglutinin Bind Sialoglycoconjugates?. *European Journal of Biochemistry*, **104**:147-153.

Moor R, Dai Y. 2001. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction* **2001**:91-104.

Moricard R, Moricard F. 1975. Espace périvitellin et réactions microvillositaires au cours de l'achèvement de la méiose et de la fécondation chez les Mammifères: orientation de recherches humaines. *La fécondation*:37-48. Collage Sociale Naturelle Etude Sterilite, Paris.

Moros-Nicolás C, Chevret P, Jiménez-Movilla M, Algarra B, Cots-Rodríguez P, González-Brusi L, Avilés M, Izquierdo-Rico MJ. 2021. New Insights into the Mammalian Egg Zona Pellucida. *International Journal of Molecular Sciences* **22**:3276.

Motlik J, Crozet N, Fulka J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Reproduction* **72**:323-328.

Murray AW. 2004. Recycling the Cell Cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**:221-234.

Noguchi S, Hatanaka Y, Tobita T, Nakano M. 1992. Structural analysis of the N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (PZP3) from porcine zona pellucida. *European Journal of Biochemistry* **204**:1089-1100.

Nomikos M et al. 2013. Phospholipase C ζ rescues failed oocyte activation in a prototype of male factor infertility. *Fertility and Sterility* **99**:76-85.

Opiela J, Kątska-Książkiewicz L. 2004. Characterization of mammalian oocyte competence to undergo fertilization and embryonic development: I. Nuclear maturation and molecular aspects of its regulation. *Biotechnologia* **2004**:140-151.

Otová B, Mihalová R, Bobková K. 2020. *Základy biologie a genetiky člověka*. Vydání druhé. Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, Praha.

Palmer A, Gavin A, Nebreda A. 1998. A link between MAP kinase and p34cdc2/cyclin B during oocyte maturation: p90rsk phosphorylates and inactivates the p34cdc2 inhibitory kinase Myt1. *The EMBO Journal* **17**:5037-5047.

Parillo F, Stradaoli G, Dall'aglio C, Verini-Supplizi A. 1996. Characterization of the complex carbohydrates in the zona pellucida of mammalian oocytes using lectin histochemistry. *Veterinary Research Communications* **20**:225-236.

Pastor LM et al. 2008. Characterization of glycoside residues of porcine zona pellucida and ooplasm during follicular development and atresia. *Molecular Reproduction and Development* **75**:1473-1483.

Peter M, Nakagawa J, Dorée M, Labbé JC, Nigg EA. 1990. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* **61**:591-602.

Petr J, Urbánková D, Tománek M, Rozinek J, Jílek F. 2002. Activation of in vitro matured pig oocytes using activators of inositol triphosphate or ryanodine receptors. *Animal Reproduction Science* **70**:235-249.

Pirino G, Wescott MP, Donovan PJ. 2014. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle* **8**:665-670.

Rankin T. 2000. The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Reviews of Reproduction* **5**:114-121.

Rath D, Töpfer-Petersen E, Michelmann H-W, Schwartz P, Ebeling S. 2005. Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology* **63**:352-362.

Rebelo AL, Contessotto P, Joyce K, Kilcoyne M, Pandit A. 2021. An optimized protocol for combined fluorescent lectin/immunohistochemistry to characterize tissue-specific glycan distribution in human or rodent tissues. *STAR Protocols* **2**.

Redgrove KA, Aitken RJ, Nixon B. 2012. More Than a Simple Lock and Key Mechanism: Unraveling the Intricacies of Sperm-Zona Pellucida Binding. *Binding Protein. InTech*.

Sela-Abramovich S, Edry I, Galiani D, Nevo N, Dekel N. 2006. Disruption of Gap Junctional Communication within the Ovarian Follicle Induces Oocyte Maturation. *Endocrinology* **147**:2280-2286.

Senbon S, Hirao Y, Miyano T. 2003. Interactions between the Oocyte and Surrounding Somatic Cells in Follicular Development: Lessons from In Vitro Culture. *Journal of Reproduction and Development* **49**:259-269.

Shalgi R, Maymon R, Bar-Shira (Maymon) B, Amihai D, Skutelsky E. 1991. Distribution of lectin receptors sites in the zona pellucida of follicular and ovulated rat oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **29**:365-372.

Sharon N. 2009. Lectins. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Chichester.

Sharon N, Lis H. 1990. Legume lectins — a large family of homologous proteins. *The FASEB Journal* **4**:3198-3208.

Shimizu S, Ito M, Dean J. 1982. Glycoproteins of mouse zona pellucida: Analysis of their reactivity to lectins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **109**:449-454.

Schatten H, Sun Q-Y. 2011. Centrosome dynamics during mammalian oocyte maturation with a focus on meiotic spindle formation. *Molecular Reproduction and Development* **78**:757-768.

Schworer CM, Colbran RJ, Keefer JR, Soderling TR. 1988. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. Identification of a regulatory autophosphorylation site adjacent to the inhibitory and calmodulin-binding domains. *Journal of Biological Chemistry* **263**:13486-13489.

Sinowatz F, Kölle S, Töpfer-Petersen E. 2001. Biosynthesis and Expression of Zona pellucida Glycoproteins in Mammals. *Cells Tissues Organs* **168**:24-35.

Sládeček F. 1986. Rozmnožování a vývoj živočichů: základy vývojové biologie. Vydání 2. Academia, Praha.

