

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Detekce galaktosylových struktur *zony pellucidy* oocytů  
prasete**

**Diplomová práce**

**Bc. Veronika Dřevová**

**Reprodukční biotechnologie**

**Mgr. Ing. Tereza Krejčová, Ph.D.**

© 2024 ČZU v Praze

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Detekce galaktosylových struktur *zony pellucidy* oocytů 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 neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Ing. Tereze Krejčové, Ph.D. za odborné vedení, pravidelné konzultace a velice vstřícný přístup. Dále bych také chtěla poděkovat svému partnerovi a rodině za trpělivost a podporu po celou dobu studia.

# Detekce galaktosylových struktur zony *pellucidy* oocytů prasete

## Souhrn

Oogeneze je složitý komplexní děj, při kterém dochází k vývoji oplození schopného oocytu. Oocyt prochází během oogeneze řadou strukturních a funkčních změn. Dochází například k syntéze extracelulárního glykoproteinového obalu zony *pellucidy*. Zona *pellucida* se u prasat skládá ze 3 glykoproteinů: ZP2, ZP3 a ZP4, které podstupují řadu posttranslačních modifikací jako jsou glykosylace, sializace a sulfatace. Tyto posttranslační modifikace jsou vysoce heterogenní a mezidruhově odlišné. Právě rozdíly v posttranslačních modifikacích rozhodují o druhově specifickém rozpoznání gamet a jsou klíčové pro vazbu spermie na oocyt.

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, že během meiotického zrání prasečích oocytů dochází k redistribuci galaktosylových struktur na *zoně pellucidě* prasečích oocytů. K detekci galaktosylových struktur byly použity lektiny specificky se vážající na galaktosylové struktury (RCA I a PNA). RCA I se specificky váže na sacharidové sekvence ve vazbě  $\beta$ -D-Gal-(1-4)-D-GlcNAc, zatímco PNA se specificky váže na sacharidovou sekvenci ve vazbě  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc.

Realizovanými experimenty byla potvrzena vazba lektinů RCA I i PNA na *zonu pellucidu* prasečích oocytů v různých stádiích meiotického zrání, konkrétně ve stádiu zárodečného vaku (GV), ve stádiu metafáze prvního meiotického dělení (MI) a ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení (MII). Dle statistických vyhodnocení nebyly u lektinu RCA I pozorovány statisticky významné rozdíly v relativní intenzitě signálu daného lektinu mezi jednotlivými sledovanými skupinami oocytů. Nicméně zde byl patrný trend, kdy pravidelně docházelo k poklesu relativní intezity signálu lektinu RCA I při přechodu ze stádia MI do stádia MII. U lektinu PNA byl naopak pozorován statisticky významný rozdíl mezi všemi skupinami. Nejvyšší relativní intenzita signálu lektinu PNA byla patrna u skupiny oocytů ve stádiu GV. Statisticky významně nižší relativní intenzita signálu lektinu PNA byla pozorována ve skupině oocytů ve stádiu MI a k dalšímu statisticky významnému poklesu došlo i mezi skupinami oocytů ve stádiu MI a MII. Je pravděpodobné, že během meiotického zrání dochází k odštěpování galaktosylových struktur ze *zóny pellucida* prasečího oocytu a tím může docházet k odhalování epitopů důležitých pro vazbu spermie na oocyt. Pro potvrzení této hypotézy by bylo potřeba realizovat podrobnější experimenty s větší škálou sledovaných lektinů.

**Klíčová slova:** galaktosylace, lektiny, oocyt, prase, *zona pellucida*



# Detection of galactosyl structures of the zona pellucida of porcine oocytes

## Summary

Oogenesis is a complex, intricate process that results in the development of a fertilizable oocyte. The oocyte undergoes a series of structural and functional changes during oogenesis. For example, the synthesis of the extracellular glycoprotein envelope of the zona pellucida occurs. The zona pellucida in pigs consists of 3 glycoproteins, ZP2, ZP3 and ZP4, which undergo a series of post-translational modifications such as glycosylation, sialylation and sulphation. These post-translational modifications are highly heterogeneous and interspecies distinct. It is the differences in posttranslational modifications that determine species-specific gamete recognition and are crucial for sperm-oocyte binding.

The aim of this thesis was to test the hypothesis that during meiotic maturation of porcine oocytes, redistribution of galactosyl structures occurs in the zona pellucida of porcine oocytes. Lectins that specifically bind to galactosyl structures (RCA I and PNA) were used to detect galactosyl structures. RCA I specifically binds to the carbohydrate sequence in the  $\beta$ -D-Gal-(1-4)-D-GlcNAc linkage, whereas PNA specifically binds to the carbohydrate sequence in the  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc linkage.

The experiments confirmed the binding of RCA I and PNA lectins to the zona pellucida of porcine oocytes at different stages of meiotic maturation, namely at the germinal vesicle (GV) stage, at the metaphase stage of the first meiotic division (MI) and at the stage of the second meiotic division (MII). According to the statistical evaluations, no statistically significant differences in the relative signal intensity of the lectin were observed for the RCA I lectin between the different groups of oocytes studied. However, there was a clear trend where there was a regular decrease in the relative signal intensity of RCA I lectin during the transition from MI to MII stage. In contrast, a statistically significant difference was observed for the PNA lectin between all groups. The highest relative signal intensity of the PNA lectin was seen in the group of oocytes at the GV stage. A statistically significantly lower relative intensity of the PNA lectin signal was observed in the MI stage oocyte group, and a further statistically significant decrease occurred between the MI and MII stage oocyte groups. It is likely that during meiotic maturation, galactosyl structures are cleaved from the zona pellucida of the porcine oocyte, and this may lead to the discovery of epitopes important for sperm binding to the oocyte. To confirm this hypothesis, more detailed experiments with a larger range of lectins would be needed.

**Keywords:** galactosylation, lectins, oocytes, pig, *zona pellucida*



# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Oogeneze</b> .....	<b>3</b>
3.1.1	Fáze množení zárodečných buněk .....	3
3.1.2	Meióza .....	4
3.1.3	Fáze růstu a folikulogeneze .....	6
3.1.4	Fáze zrání .....	8
<b>3.2</b>	<b>Zona pellucida (ZP)</b> .....	<b>9</b>
3.2.1	Struktura ZP .....	10
3.2.2	Rozdělení glykoproteinů ZP .....	11
3.2.3	Biosyntéza glykoproteinů ZP .....	12
3.2.4	Prasečí <i>zona pellucida</i> .....	13
3.2.5	Glykosylace .....	14
3.2.6	Vazba spermie na <i>zonu pellucidu</i> a oplození .....	16
<b>3.3</b>	<b>Lektiny</b> .....	<b>17</b>
3.3.1	Vlastnosti a využití lektinů .....	17
3.3.2	Druhy lektinů .....	18
3.3.3	Vybrané lektiny .....	21
<b>4</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1</b>	<b>Získ vaječníků</b> .....	<b>22</b>
<b>4.2</b>	<b>Odběr oocytů</b> .....	<b>22</b>
<b>4.3</b>	<b>Kultivace oocytů in vitro</b> .....	<b>22</b>
<b>4.4</b>	<b>Barvení oocytů</b> .....	<b>22</b>
<b>4.5</b>	<b>Vyhodnocení</b> .....	<b>23</b>
<b>4.6</b>	<b>Experimentální schéma</b> .....	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>24</b>
<b>5.1</b>	<b>Imunofluorescenční detekce galaktosylových struktur zony pellucidy pomocí lektinu PNA</b> .....	<b>24</b>
<b>5.2</b>	<b>Imunofluorescenční detekce galaktosylových struktur zony pellucidy pomocí lektinu RCA I</b> .....	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>30</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>33</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>34</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů</b> .....	<b>48</b>



# 1 Úvod

Oocytem nazýváme samičí pohlavní buňku vznikající procesem oogeneze. Během vývoje prochází oocyt řadou změn. Jednou z nejdůležitějších změn je syntéza glykoproteinového obalu kolem oocyty, který nazýváme *zona pellucida*. Tento obal je pro oocyty klíčový, jelikož hraje důležitou roli v jejich ochraně a v mnoha biologických procesech, které souvisejí i s oplozením. Uplatňuje se hlavně při rozpoznání a ve vazbě spermie na oocyt. Tato vazba je druhově specifická a struktura *zóny pellucidy* v ní hraje zásadní roli. Po oplození se *zona pellucida* účastní bloku polyspermie a posléze chrání rané embryo při průchodu vejcovodem do dělohy (Morós-Nicolás et al. 2021).

*Zona pellucida* se u prasat skládá ze tří glykoproteinů (ZP2, ZP3, ZP4). Ty na sebe váží značné množství O- a N- glykanů během posttranslačních modifikací - glykosylací. Glykoproteiny *zóny pellucidy* se od sebe liší a jsou mohutně posttranslačně modifikovány sulfatami, sializacemi a glykosylacemi (Rath et al. 2005). K těmto úpravám dochází i během meiotického zrání prasečích oocytů a jsou klíčové pro vazbu spermie na dozralé vajíčko. Přesná struktura vazebných epitopů *zóny pellucidy*, která je zodpovědná za specifickou vazbu spermie na vajíčko, není doposud u jednotlivých živočišných druhů detailně popsána (Wassarman et al. 2005).

K detekci jednotlivých typů sacharidů v glykoproteinech *zóny pellucidy* je možné využít látek patřících do skupiny lektinů. Jedná se o specializované bílkoviny, které můžeme nalézt téměř u všech druhů živočišných, rostlinných i mikrobiálních organismů. Díky své vysoké specifitě jsou lektiny schopné se nekovalentně vázat na konkrétní sacharidy ve struktuře různých glykanů, tedy i glykoproteinů *zóny pellucidy*, a tvořit s nimi glykokonjugované komplexy (Sinowatz et al. 2001b). Například lektin RCA I (Ricinus communis agglutinin), který je získávaný ze skočce obecného, má vysokou afinitu k D-galaktosylovým strukturám. Dále také PNA (Peanut agglutinin) získávaný z arašídů, patří stejně jako RCA I do skupiny lektinů vázající galaktosylové struktury (Hageman&Johnson 1986; Wu et al. 2006).

Cílem této diplomové práce je ověřit hypotézu, že během meiotického zrání prasečích oocytů dochází k redistribuci galaktosylových struktur *zóny pellucidy*. K ověření této hypotézy budou využity právě lektiny RCA i a PNA.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem diplomové práce je ověřit hypotézu, že během meiotického zrání prasečích oocytů dochází k redistribuci galaktosylových struktur na *zoně pellucidě* prasečích oocytů.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Oogeneze

Oogeneze je složitý komplexní děj probíhající u samic živočichů. Dochází při něm k řadě procesů vedoucím až k vývoji zralé zárodečné buňky neboli vajíčka (Darlene Limback & Albertini 2013; Coticchio et al. 2013). Můžeme jej rozdělit na 3 hlavní fáze: fázi množení, růstu a zrání. Základními prekuzory pro tento proces jsou primordiální zárodečné buňky (PGC – primordial germ cells), které se během oogeneze dělí nejprve mitózou a diferencují se v oogonie (Wassarman 1988; Pepling et al. 1999; Shibuya & Watanabe 2014). Oogonie vznikající z primordiálních zárodečných buněk se dále mitoticky množí, poté vstupují do meiózy a vznikají tak primární oocyty s diploidním počtem chromozomů (2n). Následuje složitý a přísně regulovaný proces meiózy, kde jsou na rozdíl od mitózy produktem buňky haploidní (n), a to zralý oocyt a pólová tělíska. U samic je meióza zahájena již ve fetálním období, ale brzy se její průběh zastavuje, a to již v diplotenním stádiu profáze prvního meiotického dělení. Dále se průběh meiózy může obnovit až v pubertě, v odpověď na nárůst a oscilaci hladin hypofyzárních hormonů, především luteinizačního hormonu (LH) produkovaného adenohipofýzou, který také indukuje ovulaci. Meióza se poté znovu zastavuje v druhém meiotickém bloku, který nastává v metafázi druhého meiotického dělení a meióza se dokončuje pouze po oplodnění samčí pohlavní gametou – spermii (Toth et al. 1994; Pepling et al. 1999; Hunt & Hassold 2008; Shibuya & Watanabe 2014; Clark & Akera 2021).

Proces vzniku gamet u samců – spermatogeneze se značně liší. U samců je meióza zahájena v pubertě a probíhá téměř po celý zbylý život samce (Phillips 2010).

#### 3.1.1 Fáze množení zárodečných buněk

Oocyty mají původ v primordiálních zárodečných buňkách (PGC), které se mitoticky dělí a svou diferenciací dávají vznik oogoniím nebo degenerují v extragonadálních oblastech (Guraya 2007; Stallock et al. 2003). Na začátku oogeneze dochází v proximálním epiblastu embrya k selekci buněk, které následně tvoří možné prekuzory zárodečných buněk, k jejichž diferenciaci dochází v entodermu žlutkového váčku embrya. Zde dochází k další molekulární selekci, jejímž výsledkem je skupina buněk označovaných jako primordiální zárodečné buňky (PGCs). PGCs v době časně gastrulace migrují ze svého extraembryonálního místa determinace do základů genitálních lišt. Pohybují se nejprve pasivně z primitivního proužku do vznikajícího endodermu, který dává vznik zadnímu prvostřevu. To následně invaginuje a buňky se améboidním pohybem přemísťují na budoucí místo primitivních gonád neboli genitálních lišt (Wassarman & Albertini 1994; Anderson et al. 2000; Picton et al. 1998). Při migraci k místu budoucích primitivních gonád, vykazují PGCs aktivní pohyb díky reakci na chemotaktické podněty. Tento děj vyvolávají chemokiny, které jsou vylučovány ze základů gonád (Hurk & Zhao 2005). Během této migrace si musejí PGCs zachovat schopnost diferenciaci buď na oocyty, nebo spermie v závislosti na tom, jestli se indiferentní základy gonád vyvinou ve

vaječníky nebo varlata (Bowles & Koopman 2007). Vstupem do genitální lišty jsou zatím pohlavně nerozlišené PGCs označovány jako gonocyty (Kerr et al. 2006). U prasat můžeme pozorovat zahájení jejich migrace 18. den vývoje embrya. Ukončení migrace do genitálních lišt je okolo 26. dne embryonálního vývoje (Takagi et al. 1998). Pro srovnání je například migrace PGCs u myši zahájena již 9. den a ukončena 11. den embryonálního vývoje (Ewen & Koopman 2010).

Během migrace a fetálního vývoje se počet PGCs dramaticky zvyšuje díky značné mitotické aktivitě, kterou lze pozorovat i několik dní po narození. Např. mezi 20. až 50. dnem březosti prasnice můžeme pozorovat jejich nárůst z 5000 až na 1 100 000. Poté počet mitotických dělení klesá (Black & Erickson 1968; Wassarman & Litscher 2013).

Ve fázi, kdy se zárodečné buňky dostávají do míst vývoje vaječnicků se zanořují do korové vrstvy a ztrácí možnost pohybu. Následnou diferenciací dávají vznik oogoniím, které jsou spojeny mezibuněčnými cytoplazmatickými můstky. K tomu dochází během 40. dne fetálního vývoje jedince (Gosden & Bownes 1995; Wassarman 1988; Picton et al. 1998). Oogonii můžeme definovat jako buňku kulovitého tvaru s jádrem obsahujícím jedno až tři jádérka. Obsahuje cytoplazmu, ribozomy, mitochondrie a může obsahovat i cisterny a tubuly drsného endoplazmatického retikula. Díky intenzivnímu mitotickému dělení se vytvářejí shluky oogonií spojených pomocí *gap junctions* (mezerových spojů), které jsou důležité pro vzájemnou interakci, zásobení a následný růst (Hunter 2000; Sathananthan et al. 2000).

### 3.1.2 Meióza

Meióza je specializované buněčné dělení typické pouze pro pohlavní buňky. Je důležité pro sexuální reprodukci, protože vede k redukci počtu chromozómů na polovinu ( $1n$ ), a umožňuje tak kombinaci dvou haploidních gamet za vzniku jedné diploidní zygoty ( $2n$ ). Vzniká tedy jedinec se stejným počtem chromozómů jako jeho rodič (Vaamonde et al. 2016). Ačkoliv se meióza vyvinula z mitózy, obsahuje 4 nové kroky: párování homologních chromozómů (replikovaných párů), rekombinaci nesesterských chromatid, separaci sesterských chromatid a absenci replikace DNA mezi jednotlivými cykly dělení (Jones 2008; Wilkins & Holliday 2009). Během meiózy probíhají po sobě dvě meiotická dělení s inhibicí separace sesterských chromatid během prvního meiotického dělení a absencí interfáze a replikace DNA před druhým meiotickým dělením (Wilkins & Holliday 2009). Proto jsou jejím výsledkem buňky s haploidní sadou chromozómů (Shibuya & Watanabe 2014; Iatrakis et al. 2023). Obě meiotická dělení probíhají ve čtyřech fázích, a to v profázi, metafázi, anafázi a telofázi.

Samčí a samičí meióza se odlišují. U samců vznikají čtyři plnohodnotné spermaticy z každého primárního spermatocyty. U samic je výsledkem meiózy vznik pouze jednoho vajíčka a dvou až tří pólových tělísek (Clark & Akera 2021; Iatrakis et al. 2023)

Před vstupem do prvního meiotického dělení dochází k replikaci DNA a tím tedy k duplikaci chromatid. Následuje profáze prvního meiotického dělení, která je rozdělena na fáze: leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze.



1. Leptotene – v této fázi probíhá spiralizace a kondenzace chromozómů.
2. Zygotene – následuje párování homologních chromozómů po celé jejich délce a tvorba synaptonemálního komplexu.
3. Pachytene – vznikají tzv. tetrády a nesesterské chromatidy se začínají rekombinovat. Vytvářejí se rekombinační uzlíky, kdy dochází překřížení nesesterských chromatid (chiazmat). Dochází k výměně části genetické informace mezi překříženými částmi nesesterských chromatid v procesu zvaném crossing-over.
4. Diplotene – zde dochází k postupnému rozrušení synaptonemálního komplexu (desynapsi). Bivalenty zůstávají spojeny v chiazmatech. Nastává první meiotický blok.
5. Diakineze – chromatin dále kondenzuje, rozpadá se jaderná membrána a chromozómy se napojují na mikrotubuly dělicího vřeténka.

