Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Exprese vybraných fúzních proteinů na membráně oocytu prasete Diplomová práce

Bc. Petra Bednářová Biotechnologie

doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Exprese vybraných fúzních proteinů na membráně oocytu prasete" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19.4.2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovala. Ráda bych také poděkovala Ing. Kateřině Kheilové, Ph.D., Ing. Anetě Pilsové, DiS., Ing. Zuzaně Pilsové, DiS. a dalším členům Katedry veterinárních disciplín za pomoc a trpělivost při řešení teoretické a praktické části diplomové práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým přátelům za trpělivost a podporu během psaní diplomové práce.

Exprese vybraných fúzních proteinů na membráně oocytu prasete

Souhrn

Tetraspaniny jako je CD9, CD81 či CD151 jsou transmembránové proteiny, které vytvářejí na oolemě tetraspaninovou síť, skrze kterou mohou asociovat s dalšími proteiny. Díky této důmyslné architektuře se tak mohou tetraspaniny nepřímo podílet na procesech spojených s oplozením, jako je adheze a následná fúze pohlavních buněk. Výskyt fúzních proteinů typu tetraspaninů byl popsán v oocytech řady živočišných druhů, málo vědeckých informací je dostupných o výskytu tetraspaninů u prasete.

Diplomová práce měla za cíl ověřit hypotézu, podle které se v prasečích oocytech vyskytuje tetraspanin CD151 a během meiotického zrání oocytů dochází ke změnám v jeho expresi.

Pro ověření hypotézy byly analyzovány oocyty na konci růstové fáze, ve stádiu zárodečného váčku (GV) a oocyty *in vitro* kultivované 24 hodin do stádia první meiotické metafáze (MI) a oocyty kultivované po dobu 48 hodin do stádia druhé meiotické metafáze (MII).

Exprese proteinu CD151 byla potvrzena jak v oocytech ve všech sledovaných fázích meiotického zrání, tak také jejich obklopujících kumulárních buňkách metodou Western blot.

Rozdíly v expresi proteinu mezi jednotlivými stádiemi oocytů (GV, MI a MII) byly sledovány imunocytochemickou analýzou, kdy bylo zjištěno, že v oocytech v průběhu meiotického zrání klesá intenzita signálu detekovaného proteinu.

Naše experimenty potvrdily hypotézu, CD151 tetraspanin se vyskytuje v oocytech a během zrání se v oocytu prasete mění jeho množství. Změny v množství detekovaného proteinu mohou souviset s jeho funkcí během procesu oplození, kdy protein asociuje například s molekulami integrinu na oolemě, čímž může zajistit komunikaci s membránovými receptory spermií jako je například fertilin. Exprese CD151 jak v oocytech, tak jejich kumulárních buňkách naznačuje, že se tento protein může podílet na morfogenezi somatického kompartmentu, možná je i alternativa, že se protein distribuuje z kumulárních buněk do oocytu pomocí vmezeřených spojů gap junctions. Pro objasnění funkce tetraspaninového proteinu CD151 je třeba provést další vědecké studie a je také nezbytné detailně popsat funkci dalších CD molekul a jejich interakci například s integriny typu $\beta 1$ a αV .

Klíčová slova: Prase; meiotické zrání; tetraspaniny; CD molekuly

Expression of selected fusion proteins on the porcine oocyte membrane

Summary

Tetraspanins such as CD9, CD81, and CD151 are transmembrane proteins that form a tetraspanin web on the cell surface, through which they can associate with other proteins. Thanks to this intricate architecture, tetraspanins can indirectly participate in processes related to fertilization, such as adhesion and subsequent fusion of gametes. The occurrence of tetraspanin-like fusion proteins has been described in the oocytes of various animal species, although very little scientific information exists regarding the presence of tetraspanins in pigs.

The aim of the thesis was to verify the hypothesis that tetraspanin CD151 is present in pig oocytes and that changes in its expression occur during the meiotic maturation of oocytes.

To test the hypothesis, oocytes at the end of the growth phase, in the germinal vesicle (GV) stage, and oocytes cultured in vitro for 24 hours to the first meiotic metaphase (MI) stage, as well as oocytes cultured for 48 hours to the second meiotic metaphase (MII) stage, were analyzed. The expression of the CD151 protein was confirmed in oocytes at all stages of meiotic maturation, as well as in their surrounding cumulus cells, using the Western blot method.

Differences in protein expression between the various stages of oocytes (GV, MI, and MII) were monitored by immunocytochemical analysis, revealing that the intensity of the signal detected for the protein decreases in oocytes during meiotic maturation. Our experiments confirmed the hypothesis that CD151 tetraspanin is present in oocytes and that its quantity changes during oocyte maturation. Changes in the detected protein quantity may be related to its function during fertilization, where the protein associates, for example, with integrin molecules on the cell surface, thereby facilitating communication with sperm membrane receptors such as fertilin. The expression of CD151 in both oocytes and their cumulus cells suggests that this protein may be involved in the morphogenesis of the somatic compartment, and it is possible that the protein is also distributed from cumulus cells to oocytes via gap junctions. Further scientific studies are needed to elucidate the function of the CD151 tetraspanin protein, as well as to provide a detailed description of the function of other CD molecules and their interaction with integrins such as $\beta 1$ and αV .

Keywords: Pig; meiotic maturation; tetraspanins; CD molecules

Obsah

1	Úvod	9d	8		
2	Cíle práce a vědecká hypotéza9				
3	Literární rešerše10				
	3.1	Meióza			
	3.2	Gametogeneze a folikulogeneze			
	3.3	Jaderné zrání oocytů			
	3.3	3.1 Rozpad zárodečného váčku (GVBD)			
	3.3	3.2 Metafáze I			
	3.3	3.3 Anafáze I			
	3.3	3.4 Metafáze II	17		
	3.4	Cytoplazmatické zrání oocytů			
	3.4	4.1 Mitochondrie			
	3.4	4.2 Endoplazmatické retikulum			
	3.4	4.3 Golgiho aparát			
	3.4	4.4 Kortikální granula			
	3.5	Tetraspaniny			
	3.6	Struktura tetraspaninů			
	3.7	Proteinové interakce			
	3.7	7.1 Interakce tetraspanin-tetraspanin			
	3.7	7.2 Interakce tetraspanin-integrin			
3.7.3 Interakce tetraspanin – proteiny		7.3 Interakce tetraspanin – proteiny IgSF			
	3.7	7.4 Interakce tetraspanin-JUNO			
	3.8	Exprese tetraspaninů na oolemě během meiotického zrání			
	3.9	Exprese tetraspaninů na kumulárních buňkách			
4	Meto	todika			
	4.1	Odběry vaječníků			
	4.2	Zisk oocytů			
	4.3	Kultivace oocytů			
	4.4	Barvení a fixace oocytů pro stanovení fáze meiotického zrán	ní 39		
	4.5	Western blot analýza			
	4.6	Imunocytochemická analýza			
	4.7	Statistická analýza dat			
	4.8	Schéma experimentu			
	4.8 kur	8.1 Experiment 1: Detekce tetraspaninu CD151 v prasečích od umulárních buňkách během meiotického zrání metodou Western b	ocytech a jejich lot 43		
	4.8 000	8.2 Experiment 2: Detekce tetraspaninu CD151 během meiotic ocytů imunohistochemickou analýzou	ckého zrání prasečích 43		

5	Výsledky 4	4
	5.1 Detekce tetraspaninu CD151 v prasečích oocytech v průběhu meiotického metodou Western blot) zrání 4
	5.2 Detekce tetraspaninu CD151 v prasečích oocytech v průběhu meiotického pomocí imunohistochemické metody	o zrání 5
6	Diskuze4	7
7	Závěr 5	0
8	Literatura5	1

1 Úvod

Oplodnění nastává v důsledku velkého sledu událostí zahrnující migraci, rozpoznání, adhezi a následnou fúzi membrán spermie a vajíčka. Fúze gamet je unikátní proces, který spojuje dvě geneticky odlišné buňky do jedné (Oren-Suissa a Podbilewicz 2007). Ač bylo dosaženo velkého pokroku vedoucího k pochopení molekulárního mechanismu oplodnění, není doposud zcela vysvětleno. Jedním z aktuálních témat reprodukční biologie je identifikace a možné interakce proteinů podílejících se na fúzi. Porozuměním mechanismů fúze gamet může přispět ke zlepšování technologií asistované reprodukce. Taktéž může napomáhat k vysoké a předvídatelné míře plodnosti u hospodářských zvířat, nezbytné pro živočišnou produkci (Siu et al. 2021).

Napříč buněčnými typy, hrají nezbytnou roli pro buněčnou adhezi a následnou fúzi transmembránové proteiny tetraspaniny, které v rámci tetraspaninové sítě asociují s různými molekulami (Barraud-Lange a Boucheix 2013), čímž mohou regulovat například sekvestraci membránových receptorů plazmatické membrány (Termini a Gillette 2017). Mezi tetraspaniny, které jsou významné pro proces oplození, patří například CD9, CD81 a CD151 (Jankovičová et al. 2020).

Aby mohl nastat kontakt a následná fúze gamet, musí nejprve gamety projít cytoplazmatickým a jaderným zráním (Barraud-Lange a Boucheix 2013). V případě tetraspaninů byly prokázány expresní vzory v průběhu meiotického zrání oocytů. Například u skotu jsou popsány expresní vzory během zrání u všech výše jmenovaných tetraspaninů (Jankovičová et al. 2019; Jankovičová et al. 2023). Oproti tomu, prasečí model má pouze omezené rozsahy v popisu exprese v průběhu zrání na oolemě. Zatímco exprese byla u prasečích oocytů dobře popsána u tetraspaninů CD9 a CD81 (Li et al. 2004; Jankovičová et al. 2019), tak v případě tetraspaninu CD151 jsou dostupná pouze omezená data o expresi na oolemě (Jankovičová et al. 2023), proto si tato práce kladla za cíl expresi CD151 v průběhu meiotického zrání oocytu prasete popsat.

2 Cíle práce a vědecká hypotéza

Cílem diplomové práce bylo ověření hypotézy, podle které během meiotického zrání oocytů prasete dochází ke změnám v expresi tetraspaninu CD151.

Cíl diplomové práce byl ověřen na základě detekce proteinu metodou Western blot a imunocytochemické analýzy.

3 Literární rešerše

3.1 Meióza

Meióza je typ buněčného dělení, jehož výsledkem je vznik zárodečných buněk, gamet. Gamety nesou pouze poloviční obsah DNA (Cohen a Holloway 2015). Snížení obsahu jaderné DNA je podmíněno jednou replikací DNA, po které následují dvě po sobě jdoucí buněčná dělení, meióza I a meióza II (John 1990). Meióza I je též označována jako redukční dělení, jelikož v jejím průběhu dochází ke snížení počtu chromozomových sad. V následné meióze II se počet sad chromozomů již nemění. Od každé sady chromozomů, označované jako n je každá kopie chromozomů poskytnuta jedním rodičem. Diploidní organismus nese tedy dvě sady chromozomů (2n), z čehož jedna kopie je mateřská a druhá otcovská. Tyto kopie se nazývají homologní chromozomy. Premeiotická replikace (S fáze) vede ke zdvojnásobení počtu kopií chromozomů, za vzniku páru sesterských chromatid (4c) v případě (2n), kdy každý chromozom se skládá ze dvou chromatid (Cohen a Holloway 2015).

Prvním meiotickým stádiem je profáze I. Jedná se o prodlouženou fázi, která je rozdělena na jednotlivá stádia, označována dle morfologického vzhledu chromozomů v jádře. Prvním dílčím stádiem profáze I, která nastává bezprostředně po premeiotické replikaci DNA, je leptotene (John 1990) (z řeckého leptos, tedy tenký). Chromozomy jsou v tuto chvíli poměrně dlouhé a dekondenzované. V této fázi se sestavuje proteinová struktura označována jako synaptonemální komplex, který propojuje homologní chromozomy mezi sesterskými chromatidami (Cohen a Holloway 2015). Během druhé dílčí fáze profáze I, zygotene (John 1990) (z řeckého zygon, tedy sousedící), se homologní chromozomy začnou párovat a následně dochází k synapsi, což vede k fyzickému navázání mezi homology (Cohen a Holloway 2015). Tyto páry se označují termínem bivalenty (Brooker a Berkowitz 2014). Současně začíná kondenzovat DNA, díky čemuž je cytologicky patrná. Po úplném spojení homologních chromozomů buňka přechází do dílčí fáze pachytene (John 1990) (po řeckém pachy, což znamená hustý nebo silný), kdy nastává úplná kondenzace DNA (Cohen a Holloway 2015). Během této fáze dochází ke crossing - overu, tedy k výměně genetického materiálu mezi mateřskými a otcovskými homologními chromozomy (Auger 2018). Díky meiotické rekombinaci se vytváří diverzita v populaci (Handel a Schimenti 2010). Místa křížení se nazývají chiasmata (Cohen 2018). Na tvorbě chiasmat se podílí pouze homologní chromatidy, neprobíhá mezi chromatidami sesterskými (Carpenter 1994). Následuje fáze diplotene (John 1990) (z řeckého diplo, tedy dvojitý), kdy dochází k rozpadu synaptonemálního komplexu a chromozomy se začínají navzájem odpuzovat, homology ale zůstávají stále ve spojení pomocí chiasmat. Pátá a poslední část profáze I, diakineze, je pojmenována podle řeckého dia ("přes") a kinesis ("pohyb"), spojením slov vzniká význam "procházet", což označuje poslední fázi před přechodem do fáze meiózy. V tomto stádiu jsou homology spojeny pouze rezidui synaptonemálního komplexu (Cohen a Holloway 2015).

Po diakinezi nastává metafáze I, při které se homology seřadí na metafázní desce a jsou připojeny k meiotickému vřeténku. Poté se během anafáze I rozcházejí homologní chromozomy I a následné oddělení je dokončeno během telofáze I. Následuje buněčné dělení, cytokineze, a vznik dvou dceřiných buněk se sadou původních homologů (1n), ale sada obsahuje stále dvě

sesterské chromatidy (2c). Nastává meióza II, sestávající se z profáze II, metafáze II, anafáze II a telofáze II. Meióza II je spíše podobná mitotickému dělení, jelikož při mitóze se rozdělují sesterské chromatidy. Tudíž po meióze II vznikají gamety s haploidní sestavou (1n a 1c) (Cohen a Holloway 2015).

3.2 Gametogeneze a folikulogeneze

U samičích gamet probíhá meióza obdobně jako u samčích (Cohen 2018). Nejzásadnější rozdíl spočívá v počtu vznikajících gamet, kdy u samců během meiózy vznikají čtyři haploidní spermie, zatímco u samic dochází k asymetrickému dělení, jehož výsledkem je pouze jeden oocyt. Dalším rozdílem je průběh meiózy, jelikož samčí meióza je zahájena zhruba v období puberty a následně dochází v semenotvorných kanálcích k meióze ve vlnách po celý život samce. Samičí meióza je charakteristická tím, že začíná ještě v gestačním období plodu a následně dochází ke dvěma obdobím meiotického bloku. První meiotický blok trvá týdny až roky, v závislosti na druhu (Cohen a Holloway 2015) a nastává ještě před narozením samice (Hassold a Hunt 2001). Meióza se obnoví až před ovulací oocytu, ale k dokončení meiózy dochází až po oplození oocytu spermií (Cohen a Holloway 2015).

Na vývoj oocytů se podílí ovariální folikul. Folikul je označován jako funkční jednotka vaječníku (ovarium), která obsahuje oocyt obklopený granulozními buňkami a v pozdější fázi vývoje i thekálními buňkami. Granulozní a thekální buňky jsou somatické buňky, které podporují vývoj oocytu. Folikuly procházejí několika nevratnými přechody během folikulárního vývoje, které jsou souhrnně označovány jako folikulogeneze (Hannon a Curry 2018). Folikulogeneze nastává u hospodářských zvířat ve fetálním období, kdy primordiální zárodečné buňky migrují ze žloutkového váčku do primordiálních gonád. Zde začíná mitotická produkce zárodečných buněk a vznikají oogonie (Seneda et al. 2023). Folikuly se tvoří ze zárodečných buněk během vývoje plodu. Nejprve vzniká nejméně zralý typ folikulu označovaný jako primordiální folikul (Hannon a Curry 2018). Následně jsou skupiny oogonií obklopeny somatickými buňkami, utvářející kortikální provazce. Tyto provazce později tvoří primární folikuly (Seneda et al. 2023). Primární folikuly se nadále vyvíjejí a vznikají z nich sekundární folikuly (preantrální folikuly). Preantrální folikuly se pak vyvinou do antrálních folikulů (Hannon a Curry 2018) označovaných také jako zralé nebo preovulační. Pro antrální folikuly je charakteristické antrum, což je prostor ve folikulu vyplněný folikulární tekutinou, která se objevuje společně s intenzivní proliferací granulózních buněk (Seneda et al. 2023). V konečné fázi folikulogeneze dochází v antrálních folikulech ke změnám charakteru granulózních buněk, které přímo obklopují oocyt. Tyto buňky se označují jako kumulární buňky, které s oocytem tvoří komplex (cumulus oocyte complex – COC). COC vyčnívá do antra z vnitřních vrstev granulózních buněk a je obklopen folikulární tekutinou (Russell a Robker 2018). Vyvrcholením folikulogeneze je prasknutí preovulačního Graafova folikulu a uvolnění oocytu během procesu ovulace společně s vrstvou buněk corona radiata. Většina časných antrálních folikulů podléhá však atrézii, což je řízený proces odumírání folikulů zprostředkovaný apoptózou (Hannon a Curry 2018).

Folikulogeneze doprovází a podporuje oogenezi. Oogeneze je definována jako tvorba, vývoj a zrání oocytu. U savců je to proces, který je zahájen během vývoje plodu, ale dokončen

je až o mnoho let později v době oplodnění. Prekurzory oocytů jsou primordiální zárodečné buňky. Oogeneze se skládá z několika dílčích procesů včetně oocytogeneze (přeměna oogonie na primordiální oocyt), po které následuje vývoj primordiálního oocytu na primární oocyt (Triputani a Pangas 2013). U primárního oocytu, který je zastaven v meióze I (profáze), dochází k jeho diferenciaci a růstu. Během této fáze má oocyt velké neporušené jádro (zárodečný – germinální váček; GV) a tvoří nezbytné molekuly potřebné pro raný embryonální vývoj, včetně organel, metabolických substrátů, mRNA a různých proteinů. Období mezi profází I a metafází II se označuje jako meiotické zrání oocytů. Během této fáze dochází k molekulárním a fyziologickým změnám, které umožní přeměnu nezralého oocytu na zralé vajíčko zastavené v metafázi II. Po dokončení prvního meiotického dělení se oocyt označuje jako sekundární oocyt (Kline 2000).

3.3 Jaderné zrání oocytů

Primární oocyt postupuje první meiotickou profází až do stádia diplotene, kdy je první meiotické dělení přerušeno až do období puberty. S nástupem adolescence dochází k periodickému obnovení meiózy zahrnující jaderné modifikace, které se souhrnně označují jako jaderné zrání (Gilbert 2000). Oocyty v diplotenní fázi první meiotické profáze mají viditelné jádro v podobě zárodečného váčku. Po znovuzahájení meiózy podléhá zárodečný váček rozpadu (germinal vesicle breakdown – GVBD) (Grøndahl 2008), po kterém u myších oocytů dochází (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) k dlouhé prometafázi I. doprovázené kondenzací chromozomů a tvorbou dělícího vřeténka (Terret et al. 2003). Dále oocyt pokračuje v meiotickém zrání do stádia metafáze I (MI), anafáze I (AI) a telofáze I (TI) následované vydělením prvního pólového tělíska (Meinecke et al. 2001). K replikaci DNA po prvním meiotickém dělení nedochází. Poté navazuje druhé meiotické dělení a oocyty se zastaví v metafázi II (Terret et al. 2003). Meióza je dokončena po úspěšném oplodnění, doprovázené vydělením druhého pólového tělíska (Grøndahl 2008).

3.3.1 Rozpad zárodečného váčku (GVBD)

Obnovení meiotického zrání začínající rozpadem zárodečného váčku, je zahájeno vlivem působení předovulační vlny luteinizačnímu hormonu (LH) (Su a Eppig 2002). LH je glykoproteinový heterodimer, který je ve vlnách vylučován z adenohypofýzy a v předovulačním období dochází k jeho masivnímu uvolnění (Padmanabhan et al. 2018). Díky nárustu LH se zvyšuje množství receptorů pro tento hormon (LHR, LHCGR) (Arroyo et al. 2020). Tento receptor je exprimován v buňkách *theca folliculi interna*. U myších oocytů bylo prokázáno, že důsledkem LH vlny dochází ke snížení hladiny cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) (Shuhaibar et al. 2015). Cyklické nukleotidy se řadí mezi druhé posly, kteří rychle a účinně šíří informace přijaté buněčnými receptory. Tyto malé neproteinové organické molekuly nebo ionty vážou specifické cílové proteiny a mění jejich aktivitu různými způsoby, čímž umožní vhodnou reakci na informaci. Mezi druhé posly patří také lipidy, ionty (Newton et al. 2016), jako například Ca²⁺ (Rizzuto et al. 2012) volné radikály a plyny, také označované jako gasotransmittery (NO, CO a H₂S) (Newton et al. 2016). Díky komunikaci mezi occytem a kumulárními buňkami skrze mezerovité spoje (gap junctions) dochází k poklesu cGMP i

v oocytech a dochází tak k zahájení meiotického zrání (Shuhaibar et al. 2015). Pokles hladiny cGMP vyvolá aktivaci fosfodiesterázy 3 (PDE3) (Gershon et al. 2019), která začne hydrolyticky štěpit cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) (Vaccari et al. 2009).

Během inhibice aktivity enzymu fosfodiesterázy je vysoká hladina cAMP v oocytech udržována adenylylckylázou spřaženou s receptory (Hinckley et al. 2005). Adenylyltcykláza je enzym odpovědný za katalytickou přeměnu molekuly adenosintritrifosfátu (ATP) na cAMP (Khannpnavar et al. 2020). Aktivita tohoto enzymu, je iniciována spřaženým receptorem GPR3 (receptor spřažený s G proteinem) a G proteinem, který patří do skupiny nejrozmanitější třídy receptorů buněčného povrchu, zprostředkovávající působení různých hormonů. neurotransmiterů a senzorických stimulů aktivací G proteinů (Horner et al. 2003). G proteiny jsou molekulární spínače, které spouští intracelulární signální kaskády na základě aktivace receptorem (Oldham a Hamm 2008). U prasečích oocytů (Sus scrofa f. domestica Linnaeus, 1758) vedla nadměrná exprese GPR3 ke zvýšení aktivity Gs proteinu, což mělo za následek vyšší hladinu cAMP (Yang et al. 2012). Pokles cAMP vyvolá inaktivaci proteinkinázy A (PKA). PKA je serin/threonin kináza složená ze dvou katalytických podjednotek (C) udržovaných v neaktivním stavu ve spojení s dimerem regulační podjednotky (R). Vazba dvou molekul cAMP na každou regulační podjednotku umožňuje katalytickým podjednotkám disociovat a vede k fosforylaci substrátových proteinů (Wang et al. 2006). Kinázy katalyzují reverzibilní adici fosfátu na specifické zbytky (Saldanha a Tollefsbol 2018). Fosforylace je posttranslační modifikace, která může řídit funkci, konformaci a stabilitu proteinů. Fosforylace serinových, threoninových a tyrosinových zbytků je klíčovým přepínačem v mnoha signálních kaskádách (Parrish a Wang 2010).

