

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



Vývoj metody stanovení relativní exprese genů CD9 a CD81 kódujících tetraspaninové proteiny ve varleti a nadvarleti koně domácího s využitím termocykleru LightCycler® Nano (Roche)

Diplomová práce

Anna Bílková

Reprodukční biotechnologie

doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vývoj metody stanovení relativní exprese genů CD9 a CD81 kódujících tetraspaninové proteiny ve varleti a nadvarleti koně domácího s využitím termocykleru LightCycler® Nano (Roche)" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 23.7. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za odborné vedení mé diplomové práce, pomoc při zpracování dat a za mnoho cenných rad v průběhu výzkumu. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martině Melounové, Ph.D. a Ing. Daniele Čílové za vedení a pomoc při laboratorní práci.

Vývoj metody stanovení relativní exprese genů CD9 a CD81 kódujících tetraspaninové proteiny ve varleti a nadvarleti koně domácího s využitím termocykleru LightCycler® Nano (Roche)

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá metodikou stanovení relativní exprese genů CD9 a CD81 ve varleti a nadvarleti koně domácího. Tyto geny kódují tetraspaninové proteiny, které jsou exprimovány v různých tkáních živočišných organismů. CD9 a CD81 jsou transmembránové proteiny s řadou funkcí, ať už jde o funkce fyziologické, tak i patologické.

Analýza exprese genů CD9 a CD81 byla provedena u vzorků pěti jedinců koně domácího, které byly odebrány veterinárním lékařem ve dvou biologických replikátech. Studována byla exprese genů v tkáni *testes* a ve všech morfologických částech *epididymis*, tedy *caput*, *corpus* a *cauda epididymis*. Z tkání byla izolovaná RNA pomocí metody vazebných kolonek, které na sebe naváží RNA z lyzátu. Izolovaná RNA byla zmrazena v kapalném dusíku a skladována při teplotě -80°C . Izolace RNA touto metodou proběhla bez obtíží. Výsledná RNA neměla tendence degradovat a neobsahovala kontaminanty.

Bylo navrženo pět párů primerů pro každý CD gen (F1/R1 až F5/R5) a jeden pár primerů pro house keepingový gen β -aktin. Tyto primery byly testovány, dle stanovených požadavků. Byla hodnocena specifita amplifikace pomocí elektroforetického testu, sekvenace amplikonů, byla stanovena teplota tání produktu qRT-PCR a hodnota eficienty CD genů a house keepingového genu. Pro gen CD9 byl použit primerový pár F4/R4 a pro gen CD81 primerový pár F2/R2, jelikož nejlépe splňovaly dané požadavky.

Cílem práce bylo zjistit, který z faktorů (gen, typ tkáň, jedinec, biologický replikát) má vliv na expresi daných CD genů. Vyhodnocení bylo provedeno metodou stanovení relativní exprese genů CD9 a CD81 pomocí qRT-PCR. Ke statistickému vyhodnocení byla stanovena hodnota $\text{Ratio } \Delta\text{C}_q$, která byla vztažena k house keepingovému genu β -aktin (ACTB). Z výsledků práce vyplývá, že faktor, který ovlivňuje míru exprese je tkáň a gen. Gen CD81 se více exprimoval v *testes* a gen CD9 se exprimoval více v *epididymis* koně domácího. Oba geny se nejméně exprimovaly v *cauda epididymis*. Srovnání s výsledky dalších autorů je složité. Řada autorů se soustředí na detekci proteinů na spermii, a nikoliv na expresi genů CD ve varlatech a nadvarletech, přesto, že jsou spermie transkripčně neaktivní. Dalším problémem je fakt, že studie exprese CD9 a CD81 u koně domácího nebyla dosud publikována. Nicméně, přes značnou variabilitu napříč modelovými druhy, výsledky odpovídají studiím, které tyto proteiny detekovaly na spermii ve varleti a nadvarleti.

V průběhu toho dvouletého výzkumu databáze Ensembl publikovala informace o třech transkripčních variantách genu CD81. Na základě těchto informací doporučuji vývoj dalších expresních markerů, které odliší tyto tři transkripční varianty a budou tedy navrženy do exonů, kterými se tyto tři transkripční varianty liší.

Řešení diplomové práce bylo podpořeno projekty GA FAPPZ Studium geneticky podmíněných vlastností s využitím molekulárně-genetických, bioinformatických a statistických metod (SV20-9-21360), Molekulární analýza nukleových kyselin rostlin a živočichů a možnosti jejího hodnocení s využitím metod bioinformatiky a biostatistiky (SV19-07-21360) a projektu

CIGA Zlepšení mrazitelnosti hřebčích spermií přidáním proteinů semenné plazmy do kryokonzervačního média (2018200).

Klíčová slova: kůň domácí, *Equus caballus*, geny CD9 a CD81, tetraspaniny, exprese, qRT-PCR, sekvenace

Development of a method for determining the relative expression of CD9 and CD81 genes encoding tetraspanin proteins in the testis and epididymis of a domestic horse using the LightCycler® Nano (Roche) thermocycler

Summary

This diploma thesis dealt with the methodology of determining the relative expression of CD9 and CD81 genes in the testis and epididymis of a domestic horse. These genes encode tetraspanin proteins that are expressed in various tissues of animal organisms. CD9 and CD81 are transmembrane proteins with a number of functions, both physiological and pathological.

Analysis of CD9 and CD81 gene expression was performed on samples from five domestic horses that were collected by a veterinarian in two biological replicates. The expression of genes in the tissue tested on all morphological parts of the *epididymis*, ie *caput*, *corpus* and *cauda epididymis*, was studied. RNA was isolated from the tissues using binding columns, which bind RNA from the lysate. Isolated RNA was frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. RNA isolation was performed without any difficulties. Isolated RNA did not tend to degrade and contained no contaminants.

Five primer pairs were designed for each CD gene (F1/R1 to F5/R5) and one primer pair for the housekeeping gene β -actin. These primers have been tested in compliance with set requirements. The specificity of the amplification was evaluated by means of an electrophoretic assay, sequencing of the amplicons, the melting temperature of the qRT-PCR product and the efficiency value of the CD genes and the housekeeping gene were determined. The F4/R4 primer pair was used for the CD9 gene and the F2/R2 primer pair for the CD81 gene, as they met the requirements accordingly.

The goal of this study was to find out, which of the factors (gene, tissue type, individual, biological replicate) affects the expression of given CD genes. Evaluation was conducted by determining the relative expression of the CD9 and CD81 genes by qRT-PCR. For statistical evaluation, the Ratio Δ Cq value was determined with regard to the β -actin housekeeping gene (ACTB). From the results, it can be concluded that the factors affecting the level of gene expression are tissue and gene. The CD81 gene was expressed more in the *testes* and CD9 gene was expressed more in the *epididymis* of the domestic horse. The lowest level of expression for both genes was measured in the *cauda epididymis*. Comparison with results from other authors is difficult. Many authors focus on the detection of proteins in sperm membrane, not on the expression of CD genes in *testes* and epididymis, even though sperm cells are transcriptionally inactive. Another issue is that there have been no publications about the expression of CD9 and CD81 in the domestic horse so far. Nevertheless, despite considerable variability across model species, our results are in agreement with the results from published research, that detected these proteins in sperm in the *testis* and *epididymis*.

During this two-year study, the Ensembl database published information on three transcriptional variants of CD81. Based on this information, I recommend the development of more expression markers, which differentiate these three transcriptional variants and will therefore be designed into specific exons, which are different in each variant.

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

Keywords: domestic horse, *Equus caballus*, CD9 and CD81 genes, tetraspanins, expression, qRT-PCR, sequencing

Obsah

1	Úvod	1
2	Vědecké hypotézy a cíle práce.....	2
3	Literární řešerše.....	3
3.1	Kůň domácí (Equus caballus Linnaeus, 1758)	3
3.2	Reprodukce klisen	3
3.2.1	Sezónnost a estrální cyklus klisen	3
3.3	Reprodukce hřebců.....	4
3.3.1	Anatomie samčích reprodukčních orgánů	4
3.3.2	Stavba spermie	7
3.3.3	Spermatogeneze	9
3.4	Vazba spermie a oocytu	12
3.4.1	Kapacitace.....	12
3.4.2	Akrozomální reakce.....	13
3.4.3	Vybrané proteiny účastníci se fúze gamet: CD9, CD81, Izumo 1, Juno ..	14
3.5	Struktura Genů CD9 a CD81 u koně domácího.....	19
3.6	Tetraspaniny	20
3.6.1	Struktura tetraspaninů	20
3.6.2	Funkce tetraspaninů	22
3.6.3	CD proteiny.....	23
3.6.4	Expres proteinů CD9 a CD81 mimo reprodukční soustavu.....	24
3.7	PCR.....	25
3.7.1	Primery.....	26
3.7.2	qRT-PCR	27
3.7.3	Fluorescenční analýza SYBR Green I	27
3.7.4	Reverzní transkripce	28
3.7.5	Genová exprese.....	29
3.7.6	Vyhodnocení míry exprese genů	29
4	Metodika	31
4.1	Biologický materiál	31
4.2	Izolace RNA ze vzorků varlete a nadvarlete.....	31
4.2.1	Příprava materiálu.....	31
4.2.2	Izolace RNA	32
4.2.3	Výpočet výtěžnosti izolované RNA	32
4.3	Reverzní transkripce.....	33
4.4	Navrhování primerů	33
4.4.1	Pozice primeru v referenčním genomu koně domácího	33

4.5	qRT-PCR	38
4.6	Výběr primeru pro vlastní analýzy	38
4.6.1	Ověření specifčnosti amplikonů pomocí analýzy teploty tání.....	38
4.6.2	Ověření specifčnosti amplikonů pomocí elektroforézy.....	39
4.6.3	Výběr primerů na základě eficiency	39
4.6.4	Sekvenační analýza.....	39
4.7	Stanovení parametru Ratio ΔCq	40
4.8	Statistické zpracování výsledků	40
5	Výsledky.....	41
5.1	Kvantifikace totální RNA	41
5.2	Testování navržených primeru	42
5.2.1	Elektroforetický test specifčnosti amplifikace.....	42
5.2.2	Hodnoty eficiency reakce.....	44
5.2.3	Specifita amplifikace pomocí vyhodnocení křivek tání	44
5.2.4	Sekvenace amplikonů	45
5.2.5	Výběr primerů.....	52
5.3	qRT-PCR – vyhodnocení relativní exprese CD9 a CD81	52
5.4	Statistické šetření	52
1.1.1	Test normality dat	52
5.4.1	Hodnocení variability tkání, biologických replikátů, hřebců a genů.....	54
6	Diskuze.....	59
6.1	Biologický materiál	59
6.2	Metodika izolace RNA	59
6.3	Výtěžnost izolované RNA	60
6.4	Návrh a výběr primerů.....	60
6.5	Přepis RNA do cDNA a qRT-PCR	61
6.6	Relativní exprese CD9 a CD81.....	62
6.6.1	House keepingové geny	62
6.6.2	Úloha proteinů CD9 a CD81 ve vazbě spermie-oocyt	62
6.6.3	Expresa CD9 a CD81 ve spermích a varlatech savců.....	63
6.7	Závěr.....	66
7	Zdroje.....	67

1 Úvod

Oplodnění je velmi složitý proces, k němuž dochází, když se spermie a vajíčko vzájemně rozpoznají a fúzí, za účelem vzniku nového, geneticky odlišného jedince (Gadella et al. 2001; Okabe 2013). Aby spermie byla schopná oplodnit vajíčko, musí projít řadou modifikací v průběhu procesu zrání ve varlatech, nadvarlatech a vývodných pohlavních cestách (Asquith et al. 2004; Caballero et al. 2013). V okamžiku ejakulace se do samičího reprodukčního traktu uvolní miliony spermií, které prodělají řadu morfologických a fyziologických změn, zejména na povrchu membrány. V nehostinném prostředí přicházejí spermie do kontaktu s tisíci buňkami, které ignorují a putují k cíli, jímž je oocyt (Nixon et al. 2007; Bianchi et al. 2014).

Vazba spermie a oocytu není dosud zcela popsána a je zapříčiněna řadou adhezních a fúzních proteinů na povrchu obou gamet. Tyto vynikající rozpoznávací schopnosti, které jsou specifické pro různé buňky a druhy, patří mezi strategicky nejdůležitější buněčné interakce v biologii. Pochopení těchto molekulárních mechanismů je velmi důležité pro porozumění procesu oplození, a s tím související léčbě neplodnosti lidí i zvířat (Nixon et al. 2007; Jankovičová et al. 2020).

Je prokázáno, že tetraspaninové proteiny CD9 a CD81 jsou velmi důležité pro membránovou interakci během oplození (Jankovičová et al. 2020). Tetraspaniny jsou zapojeny do mnoha buněčných mechanismů (Hemler 2001). Mají významnou roli během různých zásadních patologických i fyziologických dějů v těle, jakými jsou: infekce, rakovinné bujení, fertilizace a řada dalších (van Spriell & Figdor 2010; Hemler 2014; Frolíková et al. 2018). Mohou interagovat s řadou dalších proteinů, jako jsou integriny, členy superrodiny imunoglobulinů, proteázy, a jsou schopni se propojit mezi sebou a vytvořit síť (Hemler 2001).

Dosud byla uskutečněna řada studií popisujících expresi CD9 a CD81 využívající modelu myši, skotu a člověka a velmi málo studií se zabývalo expresí mRNA těchto proteinů ve varleti a nadvarleti savců (Nixon et al. 2007; Ito et al. 2010; Jankovičová et al. 2015; Frolíková et al. 2018). Avšak žádná studie se nevěnovala expresi těchto genů ve varlatech a nadvarlatech koní. Spermie jsou transkripčně neaktivní, tudíž schopnost fertility získávají při průchodu varletem a nadvarletem díky postraslačním úpravám, modifikacím membrány a molekulám, které získají z epididymální tekutiny (Jervis & Robaire 2001; Galti et al. 2004; Caballero et al. 2013). Expresie proteinů ve varleti a nadvarleti, případně v přídatných pohlavních žlázách, je velmi důležitá k pochopení mechanismu vazby spermie a oocytu.

Cílem této práce bylo zvolit vhodnou metodu pro detekci exprese genů CD9 a CD81 ve varlatech a nadvarlatech koně domácího a zjistit, který z faktorů má vliv na míru exprese těchto genů. Byla popsána problematika CD81 a CD9 během fertilizace a porovnání s ostatními modely.

2 Vědecké hypotézy a cíle práce

1. U genů CD9 a CD81 lze předpokládat bazální expresi. Množství transkribované mRNA těchto genů bude dostatečné pro detekci metodou qRT-PCR s využitím SYBR Green barviva (Roche).
2. U genů CD9 a CD81 koně domácího byla popsána pouze jedna transkripční varianta. Lze předpokládat, že tato varianta bude exprimována ve varleti či nadvarleti.
3. Lze předpokládat, že varle a nadvarle budou vykazovat odlišnou relativní transkripci genů CD9 a CD81.
4. Navržené dvojice PCR primerů budou vhodné pro potvrzení specifčnosti amplifikace pomocí sekvenace.

Cílem práce je ověřit platnost výše uvedených hypotéz. Na základě studia vědecké literatury bude zpracována ucelená literární rešerše. Bude provedena bioinformatická analýza genů CD9 a CD81 koně domácího s cílem identifikovat exonové oblasti. Budou navrženy primerové páry umístěné v jednotlivých exonech genů CD9 a CD81 vhodné pro následné stanovení relativní exprese metodou qRT-PCR s využitím SYBR Green barviva (Roche). Bude vybrán vhodný "house keeping" gen. Bude získána cDNA z varlete a z různých oblastí nadvarlete 5 hřebců. Z každé tkáně budou hodnoceny 2 biologické replikáty. Bude provedeno statistické vyhodnocení experimentů.

3 Literární rešerše

3.1 Kůň domácí (*Equus caballus* Linnaeus, 1758)

3.2 Reprodukce klisen

3.2.1 Sezónnost a estrální cyklus klisen

Klisy jsou sezónně polyestrická zvířata, což znamená, že během rozmnožovacího období prodělají více estrálních cyklů (Graham et al. 2011). Estrální cyklus je definován jako období od jedné ovulace k následující, kdy během ovulace jsou hladiny progesteronu na nejnižší úrovni (Blanchard et al. 1998). V rámci estrálních cyklů, dochází k řadě řízených anatomických a hormonálních změn, včetně změn v chování, které mají za účel vyvrcholit v ovulaci. Asi 20 % klisen je schopno ovulovat i během zimního období, nicméně většina klisen potřebuje k úspěšné ovulaci dlouhé dny jara, léta, případně brzkého podzimu. Postupným zkracováním dne a fotoperiody se snižuje počet cyklů a úspěšných ovulací. Nejlepší aktivita vaječníků se odhaduje kolem 15-16h délky fotoperiody, což odpovídá letnímu období. Roční cyklus klisny se rozděluje na dvě období. Od první ovulace na jaře do poslední ovulace na podzim se mluví o ovulační fázi a druhá fáze je označena jako zimní anestrus. Obě období rozdělují přechodné fáze (Graham et al. 2011).