(Hauf & Watanabe 2004; Vacek 2006; Wilkins & Holliday 2009; Otová 2020)

V metafázi dochází k maximální kondenzaci chromozómů. Tetrády se řadí do ekvatoriální roviny a navazují se pomocí kinetochorů k tubulinovým vláknům tvořícím dělicí vřeténko. V anafázi se celé bivalenty díky uvolnění chiazmat oddělují a rekombinované chromozómy se rozcházejí k opačným pólům buňky. Poslední fází prvního meiotického dělení je telofáze. Jakmile dosáhnou bivalenty opačných pólů buňky, začíná se znovu tvořit jaderná membrána a buňky procházejí velmi krátkou interfází. Zde se vydělí pólóvé tělísko a oocyt dále vstupuje do druhého meiotického dělení (Eichenlaub – Ritter 2012; Holt et al. 2013).

Druhé meiotické dělení je velmi podobné mitóze, jelikož jednotlivé fáze druhého meiotického dělení jsou s průběhem mitózy téměř totožné (Hawley & Walker 2009). Jen v metafázi se meiotické dělení opět zastavuje ve druhém meiotickém bloku a dokončuje se až po oplození (Sun & Nagai 2003). Po oplození se druhé meiotické dělení dokončuje a výsledkem meiózy je jedno oplozené vajíčko a tři pólóvá tělíska (Hawley & Walker 2009; Wilkins & Holliday 2009).

Důležitý je i proces cytokineze, který je zajištěn vznikem kontraktálního prstence tvořeného mikrofilamentárním aparátem buňky. Zatímco karyokinezi rozumíme rozdělení chromatinu jádra, cytokineze znamená rozdělení cytoplazmy a membránových organel do dvou dceřiných buněk. Cytokineze je nejprve patrná jako jemné vroubkování na povrchu buňky, které postupně prominuje do štěrbinové rýhy vedoucí po celém obvodu vajíčka. Tato rýha je vždy kolmá k ose dělicího vřeténka. Postupně vzniká kontraktální prstenec z mikrofilamentárních vláken, který nakonec oplozené vajíčko zaškrtní a oddělí druhé pólóvé tělísko. Díky tomuto procesu, který je složitě regulován, lze zajistit rozdělení přesné poloviny chromozómů (Hill 2007; König et al. 2017).

## Fáze růstu a folikulogeneze

Meiotickou kompetenci, neboli schopnost znovuzahájit a dokončit meiotické dělení, mají pouze zcela dorostlé oocyty (Moor & Waener 1978; Hampl & John 1995).

Oogonie postupem času ztrácí schopnost proliferace, diferencují se v primární oocyty a vstupují do meiózy, což u prasečích oocytů probíhá přibližně od 40. dne embryonálního vývoje. V průběhu posledního mitotického dělení lze pozorovat tvorbu vrstvy pregranulóznic buněk, která obklopuje oocyt (Alberts et al. 2002; de Felici 2010; Hunter 2000). Průběh meiózy se u primárních oocytů záhy zastavuje, a to již v diplotenním stádiu profáze prvního meiotického dělení. Primární oocyty se poté nacházejí ve stádiu zvaném dictyotén a přecházejí do růstové fáze. Ta je charakteristická výrazným růstem a kumulací zásobních látek, potřebných pro vstup do fáze meiotického zrání a k prolomení prvního meiotického bloku. Probíhají zde také změny v uspořádání karyoplazmy, dochází k aktivní transkripci a kumulaci RNA v cytoplazmě, dělí se organely a mění se jejich uspořádání v cytoplazmě oocytu. Během této fáze pozorujeme mnohonásobné zvětšení objemu primárního oocytu. Např. prasečí oocyty rostou od 30 $\mu$ m až do 120–125 $\mu$ m (Zamboni 1970; Fulka et al. 1986). Primární oocyty zůstávají v prvním meiotickém bloku až do dosažení pohlavní dospělosti samice a zahájení estrálního cyklu (Vanderhyden 2002; Hunt & Hassold 2008).

Během růstové fáze můžeme pozorovat dva odlišné procesy – růst oocytů a tvorbu a diferenciaci folikulu v procesu folikulogeneze. Nejdříve probíhá folikulogeneze s růstem oocytů souběžně, ale později se již velikost oocytu nemění, ale diferenciaci folikulu probíhá dále (Hunter 2000). Folikulogeneze probíhá v korové vrstvě vaječníku. Kůra vaječníku obsahuje folikuly v různých stádiích vývoje, které se klasifikují podle velikosti, typu a počtu jednotlivých vrstev granulóznic buněk (Paulini et al. 2014). Jedná se o složitě regulovaný proces vývoje od primordiálních folikulů až po předovulační stádium folikulu – tzv. Graafův folikul (Mehlmann 2005). U prasnic se z celkového počtu primordiálních folikulů, který čítá přibližně 420 tisíc folikulů, vyvine zhruba pouze 84 tisíc folikulů v předovulační stádium (Miyano 2005). Folikuly můžeme rozdělit podle přítomnosti antrální dutiny na antrální a preantrální. Preantrální folikuly můžeme dále rozdělit na tři stádia: primordiální, primární a sekundární folikuly (Paulini et al. 2014). Dříve byl předpoklad, že se samotný oocyt regulace folikulogeneze neúčastní a regulace folikulogeneze podléhá kontrole granulózními buňkami. Je však již potvrzeno, že tomu tak není (Gosden 2002). Oocyt je významně zapojen do regulace růstu folikulů a diferenciaci granulóznic buněk. Oocyt ovlivňuje své okolí uvolňováním rozpustných parakrinních růstových faktorů. Ty dále působí na granulózní buňky, které následně zpětně regulují také samotný vývoj oocytu. V preantrálních folikulech mohou oocyty přímo regulovat růst folikulů, zatímco v antrálních folikulech oocyty ovlivňují pouze blízké granulózní buňky (buňky kumulární), a tím své mikroprostředí (Gilchrist et al. 2004; Andrade et al. 2019). Také granulózní buňky jsou navzájem propojené pomocí mezerových spojů a společně komunikují, čímž zajišťují koordinovaný průběh vývoje oocytu i folikulu (Gosden 2002).

U prasat lze pozorovat zhruba od 47. dne březosti tzv. primordiální folikuly (Bielańska-Osuchowska 2006). V primordiálním folikulu je oocyt obklopen plochou vrstvou pregranulóznic buněk (Vanderhyden 2002; Hunt & Hassold 2008; de Felici 2010). Zajímavostí je, že v určité fázi vývoje můžeme na fetálním vaječníku budoucí prasnice nalézt

jak mitoticky aktivní oogonie, tak i primární oocyty v primordiálních folikulech. Je tomu tak díky asynchronnímu průběhu oogeneze a folikulogeneze, stejně jako např. u myši, primátů nebo skotu (Bielańska-Osuchowska 2006).

Primordiální folikuly vytvářejí ovariální rezervu pro další vývoj folikulů a oogenezi a zůstávají v klidovém stádiu do doby, dokud nejsou rekrutovány pro další vývoj – růst a následnou ovulaci nebo nezanikají atrézií (Braw-Tal & Yossefi 1997; Knox 2005). Prvními znaky další diferenciací folikulu je morfologická změna plochých granulózních buněk, které se mitoticky množí a mění svůj tvar z plochého na kubický. Dále můžeme u folikulu pozorovat jeho dramatický růst. To již folikul označujeme jako primární (Miyano 2005; Adhikari & Liu 2009). Fáze vývoje z primordiálního folikulu v primární může trvat delší dobu a folikuly mohou být v této fázi tvořeny granulózními buňkami plochého dlaždicovitého i kubického tvaru (Fortune 2003).

Jakmile se primární folikul začne vyvíjet nastává průběh dalších morfologických změn (Paulini et al. 2014). Když se totiž vytvoří dvě a více vrstev granulózních buněk, nazýváme folikul jako sekundární nebo také multilaminární (MUF). Buňky obklopující oocyt se následně formují do více vrstev a vytvářejí mnohvrstevný epitel nazývaný *membrana granulosa* (Van Den Hurk & Zhao 2005). V tuto chvíli se oocyt nachází v intenzivní růstové fázi, což je nezbytné pro následné jaderné zrání a budoucí oplození. Sekundární folikuly u prasnic obsahují oocyty o průměru až 90  $\mu\text{m}$  (Van Den Hurk & Zhao 2005).

Současně se zvětšováním objemu probíhá také diferenciací oocyty. Zde dochází k nárůstu syntézy RNA, syntézy proteinů a enormnímu nárůstu počtu ribozomů společně s dalšími organelami. U mnoha z nich dochází ke změně vzhledu a posunu směrem k periferii oocyty. Mitochondrie mění svůj tvar z kulovitých na protáhlejší, což souvisí se zvýšeným metabolismem oocyty. U prasat a buvolů můžeme, ale v této fázi folikulu stále pozorovat spíše kulovitou formu mitochondrií (Lundy et al. 1999; Mondadori et al. 2007). Granulózní buňky proliferují a z intersticiálních buněk stromatu vzniká nová buněčná vrstva – *theca folliculi*, která je oddělená od granulózy bazální membránou (Van Den Hurk & Zhao 2005). V této chvíli mohou folikuly dosahovat průměru až 300  $\mu\text{m}$  (Araújo et al. 2014).

Granulózní buňky se navzájem spojují mezi sebou a zároveň vytvářejí spoje pomocí *gap junctions* na cytoplazmatické membráně oocyty. Tyto spoje jsou tvořeny pomocí konexinu-37 produkovaného oocyty a usnadňují komunikaci v obou směrech a přenos živin, informačních molekul, meiotických signálů a metabolických prekurzorů. Takto může oocyt zajistit růst a vývoj folikulu, zatímco granulózní buňky zajišťují růst a diferenciací oocyty (McGee & Hsueh 2000; Van Den Hurk & Zhao 2005).

Jednou z nejdůležitějších a nejmarkantnějších změn v růstové fázi oocyty je vznik ochranné glykoproteinové vrstvy zvané *zona pellucida* (ZP), která představuje bariéru mezi kumulárními buňkami a oocytem. ZP je tvořena třemi glykoproteiny v závislosti na druhu. Vzniká syntézou, postupným vylučováním a ukládáním glykoproteinů oocytem a granulózními buňkami do matrix ZP (Fair 2003). ZP hraje důležitou roli v různých fázích vývoje oocyty. Její integrita je například velmi důležitá pro komunikaci mezi oocytem a kumulárními buňkami, které těsně obklopují oocyt (Wassarman & Litscher 2012; Wang et al. 2019). Zde dochází k tvorbě mezerových spojů, které jsou důležité pro vzájemnou komunikaci s oocytem a jeho další vývoj (Paulini et al. 2014). Dále *zona pellucida* hraje zásadní roli při oplození při bloku polyspermie a při časném vývoji embrya umožňuje průchod vejcovodem. Zároveň chrání

rýhující se embryo až do implantace a je důležitá pro správné načasování implantace embrya v děloze (Gupta 2015).

Poprvé můžeme také u sekundárních folikulů pozorovat v cytoplazmě oocyty kortikální granula. Tyto malé orgány obsahují enzymy, které hrají důležitou roli při kortikální reakci. K té dochází po oplození oocyty spermií, kdy se jejich obsah exocytózou vylévá do perivitellinního prostoru mezi *zonou pellucidou* a plazmatickou membránou. Jejich obsahem jsou především proteolytické enzymy, které následně změní strukturu ZP. Díky tomu se zabrání vniknutí další spermie do vajíčka a vzniku polyspermie (Wang et al. 1997). Kortikální granula se nejdříve nacházejí ve shlucích po celé ploše oocyty, ale na konci období zrání se přesouvají do blízkosti oolemy (plazmatické membrány) (Ferreira et al. 2009; Paulini et al. 2014).

Zároveň ve fázi sekundárního folikulu vznikají také intracelulární dutiny, které jsou vyplněné folikulární tekutinou – *liquor folliculi*. Složky folikulární tekutiny pochází z krevního řečiště a sekretů folikulárních buněk. Folikulární tekutina obsahuje směs iontů, metabolitů, proteinů, hormonů, lipidů, reaktivních forem kyslíku a energetických substrátů. Také jsou zde přítomny regulační molekuly, jako např. gonadotropiny, enzymy nebo steroidy. Je tedy zřejmé, že folikulární tekutina neslouží jen jako prostředí pro oocyt, ale také pro intenzivní metabolickou aktivitu a ovlivňuje buňky folikulu (Hennet & Combelles 2012; Ambekar et al. 2013; Andrade et al. 2019). Intracelulární dutiny se později spojují a vytvářejí jednu antrální dutinu neboli *antrum folliculi*. Zde se vytváří *cumulus oophorus* (vejconosný hrbolík, CO), na kterém je umístěn oocyt. Kumulární buňky obklopují rostoucí oocyt a dodávají mu potřebné živiny. Dle Yanagimachi (2022) zvyšuje přítomnost CO a kumulárních buněk šanci na úspěšné oplodnění v *in vitro* podmínkách. Vytvořením antrální dutiny se z preantrálního folikulu stává folikul antrální neboli terciární, který lze u prasat pozorovat od 70. dne po narození (Hunter 2000; Smitz & Cortvrindt 2002; Vanderhyden 2002). Oocyt již nemá tendenci k růstu a můžeme tedy pozorovat plně dorostlý oocyt ve fázi zárodečného váčku (*germinal vesicle* – GV), který dosáhl meiotické kompetence a je schopný znovuzahájit meiotické dělení (Wassarman & Albertini 1994). Dochází ale stále ke zvětšování objemu folikulární tekutiny, a tím i ke zvětšování folikulu, antrální dutiny a k ztenčování *membrany granulosa*. *Theca folliculi* je díky antru rozdělena na dvě vrstvy: *theca folliculi interna* a *theca folliculi externa*. Dále kumulární buňky formují těsně u oocyty vrstvu buněk cylindrického tvaru. Ta obklopuje oocyt a nazýváme jí *corona radiata* (Vanderhyden 2002).

### 3.1.3 Fáze zrání

Do této fáze vstupují oocyty nejdříve až v pubertě samice, v době její pohlavní dospělosti. Prolomením prvního meiotického bloku, díky vlně luteinizačního hormonu (LH), je znovuzahájeno meiotické dělení oocyty. Na vlnu LH reaguje pouze plně dorostlý oocyt z Graafova folikulu (Alberts 2006). Po znovuzahájení meiotického dělení dochází nejprve k rozpadu zárodečného váčku (GVBD – *germinal vesicle break down*). Tento proces můžeme rozdělit na fáze: GV1, GV2, GV3 a GV4. Během GV1 fáze můžeme pozorovat kondenzovaný chromatin, který se soustřeďuje kolem viditelného jádérka a vytváří tak prstencovitou strukturu.

Fázi GV2 se prstencovitá struktura narušuje a vytváří se kolem jádérka struktura ve tvaru podkovy. K rozptýlení chromatinových shluků do nukleoplazmy dochází ve fázi GV3. Jadérko je, i bez ohraničení, ale stále viditelné. Ve fázi GV4 je již chromatin rozptýlen do celého jádra a jadérko mizí. Můžeme zde pozorovat fragmentaci jaderné membrány (Motlík & Fulka 1976; Sun et al. 2016). Proces GVBD trvá u oocytů prasat v *in vitro* podmínkách cca 22 hodin, ale např. u myši je to pouze 6 hodin. Po rozpadu zárodečného vřetva pokračuje metafáze I, anafáze I a telofáze I. Poté dochází k vydělení prvního pólového tělíska. Tím se sníží objem oocytu a vytvoří se periviteliní prostor (Motlík & Fulka 1976; Fulka et al. 1986). Po ukončení heterotypického (redukčního) dělení nazýváme oocyt jako sekundární. Dále pokračuje homeotypickým (ekvačním) dělením, kde se chromozómy opět v metafázi II seřadí do ekvatoriální roviny a nastává druhý meiotický blok trvající do oplození (Wassarman 1988).

Většina antrálních folikulů podléhá atretické degeneraci, ale několik málo z nich dále dorůstá a přechází do předovulačního stádia. Na rozdíl od předchozích stádií folikulů, je vývoj Graafova folikulu plně závislý na hormonální regulaci. Jedná se zejména o cyklické hormonální stimulační faktory, které začínají v období puberty, tedy pohlavní dospělosti. Těmito hormony jsou gonadotropiny, a to luteinizační hormon (LH) a folikulostimulační hormon (FSH). Signálizace k cyklickému uvolňování gonadotropinů přichází z hypotalamu, kde se uvolňuje GnRH (gonadotropin releasing hormon), který následně působí na hypofýzu. V adenohipofýze se pak dle zpětné vazby tvoří gonadotropiny, které působí na vaječníky a jejich folikuly. Díky těmto cyklickým změnám může dominantní Graafův folikul ovulovat a uvolňuje zralý oocyt. V případě prasečího oocytu mluvíme o haploidní buňce o 120  $\mu\text{m}$  s 19 chromozómy, které jsou uspořádané v ekvatoriální rovině (McGaughey et al. 1979; Sathananthan et al. 2006). Následně u folikulu nastává luteinizace a stává se žlutým tělískem, které následně produkuje progesteron pro udržení březosti po oplodnění (Vanderhyden 2002; Adhikari & Liu 2009; Zhang & Xia 2012).

Cytoplazmatické zrání oocytu spočívá zejména ve změně uspořádání cytoskeletu, redistribuci buněčných organel, přesunu mitochondrií, tvorbě a ukládání mRNA, proteinů a transkripčních faktorů (Ferreira et al. 2009). Mitochondrie fungují jako rezervoár energie ve formě ATP (adenosintrifosfát) a jsou tedy pro oocyt nepostradatelné. Během GVBD fáze se mitochondrie nacházejí v blízkosti jádra, ale při redistribuci dochází k rozptýlení do celého prostoru cytoplazmy. Zatímco primární oocyty obsahují kolem 6000 mitochondrií, zralé oocyty jich mohou obsahovat až přes 100 000 (Shoubridge & Wai 2007).

### 3.2 *Zona pellucida* (ZP)

*Zona pellucida* (ZP) je z evolučního hlediska popisována jako jeden z nejstarších typů obalů oocytů obratlovců. Vajíčka obratlovců jsou obklopena extracelulární matrix, která má napříč třídami různé názvy: periviteliní membrána (ptáci), chorion (ryby), viteliní obal (žáby) a *zona pellucida* u savců. I přes terminologické rozdíly mají tyto obaly podobné funkce i ultrastruktury a hrají důležitou roli během oplození a raného embryonálního vývoje daného jedince (Rankin & Dean 2000; Moros-Nicolás et al. 2021).