Proteinkináza A nepřímo reguluje aktivitu faktoru podporujícího zrání (maturation promoting factor - MPF) (Jones 2004; Pirino et al. 2009), označováného také jako metafázi (M fázi) podporující faktor (Naito et al. 2010). MPF je komplex cyklinu B, cyklin-dependentní kinázy CDK1, která je též označována jako p34cdc2 (Wu et al. 1997), nebo cdc2 (Tang et al. 2008) a Greatwall kinázy (Kishimoto 2015). Komplexy CDK/cyklin vyžadují fosforylaci konzervovaného threoninového zbytku v CDK1 pro plnou katalytickou aktivitu, jelikož vazba CDK s příslušným cyklinem vede pouze k částečné aktivaci komplexu (Camins et al. 2013). Pro aktivaci je významná Wee1 kináza, která fosforyluje CDK1 na threoninové a tyrozinovém zbytku (Thr14 a Tyr15) (Schmidt et al.2017). Zároveň je inaktivace MPF podpořená inhibicí defosforylační aktivity fosfatázy cdc25. Po poklesu hladiny cAMP a následném poklesu aktivity PKA, se cdc25 fosfatáza přesouvá do jádra, kde může defosforylovat CDK1 na Thr14 a Tyr15, tím aktivovat MPF (Pirino et al. 2009). Možná role serin/threoninové (Yu et al. 2004) Greatwall kinázy byla vysvětlována na modelu prasete. Její lokalizace byla detekována v jádře GV, kde pravděpodobně inhibuje aktivitu fosfatázy A2 (PPA2) (Li et al. 2013), která je u vajíček drápatky vodní (Xenopus laevis (Daudin, 1802) známá pro své inhibiční účinky na fosfatázu cdc25 (Clarke et al. 1993). Aktivace MPF vede ke znovuzahájení meiózy a rozpadu zárodečného váčku (Pirino et al. 2009)

Snížená aktivitou PKA je spojována, s cytoplazmatickou polyadenylací mRNA a následnou translací protoonkogenového produktu, proteinu c-Mos (Lazar et al. 2002). Mos je serin/threonin kináza, která je exprimována ve vysokých koncentracích v zárodečných buňkách a hraje klíčovou roli během zrání oocytů (Gebauer a Richter 1997). Mos je aktivátor MAPK kinázy (mitogenem aktivované protein kinázy), prostřednictvím přímé fosforylace kinázy MEK

(MAP/ERK kináza) (Dupré et al. 2011). MAPK kinázy, které se také nazývají extracelulárně regulované kinázy (ERK), jsou Ser/Thr proteinkinázy, které pro plnou aktivaci vyžadují duální fosforylaci na threoninových a tyrosinových zbytcích (Fan et al. 2002). Předpokládá se, že signální dráha Mos/MEK/MAPK je kritickým regulátorem meiotických dělení (Dupré et al. 2011). V prasečích oocytech je MAPK aktivována současně s MPF během GVBD. Nicméně, její aktivace není nezbytná pro aktivaci MPF ani pro zahájení GVBD (Ye et al. 2003).

3.3.2 Metafáze I

MPF a MAPK úzce spolupracují a hrají klíčovou regulační roli v procesu meiotického zrání. Obecně pro zrání oocytů platí, že mezi meiózami dochází k inaktivaci MPF, zatímco aktivita MAPK zůstává vysoká (Fan et al. 2002). Jejich společná aktivita podporuje stabilizaci cyklinu B1, který je následně k dispozici pro udržení a navýšení aktivity CDK1. Přetrvávající aktivita MAP kinázy je odpovědná za stabilizaci kontrolního bodu pro sestavení dělícího vřeténka (spindle assembly checkpoint - SAC) (Nabti et al. 2014).

Během mitózy se chromozomy s mikrotubuly dělícího vřeténka připojují pomocí speciální struktury nazývané centromera. Centromera reguluje sestavení proteinových struktur zvaných kinetochory, které se s centromerou spojují. Kinetochory následně interagují s mikrotubuly dělícího vřeténka, čímž se zajistí zarovnání a následná segregace chromozomů (Cheeseman a Desai 2008). Kinetochory jsou v první meióze na homologních chromozomech zachyceny mikrotubuly ze shodného pólu, což zapříčiní oddělení homologních chromozomů. Toto monopolární připojení je odlišné od mitotického dělení a druhého meiotického dělení, při kterém dochází k bipolárnímu připojení kinetochorů sesterských chromatid zachycených mikrotubuly z opačných pólů vřeténka (Watanabe 2006).

SAC zajišťuje, aby přechod z metafáze I do anafáze I nenastal dříve, než se vytvoří silná a stabilní vlákna kinetochorů (Hached et al. 2011). Při selhání SAC může docházet k chybné segregaci chromozomů, jejíž důsledkem je tvorba aneuploidní embryí s vážnými vrozenými vadami (Wassmann et al. 2003). Jádrem SAC je komplex mitotických kontrolních bodů (MCC) (Lane a Kauppi 2019). Jednou ze složek SAC komplexu je protein Mad2 (mitotic arrest deficient 2) (Li a Murray 1991)), který hraje klíčovou roli během meiózy I. Již v prometafázi se nachází na nepřipojených kinetochorech a zodpovídá za správnou separaci homologních chromozomů (Wassmann et al. 2003). Při následné interakci kinetochorů s mikrotubuly již není protein Mad2 na kinetochorech přítomen (Hached et al. 2011). Za distribuci proteinu Mad2 na kinetochorech odpovídá kontrolní kináza SAC Mps1 (monopolar spindle 1, monopolární vřeténko 1) (Musacchio a Salmon 2007), jejíž aktivita je fosforylačně řízená MAPK (Nabti et al. 2014) Další člen kontrolních kináz komplexu SAC je Bub1 (Musacchio a Salmon 2007) (budding uninhibited by benzimidazole 1, tedy pučení neinhibované benzimidazolem 1 (Yin et al. 2006)), která je odpovědná za správné zarovnání chromozomů (Nabti et al. 2014). Za korektní lokalizaci Bubl pravděpodobně zodpovídá aktivita enzymu Aurora C, která se vyskytuje v metafázi I na osách chromozomů a centromerách, přičemž v následné MII fázi je přítomná pouze na centromerách. Její aktivitou brání abnormálnímu připojení kinetochorů s mikrotubuly, předčasné segregaci chromozomů a selhání cytokineze v meióze I, které by vedlo k aneuploidii (Yang et al. 2010). A v neposlední řadě, je pravděpodobně nezbytná aktivita

Greatwall kinázy k inhibici fosfatázy PP2A pro správné sestavení vřeténka během meiotického zrání (Li et al. 2013)

CDK1 a MAPK působí komplementárním způsobem během prometafáze I, aby omezily aktivitu APC/C. (Nabti et al. 2014). Stejně tak komplex mitotických kontrolních bodů (MCC) reguluje aktivitu APC/C (Lane a Kauppi 2019). Konkrétněji byla popsána inhibice aktivity APC/C, za kterou odpovídal právě protein Mad2 (Niault et al. 2007) a kináza Bub1 (McGuinness et al. 2009).



Obrázek 1 Aktivita MPF a MAPK v průběhu meiotického zrání myších oocytů (upraveno v Krita editoru podle Brunet a Maro 2005).

3.3.3 Anafáze I

Komplex podporující anafázi APC/C je komplexní a hlavní ubikvitinová ligáza, která se zaměřuje na proteiny související s buněčným cyklem, jako jsou například cykliny a sekurin, které jsou poté degradovány v proteazomu (Acquaviva a Pines 2006). V eukaryotních buňkách je využíván ubikvitin jako marker, který slouží jako značka pro proteiny, které musí projít proteolýzou. Takové polyubikvinované proteiny jsou rozpoznávány a degradovány velkým komplexem proteáz s více podjednotkami, nazývaným proteazom (Cooper 2000).

Pokles hladiny cyklinu B, a tedy snížení aktivity MPF, je nezbytné pro přechod mezi metafází I (MI) a anafází I (AI). V případě myších oocytů, byl navržen model, kdy jsou po aktivaci APC/C během přechodu MI-AI degradovány cykliny B1 a B2, čímž dochází k aktivaci separázy. Komplex cyklinB2/CDK1 inhibuje separázu prostřednictvím inhibiční fosforylace (Li et al. 2019). Separáza je velká cysteinová proteáza s N-koncovou helikální oblastí, Ckoncovou katalytickou oblastí a nestrukturovaným regulačním segmentem mezi nimi (Luo a Tong 2021). Aktivace separázy vede ke štěpení kohezinu (Rattani et al. 2016). Koheziny jsou multiproteinové komplexy, které jsou odpovědné za soudržnost sesterských chromatid, která je vytvořena během replikace DNA (Brooker a Berkowitz 2014). Komplexy kohezinu obsahující Rec8 (kohezinová alpha-kleisinová podjednotka) zajišťují kohezi sesterských chromatid distálně od chiasmat, která drží bivalenty pohromadě během metafáze I. Aktivace separázy pomocí APC/C, která nastává v okamžiku zarovnání bivalentů a inaktivace SAC, spouští oddělení bivalentů vyvolané selektivní ztrátou kohezinu z chromozomových ramen. To je doprovázeno rozdělením chiasmat v anafázi I. Vznikají tak univaletní chromozomy obsahující pár homologních chromatid. Ty jsou spojené výhradně kohezí sesterských centromer, též iniciovanou komplexy kohezinu obsahující Rec8. Zahájení štěpení podjednotky Rec8 je nezbytné pro přechod z metafáze (I/II) do anafáze (I/II), což bylo potvrzeno například u oocytu myši (Kudo et al. 2006) či oocytu prasete (Huo et al. 2006).

U myšího modelu bylo prokázáno, že i bez přítomnosti cyklinu B1 nastala inhibice separázy, cyklin B může být nahrazen cyklinem jiným. Což může poukazovat na společné funkce cyklinových komplexů a potenciální překryv funkcí komplexů. Dále byla předpokládána různorodá funkce cyklinu B. Například cyklin B2 v komplexu s CDK1 interaguje se separázou pomocí přímé vazby. V případě cyklinu B3 se předpokládala schopnost dopomáhat meiotickému přesunu mezi MI a AI (Li et al. 2018). Přesný mechanismus zahrnoval buďto modulaci APC/C specifitu per se, nebo regulaci či kolokalizaci přebytků substrátu cyklinu B1 a sekurinu. Přesto se předpokládá, že cyklin B3 tvoří s CDK1 komplex (Karasu et al. 2019), který má specifické a odlišné substráty od komplexů cyklin B1/CDK1 a cyklin B2/CDK1 (Li et al. 2019).

Dalším regulátorem separázy je sekurin (Li et al. 2019). Jedná se o inhibiční chaperon, který se váže na separázu kotranslačně a stabilizuje separázu až do nástupu anafáze, kdy je sekurin zničen proteazomem (Luo a Tong 2021). Za jeho akumulaci během prometafáze I zodpovídá aktivita CDK1 nebo MAPK (Nabti et al. 2014). Sekurin se pravděpodobně vyskytuje i ve volném nenavázaném stavu. Tato volná forma musí být degradována v prometafázi I a vázaná forma na separáze je následně degradována v metafázi. Je pravděpodobné, že APC/C preferenčně cílí na fenylalaninové zbytky nenavázaného sekurin, které jsou pravděpodobně maskovány v sekurinu vázaném na separázu. Touto strategií je zachován sekurin vázaný na separázu, což pravděpodobně umožňuje přepínači podobnou aktivaci separázy, která je nezbytná pro přechod do anafáze. Jedná se o pojistku, aby nebyl APC/C přehlcen substrátem a nedošlo tak k zástavě v metafázi I (Thomas et al. 2021).



Obrázek 2 Regulace aktivity separázy v průběhu meiotického zrání (upraveno v Krita editoru podle Wassmann 2022)

3.3.4 Metafáze II

Oocyty se v buněčném cyklu nikdy nezastavují v anafázi nebo telofázi (Hirao et al. 1995) a tak po separaci homologních chromozomů, následované vydělením prvního pólového tělíska, pokračuje zrání vstupem do meiózy II (Terret et al. 2003). Tento přechod je umožněn koordinovanou aktivitou kináz cdc2 a Mos, které řídí stabilitu proteinu Emi2 (Tang et al. 2008) (early mitotic inhibitor 2, časný mitotický inhibitor) (Nabti et al. 2014). Emi2 je regulátor APC/C, který je během meiozy I udržován na nízké úrovni pomocí fosforylační aktivity komplexu cdc/cyklinu B, což je nutné pro výstup z meiozy I. Před nástupem anafáze I jsou hladiny proteinu Emi2 udržovány destabilizací zprostředkovanou cdc2 kinázou. Aktivace APC pak vede ke snížení aktivity cdc2 kinázy, protože hladiny cyklinu B klesají. Jakmile je vytvořena metafázní destička a chromozomy jsou správně připojeny k vřeténku, signál kontrolního bodu dělícího vřeténka se rozptýlí, což vede k aktivaci APC a degradaci cyklinu B. Teprve poté je Emi2 schopen se akumulovat, čímž se zabrání úplné degradaci cyklinu B. Dochází k přímému přechodu přímo meiózy II, bez předchozího nástupu. Tento kontrolní bod vede k inhibici APC, dokud se nevytvoří metafázní destička I, což umožňuje konstitutivně vysokou aktivitu cdc2 kinázy a následně rychlý obrat Emi2. Zároveň je nezbytná pro včasnou akumulaci Emi2 aktivita Mos. Mos zajišťuje vazbu fosfatázy PP2A s Emi2, čímž dochází pouze k neúplné degradaci B, jelikož cestou Mos-PP2A se katalyzuje defosforylační stav Emi2 a tím se tak může Emi2 akumulovat a účinně inhibovat APC (Tang et al. 2008). Neúplná degradace cyklinu v meióze I se předpokládá u cyklinu B1 (Li et al. 2021). Též tento stav napomáhá při blokování nástupu S fáze po prvním meiotickém dělení a podpoře vstupu do meiózy II (Tang et al. 2008). Odhaduje se, že zbytek hladiny cyklinu B1 je nezbytný pro rychlou reaktivaci CDK1, při přechodu z meiózy I do meiózy II. Pro snadnou reaktivaci CDK1 po vstupu do meiózy II přispívá pravděpodobně také reakumulace cyklinu B2, který v komplexu s CDK1 může udržovat inhibovanou separázovou aktivitu, a tedy zabraňuje v segregaci sesterských chromatid (Li et al. 2021).

Oocyty jsou následně zastavené v metafázi II, působením aktivity cytostatického faktoru (CSF). Jeho aktivita v druhém meiotickém bloku zajišťuje vysokou hladinu MPF do oplození, po oplození je CSF inaktivován. Pojem cytostatický faktor neoznačuje pouze jednu molekulu. Jedním z komponentů CSF je považován například protein Mos (Tunquist a Maler 2003). Dalším z komponentů, nezbytných pro aktivní CSF je Emi2 (Hansen et al. 2006). Aby se udržela aktivita CSF, musí protein Emi2 inhibovat aktivitu APC/C (Wu a Kornbluth 2008), prostřednictvím sekvestrace adaptoru Cdc20 (Shoji et al. 2006). Pro udržení CSF se opět zapojuje dráha Mos (Mos-MEK-MAPK-Rsk), která podporuje vazbu PP2A s Emi2 a udržuje tak defosforylovaný stav Emi2 na N-konci. V opačném případě dochází k fosforylaci na tomto místě prostřednictvím komplexu Cdc2/ cyklin B, čímž by docházelo k ubikvitinaci tohoto konce a následně k degradaci Emi2. Těmito procesy vyvažování účinku jak PPA2, tak cdc2 podněcuje stabilitu Emi2. Jelikož degradací Emi2 dochází ke zmírnění inhibice APC/C, i když je oocyt stále v bloku MII. Avšak, dochází díky tomu k určité úrovni degradace cyklinu B. Klesající hladiny snižují fosforylační aktivitu cdc2, což napomáhá převaze defosforylovaného stavu Emi2, indukovaného PPA2. Výsledkem je stabilizovaný stav Emi2, který inhibuje aktivitu APC/C a nenastává výstup z bloku MII (Wu a Kornbluth 2008).

U prasečích oocytů se i v případě metafáze II předpokládala nezbytná aktivita Greatwall kinázy, která inhibuje fosfatázu PP2A (Li et al. 2013)

Pro přesun MII-AII byla u myších oocytů nezbytná degradace cyklinu B2 (Li et al. 2021) a v případě cyklinu B1, byla degradace urychlena elevací Ca^{2+} , která nastává až při oplození (Hyslop et al. 2004). U aktivovaný prasečích oocytů bylo popsáno narušení cyklinu B1 zprostředkované aktivitou kalmodulin dependentní proteinkinázy II (CaMKII) (Ito et al. 2004). Jedná se o člena kalmodulin kináz, které jsou klasifikovány jako serin/threonin kinázy, jejíchž aktivace je z počátku závislá na vazbě Ca^{2+} /kalmodulinu (Swulius a Waxham 2008). U myších oocytů byl navržen model, při kterém aktivace CaMKII (γ izoforma), prostřednictvím zvýšené hladiny Ca^{2+} při oplození, iniciovala znovuzahájení buněčného cyklu a následný výstupu z metafáze II, doprovázeno snížení aktivity MAPK a MPF (Backs et al. 2010).

3.4 Cytoplazmatické zrání oocytů

Kromě jaderných změn zahrnuje zrání oocytů také mnoho dalších intracelulárních změn (Sathananthan et al. 1985). Cytoplazmatická maturace zahrnuje soubor procesů modifikujících cytoplazmu (Grøndahl 2008). Mezi obnovením a následném zatavením meiózy probíhá cytoplazmatické reorganizace (Van Blerkom a Runner 1984). Buněčný obsah se při dělení musí asymetricky distribuovat tak, aby se cytoplazmatické materiály udržely v oocytu, a tak následně podpořily vývoj embrya (Larson et al. 2010). Během zrání oocytů, dochází ke změnám v kortexu, který zahrnuje oolemu (plazmatickou membránu (Calvert et al. 2003) a blízkou subkortikální oblast včetně cytoskeletu a cytoplazmatických složek, které jsou polarizovány k této oblasti sousedící s oolemou. Mezi změny se řadí pohyby organel a cytoskeletu, stejně jako změny v oolemě a regionálně lokalizovaných proteinech (McGinnis et al. 2018).

3.4.1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou organely, které se úzce zapojují do buněčné homeostázy. Kromě hlavní role v buněčném energetickém metabolismu, se mitochondrie podílejí na řadě dalších pochodů, jako je intracelulární signalizace, apoptóza, intermediární metabolismus a metabolismus aminokyselin, lipidů, cholesterolu, steroidů či nukleotidů (Chinnery a Schon 2003). Ze strukturního hlediska jsou mitochondrie popisovány jako organely s dvěma membránami, které oddělují čtyři odlišné kompartmenty, kterými jsou vnější membrána, mezimembránový prostor, vnitřní membrána a matrix mitochondrie (McBride, et al. 2006).

U prasečích oocytů byla popsána submembránová agregace mitochondrií a jejich akumulace v oblasti zárodečného váčku. Předpokladem relokalizace mitochondrií je pravděpodobný podíl na rozpadu zárodečného váčku a tvorbě dělícího vřeténka. Po GVBD, ve fázi MI a AI, se mitochondrie hromadí v perinukleární oblasti a kolem vřeténka. Mitochondrie, které po prvním dělení zůstaly v oocytu, následně obklopují vznikající druhé meiotické vřeténko. Ve fázi MII jsou mitochondrie již homogenně distribuovány v cytoplazmě (Sun et al. 2001; Dalton a Carroll 2013).

Základem pro reorganizaci a shlukování mitochondrií v myších oocytech je remodelace kortikální aktinové sítě (Yu et al. 2010). Dle Dalton a Carol (2013) se na interakci mitochondrií s dělícím vřeténkem podílejí proteinové motory kinesin a dynein. Stejně tak u lidských oocytů transport mitochondrií během zrání probíhá pomocí mikrotubulů ukotvených k mikrofilamentům situovaných v subkortikálních oblastech (Takahashi et al. 2016). V případě prasečích oocytů, se předpokládalo, že translokace mitochondrií probíhá prostřednictvím mikrotubulů (Sun et al. 2001). Výsledky práce Yamochi et al. (2016) poukazují však na nezbytnost a zapojení především aktinových filament. Je tedy možné, že komponenty cytoskeletu zapojené do pohybu mitochondrií se mohou dynamicky měnit dle fáze meiotického zrání oocytů.

Agregace mitochondrií kolem perinkuleární oblasti v metafázi I a anafázi I je u prasečích oocytů vysvětlována vysokou energetickou potřebou pro meiotické děje, jako je sestavení vřeténka, kondenzace a pohyb chromozomů a emise pólového tělíska (Sun et al.2001). ATP (adenosintrifosfát) je zdrojem energie prakticky pro všechny aktivní metabolické procesy v buňce. ATP syntáza, neboli-komplex V (Chinnery a Schon 2003), na vnitřní membráně mitochondrií syntetizuje ATP z adenosindifosfátu (ADP) a anorganického fosfátu (Shoubridge a Wai 2007). Komplex V pro tuto syntézu využívá protonový gradient, který je vytvářen přesunem elektronů po chemickém gradientu mezi komplexy dýchacího řetězce, jehož je komplex V součástí (Chinnery a Schon 2003). Yu et al. (2010) u myších oocytů popisují korelaci mezi redistribucí mitochondrií se změnami hladin ATP. První zvýšení hladiny cytosolického a mitochondriálního ATP nastává přibližně v době rozpadu zárodečného váčku. Druhé během migrace vřeténka a třetí během přechodu MI na MII. Předpokládá se, že změny distribuce a agregace mitochondrií, časově korelují se změnami v produkci ATP (Yu et al. 2010).