Účinek zkracujícího se nebo prodlužujícího se dne má vliv na epifýzu a hormon melatonin, přičemž během zimních měsíců je produkce melatoninu vysoká. Melatonin má inhibiční účinek na GnRH (gonadotropin-releasing hormon) z hypotalomu, který stimuluje produkci FSH (folikuly stimulující hormon) a LH (luteinizační hormon) z hypofýzy, který řídí hormonální aktivitu na vaječnicích (Graham et al. 2011). FSH je zodpovědné za *recruitment* folikulů (růst skupiny primordiálních folikulů) a LH zodpovídá za zrání folikulů, produkci estrogenu folikuly, ovulaci a luteinizaci žlutého tělíska (CL). Pravidelný estrální cyklus se pak opírá o rovnováhu mezi hypotalamem, epifýzou, hypofýzou, vaječnicí a endometriem, ze kterého se uvolňuje prostaglandin rozrušující CL, pokud nedojde k oplození (Blanchard et al. 1998).

V průběhu zimního anestru je děloha klisen atonická, suchá, s tenkou děložní stěnou, děložní čípek je uvolněný a vaječnící jsou malé, pevné s minimální folikulární aktivitou. Hladiny LH i progesteronu jsou nízké a FSH kolísají v rámci nepravidelných folikulárních vln. S prodlužujícími dny jara, a snižující se hladinou melatoninu, se na vaječnicích objevují folikuly různé velikosti. Folikuly produkují estrogény, ale nikoliv v dostatečném množství, aby ovlivnily GnRh a LH, a proto zatím nedochází k ovulaci. Hladina FSH začíná brzy stoupat a zhruba od 15. dne před první ovulací má klesající tendenci. Zatímco LH hladina je zprvu nízká, několik dnů před ovulací se zvyšuje až do peaku kolem ovulace. S postupným prodlužováním dne a přibýváním FSH a LH se folikul vyvine do finálního terciálního folikulu a ovuluje, čímž začne ovulační fáze. Po první ovulaci následují pravidelné ovulace po zbytek rozmnožovací sezóny (Graham et al. 2011).

3.3 Reprodukce hřebců

Orgány zodpovídající za hormonální a neurální funkci samčí reprodukční soustavy jsou: hypotalamus, hypofýza, epifýza, vomeronasální orgán a varlata. Vliv epifýzy není tak výrazný jako u klisen, jelikož hřebec produkuje sperma napříč celým rokem bez vlivu délky fotoperiody. Nicméně vliv sezónnosti se projevuje na velikosti jeho varlat, objemu a kvalitě ejakulátu, libidu a koncentraci hormonů, přičemž nejlepších hodnot dosahuje na jaře a v létě (Burns et al. 2011).

Pro správné fungování reprodukčního systému hřebce jsou důležité čichové, zrakové a hmatové vjemy. Při předvedení říjné klisny před hřebce vzroste koncentrace GnRH a LH díky flémování. Flémování spočívá v nasátí klisních feromonů přes vomeronasální žlázy, které zprostředkovávají čichové informace k hypotalamu. GnRH v hypofýze ovlivňuje uvolňování LH a FSH, které řídí spermatogenezi a tvorbu steroidů. LH reguluje Leydigovy buňky varlat, které produkují steroidní hormony testosteron, estrogen a dihydrotestosteron. Tyto steroidní hormony jsou důležité pro normální průběh spermatogeneze, ovlivňují libido a přídatné pohlavní žlázy samce. Současně estrogen a testosteron zpětnou vazbou ovlivňují uvolňování LH. FSH ovlivňuje Sertolihovy buňky, a tím produkci různých sloučenin důležitých pro vývoj spermií a tvorbu steroidních hormonů, jako je například inhibin a activin, které se vrací zpět do hypofýzy, kde ovlivňují množství uvolňovaného FSH (Burns et al. 2011).

Hřebci mají často psychologické problémy a problémy s chováním. Různé nemoci či nedostatky v chovu se pravděpodobně odrazí na reprodukční schopnosti daného hřebce, i když na první pohled s reprodukcí vůbec nesouvisí. Existuje řada nemocí, které, pokud nejsou léčeny, jsou schopny ukončit uchovnění daného hřebce (Burns et al. 2011).

3.3.1 Anatomie samčích reprodukčních orgánů

3.3.1.1 Varle (*testes*)

Varlata hřebce jsou hmatatelná jako dvě oválné struktury horizontálně uložené v šourku (Marvan et al. 1998; Burns et al. 2011). Velikostně varlata dosahují 10-12 cm a váží 400-600 g (Marvan et al. 1998). Varle je hladké a je pokryto vrstvou hustého kolagenu a hladkého svalstva zvanou bělavý obal (*tunica albuginea*), který je bohatě krven. Na bělavém obalu leží poševní obal (*tunica vaginalis*), což je rozšířená část pobřišnice lemující šourek. Mezi oběma vrstvami je tenká vrstva tekutiny vyplňující vaginální dutinu, jejíž funkcí je bezproblémový hladký pohyb varlat v šourku (Lopate et al. 2003; Burns et al. 2011). Bělavý obal prorůstá do parenchymu varlete a tvoří vazivovými přepážkami lalůčky (Burns et al. 2011). Lalůčky mají jehlanovitý tvar s širokou bází obrácenou k bělavému obalu (Marvan et al. 1998). Centrálně se vazivové přepážky spojují do středového vaziva varlete zvaného *mediastimum* (Marvan et al. 1992; Sláma et al. 2015). V každém lalůčce je stočeno několik (2-4) semenotvorných kanálků, což vytváří zrnitou strukturu (Sláma et al. 2015). Kanálky jsou lemovány svalovými buňkami a fibroblasty pro usnadnění pohybu spermií. Intersticiální tkáň obsahuje pojivovou tkáň, nervy, krevní a lymfatické cévy (Lopate et al. 2003). Semenotvorné kanálky začínají slepě v periférii lalůčky a různě se propojují. Spojením semenotvorných kanálků lalůčky vzniká krátký přímý kanálek (Marvan et al. 1998).

Autonomní inervace varlat hraje hlavní roli při regulaci močopohlavních funkcí. Její funkce je vysoce organizovaná, zajišťuje ukládání a uvolňování moči z močového měchýře, reguluje transport a skladování spermií v reprodukčním traktu a koordinuje sekreci přídatných pohlavních žláz samce (Ricker et al. 1996; Hafez & Hafez 2000). Pro správný vývoj spermií je nutno spermiím zajistit teplotu o 4-6 °C nižší, než je teplota těla, což zabezpečují svaly, které zvedají varle blíže k tělu, když je chladno. Dále k termoregulaci pomáhá žilní systém varlete a kůže šourku s minimálním obsahem tuku a současně s mnoha potními žlázami (Lopate et al. 2003). U pohlavně nevyspělých hřebců jsou varlata menší a jejich semenotvorné kanálky jsou úzké s jednou řadou nediferenciovaných buněk (Marvan et al. 1998).

Při narození obsahují varlata velmi málo Leydigových, Sertoliho i zárodečných buněk (Lopate et al. 2003). Před pubertou, u hříbat kolem 6 měsíců, se kanálky rozšiřují, již obsahují lumen a ve vazivu začínají oddělující se kanálky diferencovat intersticiální buňky produkující hormony. Také dochází k diferenciaci Sertoliho a Leydigových buněk a začíná nedokonalá spermatogeneze (Marvan et al. 1998; Sláma et al. 2015). U hřebců kolem 9 měsíců se zvyšuje koncentrace LH a FSH (Lopate et al. 2003). V době pohlavní dospělosti hřebce (12-18 měsíců) jsou kanálky vystlány zárodečným epitelem. Vícevrstevný zárodečný neboli spermatogenní epitel nasedá na bazální membránu a jeho součástí jsou Leydigovi a Sertoliho buňky (Marvan et al. 1998; Lopate et al. 2003; Sláma et al. 2015).

3.3.1.1.1 Leydigovi a Sertoliho buňky

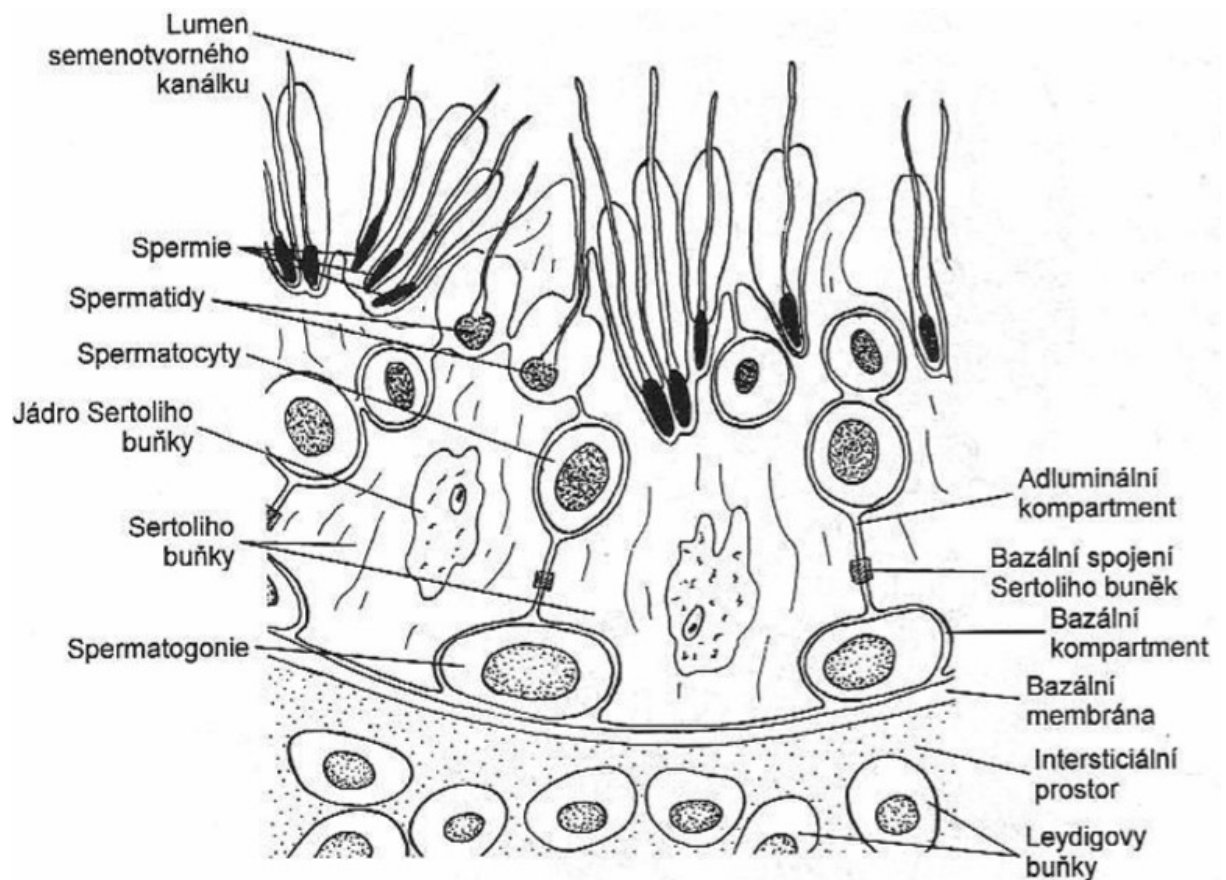
Leydigovi buňky jsou nerovnoměrně rozprostřeny mezi semenotvornými kanálky a jejich funkcí je syntéza a vylučování pohlavních hormonů, zejména testosteronu a dihydrotestosteronu, do varlat a lymfatických cév (Hafez & Hafez 2000; Lopate et al. 2003). Pohlavní hormony usnadňují produkci spermií a podporují samčí libido, chování a samčí vzhled (Lopate et al. 2003). Leydigovi buňky mají polyedrický tvar, jejich cytoplazma obsahuje bílkovinné krystalky a tukové kapénky (Marvan et al. 1998).

Podpůrné Sertoliho buňky jsou v zárodečném epitelu rozloženy nerovnoměrně (Marvan et al. 1998). Se začínající pubertou se diferencující zárodečné buňky z celkové cirkulace (Yzama et al. 1988). Jsou propojeny *gap junction* spoji, čímž vytváří jakousi bariéru mezi zárodečnými buňkami a imunitním systémem. Narušení této bariéry může mít za následek neplodnost, jelikož imunitní systém koně by vyvíjející se spermie označil jako antigenní buňky a zničil by je (Lopate et al. 2009). Stejně tak bariéra slouží k zamezení vstupu spermií do *instersticia* (Reece 2010). Sertoliho buňky jsou velké, vysoké, členité buňky, nasedají na bazální membránu a dosahují až k lumenu kanálku (Obrázek 1). Jádro je tmavé se zřetelným jadérkem, zbytek cytoplazmy je rozptýlený a okraje buňky neohrazené (Hafez & Hafez 2000). Četné výběžky Sertoliho buněk obklopují dutinky, ve kterých se zárodečné buňky nachází (Sláma et al. 2015). Výběžky Sertoliho buněk jsou v těsné blízkosti všech vývojových stádií, aby byl možný jejich ochranný a výživující smysl (Obrázek 1) (Reece 2010). Jejich funkcí je produkce proteinů usnadňující produkci spermií, zodpovídají za výživu, fagocytují produkty spermatogenních buněk, jsou i jejich důležitou oporou a podílejí se na vývoji a diferenciaci spermatid (Marvan et al. 1998; Lopate et al. 2003).

Díky Sertoliho buňkám se semenotvorné kanálky rozdělují do dvou částí (kompartmentů). Bazální kompartment je vnější bazální část, která umožňuje kontakt s intersticiální tekutinou a poskytuje prostor pro zárodečné buňky. Adluminální kompartment

je vnitřní část, ve které jsou mezi Sertoliho buňkami mezery pro komunikaci s centrálním lumen kanálku. Dělení spermatogonií v bazálním oddílu kanálku umožňuje obměnu buněk, které jsou nuceny projít přes spoje Sertoliho buněk na cestě do lumen kanálku. Během tohoto procesu dochází k diferenciaci a meioze do finální podoby spermií (Reece 2010).

V průběhu rozmnožovací sezóny se zvýší počet produkováných spermií, i počet Sertoliho a Leydigových buněk. S rostoucím věkem počet Sertoliho buněk klesá v souvislosti s degenerací varlat. Spermie opouštějí kanálky do *rete testis* (sít' kanálků na zadní straně varlete), pak do vývodných (eferentních) kanálků, které se vyplavují do hlavy nadvarlete. Spermie dozrávají postupně v nadvarleti, a než dojde k ejakulaci, jsou uloženy v ocasu nadvarlete (Lopate et al. 2003).



Obrázek 1. Schéma semenotvorného kanálku (Reece 2010).

3.3.1.2 Nadvarle (*epididymis*)

Nadvarle má za funkci dozrávání a skladování spermií a je volně připojeno k varleti (Lopate et al. 2003). Nadvarle začíná v části, kde do varlete vstupují cévy a nervy (Reece 2010). Popisují se tři anatomické části, kterými je hlava (*caput*), tělo (*corpus*) a ocas (*cauda*) (Hafez & Hafez 2000). Vývodnými kanálky se spermie dostávají z varlete (*rete testis*) do nadvarlete. V pohybu spermiím pomáhá varletní tekutina ze semenotvorných kanálků, která je z velké části resorbována v hlavě nadvarlete (Reece 2010).

Hlava nadvarlete zeširoka překrývá hlavu varlete, jejíž součástí jsou odvodné kanálky varlete, které se v přechodu do těla nadvarlete spojují ve vývod nadvarlete. Tělo nadvarlete je úzkého a směrem k ocasu rozšiřujícího se tvaru. Ocas nadvarlete má kuželovitý tvar. V tělu i v ocase nadvarlete je vývodný kanál nadvarlete silně zprohýbaný a tvoří kličky spojené řídkým vazivem, díky čemuž dosahuje značné délky. Ocas nadvarlete slouží zejména jako dočasný rezervoár spermií, dokud nedojde k ejakulaci (Marvan et al. 1998). Jeho vyústění končí v chámovodu (Lopate et al. 2003). Vývodný kanál směrem k chámovodu ztlušťuje svou stěnu a zvětšuje lumen (Marvan et al. 1998).

Epitel je v počáteční části vývodu nadvarlete dvouvrstevný cylindrický, postupně se snižuje až na jednovrstevný kubický (Sláma et al. 2015). Je opatřen mikroklyky, díky nimž je schopen resorbce odpadních látek vzniklých rozpadem spermií, které nebyly ejakulovány. Velmi důležitá je i sekreční funkce epitelu v tělu a ocasu nadvarlete, která produkuje výživný sekret pro spermie (Marvan et al. 1998; Lopate et al. 2003). Sekret je mírně kyselý, jelikož je za potřeby snížit pohyblivost a metabolismus spermií, aby nedošlo k vyčerpání energie před ejakulací. K utlumení spermií slouží i snížený obsah kyslíku a vyšší koncentrace CO₂, aby byly schopné přežít v ocasu nadvarlete i 2-3 týdny (Marvan et al. 1998).