U savců tedy mluvíme o extracelulární glykoproteinové matrix obalující oocyt a preimplantační embryo, která je významnou součástí procesu oogeneze, fertilizace a raného embryonálního vývoje (Song et al. 1999; Lefèvre et al. 2004). Podílí se na folikulogenezi, vývoji a organizaci granulózních buněk, rozpoznání a vazbě spermií na vajíčko, akrozomální reakci, bloku polyspermie a ochraně raného embrya při průchodu vejcovodem samice (Tanihara et al. 2013; Moros-Nicolás et al. 2021). Tento kulovitý obal vytváří viskózní hranici mezi cytoplazmatickou membránou oocyta (oolemou) a vnitřní vrstvou kumulárních buněk (*corona radiata*) a vykazuje vlastnosti jako je např. elasticita nebo poréznost. Nacházejí se zde buněčné komunikační spoje, které sahají až od nejsvrchnější vrstvy folikulárních buněk přes ZP a vytvářejí gap junctions s oolemou oocyta (Denker 2000).

### 3.2.1 Struktura ZP

Většina informací o struktuře a funkcích ZP byla popsána u myši (Sinowatz et al. 2001a). Starší studie uvádějí, že ZP je složena jen ze tří glykoproteinů, a to: ZP1, ZP2 a ZP3, jak tomu u myši skutečně je. Dnes již víme, že tento model není možné použít pro všechny savce, jelikož ZP geny prodělaly během molekulární evoluce pseudogenizace a duplikace, a tím se změnilo složení proteinů společně s jejich strukturou a funkcí (Moros-Nicolás et al. 2021).

Dalším mezidruhovým rozdílem je průměr ZP. U vačic má ZP od 1 do 2  $\mu\text{m}$ , 5 - 7  $\mu\text{m}$  u myši, 13 až 16  $\mu\text{m}$  u člověka nebo prasete a 27  $\mu\text{m}$  u krávy (Dunbar et al. 1980). U většiny druhů je navíc ZP rozdělena do vrstev, přičemž můžeme vidět mezi vnitřní a vnější vrstvou značnou asymetrii. Tuto asymetrii můžeme identifikovat např. pomocí lektinů nebo ZP specifických proteinů. U krav nebo králíků můžeme identifikovat tři vrstvy ZP. Čím dále se od oocyta vrstva nachází, tím větší poréznost vykazuje (Vanroose et al. 2000).

Mezidruhově se liší také velikost pórů. Nejmenší póry nalezneme u skotu a největší póry naopak u myši nebo koček (Vanroose et al. 2000). Liší se také tvary pórů uvnitř i mezi zónami. Póry jsou většinou náhodně rozmístěné s výjimkou koček, kde je tomu naopak. Poréznost je důležitá pro průnik velkých molekul jako např. imunoglobulinů, ale malé molekuly, jako např. heparin, pórem neprojdou. Je tedy zřejmé, že průnik molekul nezávisí na jejich velikosti, ale na jejich biochemických vlastnostech jako např. na jejich povrchovém náboji (Alex Shivers & Dunbar 1977).

Struktura zony *pellucida* se také mění během fáze meiotického zrání oocyta a oplození. Suzuki et al. (1994) provedli výzkum ZP oocytů skotu v *in vitro* podmínkách a prokázali, že ZP nezralých oocytů skotu má četné a hluboké póry, zatímco povrch ZP u zralých oocytů má jemnější strukturu s méně hlubokými póry. Meiotické zrání neovlivňuje pouze morfologii, ale také funkčnost ZP. Bylo zjištěno, že ZP zralých oocytů skotu je v *in vitro* podmínkách schopna indukovat akrozomální reakci spermií dvojnásobnou rychlostí než ZP nezralých oocytů (Petrunina et al. 2005).

### 3.2.2 Rozdělení glykoproteinů ZP

Spargo a Hope (2003) uvádějí, že existují 4 podskupiny genů ZP: ZPA, ZPB, ZPC a ZPX. Uvádějí také, že některé z těchto genů se u vyšších živočichů již nevyskytují a zůstávají přítomny pouze u ryb a obojživelníků. Toto potvrdili i Goudet et al (2008). Vytvořili úplnější seznam, kde jsou ZP proteiny zařazeny do šesti podrodin: ZP1, ZP2, ZP3, ZP4, ZPAX a ZPD. Z těchto genů mají placentární savci většinou čtyři proteiny (ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4). U některých z nich, jako např. u skotu, prasete nebo psa chybí protein ZP1 a myši zase naopak postrádají protein ZP4. Geny pro tyto dva proteiny se u nich vyskytují pouze jako pseudogeny. ZPD můžeme nalézt pouze u obojživelníků společně s ZPAX, který je přítomen také u kura (Goudet et al. 2008; Moros-Nicolás et al. 2021) Přehled glykoproteinů a jejich genů ZP u vybraných savců je shrnut v tabulce 1.

**Tab. 1.** Přehled glykoproteinů ZP a jejich genů (Převzato a upraveno z Tumova et al. 2021)

SAVČÍ DRUH	ZP GEN	ZP PROTEIN
myš	ZP1 (ZPB1)	ZP1
	ZP2 (ZPA)	ZP2
	ZP3 (ZPC)	ZP3
	ZP4 (ZPB / ZPB2)	Nevytvořen
člověk	ZP1 (ZPB1)	ZP1
	ZP2 (ZPA)	ZP2
	ZP3 (ZPC)	ZP3
	ZP4 (ZPB / ZPB2)	ZP4
prase	ZP1 (ZPB1)	Nevytvořen
	ZP2 (ZPA)	ZP2/PZPL
	ZP3 (ZPC)	ZP3/ZP3-β
	ZP4 (ZPB/ZPB2)	ZP4/ZP3-α
skot	ZP1 (ZPB1)	Nevytvořen
	ZP2 (ZPA)	ZP2
	ZP3 (ZPC)	ZP3
	ZP4 (ZPB / ZPB2)	ZP4

U savců můžeme tedy říct, že se glykoproteiny dělí do tří hlavních rodin: ZPA, ZPC a ZPB podle podobnosti jejich sekvence aminokyselin. Bylo také prokázáno, že každá z těchto 3 rodin vykazuje 50-98 % homologii nukleových kyselin u různých druhů savců. Ačkoliv se rodiny liší v molekulové hmotnosti, existují zde podobnosti v počtu a poloze cysteinových zbytků na ZP doméně a v počtu N-glykosylačních míst. Např. myši ZPB je pouze z 39 % identický s lidským, ale králíci a prasečí je s lidským identický ze 70 % (Epifano & Dean 1994; McLeskey et al. 1997; Prasad et al. 2000).

### 3.2.3 Biosyntéza glykoproteinů ZP

Biosyntéza glykoproteinů *zony pellucidy* probíhá během oogeneze ve folikulu. Mnoho studií prokázalo, že vývoj ZP je druhově specifický. U savců jsou proteiny ZP syntetizovány výhradně pomocí vaječnicků. U jiných obratlovců mohou do syntézy zasahovat také játra, která se buďto podílejí na syntéze jako jediná, nebo ve spolupráci s vaječníky (Wassarman & Litscher 2013). U savců jsou jedinými druhy, které syntetizují glykoproteiny ZP pouze oocytem, myši, krysy a křečci. U ostatních druhů se na syntéze podílejí i granulózní buňky (Scobie et al. 1999; Izquierdo-Rico et al. 2011; Moros-Nicolás et al. 2021). Existují ale také rozdíly v expresi určitých ZP genů. Např. u králíků je ZP1 exprimován jak oocytem, tak granulózními buňkami. To stejné platí i u skotu pro ZP3 a u prasat pro ZP4. U primátů to platí pro ZP2, ZP3 i ZP4 (Kölle et al. 1996, 1998; Bogner et al. 2004). Pro tyto druhy je charakteristická silná ZP, a proto se předpokládá, že se na její syntéze musí podílet i folikulární buňky, jelikož syntéza proteinů pouze oocytem by nebyla dostatečná (Schultz et al. 1979; Skinner et al. 1984).

Glykoproteiny ZP přechází z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu během růstové fáze oocyty. Zde jsou zabaleny do sekrečních vezikul, které je poté transportují k oolemě, kde splynou s membránou. Tak se glykoproteiny dostávají do extracelulárního prostoru (Wassarman et al. 2005).

Na myším modelu byla sledována sekrece glykoproteinů ZP a jejich sestavení do matrix. V první řadě se glykoproteiny nerovnoměrně sekretují do prostoru mezi oocytem a kumulárními buňkami. V rané fázi vývoje oocyty je můžeme pozorovat jako filamenta uspořádaná do hexagonálních polí se stejnou velikostí pórů. S růstem oocyty se glykoproteiny spojují a vytvářejí tak kolem oocyty jednotnou vrstvu s velkým počtem mikroklyků. Ty poté přicházejí do kontaktu s výběžky kumulárních buněk a vytvářejí důležité kanály přes *zonu pellucidu*, které rostoucímu oocyty poskytují potřebnou výživu (Gupta et al. 2012).

Vznikající glykoproteiny obsahují N-konec, místo konsenzuálního furinového štěpení (CFCS), ZP doménu a TMD (transmembrane-like domain), která se nachází u C-konce. Glykoproteiny obsahují také signální sekvence různé délky, které se odštěpují ve fázi zralého proteinu. ZP doména je složena z různého počtu aminokyselin a osmi cysteinových (Cys) zbytků. Dále také obsahuje velké množství  $\beta$  řetězců. Její hlavní funkcí je umožnění polymerace glykoproteinů a tvorba matrix ZP. CFCS napomáhá ukotvení v extracelulárním prostoru a TMD zase naopak v sekrečních váčcích oolemy (Bork & Beckmann 1993). Dále se setkáváme u proteinů ZP1 a ZP4 s doménou tvaru trojlístku. Ta obsahuje 6 Cys zbytků spojených třemi disulfidickými můstky (Gupta et al. 2012).

Myši ZP glykoproteiny ZP2 a ZP3 tvoří heterodimerní jednotky a jsou periodicky uspořádané do dlouhých vláken. Ta jsou propojena největším proteinem ZP1 (Wassarman & Mortillo 1991). Cílené změny a mutace těchto glykoproteinů poskytly důležité informace k funkčnosti ZP. U myšičho ZP1 se předpokládá, že zodpovídá za stabilitu a integritu matrix. U ZP1 knockoutovaných myšič dochází k syntéze *zony pellucidy*, ta má však poréznější strukturu. Embrya mají možnost normálního vývoje, ale může se stát, že jsou vrhy menší než obvykle. Toto, ale nelze potvrdit u knockoutu genu pro ZP3. Při ztrátě genu ZP2 se *zona pellucida* ztenčuje, ale pokud myšič chybí gen ZP3, není schopna vytvořit kolem oocyty *zonu pellucidu* vůbec. Z toho tedy vyplývá, že vývoj ZP je u myšič možný minimálně se dvěma



glykoproteiny, přičemž přítomnost ZP3 je nezbytná (Dean 2004; Evsikov et al. 2006; Moros-Nicolás et al. 2018, 2021).

Studie, které se prováděly na myších i lidech ukázaly, že výsledky získané u jednoho druhu nelze použít pro druh jiný. Jak můžeme vidět v tabulce č.1 ženy mají ZP složenou ze 4 glykoproteinů a ZP1, na rozdíl od myší, u nich tvoří základní glykoprotein matrix ZP (Rankin & Dean 2000; Moros-Nicolás et al. 2021). Pokud myši chybí ZP1 může *zonu pellucidu* vytvořit a embryo se bez problémů vyvíjí. U žen může být ztráta nebo mutace genu ZP1 spojována s neplodností, syndromem prázdných folikulů nebo oocytů bez ZP (Zhang et al. 2018; Zhou et al. 2019; Cao et al. 2020).

Prasečí ZP glykoproteiny byly studovány pro vývoj antikoncepční vakcíny. Bylo tomu tak hlavně kvůli snadné dostupnosti vaječnicků z jatek. Aktivní imunizace nativními prasečími ZP proteiny samic králíka vedla k jejich nevratné neplodnosti. Bližší studie následně prokázaly že imunizace nativními nebo rekombinantními ZP glykoproteiny omezuje plodnost různých druhů savců, při které dochází i k ovarialním patologiím (Gupta 2022).

### 3.2.4 Prasečí *zona pellucida*

*Zona pellucida* prasete má průměr 13-16  $\mu\text{m}$  s obsahem 30-33 ng specifických glykoproteinů v ZP. Dříve se vědci domnívali, že se prasečí ZP skládá ze čtyř glykoproteinů a nikoli ze tří. Tyto rozdílné názory byly způsobeny různým názvoslovím, které se v průběhu minulosti několikrát změnilo. V mnoha studiích lze najít rozdílná značení těchto proteinů: ZP1 (ZPB/ZP3 $\alpha$ ), ZP2 (ZP1/ZP2/ZPA) a ZP3 (ZP3 $\beta$ /ZPC) (Harris et al. 1994; Prasad et al. 2000). Podle novějších výzkumů ale víme, že prasečí ZP1 je nahrazena ZP4. Novější značení prasečích glykoproteinů je shrnuto v tabulce č. 1. Nejčastěji se však setkáváme se značením: ZP2/ZPA, ZP3/ZPC a ZP4/ZPB. Díky elektroforéze lze glykoproteiny ZP prasete rozdělit dle různé molekulové hmotnosti: 90 kDa (ZP2) a 55 kDa (ZP3 a ZP4). Proteiny ZP3 a ZP4 tvoří až 80% z celkového množství glykoproteinů ZP. Poměr ZP2:ZP3:ZP4 činí 1:6:6. Nasvědčuje to tomu, že podobně jako u myší, tvoří u prasat glykoproteiny ZP3 a ZP4 heterodimer, který je propojen ZP2 (Hedrick & Wardrip 1987; Tumova et al. 2021).

#### **ZP2 (ZPA) protein**

ZP2 protein, patřící do rodiny ZPA, je největším glykoproteinem ZP prasat. Jeho funkcí je zpevnění struktury ZP a prevence polyspermie při oplodnění. Jako nezralý protein se skládá z 716 aminokyselin (AA) a má pouze jednu ZP doménu. Zralý je tvořen 603 aminokyselinami, protože jsou z něj odštěpeny signální peptid (1-35 AA) na N-konci a propeptid (639-716 AA) na C-konci. Během kortikální reakce je ZP2 u N – konce proteolyticky rozštěpen na dva fragmenty spojené disulfidickými můstky (Töpfer-Petersen 1999).

## ZP3 (ZPC) a ZP4 (ZPB) proteiny

U prasnic byl protein ZPC určen jako receptor pro vazbu spermie, jelikož nese biologicky aktivní sacharidové řetězce. Této vazby však není dosaženo bez ZPB, se kterým tvoří heterodimerní komplex, což může vést k maximálnímu odhalení vazebných míst pro spermie a zesílení jeho vazebné aktivity. Tyto glykoproteiny obsahují po posttranslačních úpravách 330 (ZPB) a 326 (ZPC) aminokyselin (Töpfer-Petersen 1999; Gupta et al. 2012).

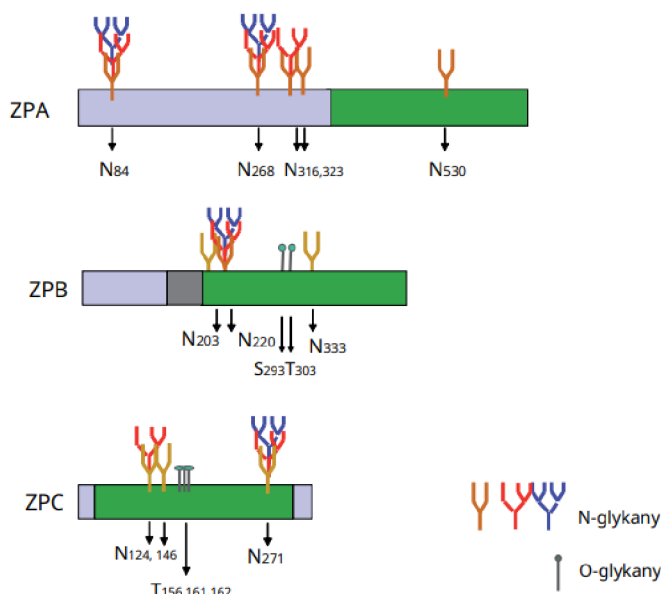
### 3.2.5 Glykosylace

Glykosylace probíhá během meiotického zrání oocyty. Samotné proteiny mají v organismu řadu funkcí. Glykosylace může ale měnit jejich signalizační a regulační reakce, stabilitu, anebo je také chránit před proteolytickými enzymy. Tato důležitá posttranslační modifikace proteinů probíhá v několika krocích. Nejdříve se v cytosolu vytvářejí peptidy s navázanými sacharidy, dále dochází v endoplazmatickém retikulu ke kompletování a v poslední řadě k transportu a konečnému zpracování v Golgiho aparátu (GA) (Fernandes 2008). Z GA jsou pak glykoproteiny sekretovány ven pomocí vezikulů. Podle kovalentní vazby mezi proteinem a glykanem můžeme rozlišovat 3 typy glykosylace. N-glykosylací rozumíme napojení pomocí amidové skupiny asparaginu. Dle Varki et al. (2009) jsou N-glykany jedny z nejdůležitějších glykanových modifikací u eukaryotních organismů. Jsou zapojeny do intracelulárních a extracelulárních procesů, intracelulárního transportu, interakcí mezi buňkami a mnoha dalších dějů v buňce. Dalším typem glykosylace je O-glykosylace, která probíhá napojením přes hydroxylovou skupinu serinu nebo threoninu a vazby mezi uhlíky glykanu a tryptofanu potom nazýváme C-glykosylace (Ohtsubo & Marth 2006).

Glykoproteiny ZP jsou vysoce heterogenní díky postranslačním změnám a modifikacím pomocí sialyzací a sulfatací. Obsahují tedy velké množství sulfatovaných nebo sialovaných N-(aspariginových) a O-(serinových/threoninových) glykanů. Tyto oligosacharidy zodpovídají za vazbu spermie na oocyt, indukci akrozomové reakce a penetraci spermie přes ZP (Rath et al. 2005).