Slípka J, Tonar Z. 2019. Základy embryologie. 2., upravené vydání. Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, Praha.

Song X-X, Yang X-Z, Iga K, Niwa K. 1999. Binding of Lectins to the Zona Pellucida of In Vitro Matured Pig Oocytes and Sperm-Oocyte Interaction In Vitro. *Journal of Mammalian Ova Research* **16**:23-30.

Stojkovic M, Motlik J, Kölle S, Zakhartchenko V, Alberio R, Sinowatz F, Wolf E. 1999. Cell-Cycle Control and Oocyte Maturation: Review of Literature. *Reproduction in Domestic Animals* **34**:335-342.

Sun Q-Y, Nagai T. 2003. Molecular Mechanisms Underlying Pig Oocyte Maturation and Fertilization. *Journal of Reproduction and Development* **49**:347-359.

Takahashi K et al. 2013. Binding of Sperm to the Zona Pellucida Mediated by Sperm Carbohydrate-Binding Proteins is not Species-Specific in Vitro between Pigs and Cattle. *Biomolecules* **3**:85-107.

Thibault C, Szöllösi D, Gérard M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reproduction Nutrition Développement* **27**:865-896.

Topfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Tsoлова M. 2008. Glycobiology of fertilization in the pig. *The International Journal of Developmental Biology* **52**:717-736.

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.

Uyar A, Torrealday S, Seli E. 2013. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and Sterility* **99**:979-997.

Vaccari S, Weeks JL, Hsieh M, Menniti FS, Conti M. 2009. Cyclic GMP Signaling Is Involved in the Luteinizing Hormone-Dependent Meiotic Maturation of Mouse Oocytes1. *Biology of Reproduction* **81**:595-604.

Vacek Z. 2006. Embryologie: učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka. Grada, Praha.

Van Den Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* **63**:1717-1751.

Varki A et al. 2009. Essentials of Glycobiology. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

Velásquez JG, Canovas S, Barajas P, Marcos J, Jiménez-Movilla M, Gallego RG, Ballesta J, Avilés M, Coy P. 2007. Role of sialic acid in bovine sperm–zona pellucida binding. *Molecular Reproduction and Development* **74**:617-628.

Verlhac MH, Breuer M. 2013. Cytoskeletal Correlates of Oocyte Meiotic Divisions. *Oogenesis*:195-207. Springer London, London.

Verlhac M-H, Villeneuve A. 2010. Oogenesis: The Universal Process. 1st edition. John Wiley, New York.

Vildova D, Jeřeta M, Máchal L. 2014. Modification of the zona pellucida sperm-binding protein 3 (ZP 3) in pigs during folliculogenesis.

Wang C, Machaty Z. 2013. Calcium influx in mammalian eggs. *Reproduction* **145**:97-105. Available at <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/145/4/R97.xml>.

Wassarman PM, Jovine L, Qi H, Williams Z, Darie C, Litscher ES. 2005. Recent aspects of mammalian fertilization research. *Molecular and Cellular Endocrinology* **234**:95-103.

Wassarman P, Chen J, Cohen N, Litscher E, Liu C, Qi H, Williams Z. 1999. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *J Exp Zool* **285**:251-258.

Wassarman P. 1988. The Mammalian Ovum. *The Physiology of Reproduction*:69-102. Raven Press, New York.

Weingartová I, Dvořáková M, Nevorál J, Vyskočilová A, Sedmíková M, Rylková K, Kalous L, Jílek F. 2015. Back In Time: Fish Oocyte As A Superior Model For Human Reproduction? A Review. *Scientia Agriculturae Bohemica* **46**:7-20.

Weis WI, Drickamer K. 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry* **65**:441-473.

Wong EV. 2021. Book: Cells - Molecules and Mechanisms. Axolotl Academica Publishing. Available at [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Cell_and_Molecular_Biology/Book%3A_Cells_-_Molecules_and_Mechanisms_\(Wong\)](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Cell_and_Molecular_Biology/Book%3A_Cells_-_Molecules_and_Mechanisms_(Wong)) (accessed April 13, 2022).

Yurewicz EC, Pack BA, Sacco AG. 1992. Porcine oocyte zona pellucida Mr 55,000 glycoproteins: Identification of O-glycosylated domains. *Molecular Reproduction and Development* **33**:182-188.

UniProtKB - P42099 (ZP2_PIG). 1995. UniProt Consortium. Available at <https://www.uniprot.org/uniprot/P42099> (accessed March 11, 2022).

ZP3 elisa kit :: Pig zona pellucida glycoprotein 3 (sperm receptor) ELISA Kit. Available at <https://www.mybiosource.com/zp3-pig-elisa-kits/zona-pellucida-glycoprotein-3-sperm-receptor/9319610> (accessed March 11, 2022).

UniProtKB - Q12836 (ZP4_HUMAN). 2004. UniProt Consortium. Available at <https://www.uniprot.org/uniprot/Q12836> (accessed March 11, 2022).

Sambucus nigra (elderberry) lectin (5mg). Available at <https://eshop.baria.cz/z1416476-sambucus-nigra-elderberry-lectin-5mg> (accessed March 12, 2022).

Sambucus Nigra (Elderberry Bark) Lectin (SNA, EBL), fluorescein (FITC). Available at <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L32479> (accessed March 12, 2022).