K vypuzení spermií při ejakulaci pomáhají peristaltické pohyby hladké kruhové svaloviny ve varletním vývodu (Marvan et al. 1998). Sympatická inervace v nadvarletí je nezbytná pro neuromuskulární příhody potřebné pro transport spermatu a celkovou funkci nadvarlete (Ricker et al. 1996). Délka transportu spermií napříč nadvarletem trvá v průměru 8-11 dní (Lopate et al. 2003). Během průchodu částmi nadvarlete je již spermie schopná přímočarého pohybu a oplození. Dochází k změnám chromatinu a také na plazmatické membráně. Neejakulované spermie jsou fagocytovány nebo odchází s močí (Reece 2010).

K vzniku mezibuněčných spojovacích komplexů je za potřeby adhezních buněk. Pro mezibuněčnou i vnitrobuněčnou komunikaci ve varletech jsou adhezní molekuly velmi důležité. Změna exprese těchto molekul by měla za následek změnu interakcí mezi různými buňkami varlat, včetně vlivu na různé signální dráhy a produkci spermií jako takovou. Exprese adhezních molekul je různá v zárodečných buňkách tak i v průběhu vývinu buněk v bazálním a adlumínálním kompartmentu (Herms et al. 2010b).

3.3.2 Stavba spermie

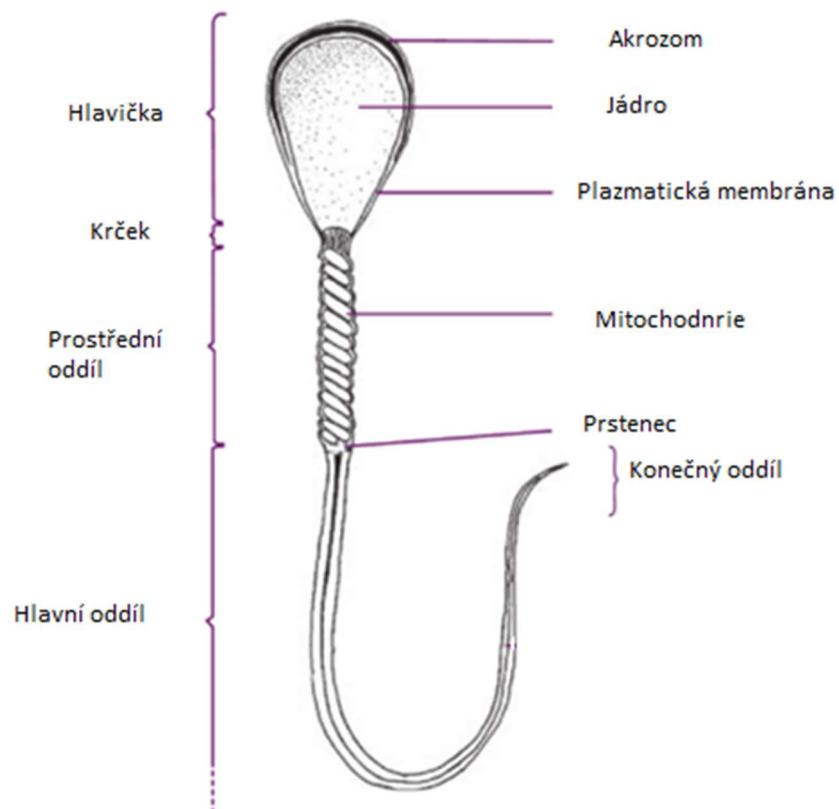
Na spermii rozeznáváme hlavičku, krček a bičík. Hlavička má dorzoventrálně zploštělý elipsoidní tvar a rozděluje se na: akrozom, ekvatoriální segment, postakrozomální pochvu a zadní prstenec. Spermie dále obsahuje jádro, akrozom a cytoskeletární struktury (Johnson 1991; Varner et al. 2015).

Zadní prstenec připevňuje plazmatickou membránu k jadernému obalu. Největší část hlavičky zaujímá jádro s vysoce kondenzovaným chromatinem. Významně se změnilo složení a zesíťování jaderných proteinů během spermiogeneze a během průchodu nadvarletem. Během spermiogeneze jsou nahrazeny protaminy namísto histonů (Varner et al. 2015). Tyto změny ovlivňují i zastavení transkripce i translace (Herms et al. 2010a). Díky cysteinovým zbytkům protaminů se vytváří disulfidické můstky, díky nimž dojde ke stabilizaci DNA. Stabilizace chromatinu slouží jako ochrana před negativními vlivy během průchodu samičími reprodukčními cestami, zároveň tato struktura chromatinu umožňuje zrychlenou mobilitu při

aktivaci spermií a při penetraci do zony pellucidy (ZP) vajíčka (Varner et al. 2015). Během růstu vajíčko vytvoří extracelulární matrix zvanou zona pellucida, která je zvořena ZP proteiny, na které se spermie naváže (Okabe 2013). Jádro spermie je obaleno do dvouvrstvé jaderné membrány s jadernými póry (mimo akrozom a postakrozomální oblasti) (Varner et al. 2015).

Akrozom kryje dvě třetiny jádra a vznikl z Golgiho aparátu v průběhu spermiogeneze (Varner et al. 2015). Rozlišuje se vnější (OAM) a vnitřní akrozomální membrána (IAM). Vnější akrozomální membrána je pod plazmatickou membránou a vnitřní membrána se dotýká jaderného obalu. Obě membrány se sbíhají v úrovni ekvatoriálního segmentu (Reece 2010; Varner et al. 2015). Akrozom obsahuje velké množství akrozinu a jiných hydrolytických enzymů, bílkovinných receptů, důležitých pro adhezi a fúzi gamet (Schill et al. 1988; Varner et al. 2015).

Bičík lze rozdělit na spojovací (krček), prostřední, hlavní a koncové části (Obrázek 2). Spojovací část se skládá ze segmentovaných vláken a proximální a distální centrioly, které jsou vůči sobě kolmé. Hlavními prvky bičíku jsou: vnější hustá vlákna sloužící k fixaci, axonemy (svazek mikrotubulů), mitochondrie a fibrilární pochvy (Varner et al. 2015). Mitochondrie spermie jsou přítomné pouze ve spirálovitě uspořádané mitochondriální pochvě (McKinnon et al. 2011). Celá spermie je pokryta plazmatickou membránou, kterou lze rozdělit do domén dle funkcí: akrozomální reakce, získání aktivované motility, adheze a fúze spermie a oocyty aj. (Varner et al. 2015).



Obrázek. 2 Stavba hřebčí spermie (upraveno dle Morel 2008).

3.3.3 Spermatogeneze

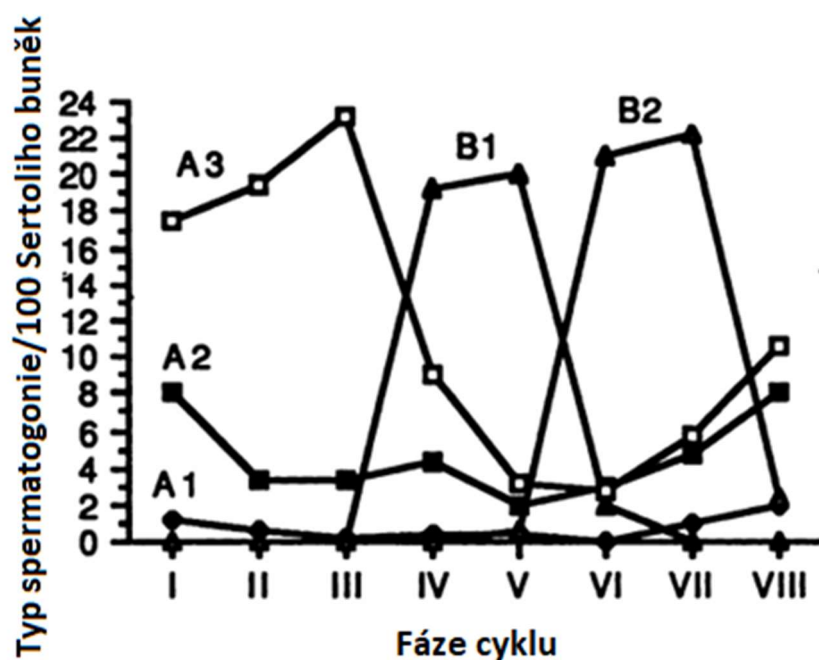
Spermatogeneze je soubor mitotických, meiotických i morfologických změn v semenotvorných kanálcích a nadvarleti, které vedou k vytvoření naprosto odlišné a specializované buňky (spermie) od buněk zárodečných (Clermont 1972). Mitozou se rozumí dělení buněk, kdy nově vzniklé buňky mají diploidní sadu chromozomů. Po dokončení meiozy má nově vzniklá buňka haploidní sadu chromozomů a dochází k výměně genetické informace v chromozomech gamety (Johnson et al. 1997; Reece 2010).

Jedná se o proces zahrnující koordinované přeměny spermatogonií, spermatocytů a spermatid (McKinnon et al. 2011). Proliferace spermatogonií a meiotická dělení se označují jako spermatocytogeneze. Haploidní buňky jsou nazývané spermatidami, ty podstupují množství vývojových a strukturálních změn, známých jako spermiogeneze za vzniku spermie (Hafez & Hafez 2000). U koní je délka spermiogeneze 57 dní a spermatocytogeneze trvá 19,4 dny (Morel 2008).

Puberta je označována jako úspěšný začátek reprodukční funkce. U hřebců nastupuje nejčastěji ve věku 18 měsíců a doprovází ji zvýšení svalové hmoty, zvětšení čelistí, hřebci začínají vykazovat typické chování jako je vokalizace v přítomnosti samic, erekce a páření. Spermiogeneze začíná v pubertě díky vyšší činnosti Leydigových buněk, a tedy i vysokým hladinám dihydrotestosteronu a testosteronu kolem zárodečných buněk. Dihydrotestosteron stimuluje transformaci zárodečných buněk na spermie (Lopate et al. 2003).

Spermatogonie jsou zárodečné buňky a spolu se Sertoliho buňkami vystýlají semenotvorný kanálek varlete. Jedná se o kmenové buňky, které mitozou doplňují svůj počet směrem k lumenu kanálku (McKinnon et al. 2011). Koňská varlata obsahují zhruba dvojnásobek spermatogonií v létě než v zimě (Johnson 1991).

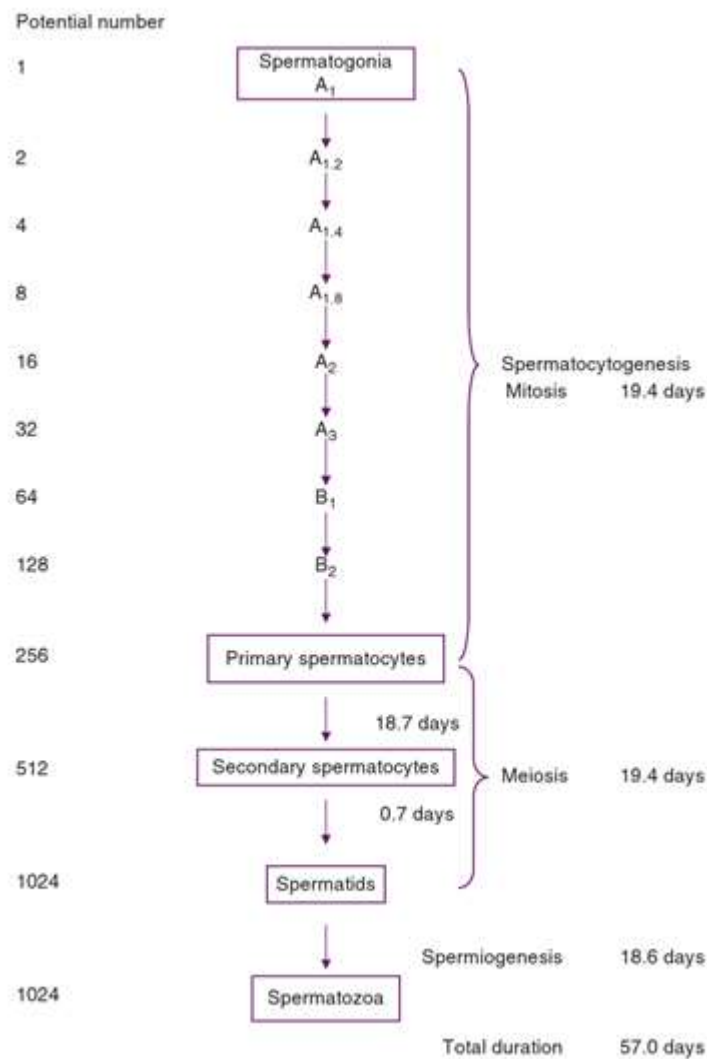
V embryonálním vývoji migrují primordiální zárodečné buňky do gonád ze žloutkového vaku. Poté dojde k sérii mitoz a vytvoří se gonocyty (Hafez & Hafez 2000). Není přesně jasné, o kolik mitoz se jedná u hřebců, ale u savců v průměru dochází k 1-14 mitozám (Morel 2008). Samčí gonocyty prochází diferenciací za vzniku spermatogonie A1, které se mitoticky množí a jsou základem pro zárodečnou linii buněk (Hafez & Hafez 2000). U hřebců je známo 5 typů spermatogonií: A1, A2, A3 a B1 a B2, které se v průběhu sezóny dramaticky mění v počtech a mají různé tvary jader (Obrázek 3) (Johnson 1991; Johnson et al. 1997).



Obrázek 3. U 10 dospělých hřebců byl stanovený počet jednotlivých typů spermatogonií na 100 Sertoliho buněk v období rozmnožování. Změny nastaly u všech typů v závislosti na stádiu spermatogonického cyklu. Nejvýznamnější změny nastaly v počtu u spermatogonií A3, B1 a B2 (upraveno dle Johnson 1991).

Spermatogonie A1 mají mimo doplnění zárodečných buněk i druhou funkci, a tou je produkce dalších typů spermatogonií A2, A3, B1 a B2. Typ A2 slouží mj. k nahrazení populace spermatogonií typu A1 (Hafez & Hafez 2000). Spermatogonie A1 prodělají 4 mitozy za vzniku typu A2, které též prodělají mitozu za vzniku A3. Mitozou A3 vznikne typ B1, a nakonec mitozou B1 vznikne spermatogonie typu B2 (stále s diploidní sadou chromozomů) (Obrázek 4). Touto cestou by teoreticky mělo vzniknout 128 spermatogonií typu B2, ale je tu určitá regulace a řízená degradace uzpůsobená počtu Sertoliho buněk (Morel 2008).

Spermatogonie typu B2 se dvakrát dělí za vzniku primárních spermatocytů (Hafez & Hafez 2000). Poté dojde k první meioze a vznikají dva sekundární spermatocyty. První meioza trvá v průměru 18,7 dne (Morel 2008). Sekundární spermatocyty se opět dělí za vzniku haploidních spermatid, přičemž každý spermatid obsahuje jeden chromozom (dvě spojené chromatidy) (Reece 2010). Druhá meioza trvá v průměru u hřebců jen 0,7 dne a dává vzniknout dvěma spermatidám z jednoho sekundárního spermatocytu (Obrázek 4). Chromatidy se od sebe oddělí a vytvoří dva soubory genů, z nichž každý ze souborů putuje do jedné spermatidy (Morel 2008; Reece 2010). Vývoj spermatid je rozdělen do 4 fází: Golgiho, akrozomální, maturační a fáze čepičky (Hafez & Hafez 2000).



Obrázek 4. Dělení buněk během spermatogeneze u hřebce (Morel 2008).

3.3.3.1.1 Golgiho fáze

Akrozom vzniká tvorbou proakrozomických granulí z Golgiho aparátu, jejímž shlukováním se postupně vytvoří velký lysozom. Granule stále zvětšuje svůj objem, a to díky syntéze glykoproteinů z GA, které vstupují dovnitř. Objekt roste, zhušťuje se, a nakonec nasedne vnitřní membránou na jadernou membránu (Abou-Haila & Tulsiani 2000). Na opačném pólu hlavičky vznikají základy pro bičík. Proximální centriola migruje směrem k jádru a vytvoří základ pro propojení hlavičky a bičíku (Hafez & Hafez 2000).

3.3.3.1.2 Fáze čepičky

Dochází k vývoji axonem bičíku z distální centrioly. Axonema má podobu centrálního páru mikrotubulů a devět párů je rozprostřeno kolem páru centrálního. Současně se základ akrozomu rozšiřuje po karyolemě, dokud nezabírá dvě třetiny jádra (Hafez & Hafez 2000).