Za regulaci funkcí mitochondrií, včetně produkce ATP, je odpovědná mitochondriální hladina Ca²⁺ (Rizzuto et al. 2012). Pro udržení homeostázy musí mitochondrie přesně vyvážit příjem, distribuci a uvolňování Ca2+ do nebo z mitochondriální matrix. Ca2+ se v mitochondriální matrix ukládá ve formě fosforečnanu vápenatého (MacEwen a Sancak 2023). Tato mitochondriální pufrovací schopnost může být využita k regulaci cytoplazmatické hladiny Ca²⁺ pomocí různých mechanizmů. Buďto mohou být řízeny kinetické vlastnosti Ca²⁺ kanálů, nebo může být regulována difúze Ca^{2+} z oblasti, ve které se nacházejí otevřené iontové kanály. Mitochondriální redistribuce se zdá být klíčová může být klíčová pro omezení Ca²⁺ signálu na určitou subcelulární úroveň buněčných domén (Rizzuto et al. 2012). Perinukleární shlukování mitochondrií v prasečích oocytech je zřejmě důležité pro fázi GVBD, kvůli schopnosti modulovat lokální koncentraci volného Ca²⁺ (Sun et al. 2001). U myších oocytů byly porovnány hladiny Ca^{2+} v matrix mitochondrií ([Ca^{2+}]m) s cytoplazmatickou hladinou Ca^{2+} ([Ca^{2+}] i). Zatímco [Ca2+]m reguluje mitochondriální aktivitu pro doplnění energie. Oscilace cytoplazmatické hladiny [Ca2+]i je odpovědná za elevaci cytoplazmatického Ca2+ během aktivace oocytů, čímž pravděpodobně synchronizuje doplnění mitochondriální energie, tvorbu a zachování vřeténka, stejně jako další buněčné děje během aktivace oocytů. Také byl potvrzen vztah [Ca²⁺]m s proteinem kalmodulinem CaM (kalmodulin 2), u kterého se obecně předpokládá distribuce do míst kolem organel senzitivních na Ca²⁺. Výsledky prokázaly, že kalmoduliny CaM1 a CaM2 byly lokalizovány u vřeténka. Očekává se, že CaM2 se přímo podílí na tvorbě vřeténka, což dokazovala lokalizace kalmodulinu na vřeténku. Po aktivaci oocytu se CaM2 pravděpodobně spojí s vřetenem až do druhé extruze pólového tělesa (Wang et al. 2020).

3.4.2 Endoplazmatické retikulum

Endoplazmatické retikulum (ER) je organela tvořená trojrozměrnou sítí propojených membránových tubulů a cisteren v buněčné cytoplazmě (Baumann a Walz 2001). ER obsahuje domény, které jsou v kontaktu s plazmatickou membránou (PM) a dalšími organelami včetně Golgiho aparátu, endozomů, mitochondrií, lipidových granulí a peroxisomů. Kontaktní místa ER s jinými organelami a PM jsou rozptýlená po celé cytoplazmě, což ovlivňuje celkovou architekturu ER (English a Voeltz 2013). U prasečích oocytů byla popsána homogenní distribuce ER v GV stádiu s jasnými shluky na periferii. Oproti stádiu GV v prometafázi I shluků ER ubývá. V periferní části cytoplazmy shluky ER tvoří tenkou vrstvu pod oolemou. V centru cytoplazmy je distribuce rovnoměrnější a v blízkosti chromozomů ani v pólovém tělísku se ER shluky nevyskytují. V metafázi II vrstva ER vytváří jemnou retikulární síť pod plazmatickou membránou, zatímco v centrální cytoplazmě změny v distribuci nenastávají (Maeda a Yagyu 1997).

Za akumulaci ER kolem vřeténka ve fázi GVBD a shlukování ER charakteristické pro MII fázi jsou u myších oocytů odpovědné mikrotubuly a proteinový motor dynein. Reorganizace ER řízená dyneinem je jen prvním krokem k vytvořením kortikálních ER shluků. Následné shlukování ER, charakteristické pro MII fázi, je však řízeno odlišnou složkou cytoskeletu a to mikrofilamenty. Předpokládá se, že hustá aktinová síť v kortikální oblasti slouží k ukotvení shluků (FitzHarris et al. 2007).

Endoplazmatické retikulum bývá rozdělováno do určitých domén, které představují jaderný obal, drsné a hladké endoplazmatické retikulum (Baumann a Walz 2001). Funkce drsného plazmatického retikula spočívá v produkci proteinů prostřednictvím ribozomů. Výsledný protein vytvořený komplexem mRNA/ribozom je vložen do lumen retikula. Dále ER odpovídá za správné zabalení proteinu a jeho zpracování pro transport do Golgiho aparátu. Také se podílí na produkci integrálních proteinů buněčných membrán a je místem produkce lipidů pro ostatní buněčné membrány. Oproti tomu hladké endoplazmatické retikulum postrádá ribozomy, tudíž se neúčastní produkce proteinů. Podílí se především na metabolismu lipidů, produkci steroidů, odbourávání glykogenu a detoxikaci buňky (Muffly 2007). Jemná struktura endoplazmatického retikula je dána typem buňky a závisí na tom, které funkce v buňce převládají (Baumann a Walz 2001). Specializované hladké endoplazmatické retikulum (sarkoplazmatické retikulum – SR) je obsaženo například v příčně pruhovaném svalu, kde je jeho hlavní funkcí uvolňování Ca²⁺ pro indukci svalové kontrakce (Muffly 2007). V nezralých i zralých lidských oocytech byly identifikovány a lokalizovány proteiny kalretikulin a kalsekvestrin, které hrají důležitou roli při ukládání Ca²⁺ v lumen ER a SR. Též byl detekován1,4,5-trifosfátový receptor (InsP3R-2) a ryanodinový receptor (RyR), což jsou kanály, které jsou odpovědné za uvolňování Ca²⁺ spojené s ER/SR. Oocyty představují jedinečné buňky, které pro Ca²⁺ homeostázu a signalizaci vyžadují oba typy těchto Ca²⁺ vazebných proteinů (Balakier et al. 2002). Vytvoření vrstvy ER v periferní části cytoplazmy, která vzniká během meiotického zrání, je nezbytné pro fertilizaci prasečích oocytů, jelikož úzce souvisí s okamžitým nárůstem intracelulárního Ca²⁺ a exocytózou kortikálních granulí při oplodnění (Maeda a Yagyu 1997). ER je nezbytné pro aktivaci oocytů (Feitosa et al. 2020). Pro dokončení meiózy a další vývoj je přítomnost Ca²⁺ nezbytná (Kline 2000). Zvýšená hladina intracelulárního Ca^{2+} je iniciována specifickou fosfolipázou C zeta (PLC ζ), která se uvolňuje

do cytosolu oocytu při fúzí oocytu se spermií. Tím aktivuje fosfoinositidovou dráhu v oocytu a uvolní Ca^{2+} z ER (Martín-Romero et al 2012). Fosfolipáza hydrolyzuje membránový lipid fosfatidylinositol-4,5bifosfát (PIP₂), za vzniku druhého posla, inositol 1,4,5-trifosfátu (IP₃). Dalším produktem hydrolýzy je diacylglycerol (DAG) (Kline 2000), který zůstává v blízkosti plazmatické membrány a může buďto aktivovat proteinkinázu C (PKC) nebo je metabolizován (Bootman et al. 2002). IP₃ se následně váže s vysokou afinitou ke svému receptoru, což je vápníkový kanál, který prochází membránou zásobáren vápníku vytvořených z endoplazmatického retikula (Kline 2000). Tím se generuje fertilizační vlna Ca^{2+} (Martín-Romero et al 2012), která moduluje aktivitu proteinů odpovědných za exocytózu kortikálních granulí (Abbott a Ducibella 2001).

3.4.3 Golgiho aparát

Golgiho aparát je organela odpovědná za následné třídění a balení komponent tvořených ER, které jsou následně určené pro začlenění do jiných organel nebo pro přesunu na povrch buňky, k následnému vyloučení (Muffly 2007). Golgiho aparát má svou specifickou strukturu, obsahuje zploštělé membránové útvary zvané cisterny, které se na sebe vrství a tím utváří sloupce. U obratlovců jsou sloupce obvykle spojeny tak, aby vytvořily Golgiho pás (Lowe 2011). Rozděluje se na cisterny tvořící konvexní (cis) a konkávní (trans) plochu. Cis plocha je orientována směrem k endoplazmatickému retikulu a její hlavní úlohou je modifikovat, třídit a balit proteiny přenášené z ER. Během migrace přes Golgiho aparát probíhá několik různých chemických procesů, jako je například glykosylace nebo sulfatace. Trans plocha Golgiho aparátu je tvořen systémem mikrotubulů a váčků, které ve spojení s molekulárními motory posouvají obsah na buněčný povrch nebo jiné organely (Muffly 2007).

Stejně jako v případě mitózy (Thyberg a Moskalewski 1999), Golgiho cisternové shluky neboli "mini – Golgi" (Moreno et al. 2002) se během meiotického dělení fragmentují. U bovinních oocytů (*Bos taurus* Linnaeus, 1758) jsou Golgiho váčky nebo mini-Golgi ve stádiu GV distribuovány rovnoměrně po cytoplazmě a obklopují jádro. Následně v období GVBD migrují směrem ke kortikální oblasti. V kortikální oblasti dochází k fragmentaci a ložiska se před dosažením stádia MII rozmístí po celé cytoplazmě. Předpokládá se, že za ukotvení organel do fáze GVBD je odpovědná činnost mikrotubulů a dyneinu. Za fragmentaci a distribuci v cytoplazmě po stádiu GVBD, je odpovědná aktivita kinázy cdc2A (Racedo et al. 2012). Distribuce mini-Golgiho shluků v cytoplazmě oocytů ve stadiu GV, byla popsána též u oocytů myši a makaka královského (*Macaca mulatta* Linnaeus, 1758) (Zimmermann, 1780)). Zároveň bylo prokázáno, že funkční membránový transport Golgiho aparátu je po GVBD nezbytný pro další průběh zrání (Moreno et al. 2002).

Bylo potvrzeno, že pro meiotické zrání myších oocytů je důležitá nejen de novo syntéza proteinů, ale také jejich modifikace a distribuce proteinů na vhodné místo (Moreno et al. 2002). Například, u proteinu GM130, který je součástí cis-matrice Golgiho aparátu, se předpokládá regulační role v organizaci meiotického vřeténka. Společná lokalizace GM130 s MEK1/2 na obou pólech vřetének naznačuje, že protein GM130 slouží k regulaci a organizaci mikrotubulů a účastní se signální dráhy mitogenem aktivované proteinkinázy MAPK. Mohl by tak hrát roli v asymetrickém dělení během zrání myších oocytů (Zhang et al. 2011). Novější studie na myším modelu však zásadní roli GM130 neprokázaly. Předpokládá se tedy, že na udržení meiotického

zrání se podílí další proteiny, které mohou kompenzovat případnou ztrátu GM130 (Jiang et al. 2020).

3.4.4 Kortikální granula

Golgiho komplex společně s ER během časného zrání vytváří kortikální granula (Sathananthan et al. 1985), což jsou membránou ohraničená specializovaná sekreční granula (Schuel 1978). U prasečích oocytů ve fázi GV se vyskytují v kortikální oblasti (Wang et al. 1997) nebo po celé cytoplazmě (Kim et al. 1996). Po rozpadu zárodečného váčku migrují těsně pod oolemu, kde tvoří souvislou vrstvu. Tato migrace je dokončena ve stádiu MI (Wang et al. 1997). Na přesunu kortikálních granulí do kortexu prasečích oocytů se podílí mikrofilamenta (Kim et al. 1996). Úlohou kortikálních granulí je iniciace kortikální reakce, která nastává po fúzi spermie a oocytu. Při kortikální reakci dochází k fúzi plazmatické membrány s membránou granulí a uvolnění obsahu kortikálních granulí do perivitelinního prostoru, který se nachází (Wassarman a Litscher 2022; Kim et al. 1996) mezi oolemmou a vrstvou zona pellucida (Talbot a Dandekar 2003). Obsah granulí poté interaguje s vrstvou zona pellucida, mění její vlastnosti (Sun 2003) a indukuje tak zonální reakci (Wassarman a Litscher 2022), čímž se zabrání polyspermické penetraci (Sun 2003). Zona pellucida je extracelulární matrix složená ze tří glykoproteinů, kterými jsou ZP1, ZP2 a ZP3. Poté, co dojde k degradaci membrány spermií během akrozomální reakce, udržuje vazba na ZP2 kontakt mezi spermií a oocytem (Jones a Lopez 2014). U myších oocytů bylo popsáno blokování vazby spermií prostřednictvím proteinu kortikálních granulí, ovastacinu (Burkart et al. 2012). Tento člen astacinové rodiny metaloproteináz (Felten et al. 2024) se uvolňuje z kortikálních granul po oplodnění a následně štěpí glykoprotein ZP2. Proteolýza trvá několik hodin a brání vazbě spermií na zona pellucida. Tento postfertilizační blok brání polyspermické aneuploidii, která ohrožuje přežití embrya (Burkart et al. 2012).

Savčí oocyty získávají schopnost podstoupit kortikální reakci během meiotického zrání. Kortikální reakce oocytů je pravděpodobně zprostředkována aktivací inositolfosfátové kaskády, tedy generováním druhého posla IP₃ a DAG, což iniciuje nárůst hladiny Ca²⁺ a aktivaci proteinkinázy C (PKC), která se podílí na fúzi membrán granul a oolemy. Ač se očekávala možná funkce spínače transdukce vápníkového signálu kinázy CaMKII (Sun 2003), Backs et al. (2010) považuje exocytózu kortikálních granulí a následnou blokaci polyspermie, za na CaMKII nezávislou (Backs et al. 2010). Stejně tak PLCζ může potenciálně ovlivnit následné události při aktivaci vajíčka, jako je právě exocytóza kortikálních granulí (Saleh et al. 2020).



Created in BioRender.com bio

Obrázek 3 Změny během cytoplazmatickém zrání oocytu (vlastní ilustrace vytvořena v Biorender.com a Krita editoru). Zleva GV – mitochondrie se akumulují v oblasti zárodečném váčku (prase; Sun et al.2001), endoplazmatické retikulum se homogenně distribuuje s utváří shluky na periferii oocytu (prase; Maeda a Yagyu 1997), Golgiho aparát-váčky jsou homogenně distribuovány a obklopují jádro (skot; Racedo et al. 2012), kortikální granula se lokalizují v kortikální oblasti nebo po celé cytoplazmě (prase; Kim et al. 1996; Wang et al. 1997); MImitochondrie se po GVBD hromadí kolem vřeténka a perinukleární oblasti (prase; Sun et al. 2001), endoplazmatické retikulum po GV ubývají hluky a začíná se tvořit tenká vrstva pod oolemou (prase; Maeda a Yagyu 1997), Golgiho aparát-fragmenty se po GVBD fázi přesouvají ke kortikální oblasti, kde dochází k fragmentaci (skot; Racedo et al. 2012), kortikální granula po GVBD fázi migrují těsně pod oolemu kde tvoří souvislou vrstvu (prase; Wang et al. 1997); MII-mitochondrie se homogenně distribuují v cytoplazmě (prase; Sun et al. 2001), endoplazmatické retikulum utváří retikulární síť pod oolemou, zatímco v cytoplazmě se distribuce nemění (prase; Maeda a Yagyu 1997), Golgiho fragmenty do MII fáze se distribuují po celé cytoplazmě (skot; Racedo et al. 2012), kortikální granula po přesunutí k oolemě, při MI fázi, zůstávají (prase; Wang et al. 1997).

3.5 Tetraspaniny

Tetraspaniny jsou rodina membránových proteinů, které jsou zastoupeny v celé fylogenezi mnohobuněčných organismů (Wright et al. 2004). Klíčovou funkcí přisuzovanou tetraspaninům je organizovat rozsáhlé sítě transmembránových a cytoplazmatických proteinů v plazmatické membráně (He et al. 2009). Tetraspaniny CD9, CD81 a CD151 jsou zapojeny do různých buněčných procesů. Tetraspaniny CD9 a CD81 hrají důležitou roli při metastázi nádorových buněk, vývoji nervového systému, buněčné proliferaci a u patogenezí virové hepatitidy C nebo rozvoji onemocnění diftérie (Stipp et al. 2001). Tetraspanin CD151 reguluje signální komplexy, které řídí metastázi rakoviny. Zároveň ovlivňuje lokalizaci a organizaci svých partnerských proteinů, které jsou důležitými determinanty metastatického chování u mnoha typů rakovin (Detchokul et al. 2014).

Stejně tak jsou tyto tetraspaniny podstatné při procesu fertilizace (Stipp et al. 2001; Wolf et al. 2003). Jak ukázaly výsledky Zhou et al. (2009), zabývající se expresí na zralých bovinních oocytech, tetraspanin CD9 se nachází na oolemě. Přesněji byl tetraspanin CD9 lokalizován na mikroklcích (mikrovilli) u myších oocytů. Na plazmatické membráně zralých oocytů jsou mikroklky rozprostřené po celé ploše oocytu, výjimkou je místo, které se nachází nad dělícím vřeténkem. Do oblasti, které je bohaté na mikroklky, se vážou spermie a následně zde dochází k fúzi. Pomocí protilátek byla prokázána přítomnost pouze na mikroklcích, nikoliv v místech mezi jednotlivými mikroklky (planární - rovinná část). Nejvíce se CD9 shromažďuje na špičkách mikroklků a oproti rovinných částí membrány se na mikroklcích tetraspanin vyskytuje až 4x vyšší koncentraci. U mikroklků je správná morfologická stavba nezbytná pro fúzi gamet. Změny v morfologii mikroklků především v tloušťce, délce a hustotě byly závislé na přítomnosti nebo absenci tetraspaninu CD9. Při knockoutu genu pro CD9došlo ke změně morfologie mikroklků. Mikrovilli na oocytech s deficitem CD9 měly hustější distribuci, byly krátké a silné až o dvojnásobek průměrné tloušťky kontrolní skupiny. Oproti tomu, oocyty bez deficitu CD9 měly mikroklky vysokou variabilitu tvarů, v porovnání s CD9 deficientními oocyty se občas mikroklky jevily jako tenčí a delší. Také poloměr zakřivení špičky mikroklků se změnil a u deficitních oocytů se mnohonásobě zvýšil. Lokalizace CD9 v subdoméně membrány mikroklku tak může zvyšovat povrchovou hustotu CD9, což by mohlo řídit adhezní a fúzogenní vlastnosti membrány. Alternativně se jeví možnost, že lokalizace tetraspaninu CD9 odráží účast tetraspaninového pásu na tvorbě nebo udržení mikroklkové struktury (Runge et al. 2007). Umeda et al. (2020) předpokládali u lidského tetraspaninu CD9, že na základě jeho vysoce asymetrický tvaru CD9 se může lokalizovat do více zakřivených míst nebo vytvářet zakřivení membrány vyvolané shlukování.

Schopnost fúze myšího oocytu při knockoutu genu pro CD9 zkoumala studie Kaji et al. (2000). Knockout zapříčinil absenci oscilace intracelulárního Ca2+. Oscilace nastává po fúzi, kdy cytoplazmatické faktory spermie vniknou do cytoplazmy oocytů. Nebylo však zjištěno, že by CD9 byla signální molekula pro mobilizaci Ca²⁺. U kontrolní skupiny byl tetraspanin CD9 detekován na mikroklcích a byly hustě koncentrovány v místě spojení se spermií. CD9 by mohl sestavit nebo stabilizovat adhezní molekuly, jako jsou integriny, pro lepší kontakt se spermií. F-aktin společně s tetraspaninem CD9 byly přítomny v mikroklcích a nacházely se také kolem hlavičky spermie. Nevyskytovaly se u ekvatoriálního segmentu hlavičky spermie, kde probíhá adheze a fúze. Předpokládá se tedy, že CD9 může působit v blízkosti místa fúze při rané fázi membránové fúze, kdy dochází k přeskupení mikroklků a postupnému sestavení aktivních molekul. Jégou et al. (2011) uvažovali nad schopností tetraspaninu CD9 vytvářet vazebná místa určena pro fúzi. V případě selhání fúze se předpokládá, že je důsledkem změny v adhezních místech. Tetraspaninu CD9 se dále připisovala regulační schopnost, která ovlivňuje interakce gamet. U zralých oocytů skotu (Zhou et al. 2009) a také oocytů myši (Le Naour et. al 2000) byla schopnost regulace vazby a fúze přisuzována tetraspaninu CD9. Komorowski et al. (2006) zjistili, že přítomnost tetraspaninu CD9 však nestačí k tomu, aby byl oocyt schopen fúze.

Další možnou cestou, jak tetraspanin CD9 přispívá k fúzi, je jeho aktivní účast při transportech vezikul pro komunikaci oocytů. U defektních oocytů docházelo ke zhoršení uvolňování vezikulů, které by měly interagovat se spermií. Interakce spermie a vezikuly předchází přímé interakci membrán gamet. Vezikuly obsahují složky GM3 s HSP90, které jsou známé jako konzervované složky exozomů. Proto se označují tyto vezikuly jako exozomům podobné (Miyado et al. 2008). Shodná hypotéza o vlivu CD9 na komunikaci prostřednictvím exozomům byla potvrzena u myších oocytů. Během exozomálního cyklu v oocytech se v GV fázi objevují v hojném počtu klatrinové vezikuly, které následně vymizí v MII fázi. V MI fázi se objevují vezikuly podobné exozomům, které jsou společně s multivezikulárními tělesy zastoupeny ve vysokém počtu ve fázi MII v periviteliním prostoru oocytu. Při deleci CD9 docházelo k narušení vezikulárního transportu spojené s navýšením klatrínových a exozomových váčků ve fázi MII (Benammar et al. 2017). Studie Umeda et al. (2020) předpokládala dvě možné role tetraspaninu CD9 ve funkci exozomů. První možná role tkví ve shlukováním molekul tetraspaninu, které může samo o sobě usnadnit uvolnění exozomů, pomocí indukce membrány. Možná druhá role by mohla být v nasměrování dalších funkčních proteinů do vezikulů, a tak by CD9 byl jedním z organizátorů třídění vezikulárního obsahu. Rovněž se CD9 může podílet na tvorbě bloku polyspermie, jelikož bylo popsáno náhlé uvolnění více jak 50 % CD9 z celé oolemy myších oocytů bezprostředně po fúzi (Ravaux et al. 2018).

3.6 Struktura tetraspaninů

Obecně mohou tetraspaniny sdílet podobné struktury, jako je intracelulární konec C a N, malé (EC1) a velké (EC2) extracelulární smyčky, čtyři transmembránové oblasti (TM) a krátké intracelulární smyčky mezi TM2 a TM3. Tetraspanin obsahuje velkou intramembránovou dutinu tvořenou dvěma do značné míry nezávislými páry transmembránových šroubovic, uzavřené doménou EC2. Místo mezi šroubovicemi se vyplňuje molekulami cholesterolu, což poukazuje na funkční modulaci zprostředkovanou malými molekulami. Právě koncentrace cholesterolu v membráně může ovlivnit tetraspaninovou regulaci subcelulární lokalizací jejich partnerských proteinů. Právě extracelulární velká smyčka/doména (EC2) reaguje na složení lipidové membrány, pomocí změny konformace. Při absenci cholesterolu v intramembránové "kapse" se EC2 fragment otevírá, což přináší lepší vazbu s tetraspaninovými partnerskými proteiny. Uzavřená konformace, a tedy zhoršení vazby tetraspaninu s partnerským proteinem, nastává za přítomnosti cholesterolu v intramembránovém prostoru. Takové struktury byly popsány u tetraspaninu CD81 lidského oocytu (Zimmerman et al. 2016).