Existuje studie, která dokazuje, že pro počáteční interakci spermie a oocyty jsou důležité vazby sacharid-protein nebo v menší míře protein-protein. To bylo dokázáno i u bezobratlých (Clark 2010). Sacharidy tedy tvoří základ pro druhově specifickou vazbu gamet při oplodnění. U myši byla vazba spermie a *zona pellucida* prozkoumána nejvíce. Charakter této vazby není ale pro všechny druhy savců stejný. Např. u myši se spermie může vázat jen na ZP3, zatímco u prasat nebo u skotu se váže spermie pouze k heterokomplexu společně s ZP4. Akrozom intaktní spermie kanců a býků vykazují nejvyšší afinitu k  $\beta$ -Gal (galaktosovým) a  $\alpha$ -Man (manosovým) zbytkům. Respektive u prasat se afinita po akrozomové reakci (AR) mění z  $\beta$ -Gal na  $\alpha$ -Man. Bylo také zjištěno, že vazba spermií po akrozomální reakci se po trypsinizaci snižuje, a tudíž složky, které vážou sacharidy, jsou proteiny (Yonezawa et al. 2012; Takahashi et al. 2013).

Dle Töpfer-Petersen et al. (2008) na sobě nesou glykoproteiny rozdílný počet potenciálních N-glykosylačních míst. Tato místa jsou zobrazena obrázku 1. Pro ZPB a ZPC jsou tato místa uložena v doméně ZP (ZPB: N202, N220, N333; ZPC: N124, N146, N271). Z obrázku je vidět, že pouze asparaginové zbytky N220 a N271 nesou tri- i tetraantenární N-glykany. U ZPA je pouze 5 ze 6 glykosylačních míst glykosylováno (N84, N268, N316, N323, N530). Většina těchto míst nese tri- a tetraantenární glykany s výjimkou N530 umístěné v ZP doméně. To je obsazeno biantenárními řetězci. Dle Kudo et al. (1998) se vážou tri a tetraantenární řetězce glykanů silněji nežli řetězce biantenárního komplexu. ZPA disponuje také mimo jiné i pentanosylglykany ( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ) (Rath et al. 2005).



**Obr. 1.** Glykosylační místa prasečích glykoproteinů ZP (Převzato a upraveno zTöpfer-Petersen et al. 2008)

V 90. letech byly sacharidové struktury popsány díky vazbě na proteiny zvané lektiny. Přítomnost manózy a N-acetylglukosaminu byla popsána téměř u všech druhů savců. Naopak přítomnost  $\beta$ -galaktózy byla prokázána pouze u myši a skotu. U glykoproteinů ZP myši a skotu tvoří terminální N-acetylgalaktosaminové a  $\alpha$ -galaktosové zbytky minoritní složku. Prasečí N-glykany tyto složky ale postrádají. Základní struktura N-oligosacharidů komplexního typu je u prasat, myši a skotu prakticky stejná. Rozdíly se vyskytují hlavně u neutrálních oligosacharidů, které u myši tvoří 5 %, zatímco u prasnic a krav 25 %. Dále jsou zde také rozdíly v di-, tri- a tetraantenárních řetězcích, sulfataci a sialyzaci (Parillo et al. 1996; Töpfer-Petersen 1999; Tumova et al. 2021).

Jako u spousty jiných druhů, jsou u prasat ZP glykoproteiny nestejnorodé díky rozdílnému množství sialovaných nebo sulfatovaných poly-N-acetylglukosaminů (Yonezawa et al. 1997). N – vázané řetězce se skládají z neutrálních a kyselých řetězců v molárním poměru 1:3. Ty vytvářejí di-, tri- nebo tetraantenární komplexy s  $\alpha$ -fukosylovými zbytky (Nakano & Yonezawa 2001). Hlavními neutrálními N vázanými glykany ZP u prasat jsou fukosylové

glykany s acetylaktosaminovými řetězci. Tyto glykany se podílejí na rozpoznání spermie oocytem (Töpfer-Petersen 1999). Vysoce sulfatované kyselé N-glykany obsahují poly-N-acetylaktosaminové sekvence v různých délkách, které jsou sulfatované v poloze C-6 GlcNAc (N-acetylglukosamin) (Noguchi & Nakano 1992). U prepubertálních prasnic byl popsán nižší stupeň sulfatace nežli u cyklujících prasnic. Dále obsahují N-glykany fukózové zbytky, nikoliv vysokomanosové řetězce jako u jiných druhů (Tumova et al. 2021).

O-glykany obsahují 9 neutrálních a 26 kyselých nerozvětvených řetězců typu core-1 O-N-acetylgalaktosamin. Stejně jako N-glykany jsou sulfatovány v poloze C-6 nebo sialovány. Bylo zjištěno, že se O-glykany u proteinů ZP3 a ZP4 podílejí na vazbě spermie-ZP. U prasat se jako hlavní receptor jeví také neredukující koncové  $\beta$ -Gal zbytky, které se nacházejí na tri a tetraantenárních komplexech glykoproteinů. U skotu se jeví jako hlavními ligandy pro býčí spermie neredukující koncové  $\alpha$ -Man zbytky v glykoproteinech ZP s vysokým obsahem manosy (Takahashi et al. 2013; Tumova et al. 2021).

Zároveň sialové kyseliny na N- a O-glykanech hrají důležitou roli pro vazbu spermie a přenosu signálu (Tumova et al. 2021). Glykoproteinové vrstvy jak samčích (glykokalyx), tak samičích (ZP) gamet jsou zakončeny sialovými kyselinami (Sia). Tak označujeme kyselé devítihlíkaté monosacharidy, které můžeme často nalézt na povrchu buněk na koncích glykokonjugátů. U prasat je dokonce 75 % všech N-glykanů sialyzováno a jsou tedy kyselého charakteru (Velásquez et al. 2007; Fernandez-Fuertes et al. 2018). Sialyzace probíhá na biantenárních nebo na -4,2 rozvětvených triantenárních řetězcích. Sialovány mohou být také krátké řetězce s jednou N-acetylaktosaminovou jednotkou nebo bez ní (Sinowatz et al. 2001a).

### 3.2.6 Vazba spermie na zonu pellucidu a oplození

Vazba spermie na ZP je druhově specifická a díky tomu je tak zabráněno mezidruhovému oplození. Za tento fakt jsou zodpovědné receptory pro vazbu spermie na povrchu ZP oocytu a mezidruhově rozdílná glykosylace proteinů ZP (Wassarman et al. 2005).

Tento proces začíná primární vazbou, čímž rozumíme navázání spermie na glykoproteiny ZP, což vede k akrozomální reakci. Dále probíhá sekundární vazba a následná penetrace přes ZP do perivitelinního prostoru odkud se spermie dostává až k oolemě. Zde potom dochází ke splnutí gamet a dochází k oplození. Proteiny kančích spermií, které se váží na ZP oocytů prasnic jsou např.:  $\beta$ 1,4-galaktosyltransferáza (B4GALT1), proakrosin/akrosin (ACR), zonadhezin (ZAN), spermadheziny (AWN, AQN1, AQN3, PSP-I, PSP-II) a adhezní protein z (APz) (Tumova et al. 2021).

Významným proteinem spermií je také IZUMO (1-4), který je nezbytný pro fúzi membrán oocytu a spermie. Dle Okabe (2018) a Yanagimachi (2022) víme, že spermie jsou schopné fúze až po dokončení akrozomální reakce. K AR dochází po kontaktu spermie s vnějším obalem vajíčka a dochází tak k aktivaci signálních kaskád a proteinů spermie potřebných pro následnou fúzi gamet. U myši byl pozorován přesun IZUMO1 na povrch plazmatické membrány spermie během AR. Na membráně oocytu se poté nachází jeho receptor JUNO, jakožto membránový protein s GPI kotvou, který slouží jako receptor pro IZUMO1.

Dále bylo zjištěno, že systém IZUMO1-JUNO je identifikován jako první pár receptorů na povrchu membrán gamet, který je velmi důležitý pro jejich společnou fúzi.

Po vniknutí spermie do vajíčka nastává polyspermický blok díky působení enzymů z kortikálních granul. Vzhledem k zásadní roli JUNO při oplodnění byla zkoumána jeho role i při zamezení průniku dalších spermií. Byla prokázána ztráta vazebných receptorů JUNO z plazmatické membrány vajíčka při kortikální reakci. Vzhledem k tomu, že se takto ztrácejí vazebná místa pro IZUMO1, můžeme ztrátu receptorů JUNO také označovat za částečný mechanismus bloku polyspermie (Bianchi et al. 2014).

### 3.3 Lektiny

Slovo lektin pochází z latinského slova *legere*, což znamená vybrat, přečíst nebo shromáždit (Kumar et al. 2012; Mishra et al. 2019). Lektiny patří do strukturně velmi různorodé třídy proteinů a v přírodě je můžeme nalézt u většiny druhů organismů, ať už virů, bakterií, rostlin, řas, hub, bezobratlých nebo obratlovců (Loris 2002; Sharon 2008). Jsou schopné specificky a reverzibilně vázat sacharidy pomocí nekovalentních vazeb za vzniku glykokonjugátů (Rini 1995; Cavada et al. 2019; Mishra et al. 2019). Často tyto vazby potřebují zvýšenou přítomnost  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$  (Sharon & Lis 1990). Pro specifickou vazbu sacharidů je pro ně důležitá zejména CRD doména (carbohydrate recognition/binding domain), kterou lektiny obsahují. CRD doména se na sacharidy navazuje pomocí různých vazeb jako jsou např. vodíkové můstky, iontové vazby, Van der Waalsovy síly a hydrofobní reakce (Ghazarian et al. 2011).

#### 3.3.1 Vlastnosti a využití lektinů

Lektiny se díky své vazbě protein-sacharid zapojují do velké řady biologických procesů a jsou důležité pro přenos biologické informace. Příkladem procesů, kterých se účastní je např. obranyschopnost, vývoj buňky, migrace buněk, fagocytóza, endocytóza a pro nás důležitý proces fertilizace (Sharon & Lis 1990). Jejich široký komerčně dostupný výběr a úzká specifčnost nám umožňuje identifikaci a lokalizaci mnoha sacharidových struktur na ZP oocytů různých druhů zvířat (Sinowatz et al. 2001b). Dále se mohou používat k rozpoznání sacharidů na povrchu buněk během různých fyziologických či patologických procesů. Mají také schopnost aglutinovat erythrocyty a díky nim objevil Karl Landsteiner lidské krevní skupiny A, B a 0. Ze všech vlastností, kterými lektiny disponují je patrné, že se dají hojně využívat v mnoha biologických oborech jako biochemie, imunologie nebo buněčná biologie. Používají se také např. pro klinickou diagnostiku zahrnující rozpoznání nádorových buněk (Mishra et al. 2019).

Je nutné říci, že ačkoliv se lektiny podílejí na obranyschopnosti organismu, nezpůsobují v těle žádnou antigenní reakci a nezpůsobují ani primární imunitní odpověď. Proto je

nemůžeme zařadit mezi protilátky. Dále je nelze řadit ani mezi enzymy, jelikož nevykazují katalytickou aktivitu (Sharon & Lis 1990).

Pro mapování sacharidových struktur využíváme cytochemickou analýzu pomocí lektinů (Brooks 2017). Napomáhá nám k tomu fluorescenční barvení v kombinaci s imunohistochemií. Můžeme díky nim ale detekovat jen terminální zbytky glykoproteinů nebo glykolipidů a nemůžeme tedy analyzovat celou strukturu oligosacharidových řetězců (Wiederschain 2009). *Zona pellucida* je až ze 30 % tvořena sacharidy z nichž mají všechny určitý počet postranních řetězců. Lektiny se na tyto řetězce navazují a pomáhají nám k jejich výzkumu (Rabelo et al. 2012).

### **3.3.2 Druhy lektinů**

Lektiny produkuje velké množství organismů a lze je tedy rozdělit do skupin dle jejich původu. Dalším způsobem, jak lektiny řadit, může být dle jejich lokalizace v buňce anebo specifity. Proto se mohou jednotlivé třídy lektinů různě překrývat (Lakhtin et al. 2011; Mishra et al. 2019).

#### **Živočišné lektiny**

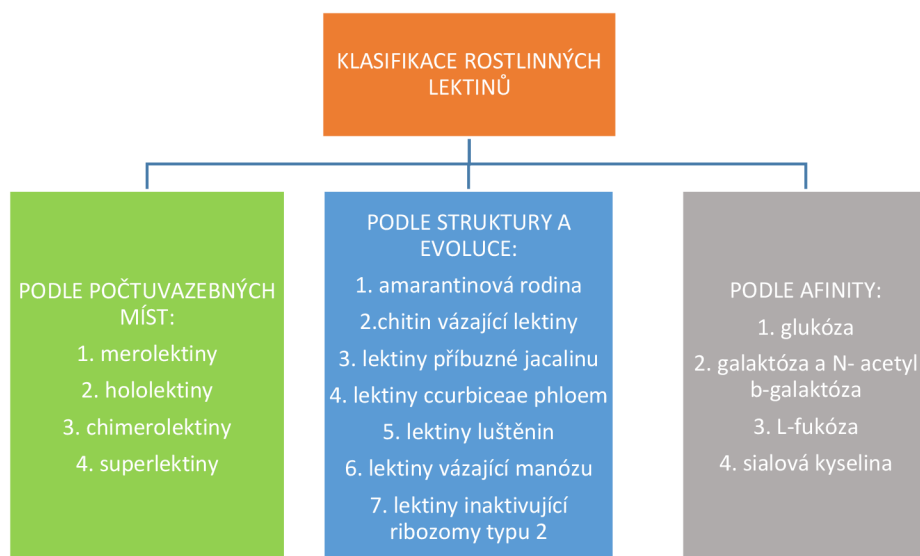
Živočišné lektiny jsou schopné díky CRD, které obsahuje každý z nich, vázat komplexní sacharidové struktury s mnoha aminokyselinovými sekvencemi. Mezi jejich funkce patří např. buněčný kontakt, detekce patogenů, přilnutí buněk k povrchu epitelu a zprostředkování imunitní odpovědi. Můžeme je dělit do několika skupin dle sekvence CRD a nároků na kationty (LIS & SHARON 1986; Kilpatrick 2002). V tabulce č. 2 jsou shrnuty vybrané lektiny společně s jejich funkcí.

**Tab. 2.** Rozdělení živočišných lektinů (Převzato a upraveno z Kilpatrick 2002; Kumar et al. 2012)

NÁZEV	PŘÍKLAD FUNKCE
Typ C	Imunitní odpověď, adheze buněk
Typ I	Adheze buněk, regulace signalizace imunitních buněk
Typ P	Rozdělení proteinů z GA, degradace proteinů v ER
Galektiny	Regulace apoptózy, adheze a migrace buněk, imunitní reakce
pentraxiny	Reaktanty akutní fáze zánětu, přirozená imunitní odpověď
calnexin	Třídění proteinů v ER
typ M	Asociovaná degradace glykoproteinů v ER
Typ L	Třídění proteinů v ER
typ R	Regulace hormonů glykoproteinové povahy, enzymové cílení
F-box	Degradace špatně vytvořených proteinů
fikoliny	Vrozená imunita
podobné chinináze	Ovlivňují metabolismus kolagenu

## Rostlinné lektiny

Pro jejich snadnou izolaci a distribuci byly studovány mezi prvními a dnes známe již 500 různých lektinů rostlin. Můžeme je také dělit do různých podskupin dle afinity, struktury a počtu vazebných míst viz. obr 4 (Mishra et al. 2019). Mezi ty nejvíce prozkoumané můžeme řadit *wheat germ agglutinin* (WGA), který byl vyizolován z pšenice seté a dále *Ricinus communis agglutinin* (RCA) vyizolovaný ze skočce obecného (Etzler 1985). Dají se nalézt jak v kořenech, semenech, zásobních orgánech, tak i v listech rostlin. Zajímavostí je jejich afinita k oligosacharidům, které se v rostlinách téměř nevyskytují a váží tedy spíše jednoduché cukry. Napomáhají k rozpoznání glykokonjugátů na povrchu buněk, buněčné signalizaci a komunikaci. Mají také velký význam při vývoji a ochraně rostlin před mikroorganismy, hmyzem a živočichy. Dále se účastní symbiotického vztahu mezi rostlinami a bakteriemi vázajícími dusík (Kalsi et al. 1992; Sharon & Lis 2004; Mishra et al. 2019).



**Obr. 2.** Klasifikace rostlinných lektinů (Převzato a upraveno z Mishra et al. 2019)

### Mikrobiální lektiny

Bakteriální lektiny můžeme jinak nazývat také adheziny, jelikož během infekce podporují navázání bakterie k hostitelské buňce (Hooper & Gordon 2001). Většina bakterií obsahuje adheziny, které mají různou specifitu. Jedny se váží na terminální sacharidové zbytky pomocí CRD a druhé na vnitřní sekvence oligosacharidů (Nizet et al. 2017). Nejčastěji uplatňují své schopnosti při symbióze nebo adhezi (Mishra et al. 2019).

Virové lektiny též zprostředkovávají adhezi s hostitelskou buňkou, což vede ke vzniku následné infekce. Tento fakt byl poprvé prokázán ve 40. letech 20. století u hemaglutininu viru chřipky. Při odstranění specifického cukru z membrány hostitelské buňky byla vazba s virem přerušena a díky tomu se zabránilo jejímu infikování (Lis & Sharon 1998).

Tyto výzkumy bakteriálních a virových lektinů napomáhají při vývoji antiadhezní léčby u mikrobiálních infekcí. Vývoj nových léků jako jsou antiadheziva je velmi důležitý hlavně z hlediska vzrůstající rezistence ke konvenčním antibiotikům (Lis & Sharon 1998).

### Houbové lektiny

Lektiny hub jsou specifické svou vazbou k N-acetylgalaktosaminovým zbytkům. Původem je 85 % houbových lektinů z hub, 15 % z plísní a 3 % z kvasinek (Singh et al. 2010; Kobayashi & Kawagishi 2014). Jejich obvyklý výskyt zahrnuje plodnice a v malém množství také mycelia. Jejich nejdůležitější funkcí je účast při růstu, morfogenezi, vývoji a rozpoznání mykorhizace (Varrot et al. 2013; Mishra et al. 2019). Dále se také podílejí na prvotní fázi infekce díky interakci s glykokonjugáty hostitelské buňky (Khan & Islam Khan 2011; Mishra et al. 2019).