3.3.3.1.3 Akrozomální fáze

Během akrozomální fáze spermiogeneze dochází k vývojovým změnám na jádru, akrozomu a bičíku. Spermatid se otáčí bičíkem k lumen kanálku (Hafez & Hafez 2000). Mikrotubuly jsou původně náhodně uspořádány v cytoplazmě, ale nyní dochází k zvýšení jejich koncentrace v blízkosti jádra a tvoří se manžeta obklopující jádro distálně od akrozomu (Wolosewick & Bryan 1977; Moreno & Schatten 2000). Kolem axonemy se vytvoří prsteneček. Modifikace jádra a akrozomu ovlivňují Sertoliho buňky. Jádro se díky mikrotubulové manžetě protahuje a chromatin zhušťuje, na což odpovídá stejnou reakcí akrozom, je protáhlý a kondenzovaný. Zároveň se cytoplasma jádra přesouvá a obklopuje proximální část vyvíjejícího se bičíku. Distální centriol roste a vytváří bazální tělísko bičíku. Mitochondrie původně volně rozmístěné po cytoplazmě se přesouvají do proximální části bičíku, kterou ztlušťují a vytváří střední část spermie (Hafez & Hafez 2000).

3.3.3.1.4 Maturační fáze

Maturační fáze uvolňuje buňky do lumen kanálku. Dochází k náhradě histonů za protaminy a chromatin se zhušťuje, čemuž pravděpodobně napomáhá manžeta (Meistrich et al. 1990; Hafez & Hafez 2000). Co se týče změn na bičíku, kolem axonemu se vytváří fibrilární pochva obklopující oblast od krčku po koncovou část bičíku. Manžeta se přesouvá k místu, kde oddělí střední a hlavní část bičíku a později zmizí, zároveň se Sertoliho buňky zbavují přebytečné cytoplazmy. Mitochondriální pochva se stává kompaktní strukturou dosahující k prstenci (Hafez & Hafez 2000).

3.4 Vazba spermie a oocytu

K oplodnění dochází, když se spermie a vajíčko vzájemně rozpoznají a sfúzují (Bianchi et al. 2014). Hlavními protagonisty jsou dvě morfologicky naprosto odlišné haploidní buňky, spermie a vajíčko, které interagují, a nakonec se spojí za vzniku diploidní buňky zygoty (Bianchi & Wright 2014). Savčí spermie po samotné ejakulaci není schopná vajíčko oplodnit. (Gadella et al. 2001; Okabe 2013). Spermie nejdříve musí prodělat fyziologické změny, nazývané kapacitace, a následně morfologické změny označované jako akrozomální reakce (Okabe 2013). Vrcholem oplození je fúze membrán, cytoplazmy, a nakonec genomů obou gamet (Klinovska et al. 2014).

3.4.1 Kapacitace

Kapacitace je soubor změn na membráně spermie i soubor změn intracelulárních (Yanagimachi 1994). Jakmile spermie opustí varle, přestává syntetizovat lipidy a proteiny plazmatické membrány. V samičím reprodukčním traktu je spermie „aktivována“ kapacitačními faktory, jež zapřičiňují jemnou modifikaci a přemístění molekul v plazmatické membráně, která je důležitá pro pozdější vazbu na oocyt (Gadella et al. 2001). Kapacitace vede ke ztrátě membránových složek, ke změně tekutosti membrány a dochází k hyperaktivaci spermie, aby spermie byla schopná opustit ovidukální rezervoár (Rubinstein et al. 2006a).

Během kapacitace dochází k hyperpolarizaci plazmatické membrány, což aktivuje řadu signálních molekul. Přes cAMP se aktivuje PKA, dochází k hyperaktivaci, zvýšení pH

(související se změnami HCO_3^-) zvýší se i množství cAMP (souvisí s fosforylací proteinů). Dochází též k zvýšení hladiny vápníkových iontů (druhý větší peak vzrůstu vápníku spouští akrozomální reakci). Současně cholesterol putuje ven z membrány spermie, jehož je v koňském spermatu vyšší množství než u kance, a to 37 % (Gadella et al. 2001; Gadella et al. 2008; Okabe 2013). Z povrchu spermií se uvolňuje ochranný glykoproteinový obal získaný v nadvarleti, což má za následek vyšší propustnost a vytvoření tekutějšího prostředí membrány (Yano et al. 2010; Okabe 2013). Zvýšená fluidita membrány pak zlepšuje příjem extracelulárního estradiolu, který je důležitý nejen pro kapacitaci spermií, ale i pro samotný vývoj spermie a oocyty, zároveň je důležitý pro jejich vzájemnou komunikaci (Bosakova et al. 2018).

Dochází k fosforylaci různých bílkovin, zejména na zbytcích tyrosinu, jež jsou klíčové pro úspěšnou kapacitaci, jelikož pomáhají uvolnění spermie z oviduktálního rezervoáru. Uvolnění spermie z oviduktálního rezervoáru je hormonálně řízeno (Rubinstein et al. 2006a). Přítomnost 17β -Estradiolu podporuje jak kapacitaci (vyšší množství tyrozinové fosforylace), tak pozitivně ovlivňuje průběh akrozomální reakce (Visconti et al. 1995; Okabe 2013; Bosakova et al. 2018).

3.4.2 Akrozomální reakce

Studie Jin et al. (2011) při výzkumu na myších vyvrátila fakt, že k akrozomální reakci dochází při kontaktu spermie a ZP proteiny na zoně pellucidě vajíčka. Z výzkumu je zřejmé, že spermie myši prodělají akrozomální reakci již při kontaktu s *cumulus oophorus* oocyty. Buňky *cumulu* produkují progesteron, jež by mohl být spouštěčem akrozomální reakce. Spermie je dále schopná projít přes zonu pellucidu a oplodnit vajíčko.

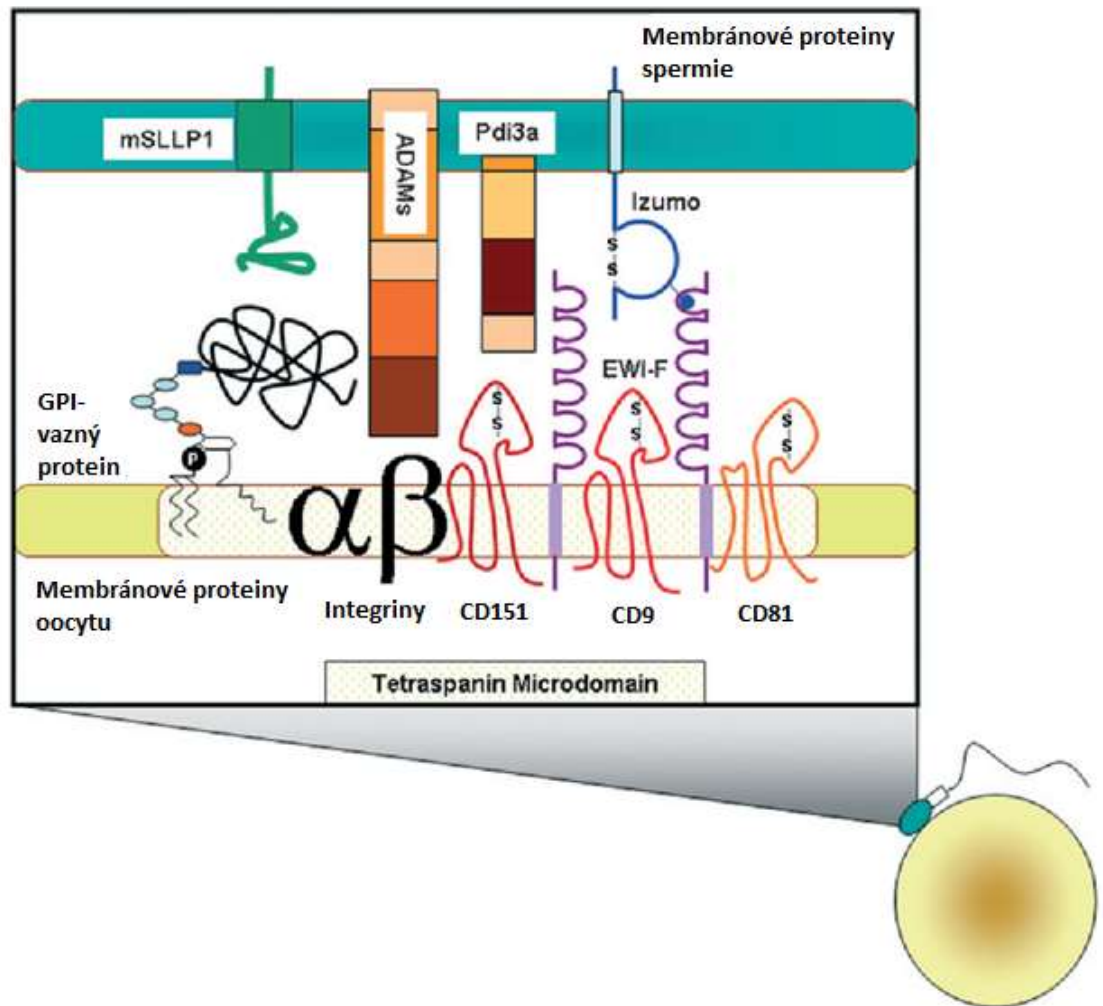
Během akrozomální reakce dochází k změnám v membráně ekvatoriální a postakrozomální oblasti spermie a odhaluje se IAM (Wassarman et al. 2001; Rubinstein et al. 2006a). Akrozom je váček obklopen dvěma membránami (Okabe 2013). Během akrozomové reakce se OAM spojuje s plazmatickou membránou spermie, čímž vytváří hybridní vezikuly a póry, které vedou k uvolnění akrozomálního obsahu a odhalení proteinů na IAM (Gerton 2002). Akrozom obsahuje rychle i pomalu uvolňované proteiny, které podléhají exocytóze, při které plazmatická membrána a OAM fúzí na více místech v oblasti akrozomální čepičky. Po prodělení této reakce se odkryjí dříve skryté receptorové proteiny. Uvolňování enzymů umožňuje spermii proniknout do ZP a vstoupit do perivitelinního prostoru oocyty (prostor mezi ZP a oolemou oocyty) (Okabe 2013). Vrstvu *cumulus oophorus* vajíčka spermie překročí díky hyaluronidáze, která naruší vazby mezi kumulárními buňkami (Yanagimachi 1981). Průnik zónou pellucidou zprostředkuje aktivovaný enzym akrozin (Allen & Green 1997).

Vajíčko je schopno být oplodněné jen spermií s aktivovanou kaskádou akrozomálních změn (Okabe 2013). Spermie v perivitelinním prostoru se váže na mikrovilární oblast oolemy, se kterou fúzuje v oblasti ekvatoriálního segmentu (Wassarman et al. 2001; Rubinstein et al. 2006a). Oolemma (membrána oocyty) i zona pellucida jsou po oplodnění biochemicky změněny, prodělají tzv. zonární reakci, vajíčko je již nevnímavé k dalším spermiím, čímž se zabraňuje vytvoření neživotaschopného polyploidního embrya (Gardner & Evans 2006).

3.4.3 Vybrané proteiny účastníci se fúze gamet: CD9, CD81, Izumo 1, Juno

Pro membránovou interakci během oplození jsou, dle dosavadních studií, velmi důležité proteiny CD9, CD81, Izumo 1 a Juno (a další). Izumo 1 se nachází na spermii a jeho vazebný partner je Juno, nacházející se na vajíčku společně s proteiny CD9 a CD81 (Obrázek 5). (Chalbi et al. 2014; Bianchi et al. 2014; Jankovičová et al. 2020).

Pouze spermie, která prodělala akrozomální reakci, se může navázat a sfúzovat s oolemou oocyty. Po fúzi membrán vstupuje do oocyty jádro, centriola, mitochondrie a bičík spermie. Jádra spermie a oocyty fúzují a vytvoří se zygota (Yanagimachi 1994).



Obrázek 5. Interakce spermie a oolemy oocyty znázorňující síť receptorů CD151, CD81, CD9, integriny, GPI proteiny (vazné proteiny), ADAM proteiny, jež jsou zodpovědné za vazbu oocyty a spermie (upraveno dle Nixon et al. 2007).

3.4.3.1 Tetraspaniny CD9 a CD81

Tetraspaniny CD9 a CD81 jsou důležitými proteiny při fúzi pohlavních buněk. Obsahují dva krátké C a N konce uložené intracelulárně a čtyři transmembránové domény oddělující dvě extracelulární domény (Yauch & Hemler 2000). Oba tetraspaniny asociují s integriny $\alpha 3\beta 1$ a $\alpha 6\beta 1$. Integrin $\alpha 6$ a $\beta 1$ je na lidském oocyty přítomen krátce po ovulaci a je možné, že zastává roli při fúzi gamet (Berditchevski et al. 1996; Ji et al. 1998; Stipp & Hemler 2000).

3.4.3.1.1 Poloha CD81 a CD9 na spermii

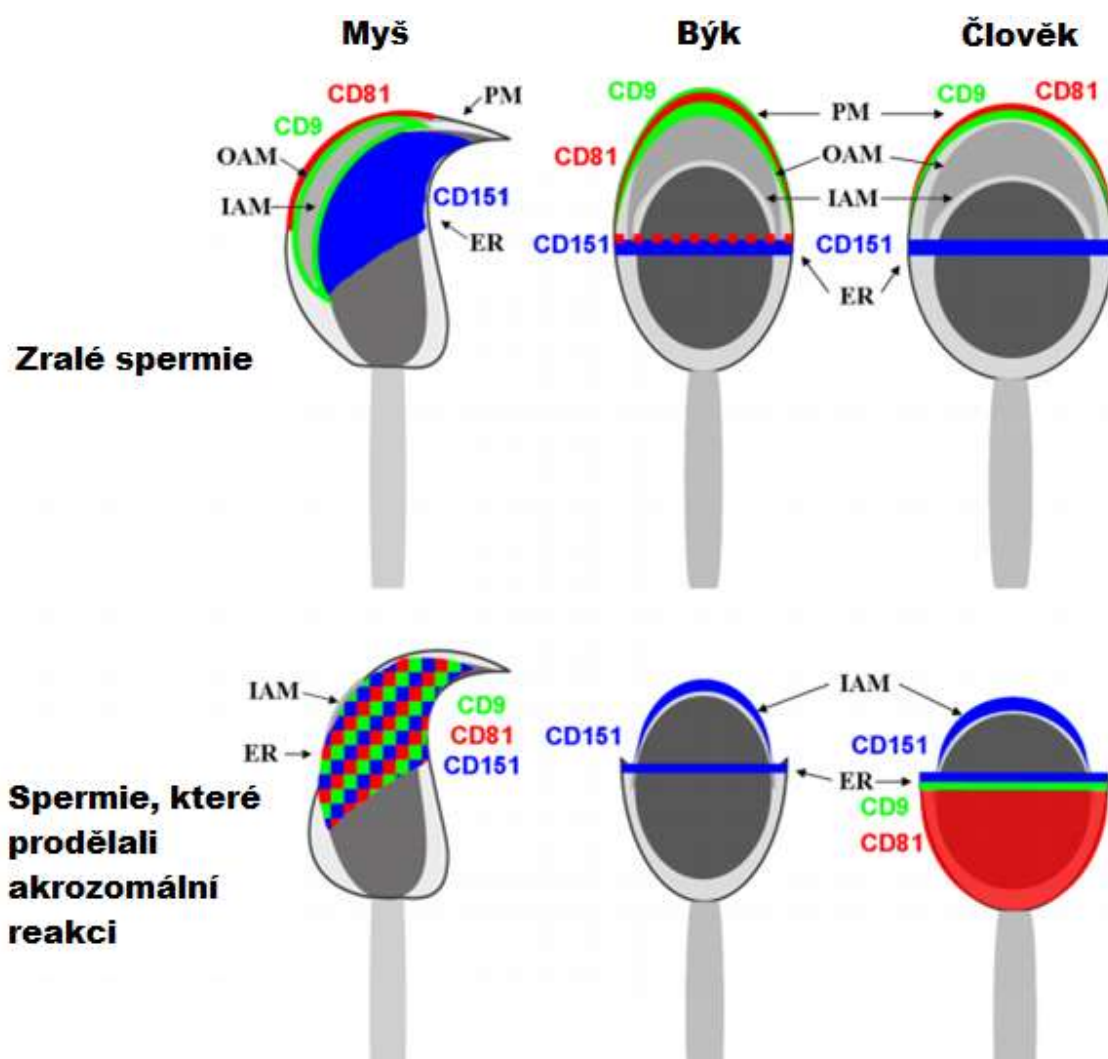
CD81 je přítomen u myši a skotu na membráně apikálního akrozomu a je tomu tak i v průběhu kapacitace, nicméně během akrozomální reakce u myši dochází k přemístění CD9 i CD81 směrem k ekvatoriálnímu segmentu hlavičky spermie a dále přes celou hlavičku spermie.

U lidí a býka je situace jiná, k přemístění při akrozomální reakci dochází pouze u molekuly CD9. Molekula CD81 je odstraněna z hlavičky spermie a u lidí je slabě detekována v postakrozomální oblasti (Jankovičová et al. 2016; Frolíková et al. 2018). U býka je CD81 přítomný na apikální části a částečně v rovníkové oblasti epididymální a ejakulované spermie, po akrozomové reakci zmizí z hlavičky spermie. U člověka detekovaný CD81 také v apikální části akrozomu a částečně v postakrozomální oblasti ejakulovaných a kapacitovaných spermií (Obrázek 6) (Jankovičová et al. 2016). Tato souhra mezi CD9 a CD81 byla pozorována i při fúzi myoblastů a monocytů (Schwander et al. 2003; Fanaei et al. 2011).