Lidský tetraspanin CD9 je složen do čtyř transmembránových helixů, s jejich intracelulárními konci pevně svázanými k sobě a jejich extracelulárními konci navzájem volně sbalenými, čímž vytváří velkou centrální dutinu uvnitř intramembranové oblasti. Přes tuto centrální dutinu se rozprostírá krátká extracelulární smyčka (SEL), lokalizovaná mezi transmembránové oblasti TM1 a TM2, a velká extracelulární smyčka (LEL) mezi TM3 a TM4. LEL je stabilizována páry disulfidových vazeb mezi vysoce konzervovanými cysteinovými zbytky. V blízkosti cysteinových zbytků byla pozorována vysoká hustota na intracelulárních koncích TM helixů, které jsou pravděpodobně odvozeny od připojených palmitoylových skupin. Lipidové modifikace nejspíš ukotvují TM helixy na lipidové membráně a tím je stabilizují. CD9 sdílí vysokou sekvenční podobnost (přibližně 60 %) s příbuzným

tetraspaninovým proteinem CD81. Zatímco extracelulární smyčky (SEL a LEL) mají odlišné sekvence, transmembránová oblast je mezi členy rodiny tetraspaninů vysoce konzervovaná. Proto toto uspořádání čtyř transmembránových helixů ve strukturách CD9 a CD81 může představovat společnou architekturu proteinů rodiny tetraspaninů. Díky molekulárnímu tvaru "kužele", generují seskupené molekuly v lipidovém prostředí zakřivení lipidových membrán, což má za následek zvlněné vrstvy v krystalické mřížce. Uvnitř centrální dutiny jsou hydrofilní umístěny uprostřed transmembránových šroubovic a vytvářejí hydrofilní zbytky, intramembránové prostředí. Dutina je na extracelulární straně utěsněna spojením mezi dvěma extracelulárními smyčkami (SEL a LEL). U těchto smyček byla pozorována konformační flexibilita. Jejich konformační změny zahrnovaly otevřenou, polootevřenou a zavřenou konformaci. V uzavřené konformaci se LEL slabě asociuje s SEL a zůstává vedle membránové roviny, jako v krystalové struktuře. Zatímco v otevřené konformaci zaujímá LEL pozici nahoře, oddělené od SEL. Oproti CD81, však uzavřená konformace nenastávala nejen za přítomnosti cholesterolu v intramembránovém prostoru, ale přecházela spontánně do otevřené, nezávisle na přítomnosti cholesterolu. Navíc se potvrdilo, že nezbytná aminokyselina pro vazbu cholesterolu (Glu219 v CD81) není konzervována u ostatních členů tetraspaninu a je nahrazena Gly210 v CD9, zatímco zbytky lemující centrální dutinu jsou v rodině tetraspaninů vysoce konzervované (Umeda et al. 2020).

Pomocí EC2 domény může tetraspanin CD9 zprostředkovávat různé interakce na úrovni membrány oocytu. Může vytvářet interakci s jinou molekulou na membráně oocytu (cis interakce). Interakce s receptorem na spermii (trans interakce) se však nepředpokládá, jelikož pravděpodobně spermie postrádají receptor působící jako trans partner pro CD9 (Zhu et al. 2002).



CYTOPLAZMA

Created in BioRender.com bio

Obrázek 4 Obecná struktura transmembránového proteinu tetraspaninu (vlastní ilustrace vytvořena v Biorender.com a Krita editoru podle Jankovičová et al. 2020). TM (1-4) - transmembránové domény, Gly – glycin, Cys-cystein.

3.7 Proteinové interakce

Proteinové interakce lze obecně rozdělit do několika úrovní. První úroveň je charakteristická velmi robustním spojením, stabilním v detergentu Triton X-100 a pravděpodobně se jedná o přímou vazbu (Claas et al. 2001). Jedná se tedy o primární interakce mikrodomény obohacené tetraspaninem a zahrnuje přímou extracelulární interakci tetraspanin - protein (Martin et al. 2005). Asociace druhé úrovně je četnější, ale přesto vysoce specifická. Vazba lze narušit 1 % Tritonem X-100, ale je zadržována v 1 % Brij 96 nebo Brij 97 detergentu a dalších méně hydrofobních detergentech (Claas et al.2001). Čili, sekundární interakce je méně robustní a zahrnuje heterotetraspaninové interakce, které usnadňují nepřímou interakci primárních proteinů tetraspaninového komplexu (Martin et al. 2005). A poslední, třetí úroveň, je nejpočetnější a s největší pravděpodobností nebude obsahovat přímé vazby. Komplex je narušen Tritonem X-100, Brij 96 nebo Brij 97, ale může být udržen v 1 % Brij 99, 1 % CHAPS nebo jiných méně hydrofobních detergentech (Claas et al. 2001). Tato terciální vazba utváří nejméně odolné komplexy a pravděpodobně formují velké signální domény pomocí rozsáhlého sloučení interakcí vyššího řádu (Martin et al. 2005). Z této klasifikace vyplývá, že robustní interakce první úrovně představují specifické funkce pro jednotlivé tetraspaniny. Zatímco slabší interakce, druhá a třetí úroveň, představují sdílené funkce několika tetraspaninů v rámci mikrodomény. Alternativně mohou být interakce, které jsou méně striktní, zvláště fyziologicky významné. Mohly by totiž představovat flexibilní dynamické interakce, které se mění podle stavu aktivace buňky (Tarrant et al. 2003).

Takové spojení, mezi povrchovými proteiny a tetraspaniny, se označuje jako tetraspaninová síť, která má za úkol udržovat povrchové molekuly v těsné blízkosti. Což může být potřebné pro kostimulační aktivitu (Rubinstein et al. 1996). Jednotlivé tetraspaniny mohou interagovat s různými proteiny a přispívat tak k variabilitě a pravděpodobně i funkční specifičnosti komplexu. Tyto interakce neinterferují se schopností tetraspaninových proteinů interagovat s jinými členy tetraspaninu nebo se sebou samými (Yunta a Lazo 2003).

Nejcharakterističtější interakce tetraspaninových proteinů jsou ty, které se vyskytují mezi různými členy této proteinové rodiny. Obecně jsou nejlépe charakterizované jsou takové tetraspaniny, jejichž vzor exprese je méně specifický, jako je CD9, CD81 nebo CD151. CD9 a CD81 jsou nejrozšířenějšími členy, s některými výjimkami, například CD9 není exprimován ve zralých B-buňkách (Yunta a Lazo 2003).



Obrázek 5 Tetraspaninové interakce v rámci tetraspaninové sítě (vlastní ilustrace vytvořena v Biorender.com a Krita editoru podle Rubinstein et al. 1996; Zhu et al. 2002; Yunta a Lazo 2003).

3.7.1 Interakce tetraspanin-tetraspanin

Mikroklky napomáhají rozšíření povrchu membrány a poskytují jakési lešení pro uchycení spermie. Spermie se pak lépe dostane k membránovým proteinům odpovědných za fúzi. Během zrání oocytů se mění počet a morfologie mikroklků. V GV fázi jsou téměř rovnoběžné, zasahující do vrstvy zona pellucida. Ve fázi MI se prostřednictvím prasknutí gap junctions utváří perivitelinní prostor a tím se mikrovilli v tomto prostoru uvolní a prodlouží se. Hustota se neliší od předchozího stádia. V MII fázi se hustota snižuje, stejně tak délka mikroklků a šířka se zvyšuje. Tetraspaniny CD9 a CD81 na mikroklcích, u myších oocytů hrají velmi významnou roli. Při deleci obou nebo jednoho tetraspaninu (CD9 a CD81) byly prokázány změny v morfologii, které korelovaly se snížením fertilizační schopností. Delece CD81 doprovázela hypofertilitu a při deleci CD9 byla pozorována velmi nízká plodnost. Při deleci obou tetraspaninů docházelo ke sterilitě, která korelovala se snížením počtu mikroklků. Delece jednoho z dvou tetraspaninů zapříčinila signifikantně větší tloušťku mikroklků se zvýšeným poloměrem zakřivení. Na délce se odráží pouze nepřítomnost tetraspaninu CD81 (Benammar et al. 2017). V práci Kaji et al. (2002) se snažili zvrátit deficit myšího tetraspaninu CD9 pomocí exprimované polyadenylové mRNA exogenní myší CD9 ve fázi GV. Přítomnost exogenního tetraspaninu CD9 korelovala se ziskem fertilizační schopnosti u oocytů, které byly prosté od CD9. Stejně tak exogenně přidaný myší CD81 a lidský CD9 dokázal zvýšit fertilizační schopnost. Taky se ukázalo, že nadměrná exprese lidského CD9 a myšího CD81 může zachránit

fúzi blokovanou protilátkou anti-CD9 mAb. Autoři zde předpokládali, že inhibice může být způsobena blokováním interakce mezi mCD9 a jinou molekulou nebo molekulami. Inhibice byla tak překonána nadměrnou expresí lidského CD9 a myšího CD81. Lokalizace exogenních tetraspaninů byla kolokalizována s endogenní myším CD9. Zajímavý je také fakt, že zde myší CD81 mohl kompenzovat funkci myšího CD9. Což poukazuje na možnou vzájemnou substituci tetraspaninů. Naproti tomu Rubinstein et al. (2006) prokázali komplementární roli CD9 a CD81 při fúzi u myších gamet. CD81 byl exprimován na povrchu oocytů. Zde dochází ke spojení se strukturami oolemy obohacenými o CD9 a CD9-P. Mezi tetraspaniny jsou CD9 a CD81 blízce příbuzné, mají 45 % vzájemnou identitu. Sdílejí schopnost přímé interakce ("primární interakce") s alespoň dvěma tetraspaninovými partnery CD9P-1 a EWI-2. Delece genu pro CD81 bylo doprovázeno sníženou fertilitou o 40 % vlivem nedostatečnosti fúze. Stejně tak při deleci CD9 byla fertilizace silně narušena. Zároveň se však ukázalo, že oba tetraspaniny se nemohou vzájemně zastoupit, ani po nadměrné expresi. To bylo prokázáno tím, že po deleci genu pro CD9 a CD81 byla popisována úplná neplodnost. Jedná se tedy o dva mechanismy pro každý tetraspanin, které spolu úzce souvisí a nepřítomnost jednoho z dvou tetraspaninu naruší fúzi gamet u myší.

Také se dle výsledků předpokládá, že tetraspaniny CD9 a CD81 se podílejí na reorganizaci a zakřivení oolemy, což by usnadnilo komunikaci protein-protein a interakci proteinové sítě vedoucí k oplodnění (Jankovičová et al. 2019).

3.7.2 Interakce tetraspanin-integrin

Integriny tvoří velkou rodinu homologních transmembránových adhezních receptorů mezi buňkami a matrix. V krevních buňkách integriny slouží jako adhezní molekuly pro zprostředkování vazby s ostatními buňkami (Alberts et al. 2002). U somatických buněk je známá asociace tetraspaninu CD151 s integriny (α 3 β 1, α 6 β 1, α 6 β 4 a α 7 β 1). Tetraspanin CD151 je známý pro svou asociaci s integriny, které jsou odpovědné za adhezi buněk k laminům, což jsou nezbytné složky bazální membrány. Díky této asociaci s integriny mohou modulovat morfologii, migraci, signalizaci a posilování adheze buněk (Hemler 2005). Selektivní asociace tetraspanin - integrin byla detekována za použití somatických buněk megakaryotická linie HeEL, některý linií buněk – B a T, adherentní buněčné linie HeLa (karcinom děložního čípku), A431 (karcinom skvamózního karcinomu), LoVo (karcinom tlustého střeva) HT1080 (fibrosarkom) a buněk ovárií čínského křečka. Asociace tetraspaninu a integrinů byla detekována po lýzi buněk v digitoninu. Jedná se o detergent, který narušuje interakci tetraspanin-tetraspanin. V tomto případě, CD81 selektivně korecipitoval s integrinem α4β1 ve všech buňkách exprimujících tuto molekulu. CD151 korecipoval s integriny α3β1 a $\alpha 6\beta 1$, nikoliv s $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ nebo $\alpha 5\beta 1$. To naznačuje těsnou asociaci těchto molekul a přímou interakci. Ostatní tetraspaniny se pravděpodobně nepřímo spojují s heterodimery integrinu. Tato nepřímá asociace je zprostředkována prostřednictvím CD81 nebo CD151. Tyto tetraspaniny jsou pravděpodobně odpovědné za spojení integrinů s ostatními tetraspaniny prostřednictvím interakce tetraspanin-tetraspanin. Jiné tetraspaniny mohou takto podobně spojovat jiné molekuly s celou řadou tetraspaninů. Organizace tetraspaninů v takové síti může umožnit cross talk různých druhů asociovaných molekul na buněčném povrchu (Serru et al. 1999). Avšak u interakcí tetraspaninu CD151 s integrinem α6β4, α3β1 a α6β1 se předpokládalo možné zprostředkování vazby s ostatními tetraspaniny do nových signálních transmembránových platforem. Vzhledem k detekci palmitoylace integrinu β 4 se očekává jeho role v šíření a signalizaci buněk závislé na integrinu a při udržování sekundárních interakcí s dalšími tetraspaninovými proteiny (Yang et al. 2004). Myší integrin β 1 se podílí na vývoji svalových vláken tím, že reguluje fúzi myoblastů a podílí se na sestavení sarkomer, sestavování cytoskleletu svalových vláken a udržení myotendinosního spojení u příčně pruhovaného svalu (Schwander et al. 2003).

Jelikož je integrin β 1 spojen s aktinovým cytoskeletem, očekávalo se, že při vazbě spermie na integrin β 1 může narušit subkortikální aktin, což je nezbytný krok v procesu fúze. I když byla potvrzena preferenční interakce spermie s částmi bohatými na integrin β 1, obecně schopnost fúze lidských oocytů nekorelovala s celkovým obsahem integrinu β 1. Tudíž většina detekovaného integrinu β 1 nebyla pro fúzní proces zásadní (Ji et al. 1998). Obdobné závěry o doprovodné, nikoliv esenciální funkci integrinu s podjednotkou β 1 při fúzi gamet byly potvrzeny u prasete (Linfor a Berger 2000). Stejně tak u více podjednotek integrinu (α 2, α 3, α 5, α 6, α V, α M, β 1, β 2, β 3) byla tato hypotéza potvrzena opět u lidských oocytů. Podjednotky β 4, β 5 a β 6 dokonce neprojevovaly žádnou doprovodnou funkci pro fúzi. Proto se očekává ještě jiný mechanismus, který nezahrnuje přítomnost integrinů (Sengoku et al. 2004).

Podle Le Naour et al. (2000) může tetraspanin CD9 pomocí modulace funkce integrinu $\alpha 6\beta 1$ napomáhat k fúzi gamet u myší. Kritickou roli integrinu s podjednotkou $\beta 1$ pro vazbu a fúzi myších gamet však vyvrátila studie Miller et al. (2000), která prokázala samostatné působení tetraspaninu CD9 či ve spojení s dalšími proteiny než integrinu s podjednotkou $\beta 1$. Obdobné závěry byly definovány u lidských oocytů, kde se očekávalo, že pro tetraspanin CD9 může existovat partner, který by interagoval s receptorem spermií a byl tak odpovědný za fúzi (Sengoku et al. 2004). Nepřímou interakci potvrdila také studie provedená u myších oocytů Chen et al. (1999), jejíž data podporovala hypotézu, že na vazbě a fúzi gamet se podílí více molekul zahrnující také integrin $\beta 1$ a tetraspanin CD9.

Možné interakce tetraspanin – integrin porovnávaly u lidských a myších oocytů, s ohledem na tetraspaniny CD151 a CD81. Ziyyat et al. (2006) popsali dynamické chování a plasticitu dvou tetraspaninů a tím i plasticitu tetraspaninové sítě. K porovnání zde byly použity oocyty lidské a myší. Potvrdilo se, že CD9 pravděpodobně reguluje seskupení integrinů u lidských oocytů nepřímo. Přispívá k fúzi díky řízení tvorby "patche" integrinů a jejich laterální mobilitu na oolemě, přičemž jeho výskyt byl potvrzen především v oblasti mikroklků. Asociace s integriny byla také pozorována u přítomných tetraspaninů CD81 a CD151. Oproti CD9, netvořily homogenní rozprostření, ale utvářely shluky. U lidských gamet je CD151 přítomnost nenahraditelná, narozdíl od oocytů myši. CD151 přímo interaguje s integrinem β 1 (receptor pro fertilin), který společně tvoří "patche", které jsou potřebné pro navázání se na fertilin, pro následnou fúzi. Také se u lidských oocytů předpokládalo odlišné chování tetraspaninů. Nezbytný není pro fúzi lidských oocytů tetraspanin CD81. CD81 mAb neovlivnila "patchování" integrinové podjednotky. Nezbytnou přítomnost CD151, charakteristickou pro lidské oocyty, který interaguje s integriny a formují s nimi komplexy, prokázala též dřívější studie, kterou provedli Wolf et al. (2003).

Fertilin α (ADAM1) a β (ADAM2) jsou integrální glykoproteiny, tvořící fertilinový komplex, který hraje důležitou roli při interakcích membrán gamet (Fàbrega et al. 2011). Studie na myších gametách odhalily některé podobnosti a některé zajímavé rozdíly mezi myšími

fertiliny α a β . Zdá se, že jejich desintegrinové domény se podílejí na vazbě spermie – oocyt. Zdá se však, že doména dezintegrinu fertilinu β je kritická pro vazbu spermie-vajíčko, stejně tak dezintegrinová doména a také další domény extracelulární domény fertilinu α (doména bohatá na cystein a repetice podobná EGF) se účastní interakcí mezi fertilinem α a vazebným místem (místy) na oolemě (Evans et al. 1998). Právě u myších oocytů se předpokládala účast dezintegrinových domén na vazbě spermie-oocyt, pomocí interakce s integrinem $\alpha 6\beta$ 1 (Almeida et al. 1995). Což dokládá i zjištěná vysoko avidiní vazba mezi spermatickým fertilinem (ADAM2) a oocytárním integrinové podjednotky β 1 u myší (Chen et al. 1999). Podle výsledků Higginbottom et al. (2003), lidský CD9 tetraspanin pravděpodobně není povrchovým receptorem pro povrchový ligand spermie (jako například ADAM). U myší se ukázala možná interakce zprostředkována pro vazbu a fúzi. Protilátky proti CD9 a CD98 významně narušily nejen vazbu a fúzi gamet, ale specifičtěji, narušily vazbu dezintegrinové domény ADAM3 s integrinem β 1. Což opět ukazuje na důmyslnou organizaci tetraspaninové sítě (Takahashi et al. 2001).

Byly popsány různé motivy proteinů, které jsou odpovědné za vazbu s proteinem na oocytu. Dle práce Bronson a Fusi (1990) mohou interagovat lidské spermie s křeččím oocytem *in vitro* podmínkách, za pomocí syntetického peptidu, obsahující RGD – tripeptid ARG-GLY-ASP (aminokyseliny ARG-GLY-ASP-VAL, RGDV). Jelikož při adici RGD do inkubačního media tak byla pozorována inhibice vazby a penetrace oocytu. RGD hraje obecně velkou roli v rozpoznávání mezi buňkami a buňkami k matrici. Kromě syntetického RGD peptidu se ukázal jako další ligandový motiv pro integrin peptid DECD (ASP-GLU-CYS-ASP). Tato dezintegrinová smyčka fertilinu β se přímo váže s vysokou specifitou na integrin $\alpha 6\beta 1$, u myší. Integrin $\alpha 6\beta 1$ byl detekován na mikroviliárním povrchu oolemy. Avšak se nevylučuje možnost, že pro navázání fertilinu β není zapotřebí další extracelulární protein na oocytu (Chen a Sampson 1999).

Avšak, použitím syntetických proteinů nemusí být vždy kompetentní pro určení interakcí s proteiny. Všechny syntetické proteiny mají doménu podobnou dezintegrinu, obsahující domnělý motiv konzervovaný XCD vázající integrin (X představuje jednu z omezených, ale do té doby neidentifikovatelných podskupin aminokyselinových zbytků). Kandidáti na vazbu integrinů na oolemě jsou fertilin β nebo třeba cyritestin u různých studií. Tyto syntetické imitace proteinu musí mít jasnou sekvenční specifitu, o které se předpokládá, že je vlastní jejich nativním protějškům. Proto tato napodobenina může inhibovat řadu různých interakcí s integrinem. Je tedy předpoklad, že jakýkoliv peptid obsahující XCD, je schopen inhibovat vazbu a fúzi myších spermií a oocytů, čímž se ověřuje jejich vazba na příslušný protein na oolemě. Proto ač data ukazují na důležitost fertilinu β a cyritestin v interakcích spermie a oocytu, je možné očekávat že jiné integrální membránové proteiny na povrchu spermií jsou stejně důležité. Syntetizované proteiny nemusí mít vhodnou velikost, nebo mohou mít různou povahu cysteinu a tím tak jiné chování disulfidických můstků, či mohou chybět různé posttranslační modifikace. U napodobenin rekombinantních exprimovaných proteinů mohou být nedostatky v podobě nesprávného složení, a tak se mohou chovat jako dlouhé peptidy, což může být stejný problém jako u krátkých navrhnutých proteinů, které jsou chybné spíše kvůli specifičnosti proteinu (McLaughlin et al. 2001).

Odlišná interakce, spjatá s proteinem RGD odhadla simulace u lidských integrinů exprimovaných na ovariálních buňkách křečka čínského. Tetraspanin CD81 se pravděpodobně

váže svou doménu EC2 na vazebné místo pro RGD na $\alpha V\beta3$ integrinu, avšak toto vazebné místo není striktně omezeno na vazbu CD81 EC2. Pravděpodobně je možné v experimentálních podmínkách detekovat interakci integrinu $\alpha V\beta3$ s EC2 doménou CD9, CD81 a CD151. Je možné že tetraspanin svou EC2 doménou s integrinem pomocí cis interakce a tím tak, na buněčném povrchu, reguluje jeho funkci. V této simulaci, ve vazbě na doménu EC2 nebyly tolik účinné integriny $\alpha 3\beta1$, $\alpha 4\beta1$ a $\alpha 6\beta1$ (Yu et al. 2017).

3.7.3 Interakce tetraspanin – proteiny IgSF

Dalším partnerem tetraspaninů CD9 a CD81 jsou povrchové proteiny s imunoglobulinovými domény SF (IgSF), EWI. EWI se v somatických buňkách podílejí na různých buněčných procesech. EWI-2 je hojně zastoupen v různých typech buněk, proto se předpokládá, že se zapojuje do buněčných procesů, které do kterých se aktivně zapojují také tetraspaniny CD9 a CD81 (Stipp et al. 2001). Například na migraci a polaritu lymfocytů má EWI-2 a EWI-F přímý podíl, jelikož regulují propojením tetraspaninové sítě, pomocí interakce s jejich přímým partnerem CD81, s aktinovým cytoskeletem, aktin spojujícími proteiny ERM. Je tedy facilitátorem pro přenos signálu od mikrodomén obohacených o tetraspanin (TEM) (Sala-Valdés et al. 2006). Tetraspaniny by měly svou interakční doménou komunikovat s Ckoncovou (42kDa) částí EWI-2. Společně se EWI-2 a EWI-F odlišují od jiných navrhovaných proteinů asociovaných s CD9 a CD81, protože jejich asociace jsou stabilnější, z pohledu stechiometrie (Stipp et al. 2001). Není to však jediná interakce, kterou EWI-2 iniciuje. S asociací tetraspaninu CD81 a CD9, tedy s pomocí laterální interakce, komunikuje EWI-2 s integrinem α3β1, který je receptorem lamininu-5, čímž se laminin-5 může reagregovat a pohybovat. To dokazuje, že tetraspaniny mohou sestavovat více netetraspaninových proteinů do funkčních komplexů a jsou tedy linkery v některých komplexech. Ukázalo se, že s asociací CD81 vedoucí k větší expresi EWI-2 na buněčném povrchu existuje schopnost sestavit další molekuly CD81 a EWI-2 do expandovaného komplexu. EWI-2 také pomáhá získávat více CD81 do komplexu s integrinem $\alpha 3\beta 1$ (Stipp et al. 2003).