## Lektiny mořských řas

Lektiny mořských řas můžeme nazývat také jako fytolektiny a u mnohých z nich nalezneme několik společných vlastností. Jsou nízkomolekulární, monomerní, termostabilní a jsou charakteristické svou specifitou pro glykoproteiny. Tím se liší od lektinů většiny suchozemských rostlin, jelikož ty se vyznačují afinitou k monosacharidům a vyskytují se jako oligosacharidové formy (Praseptianga 2015; Mishra et al. 2019). Dle Teixeira et al. 2012 byla přítomnost lektinů zjištěna zhruba u 800 druhů mořských řas z nichž 60 % vykazuje hemaglutinační aktivitu. Toto číslo se však nerovná skutečnosti vzhledem k počtu druhů řas ve světě. Fytolektiny můžeme také řadit do tří skupin dle jejich vazebných vlastností: vázající N-glykany, vázající N-glykan s vysokým obsahem manózy a lektiny vyznačující se oběma typy vazeb. Jejich využití můžeme pozorovat hlavně v biomedicíně díky jejich protizánětlivým, protinádorovým a antivirovým účinkům (Singh et al. 2015; Mishra et al. 2019)

### 3.3.3 Vybrané lektiny

#### RCA I

RCA, neboli latinským názvem *Ricinus communis agglutinin* též známý jako Ricin, je protein získávaný ze skočce obecného (*Ricinus communis*) (De Mejía & Prisecaru 2005; Manning et al. 2017). Je to termerer složený ze dvou řetězců typu A spojených disulfidickými můstky a dvou řetězců typu B na jejich koncích. RCA I je zvláště zajímavý pro svoji afinitu a specifčnost pro glykokonjugáty, které obsahují D-galaktosylové zbytky. Podporuje tak aglutinaci a vazbu polysacharidů a glykoproteinů stejně jako lipozomů a micel obsahujících glykolipidy s galaktosylovými zbytky. Výsledky studií ukázaly, že hlavním a nejdůležitějším rozpoznávacím faktorem pro RCA I by měla být sacharidová sekvence  $\beta$ -D-Gal(1-4)-D-GlcNAc (Wu et al. 2006).

#### PNA

PNA, neboli latinským názvem *Peanut agglutinin*, je rostlinný lektin získávaný z arašídů (*Arachis hypogaea*). Je to protein schopný aglutinovat buňky na buněčném povrchu pomocí determinantů oligosacharidů. Váží se při tom na sacharidovou sekvenci  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc (Hageman & Johnson 1986). Patří tedy do skupiny galaktózu vázajících lektinů, stejně jako RCA I. Má mnoho funkcí a využívá se např. pro stanovení krevních skupin, mitogenezi lymfocytů, separaci subpopulací histocytů (Howard & Batsakis 1982), detekci sacharidových struktur na akrozomu spermií a detekci sacharidových struktur na *zona pellucida* oocytu (Blanks & Johnson 1984; Mortimer et al. 1987).

## 4 Metodika

### 4.1 Zisk vaječníků

Vaječníky byly získávány na jatkách z prepubertálních odporažených prasniček. Následně byly převezeny do laboratoře ve vytemperované termoláhvi (38 °C) s fyziologickým roztokem (0,9% chlorid sodný).

### 4.2 Zisk a výběr oocytů

Z vaječníků byly oocyty získávány aspirací folikulární tekutiny. Oocyty ve stádiu zárodečného vajíčka (GV stádiu) byly aspirovány z folikulů (2-5 mm) spolu s folikulární tekutinou pomocí injekční stříkačky (20 ml) a jehly 20G. Folikulární tekutina byla následně přenesena na Petriho misku a oocyty byly vybrány pod stereomikroskopem. Pro kultivaci byly vybírány pouze oocyty s kompaktním obalem kumulárních buněk a nepoškozenou cytoplazmou. Pomocí skleněné kapiláry byly vybrané oocyty následně přeneseny do modifikovaného média M199 obsahujícího přísady laktátu vápenatého (0,06 mg/ml), gentamicinu (0,0025 mg/ml), pyruvátu sodného (0,25 mg/ml), 10% bovinního fetálního séra a HEPESu (1,5 mg/ml).

### 4.3 Kultivace oocytů *in vitro*

Před kultivací byly vybrané oocyty třikrát promyty v modifikovaném médiu M199. Poté byly přeneseny pomocí tenkostěnné skleněné kapiláry do čtyř-důlkových misek (NUNC), které obsahovaly 1 ml kultivačního média M199 a gonadotropinu P.G. 600. Oocyty byly kultivovány v termostatu s řízenou atmosférou s 5% CO<sub>2</sub> při stálé teplotě 39°C. Oocyty byly kultivovány 24 hodin do dosažení stádia metafáze prvního meiotického dělení (MI), nebo 46 hodin do dosažení stádia metafáze druhého meiotického dělení (MII).

### 4.4 Barvení oocytů

Po kultivaci byly oocyty zbaveny kumulárních buněk pomocí tenkostěnné kapiláry a následně fixovány v 3,7% paraformaldehydu po dobu 40 minut. Dále byly oocyty několikrát promyty v roztoku PBS/ 1% PVA. Pro tento experiment byly použity lektiny konjugované s biotinem RCA I a PNA. Poté následovala inkubace s vybranými lektiny v ředění 1:50 po dobu 45 minut. Poté byly oocyty 3x promyty v roztoku PBS/1% PVA a inkubovány se Streptavidinem konjugovaným s FITC v ředění 1:1000 po dobu 45 minut. Tato inkubace probíhala ve tmě. Poté byly třikrát promyty v PBS/1% PVA. Poté byly oocyty montovány na podložní sklíčko do Vectashieldu s DAPI a následně došlo k zalakování sklíčka pro zamezení vysychání vzorku. Ke každému experimentu byla prováděna negativní kontrola k vyloučení nespecifické vazby Streptavidinu na struktury oocytu.

## 4.5 Vyhodnocení

Oocyty byly po zafixování na podložním sklíčku snímány pomocí konfokálního mikroskopu (Zeiss LSM 800) při zvětšení 400x, při vlnové délce 488 nm. Získané snímky byly následně vyhodnoceny pomocí programu pro analýzu obrazu NIS Elements. Zde byla hodnocena relativní intenzita signálu FITC v oblasti *zona pellucida* oocyty. Výsledky byly dále hodnoceny pomocí statistické metody jednofaktorová ANOVA v programu STATISTICA. Hodnota  $P < 0,05$  je považována za statisticky významnou.

## 4.6 Experimentální schéma

### **Experiment 1: Imunofluorescenční detekce galaktosylových struktur zony *pellucida* pomocí lektinu PNA**

Tento experiment byl zaměřen na detekci  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc struktur na *zoně pellucidě* u prasečích oocytů pomocí vazby lektinu PNA. Pro experimenty byly využity oocyty ve stádiích zárodečného vajíčka (GV), metafáze prvního meiotického dělení (MI) a metafáze druhého meiotického dělení (MII). Kultivace probíhala v modifikovaném kultivačním médiu M199. Dále byly detekovány příslušné sacharidové struktury barvením s příslušným lektinem a následně snímány pomocí konfokálního mikroskopu. Oocyty byly hodnoceny pomocí programu pro analýzu obrazu (NIS Elements). Intenzita signálu byla vyjádřena jako relativní intenzita signálu vztažená k oocytům ve stádiu MII. Relativní intenzita signálu fluorescence byla vyhodnocena programem STATISTICA pomocí metody ANOVA.

### **Experiment 2: Imunofluorescenční detekce galaktosylových struktur zony *pellucida* pomocí lektinu RCA I**

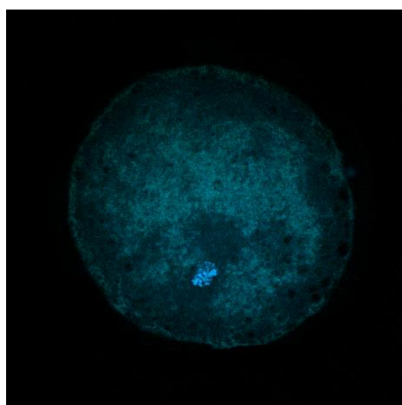
Tento experiment byl zaměřen na detekci  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GlcNAc struktur na *zoně pellucidě* u prasečích oocytů pomocí vazby lektinu RCA I. Pro experimenty byly využity oocyty ve stádiích zárodečného vajíčka (GV), metafáze prvního meiotického dělení (MI) a metafáze druhého meiotického dělení (MII). Kultivace probíhala v modifikovaném kultivačním médiu M199. Dále byly detekovány příslušné sacharidové struktury barvením s příslušným lektinem a následně snímány pomocí konfokálního mikroskopu. Oocyty byly hodnoceny pomocí programu pro analýzu obrazu (NIS Elements). Intenzita signálu byla vyjádřena jako relativní intenzita signálu vztažená k oocytům ve stádiu MII. Relativní intenzita signálu fluorescence byla vyhodnocena programem STATISTICA pomocí metody ANOVA.

## 5 Výsledky

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, že dochází k redistribuci galaktosylových struktur na *zoně pellucidě* prasečích oocytů během jejich meiotického zrání. Tyto změny byly sledovány pomocí lektinů RCA I a PNA v různých fázích meiotického zrání (GV, MI, MII).

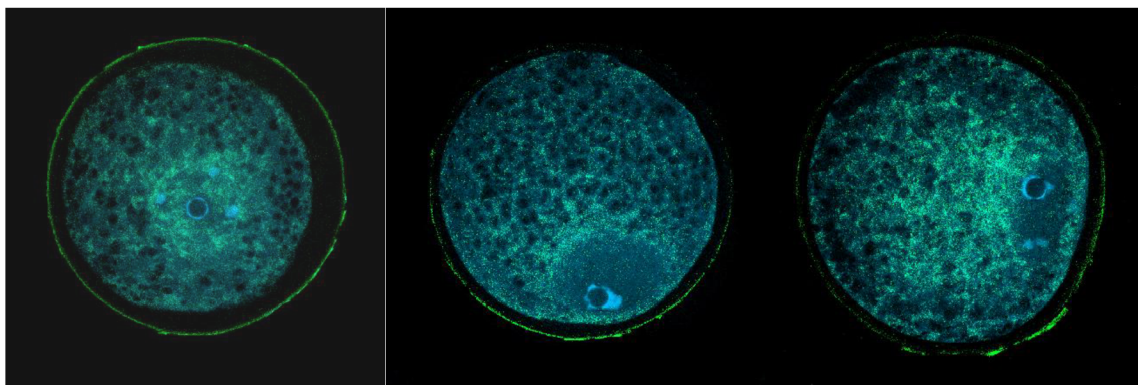
### 5.1 Imunofluorescenční detekce galaktosylových struktur zony *pellucidy* pomocí lektinu PNA

Pro každý experiment byla provedena negativní kontrola. Oocyty byly inkubovány se Streptavidinem konjugovaným s Fluoresceinem pro vyloučení nespecifické vazby Streptavidinu na struktury oocyty. Bylo potvrzeno, že nedocházelo ke nespecifickým vazbám Streptavidinu k oocyty.

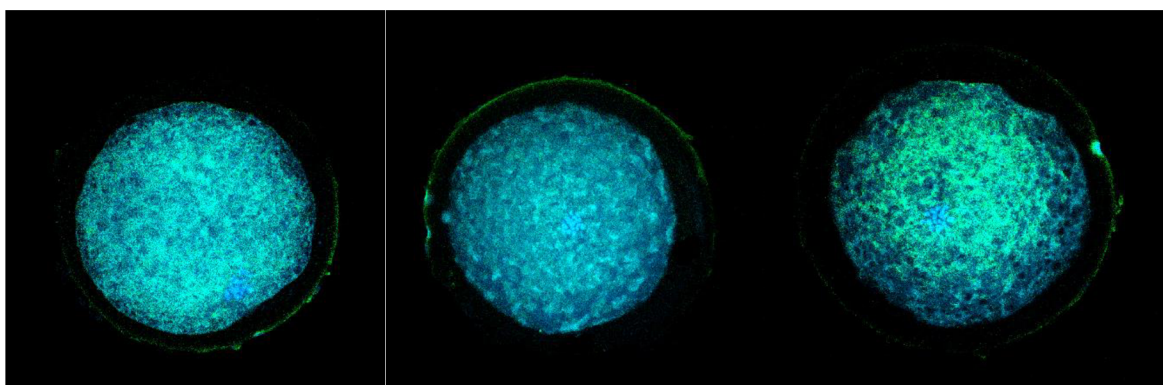


**Obr. 3.** Negativní kontrola experimentu pro detekci galaktosylových struktur pomocí lektinu PNA. Inkubace oocytů proběhla se Streptavidinem konjugovaným s Fluoresceinem (FITC – zelené značení, chromatin je vyznačen modře – DAPI) Oocyty byly snímány pomocí konfokálního mikroskopu při zvětšení 400x.

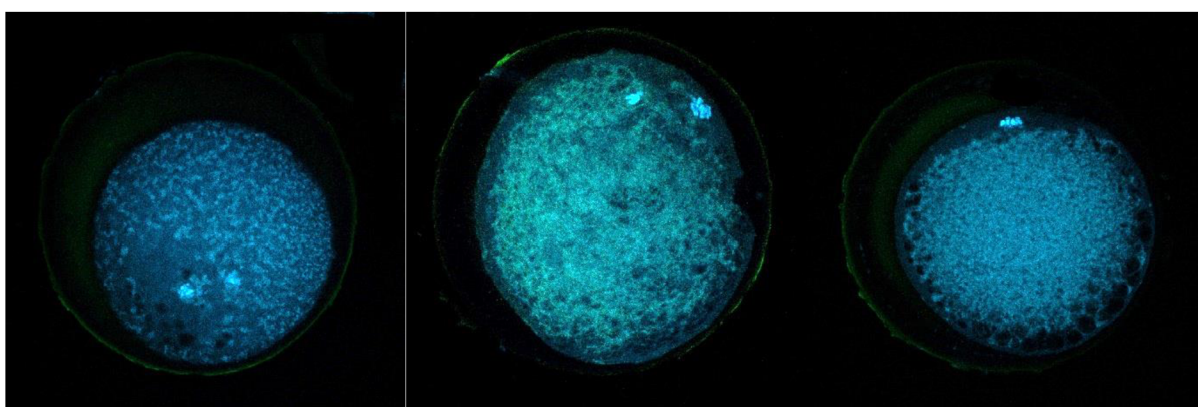
Přítomnost galaktosylových struktur  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc v oblasti *zona pellucida* byla detekována pomocí fluorescenčního signálu lektinu PNA, a to ve třech fázích meiotického zrání. Před statistickým vyhodnocením byla stanovena nulová hypotéza ( $H_0$ ), kde neexistuje ani jeden statisticky významný rozdíl mezi průměry výběrových souborů.  $H_0$  byla hodnocena pomocí jednofaktorové ANOVY a na základě výsledné P hodnoty ( $p < 0,05$ ) byla zamítnuta. Pro následné podrobnější vyhodnocení rozdílů pro jednotlivé fáze meiotického zrání oocytů byl použit Scheffého test. Na jeho základě byly zjištěny statisticky významné rozdíly v relativní intenzitě signálu lektinu PNA mezi skupinami GV a MI, MI a MII i GV a MII. Mezi jednotlivými skupinami docházelo vždy ke statisticky významnému poklesu relativní intenzity signálu PNA, přičemž nejvyšší hodnoty relativní intenzity signálu byly pozorovány u oocytů v GV stádiu.



**Obr. 5.** Detekce a lokalizace vybraných galaktosylových struktur *zona pellucida* u oocytů v GV stádiu pomocí biotinem značeného lektinu PNA. Lektin PNA se specificky váže na  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc. PNA je na snímcích značen zeleně. Chromatin je označen modře pomocí barviva DAPI. Snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu při zvětšení 400x.



**Obr. 6.** Detekce a lokalizace vybraných galaktosylových struktur *zona pellucida* u oocytů v MI stádiu pomocí biotinem značeného lektinu PNA. Lektin PNA se specificky váže na  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc. PNA je na snímcích značen zeleně. Chromatin je označen modře pomocí barviva DAPI. Snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu při zvětšení 400x.

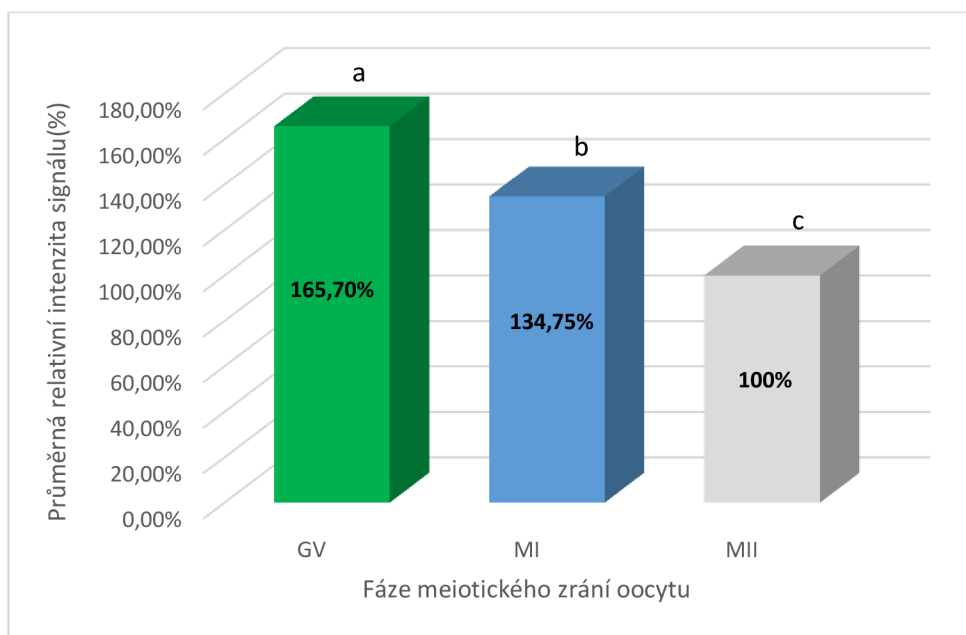


**Obr. 7.** Detekce a lokalizace vybraných galaktosylových struktur *zona pellucida* u oocytů v MII stádiu pomocí biotinem značeného lektinu PNA. Lektin PNA se specificky váže na  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc. PNA je na snímcích značen zeleně. Chromatin je označen modře pomocí barviva DAPI. Snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu při zvětšení 400x.

**Tab. 3.** Relativní intenzita signálu lektinu PNA v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů. Intenzita signálu je vyjádřena jako relativní intenzita signálu vztažena k referenční hodnotě oocytů v MII fázi (100 %). N= počet pozorování, GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku, MI – oocyty v metafázi prvního meiotického dělení, MII – oocyty v metafázi druhého meiotického dělení.