Li et al. (2004) nedetekoval CD9 na zmraženém spermatu, pravděpodobně díky tomu, že prasečí sperma je velmi citlivé na kryogenní sloučeniny. Po akrozomální reakci jsou CD9 molekuly zachyceny v IAM. Minimum CD9 bylo nalezeno na membráně rovníkového segmentu. K vymizení CD9 z hlavičky spermie dochází při vstupu do periviteliního prostoru oocyty (Ito et al. 2010).

Na spermích, které prodělali akrozomální reakci, byl detekován protein CD9 na vnitřní i vnější akrozomální membráně, na povrchu ekvatoriálního segmentu a současně byl nalezen i ve váčcích vzniklých fúzí plazmy a vnější akrozomální membrány (Obrázek 6) (Ito et al. 2010; Frolíková et al. 2018).

Dle Frolíková et al. (2018) tvoří CD9 tetraspaninovou síť membrány spermie. Dynamika interakční sítě CD9 a CD81 přímo souvisí s přítomností nebo nepřítomností cholesterolu v CD81. CD81 bez cholesterolu vykazuje změnu konformace, jež má vliv na fúzi gamet. Odstranění cholesterolu z membrány spermie v průběhu kapacitace může mít vliv na schopnost spermie navázat se na oocyt (Frolíková et al. 2018).



Obrázek 6. Rozložení CD proteinů na spermii myši, býka a člověka (upraveno dle Jankovičová et al. 2020).

3.4.3.1.2 Poloha CD9 a CD81 na oocytu, vazba spermie-oocyt

U člověka byl CD9 detekovaný v oocytech zárodečného vaku a v oocytech ve stádiu MI a MII, stejně tak CD81 u myši a skotu (Coskun et al. 2003; Ziyyat et al. 2006; Jankovičová et al. 2016). CD9 je bohatě exprimovaný na plazmatické membráně oocyty a také je přítomný ve vesikulech v periviteliním prostoru intaktních oocytů myši (Ziyyat et al. 2006; Jankovičová et al. 2015). CD81 je detekovaný hlavně v ZP, a také je součástí exocytů oocytů. Dále lze CD81 detekovat ve vesikulech v periviteliním prostoru oocytů v průběhu oplození (Ohnami et al. 2012; Jankovičová et al. 2016).

Molekuly CD9 jsou exprimovány na vaječných mikrovilách a jsou hustě koncentrovány v místě připojení oocyty a spermie (Kaji et al. 2000; Runge et al. 2007). Oocyty, které nejsou schopné fúzovat se spermii, mají pozmeněnou délku, tloušťku a hustotu jejich mikrovilů. Malý poměr zakřivení znemožňuje fúzní schopnost. U oocyty divokého typu byl poměr zakřivení mikrovilárních špiček na membráně oocyty o polovinu menší než u CD9 knock-outovaných oocytů (Runge et al. 2007). Pokud je schopen CD9 ovlivnit takto významně stavbu mikrovil vajíčka, velmi pravděpodobně spolupracuje s dalšími membránovými proteiny (Klinovská et al. 2014).

Savčí spermie se váže na mikrovily na povrchu oocyty. K fúzi spermie a oocyty dochází nejprve kolem equatoriálního segmentu spermie (Yanagimachi 1994). Knock-outovaný CD9 a/nebo CD 81 způsobuje u samic myši zhoršenou plodnost (Kaji et al. 2000; Miyado et al. 2000). Takto zachycené spermie se jen ojediněle váží na povrch vajíčka, což naznačuje, že CD9 má vliv na silnou adhezi spermie (Zhu & Evans 2002; Jégou et al. 2011). Fúze vajíčka a spermie byla silně inhibována protilátkami anti-CD9. Tento jev ale nebyl pozorovaný u samců myši (Kaji et al. 2000; Miller et al. 2000). Defekt je spojen pravděpodobně se samotnou fúzí gamet, jelikož spermie pronikne ZP, naváže se na oolemu, ale nedokáže s membránou fúzovat. Je zachycena v perivitellinním prostoru (Klinovská et al. 2014). Zvýšená hladina vápníkových iontů signalizující oplození nebyla detekována téměř u žádných ze studovaných oocytů, výjimečně k vápníkovému vzestupu došlo, ale po dlouhém časovém úseku (Kaji et al. 2000; Miller et al. 2000). V případě dodání mRNA CD9/CD81 do oocyty knock-outované myši se funkce fúze obnoví, tudíž CD9 hraje klíčovou roli při oplodnění a CD81 má potenciál kompenzovat funkci CD9 při fúzi spermie a oocyty (Kaji et al. 2002). Samci myši byli plodní i v případě dvojitého knock-outu CD genů (Rubinstein et al. 2006b).

Dle studie Jégou et al. (2011) myši s vyblokováním CD9 genem vykazovaly menší rychlost fúze, přičemž počet navázaných spermií na oocyt byl vyšší než u oocytů divokého typu. Jégou et al. (2011) tuto skutečnost připisují zvýšenému počtu adhezních míst pro spermie. Úspěšná fúze je poté důsledkem CD9 řízených adhezních reakcí mezi gametami (Jégou et al. 2011; Jankovičová et al. 2015). Je možné, že si některé druhy vyvinuly „záložní mechanismy“, které, v případě vyblokování určitých genů důležitých pro fertilizaci, nahradí funkci blokováných proteinů (Jankovičová et al. 2020).

3.4.3.1.3 Funkce CD9 a CD81 v reprodukci

CD81 je exprimován na povrchu oocyty i ve spermii hraje tedy roli ve fúzi gamet, současně se ale podílí i na dalších funkcích CD9, se kterým interaguje (Horváth et al. 1998; Klinovská et al. 2014; Jankovičová et al. 2016). CD9 i CD81 interaguje s různými buněčnými proteiny oocyty a spojuje je, což je typická funkce řady tetraspaninů (Rubinstein et al. 1996; Hemler 2003; Higgingbottom et al. 2003).

Je možné, že pro správnou funkci CD9 i CD81 proteinu v procesu oplození zastupuje důležitou roli sestavení tetraspaninové sítě s důležitými molekulami integrinů a členy rodiny ADAM exprimované na spermii (Obrázek 5) (Schwarz et al. 1995; Jankovičová et al. 2015). Zdá se, že úloha proteinu CD9 spočívá v organizaci komplexu multiproteinů a morfologii membrány potřebné pro fúzi (Klinovská et al. 2014). Nicméně doposud nebyla objasněna přesná funkce CD9 a CD81 při fertilizaci (Klinovská et al. 2014; Jankovičová et al. 2015; Jankovičová et al. 2020).

Dle Stein et al. (2004) CD9 interaguje s molekulami na oolemě během fúze spermie a oocyty a mohl by sloužit jako receptor pro spermii. Mimo expresi na oocytech by se jeho funkce mohla vztahovat k přenosu vezikul oolemy s CD9 do spermatozoí v oblasti perivitellinního prostoru před fúzí gamet, kdy současně dochází k přeskupení membrány spermie. Nicméně při vyblokování genu CD9 v myších oocytech nebylo pozorováno, že by tento akt změnil syntézu vezikul v perivitellinním prostoru (Barraud-Lange et al. 2007). Tyto vezikuly indukují fúzi mezi spermii a oocytem (Miyado et al. 2000).

CD9 na vnitřní akrozomální membráně může mít funkci řídicí reorganizaci IAM, je přemístěn do ekvatoriální roviny a interaguje s vezikulem. Po prodělání akrozomové reakce se obnaží receptory IAM díky fúzi plazmatické membrány a OAM (Ito et al. 2010). Je možné, že CD9 usnadňuje fúzi oocyty a spermatu a slouží jako vazebná molekula (Jankovičová et al. 2015). Mezi Izumo 1 a CD9 z vezikulů oocyty je patrná specifická molekulární interakce a Izumo 1 by mohl být spouštěčem interakcí s CD9 na oolemě (Sutovsky 2009; Vicens & Roldan 2014). Určitý vazebný vztah má CD9 s molekulou PSG17 (člen rodiny imunoglobulinů), jelikož při její mutaci či blokaci nedojde k navázání molekuly CD9 a dojde k narušení fúze oocyty a spermie (Ellerman et al. 2003).

Důležitost CD9 a CD81 je prozkoumávána v akrozomové reakci, vazbě spermií, penetraci spermií, fúzi spermií a vajíček a případně při samotné aktivaci vajíček (Ito et al. 2010; Jankovičová et al. 2015; Frolíková et al. 2018).

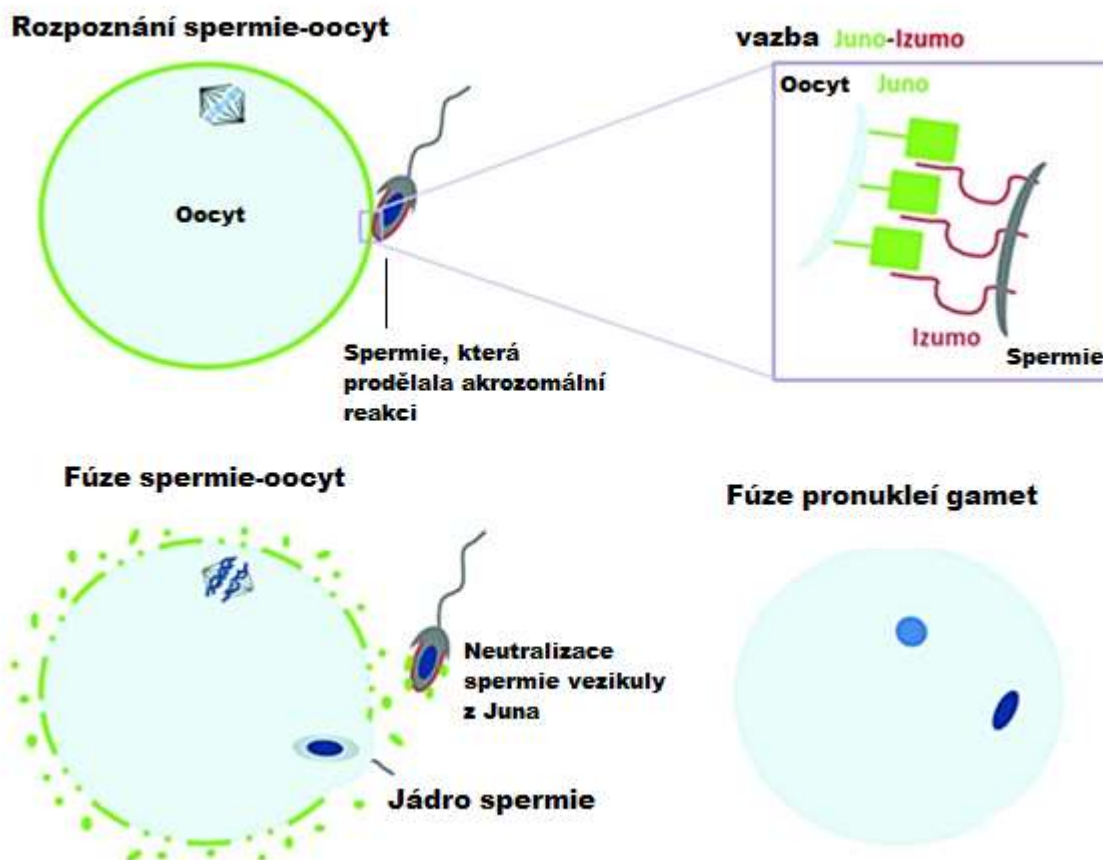
3.4.3.2 Izuno a Juno

Rozpoznání mezi vajíčkem a spermií je zapříčiněno souhrou několika proteinů, za samotné oplodnění jsou prokazatelně nezbytné proteiny: Izumo 1 a Juno (Obrázek 7) (Inoue et al. 2005; Ikawa et al. 2010; Bianchi et al. 2014). Tetraspanin CD9 je považován za důležitou kandidátní molekulu účastnící se oplození a partner receptoru Juno. Nicméně není důležitý pro samotnou spojení Juno a Izumo 1 (Chalbi et al. 2014; Jankovičová et al. 2015). Juno bylo objeveno několik let po Izumo, zejména z důvodu vzácnosti oocytů oproti spermiím, což omezuje materiál k výzkumu. Současně výzkum zpomalovala složitější detekce vazebných partnerů díky přechodné povaze extracelulární interakce mezi ligandem a receptorem (Wright 2009; Bianchi & Wright 2014).

Izumo 1 je protein v oblasti akrozomu na IAM a ekvatoriálním segmentu. Není možné ho detekovat, pokud spermie neprodělá akrozomální reakci, do té doby je skryt pod plazmatickou membránou (Inoue et al. 2005; Kim et al. 2013). Izumo 1 je exprimovaný ve varleti a účastní se sekundární vazby na oolemu vajíčka (Ellerman et al. 2009; Kim et al. 2013).

Nicméně Izumo 1 není schopný zprostředkovat fúzi gamet, díky absenci fúzogenní peptidové domény. Jeho funkce je spíše interakce s jinými proteiny nezbytných pro fúzi gamet (Ellerman et al., 2009; Klinovská et al., 2014). V případě inaktivace Izumo 1 proteinu spermie je schopná projít ZP, ale již není schopná se navázat na oocyt a je tedy infertilní (Inoue et al. 2005). Vajíčko není aktivované, tudíž neproběhne zonární reakce a ZP je stále průchodná pro zbytek spermií (Inoue et al. 2011).

Juno je velmi důležitý vaječný receptor a vazebný partner pro Izumo 1 (Bianchi et al. 2014). V případě knock-outu genu pro Juno samci zůstávají plodní, nicméně samice jsou neplodné (Chalbi et al. 2014). Samotné Juno nemůže být zodpovědný za fúzi gamet, jelikož je krátce po oplození uvolněn z oolemy, nejspíše za účelem jeho kooperace při zonární reakci. Pro oplození samotné je velmi důležitá adhezní funkce obou proteinů (Bianchi et al. 2014; Bianchi & Wright 2014).



Obrázek 7. Izumo na povrchu spermii s probíhající akrozomální reakcí interaguje s Juno na povrchu ovulovaného oocyty. Po oplodnění Juno rozloží membránu vajíčka na jednotlivé vezikuly, které se mohou vázat na další přichodící spermie. Vezikuly reagují s akrozomem, neutralizují spermii, a tím zabraňují vzniku polyploidních embryí (upraveno dle Bianchi & Wright 2014).

3.5 Struktura Genů CD9 a CD81 u koně domácího

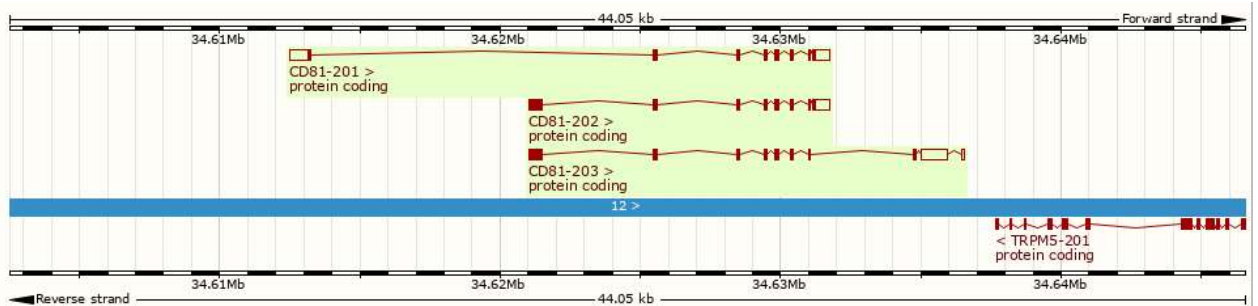
Gen CD9 leží u koně na chromozomu 6, obsahuje 8 exonů a 7 intronů (Obrázek 8). Velikost transkriptu genu CD9 je 998 bp a kóduje 226 aminokyselin. Tento gen má jen jednu transkripční variantu a kóduje tetraspaninový protein CD9. Každý gen se liší svou strukturou napříč živočišnou říší. Například u krávy je velikost genu CD9 1301 bp (Ensembl 2020).



Obrázek 8. Struktura exonů a intronů genu CD9 koně domácího (Ensembl 2020).

Gen CD81 leží u koně domácího na chromozomu 12 a má 3 transkripční varianty kódující protein CD81. Velikost prvního transkriptu je 2212 bp a velikost druhého transkriptu je 1615 bp. Oba transkripty obsahují 8 exonů a 7 intronů. Velikost třetího transkriptu je 1894 bp a

obsahuje 10 exonů a 9 intronů (Obrázek 9). U člověka má tento gen transkripčních variant 17. (Ensembl 2020). Dle databáze NCBI má gen CD81 transkript pouze jeden.