EWI-2 (IgSF8) je též partner tetraspaninu CD9 u myších oocytů, s interakcí první úrovně (Glazar a Evans 2009). Tato asociace může být zachována v komplexních interakcích s jinými vazebnými partnery, což může značit široku specifitu pro partnerské proteiny, zároveň to ukazuje na regulační roli tetraspaninu. Tato asociace byla zprostředkována tetraspaninovou transmembránovou oblastí. Především malé aminokyselinové zbytky v této oblasti, jsou nezbytné pro tvorbu komplexu EWI-2 a CD9. Asymetrický tvar byl zachován v komplexu CD9 a EWI-2, což naznačuje schopnost tetraspaninu utvořit heterokomplex. Širokospektrá interakce s dalšími dosud nepopsanými proteiny by mohl tetraspanin CD9 učinit na základě multiplatformní vazby, která by poskytovala zcela odlišná vazebná místa pro jeho proteinové partnery (Umeda et al. 2020). Interakcí s tetraspaninem CD9, tak EWI-2 utváří funkční spojení v mikroklcích oolemy (Runge et al. 2007). Dle Jégou et al. (2011) CD9 generuje adhezní místa která jsou více silně ukotvena k aktinovému jádru mikroklků. Jakékoli, připojení spermievajíčko zahrnující receptor spojený s CD9 by bylo nepřímo ukotveno k cytoskeletu, prostřednictvím vazby CD9-EWI2-ERM-aktin. Receptor spermie by tak nemusel být přímo spojen s CD9, pokud je těsně obklopen několika CD9 tetraspaniny pevně spojenými s cytoskeletem a izoluje ho od lipidového rezervoáru. Interakci CD9 s proteiny EWI-2, EWI-F a

proteiny ERM (Erzin, Radaxin a Moesin), které tvoří těsné spojení oolemy a aktinového cytoskeletu, potvrdila novější studie Cohen et al. (2022). Při inhibici obou skupin proteinů též docházelo ke snížení hustoty mikroklků. Tento výsledek naznačuje, že ERM a EWI-2/EWI-F by se podílejí na tvorbě mikroklků. Dále se předpokládalo, že CD9 negativně reguloval činnost těchto proteinů, pravděpodobně nepřímým působením na organizaci jiných proteinů. Tato negativní regulace byla vysvětlována absencí negativní regulace v kontextu knockoutu genu pro CD9, při které se zvýšila hustota mikroklků. Nevylučuje se však pro zapojení dalších molekul. V neposlední řadě se ukázalo, že EWI-2 a EWI-F neregulují expresi a lokalizaci CD9.

3.7.4 Interakce tetraspanin-JUNO

S tetraspaninem CD9 také interaguje protein JUNO. JUNO je povrchový protein oocytu, dříve označovaný jako folátový receptor 4 (Folr4), který je však je neschopný vázat folát. JUNO je k membráně ukotven pomocí GPI (Bianchi et al. 2014), což je označení pro glykosylfosfatidylinositol, též označován jako lipidová kotva (Kinoshita 2016). Exprimace tohoto proteinu na oolemmě byla prokázána například u myších (Suzuki et al. 2017) a lidských oocytů (Jean et al. 2019) a to již v rané fázi jaderného zrání (GV). JUNO se zdá být velmi nezbytný pro adhezi a fúzi membrány gamet, kterou zprostředkovává interakcí s receptorem spermie IZUMO1 (Jean et al. 2019). Sekvenace identifikovala IZUMO jako protein imunoglobulinové superrodiny IgSF membránového typu I s extracelulární imunoglobulinovou doménou, která obsahuje jedno putativní glykosylační místo. Byl detekován u myších a lidských spermií, které již prošly akrozomální reakcí. U ejakulovaných spermií nebyly detekovány, což je v souladu se skutečností, že ejakulované spermie nemají fertilizační schopnost (Inoue et al. 2005).

Jedna z možných úloh tetraspaninu CD9, spojená s interakcí JUNO, je molekulární kompartmentalizace glykosylfosfatidylinoitolově ukotvených proteinů, jako je právě JUNO a CD55 z kortikální oblasti u myších oocytů. Jelikož v této oblasti se nachází velmi blízko chromozomy, mohlo by v tomto místě při navázání spermií dojít k narušení bezpečného rozdělení genomové DNA, při oplození. Proto na základě výsledků, kdy absence CD9 přinesla nedostatečnou tvorbu čepičky a z této oblasti byly přesunuty pouze plazmatické integriny (podjednotky α6 a β1) a tetraspaniny CD81 a CD315 tetraspaniny, byl navržen model. CD9 je nezbytná pro relokalizaci proteinů ukotvených GPI, aby tak nedošlo k navázání IZUMO1 na spermii na receptor oocytu JUNO, který by byl na nevhodném místě, z pohledu správného oplození. Tento mechanismus by zahrnoval interakci CD9 s neznámými doménami vnější vrstvy plazmatické membrány, avšak by se nemělo jednat o lipidové rafty (Inoue et al. 2020). Lipidové rafty jsou charakterizovány jako oblasti plazmatické membrány, na kterých je lipidová dvojvrstva obohacena o specializované lipidy, jako jsou cholesterol a sfingolipidy, díky čemuž je membrána zesílena. Nejčastěji zahrnují různé proteiny, zejména transmembránové proteiny (Dharani 2015). Od těchto lipidových raftů se při fúzi gamet očekávala možná komunikace s doménami obohacenými o tetraspaniny pro (ulehčení apozice membrán gamet na překonání) ulehčení překonání energické bariéry, která brání ke spontánní fúzi a umožnilo se tak míšení lipidů mezi membránami gamet (Barraud-Lange a Boucheix 2013).

Práce Chalbi et al. (2014) ukázala společnou akumulaci tetraspaninu CD9 se spermatickým proteinem IZUMO1 v místě kontaktu gamet. Lze předpokládat, že buněčná adheze je u savců zapříčiněna nepřímou nebo přímou cis interakcí CD9 s proteinem JUNO, které je receptorem pro IZUMO1. Podrobnější interakci poskytla studie na myších oocytech, ve které exprimace těchto proteinů byla shodná pouze v oblasti mikroklků, zatímco v rovinné části mezi mikroklky byla detekována pouze exprese JUNO proteinu. Proto se předpokládá, že jejich asociace probíhá na úrovni mikroklků a mohla by souviset s regulací uchycení spermií z hlediska počtu spermií a následnou fúzí membrán. Předpokládá se, že v komplexu CD9 – JUNO jsou interakce na úrovni vodíkových můstků, poskytovány aminokyselinovými (AMK) zbytky (14 AMK JUNO a 11 AMK CD9). Tato interakce je možná i v komplexu JUNO-IZUMO1, avšak AMK zbytky pro IZUMO1 jsou u JUNO volné i v případě, že je navázáno v komplexu JUNO-CD9. Lze tedy usoudit, že pro interakce JUNO ve dvou různých komplexech využívá rozdílné AMK zbytky, které se vzájemně neinterferují. Dle výsledků, v komplexu JUNO-CD9 mění CD9 procentuální zastoupení sekundárních struktur. Pravděpodobně rozšiřuje své postranní řetězce a tím přispívá k tvorbě komplexu. Velká strukturální flexibilita v sekundární struktuře je nezbytná pro interakci protein-protein. Komplex pravděpodobně reaguje principem šroubovice-šroubovice a utváří vyšší hydrofobní jádro (Frolíková et al. 2023).

JUNO však dle studie Inoue et al. (2015) není přítomen v celém fuzogením procesu u myší. Poté, co JUNO selektivně rozpozná monomer IZUMO1, pak následně přichází přechodná dimerizace IZUMO1, pomocí shlukování iniciované JUNEM. Následně dimerizovaný komplex se naváže na oocytový receptor a přivádí vedle sebe fosfolipidové dvojvrstvy do nejbližší blízkosti. Lze tedy říct, že JUNO zasahuje pouze do rané fázi procesu zprostředkovaného IZUMO1. JUNO poté, co opustí membránu, pomocí vezikulů, vytváří v perivitelliním prostoru jakousi "návnadu" pro ostatní příchozí spermie se zreagovaným akrozomem, aby tak utvořilo blok polyspermie, u savců (Bianchi et al. 2014).

Možné vysvětlení pro odstranění JUNA po navázání na IZUMO a další kroky přinesla práce Vondráková et al. (2022). Protein Fcrl3, receptor superrodiny imunoglobulinu pojmenován jako protein MAIA propletené s JUNO, byl detekován u lidských oocytů. Dle navrhnutého modelu se při počáteční vazbě IZUMO1 – JUNO utváří pár hlubokých rýh, vzniklých mezi povrchem JUNO a oběma proteiny IZUMO, které právě slouží, jaké preferované místo pro všechny domény proteinu MAIA. Pomocí modelování byl navržen mechanismus této vazby. Juno je pomocí rozpoznání IZUMEM vytaženo z oolemmy a následně v komplexu utváří vazebné kapsy pro protein MAIA. Po odstranění JUNA z komplexu a dokováním další domény MAIA, pak zlepšuje vazbu pomocí původního vazebného rozhraní IZUMA1 s JUNEM. Afinita domén MAIA ke komplexu vede ke stabilní adhezi membrán, čímž se docílí blízký kontakt buněk (molekulárním řehtačkovým "ratchet-like" mechanismem). Následné odstranění JUNA pak poskytuje větší vazebné rozhraní pro MAIA a stabilizuje strukturu pro ještě těsnější blízkost pro membránovou fúzi. Z morfologického pohledu, navrhovaná interakce probíhá na úrovni membrány spermie, kde na apikální části je IZUMO a na vrcholku mikroklků JUNO interagují s apiko-laterálně umístěnými IZUMO a MAIA. Pak může nastat expanze membrán gamet, zprostředkováno interakcí IZUMO-JUNO a usnadněnou konvergencí, pomocí kontrakce IZUMO1-MAIA komplexem. Nastává hybridizace membrán gamet a jejich povrchová destabilizace iniciuje následné vytvoření hybridní membrány gamet.

Interakce MAIA – tetraspanin CD9 dle modelu tvoří stabilní interakci pomocí vazebných míst dimeru, které obsazovalo 6 domén MAIA. Avšak, dle dalších testů, zahrnující kolokalizační test a přibližovací ligační test (PLA) ukazovaly pouze mírnou interakci. Slabou interakci může pravděpodobně způsobit přítomnost JUNA v oolemmě, což může být změněno po uvolnění JUNA z oolemmy. Připouští se však i možnost interakce MAIA s dalším členem z rodiny tetraspaninu i za přítomnosti JUNO (Vondráková et al. 2022).

3.8 Exprese tetraspaninů na oolemě během meiotického zrání

U myších oocytů je CD9 exprimován již v rané fázi růstu (Komorowski et al 2006). Také u lidských oocytů byl detekován imunofluorescenční signál ve všech stádiích zrání GV, MI a MII (Coskun et al. 2003). U ovčích oocytů se v preantrálních folikulech prokázala slabší intenzita imunofluorescenčního signálu proteinu CD9 na oolemě, oproti granulóznímbuňkám. Avšak signál se zesílil a nabyl skoro shodné intenzity jako u membrány granulózních buněk, když byly oocyty již v plně dorostlých folikulech. Intenzita signálu oocytů ve fázích zrání ukázal vzrůstající trend, který koreloval s postoupením z fáze GV až do MII, tedy kdy v MII byl signál nejintenzivnější oproti předešlým fázím. Vystavení oocytů protilátce CD9 (anti-CD9 mAb), přineslo výsledek v podobě snížení penetrace spermií (41,5 % oproti kontrolní skupině 81,4 %). Prokázalo se, že tetraspanin CD9 je syntetizován od časného folikulárního vývoje až do zrání oocytů (Gaowa et al. 2016).

Použitím polyklonální protilátky byla popisována u bovinních oocytů distribuce tetraspaninu CD9 jako přerušovaná linie prstence (značící membránu) na oolemě. Navíc byly detekovány shluky CD9, které zasahovaly do perivitelinního prostoru. Vzory se značně lišily v různých stádií zrání. VGV fázi byla popsána vyšší kontinuita oproti MI a MII, kde byly pozorovány výraznější uspořádané shluky. Ve vrstvě zona pellucida nebyl detekován žádný specifický signál. Oproti tomu, při použití monoklonální protilátky mAb IVA50, byla intenzita signálu detekovaného proteinu na oolemě homogenní ve všech fázích zrání. Dále byly zkoumány oocyty bez vrstvy zona pellucida, u kterých byly opět shledány rozdíly při použití polyklonální a monoklonálních protilátek. Polyklonální protilátky detekovaly nerovnoměrně distribuované skvrny v oolemě. U monoklonálních protilátek se objevil jasný prstencový vzor v oolemě, který byl přerušen v oblasti nad dělícím vřeténkem. To opět poukazuje na místo bez mikroklků, kde by se CD9 neměl vyskytovat (Jankovičová et al. 2019). U bovinních oocytů byla také popsána distribuce tetraspaninu CD81 v rámci zrání, ale také distribuce u zygot a čtyř buněčného embrya. Tetraspanin byl exprimován na oolemě ve všech fází zrání, nebyla však zaznamenána přítomnost tetraspaninu v zona pellucida jak u oocytů z antrálních folikulů, tak i u zralých oocytů (v MII fázi). V GV a MI fázi oocytů imunofluorescenční analýza odhalila přerušovanou nebo "žíhanou" distribuci na povrchu oolemy. V MII fázi byla detekována přítomnost CD81 jako nejsilnější a nejrovnoměrnější shluky na oolemě. Nehledě na jaderné stádium, se na oolemě 50-70 % oocytů bez zona pellucida objevily shluky tetraspaninu (Jankovičová et al. 2016). Tetraspanin CD151 byl imunofluorescenčním testem detekován ve viditelných shlucích podél plazmatické membrány a také byl detekován v perivitelinním prostoru nezralých bovinních oocytů, získaných z antrálních folikulů. Ve zralých (MII fázi) oocytech protein CD151 utvářel jasné shluky, které naléhaly k plazmatické membráně (Jankovičová et al. 2023). U bovinních oocytů zkoumali také vliv vitrifikace na expresi CD9. Práce Zhou et al. (2013) potvrdila změny distribučního vzorce CD9 a sníženou expresi na úrovni mRNA a proteinu. Ve skupině, která prošla vitrifikací, tvořil CD9 nespojitou linii podél plazmatické membrány, zatímco u kontrolní skupiny CD9 vytvořil souvislou linii podél plazmatické membrány téměř u všech oocytů (MII fáze). Oproti tomu, rozsáhlejší a novější studie Jankovičová et al. (2023) neshledala žádnou rozdílnost v distribučních vzorcích tetraspaninů mezi vitrifikovanými a nevitrifikovanými zralými oocyty skotu. Ačkoliv při vitrifikaci dochází ke změně lipidového profilu membrány, v oocytech v MII fázi nebyl žádný rozdíl v hladinách a distribuci tetraspaninů CD9, CD151, CD81, CD82 a CD63. S použitím monoklonální protilátky byl detekován tetraspanin CD9 homogenně po oolemě. Při použití polyklonální protilátky byl CD9 lokalizován v přerušovaných linií na oolemě, s částečnou lokalizací v perivitelinním prostoru. Zato tetraspanin CD81 tvořil shluky na oolemě bez zásahu do vnější vrstvy oocytu, vrstvy *zona pellucida*. Tetraspaninu CD151 i v případě vitrifikovaných zralých oocytů utvářel shluky naléhající k oolemě.

U prasečích oocytů přinesla práce Li et al. (2004) důkaz o významnosti CD9 při procesu fúze, za použití monoklonálních protilátek (anti CD9 mAb). Také zde byla popsána distribuce tetraspaninu CD9 na oolemě prasečích oocytů, během meiotického zrání. Syntéza probíhala v antrálních folikulech a elevace nastala v průběhu meiotického zrání, tedy do MII fáze, u které byl signál nejintenzivnější. Pozoruhodné však bylo zjištění, že se tetraspanin CD9 vyskytuje po celé membráně oocytů v MII fázi. Což je rozdílná distribuce oproti tomu, co bylo popsáno u myších oocytů. V myším modelu byla distribuce tetraspaninu CD9 sice byly rozprostřeny po mikroklcích, avšak nebyl přítomen v úseku bez mikroklků, kde se nachází metafázní destička (Zhu et al. 2002). Proto v případě prasečího modelu se očekávalo, že kančí spermie se navážou na jakékoliv místo na oolemě (Li et al. 2004). Kromě detekce tetrapsaninů u bovinních oocytů, práce Jankovičová et al. (2019) se zaměřovala také na prasečí oocyty, v rámci popisu mezidruhových vzorců exprese. V tomto případě, byla detekována střední intenzita reaktivity monoklonální protilátky. Předpokládá se, že je to důsledkem variabilní domény ECL2 epitopu CD9. Čímž došli k závěru, že protilátka mAb IVA50 není vhodná pro analýzu tetraspaninu CD9 u prasečích oocytů. Oproti bovinním oocytů, byl vzor (detekován polyklonálními protilátkami) shodný pro expresi CD9 a CD81 v oolemě a ve shlucích se nacházely také na vnitřním okraji zona pellucida, ve všech fázích zrání. V případě tetraspaninu CD151 u prasečích oocytů, byla potvrzená exprese tohoto proteinu zatím pouze na základě in silico analýz, tedy analýzou dostupných transkriptomických a proteomických dat (Jankovičová et al. 2023).

3.9 Exprese tetraspaninů na kumulárních buňkách

Kromě plazmatické membrány oocytů, byla imunohistochemickou analýzou potvrzena exprese tetraspaninu CD81 také u kumulárních buněk, obklopujících ovulovaný myší oocyt. Na základě tohoto výsledku se předpokládal dřívější kontakt tetraspaninu CD81 se spermií na úrovni somatického komplexu (Tanigawa et al. 2008). Oproti tomu, Ohnami et al. (2012) se domnívali, že vyšší expresní vzor CD81 u kumulárních buněk myší je zodpovědný za lokalizaci tetrasapninu CD81 na vnitřním okraji *zona pellucida*. Naproti tomu, CD9 je pravděpodobně exprimován oocyty, jelikož zasahoval do perivitelinního prostoru. Tím se odhadovaly nezávislé exprese, které utváří extracelulární komponent oocytů. I v případě skotu byly potvrzené expresní vzory tetraspaninu CD81, CD9 (Jankovičová et al. 2016; Jankovičová et al. 2023).

Výskyt tetraspaninů v somatickém prostředí je vysvětlováno možným podílem na morfogenezi granulózních buněk a folikulů během vývoje (Jankovičová et al. 2023). Další detekce signálu CD9 bylo zaznamenáno ve filamentové struktuře (v MII) procházející vrstvou *zona pellucida*. Tento jev byl vysvětlen jako možné zapojení tohoto tetraspaninu do transzonální projekce (Jankovičová et al. 2019; Jankovičová et al. 2023). Transzonální projekce zprostředkovává cestu pro dodání materiálu ze somatického komplexu do oocytu. V podobě aktinových filament tak z kumulárních buněk prostupuje projekce skrze *zonu pellucidu*, aby mohla následně interagovat s mikroklky oolemy. Takto získávají oocyty od kumulárních buněk molekuly RNA, čímž je kompenzována dlouhá transkripční neschopnost oocytů během zrání (Macaulay et al. 2014). Také kumulární produkce cAMP výrazně přispívá k celkovému obsahu cAMP v oocytech (Thomas et al. 2004). Zároveň je ze strany oocytu nezbytná jeho parakrinní signalizace pro funkci kumulárních buněk (Sutton et al. 2003). Avšak komunikace skrze gap junctions je možná jen do určité doby, v *in vitro* podmínkách bylo například u bovinních oocytů vyměřen čas konce tohoto spojení, který nastal 9 hodin po indukci obnovení meiotického a úplné ukončení mezibuněčné komunikace nastalo až po 22 hodinách (Macaulay et al. 2014).

4 Metodika

4.1 Odběry vaječníků

Z jatek v Příbrami byly odebírány vaječníky prepubertálních prasniček z blíže neurčených chovů. Pro transport vaječníků z jatek do laboratoře byly využity termoláhve s fyziologickým roztokem (0,9 % chlorid sodný; NaCl) o teplotě 39 °C.

4.2 Zisk oocytů

Pro získání oocytů s ukončeným růstem, ve stádiu zárodečného váčku (GV), byla provedena aspirace folikulární tekutiny z folikulů o průměru 2-5 mm prostřednictvím jehly 20G a stříkačky o objemu 20 ml. Ze získané folikulární tekutiny byly pod stereomikroskopem odsávány oocyty pomocí skleněné tenkostěnné pipety a následně přenášeny do kapek modifikovaného média M199, jehož složení je uvedeno v Tabulce 1. Pro experimentální účely, byly vybrány pouze oocyty s nepoškozenou cytoplazmou a kompaktním obalem kumulárních buněk.

4.3 Kultivace oocytů

K manipulaci s prasečími oocyty bylo zvoleno výše uvedené médium M199 (Merck KGaA, Německo, katalogové číslo M4530), které bylo modifikováno. Čerstvý zásobní roztok modifikovaného média byl připravován ve flow boxu každý týden a sterilizovaný uchováván v prostředí směsi 5% CO₂ se vzduchem při teplotě 4 °C.

Tabulka	1: SI	ožení	modifikov	vaného	média	M199 k	x manin	ulaci s	nrasečími	oocvtv
1 abuika	1.01	ozem	mouniko	ancho	muua		mamp	ulaci s	prascemm	outjuj

Chemikálie	Množství ve 100 ml média M199
Laktát sodný (katalogové číslo 1614308)	60 mg
Pyruvát sodný (katalogové číslo S8636)	25 mg
HEPES (katalogové číslo 391333)	150 mg
Gentamicin (katalogové číslo G1397	2,5 mg
Bovinní sérový albumin (katalogové číslo A9205)	50 mg

Všechny použité chemikálie jsou původem z firmy Merck KGaA Německo

Prasečí oocyty byly kultivovány ve čtyřjamkových Petriho miskách (Nunc, Roskilde, Dánsko) v 1 ml modifikovaného média M199 se sérovým albuminem s přídavkem hormonů eCG/hCG (PG 600, Intervet Boxmeer, Holandsko) 13,4:6,6 IU/ml. Pro experimenty byly použity jednak oocyty ve stádiu zárodečného váčku (GV) bez kultivace, dále pak byly oocyty ve stádiu zárodečného váčku, které byly kultivovány po dobu 24 nebo 48 hodin do stádia první (MI) a druhé meiotické metafáze (MII).