	<b>GV</b>	<b>MI</b>	<b>MII</b>
<b>Intenzita signálu PNA</b>	165,70 %	134,75 %	100 %
<b>N</b>	30	30	30

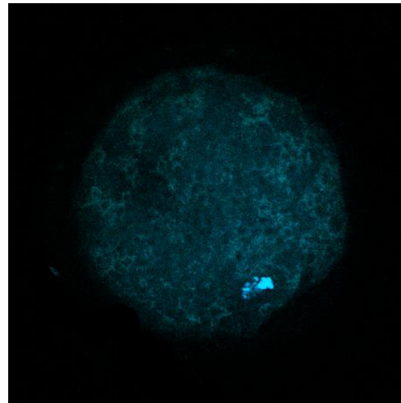
**Graf 1.** Průměrná relativní intenzita signálu PNA v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů. Intenzita signálu je vyjádřena jako relativní intenzita signálu, kde referenční hodnotou byla stanovena průměrná intenzita signálu v MII fázi (100 %). Statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) jsou mezi jednotlivými stádii oocytů znázorněny odlišnými superskripty <sup>a,b,c</sup>.





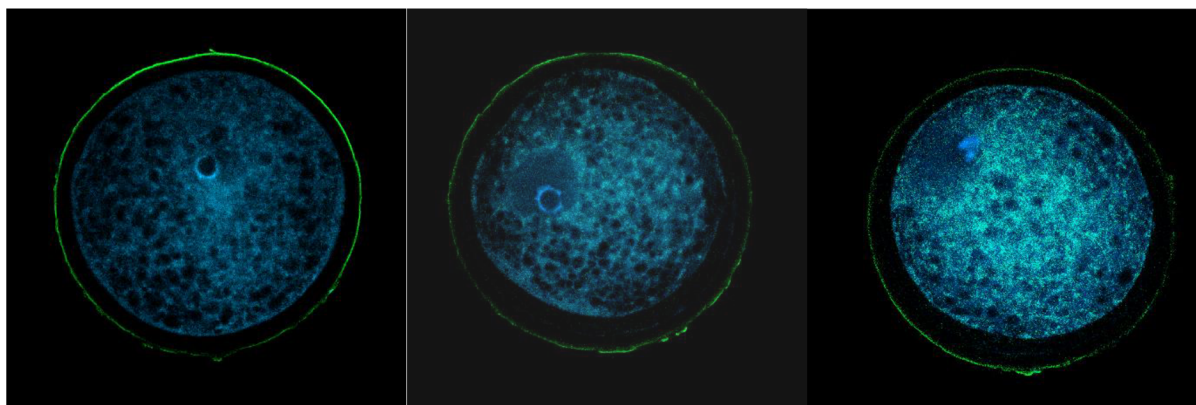
## 5.2 Imunofluorescenční detekce galaktosylových struktur zony *pellucida* pomocí lektinu RCA I

Pro každý experiment byla provedena negativní kontrola. Oocyty byly inkubovány se Streptavidinem konjugovaným s Fluoresceinem pro vyloučení nespecifické vazby Streptavidinu na struktury oocyty. Bylo potvrzeno, že nedocházelo ke nespecifickým vazbám na oocyty.

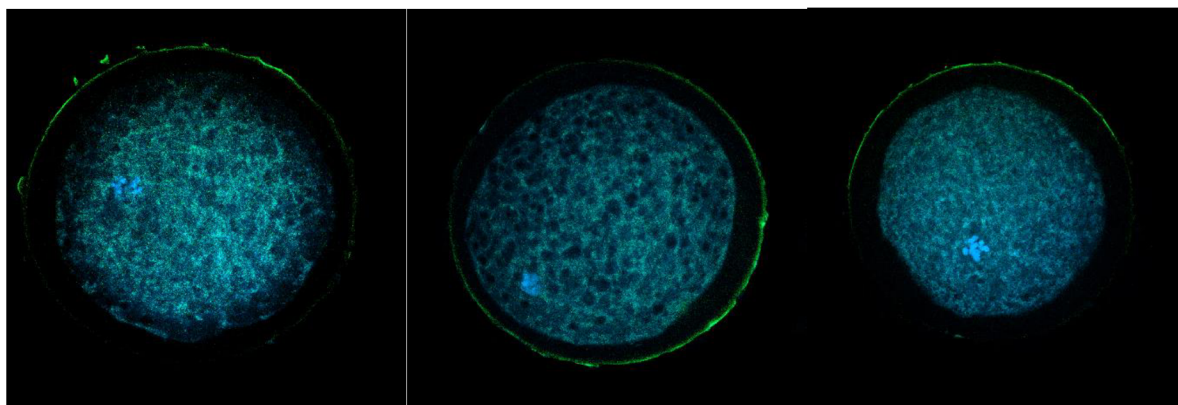


**Obr. 7.** Negativní kontrola experimentu pro detekci galaktosylových struktur pomocí lektinu RCA I. Inkubace oocytů proběhla se Streptavidinem konjugovaným s Fluoresceinem (FITC – zelené značení, chromatin je vyznačen modře – DAPI) Oocyty byly snímány pomocí konfokálního mikroskopu při zvětšení 400x.

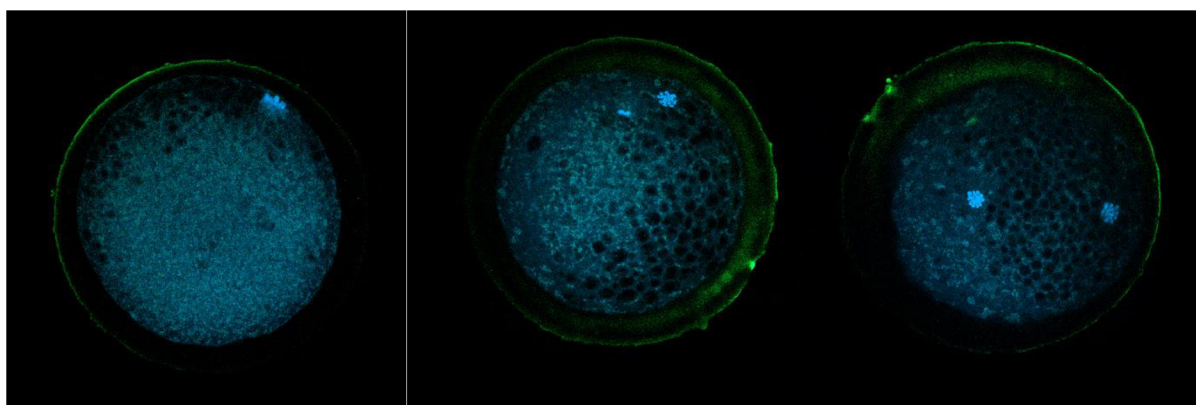
Přítomnost galaktosylových struktur  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GlcNAc v oblasti *zona pellucida* byla detekována pomocí fluorescenčního signálu lektinu RCA I, a to ve třech fázích meiotického zrání. Před statistickým vyhodnocením byla stanovena nulová hypotéza ( $H_0$ ), kde neexistuje ani jeden statisticky významný rozdíl mezi průměry výběrových souborů.  $H_0$  byla hodnocena pomocí jednofaktorové ANOVY a na základě výsledné P hodnoty ( $p > 0,05$ ) byla potvrzena. Neexistuje tedy statisticky významný rozdíl mezi ani jednou výběrovou skupinou oocytů v různých fázích meiotického zrání.



**Obr. 8.** Detekce a lokalizace vybraných galaktosylových struktur *zona pellucida* u oocytů v GV stádiu pomocí biotinem značeného lektinu RCA I. Lektin RCA I se specificky váže na  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GlcNAc. RCA I je na snímcích značen zeleně. Chromatin je označen modře pomocí barviva DAPI. Snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu při zvětšení 400x.



**Obr. 9.** Detekce a lokalizace vybraných galaktosylových struktur *zona pellucida* u oocytů v MI stádiu pomocí biotinem značeného lektinu RCA I. Lektin RCA I se specificky váže na  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GlcNAc. RCA I je na snímcích značen zeleně. Chromatin je označen modře pomocí barviva DAPI. Snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu při zvětšení 400x.



**Obr. 10.** Detekce a lokalizace vybraných galaktosylových struktur *zona pellucida* u oocytů v MII stádiu pomocí biotinem značeného lektinu RCA I. Lektin RCA I se specificky váže na

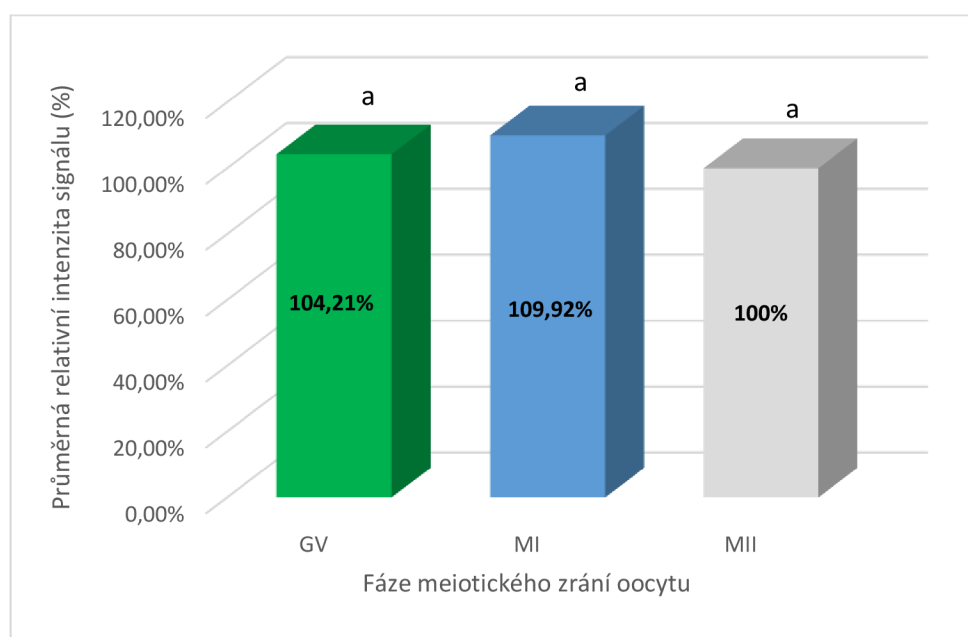


$\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GlcNAc. RCA I je na snímcích značen zeleně. Chromatin je označen modře pomocí barviva DAPI. Snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu při zvětšení 400x.

**Tab. 4.** Relativní intenzita signálu lektinu RCA I v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů. Intenzita signálu je vyjádřena jako relativní intenzita signálu vztažena k referenční hodnotě oocytů v MII fázi (100 %). N= počet pozorování, GV – oocyty ve stádiu zárodečného vajíčka, MI – oocyty v metafázi prvního meiotického dělení, MII – oocyty v metafázi druhého meiotického dělení.

	<b>GV</b>	<b>MI</b>	<b>MII</b>
<b>Intenzita signálu RCA I</b>	104,21 %	109,92 %	100 %
<b>N</b>	30	30	30

**Graf 2.** Průměrná relativní intenzita signálu RCA I v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů. Intenzita signálu je vyjádřena jako relativní intenzita signálu, kde referenční hodnotou byla stanovena průměrná intenzita signálu v MII fázi (100 %). Statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) jsou mezi jednotlivými stádii oocytů znázorněny odlišnými superskripty <sup>a</sup>.



## 6 Diskuze

V této diplomové práci jsme se zaměřili na detekci galaktosylových struktur *zona pellucida* u prasečího oocyty a sledování jejich redistribuce během meiotického zrání. Pro detekci sacharidových struktur můžeme využívat specifické multivalentní proteiny zvané lektiny, které se vyskytují téměř ve všech formách života (Natchiar et al. 2007). Pro experiment byly vybrány dva lektiny. První, RCA I (*Ricinus communis agglutinin*) je rostlinný lektin, který vykazuje vysokou afinitu k D-galaktosylovým zbytkům. Studie prokázaly, že hlavním rozpoznávacím místem by u RCA I měla být sacharidová sekvence  $\beta$ -D-Gal-(1-4)-D-GlcNAc (Wu et al. 2006). V experimentu pro detekci galaktosylových struktur lektinem RCA I byla potvrzena přítomnost galaktosylových struktur v oblasti *zóny pellucidy*. Po statistickém vyhodnocení však nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi žádnou z vybraných skupin oocytů. Ovšem v experimentu zaměřeném na detekci galaktosylových struktur lektinem PNA, byl patrný statisticky významný pokles relativní intenzity signálu mezi skupinami oocytů ve stádiu GV a MI a následně i mezi skupinami oocytů ve stádiu MI a MII. Statisticky významný rozdíl v relativní intenzitě signálu lektinu PNA byl potvrzen i mezi skupinami oocytů ve stádiu GV a MII. Lektin PNA (*Peanut agglutinin*) se též řadí do galaktózu vázajících lektinů, a to specificky k sacharidové sekvenci  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc (Hageman & Johnson 1986), tedy k jiné než lektin RCA I. Přesná úloha galaktosylových struktur v glykoproteinech *zóny pellucidy* prasečích oocytů není doposud známa. U prasat by galaktosylové struktury mohly být jedním z hlavních receptorů pro vazbu spermie na vajíčko (Takahashi et al. 2013; Tumova et al. 2021). To však není zcela potvrzeno. *Zona pellucida* je unikátní extracelulární obal savčích oocytů a preimplantačních embryí a u prasat je složena ze tří glykoproteinů – ZP2, ZP3 a ZP4 (Prasad et al. 2000; Moros-Nicolás et al. 2021). Ty procházejí řadou posttranslačních úprav jako jsou glykosylace, sulfatace a sialyzace (Rath et al. 2005). *Zona pellucida* obsahuje tedy velké množství sialovaných N-(aspariginových) a O-(serinových/threoninových) glykanů, které hrají významnou roli při vazbě spermie na vajíčko a oplození. Konkrétní vazebné struktury zodpovědné za tuto vazbu však nejsou doposud odhaleny (Tumová et al. 2021). N-glykany vytvářejí komplex a obsahují bi/tri/tetra antenární struktury, které dále obsahují N-acetyllaktosaminové jednotky. Až 75 % glykanů je sialováno nebo nese  $\text{SO}_3\text{-6GlcNAc}$  v jednotkách laktosaminu. U prasat se vyskytuje velké množství fukosylových glykanů s acetyllaktosaminovými řetězci. Dále jsou zde také kyselé vysoce sulfatované N-glykany obsahující poly-N-acetyllaktosaminové sekvence v různých délkách, které jsou sulfatované v poloze C-6 GlcNAc (N-acetylglukosamin) (Noguchū&Nakano 1992). O-glykany jsou též prodlouženy o sulfatované laktosaminy. Dále byla potvrzena přítomnost N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminových zbytků (D-GlnNAc) na *zoně pellucidě* oocytů (Takahashi et al. 2013). Např. Habibi et al. (2008) potvrdili přítomnost D-GlcNAc na *zoně pellucidě* od rostoucího oocyty až po plně meioticky kompetentní oocyty, což podporuje teorii, že se N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminové zbytky účastní vazby spermie-*zona pellucida*. Aviles et al (1997) zase ve své studii potvrdili, že jednotky GlcNAc se nacházejí v celé matrix *zóny pellucidy*. O-vázané oligosacharidy na ZP3 jsou zde charakterizovány jako trisacharidy s terminálním GlcNAc. To nasvědčuje tomu, že se GlcNAc nejspíše také podílí na vazbě spermie-oocyt. Tuto skutečnost potvrzují ve své studii také Mendes et al. (2019). Ve svém výzkumu zjistili přítomnost D-GlcNAc a  $\beta$ -D-galaktózy v *zoně pellucidě* oocytů od prepubertálních až po cyklující prasnice.

Song et al. (1999) prováděli výzkum vazby lektinů k *zoně pellucidě* prasat v *in vitro* podmínkách a zkoumali při tom také vazbu spermií na oocyty. U každého lektinu se předpokládá, že se specificky váže na jednotlivé sacharidové zbytky. Oocyty v MII fázi barvili různými lektiny mezi nimiž byl i RCA I. Ten vykazoval, společně s lektinem LCA, nejsilnější vazbu na sacharidové struktury glykoproteinů ZP. To našimi experimenty potvrzeno nebylo. Intenzita signálu lektinu RCA I byla poměrně slabá. Co může být příčinou rozdílných výsledků je těžké popsat. Bylo by možná vhodné použít zmíněný lektin ve více verzích od různých výrobců. Ve studii Song et al. (1999) se RCA I vázal především v zevní části *zony pellucidy*. To bylo pozorováno i našimi experimenty.

Dle výzkumů hraje hlavní roli ve vazbě a indukci akrozomální reakce glykoprotein ZP3. Po ošetření oocytu pomocí lektinu BS-I nebo BS-II byl počet spermií, které se navázaly na ZP výrazně nižší, ovšem míra akrozomální reakce a následné penetrace zůstala stejná. Pokud byly ale oocyty ošetřeny pomocí lektinu RCA I nebo LCA, byla inhibována jak vazba spermií na vajíčko, tak její akrozomální reakce a následná penetrace. Tento experiment svědčí o tom, že se  $\beta$ -Gal a  $\alpha$ -Man nejspíše účastní rozpoznání spermií a oocytu a indukují také následnou akrozomální reakci. Nasvědčuje tomu také fakt, že se kančí spermií váží na neredukující terminální zbytky  $\beta$ -Gal u králíčích erytrocytů, zatímco býčí spermií nikoliv (Takahashi et al. 2013). Tuto skutečnost potvrzuje také Yonezawa (2014), který zkoumal domény glykosylovaných míst vazajících spermií na *zonu pellucidu*. Bylo potvrzeno že  $\beta$ -Gal zbytky se podílejí na vazbě spermií a *zony pellucidy*. Dále zkoumal také účast glykoproteinů ZP4 a ZP3, přičemž došel k závěru, že heterokomplex ZP3/ZP4 je nezbytný pro již zmíněnou vazbu. Zajímal se také o mezidruhové rozdíly mezi N – vázanými řetězci. Zatímco u krav mají N-řetězce na svém konci terminální  $\alpha$ -Man, prasečí N-vázané řetězce obsahují na svých koncích  $\beta$ -Gal a  $\beta$ -GlcNAc (Yonezawa, 2014).

Ve studii Desantis et al. (2009) byla zjištěna silná reakce lektinu RCA v oblasti *zona pellucida* i kumulárních buněk u prasečích i koňských oocytů.