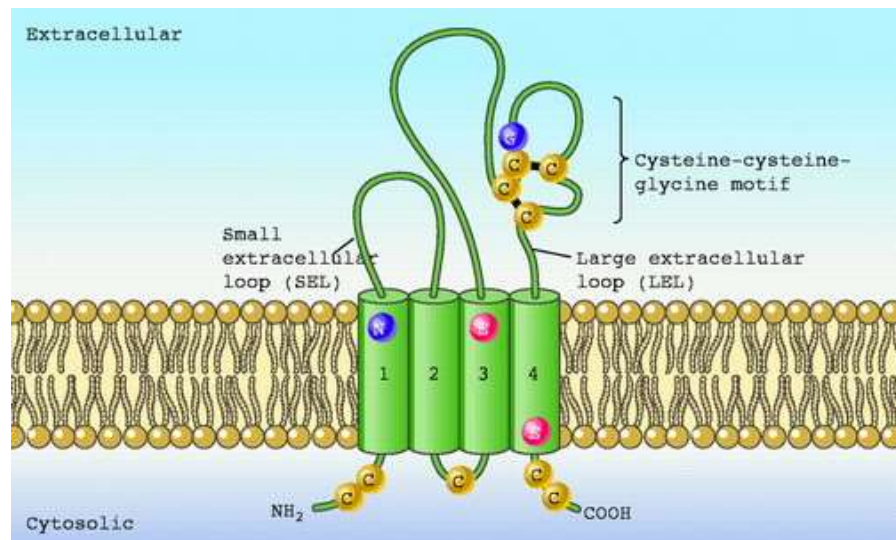
Obrázek 9. Struktura exonů a intronů genu CD81 koně domácího ve třech transkriptech (Ensembl 2020).

3.6 Tetraspaniny

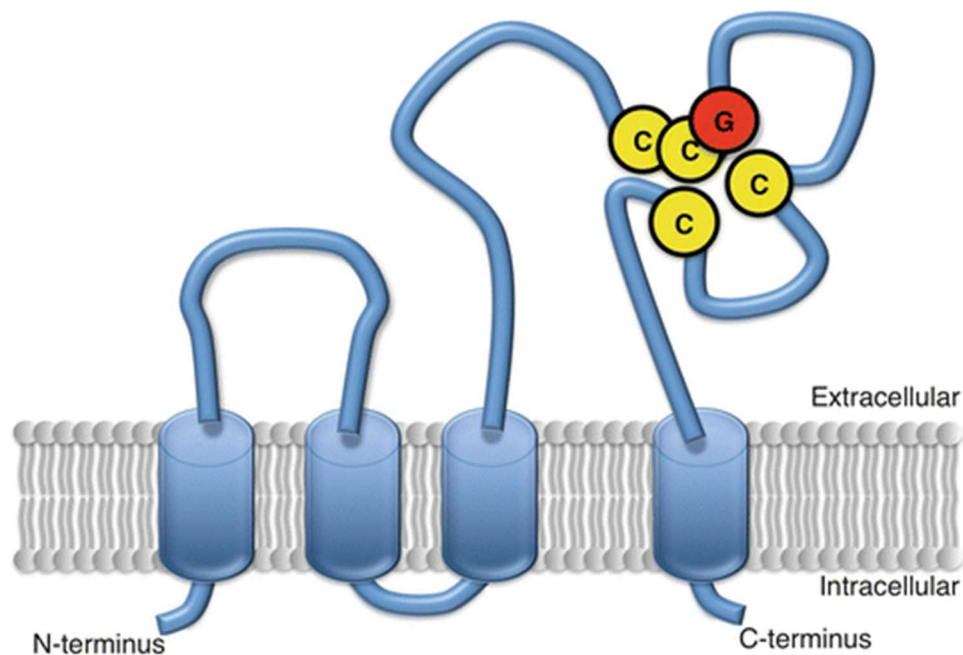
Tetraspaniny jsou hojně exprimované transmembránové proteiny o velikosti 25–55 kDa (Todres et al. 2000). Jedná se o molekuly s mnoha funkcemi a jsou umístěné ve specifických mikrodoménách na plasmatické membráně téměř všech eukaryotických buněk (Bassani & Cingolani 2012; Jankovičová et al. 2019). Tetraspaniny tvoří membránové komplexy s integrinovými receptory a jsou součástí buněčné migrace zprostředkované integrinem (Berditchevski & Odintsova 1999).

3.6.1 Struktura tetraspaninů

Struktura tetraspaninů se skládá ze čtyř domén procházejících membránou (TM1-TM4), které jsou propojené dvěma extracelulárními doménami (malá EC1 (SEL) a velká EC2 (LEL) smyčka)), které se mezi rodinami liší. Tyto extracelulární domény obsahují aminokyselinové zbytky určující funkci, intracelulární část bílkoviny je pak zakončena N a C konci (Seigneuret et al. 2001; Levy & Shoham 2005a; Min et al. 2006). Na velké smyčce (LEL) se nachází motiv aminokyselin CCG (cystein-cystein-glycin), který tvoří disulfidické můstky s dalšími cysteiny ve fixních pozicích LEL (Obrázek 10 a 11) (Seigneuret et al. 2001; Levy & Shoham 2005a).



Obrázek 10. Struktura tetraspaninů demonstrována na CD81. Znázorněné jsou 4 transmembránové proteiny, velká a malá smyčka extracelulárních domén a krátký intracelulární úsek. Počet disulfidických můstků v LEL může být variabilní (2-4), v případě CD81 jsou přítomny 2 disulfidické můstky (Seigneuret et al. 2001; Levy & Shoham 2005a).



Obrázek 11. Strukturální rysy tetraspaninu CD9, jehož molekulární hmotnost je 24 kDa. Strukturální vlastnosti CD9 zahrnují čtyři transmembránové domény, dvě extracelulární smyčky, krátké a velké extracelulární smyčky (SEL a LEL) a dva krátké cytoplazmatické konce. CD9 obsahuje zbytky cystein-cystein-glycin (CCG) specifické pro tetraspanin a dva další cysteiny v rámci LEL (Yoshida et al. 2014).

3.6.2 Funkce tetraspaninů

Nejvýznamnější vlastností, jež tetraspaniny oplývají, je schopnost sdružovat se s integriny, adhezními molekulami imunoglobulinových superrodin, s jinými tetraspaniny a signálními molekulami. Prostřednictvím těchto sdružení se vytvoří na membráně buňky tetraspaninové obohacené mikrodomény (TEM) s organizační funkcí pro jiné transmembránové proteiny. Skrze tyto spojení jsou tetraspaniny schopny interagovat s různými buňkami (Hemler 2005; Hemler 2008).

Laterální uspořádání buněčných membrán je umožněno prostřednictvím specifických asociací mezi tetraspaniny navzájem anebo s odlišnými integriny (Nydegger et al. 2006; Charrin et al. 2009). Na rozdíl od jiných membránových proteinů, tetraspaniny mají schopnost vytvářet laterální spojení s partnerskými proteiny z různých typů buněk za současného vytvoření takzvané tetraspaninové sítě. Děje se tak zásluhou transmembránových mikrodomén (Rubinstein et al. 1996; Levy & Shoham 2005a; Nydegger et al. 2006). Díky své schopnosti tvořit síť s jinými proteiny se účastní mnoha buněčných funkcí (Hemler 2005).

Tetraspaniny jsou důležitou komponentou při buněčné adhezi, signalizaci, fúzi a pohyblivosti buněk, zároveň jsou součástí interaktivní sítě v gametách (Fanaei et al. 2011; Jankovičová et al. 2019). Dále jsou zapojeny v procesech jako je aktivace a proliferace buněk, diferenciaci buněk, funkce imunitního systému, zároveň hrají roli v rakovinových a virových onemocněních (Maecker et al. 1997). U lidí se tetraspaniny exprimují ve všech typech buněk, z nichž každý obvykle exprimuje více členů rodiny (Levy & Shoham 2005a). Nicméně exprese není ve všech buňkách těla stejná, u některých buněk je omezená na určité buněčné typy nebo jejich vývojová stádia (Maecker et al. 1997).

Mnoho tetraspaninů je na jednom nebo více místech glykosylováno, zejména v oblasti LEL. Množství vzniklých glykosylovaných míst je u řady tetraspaninů důležité pro interakci s jinými tetraspaniny (Berditchevski 2001).

3.6.3 CD proteiny

Tetraspaniny CD81 i CD9 spolu s CD82 a CD63 se nacházejí prakticky ve všech tkáních člověka (Obrázek 12 a 13), na rozdíl od CD37, který je omezený na B-buňky nebo CD53 v lymphoidních a myeloidních buňkách (Fanaei et al. 2011; Maecker et al. 1997).



Obrázek 12. Relativní exprese RNA a proteinu CD9 v tkáních člověka (upraveno dle Uhlén et al. 2015).



Obrázek 13. Relativní exprese RNA a proteinu CD 81 v tkáních člověka (upraveno dle Uhlén et al. 2015).

3.6.4 Exprese proteinů CD9 a CD81 mimo reprodukční soustavu

CD81 a CD9 jsou tetraspaniny, které vytváří komplexní síť na povrchu buněk. Jsou schopní formovat homologní i heterologní partnerství ať už s dalšími tetraspaniny, nebo s adhezními molekulami, receptorovými molekulami a antigeny MHC (Hemler 2003; Levy & Soham 2005b). Velmi často tvoří CD9 a CD81 komplexy s integriny, kterým zabezpečují integrinovou signalizaci (Berditchevski & Odintsova 1999).

V této kapitole nebude věnována pozornost funkci proteinů v reprodukci, jelikož tato problematika byla popsána v kapitole 3.4.3.

3.6.4.1.1 HCV

Tetraspanin CD81 je receptor pro membránový glykoprotein E2 HCV (hepatitida C). Životní cyklus obalených virů vyžaduje interakci a fúzi virového lipidového obalu s membránami hostitelských buněk, intracelulární transport proteinových virových obalů a virových agens (Hassuna et al. 2009). Proteiny virového obalu podléhají konformačním změnám za účelem dosažení těsné blízkosti s membránou hostitelské buňky (Chernomordik & Kozlov 2008). Lidský CD81 zprostředkovává intracelulární transport obalových proteinů HCV a jejich začlenění do exozomů (Masciopinto et al. 2004). Exozomy jsou endosomálně odvozené vezikuly uvolňované do extracelulárního prostředí mnoha typy buněk a slouží k mezibuněčné komunikaci (Karp et al. 2017).

3.6.4.1.2 Imunitní systém

Během infekce HIV (virus lidské imunodeficiency) dochází k narušení buněčných pochodů v buňce a dochází k tvorbě syncytií neboli vícejaderných obřích buněk (Chowdhury et al. 1992). Tvorba syncytie je potlačena tetraspaniny (Weng et al. 2009). Protilátka Anti-CD81 usnadňuje vstup HIV-1 do lidských T-lymfoblastů, při současném působení protilátek anti-CD9 a anti-CD81 se zvyšuje tvorba syncytia indukovaného obalem HIV. Snížená exprese CD81 a CD9 zvýšila tvorbu syncytia, zatímco nadměrná exprese CD9, CD81 a CD63 měla inhibiční účinek (Gordon-Alonso et al. 2006; Kremmentsov et al. 2009). Dále mohou tyto tetraspaniny usnadnit únik viru z infikovaných buněk (Nydegger et al. 2006).

Tetraspaniny regulují virovou fúzi prostřednictvím ovlivnění přístupu virového fúzního aparátu do klíčových oblastí buněčné membrány. Přidání protilátky anti-CD9 vyvolalo shlukování CD9 v kontaktních oblastech buněk (Singethan et al. 2008).

V případě předčasného stop-kodonu v lidském LEL CD81 dojde ke snížení exprese CD19, která je na expresi CD81 extrémně závislá. CD19 je signální molekulou a interaguje s CD81 v B lymfocytech, což má za následek snížení prahové hodnoty reakce imunitního systému na antigeny a další podněty (van Zelm et al. 2010). Dále je CD81 přítomen v kompartmentech MHC třídy II a hraje roli při prezentaci antigenu imunitnímu systému (Secrist et al. 1996). Molekuly CD9 a CD81 také mají vliv na schopnost fúze makrofágů a monocytů, kterou inhibují (Takeda et al. 2003). Dle studie Nakazawa et al. (2008) je CD9 schopen potlačit metastáze nádorů prostřednictvím snížení shlukování destiček.

3.6.4.1.3 Myoblasty

Vývoj svalů u lidí začíná v pozdní embryogenezi, když se buňky myoblastů spojují dohromady v myotuby, jež jsou základem kosterního svalu. Dospělé svalové kmenové buňky mohou fúzovat s existujícími svalovými vlákny za účelem regenerace svalů (Chen et al. 2007; Karp et al. 2017).

Proteiny CD9 a CD81 mají pozitivní regulační roli ve fúzi myoblastů. Monoklonární protilátky anti-CD9 a anti-CD81 způsobovaly zpoždění fúze myoblastů a časnou degeneraci myotubů. Při společném použití obou protilátek se účinek znásobil. Lze detekovat silnou expresi CD9 na povrchu myoblastů divokého typu, ale u myoblastů, které mají vyblokováný gen pro $\beta 1$ integrin, je exprese minimální, což značí vliv mezi CD9 a $\beta 1$ integrinem při tvorbě myotubů (Schwander et al. 2003; Fanaei et al. 2011). Integriny jsou membránové proteiny zajišťující integritu tkání, adhezi buňka-buňka, přičemž jsou složeny z podjednotek a signální molekuly mezi buňkami vzájemně nebo buňkami a extracelulárním prostorem (Hynes 2002).

3.6.4.1.4 Nervový systém

CD9 je přítomen na paranodu a ovlivňuje tvorbu myelinu v periferní nervové soustavě. Při vyblokování genu CD9 došlo u myši k narušení spojení mezi myelinem a paranodem, což je komplex mezi myelinovou pochvou a Ranvierovým zářezem. CD9 tak ovlivňuje tvorbu myelinové pochvy, formaci myelinu v periferní nervové soustavě a význam má i v paranodálním spojení (Ishibashi et al. 2004). Interakce mezi CD81 a CD9 a integriny $\alpha 1$ a $\beta 6$ jsou nezbytné pro růst axonů neuronů (Schmidt et al. 1996; Stipp & Hemler 2000).

3.7 PCR

PCR je založena na replikaci nukleových kyselin. Díky PCR již není nutné klonování ve vektorech pro získání nepoškozeného segmentu DNA. Specifický úsek DNA, který má být klonován, je označen primery na obou vláknech DNA a vůči sobě jsou orientovány ve směru 3' (Šmarda et al. 2005). Primery hybridizují s opačnými vlákny DNA a slouží jako iniciační body pro syntézu nového vlákna DNA. Tuto syntézu katalyzuje DNA polymeráza (Degen et al. 2006). Během reakce dochází k syntéze vlákna DNA komplementární k původní molekule DNA ve směru od 5' konce ke 3' konci prostřednictvím DNA polymerázy. DNA polymeráz je několik druhů, ale pro PCR se používají termostabilní polymerázy, aby byly schopny odolat teplotám, při nichž DNA denaturuje (Šmarda et al. 2005). Většina DNA polymeráz je však polyfunkčních, kromě syntézy mají i funkci 5' a/nebo 3' exonukleázovou, což znamená, že je schopna odstranit nukleotidy v jednom nebo obou směrech (Degen et al. 2006). Nejhojněji využívaná je Taq polymeráza, která odolá výkyvům teplot během cyklu a cykly se tak mohou opakovat (Šmarda et al. 2005).

Celkem se v každé reakci opakují tři děje, jimiž je denaturace, annealing a elongace (Mullis & Faloona 1987). Jedná se o tři odlišné děje a je nutné každému kroku přizpůsobit požadovanou teplotu, kterou lze předem nastavit do jednotlivých časových úseků v termocykleru (Šmarda et al. 2005).

- Denaturace DNA probíhá při 94 °C (Šmarda et al. 2005). Dochází k rozvolnění ds DNA na jednotlivá vlákna, jelikož vodíkové vazby mezi dusíkatými bázemi jsou slabé, rozruší se teplotně. Vazby mezi deoxoribozou a fosfáty zůstávají

zachovány (Degen et al. 2006). Doba trvání je specifická, stejně tak teplota. Orientačně se délka denaturace pohybuje kolem 15 sekund (Innis & Gelfand 1990).

- Annealing neboli připojení primerů pracuje při teplotě nižší, v rozmezí 30-65 °C, aby nasedaly pouze primery, ale nedošlo k spojení obou vláken DNA (Šmarda et al. 2005). Určení ideální teploty annealingu záleží na sekvenci, množství a délce primerů (Innis & Gelfand 1990). Během PCR se nereplikuje celé vlákno DNA, ale jen určitý úsek o velikosti 100-35 000 bp, který ohraničují primery (Defen et al. 2006). Doba trvání annealingu se odvíjí opět od zvolené teploty, orientačně při 55 °C trvá 30 sekund (Innis & Gelfand 1990).
- Elongace. Po nasednutí primerů se teplota opět zvýší na 65-75 °C (Šmarda et al. 2005). Většinou je elongační teplota nastavena na 72 °C, což je ideální teplota pro práci Tag DNA polymerázy, která začne zabudovávat volné nukleotidy a syntetizovat vlákno DNA. Syntéza pokračuje ve směru 5' (Degen et al. 2006). Délka cyklu při 72 °C odpovídá 1,5 minutě. Elongace posledního cyklu probíhá 5 minut a poté je vzorek schlazen na 4 °C a reakce se zastaví (Innis & Gelfand 1990).