4.4 Barvení a fixace oocytů pro stanovení fáze meiotického zrání

Jak bylo uvedeno výše, pro experimenty byly použity jednak oocyty s ukončeným růstem, ve stádiu zárodečného váčku (GV), které nebyly kultivovány, dále pak byly oocyty ve stádiu GV kultivovány po dobu 24 hodin do stádia první meiotické metafáze (MI) nebo 48 hodin do stádia druhé meiotické metafáze (MII).

V každém experimentu bylo kontrolováno jaderné zrání, kultivováno bylo nejméně 45 oocytů, 20 pro kontrolu jaderného zrání a zbytek pro vlastní experiment. Pro experimenty byly oocyty použity jen v případě, že 85% ze sledovaného kontrolního vzorku 20 oocytů bylo v požadované fázi meiotického zrání, tedy buď MI nebo MII. Pokud oocyty nesplnily dané kritérium, nebyly pro další experimenty použity.

Oocyty pro kontrolu zrání byly po odstranění kumulárních buněk a trojím promytí v PBS přeneseny skleněnou tenkostěnnou pipetou na střed podložního sklíčka. Podél kapky oocytů v PBS (Merck KGaA, Německo, katalogové číslo P4417) byly lékařskou vazelínou vytvořeny dva podélné proužky o délce zhruba 0,7 cm. Následovalo položení krycího sklíčka na kapku oocytů a proužků vazelíny a jeho zafixování pomocí kovových háčků tak, že se na krycí sklo tlačilo do té doby, než začala zrnit žloutková zrna v oocytech. Pro fixaci oocytů byl použit roztok kyseliny octové s ethanolem v poměru 1:3 po minimální dobu 24 hodin a následně byly oocyty zbavené kumulárních buněk barveny 1% orceinem v octové kyselině (Merck KGaA, Německo).

Vyhodnocení fáze zrání probíhalo pod světelným mikroskopem s fázovým kontrastem (zvětšení 400x, stereomikroskop Nikon, Japonsko). Hodnocené fáze meiotického zrání – stádium zárodečného váčku (GV), pozdní diakineze (LD), metafáze I (MI), anafáze I (AI), telofáze I (TI) a metafáze II (MII) byly v souladu s kritérii definovanými Motlíkem a Fulkou (1976). Abnormální konfigurace chromatinu, jenž neodpovídala těmto kritériím, byla zhodnocena jako degenerativní.

4.5 Western blot analýza

Po odstranění kumulárních buněk byly oocyty opláchnuty ve třech kapkách fosfátového pufru PBS o objemu 200 µl (složení viz Tabulka 2). Posléze byly oocyty vloženy do mikrozkumavky s obsahem 7 µl koncentrovaného vzorkového pufru s dodecylsulfátem sodným (SDS) (Tabulka 8). Dále byly vzorky povařeny 3 minuty ve vodní lázni a následně zmraženy. Odstraněné kumulární buňky byly odděleně od oocytů centrifugovány v 1ml PBS po dobu 3 minut při 5000 otáčkách a poté vloženy do 7 µl koncentrovaného SDS vzorkového pufru. Stejně jako vzorky s oocyty, byly tyto vzorky následně povařeny ve vodní lázni po dobu 3 minut a poté zamraženy. Vzorky byly uchovány za teploty -20°C a před elektroforetickou separací byly naředěny 13 µl redestilované vody.

Elektroforetická separace proteinů byla realizována nejprve pomocí zaostřovacího 4% polyakrylamidového gelu (Tabulka 5) s přídavkem dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) a následně byl použit 12% separační SDS-PAGE gel (Tabulka 6). Proteiny, které byly v gelu rozřazeny podle molekulové hmotnosti, byly poté přetištěny na nitrocelulózovou membránu (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech, USA). K ověření úspěšného přetištění proteinů na

membránu a pro jejich následnou identifikaci byl využit hmotnostní marker Prestained molecular weight bovine standard (Bio-Rad, Montreal, Kanada, katalogové číslo 161-0318). Dále byla membrána blokována přes noc v 2% roztoku netučného mléka v PBS s přídavkem 0.1% Tween 20. Po této fázi byla provedena inkubace membrány s primární králičí monoklonální protilátkou anti – CD151 (Merck KGaA, Německo, katalogové číslo HPA011906) a to v koncentraci 1:1 000 po dobu 2 hodin. Po následném promytí byla membrána inkubována se sekundární myší protilátkou (Amersham GE Healthcare, Life Sciences, Velká Británie, katalogové číslo NIF825) o koncentraci 1:30 000. Použité primární a sekundární protilátky byly rozpuštěny ve 2% odtučněném mléce. Pro stanovení celkové nanášky proteinu byla využita protilátka specifická proti α – tubulinu. Vizualizace přenesených proteinů s navázanou protilátkou byla zprostředkována pomocí Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie) a s použitím přístroje Azure Biosystems C300 (BioTech, Česká republika).

Chemikálie	Množství
NaHPO ₄	29 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2,96 g
NaCl (100 mM)	5,84 g
H ₂ O	do 1 000 ml

Tabulka 2 Složení PBS pufru

Tabulka 3 Složení lyzačního pufru (5ml)

Chemikálie	Množství
10% Triton X	0,15 ml
10% SDS	0,05 ml
PBS	4,3 ml
10% inhibitor proteáz v PBS	0,5 ml

Tabulka 4 Složení pufru do separačního gelu

Chemikálie	Množství
2M Tris – HCl (pH 8,8)	7,5 ml
10% SDS	0,4 ml
H ₂ O	2,1 ml

Tabulka 5 Složení pufru do 4% zaostřovacího gelu (10 ml)

Chemikálie	Množství
1M Tris – HCl (pH 6,8)	5 ml
10% SDS	0,4 ml
H ₂ O	4,6 ml

Tabulka 6 Složení 12% separačního gelu (15 ml)

Chemikálie	Množství
30% akrylamid	7,5 ml
Pufr (pH 8,8)	3,7 ml
Destilovaná H2O	3,8 ml
Persulfát amonný	75 μl
TEMED (N, N, N', N' - tetramethylen-	
ethylendiamin)	5 μl

Tabulka 7 Složení elektroforetického pufru

Chemikálie	Množství
25 mM Tris	3 g
192 mM glycin	14,4 g
10% SDS	10 ml
H ₂ O	1 000 ml

Tabulka 8 Složení vzorkového pufru

Chemikálie	Množství
1 M Tris – HCl (pH 6,8)	0,6 ml
50% glycerol	5 ml
10% SDS	2 ml
1% bromfenolová modř	0,5 ml
H ₂ O	0,9 ml

Tabulka 9 Složení blotovacího pufru – Towbinův pufr

Chemikálie	Množství
25 mM Tris	3 g
192 mM glycin	14,4 g
10% SDS	1 ml
Metanol (před použitím)	100 ml
H ₂ O	1 000 ml

Tabulka 10 Složení PBST pufru

Chemikálie	Množství
Na ₂ HPO ₄	29 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2,96 g
NaCl (100 mM)	5,84 g
Tween 20	1 ml
H ₂ O	do 1 000 ml

4.6 Imunocytochemická analýza

Nejprve byly oocyty v různé fázi meiotického zrání zbaveny kumulárních buněk. Odstranění buněk bylo prováděno mechanickým způsobem, pomocí nasávání skrze úzkou tenkostěnnou skleněnou kapiláru, která byla připevněna do žluté nebo zelené embryologické tlačky. Po očištění oocytů od kumulárních buněk následovalo odstranění vrstvy zona pellucida pomocí 0,1% pronázy (Merck KGaA, Německo, katalogové číslo P5147). U oocytů prostých kumulárních buněk a vrstvy zona pellucida byl dále proveden oplach ve třech kapkách 0,1% roztoku BSA v PBS. Následná fixace oocytů probíhala v 2,5% roztoku paraformaldehydu v PBS při laboratorní teplotě po dobu 60 minut, po 30 minutách byl vyměněn fixační roztok za čerstvý. Po fixaci byly oocyty permeabilizovány použitím 0,5% roztoku Tritonu X-100 v PBS po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Pro následný oplach oocytů byl zvolen 0,1% roztok Tweenu 20 v PBS a k pozdější inkubaci bylo využito inkubační médium 0,1% BSA a 0,01% Tween 20 v PBS s králičí rekombinantní monoklonální primární protilátkou anti-CD151 (Merck KGaA, Německo, katalogové číslo HPA011906) ředěnou v poměru 1:2 000. Po inkubaci byly oocyty následně při laboratorní teplotě třikrát promyty v roztoku 0,1% Tween 20 v PBS. Dále proběhla inkubace oocytů v inkubačním médiu se sekundární protilátkou anti-myší IgG konjugovanou s fluorescein-5-izothiokyanátem, v poměru 1:3 000 (FITC; Jackson ImmunoResearch, INC., USA). Inkubace probíhala po dobu 1 hodiny ve tmě při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly oocyty propláchnuty v roztoku Tween 20 v PBS a následně promyty v 0,1% roztoku BSA v PBS po dobu 10 minut. Oocyty byly po opláchnutí v ekvilibračním pufru montovány montovacím médiem s obsahem DAPI Vectashield (Vector Laboratories, USA) na podložní teflonová skla. Kontrolní skupina byla inkubována pouze se sekundární protilátkou, primární protilátka nebyla aplikována. Složení roztoků, které byly použity pro imunocytochemickou analýzu je uvedeno v Tabulce 11.

Analýza vzorků byla realizována laserovým konfokálním mikroskopem (Zeiss LSM, Německo), který se nachází v budově Technické fakulty, ČZU v Praze. Fluorescence barviva FITC byla stanovována při emisní vlnové délce 517 nm, úroveň laseru byla ve shodném nastavení u všech experimentálních skupin. Fluorescence barviva 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) byla stanovena při emisní vlnové délce 461 nm. Ze získaných snímků z konfokálního mikroskopu byl následně snímán fluorescenční signál detekovaného proteinu CD151 v oocytech v průběhu jejich meiotického zrání.

Roztok	Dílčí chemikálie	
2,5% paraformaldenyd v PBS	2,5 g paraformaldenydu + 50 ml, redestilovane H ₂ O	
5% roztok BSA	1 g BSA + 20 ml redestilované H ₂ O	
PBS + BSA	1 ml PBS + 20 µl 5% BSA	
PBS + Triton X-100 + BSA	1 ml PBS + 50 µl Triton X-100 + 20 µl 5% BSA	
PBS + Tween 20	1 ml PBS + 10 µl 10% Tween 20	
Inkubační médium	PBS – 10 μ l 10% Tween 20 + 20 μ l 5% BSA	

Tabulka 11 Přehled roztoků použitých pro imunocytochemickou analýzu

4.7 Statistická analýza dat

Získaná data relativní intenzity fluorescence, která byla odečtena ze snímků získaných z laserového konfokálního mikroskopu, byla analyzována pomocí programu STATISTICA verze 14.0. Pro analýzu dat byla zvolená statistická metoda jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) a následné meziskupinové diference byly vyhodnoceny Scheffého testem. Pro statistické vyhodnocení získaných biologických dat byla zvolena hladina významnosti α =0,05. Každý experiment byl 4x zopakován.

4.8 Schéma experimentu

4.8.1 Experiment 1: Detekce tetraspaninu CD151 v prasečích oocytech a jejich kumulárních buňkách během meiotického zrání metodou Western blot

Cílem prvního experimentu bylo potvrdit přítomnosti tetraspaninu CD151 v prasečích oocytech a jejich kumulárních buňkách v daných fázích meiotického zrání a ověření specifity zvolené protilátky. Analyzováno bylo vždy 100 oocytů v daném stádiu meiotického zrání (GV, MI a MII), popřípadě kumulární buňky získané z daného vzorku 100 oocytů.

Pro detekci proteinů byla použitá elektroforetická separace polyakrylamidovým gelem s přídavkem SDS. Po elektroforetické separaci a rozdělení dle molekulové hmotnosti byly proteiny přetištěny na nitrocelulózovou membránu. Proteiny přetištěné na membránu byly nejprve inkubovány s primární (anti-CD151; rekombinantní králičí monoklonální) a následně se sekundární (anti – myší IgG) protilátkou podle popisu v materiálech a metodách. Po inkubaci byla provedena vizualizace proteinů metodou ECL Advance Western Blotting Detection Kit a bloty snímány přístrojem Azure 300 a hodnoceny analýzou obrazu.

Experiment byl 4x opakován.

4.8.2 Experiment 2: Detekce tetraspaninu CD151 během meiotického zrání prasečích oocytů imunohistochemickou analýzou

Cílem druhého experimentu byla detekovat CD151 protein v oocytu prasete během jeho meiotického zrání a zhodnotit intenzitu signálu CD151. Analyzovány byly oocyty ve stádiu zárodečného váčku (bez kultivace) a první (24 hodin *in vitro* kultivace) a druhé meiotické metafáze (48 hodin *in vitro* kultivace). Intenzita signálu pro tetraspaniny CD151 byla hodnocena pomocí nepřímé imunofluorescenční metody s využitím konfokálního mikroskopu a následné analýzy obrazu v programu NIS Elements. Pro jednotlivé kategorie byly analyzováno nejméně 15 oocytů v dané fázi meiotického zrání.

Experiment byl 4x opakován.

5 Výsledky

Nejprve byla metodou Western blot ověřena specifita dané protilátky Merck KGaA anti-CD151 (katalogové číslo HPA011906). Protilátka označila protein o molekulové hmotnosti přibližně 29 kDa a to jak v oocytech, tak i kumulárních buňkách z oocytů ve stádiu GV, MI a MII. Poté byla přítomnost tetraspaninového proteinu potvrzena také imunohistochemickou analýzou.

5.1 Detekce tetraspaninu CD151 v prasečích oocytech v průběhu meiotického zrání metodou Western blot

Western blotting technikou byly analyzovány tři kategorie oocytů a jejich kumulárních buněk, GV, MI a MII. Každý vzorek obsahoval 100 oocytů, popřípadě kumulární buňky z nich získané. Po separaci elektroforézou, byly proteiny přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Pro detekci tetraspaninu CD151 byla zvolena monoklonální králičí protilátka. Ke stanovení celkové nanášky proteinu byla použita protilátka specifická vůči α – tubulinu.

Zvolenou metodou Western blot byla detekována reakce primární protilátky proti proteinu s molekulovou hmotností pohybující se kolem 29 kDa, což je odpovídající molekulová hmotnost, která je popisována pro tetraspanin CD151.

U analyzovaných oocytů se protein o dané molekulové hmotnosti 29 kDa vyskytoval jak v oocytech s ukončenou periodou růstu, tak také během jejich meiotického zrání v obou stádiích meiotické metafáze. Také analýza okolních kumulárních buněk potvrdila, že se v nich protein CD151 vyskytuje, a to jak na konci růstové periody u kumulárních buněk z oocytů ve stádiu GV, tak také u buněk z oocytů v MI a MII (Obrázek 6).



Obrázek 6 Western blot detekce proteinu CD151 v oocytech a kumulárních buňkách prasete v průběhu meiotického zrání. Oocyty ve stádiu GV – zárodečného váčku, MI – první meiotické metafáze, MII – druhé meiotické metafáze; kumulární buňky z oocytů ve stádiu GV K – zárodečného váčku, MI K – první meiotické metafáze, MII K – druhé meiotické metafáze

5.2 Detekce tetraspaninu CD151 v prasečích oocytech v průběhu meiotického zrání pomocí imunohistochemické metody

Po odstranění kumulárních buněk a vrstvy *zona pellucida* pronázou byly oocyty inkubovány nejprve s primární králičí protilátkou proti CD151 a následně se sekundární myší protilátkou.

Jako negativní kontrola byly oocyty barveny pouze sekundární protilátkou, s vynecháním primární protilátky. K detekci tetraspaninu CD151 byla vybrána sekundární protilátka obsahující barvivo FITC emitující zelenou barvu. Oocyty byly montovány montovacím médiem Vectashiled s přídavkem DAPI, což je barvivo, které se váže na jaderné struktury.

Následné snímání fluorescenčního signálu tetraspaninu CD151 v prasečích oocytech v různých fázích meiotického zrání potvrdilo přítomnost proteinu ve všech sledovaných fázích meiotického zrání oocytů (GV, MI a MII). Po získání dat průměrné intenzity každého vzorku všech skupin byla provedena statistická analýza dat v programu STATISTICA verze 14.0. Dle výsledků zvolené metody jednofaktorová ANOVA byl shledán statisticky významný rozdíl na hladině významnosti α =0,05 (p = 0,002147; p <0,05). Proto byl pro zjištění meziskupinových rozdílů následně zvolen post hoc Scheffého test, z jehož výstupů byl vyhodnocen statisticky významný rozdíl mezi skupinou ve stádiu GV a MI (p = 0,014845) a též byl shledán statisticky významný rozdíl mezi skupinou ve stádiu GV a MII (p =0,005251). Nebyl však popsán statisticky významný mezi skupinami oocytů ve stádiu MI a MII (p =0,923215) (viz Tabulka 12). Zároveň byl vyhodnocen stupeň intenzity fluorescenčního signálu vztažený k oocytům ve stádiu zárodečného váčku (GV = 100 %), jejíž průměrné relativní hodnoty jsou popsány v Grafu 1.



Obrázek 7 Imunocytochemická analýza distribuce proteinu CD151 v průběhu meiotických fází prasečích oocytů. Zleva GV – oocyt ve stádiu zárodečného váčku (GV), MI – oocyt v první meiotické metafázi (MI), MII – oocyt v druhé meiotické metafázi (MII); FITC barvivem sekundární protilátky je zelenou fluorescencí vyznačen tetraspanin CD151. Modře emitujícím barvivem DAPI jsou fluorescenčně označeny jaderné struktury.

Tabulka 12. Výsledky Scheffého post-hoc testu zvoleného po výsledku jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) skupin fáze zrání p = 0,002147 (p <0.05)

Fáze zrání	GV	MI	MII
GV		0,014845	0,005251
MI	0,014845		0,923215
MII	0,005251	0,923215	





Hodnota fluorescenční intenzity signálu tetraspaninu CD151 v prasečích oocytech byla vztažena k hodnotě fluorescenční intenzity naměřené u oocytů ve stádiu GV (100 %). U skupiny oocytů v MI fázi byl u relativní intenzity signálu shledán statisticky významný pokles (77,30 %). Signifikantní statistický rozdíl v průměrné intenzitě signálu mezi skupinou oocytů ve fázi MI a MII nebyl hodnocen jako statisticky významný, jelikož relativní průměr u skupiny oocytů ve fázi MII byla (74,32 %).

6 Diskuze

Z literatury je známo, že exprese transmembránového tetraspaninového proteinu CD151 byla zatím popsána pouze u oocytu myši (Ziyyat et al. 2006), skotu (Jankovičová et al. 2019) a také v oocytu člověka (Ziyyat et al. 2006). V případě prasečího modelu byla exprese odhadována pouze *in silico* analýzou počítačových dat z transkriptomických a proteomických databází (Jankovičová et al. 2023). V této diplomové práci byla exprese tetraspaninu CD151 potvrzena jak u oocytu prasete, tak i jeho kumulárních buněk. Metoda Western blot prokázala přítomnost hledaného proteinu o molekulové hmotnosti 29 kDa (Geary et al. 2001) v lyzátech vyrobených z prasečích oocytů, které byly ve třech fázích meiotického zrání, GV, MI a MII a také v kumulárních buňkách z nich získaných. Také imunocytochemická analýzy přítomnost CD151 proteinu v prasečích oocytech potvrdila.

Byl sledován trend v podobě intenzity imunofluorescenčního signálu pro tetraspanin CD151 v průběhu meiotického zrání. V oocytech intenzita imunofluorescenčního signálu v průběhu meiotického zrání klesala. Nejprve byl pozorován prudký pokles o 23 % v intenzitě signálu při přechodu ze stádia GV do stádia první meiotické metafáze, signál klesal až do druhé meiotické metafáze, ale pokles o 3 % již nebyl hodnocen jako statisticky významný, tento nečekaný trend může být vysvětlen několika možnostmi.

Prvním možným vysvětlením snížené intenzity signálu při přechodu z GV do MI fáze meiotického zrání je částečné zakrytí epitopu CD151 proteinu pro monoklonální protilátku, kdy zakrytí epitopu může být způsobeno vazbou tetraspaniny CD151 s integrinem Z literatury je známo, že tetraspanin CD151 s integriny interaguje, zejména s integrinem s podjednotkou β1 (Ziyyat et al. 2006). V experimentu s buňkami A549, což jsou lidské adenokarcinomové buňky plicního epitelu), buňkami NIH 3T3, což jsou myší fibroblastické buňky a s buňkami HEK-293T, kdy se jedná o lidské embryonální ledvinové buňky, byla popsána charakteristická vazba integrinu s tetraspaninem CD151, která zapříčinila částečný překryv epitopu, na kterou se vázala skupina myších anti-lidských monoklonálních protilátek, čímž byla částečně blokována vazba tetraspanin – protilátka. Jednalo se o dva po sobě jdoucí segmenty zahrnující dva epitopy pro monoklonální protilátku (Leu191 a Gln194), které tvoří rozhraní mezi CD151 a integrinem α3β1 a spolu s epitopem zahrnujícím Gly176/Gly177 jsou překrývány navázaným integrinem (Yamada et al. 2008). Vzhledem k použití detergentu Triton X 100 před imunohistochemickou analýzou je tato možnost interakce tetraspaniny s integrinem méně pravděpodobná, protože se uvádí, že v detergentu Triton X-100 jsou proteinové interakce charakteristické přímou vazbou (Claas et al. 2001). Studie Berditchevski et al. (2001) na buňkách lidské buněčné linie MDA-MB-231 (rakovina prsu) popsala nezbytnost velké extracelulární smyčky tetraspaninu CD151, která zprostředkovává dostatečnou stabilitu pro interakci s podjednotkou α3 integrinu v přítomnosti detergentu Tritonu 100-X. Zároveň je přípustná interakce s dalších částí tetraspaninu, které přispívají k asociaci komplexu tetraspanin CD151 – integrin α3β1. Vliv buněčného proteinového prostředí na vazbu mezi monoklonální protilátkou a tetraspaninem CD151 byla též potvrzena u lidských hemopoetických buněk a tkáňových řezů (srdeční svalstvo, kůže nebo tenkého střeva). Příčinou odlišných vzorců vazby různých monoklonálních CD151 protilátek bylo opět vysvětlováno do jisté míry přítomností proteinu v komplexech s různými integriny (Geary et al. 2001).