Několik studií je také věnováno lokalizaci vazebných míst pro lektiny RCA I a PNA. Parillo et al. (1996) ve svém studiu barvili oocyty z antrálních folikulů dospělých cyklujících prasnic. Následně zjistili slabou intenzitu signálu lektinu RCA I ve vnitřní části *zony pellucidy*, tedy nejbližší plazmatické membráně. Silnější signál intenzity byl pozorován ve vnější části. Po naštěpení sialidázou před barvením RCA I se signál rovnoměrně rozšířil po celé tloušťce *zony pellucidy* a odhalila se nová vazebná místa pro RCA I na vnější části *zony pellucidy*. Vazebná místa pro lektin PNA byla v *zoně pellucidě* jen řídce distribuována až po odštěpení zbytků kyseliny sialové, což ukazuje na přítomnost kyseliny sialové- $\beta$ -Gal-(1-3)-GalNAc jako jednu terminálních sekvencí v sialoglykoproteinech, které jsou různě distribuované v matrici *zony pellucidy*. Tyto závěry korespondují s výsledky experimentů této diplomové práce. Intenzita signálu lektinu PNA byla ve srovnání se signálem lektinu RCA výrazně slabší a nejvyšší byla pozorována u skupiny oocytů ve stádiu GV, pak docházelo k jejímu statisticky významnému poklesu během meiotického zrání. Je pravděpodobné, že během meiotického zrání dochází k výrazné sialyzaci, která může zamaskovat vazby pro lektin PNA v glykoproteinech *zony pellucidy*. To by však bylo potřeba ověřit u oocytů ošetřených sialidázou před vazbou s lektinem PNA.

Ve studii Desantis et al. (2009) byla zkoumána místa vazající lektin komplexu cumulus-oocyt u koní. PNA značené glykany a terminální strukturou  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc byly

rovnoměrně rozmístěny v *zoně pellucidě*. To ukazuje na přítomnost O-vázaných oligosacharidů, jelikož  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc je běžná sekvence u O-vázaných glykanů a hraje důležitou roli v primární vazbě spermie na *zonu pellucidu*. Také Habibi et al. (2008) ve své práci potvrdili, že na spermii se nachází molekula vázající GalNAc a je tedy součástí vazby a následné fúze spermie s oocytem.  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc byly také nalezeny homogenně distribuované v *zoně pellucidě* prasete. U křečka, myši nebo krysy se tyto O-glykany nacházely hlavně ve vnitřní oblasti nejbližší cytoplazmatické membráně. Také Parillo et al. (1996) se věnovali mezidruhově rozdílné distribuci sacharidových struktur u ovcí, koz a prasat. Pro experiment byly použity oocyty ošetřené hydroxidem draselným a neuroaminidázou a dále barveny několika lektiny. PNA vykazovalo nejvyšší intenzitu signálu u přežvýkavců a nejnižší u prasat. U PNA je oblast vázající cukry tvořena 4 smyčkami: A, B, C a D. Nejvýznamnějším výsledkem v oblasti studie tohoto lektinu je fakt, že jako jediný není schopen vázat samotný GalNAc a je výhradně specifický pro Gal. Jiné studie prokázali jeho vysokou afinitu pro -1-3 vázané disacharidy, a tedy i zmíněný  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc (Natchiar et al. 2007).

V této diplomové práci byla potvrzena redistribuce galaktosylových struktur glykoproteinů *zóny pellucidy* během meiotického zrání prasečích oocytů. Přesný mechanismus těchto změn a jejich úloha pro specifickou vazbu spermie na vajíčko, však zůstává zatím neobjasněna.

## 7 Závěr

Během oogeneze dochází k mnoha složitým komplexním dějům, které mají oocyt připravit pro oplození a následný embryonální vývoj. Jedním z nich je vznik glykoproteinového obalu zvaného *zona pellucida*, který se účastní mnoha dějů vedoucích k oplození a zároveň chrání vzniklé embryo při průchodu vejcovodem samice. Skladba glykoproteinů ZP není u všech savců stejná a tyto rozdíly jsou klíčové k zajištění druhově specifické vazby spermie a vajíčka. U prasat je *zona pellucida* tvořena třemi glykoproteiny, a to ZP2, ZP3 a ZP4, přičemž heterokomplex ZP4/ZP3 je nezbytný pro již zmíněnou primární vazbu spermie na vajíčko. Jedná se o specifickou interakci protein-sacharid nebo v menší míře protein-protein, která vede k následné akrozomální reakci spermie a následnému proniknutí spermie do vajíčka. Právě zmíněná interakce protein-sacharid byla předmětem našich experimentů, kdy pomocí lektinů (proteinů) byly detekovány galaktosylové struktury (sacharid) *zony pellucidy*.

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, že dochází k redistribuci galaktosylových struktur na *zoně pellucidě* prasečích oocytů během jejich meiotického zrání. Pro navržený experiment bylo vybrány skupiny oocytů ve třech fázích meiotického zrání (GV, MI, MII) a byly použity specificky vázající se lektiny: RCA I (*Ricinus communis agglutinin*) specificky se vázající na sacharidové sekvence  $\beta$ -D-Gal-(1-4)-D-GlcNAc a PNA (*Peanut agglutinin*) specificky se vázající na sacharidové sekvence  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc.

V experimentu pro detekci  $\beta$ -D-Gal-(1-4)-D-GlcNAc struktur lektinem RCA I byla potvrzena přítomnost sacharidové sekvence v oblasti *zony pellucidy*. Po statistickém vyhodnocení však nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi žádnou z vybraných skupin oocytů.

V experimentu pro detekci  $\beta$ -D-Gal-(1-3)-D-GalNAc struktur lektinem PNA byla též potvrzena přítomnost této sacharidové sekvence v oblasti *zony pellucidy*. Z naměřených dat relativní intenzity signálu FITC je patrný statisticky významný pokles relativní intenzity signálu mezi skupinami oocytů ve stádiu GV a MI a následně i mezi skupinami oocytů ve stádiu MI a MII. Statisticky významný rozdíl v relativní intenzitě signálu lektinu PNA byl potvrzen i mezi skupinami oocytů ve stádiu GV a MII.

Hypotézu této diplomové práce o redistribuci galaktosylových struktur během meiotického zrání prasečích oocytů se podařilo potvrdit. Patrně je významné, v jaké vazbě se galaktóza v řetězci glykanu nachází. Tomu nasvědčují i výsledky provedených experimentů, kdy statisticky významné rozdíly v relativní intenzitě signálu lektinu byly prokázány jen při použití lektinu PNA, který se váže na galaktózu vázanou v řetězci v pozici 1-3. Tuto hypotézu by ovšem bylo vhodné ověřit.

## 8 Literatura

- Adhikari D, Liu K. 2009. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews* **30**:438–464.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. New York.
- Alberts B, Bray D, Johnson A. 2006. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Espero, Ústí nad Labem
- Alex Shivers C, Dunbar HS. 1977. Autoantibodies to zona pellucida: A possible cause for infertility in women. *Science* **197**:1082–1084.
- Ambekar AS et al. 2013. Proteomic analysis of human follicular fluid: A new perspective towards understanding folliculogenesis. *Journal of Proteomics* **87**:67–77.
- Anderson R, Copeland TK, Schöler H, Heasman J, Wylie C. 2000. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mechanisms of Development* **91**:61–68.
- Andrade GM, Collado M del, Meirelles FV, da Silveira JC, Perecin F. 2019. Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development. *Animal Reproduction* **16**:485–496. Colegio Brasileiro de Reproducao Animal.
- Araújo VR, Gastal MO, Figueiredo JR, Gastal EL. 2014. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* **12**:1–14.
- Avilés M, Jaber L, Teresa Castells M, Ballesta J, Kan FWK. 1997. Modifications of Carbohydrate Residues and ZP2 and ZP3 Glycoproteins in the Mouse Zona Pellucida after Fertilization1. *Biology of Reproduction*. **57**(5):1155-1163.
- 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.
- Bielańska-Osuchowska Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive biology* **6**:162–193.
- Black JL, Erickson BH. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record* **161**:45–55.
- Blanks JC, Johnson L V. 1984. Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. A species comparison. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **25**:546–557.

- Bogner K, Hinsch KD, Nayudu P, Konrad L, Cassara C, Hinsch E. 2004. Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) ovary. *Molecular Human Reproduction* **10**:481–488.
- Bork P, Beckmann G. 1993. The CUB Domain: A Widespread Module in Developmentally Regulated Proteins. *Journal of Molecular Biology* **231**:539–545. Academic Press.
- Bowles J, Koopman P. 2007. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development* **134**:3401–3411.
- Braw-Tal R, Yossefi S. 1997. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* **109**:165–171.
- Brooks SA. 2017. Lectin histochemistry: Historical perspectives, state of the art, and the future. Pages 93–107 *Methods in Molecular Biology* Springer New York. New York.
- Cao Q, Zhao C, Zhang X, Zhang H, Lu Q, Wang C, Hu Y, Ling X, Zhang J, Huo R. 2020. Heterozygous mutations in ZP1 and ZP3 cause formation disorder of ZP and female infertility in human. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **24**:8557–8566.
- Cavada BS, Pinto-Junior VR, Osterne VJS, Nascimento KS. 2019. ConA-like lectins: High similarity proteins as models to study structure/biological activities relationships. *International Journal of Molecular Sciences* **20**:30.
- Coticchio G, Albertini DF, De Santis L. 2013. *Oogenesis*. Springer, London. DOI: 1007/9780-85729-826-3.
- Clark FE, Akera T. 2021. Unravelling the mystery of female meiotic drive: Where we are. *Open Biology* **11**.
- Clark GF. 2010. The mammalian zona pellucida: A matrix that mediates both gamete binding and immune recognition? *Systems Biology in reproductive Medicine*. **56** (5): 349-364
- Darlene Limback S, Albertini DF. 2013. Imaging strategies for studying mammalian oogenesis. Pages 3–16 *Oogenesis*. Springer London, London.
- de Felici M. 2010. Germ stem cells in the mammalian adult ovary: Considerations by a fan of the primordial germ cells. *Molecular Human Reproduction* **16**:632–636.
- De Mejia EG, Prisecaru VI. 2005. Lectins as bioactive plant proteins: A potential in cancer treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **45**:425–445.
- Dean J. 2004. Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *BioEssays* **26**:29–38.

- Denker HW. 2000. Structural dynamics and function of early embryonic coats. *Cells Tissues Organs* **166**:180–207.
- Desantis S, Ventriglia G, Zizza S, De Santis T, Di Summa A, De Metrio G, Dell’Aquila ME. 2009. Lectin-binding sites in isolated equine cumulus-oocyte complexes: Differential expression of glycosidic residues in complexes recovered with compact or expanded cumulus. *Theriogenology*. **72**(3):300-309.
- Dunbar BS, Wardrip NJ, Hedrick JL. 1980. Isolation, Physicochemical Properties, and Macromolecular Composition of Zona Pellucida from Porcine Oocytes†. *Biochemistry* **19**:356–365.
- Eichenlaub – Ritter, U. 2012. Oocyte aging and its cellular basis. *The International Journal of Developmental Biology*. **56** (10 – 12): 841 – 852.
- Epifano O, Dean J. 1994. Biology and structure of the zona pellucida: A target for immunocontraception. *Reproduction, Fertility and Development* **6**:319–330.
- Etzler ME. 1985. Plant lectins: molecular and biological aspects. *Annual review of plant physiology*. **36**(1):209-234.
- Evsikov A V., Graber JH, Brockman JM, Hampl A, Holbrook AE, Singh P, Eppig JJ, Solter D, Knowles BB. 2006. Cracking the egg: Molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo. *Genes and Development* **20**:2713–2727.
- Ewen KA, Koopman P. 2010. Mouse germ cell development: From specification to sex determination. *Molecular and Cellular Endocrinology* **323**:76–93.
- Fair T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science* **78**:203–216.
- Fernandez-Fuertes B, Blanco-Fernandez A, Reid CJ, Meade KG, Fair S, Lonergan P. 2018. Removal of sialic acid from bull sperm decreases motility and mucus penetration ability but increases zona pellucida binding and polyspermic penetration in vitro. *Reproduction* **155**:481–492.
- Fernandes J, Saudubray JM, Berghe G, Walter J. 2008 *Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch*: 1. vyd. Praha: Triton ISBN 978-80-7387-096-6.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles F V., Ferriani RA, Navarro PAAS. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* **71**:836–848.
- Fortune JE. 2003. The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science* **78**:135–163.



- Fulka J, Motlik J, Fulka J, Jilek F. 1986. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* **77**:281–285.
- Georgios Iatrakis, Dimitrios Iatrakis, Eirini Orovou, Evangelia Antoniou. 2023. Meiosis and preimplantation genetic testing. *World Journal of Advanced Research and Reviews* **17**:861–863.
- Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB. 2011. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica* **113**:236–247.
- Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science* **82–83**:431–446.
- Gosden RG, Bownes M. 1995. Cellular and molecular aspects of oocyte development, Gametes-The Oocyte. Cambridge University Press. Cambridge
- Gosden RG. 2002. Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* **186**:149–153.
- Goudet G, Mugnier S, Callebaut I, Monget P. 2008. Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. *Biology of Reproduction* **78**:796–806.
- Gupta SK. 2015. Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans. *Journal of Reproductive Immunology* **108**:90–97.
- Gupta SK. 2022. Zona pellucida glycoproteins: Relevance in fertility and development of contraceptive vaccines. *American Journal of Reproductive Immunology* **89**:13535.
- Gupta SK, Bhandari B, Shrestha A, Biswal BK, Palaniappan C, Malhotra SS, Gupta N. 2012. Mammalian zona pellucida glycoproteins: Structure and function during fertilization. *Cell and Tissue Research* **349**:665–678.
- Guraya S. 2007. Cellular and Molecular Biology of Human Oogenesis, Ovulation and Early Embryogenesis. 1st edition. NEW AGE, Ludhiana.
- Habibi Rezaei M, Hosseini Panah S, Fazaal A. 2008. Lectin binding characteristic of murine zona pellucida during folliculogenesis; The importance of N-acetyl sugar derivatives. *Journal of science*. **33**(4):25-31.
- Hageman GS, Johnson L V. 1986. Biochemical characterization of the major peanut-agglutinin-binding glycoproteins in vertebrate retinae. *Journal of Comparative Neurology* **249**:499–510.

- Hampl A, John JE. 1995. Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development*. **121**: 925–933.
- Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG. 1994. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: The ZPA, ZPB and ZPC gene families. *Mitochondrial DNA* **4**:361–393.
- Hauf S, Watanabe Y. 2004. Kinetochore orientation in mitosis and meiosis. *Cell* **119**: 317-327
- Hawley RS, Walker M. 2009. *Advanced Genetic Analysis: Finding Meaning in a Genome*. Wiley, Nemecko
- Hedrick JL, Wardrip NJ. 1987. On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Developmental Biology* **121**:478–488.
- Hennet ML, Combelles CMH. 2012. The antral follicle: A microenvironment for oocyte differentiation. *International Journal of Developmental Biology* **56**:819–831.
- Hill L. 2007. *Cells Biology*. 1. Delhi: Global Media. ISBN 9788189940942.
- Holt JE, Lane SIR, Jones KT. 2013. The Control of Meiotic Maturation in Mammalian Oocytes. *Current Topics in Developmental Biology* **102**:207–226.
- Hooper L V., Gordon JI. 2001. Glycans as legislators of host-microbial interactions: Spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology* **11**(2):1-10
- Howard DR, Batsakis JG. 1982. Peanut Agglutinin: A New Marker for Tissue Histiocytes. *American journal of clinical pathology* **77**:401–408. Available from <http://ajcp.oxfordjournals.org/>.
- Hunt PA, Hassold TJ. 2008. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends in Genetics* **24**:86–93.
- Hunter M. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction* **5**:122–130.
- Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. **63**(6): 1717 – 1751.
- Izquierdo-Rico MJ, Gimeno L, Jiménez-Cervantes C, Ballesta J, Avilés M. 2011. Biosynthesis of hamster zona pellucida is restricted to the oocyte. *Theriogenology* **75**:463–472.
- Jones KT. 2008. Meiosis in oocytes: Predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Human Reproduction Update* **14**:143–158.

- Kalsi G, Das HR, Babu CR, Das RH. 1992. Isolation and characterization of a lectin from peanut roots. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1117**:114–119. Elsevier.
- Kerr CL, Shambloott MJ, Gearhart JD. 2006. Pluripotent Stem Cells from Germ Cells. Pages 400–426 *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc.
- Khan F, Islam Khan M. 2011. Fungal Lectins: Current molecular and biochemical perspectives. *International Journal of Biological Chemistry* **5**:20.
- Kilpatrick DC. 2002. Animal lectins: A historical introduction and overview. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-General subjects*. **1572** (2-3): 187-197
- Knox R V. 2005. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domestic Animal Endocrinology* **29**:385–397.
- Kobayashi Y, Kawagishi H. 2014. Fungal lectins: A growing family. *Methods in Molecular Biology* **1200**:15–38.
- Kölle S, Sinowatz F, Boie G, Palma G. 1998. Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte, and embryo. *Molecular Reproduction and Development* **49**:435–443.
- Kölle S, Sinowatz F, Boie G, Totzauer I, Amselgruber W, Plendl J. 1996. Localization of the mRNA encoding the zona protein ZP3 $\alpha$  in the porcine ovary, oocyte and embryo by non-radioactive in situ hybridization. *Histochemical Journal* **28**:441–447.
- König J, Borrego-Pinto J, Streichert D, Munzig M, Lenart P, Müller-Reichert T. 2017. Analysis of cytokinesis by electron microscopy. *Methods in Cell Biology* **137**:225–238.
- Kudo K, Yonezawa N, Katsumata T, Aoki H, Nakano M. 1998. Localization of carbohydrate chains of pig sperm ligand in the glycoprotein ZPB of egg zona pellucida. *European Journal of Biochemistry* **252**:492–499.
- Kumar Kk, Reddy Gs, Reddy B, Shekar Pc, Sumanthi J, Chandra KIP. 2012. Biological role of lectins: A review. *Journal of Orofacial Sciences* **4**:21–25.
- Lakhtin V, Lakhtin M, Alyoshkin V. 2011. Lectins of living organisms. The overview. *Anaerobe* **17**:452–455.
- Lefièvre L et al. 2004. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reproduction* **19**:1580–1586. Oxford University Press.
- Lis H, Sharon N. 1986. Applications of Lectins. Pages 293–370 *The Lectins*. Academic Press.