Jelikož vytvořené produkty se samy stávají templáty, počet kopií exponenciálně roste. Obecně se počty cyklů pohybují mezi 30 až 40 cykly (Degen et al. 2006). V případě 32 cyklového modelu je výsledkem až miliarda kopií vybraného úseku DNA během několika hodin (Šmarda et al. 2005).

Reakční pufr by měl obsahovat termostabilní DNA polymerázu, roztok dNTP (pH=7), magnéziové ionty a Tris-HCl buffer. Koncentrace magnézia ovlivňuje nasedání primerů, tvorbu primerových dimerů, specifitu produktu, teplotu denaturace vláken DNA a enzymovou aktivitu. Lze přidat KCl pro podporu annealingu případně bovinní sérový albumin pro podporu funkce DNA polymerázy, ale není to nutností (Innis & Gelfand 1990).

3.7.1 Primery

Primery jsou krátké úseky nukleotidů, jež nasedají na opačné konce templátu vyhraničující oblast, která se má replikovat a umožňují nasednutí a funkci DNA polymerázy. Funkčnost a výtěžnost PCR velmi závisí na správně zvolených primerech, které se naváží na templát při teplotě anelingu a dávají základ prodlužujícímu se řetězci při elongaci (Dieffenbach et al. 1995; Bermingham & Luetlich 2003).

Primery jedinečné pro hledanou sekvenci, jež má být amplikována, by měly splňovat jistá kritéria, jako je délka primeru (ideálně 18-30 nukleotidů), poměr CG bází, 5' koncová stabilita, 3' koncová specificita, teplota anelingu, teplota tání a jiné (Wu et al. 1991; He et al. 1994; Dieffenbach et al. 1995). Špatně navržený primer může mít za následek nespecifické amplifikace nebo tvorbu dimerů, které mohou převržit svým množstvím templát a zmaření celé PCR reakce (Dieffenbach et al. 1995).

Délka primeru je velmi důležitým parametrem pro PCR, odvíjí se od něj specificita produktu, teplota a čas anelingu a celková výtěžnost reakce. Minimální délka by měla dosahovat 18 nukleotidů, aby se minimalizovala možnost sekundární hybridizace a sekvence byla jedinečná. Důležité také je vyhnout se repetícím, zejména 4 a více C a G bází v řadě,

přičemž obsah CG bází by měl dosahovat 50-60 %. V případě obsahu CG bází pod 50 % je nutné primer prodloužit na více než 18 nukleotidů, aby bylo možné dodržet teplotu tání (Dieffenbach et al. 1995; Kamel 2003). Primery by měly být „lepivější“ na svých 5' koncích než na svých 3' koncích. "Lepivý" 3' konec, tedy konec s vyšším obsahem GC bází, by mohl potenciálně nasednout na více místech na templátové DNA, což je nežádoucí (Kamel 2003).

Teplota tání (T_m) je teplota, při které se rozruší vodíkové můstky mezi primerem a řetězcem DNA. Slouží pro kontrolu nespecifické amplifikace a odvíjí se od výše zmíněné délky primerů, procentuálního zastoupení CG bází, sekvence a dalších (Reed et al. 2007). Optimální teplota tání se pohybuje v rozmezí 52-58 °C, při teplotách vyšších nad 65 °C hrozí riziko sekundárního annelingu (Kamel 2003). Lightcykler detekuje fluorescenční signály v různé škále teplot v rámci cyklu. Křivka pak znázorní průběh amplifikace. V případě vzniku primer-dimerů či jiných nežádoucích struktur Lightcykler detekuje vyšší signál, jelikož tyto nespecifické produkty mívají nižší teplotu tání oproti produktům specifickým (Kaltenboeck & Wang 2005).

3.7.2 qRT-PCR

Reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce, ve zkratce RT-PCR, využívá ke sledování produktů amplifikace fluorescenční molekuly během všech cyklů PCR reakce (Bustin et al. 2005). qRT-PCR (kvantifikační RT-PCR v reálném čase) je citlivá, specifická, reprodukovatelná a s použitím příslušných standardních křivek výrazně zjednodušuje a urychluje proces kvantifikace mRNA (Bustin 2000). Díky qRT-PCR je možno detekovat a amplifikovat sekvence málo stabilních RNA (Degen et al. 2006). Využívá reverzní transkripcí k přepisu RNA do DNA, retrovirovou zpětnou transkriptázou, a dále je využita termostabilní DNA polymeráza k amplifikaci vybrané sekvence (Degen et al. 2006; Šmarda et al. 2005).

Kvantifikace produktů je důležitá při analýze genových expresí či při diagnostikách aj. Kvantifikace produktů při qRT-PCR je založena na detekci a kvantifikaci fluorescenčního signálu. V okamžiku, kdy se amplifikuje adekvátní množství produktů, termocykler zachytí signál fluorescence, která s dalšími cykly exponenciálně stoupá.

Díky hodnotě C_q lze určit počet cyklů potřebných k vytvoření detekovatelného množství produktu. Je nutné, aby vstupní materiál byl vždy ve stejném množství. K standardizaci výsledků je výhodné použít qRT-PCR genu, u kterého je známo, že se exprimuje v podobné míře ve většině buněk (house keepingový gen). Poté je možné sledovat rozdíly v expresi mezi různými geny (Šmarda et al. 2005).

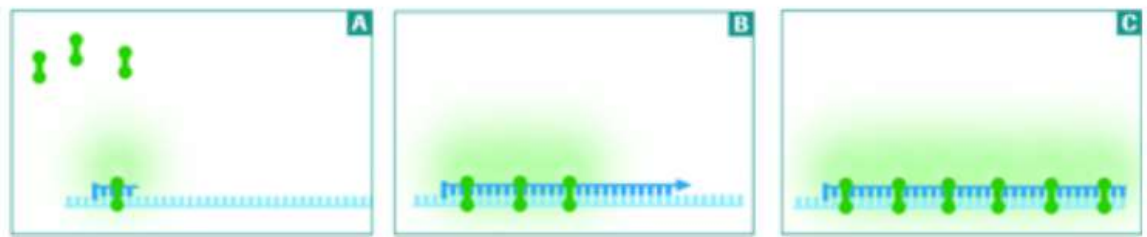
3.7.3 Fluorescenční analýza SYBR Green I

Produkty PCR jsou fluorescenčně značeny. S rostoucím množstvím produktů roste i jejich fluorescence a tvoří křivku, jež má tři fáze: fáze ranného pozadí, exponenciální růstová fáze a fáze plató. Lze tak sledovat koncentraci produktů v reálném čase. K exponenciální fázi dochází v době, kdy se amplifikuje dostatečné množství produktu, aby mohlo být detekováno nad pozadím. Zahrnuje v průměru jen čtyři až šest cyklů a pokračuje, dokud účinnost reakce nestoupá po fázi plató (vrchol) (Degen et al. 2006).

Značení vázající se na jakoukoliv dvouřetězovou DNA nezávisle na sekvenci využívají fluorofory, nejčastěji SYBR Green I. Při použití SYBR Green dochází k výrazné fluorescenci,

když se SYBR Green I naváže na ds DNA, díky změnám konformací v barvivo (Degen et al. 2006). Jedná se až o tisícínásobné zvýšení fluorescence (Šmarda et al. 2005). Fluorescence je měřena na konci každého cyklu. Jelikož nedochází k vazbě na jednovláknovou DNA, během denaturace nedochází k emitaci světla (Obrázek 14).

Nelze však rozlišit nespecifické produkty a jiné ds DNA, které neodpovídají produktu, tudíž výsledná koncentrace nemusí být vždy přesná. Tento problém lze minimalizovat provedením analýzy křivky tání, která odliší nespecifické produkty (Degen et al. 2006). Při použití primerů se značením specifickými fluorofory, mohou být zhaseny nespecifické signály díky dimerům-primerů (Šmarda et al. 2005).



Obrázek 14. Princip fluorescence SYBR Green I v průběhu cyklu. Oddíl A značí začátek syntézy nového řetězce od místa dosednutí primeru. Syntéza pokračuje v oddílu B a fluorescence z vázaného barviva se zvyšuje. Oddíl C značí konec elongace, jedná se o ds DNA s maximálně navázaným barvivem, a tedy i maximálním signálem pro daný cyklus PCR (Degen et al. 2006).

3.7.4 Reverzní transkripce

Molekulu RNA není možné použít jako templát pro PCR RNA, tudíž prvním krokem qRT-PCR je přepis RNA do cDNA, která je více stabilní a lze ji dlouhodobě uchovávat (Bustin 2000). Enzym reverzní transkriptáza pro přepis RNA do cDNA je termolabilní a přestává být funkční již při 42 °C, proto se využívá spíše RNA dependentní DNA polymerázy, které pracují i při 72 °C a je ji tedy možné použít i pro PCR. Aby byla výtěžnost reakce co největší, je nutné použít transkriptázu bez RNázyH aktivity (Udvardi et al. 2008).

Prvním krokem je využití oligo (dT) primerů (nebo hexanukleotidů) pro specifickou vazbu na polyA konec mRNA. Lze využít i dva specifické primery, ale musí být možno odlišit produkty RT-PCR oproti standardní PCR. Produkt RT-PCR je menší než genomová DNA, pokud se primery navrhne tak, aby se exony ohraničily na obou stranách v oblasti intronů. Další možnost je primery navrhne tak, aby nasedaly na spojení mezi exony, poté nedojde k žádné amplifikaci genomové DNA (Šmarda et al. 2005).

3.7.5 Genová exprese

Gen je označován jako jednotka dědičné informace, která je realizována prostřednictvím syntézy proteinů. Všechny geny eukaryotických organismů jsou obsaženy v jádru a v mitochondriích (Augustyn et al. 2019).

Všechny geny nemají stejnou míru exprese, napříč živočišnou i rostlinou řídí se exprese velmi liší. Geny eukaryotních organismů jsou regulovány nezávisle. Vyšší organismy mají mnoho možností regulace exprese často prostřednictvím přítomnosti nebo absence nějakého z transkripčních faktorů. Transkripční faktory se vážou k promotoru nebo k regulační oblasti genu a regulují transkripci. Zároveň existuje možnost různých úprav primárních transkriptů pro produkci různých mRNA. Expresi lze ovlivňovat i na postranlační a translační úrovni (Augustyn et al. 2019).

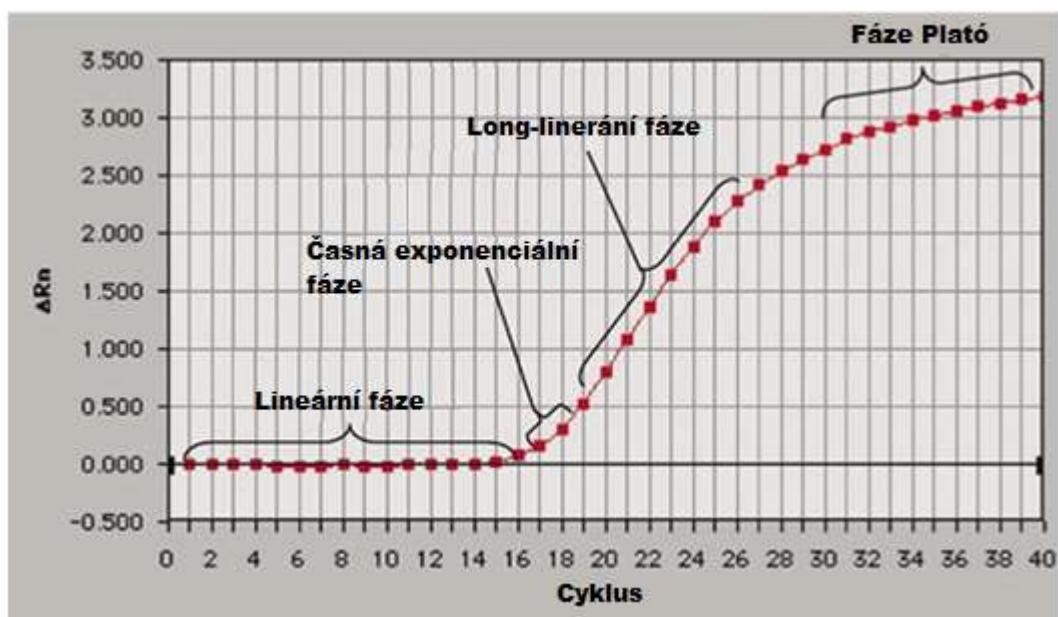
3.7.6 Vyhodnocení míry exprese genů

Expresi genů je relativní, a proto se využívá k jejímu vyhodnocení tzv. house keepingových genů (Pfaffl 2001). House keepingové geny (např. β -aktin) jsou takové geny, které jsou vždy exprimovány ve všech tkáních a jsou důležité k udržení bazálních buněčných funkcí a buňka by bez nich nepřežila (Watson et al. 1987; Eisenberg & Levanon 2013). Zároveň se house keepingové geny nachází v oblastech, které nepodléhají příliš často mutacím a vyvíjejí se pomaleji oproti jiným genům (Zhang & Li 2004).

Během PCR je amplifikace požadovaného úseku DNA znázorněna pomocí fluorescenčního signálu. Hodnota C_q udává počet cyklů, které je potřeba překročit, aby mohlo dojít k signálu fluorescence (fáze plató) (Obrázek 15). Zároveň je nepřímo úměrná množství amplifikovaného úseku DNA, tedy čím více je amplikonů ve vzorku po dokončení PCR, tím je hodnota C_q menší (Pfaffl 2004; Pfaffl 2006).

Pomocí parametru ΔC_q lze porovnat dva vzorky za využití house keepingového (referenčního) genu. ΔC_q lze vypočítat odečtením C_q house keepingového genu od C_q sledovaného genu (Perkins et al. 2012).

K přesnějšímu výpočtu kvantifikace RT-PCR je zapotřebí hodnota efieience (E), jež je definována jako zlomek cílových molekul, které jsou kopírovány v jednom cyklu PCR. Tedy v ideálním případě 2^n , kdy n je počet cyklů reakce. Tohoto stavu ale většinou není dosaženo a účinnost reakce je většinou nižší. V případě nepřítomnosti interferujících látek v matrici vzorku by se měla cílová DNA amplifikovat alespoň s 90% účinností (Lalam 2006; Perkins et al. 2012; Labguide 2014).



Obrázek 15. Amplifikační křivka znázorňující průběh každého cyklu PCR pomocí emitace fluorescence. Lze ji rozložit do 4 fází. Data z těchto fází jsou důležitá pro vyhodnocení celkové hodnoty C_q (upraveno dle Wong & Medrado 2005).

4 Metodika

4.1 Biologický materiál

Díky katedře KVD byly získány vzorky tkání pro tuto analýzu. Jednalo se o varlata pěti hřebců, která byla odebrána během kastrace veterinárním lékařem. Z každého varlete byly odebrány vzorky těchto tkání: *testes* (T), *caput epididymis* (C1), *corpus epididymis* (C2) a *cauda epididymis* (C3) (Tabulka 1). Každý ze vzorků tkáně byl odebrán ve dvou biologických replikátech (A, B) a velikost vzorků byla přibližně 4cm². Po dobu přepravy byly vzorky uloženy na suchém ledu a po příjezdu byly uchovávány při teplotě -80 °C. Z obou biologických replikátů byla nezávisle izolovaná RNA a dále přepsaná cDNA. Celkem bylo 40 vzorků cDNA, které byly hodnoceny qRT-PCR na základě třech technických replikátů.

Tabulka 1. Označení tkání hřebců.

Hřelec	Testes		Epididymis					
			Caput		Corpus		Cauda	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	Ta	Tb	C1a	C1b	C2a	C2b	C3a	C3b
2	Ta	Tb	C1a	C1b	C2a	C2b	C3a	C3b
3	Ta	Tb	C1a	C1b	C2a	C2b	C3a	C3b
4	Ta	Tb	C1a	C1b	C2a	C2b	C3a	C3b
5	Ta	Tb	C1a	C1b	C2a	C2b	C3a	C3b

4.2 Izolace RNA ze vzorků varlete a nadvarlete

Pro veškerou manipulaci se vzorky a RNA bylo nutné použít plast RNáza-free. Rukavice a pracovní plochy uvnitř laboratoře, kde probíhala manipulace s RNA, byly vydesinfikovány přípravkem RNase free RNaseZAP TM (Sigma). Stejně tak použité laboratorní nástroje jako pipety, skalpely a pinzety byly tímto přípravkem ošetřeny a vyautoklávovány.