Další možnou příčinou snížení intenzity imunofluorescenčního signálu by mohla být mezidruhová rozdílnost. Předpokládá se, že napříč savci je rozdílná exprese tetraspaninů v rámci oocytů a okolních somatických buněk, což poukazuje na možné jedinečné druhově závislé mechanismy zapojení tetraspaninů (Jankovičová et al. 2023). Mezidruhová rozdílnost se ukázala i v distribuci různých tetraspaninů. Příkladem je tetraspanin CD9, který se u myších oocytů lokalizuje homogenně po oolemmě až na část, kde se vyskytuje metafázní destička (Zhu et al. 2002). Oproti tomu u prasečích oocytů ve fázi MII byl detekován tento tetraspanin nezávisle na přítomnosti metafázní destičky (Li et al. 2004). Další mezidruhová odlišnost byla popsána také u tetraspaninu CD151, která se vztahovala k nezbytné přítomnosti proteinu na oolemě během fúze. Zatímco u myších oocytů se nejeví tetraspanin jako nezbytná molekula pro fúzi, u lidských oocytů je jeho přítomnost nenahraditelná. Opět je zde důvodem asociace tetraspaninu CD151 do komplexu s integrinem s podjednotkou β1. Tento integrin však u myších oocytů není tak zásadní pro fúzi (Ziyyat et al. 2006), stejně tak u prasečích oocytů není esenciální přítomnost integrinu s podjednotkou β1 a má tedy doprovodný charakter (Linfor a Berger 2000).

Obě navrhované příčiny snížené intenzity signálu exprese tetraspaninu CD151, které se navzájem nevylučují, mají však shodný zdroj příčiny. Tetraspaniny jsou transmembránové proteiny, který mohou interagovat s integriny a tím spojovat s ostatními tetraspaniny (Serru et al. 1999). V případě tetraspaninu CD151 byla potvrzená vazba s integriny α6β4, α3β1 a α6β1 (Yang et al. 2004). U lidských a myších oocytů se předpokládalo, že tetraspanin CD151 asociuje s integrinem s podjednotkou β1. Díky této interakci a tvoření shluků může integrin interagovat s fertilinem na membráně spermie (Zivyat et al. 2006). Fertiliny jsou integrální glykoproteiny, tvořící fertilinový komplex, který hraje důležitou roli při interakcích membrán gamet (Fàbrega et al. 2011). Dle Evans et. al (1998) isou dezintegrinové domény fertilinu přímo kritické pro adhezi spermie s vajíčkem. Na základě předešlých studií a našich výsledků předpokládáme, že tetraspanin CD151 během meiotického zrání prasečích oocytů může utvářet pomocí tetraspaninové sítě vazbu s integriny. Jelikož tetraspanin svou EC2 doménou reguluje pomocí cis interakce integrinovou funkci na buněčném povrchu (Yu et al. 2017), může tímto způsobem přímo nebo nepřímo napomáhat sestavit adhezní komplex. Lze se tedy domnívat, že během meiotického zrání dochází k velkým dynamickým změnám, které molekulárně připraví oolemu na adhezi a následnou fúzi se spermií.

Tato práce rovněž potvrdila expresi tetraspaninu CD151 v kumulárních buňkách, které tvoří somatický komplex, jež obklopuje oocyty během jejich meiotického zrání. Dle Jankovičové et al. (2023) se mohou tetraspaniny asociované s integriny podílet nejen na organizaci buněčné membrány, ale také mohou hrát roli v morfogenezi folikulů a granulózních buňkách byl interpretován jako možný zdroj exprese nezbytné pro vytvoření extracelulárního komponentu oocytu. Bylo tak usuzováno na základě lokalizace tetraspaninu CD 81 na vnitřním okraji vrstvy *zona pellucida* (Ohnami et al. 2012). U prasečích oocytů byla také popsána exprese tetraspaninu CD81 a navíc CD9, které se ve shlucích nacházely na vnitřním okraji vrstvy *zona pellucida* (Jankovičová et al. 2019). U bovinních oocytů byla lokalizace tetraspaninu CD151 popsána ve stádiu GV jako rozptýlená s přesahem do perivitelinního prostoru, následně v MII fázi byla detekce zúžená na shlukování naléhající na oolemu (Jankovičová et a. 2023). U bovinních oocytů se prokázalo, že komunikace mezi kumulárními

buňky a oocytem značně klesá v průběhu *in vitro* zrání. Při nástupu GVBD došlo k výraznému poklesu komunikace skrze *gap junction* na 40 % mezi těmito buňkami (Thomas et al. 2004). Je tedy otázkou, zda možný pokles tetraspaninu CD151 v oocytech není zapříčiněný sníženou distribucí z kumulárních buněk do oocytu, jelikož během *in vitro* zrání dochází k radikálnímu snížení komunikace mezi oocytem a kumulárními buňkami. Množství proteinů v oocytech a kumulárních buňkách jsme v našich experimentech po Western blot analýze nekvantifikovali.

S mezibuněčnou komunikací se pojí poslední možný důvod výskytu tetraspaninu CD151 na kumulárních buňkách. Alternativním vysvětlením pro přítomnosti tetraspaninu CD151 je předpokládaný podíl na transzonální projekci. Podle výsledků Jankovičová et al. (2019) a Jankovičová et al. (2023) se na transzonální projekci u bovinních oocytů podílí například tetraspanin CD9. Tato funkce byla tetraspaninu přičítána na základě jeho detekce ve vrstvě *zona pellucida*, kdy se pomocí monoklonální protilátky prokázala jeho přítomnost na filamentech procházejících zónou. Vzhledem k malému množství informací o proteinu CD151 lze pouze spekulovat, jaké role zastupuje jak na úrovni gamet, tak na úrovni somatických buněk, které oocyt obklopují.

7 Závěr

Pomocí Western blot metody byl v této diplomové práci potvrzen výskyt tetraspaninu CD151 u prasečích oocytů a také jejich kumulárních buněk. Hledaný protein byl detekován v oocytech ve stádiu zárodečného váčku a také v oocytech po 24 a 48 hodinách *in vitro* zrání, ve stádiu první a druhé meiotické metafáze a v kumulárních buňkách z těchto oocytů získaných.

Následná imunocytochemická analýza potvrdila rozdíly v průměrných intenzitách signálu exprimovaného proteinu CD151 mezi skupinami oocytů ve vybraných fází zrání (GV, MI a MII). Signifikantní statistické rozdíly byly popsány mezi skupinami oocytů GV a MI a také mezi skupinami GV a MII. Naproti tomu nebyl shledán statisticky významný rozdíl mezi skupinami oocytů ve stádiu MI a MII. Rozdíly mezi skupinami byly vysvětlovány jako možný podíl tetraspaninu CD151 na přípravných mechanismech s proteinovými partnery v rámci tetraspaninové sítě. Přípravné kroky oocytu v průběhu meiotického zrání mohou napomoct k přípravě oolemy oocytu na budoucí kontakt s membránou spermie a tím tak následně zprostředkovat fúzi membrán.

Exprese tetraspaninu CD151 na kumulárních buňkách u prasečích oocytů je vysvětlováno možnou schopností distribuce tetraspaninu k oocytu v průběhu meiotického zrání, nebo se může tetraspanin CD151 podílet na morfogenezi granulárních buněk a folikulů během vývoje. Alternativně se můžeme domnívat, že by se tetraspanin zapojoval do mezibuněčné komunikace, tedy byl součástí transzonální projekce

V budoucnu je nezbytné provést další studie zaměřené na tetraspanin CD151. Pro lepší pochopení molekulárního mechanismu, kterým tato molekula disponuje a významně se podílí na zisku adhezních vlastností oocytu je potřeba popsat jeho distribuční profil a s možnou kolokalizací s proteinovým partnerem, jako je integrin typu β 1 či α V. Dále by mělo budoucí zkoumání molekuly CD151 cílit na další struktury, mimo oolemu, pro možné potvrzení interakcí oocyt – kumulární buňky.

8 Literatura

Abbott AL, Ducibella T. 2001. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. Frontiers in bioscience: A journal and virtual library 6:792-806.

Acquaviva C, Pines J. 2006. The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C. Journal of cell science **119**: 2401–2404.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. Garland Science, New York.

Almeida EA, Huovila AP, Sutherland AE, Stephens LE, Calarco PG, Shaw LM, Mercurio AM, Sonnenberg A, Primakoff P, Myles DG, White JM. 1995. Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. Cell **81**:1095–1104.

Arroyo A, Kim B, Yeh J. 2020. Luteinizing Hormone Action in Human Oocyte Maturation and Quality: Signaling Pathways, Regulation, and Clinical Impact. Reproductive Sciences **27**:1223–1252.

Auger J. 2018. Spermatogenic Cells—Structure. Pages 53-60 in Skinner MK, editor. Encyclopedia of Reproduction (Second Edition). Academic Press, Massachusetts.

Backs J, Stein P, Backs T, Duncan FE, Grueter CE, McAnally J, Qi X, Schultz RM, Olson EN. 2010. The gamma isoform of CaM kinase II controls mouse egg activation by regulating cell cycle resumption. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**:81–86.

Balakier H, Dziak E, Sojecki A, Librach C, Michalak M, Opas M. 2002. Calcium-binding proteins and calcium-release channels in human maturing oocytes, pronuclear zygotes and early preimplantation embryos. Human reproduction **17**:2938–2947.

Barraud-Lange V, Boucheix C. 2013. The Role of Tetraspanin Complexes in Egg-Sperm Fusion. Pages 203-231 in Berditchevski F, Rubinstein E, editors. Tetraspanins. Springer, Dordrecht.

Baumann O, Walz B. 2001. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. International review of cytology **205**:149–214.

Benammar A, Ziyyat A, Lefèvre B, Wolf JP. 2017. Tetraspanins and Mouse Oocyte Microvilli Related to Fertilizing Ability. Reproductive sciences **24**:1062–1069.

Berditchevski F, Gilbert E, Griffiths MR, Fitter S, Ashman L, Jenner SJ. 2001. Analysis of the CD151-alpha3beta1 integrin and CD151-tetraspanin interactions by mutagenesis. The Journal of biological chemistry **276:**41165–41174.

Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. Nature **508:**483–487.

Bootman MD, Berridge MJ, Roderick HL. 2002. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. Current biology **12**:563–565.

Bronson RA, Fusi F. 1990. Sperm-oolemmal interaction: role of the Arg-Gly-Asp (RGD) adhesion peptide. Fertility and sterility **54**:527–529.

Brooker AS, Berkowitz KM. 2014. The roles of cohesins in mitosis, meiosis, and human health and disease. Methods in molecular biology **1170**:229-266.

Brunet S, Maro B. 2005. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. Reproduction **130**:801–811.

Burkart AD, Xiong B, Baibakov B, Jiménez-Movilla M, Dean J. 2012. Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. The Journal of cell biology **197**:37–44.

Calvert ME, Digilio LC, Herr JC, Coonrod SA. 2003. Oolemmal proteomics--identification of highly abundant heat shock proteins and molecular chaperones in the mature mouse egg and their localization on the plasma membrane. Reproductive biology and endocrinology **1**:27.

Camins A, Pizarro JG, Folch J. 2013. Cyclin-Dependent Kinases. Pages 260-266 in Maloy S, Hughes K, editors. Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition). Academic Press, Massachusetts.

Carpenter AT. 1994. Chiasma function. Cell 77:957–962.

Claas C, Stipp CS, Hemler M. E. 2001. Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. The Journal of biological chemistry **276**:7974–7984.

Clarke PR, Hoffmann I, Draetta G, Karsenti E.1993. Dephosphorylation of cdc25-C by a type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in Xenopus egg extracts. Molecular biology of the cell **4**:397-411.

Cohen PE, Holloway JK. 2015. Chapter 1 - Mammalian Meiosis. Pages 5-57 in Plant TM, Zeleznik AJ, editors. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition). Academic Press, Massachusetts.

Cohen PE. 2018. Meiosis Overview. Pages 5-12 in Skinner MK, editor. Encyclopedia of Reproduction (Second Edition). Academic Press, Massachusetts.

Cohen J, Wang L, Marques S, Ialy-Radio C, Barbaux S, Lefèvre B, Gourier C, Ziyyat A. 2022. Oocyte ERM and EWI Proteins Are Involved in Mouse Fertilization. Frontiers in cell and developmental biology **10**:863729.

Cooper GM. 2000. The Cell: A Molecular Approach (2nd edition). Sinauer Associates Inc, Massachusetts.

Coskun S, Elnour A, Hellani A, Gaafar T. 2003. CD9 is expressed on human oocytes. Fertility and Sterility **80**:268-268.

Dalton CM, Carroll J. 2013. Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. Journal of cell science **126**:2955–2964.

Detchokul S, Williams ED, Parker MW, Frauman AG. 2014. Tetraspanins as regulators of the tumour microenvironment: implications for metastasis and therapeutic strategies. British journal of pharmacology **171**:5462–5490.

Dharani K. 2015.Chapter 7 - Molecular-Grid Model. Pages 123-142 in Dharani K, editor. The Biology of Thought. Academic Press, Massachusetts.

Dupré A, Haccard O, Jessus C. 2011. Mos in the oocyte: how to use MAPK independently of growth factors and transcription to control meiotic divisions. Journal of signal transduction **2011**:1-15.

English AR, Voeltz GK. 2013. Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles. Cold Spring Harbor perspectives in biology 5 (a013227) DOI: 10.1101/cshperspect.a013227.

Evans JP, Schultz RM, Kopf GS. 1998. Roles of the disintegrin domains of mouse fertilins alpha and beta in fertilization. Biology of reproduction **59**:145–152.

Fàbrega A, Guyonnet B, Dacheux JL, Gatti JL, Puigmulé M, Bonet S, Pinart E. 2011. Expression, immunolocalization and processing of fertilins ADAM-1 and ADAM-2 in the boar (Sus domesticus) spermatozoa during epididymal maturation. Reprod Biol Endocrinol **9**:96.

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

Feitosa WB, Lopes E, Visintin JA, Assumpção MEOD. 2020. Endoplasmic reticulum distribution during bovine oocyte activation is regulated by protein kinase C via actin filaments. Journal of cellular physiology **235**:5823–5834.

Felten M, Distler U, von Wiegen N, Łącki M, Behl C, Tenzer S, Stöcker W, Körschgen H. 2024. Substrate profiling of the metalloproteinase ovastacin uncovers specific enzymesubstrate interactions and discloses fertilization-relevant substrates. The FEBS journal **291**:114–131.

FitzHarris G, Marangos P, Carroll J. 2007. Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. Developmental biology **305**:133–144.

Frolíková M, Sur VP, Novotný I, Blazikova M, Vondráková J, Šimoník O, Děd L, Valášková, E, Koptašiková L, Benda A, Postlerová P, Horvath O, Komrsková K. 2023. Juno and CD9 protein network organization in oolemma of mouse oocyte. Frontiers in cell and developmental biology **11**:1110681.

Gaowa et al. 2016. Localization of CD9 on sheep oocytes and early embryos. International Journal of Clinical and Experimental Medicine **9**:7996-8004.

Geary SM, Cambareri AC, Sincock PM, Fitter S, Ashman LK. 2001. Differential tissue expression of epitopes of the tetraspanin CD151 recognised by monoclonal antibodies. Tissue antigens **58**:141–153.

Gebauer F, Richter JD. 1997. Synthesis and function of Mos: the control switch of vertebrate oocyte meiosis. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology **19**:23–28.

Gershon E, Maimon I, Galiani D, Elbaz M, Karasenti S, Dekel N. 2019. High cGMP and low PDE3A activity are associated with oocyte meiotic incompetence. Cell Cycle. Cell cycle **18**:2629-2640.

Gilbert SF. 2000. Developmental Biology 6th Edition. Sinauer Associates, Massachusetts.

Glazar AI, Evans JP. 2009. Immunoglobulin superfamily member IgSF8 (EWI-2) and CD9 in fertilisation: evidence of distinct functions for CD9 and a CD9-associated protein in mammalian sperm-egg interaction. Reproduction, fertility, and development **21**:293–303.

Grøndahl C. 2008. Oocyte maturation. Basic and clinical aspects of in vitro maturation (IVM) with special emphasis of the role of FF-MAS. Danish medical bulletin **55**:1–16.

Hached, K, Xie SZ, Buffin E, Cladière D, Rachez C, Sacras M, Sorger PK, Wassmann K. 2011. Mps1 at kinetochores is essential for female mouse meiosis I. Development **138**:2261–2271.

Handel MA, Schimenti JC. 2010. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. Nature reviews. Genetics **11**:124-136.

Hannon PR, Curry TE. 2018. Folliculogenesis. Pages 72-79 in Skinner MK, editor. Encyclopedia of Reproduction (Second Edition). Academic Press, Massachusetts.

Hansen DV, Tung JJ, Jackson PK. 2006. CaMKII and polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**:608–613.

Hassold T, Hunt P. 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. Nature reviews. Genetics **2**:280-291.

He ZY, Gupta S, Myles D, Primakoff P. 2009. Loss of surface EWI-2 on CD9 null oocytes. Molecular reproduction and development **76**:629–636.

Hemler ME. 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. Nature reviews. Molecular cell biology **6**:801–811.

Higginbottom A, Takahashi Y, Bolling L, Coonrod SA, White JM, Partridge LJ, Monk PN. 2003. Structural requirements for the inhibitory action of the CD9 large extracellular domain in sperm/oocyte binding and fusion. Biochemical and biophysical research communications **311**:208–214.

Hinckley M, Vaccari S, Horner K, Chen R, Conti M. 2005. The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. Developmental biology **287**:249-261.

Hirao Y, Tsuj, Y, Miyano T, Okano A, Miyake M, Kato S, Moor RM. 1995. Association between p34cdc2 levels and meiotic arrest in pig oocytes during early growth. Zygote (Cambridge, England) **3**:325–332.

Horner K, Livera G, Hinckley M, Trinh K, Storm D, Conti M. 2003. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. Developmental biology **258**:385-396.

Huo LJ, Zhong ZS, Liang CG, Wang Q, Yin S, Ai JS, Yu LZ, Chen DY, Schatten H, Sun QY. 2006. Degradation of securin in mouse and pig oocytes is dependent on ubiquitin-proteasome pathway and is required for proteolysis of the cohesion subunit, Rec8, at the metaphase-to-anaphase transition. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library **11**:2193–2202.

Hyslop LA, Nixon VL, Levasseur M, Chapman F, Chiba K, McDougall A, Venables JP, Elliott DJ, Jones KT. 2004. Ca(2+)-promoted cyclin B1 degradation in mouse oocytes requires the establishment of a metaphase arrest. Developmental biology **269**:206–219.

Chalbi M, Barraud-Lange, V, Ravaux B, Howan K, Rodriguez N, Soule P, Ndzoudi A, Boucheix C, Rubinstein E, Wolf JP, Ziyyat A, Perez E, Pincet F, Gourier C. 2014. Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. Development (Cambridge, England) **141**:3732–3739.

Cheeseman IM, Desai A. 2008. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. Nature reviews. Molecular cell biology **9**:33–46.

Chen H, Sampson NS. 1999. Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg alpha6beta1 integrin is the receptor for sperm fertilinbeta. Chemistry & biology 6:1-10.

Chen MS, Tung KS, Coonrod SA, Takahashi Y, Bigler D, Chang A, Yamashita Y, Kincade PW, Herr, JC, White JM. 1999. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**:11830–11835.

Chinnery PF, Schon EA. 2003. Mitochondria. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry **74**:1188–1199.

Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. Nature **434**:234–238.

Inoue N, Hagihara Y, Wright D, Suzuki T, Wada I. 2015. Oocyte-triggered dimerization of sperm IZUMO1 promotes sperm-egg fusion in mice. Nature communications **6**:8858.

Inoue N, Saito T, Wada I. 2020. Unveiling a novel function of CD9 in surface compartmentalization of oocytes. Development 147 (dev189985.) DOI: 10.1242/dev.189985.

Ito J, Kawano N, Hirabayashi M, Shimada M. 2004. The role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on the inactivation of MAP kinase and p34cdc2 kinase during fertilization and activation in pig oocytes. Reproduction **128**:409–415.

Jankovičová J, Frolíková M, Šebková N, Simon M, Cupperová P, Lipcseyová D, Michalková K, Horovska L, Sedláček R, Stopka P, Antalíková J, Dvořáková-Hortová K. 2016. Characterization of tetraspanin protein CD81 in mouse spermatozoa and bovine gametes. Reproduction **152**:785–793.

Jankovičová J, Sečová P, Maňásková-Postlerová P, Šimoník O, Frolíková M, Chmelíková E, Horovská L, Michalková K, Dvořákova-Hortová K, Antalíková J. 2019. Detection of CD9 and CD81 tetraspanins in bovine and porcine oocytes and embryos. International journal of biological macromolecules **123**:931–938.

Jankovičová J, Neuerová Z, Sečová P, Bartóková M, Bubeníčková F, Komrsková K, Postlerová P, Antalíková J. 2020. Tetraspanins in mammalian reproduction: spermatozoa, oocytes and embryos. Medical microbiology and immunology **209**:407–425.

Jankovičová J, Sečová P, Horovská Ľ, Olexiková L, Dujíčková L, Makarevich AV, Michalková K, Antalíková J. 2023. Distribution of tetraspanins in bovine ovarian tissue and fresh/vitrified oocytes. Histochemistry and cell biology **159**:163–183.

Jean C, Haghighirad F, Zhu Y, Chalbi M, Ziyyat A, Rubinstein E, Gourier C, Yip P, Wolf JP, Lee JE, Boucheix C, Barraud-Lange V. 2019. JUNO, the receptor of sperm IZUMO1, is expressed by the human oocyte and is essential for human fertilisation. Human reproduction (Oxford, England) **34**:118–126.

Jégou A, Ziyyat A, Barraud-Lange V, Perez E, Wolf JP, Pincet F, Gourier C. 2011. CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**:10946–10951.

Ji Y, Wolf JP, Jouannet, P, Bomsel, M. 1998. Human gamete fusion can bypass beta1 integrin requirement. Human reproduction **13**:682–689.

Jiang Y, Liu Y, Han F, Zhou J, Zhang X, Xu J, Yu Z, Zhao S, Gao F, Zhao H. 2020. Loss of GM130 does not impair oocyte meiosis and embryo development in mice. Biochemical and biophysical research communications **532**:336–340.

John B.1990. Meiosis (Developmental and Cell Biology Series, Series Number 22). Cambridge University Press, Cambridge.

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

Jones RE, Lopez KH. 2014. Chapter 9 - Gamete Transport and Fertilization. Pages 159-173 in Jones RE, Lopez KH, editors. Human Reproductive Biology (Fourth Edition). Academic Press, Massachusetts.

Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S, Kudo A. 2000. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. Nature genetics **24**:279–282.

Kaji K, Oda S, Miyazaki S, Kudo A. 2002. Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. Developmental biology **247**:327–334.

Karasu ME, Bouftas N, Keeney S, Wassmann K. 2019. Cyclin B3 promotes anaphase I onset in oocyte meiosis. The Journal of cell biology **218**:1265–1281.

Khannpnavar B, Mehta V, Qi C, Korkhov V. 2020. Structure and function of adenylyl cyclases, key enzymes in cellular signaling. Current opinion in structural biology **63**:34-41.

Kim NH, Day BN, Lee HT, Chung KS. 1996. Microfilament assembly and cortical granule distribution during maturation, parthenogenetic activation and fertilisation in the porcine oocyte. Zygote **4**:145–149.