- Lis H, Sharon N. 1998. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews* **98**:637–674.
- Loris R. 2002. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1572**:198–208.
- Lundy T, Smith P, O'Connell A, Hudson NL, McNatty KP. 1999. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* **115**:251–262.
- Manning JC, Romero A, Habermann FA, García Caballero G, Kaltner H, Gabius HJ. 2017. Lectins: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochemistry and cell biology* **147**: 199-222.
- Moor RM, Warner GM. 1978. Regulation of oocyte maturation in mammals. In: CRIGHTON, D. B. (eds.). *Control of Ovulation*. Butterworth. London. p. 159–176. ISBN: 0- 408-70924-3.
- McGaughey RW, Montgomery DH, Richter JD. 1979. Germinal vesicle configurations and patterns of polypeptide synthesis of porcine oocytes from antral follicles of different size, as related to their competency for spontaneous maturation. *Journal of Experimental Zoology* **209**:239–254.
- McGee EA, Hsueh AJW. 2000. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocrine Reviews* **21**:200–14.
- McLeskey SB, Dowds C, Carballada R, White RR, Saling PM. 1997. Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *International Review of Cytology* **177**:57–113.
- Mehlmann LM. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* **130**:791–799.
- Mendes MHAF, Pinto MHB, Gimeno EJ, Barbeito CG, Sant'Ana FJF. 2019. Lectin histochemical pattern on the normal and cystic ovaries of sows. *Reproduction in Domestic Animals*. **54**(10):1366-1374.
- Mishra A et al. 2019. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food and Chemical Toxicology* **134**: 110827.
- Miyano T. 2005. In vitro growth of mammalian oocytes. *Journal of Reproduction and Development* **51**:169–176.
- Mondadori RG, Luque MCA, Santin TR, Bão SN. 2007. Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. *Animal Reproduction Science* **97**:323–333.

- Moros-Nicolás C, Chevret P, Jiménez-Movilla M, Algarra B, Cots-Rodríguez P, González-Brusi L, Avilés M, Izquierdo-Rico MJ. 2021. New insights into the mammalian egg zona pellucida. *International Journal of Molecular Sciences* **22**:3226.
- Moros-Nicolás C, Leza A, Chevret P, Guillén-Martínez A, González-Brusi L, Boué F, Lopez-Bejar M, Ballesta J, Avilés M, Izquierdo-Rico MJ. 2018. Analysis of ZP1 gene reveals differences in zona pellucida composition in carnivores. *Reproduction, Fertility and Development* **30**:272–285.
- Mortimer D, Curtis EF, Miller RG. 1987. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *Journal of Reproduction and Fertility* **81**:127–135.
- Motlík J, Fulka J. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology* **198**:155–162.
- Nakano M, Yonezawa N. 2001. Localization of sperm ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins. *Cells Tissues Organs* **168**:65–75.
- Natchiar SK, Suguna K, Surokia A, Vijayan M. 2007. Peanut agglutinin, a lectin with an unusual quaternary structure and interesting ligand binding properties. *Crystallography Reviews*. **13**(1): 3-28
- Nizet, V., Varki, A., Aebi, M., 2017. Microbial lectins: hemagglutinins, adhesins, and toxins. In: *Essentials of Glycobiology* [Internet], third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Noguchi S, Nakano M. 1992. Structure of the acidic N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (PZP3) from porcine zona pellucida. *European Journal of Biochemistry* **209**:883–894.
- Ohtsubo K, Marth JD. 2006. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* **126**(5): 855-867
- Okabe M. 2018. Sperm-egg interaction and fertilization: Past, present, and future. *Biology of Reproduction* **99**:134–146.
- Otová B, Mihalová R, Bobková K. 2020. *Základy biologie a genetiky člověka*. Vydání druhé. Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, Praha.
- Parillo F, Stradaoli G, Dall’Aglia C, Verini-Supplizi A. 1996. Characterization of the complex carbohydrates in the zona pellucida of mammalian oocytes using lectin histochemistry. *Veterinary Research Communications* **20**:225–236.

- Paulini F, Silva RC, De Paula Rôlo JLJ, Lucci CM. 2014. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *Journal of Ovarian Research* **7**:1–12.
- Pepling ME, De Cuevas M, Sprading AC. 1999. Germline cysts: A conserved phase of germ cell development? *Trends in Cell Biology* **9**:257–262.
- Petrunkina AM, Volker G, Brandt H, Töpfer-Petersen E, Waberski D. 2005. Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. *Theriogenology* **64**:1766–1782.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology* **145**:27–37.
- Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society* **365**:1663-1678
- Prasad S V., Skinner SM, Carino C, Wang N, Cartwright J, Dunbar BS. 2000. Structure and function of the proteins of the mammalian zona pellucida. *Cells Tissues Organs* **166**:148–164.
- Praseptianga D. 2015. Algal Lectins and their Potential Uses. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology* **10**:89–98.
- Rabelo L, Monteiro N, Serquiz R, Santos P, Oliveira R, Oliveira A, Rocha H, Morais AH, Uchoa A, Santos E. 2012. A lactose-binding lectin from the marine sponge *Cinachyrella Apion* (cal) induces cell death in human cervical adenocarcinoma cells. *Marine Drugs* **10**:727–743.
- Rankin T, Dean J. 2000. The zona pellucida: Using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Reviews of Reproduction* **5**:114–121.
- Rath D, Töpfer-Petersen E, Michelmann HW, Schwartz P, Ebeling S. 2005. Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology* **63**:352–362.
- Rini JM. 1995. Lectin structure. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **24**:551–577.
- Sathananthan AH, Selvaraj K, Lakshmi Girijashankar M, Ganesh V, Selvaraj P, Trounson AO. 2006. From oogonia to mature oocytes: Inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microscopy Research and Technique* **69**:396–407.
- Sathananthan AH, Selvaraj K, Trounson A. 2000. Fine structure of human oogonia in the foetal ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology* **161**:3–8.

- Song XX, Yang XZ, Iga K, Niwa K. 1999. Binding of lectins to the zona pellucida of in vitro matured pig oocytes and sperm-oocyte interaction in vitro. *Journal of Mammalian Ova Research*. **16**(1): 23-30.
- Schultz RM, Letourneau GE, Wassarman PM. 1979. Program of early development in the mammal: Changes in the patterns and absolute rates of tubulin and total protein synthesis during oocyte growth in the mouse. *Developmental Biology* **73**:120–133. Academic Press.
- Scobie GA, Kerr LE, MacDuff P, Aitken RJ. 1999. Cloning, sequencing and site of origin of the rat sperm receptor protein, ZP3. *Zygote* **7**:25–35.
- Sharon N. 2008. Lectins: Past, present and future. *Biochemical Society Transactions* **36**:1457–1460.
- Sharon N, Lis H. 1990. Legume lectins — a large family of homologous proteins. *The FASEB Journal* **4**:3198–3208.
- Sharon N, Lis H. 2004. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **14**:53–62.
- Shibuya H, Watanabe Y. 2014. The meiosis specific modification of mammalian telomeres. *Cell Cycle* **13**:2024–2028.
- Shoubridge EA, Wai T. 2007. Mitochondrial DNA and the Mammalian Oocyte. *Current Topics in Developmental Biology* **77**:87–111. Academic Press.
- Singh RS, Bhari R, Kaur HP. 2010. Mushroom lectins: Current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology* **30**:99–126.
- Singh RS, Thakur SR, Bansal P. 2015. Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research. *Critical Reviews in Microbiology* **41**:77–88.
- Sinowatz F, Kölle S, Töpfer-Petersen E. 2001a. Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs* **168**:24–35.
- Sinowatz F, Töpfer-Petersen E, Kölle S, Palma G. 2001b. Functional morphology of the zona pellucida. *Anatomia, Histologia, Embryologia* **30**:257–263.
- Skinner SM, Mills T, Kirchick HJ, Dunbar BS. 1984. Immunization with zona pellucida proteins results in abnormal ovarian follicular differentiation and inhibition of gonadotropin-induced steroid secretion. *Endocrinology* **115**:2418–2432.
- Smitz JEJ, Cortvrindt RG. 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* **123**:185–202.

- Song X-X, Yang X-Z, Iga K, Niwa K. 1999. Binding of Lectins to the Zona Pellucida of In Vitro Matured Pig Oocytes and Sperm-Oocyte Interaction In Vitro. *Page Ova Res.* **16**(1): 23-30
- Spargo SC, Hope RM. 2003. Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family. *Biology of Reproduction* **68**:358–362.
- Stallock J, Molyneaux K, Schaible K, Knudson CM, Wylie C. 2003. The pro-apoptotic gene *Bax* is required for the death of ectopic primordial germ cells during their migration in the mouse embryo. *Development* **130**:6589–6597.
- Sun MJ, Zhu S, Li YW, Lin J, Gong S, Jiao GZ, Chen F, Tan JH. 2016. An essential role for the intra-oocyte MAPK activity in the NSN-to-SN transition of germinal vesicle chromatin configuration in porcine oocytes. *Scientific Reports* **6**:23555.
- Sun QY, Nagai T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development* **49**:347–359.
- Suzuki H, Yang X, Foote RH. 1994. Surface alterations of the bovine oocyte and its investments during and after maturation and fertilization in vitro. *Molecular Reproduction and Development* **38**:421–430.
- Székvölgyi L, Nicolas A. 2010. From meiosis to postmeiotic events: Homologous recombination is obligatory but flexible. *FEBS Journal* **277**:571–589.
- Takagi Y, Talbot NC, Rexroad JrCE, Pursel VG. 1998. Identification of pig primordial germ cells by immunocytochemistry and lectin binding. *Molecular Reproduction and Development*. **46** (4): 567 – 580.
- Takahashi K, Kikuchi K, Uchida Y, Kanai-Kitayama S, Suzuki R, Sato R, Toma K, Geshi M, Akagi S, Nakano M, Yonezawa N. 2013. Binding of Sperm to the Zona Pellucida Mediated by Sperm Carbohydrate-Binding Proteins is not Species-Specific in Vitro between Pigs and Cattle. *Biomolecules*. **3**(4):85-107
- Tanihara F, Nakai M, Kaneko H, Noguchi J, Otoi T, Kikuchi K. 2013. Evaluation of zona pellucida function for sperm penetration during in vitro fertilization in pigs. *Journal of Reproduction and Development* **59**:385–392.
- Teclé E, Gagneux P. 2015. Sugar-coated Sperm: Unraveling the Functions of the Mammalian Sperm Glycocalyx. *Mol Reprod Dev* **82**: 635–650
- Teixeira EH, Holanda E, Sousa Arruda FV, do Nascimento KS, Alves V, Shiniti C, da Silva BR, Holanda A, Sousa B. 2012. Biological Applications of Plants and Algae Lectins: An Overview. Pages 533–558 *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*.



- Töfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Tsołova M. 2008. Glycobiology of fertilization in the pig. *International Journal of Developmental Biology* **52**:717–736.
- Töpfer-Petersen E. 1999. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Human Reproduction Update* **5**:414–421.
- Toth TL, Stavroula Baka MdG, Veeck LL, Howard Jones MW, Muasher S, Lanzendorf SE. 1994. Fertilization and in vitro development of cryopreserved human prophase loocytes\*. *FERTILITY AND STERILITY* **61**:891–894.
- Tumova L, Zigo M, Sutovsky P, Sedmikova M, Postlerova P. 2021. Ligands and receptors involved in the sperm-zona pellucida interactions in Mammals. *Cells* **10**:133.
- Vaamonde D, du Plessis SS, Agarwal A. 2016. Exercise and human reproduction: Induced fertility disorders and possible therapies. Page Exercise and Human Reproduction: Induced Fertility Disorders and Possible Therapies. Springer, New York.
- Vacek Z. 2006. Embryologie: učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka. Grada, Praha.
- Van Den Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* **63**:1717–1751. Elsevier Inc.
- Vanderhyden B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **7**:2006–2022.
- Vanroose G, Nauwynck H, Soom A Van, -Thérèse Ysebaert M, Charlier G, Van Oostveldt P, De Kruif A. 2000. Structural Aspects of the Zona Pellucida of In Vitro-Produced Bovine Embryos: A Scanning Electron and Confocal Laser Scanning Microscopic Study 1. 463 *BIOLOGY OF REPRODUCTION* **62**:463–469. Available from <http://www.biolreprod.org>.
- Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. 2009. *Essentials of Glycobiology* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY) ISBN 978-0-87969-770-9.
- Varrot A, Basheer SM, Imberty A. 2013. Fungal lectins: structure, function and potential applications. *Current Opinion in Structural Biology* **23**:678–685. Elsevier Current Trends.
- Velásquez JG, Canovas S, Barajas P, Marcos J, Jiménez-Movilla M, Gallego RG, Ballesta J, Avilés M, Coy P. 2007. Role of sialic acid in bovine sperm-zona pellucida binding. *Molecular Reproduction and Development* **74**:617–628.

- 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 Y, Lv C, Huang HL, Zeng MH, Yi DJ, Tan HJ, Peng TL, Yu WX, Deng HW, Xiao HM. 2019. Influence of mouse defective zona pellucida in folliculogenesis on apoptosis of granulosa cells and developmental competence of oocytes. *Biology of Reproduction* **101**:457–465.
- Wassarman Pm. 1988. The Mammalian Ovum In: *The Physiology Of Reproduction*. Eds. Knobil E. A Neill J., Raven Press Ltd., New York. 69–102
- Wassarman PM, Albertini DF. 1994. The Mammalian Ovum, In: Knobil E, Neil J, et al. (Ed): *The Physiology Of Reproduction*, 2. Vydání. Raven Press, New York
- Wassarman PM, Jovine L, Qi H, Williams Z, Darie C, Litscher ES. 2005. Recent aspects of mammalian fertilization research. *Molecular and Cellular Endocrinology* **234**:95–103.
- Wassarman PM, Litscher ES. 2012. Influence of the zona pellucida of the mouse egg on folliculogenesis and fertility. *International Journal of Developmental Biology* **56**:833–9.
- Wassarman PM, Litscher ES. 2013. Biogenesis of the Mouse Egg's Extracellular Coat, the Zona Pellucida. *Current Topics in Developmental Biology* **102**:243–266.
- Wassarman PM, Mortillo S. 1991. Structure of the Mouse Egg Extracellular Coat, the Zona Pellucida. *International Review of Cytology* **130**:85–110.
- Wiederschain GYa. 2009. Essentials of glycobiology. *Biochemistry (Moscow)* **74**:1056.
- Wilkins AS, Holliday R. 2009. The evolution of meiosis from mitosis. *Genetics* **181**: 3-12.
- Wu AM, Wu JH, Singh T, Lai LJ, Yang Z, Herp A. 2006. Recognition factors of *Ricinus communis* agglutinin 1 (RCA1). *Molecular Immunology* **43**:1700–1715.
- Yanagimachi R. Mechanisms of Fertilization in Mammals. In: MASTROIANNI, Luigi a John D. BIGGERS, ed. *Fertilization and Embryonic Development In Vitro* [online]. Boston, MA: Springer US, 1981, s. 81-182 [cit. 2023-08-09]. ISBN 978-1-4684-4018-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4684-4016-4\_6
- Yanagimachi R. 2022. Mysteries and unsolved problems of mammalian fertilization and related topics. *Biology of Reproduction* **106**:644–675.
- Yonezawa N, Kanai-Kitayama S, Kitayama T, Hamano A, Nakano M. 2012. Porcine zona pellucida glycoprotein ZP4 is responsible for the sperm-binding activity of the ZP3/ZP4 complex. *Zygote* **20**:389–397.

- Yonezawa N, Mitsui S, Kudo K, Nakano M. 1997. Identification of an N-glycosylated region of pig zona pellucida glycoprotein ZPB that is involved in sperm binding. *European Journal of Biochemistry* **248**:86–92.
- Yonezawa N. 2014. Posttranslational modifications of zona pellucida proteins. *Posttranslational Protein Modifications in the Reproductive System*. 111-140
- Zamboni L. 1970. Ultrastructure of mammalian oocytes and ova. *Biology of reproduction*. Supplement **2**:44–63.
- Zhang M, Xia G. 2012. Hormonal control of mammalian oocyte meiosis at diplotene stage. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**:1279–1288.
- Zhang Z, Shangguan T, Li YY, He W. 2018. Infertility due to lack of zona pellucida caused by a compound heterozygous mutation in ZP1 gene. *Reproductive and Developmental Medicine* **2**:183–186.
- Zhou Z et al. 2019. Novel mutations in ZP1, ZP2, and ZP3 cause female infertility due to abnormal zona pellucida formation. *Human Genetics* **138**:327–337.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

AA	amino acid; aminokyselina
ACR	akrosin
APz	adhezni protein z
AR	akrozomální reakce
AQN	spermadhezin
AWN	spermadhezin
Ca <sup>2+</sup>	vápenaté ionty
CO	<i>cumulus oophorus</i> ; vejconosný hrbolek
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
ConA	Konkanavalin A
Cys	cystein
CFCS	consensus furin cleavage site; místo konsenzuálního furinového štěpení
CRD	carbohydrate recognition/binding domain
DNA	deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSH	folikulostimulační hormon
GA	Golgiho aparát
Gal	galaktóza
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
GlcNac	N-acetylglukossamin
GnRH	gonadotropin releasing hormon
GTP	guanosintrifosfát
GV	germinal vesicle; zárodečný váček
GV1- GV4	fáze rozpadu zárodečného váčku
GVBD	germinal vesicle break down; rozpad zárodečného váčku
KO	knock-out
LCA	<i>Lens culinaris</i>
LH	luteinizační hormon
Man	manóza
MI	stádium prvního meiotického dělení
MII	stádium druhého meiotického dělení
Mn <sup>2+</sup>	hořečnaté ionty
PBS	phosphate boffer salie; fosfátový pufr
PGC	primordial germ cells; primordiální zárodečné buňky
PGCs	prekurzory zárodečných buněk
PNA	<i>Peanut agglutinin</i>
PSP	spermadhezin
PVA	polyvinylalkohol
RCA	<i>Ricinus communis agglutinin</i>
RNA	ribonucleic acid; ribonukleová kyselina
Sia	sialová kyselina
TMD	transmembrane-like domain; transmembráně podobná doména

WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>
ZAN	zonadhezin
ZP	<i>zona pellucida</i>
ZPA, ZPB, ZPC	podskupiny genů pro glykoproteiny ZP
ZP1 - ZP4	zonální glykoproteiny