Kinoshita T. 2016. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors: Biochemistry and Cell Biology: Introduction to a Thematic Review Series. Journal of lipid research **57**:4–5.

Kishimoto T. 2015. Entry into mitosis: a solution to the decades-long enigma of MPF. Chromosoma **124**:417–428.

Kline D. 2000. Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. Current topics in developmental biology **50**:125–154.

Komorowski S, Baranowska B, Maleszewski M. 2006. CD9 protein appears on growing mouse oocytes at the time when they develop the ability to fuse with spermatozoa. Zygote **14**:119–123.

Kudo NR, Wassmann K, Anger M, Schuh M, Wirth KG, Xu H, Helmhart W, Kudo H, McKay M, Maro B, Ellenberg J, de Boer P, Nasmyth K. 2006. Resolution of chiasmata in oocytes requires separase-mediated proteolysis. Cell **126**:135–146.

Lane S, Kauppi L. 2019. Meiotic spindle assembly checkpoint and aneuploidy in males versus females. Cellular and molecular life sciences: CMLS **76**:1135–1150.

Larson SM, Lee HJ, Hung PH, Matthews LM, Robinson DN, Evans JP. 2010. Cortical mechanics and meiosis II completion in mammalian oocytes are mediated by myosin-II and Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) proteins. Molecular biology of the cell **21**:3182–3192.

Lazar S, Galiani D, Dekel, N. 2002. cAMP-Dependent PKA negatively regulates polyadenylation of c-mos mRNA in rat oocytes. Molecular endocrinology **16**:331–341.

Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenan, M, Boucheix C. 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. Science **287**:319–321.

Li R., Murray AW. 1991. Feedback control of mitosis in budding yeast. Cell 66:519–531.

Li YH, Hou Y, Ma W, Yuan JX, Zhang D, Sun QY, Wang WH. 2004. Localization of CD9 in pig oocytes and its effects on sperm-egg interaction. Reproduction **127**:151–157.

Li YH, Kang H, Xu YN, Heo YT, Cui XS, Kim NH, Oh JS. 2013. Greatwall kinase is required for meiotic maturation in porcine oocytes. Biology of reproduction **89**:1-7.

Li J, Tang JX, Cheng JM, Hu B, Wang YQ, Aalia B, Li XY, Jin C, Wang XX, Deng, SL, Zhang Y, Chen SR, Qian WP, Sun QY, Huang XX, Liu YX. 2018. Cyclin B2 can compensate for Cyclin B1 in oocyte meiosis I. The Journal of cell biology **217**:3901–3911.

Li J, Ouyang YC, Zhang CH, Qian WP, Sun QY. 2019. The cyclin B2/CDK1 complex inhibits separase activity in mouse oocyte meiosis I. Development (Cambridge, England) **146** (dev182519) DOI: 10.1242/dev.182519.

Li J, Zhang HY, Wan F, Sun QY, Qian WP. 2021. The Cyclin B2/CDK1 Complex Conservatively Inhibits Separase Activity in Oocyte Meiosis II. Frontiers in cell and developmental biology **9**:1-8.

Linfor J, Berger T. 2000. Potential role of alpha v and beta1 integrins as oocyte adhesion molecules during fertilization in pigs. Journal of reproduction and fertility **120**:65–72.

Lowe M. 2011. Structural organization of the Golgi apparatus. Current opinion in cell biology **23**:85–93.

Luo S, Tong L. 2021. Structure and Function of the Separase-Securin Complex. Sub-cellular biochemistry **96**:217–232.

Macaulay AD, Gilbert I, Caballero J, Barreto R, Fournier E, Tossou P, Sirard MA, Clarke HJ, Khandjian ÉW, Richard FJ, Hyttel P, Robert C. 2014. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. Biology of reproduction, **91**:90.

MacEwen MJS, Sancak Y. 2023. Beyond the matrix: structural and physiological advancements in mitochondrial calcium signaling. Biochemical Society transactions **51**:665–673.

Maeda T, Yagyu T. 1997. Changes in the Distribution of Endoplasmic Reticulum in Porcine Oocytes during Meiotic Maturation. Journal of Mammalian Ova Research **14**:175-179.

Martin F, Roth DM, Jans DA, Pouton CW, Partridge LJ, Monk PN, Moseley GW. 2005. Tetraspanins in viral infections: a fundamental role in viral biology? Journal of virology **79**: 10839–10851.

Martín-Romero FJ, López-Guerrero AM, Alvarez IS, Pozo-Guisado E. 2012. Role of storeoperated calcium entry during meiotic progression and fertilization of mammalian oocytes. International review of cell and molecular biology **295**:291–328.

McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. 2006. Mitochondria: more than just a powerhouse. Current biology **16**: 551–560.

McGinnis LK, Rodrigues P, Limback D. 2018. Structural Aspects of Oocyte Maturation. Pages 176-182 in Skinner MK, editor. Encyclopedia of Reproduction (Second Edition). Academic Press, Massachusetts.

McGuinness BE, Anger M, Kouznetsova A, Gil-Bernabé AM, Helmhart W, Kudo NR, Wuensche A, Taylor S, Hoog C, Novak B, Nasmyth K. 2009. Regulation of APC/C activity in oocytes by a Bub1-dependent spindle assembly checkpoint. Current biology **19**:369–380.

McLaughlin EA, Frayne J, Bloomerg G, Hall L. 2001. Do fertilin beta and cyritestin play a major role in mammalian sperm--oolemma interactions? A critical re-evaluation of the use of peptide mimics in identifying specific oocyte recognition protiens. Molecular human reproduction **7**:313–317.

Meinecke B, Janas U, Podhajsky E, Meinecke-Tillmann S. 2001. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene 36:183-188.

Miller BJ, Georges-Labouesse E, Primakoff P, Myles DG. 2000. Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 and is CD9-dependent. The Journal of cell biology **149**:1289–1296.

Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. 2008. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**:12921–12926.

Moreno RD, Schatten G, Ramalho-Santos J. 2002. Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte in vitro maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor brefeldin A. Biology of reproduction **66**:1259–1266.

Motlík J, Fulka J. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. The Journal of experimental zoology **198**:155–162.

Muffly K. 2007. Structure and Function of Organelles and the Cytoskeleton. Pages 1-6 in Enna SJ, Bylund DB, editors.xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Elsevier, Amsterdam.

Musacchio A, Salmon ED. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. Nature reviews. Molecular cell biology **8:**379–393.

Nabti I, Marangos P, Bormann J, Kudo NR, Carroll J. 2014. Dual-mode regulation of the APC/C by CDK1 and MAPK controls meiosis I progression and fidelity. The Journal of cell biology **204**:891–900.

Naito K, Nishimura Y, Yamamuro T, Shimaoka T, Fujii W, Suzuki M, Nishimura T, Kano K. 2010.Upstream Factors Regulating Maturation/M-phase Promoting Factor Activity during Oocyte Maturation. Journal of Mammalian Ova Research **27**:27-34.

Newton AC, Bootman MD, Scott JD. 2016. Second Messengers. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 8 (a005926) DOI: 10.1101/cshperspect.a005926.

Niault T, Hached K, Sotillo R, Sorger PK, Maro B, Benezra R, Wassmann K. 2007. Changing Mad2 levels affects chromosome segregation and spindle assembly checkpoint control in female mouse meiosis I. PloS one 2 (e1165) DOI: 10.1371/journal.pone.0001165.

Ohnami N, Nakamura A, Miyado M, Sato M, Kawano N, Yoshida K, Harada Y, Takezawa Y, Kanai S, Ono C, Takahashi Y, Kimura K, Shida T, Miyado K, Umezawa A. 2012. CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. Biology open **1**:640–647.

Oldham WM, Hamm HE. 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. Nature reviews. Molecular cell biology **9**:60-71.

Oren-Suissa M, Podbilewicz B. 2007. Cell fusion during development. Trends in cell biology **17**:537–546.

Padmanabhan V, Puttabyatappa M, Cardoso RC. 2018. Hypothalamus–Pituitary–Ovary Axis. Pages 121-129 in Skinner MK, editor. Encyclopedia of Reproduction (Second Edition). Academic Press, Massachusetts.

Parrish AR, Wang L. 2010. Genetic Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins. Comprehensive Natural Products Chemistry II Chemistry and Biology **5**:587-617.

Pirino G, Wescott MP, Donovan PJ. 2009. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. Cell Cycle **8**:665-670.

Racedo SE, Rawe VY, Niemann H. 2012. Dynamic changes of the Golgi apparatus during bovine in vitro oocyte maturation. Reproduction **143:**439–447.

Rattani A, Wolna M, Ploquin M, Helmhart W, Morrone S, Mayer B, Godwin J, Xu W, Stemmann O, Pendas A, Nasmyth K. 2013. Sgol2 provides a regulatory platform that coordinates essential cell cycle processes during meiosis I in oocytes. eLife 2 (e01133) DOI: 10.7554/eLife.01133.

Ravaux B, Favier S, Perez E, Gourier C. 2018. Egg CD9 protein tides correlated with sperm oscillations tune the gamete fusion ability in mammal. Journal of molecular cell biology **10**:494–502.

Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. Nature reviews. Molecular cell biology **13**:566-578.

Rubinstein E, Le Naour F, Lagaudrière-Gesbert C, Billard M, Conjeaud H, Boucheix C. 1996. CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. European journal of immunology **26**:2657–2665.

Rubinstein E, Ziyyat A, Prenant M, Wrobel E, Wolf JP, Levy S, Le Naour F, Boucheix C. 2006. Reduced fertility of female mice lacking CD81. Developmental biology **290**:351–358.

Runge KE, Evans JE, He ZY, Gupta S, McDonald KL, Stahlberg H, Primakoff P, Myles DG. 2007. Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. Developmental biology **304**:317–325.

Russell DL, Robker RL. 2018. Cumulus Cells. Pages 43-46 in Skinner MK, editor. Encyclopedia of Reproduction (Second Edition). Academic Press, Massachusetts.

Sala-Valdés M, Ursa A, Charrin S, Rubinstein E, Hemler ME, Sánchez-Madrid F, Yáñez-Mó M. 2006. EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. The Journal of biological chemistry **281**:19665–19675.

Saldanha SN, Tollefsbol TO. 2018. Chapter 7 - Epigenetic Approaches to Cancer Therapy. Pages 219-247 in Tollefsbol TO, editor. Epigenetics in Human Disease (Second Edition). Academic Press, Massachusetts.

Saleh A, Kashir J, Thanassoulas A, Safieh-Garabedian B, Lai FA, Nomikos M. 2020. Essential Role of Sperm-Specific PLC-Zeta in Egg Activation and Male Factor Infertility: An Update.Frontiers in Cell and Developmental Biology **8**:28.

Sathananthan AH, Ng SC, Chia CM, Law HY, Edirisinghe WR, Ratnam SS. 1985. The origin and distribution of cortical granules in human oocytes with reference to Golgi, nucleolar, and microfilament activity. Annals of the New York Academy of Sciences **442**:251–264.

Seneda MM, Zangirolamo AF, González SM, Morotti F. 2023. Oogenesis and Folliculogenesis. Pages 59-88 in Yata VK, Mohanty AK, Lichtfouse E, editors. Sustainable Agriculture Reviews 59. Springer, Cham.

Sengoku K, Takuma N, Miyamoto T, Horikawa M, Ishikawa M. 2004. Integrins are not involved in the process of human sperm-oolemmal fusion. Human reproduction **19**:639–644.

Serru V, Le Naour F, Billard M, Azorsa DO, Lanza F, Boucheix C, & Rubinstein E. 1999. Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions. The Biochemical journal **340**:103–111.

Shoji S, Yoshida N, Amanai M, Ohgishi M, Fukui T, Fujimoto S, Nakano Y, Kajikawa E, Perry AC. 2006. Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. The EMBO journal **25**:834–845.

Shoubridge EA, Wai T. 2007. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. Current topics in developmental biology **77**:87–111.

Shuhaibar LC, Egbert JR, Norris RP, Lampe PD, Nikolaev VO, Thunemann M, Wen L, Feil R, Jaffe LA. 2015. Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **112**:5527-5532.

Schmidt M, Rohe A, Platzer C, Najjar A, Erdmann F, Sippl W. 2017. Regulation of G2/M Transition by Inhibition of WEE1 and PKMYT1 Kinases. Molecules (Basel, Switzerland) **22**:1-17.

Schuel H. 1978. Secretory functions of egg cortical granules in fertilization and development. Gamete Research 1:299–382.

Schwander M, Leu M, Stumm M, Dorchies OM, Ruegg U, Schittny J, Müller U. 2003. Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. Developmental cell **4**:673–685.

Siu K, Serrão VHB,Ziyyat A, Lee JE. 2021. The cell biology of fertilization: Gamete attachment and fusion. Journal of Cell Biology 220 (e202102146) DOI:10.1083/jcb.202102146.

Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. 2001. EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. The Journal of biological chemistry **276**:40545–40554.

Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. 2003. EWI-2 regulates alpha3beta1 integrindependent cell functions on laminin-5. The Journal of cell biology **163**:1167–1177. Su YQ, Eppig JJ. 2002. Evidence that multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaM KII) participates in the meiotic maturation of mouse oocytes. Molecular reproduction and development **61**:560-569.

Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cabot, R, Cheong HT, Day BN, Prather RS, Schatten H. 2001. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. Reproduction **122**:155–163.

Sun QY. 2003. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. Microscopy research and technique **61**:342–348.

Sutton ML, Cetica PD, Beconi MT, Kind KL, Gilchrist RB, Thompson JG. 2003. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. Reproduction (Cambridge, England) **126**:27–34.

Suzuki B, Sugano Y, Ito J, Saito H, Niimura S, Yamashiro H. 2017. Location and expression of Juno in mice oocytes during maturation. JBRA assisted reproduction **21**:321–326.

Swulius MT, Waxham MN. 2008. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases. Cellular and molecular life sciences **65**:2637–2657.

Takahashi Y, Bigler D, Ito Y, White JM. 2001. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. Molecular biology of the cell **12**:809–820.

Takahashi Y, Hashimoto S, Yamochi T, Goto H, Yamanaka M, Amo A, Matsumoto H, Inoue M, Ito K, Nakaoka Y, Suzuki N, Morimoto Y. 2016. Dynamic changes in mitochondrial distribution in human oocytes during meiotic maturation. Journal of assisted reproduction and genetics **33**:929–938.

Talbot P, Dandekar P. 2003. Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? Microscopy research and technique **61**:349–357.

Tang W, Wu JQ, Guo Y, Hansen DV, Perry JA, Freel CD, Nutt L, Jackson PK, Kornbluth S. 2008. Cdc2 and Mos regulate Emi2 stability to promote the meiosis I-meiosis II transition. Molecular biology of the cell **19**:3536–3543.

Tanigawa M, Miyamoto K, Kobayashi S, Sato M, Akutsu H, Okabe M, Mekada E, Sakakibara K, Miyado M, Umezawa A, Miyado K. 2008. Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. Molecular reproduction and development **75**:150–155.

Tarrant JM, Robb L, van Spriel AB, Wright MD. 2003. Tetraspanins: molecular organisers of the leukocyte surface. Trends in immunology **24**:610–617.

Termini CM, Gillette JM. 2017. Tetraspanins Function as Regulators of Cellular Signaling. Frontiers in cell and developmental biology **5**: 34.

Terret ME, Wassmann K, Waizenegger I, Maro B, Peters JM, Verlhac MH. 2003. The meiosis I-to-meiosis II transition in mouse oocytes requires separase activity. Current biology **13**:1797-1802.

Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB. 2004. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosophate levels. Biology of reproduction **70**:548–556.

Thomas C, Wetherall B, Levasseur MD, Harris RJ, Kerridge ST, Higgins JMG, Davies OR, Madgwick S. 2021. A prometaphase mechanism of securin destruction is essential for meiotic progression in mouse oocytes. Nature communications **12**:1-13.

Thyberg J, Moskalewski S. 1999. Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. Experimental cell research **246**:263–279.

Tripurani SK, Pangas SA. 2013. Regulation of Oogenesis by Oocyte-Specific Gene Networks. Pages 129-139 in Coticchio G, Albertini D, De Santis, L, editors. Oogenesis. Springer, London.

Tunquist BJ, Maller JL. 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. Genes & development **17**:683–710.

Umeda R, Satouh Y, Takemoto M, Nakada-Nakura Y, Liu K, Yokoyama T, Shirouzu M, Iwata S, Nomura N, Sato K, Ikawa M, Nishizawa T, Nureki O. 2020. Structural insights into tetraspanin CD9 function. Nature communications **11**:1606.

Vaccari S, Weeks JL 2nd, Hsieh M, Menniti FS, Conti M. 2009. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. Biology of reproduction **81**:595-604.

Van Blerkom J, Runner MN. 1984. Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. The American journal of anatomy **171**: 335–355.

Vondráková J et al. 2022. MAIA, Fc receptor-like 3, supersedes JUNO as IZUMO1 receptor during human fertilization. Science advances 8 (eabn0047) DOI: 10.1126/sciadv.abn0047.

Wang WH, Sun QY, Hosoe M, Shioya Y, Day BN. 1997. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. Biology of reproduction **56**:1376–1382.

Wang J, Cao WL, Liu XJ. 2006. Protein kinase A(PKA)-restrictive and PKA-permissive phases of oocyte maturation. Cell cycle **5:**213-217.

Wang XH, Yin S, Ou XH, Luo SM. 2020. Increase of mitochondria surrounding spindle causes mouse oocytes arrested at metaphase I stage. Biochemical and biophysical research communications **527**:1043–1049.

Wassmann K, Niault T, Maro B. 2003. Metaphase I arrest upon activation of the Mad2dependent spindle checkpoint in mouse oocytes. Current biology **13**:1596–1608.

Wassmann K. 2022. Separase Control and Cohesin Cleavage in Oocytes: Should I Stay or Should I Go?. Cells **11**:3399.

Wassarman PM, Litscher ES. 2022. Mouse zona pellucida proteins as receptors for binding of sperm to eggs. Trends in developmental biology **15**:1–13.

Watanabe Y. 2006. A one-sided view of kinetochore attachment in meiosis. Cell **126**:1030–1032.

Wolf JP, Monier-Gavelle F, Rubinstein E,Barraud V,Bomsel M,Boucheix C. 2003.Fusion of human gametes requires a CD9 dependent clustering of a6b1 integrin-CD151 complexes on the oocyte membrane. Fertility and Sterility **80**:80.

Wright MD, Geary SM, Fitter S, Moseley GW, Lau LM, Sheng KC, Apostolopoulos V, Stanley EG, Jackson DE, Ashman LK. 2004. Characterization of mice lacking the tetraspanin superfamily member CD151. Molecular and cellular biology **24**:5978–5988.

Wu B, Ignotz G, Currie WB, Yang X. 1997. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. Biology of reproduction **56**:253-259.

Wu JQ, Kornbluth S. 2008. Across the meiotic divide – CSF activity in the post-Emi2/XErp1 era. Journal of cell science **121**:3509–3514.

Yamada M, Tamura Y, Sanzen N, Sato-Nishiuchi R, Hasegawa H, Ashman LK, Rubinstein E, Yáñez-Mó, M, Sánchez-Madrid F, Sekiguchi K. 2008. Probing the interaction of tetraspanin CD151 with integrin alpha 3 beta 1 using a panel of monoclonal antibodies with distinct reactivities toward the CD151-integrin alpha 3 beta 1 complex. The Biochemical journal **415**:417–427.

Yamochi T, Hashimoto S, Amo A, Goto H, Yamanaka M, Inoue M, Nakaoka Y, Morimoto Y. 2016. Mitochondrial dynamics and their intracellular traffic in porcine oocytes. Zygote **24**:517–528.

Yang X, Kovalenko OV, Tang W, Claas C, Stipp CS, Hemler ME. 2004. Palmitoylation supports assembly and function of integrin-tetraspanin complexes. The Journal of cell biology **167**:1231–1240.

Yang KT, Li SK, Chang CC, Tang CJ, Lin YN, Lee SC, Tang TK. 2010. Aurora-C kinase deficiency causes cytokinesis failure in meiosis I and production of large polyploid oocytes in mice. Molecular biology of the cell **21**:2371–2383.

Yang CR, Wei Y, Qi ST, Chen L, Zhang QH, Ma JY, Luo YB, Wang YP, Hou Y, Schatten H, Liu ZH, Sun QY. 2012. The G protein coupled receptor 3 is involved in cAMP and cGMP signaling and maintenance of meiotic arrest in porcine oocytes. PloS one 7 (e38807) DOI: 10.1371/journal.pone.0038807.

Ye J, Flint AP, Luck MR, Campbell K H. 2003. Independent activation of MAP kinase and MPF during the initiation of meiotic maturation in pig oocytes. Reproduction **125**:645–656.

Yin S, Wang Q, Li JH, Ai JS, Liang CG, Hou Y, Chen DY, Schatten H, & Sun Q Y. 2006. Bub1 prevents chromosome misalignment and precocious anaphase during mouse oocyte meiosis. Cell cycle **5**:2130–2137.

Yu J, Fleming SL, Williams B, Williams EV, Li Z, Somma P, Rieder CL, Goldberg ML. 2004. Greatwall kinase: a nuclear protein required for proper chromosome condensation and mitotic progression in Drosophila. The Journal of cell biology **164**:487–492.

Yu Y, Dumollard R, Rossbach A, Lai FA, Swann K. 2010. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. Journal of cellular physiology **224**:672–680.

Yu J, Lee CY, Changou CA, Cedano-Prieto DM, Takada YK, Takada Y. 2017. The CD9, CD81, and CD151 EC2 domains bind to the classical RGD-binding site of integrin $\alpha\nu\beta$ 3. The Biochemical journal **474**:589–596.

Yunta M, Lazo PA. 2003. Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. Cellular signalling **15**:559–564.

Zhang CH, Wang ZB, Quan S, Huang X, Tong JS, Ma JY, Guo L, Wei YC, Ouyang YC, Hou Y, Xing FQ, Sun QY. 2011. GM130, a cis-Golgi protein, regulates meiotic spindle assembly and asymmetric division in mouse oocyte. Cell cycle **10**:1861–1870.

Zhou GB, Liu GS, Meng QG, Liu Y, Hou YP, Wang XX, Li N, Zhu SE. 2009. Tetraspanin CD9 in bovine oocytes and its role in fertilization. The Journal of reproduction and development **55**:305–308.

Zhou GB, Zeng Y, Meng QG, Liu Y, Dai YP, Zhu SE, Bunch TD, Hou YP. 2013. Decreased expression of CD9 in bovine oocytes after cryopreservation and the relationship to fertilization capacity. Molecular reproduction and development **80**:451–459.

Zhu GZ, Miller BJ, Boucheix C, Rubinstein E, Liu CC, Hynes RO, Myles DG, Primakoff P. 2002. Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. Development (Cambridge, England) **129:**1995–2002.

Zimmerman B, Kelly B, McMillan BJ, Seegar TCM, Dror RO, Kruse AC, Blacklow SC. 2016. Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. Cell **167**:1041–1051.

Ziyyat A, Rubinstein E, Monier-Gavelle F, Barraud V, Kulski O, Prenant M, Boucheix C, Bomsel M, Wolf JP. 2006. CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. Journal of cell science **119:**416–424.