4.2.1 Příprava materiálu

Vzorky hřebčích varlat a nadvarlat byly zmrazeny v kapalném dusíku, a následně odváženy po 25-40 mg a vloženy do sterilních polypropylenových zkumavek. Pro uchování nepoškozené struktury RNA byly vzorky opět zmrazeny v kapalném dusíku a skladovány při teplotě -80°C.

4.2.2 Izolace RNA

Pro izolaci celkové RNA byl použit kit Gen Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep (Sigma).

Vzorky (25-40 mg) byly vyjmuty z tekutého dusíku (stále zmrzlá tkáň) a vloženy do polypropylenové zkumavky. Následovalo rychlé přidání 300 µl lyzačního roztoku Lysis Solution/2-ME a vzorek byl homogenizován ve vibrační třepačce, kde byl ponechán po dobu 180 s. Vzniklá pěna byla ze vzorku odstraněna v centrifuzě při 10 000 x g po dobu 1 minuty. K homogenizátu bylo přidáno 590 µl RNáza-free H₂O a 5 µl proteinázy K, která rozložila veškeré bílkoviny buňky. Vzorek byl zvortexován a byl 10 minut inkubován při 55 °C v termocykleru.

700 µl vzorku bylo přeneseno na filtr, který byl umístěn v 2ml zkumavce. Následovala centrifugace při 13 000 x g po dobu 2 minut. Filtrát byl přenes do další 2ml zkumavky, na filtr byl přenesen zbytek vzorku a opět proběhla centrifugace při 13 000 x g po dobu 2 minut. Filtráty byly spojeny a umístěny na led. K získanému filtrátu bylo přidáno 450 µl ethanolu, vázacího roztoku, a vzorek byl důkladně promíchán ve vortexu. 700 µl lyzátu/ethanol bylo přeneseno na vazebnou kolonku a následně centrifugováno při 13 000 x g po dobu 15 s. Stejný postup byl aplikován na zbytek filtrátu. Po každé centrifugaci byl vylit zbytek filtrátu, kolonka osušena sterilní buničinou a RNA byla zachycena na kolonce.

Na kolonku bylo přeneseno 250 µl promývacího roztoku Wash Solition I a vzorek byl centrifugován při 13 000 x g po dobu 15 s. Kapalina byla slita a zkumavka osušena sterilní buničinou. Kolonka byla vrácena do osušené zkumavky a na kolonku bylo přeneseno 10 µl DNázy a 70 µl pufru DNázy za účelem degradace přebytečné DNA. Vzorek se nechal inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě a následovalo opět promytí vzorku 250 µl Wash Solition I s následnou centrifugací při 13 000 x g po dobu 15 s. Kolonka byla přemístěna do nové zkumavky a bylo na ni přeneseno 500 µl Wash Solition II. Vzorek se centrifugoval při 13 000 x g po dobu 15 s, kapalina byla slita a opět bylo přidáno 500 µl Wash Solition II s následnou centrifugací při 13 000 x g po dobu 2 minut (do sucha), během které byl z kolonek odstraněn přebytečný promývací roztok.

Vysušená kolonka byla přesunuta do nové 2ml zkumavky a na povrch bylo přeneseno 50 µl Elution Solution (eluční pufr), který vyvázal RNA z kolonky do pufru. Následovala finální centrifugace při 13 000 x g po dobu 1 minut.

4.2.3 Výpočet výtěžnosti izolované RNA

Pro kvantifikaci izolované RNA byl použit UV spektrofotometr (NanoPhotometer, Implen) a byla provedena spektrofotometrická analýza. Spektrofotometr byl kalibrován pomocí 3 µl Elution Solution. Následně byly nanесeny 4 µl pipetou lehce promíchaného vzorku. Výtěžnost izolované RNA byla vyhodnocena pomocí parametrů A_{260/A280} a A_{260/A230}.

4.3 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce, tedy syntéza cDNA z izolované RNA, byla uskutečněna pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche).

K 12 μl RNA byl přidán 1 μl polyT primeru a následovalo zahřátí vzorku na 60 °C v termocykleru po dobu 10 minut, při kterém došlo k denuraci. Ihned poté byl vzorek zchlazen, aby nedošlo k vzniku sekundárních struktur molekul RNA. Dále byl přidán Master mix, který obsahoval: 4 μl RT pufru (Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer), 0,5 μl protektoru (Protector RNase Inhibitor), 2 μl směsi deoxynukleotidů a 0,5 μl reverzní transkriptázy (Transcriptor Reverse Transcriptase). Směs byla lehce promíchána pipetou a následně inkubována v termocykleru po dobu 60 min při teplotě 50 °C, přičemž probíhala reverzní transkripce.

Výsledná cDNA byla uchována při -80°C. Při qRT-PCR byly vzorky cDNA naředěny tak, aby 1 μl roztoku obsahoval množství cDNA odpovídajícímu množství cDNA vzniklé z 0,75ng celkové RNA.

4.4 Navrhování primerů

Bylo navrženo pět primerových párů pro každý CD gen (CD81 a CD9) a jeden pár pro house keepingový gen β -aktin (ACTB). Každý z pěti primerů nasedá do různých exonů CD genů. Pro vlastní analýzu bylo potřeba vybrat jeden primerový pár pro gen CD9 a jeden primerový pár pro gen CD81.

Pro navržení primerů bylo využito programu Primer3 Input 0.4.0 (Rozen & Skaletsky 2000). Specifické nasedání primerů v genomu *Equus caballus* byla ověřena prostřednictvím programu Primer BLAST, jež patří pod mezinárodní databázi NCBI (dostupný na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Bylo ověřeno, že primery nasedají na jedinečné místo v genomu *Equus caballus*.

Pro gen CD9 byla použita referenční sekvence *Equus caballus* 3.0 NC_009149.3, chromozomu 6 plemene plnokrevník, izolátu Twiligh (Obr.).

Pro gen CD 81 byla použita referenční sekvence *Equus caballus* 3.0 NC_009155.3, chromozomu 12, plemene plnokrevník, izolátu Twiligh (Obr.).

Pro house keepingový gen ACTB byla použita referenční sekvence *Equus caballus* 3.0 NC_009156.3, chromozomu 13, plemene plnokrevník, izolátu Twiligh (Obr.) (Ye et al. 2012).

4.4.1 Pozice primeru v referenčním genomu koně domácího

Následující data (Obrázek 16;17;18;19) zobrazují umístění navržených primerů genu CD9, CD81 a ACTB v jednotlivých exonech, jejich délku, sekvenci, T_M , % GC bází a komplementaritu (Ye et al. 2012).

Sequence (5'->3') Length Tm GC% Self complementarity Self 3' complementarity

Forward primer GCTGGAAATCGGGTCCCTT 18 60.13 61.11 4.00 0.00

Reverse primer CTGTGTAGAAGCTTGAATTATTATTTT 27 56.48 29.63 6.00 3.00

Products on target templates

>NC_009149.3 Equus caballus isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 6, EquCab3.0

product length = 108
 Forward primer 1 GCTGGAAATCGGGTCCCTT 18
 Template 34817242 34817259
 Reverse primer 1 CTGTGTAGAAGCTTGAATTATTATTTT 27
 Template 34817341 34817315

1

Sequence (5'->3') Length Tm GC% Self complementarity Self 3' complementarity

Forward primer CTGGATTGCTGTGGTATCGTTG 22 59.65 50.00 3.00 0.00

Reverse primer CGTTGTGAAGCTTGAGAGTACATCC 25 61.86 48.00 6.00 2.00

Products on target templates

>NC_009149.3 Equus caballus isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 6, EquCab3.0

product length = 87
 Forward primer 1 CTGGATTGCTGTGGTATCGTTG 22
 Template 34826101 34826122
 Reverse primer 1 CGTTGTGAAGCTTGAGAGTACATCC 25
 Template 34826187 34826163

2

Sequence (5'->3') Length Tm GC% Self complementarity Self 3' complementarity

Forward primer AAGGATATCCAGGAATTTTACAAGGA 26 58.12 34.62 8.00 2.00

Reverse primer ATAGTGATGGCTTTTCAGCGTCT 23 62.01 47.83 3.00 2.00

Products on target templates

>NC_009149.3 Equus caballus isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 6, EquCab3.0

product length = 90
 Forward primer 1 AAGGATATCCAGGAATTTTACAAGGA 26
 Template 34825873 34825898
 Reverse primer 1 ATAGTGATGGCTTTTCAGCGTCT 23
 Template 34825962 34825940

3

Obrázek 16. Gen CD9, forwardový a reverzový primer 1-3 (Ye et al. 2012).

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTGGATTGCTGTGGTATCGTTG	22	59.65	50.00	3.00	0.00
Reverse primer	CGTTGTGAAGCTTGAGAGTACATCC	25	61.86	48.00	6.00	2.00

Products on target templates

>NC_009149.3 Equus caballus isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 6, EquCab3.0

```

product length = 87
Forward primer 1 CTGGATTGCTGTGGTATCGTTG 22
Template 34826101 ..... 34826122
Reverse primer 1 CGTTGTGAAGCTTGAGAGTACATCC 25
Template 34826187 ..... 34826163

```

4

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCATCAAGGAGGTCTTCGACAA	22	60.03	50.00	4.00	2.00
Reverse primer	ATCACCCACAGCAATCCCGATG	21	60.75	52.38	4.00	2.00

5

>NC_009149.3 Equus caballus isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 6, EquCab3.0

```

product length = 70
Forward primer 1 CCATCAAGGAGGTCTTCGACAA 22
Template 34826810 ..... 34826831
Reverse primer 1 ATCACCCACAGCAATCCCGATG 21

```

Obrázek 17. Gen CD9, forwardový a reverzový primer 4 a 5 (Ye et al. 2012).

Sequence (5'→3') Length Tm GC% Self complementarity Self 3' complementarity

Forward primer GCCGGAGGTGTGATCCTG 18 59.81 66.67 4.00 1.00

Reverse primer TCCAAGCTCCAGATAGAGGAGGT 23 61.99 52.17 4.00 2.00

1

Products on target templates

>[NC_009155.3](#) Equus caballus isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 12, EquCab3.0

Product Length = 81

Forward primer 1 GCCGGAGGTGTGATCCTG 18

Template 34625480 34625497

Reverse primer 1 TCCAAGCTCCAGATAGAGGAGGT 23

Template 34625560 34625538

Sequence (5'→3') Length Tm GC% Self complementarity Self 3' complementarity

Forward primer GCATCTACATCCTCATTGGCTGTG 23 59.75 47.83 4.00 2.00

Reverse primer AGCAGGCAC TGGGACTCCTG 20 64.01 65.00 5.00 3.00

2

Products on target templates

>[NC_009155.3](#) Equus caballus isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 12, EquCab3.0

Product Length = 91

Forward primer 1 GCATCTACATCCTCATTGGCTGTG 23

Template 34628448 34628470

Reverse primer 1 AGCAGGCAC TGGGACTCCTG 20

Template 34628538 34628519

Sequence (5'→3') Length Tm GC% Self complementarity Self 3' complementarity

Forward primer AAGCAGTTCTACGACCGAGCATT 23 62.44 47.83 3.00 1.00

Reverse primer CGTCTCATGGAAAGTCTTCACC 22 60.68 54.55 6.00 2.00

3

Products on target templates

>[NC_009155.3](#) Equus caballus isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 12, EquCab3.0

Product Length = 90

Forward primer 1 AAGCAGTTCTACGACCGAGCATT 23

Template 34629824 34629846

Reverse primer 1 CGTCTCATGGAAAGTCTTCACC 22

Template 34629913 34629892

Obtázek 18. Gen CD81, forwardový a reverzový primer 1-3 (Ye et al. 2012).

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTGGCTCCAGCAGCTGAC	19	63.86	68.42	6.00	2.00
Reverse primer	AATAAGTTGGTGAGGACGCTGCT	23	62.44	47.83	3.00	2.00

4

>NC_009155.3 Equus caballus isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 12, EquCab3.0

```

product length = 88
Forward primer 1      GTGGCTCCAGCAGCTGAC 19
Template         1      34630369 ..... 34630387
Reverse primer 1      AATAAGTTGGTGAGGACGCTGCT 23
Template         1      34630456 ..... 34630434

```

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAGACTGCCACCAGAGGATCGAC	23	64.12	56.52	4.00	2.00
Reverse primer	GATCACCGCCACCACGAGAT	18	59.81	61.11	4.00	2.00

5

>NC_009155.3 Equus caballus isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 12, EquCab3.0

```

product length = 83
Forward primer 1      AAGACTGCCACCAGAGGATCGAC 23
Template         1      34630985 ..... 34631007
Reverse primer 1      GATCACCGCCACCACGAGAT 18
Template         1      34631067 ..... 34631050

```

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

ACTB

>NC_009156.3 Equus caballus isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 13, EquCab3.0

```

product length = 104
Forward primer 1      AGTGTGACGTCGACATCCGTAAG 23
Template         1      4382712 ..... 4382690
Reverse primer 1      TGTGATCTCCTTCTGATCCTGT 23
Template         1      4382609 ..... 4382631

```

Obrázek 19. Gen CD81, forwardový a reverzový primer 1-3, primery genu ACTB (Ye et al. 2012).

4.5 qRT-PCR

Pro amplifikaci cDNA byl použit termocykler LightCycler Nano Instrument (Roche) a kit FastStart Essential DNA Green Master (Roche), který obsahuje: FastStart SYBR Green Master, 2x koncentrovaný master mix obsahující FastStart Taq DNA polymerázu, reakční pufr, nukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) a SYBR Green I.

Premix obsahoval: 5 μ l mastermixu, 0,5 μ l forwardového primeru o koncentraci 10 μ M, 0,5 μ l reverzového primeru o koncentraci 10 μ M. Premix byl nanesen do jednotlivých jamek stripů v množství 6 μ l. Dále byly přidány 4 μ l cDNA o koncentraci 0,75 ng/1 μ l do každé z jamek stripu. House keepingový gen ACTB byl amplifikován také a negativní kontrolou byla PCR H₂O o shodném objemu jako cDNA.

qRT-PCR reakce byla provedena následovně: polymeráza byla aktivována teplotou 95 °C po dobu 10 minut, rychlost změny teploty byla 5 °C/s; denaturace probíhala při teplotě 95 °C po dobu 20 s, rychlost změny teploty byla 5 °C/s; annealing probíhal při teplotě 64 °C po dobu 20 s, rychlost změny teploty byla 4 °C/s a elongace probíhala při 72 °C po dobu 20 s, rychlost změny teploty byla 5 °C/s. Celkem proběhlo 45 cyklů, jež zahrnovaly kroky: denaturace, annealing a elongace (bez aktivace polymerázy).

4.6 Výběr primeru pro vlastní analýzy

Při výběru páru primerů pro gen CD9 a CD81 byly na primery kladeny určité požadavky. Požadavky na primery vyplývají z:

- analýzy teploty tání – křivka musí představovat jeden symetrický peak.
- separace na elektroforéze – vykazují jeden specifický amplikon o očekávané velikosti vyplývající z návrhu primerů.
- eficiency amplifikace párů primerů CD genů a house keepingového genu si musí být velice podobné s minimálními odchylkami.
- osekvenování amplikonů – sekvenace amplikonů musí odpovídat vybraným CD genům a house keepingovému genu.

Primerový pár, který nejvíce odpovídal výše zmíněným požadavkům, byl vybrán pro analýzu exprese genů CD9 a CD81.

4.6.1 Ověření specifčnosti amplikonů pomocí analýzy teploty tání

Analýza teploty tání byla provedena u všech tkání koně 1, všech pěti párů navržených primerů pro každý CD gen a také pro house keepingový gen ACTB pomocí termocykleru LightCycler Nano (Roche). Nejprve byly amplikony zahřáty na teplotou 60 °C po dobu jedné hodiny. Rychlost změny teploty byla 4 °C/s. Poté se rychlost změny teploty zpomalila na 0,1 °C/s a amplikony byly zahřáty na teplotu 95 °C. Tato teplota byla konstantní po dobu 20 s. Na základě průběhu křivek byla hodnocena amplifikace a její specifčnost.

4.6.2 Ověření specifčnosti amplikonů pomocí elektroforézy

Získané amplikony u jednotlivých primerových párů byly separovány v 3% agarózovém gelu v TBE pufru a obarveny pomocí ethidium bromidu. Specifčnost amplifikace byla ověřena u vzorku koně 2, tkáně *testes*, biologického replikátu A.

Vzorek obsahoval: 10 µl RT-PCR produktu, 8 µl H₂O a 2 µl barviva. Poté byl vzorek nanesen do kolonek gelu, který byl vložen do systému horizontální elektroforézy. Elektroforéza probíhala 61 min při napětí 120 V. Velikost amplikonů byla vyhodnocena na základě srovnání s velikostním standartem.

4.6.3 Výběr primerů na základě eficiency

Efficiency byla stanovena u vzorku hřebce 2, tkáně *testes* a biologického replikátu A na základě ředící řady s následujícími množstvími teplátové cDNA v reakčních směsích o objemu 10 µl: 312,5 pg; 1250 pg; 5000 pg; 20 000 pg cDNA. Program termocyklu LightCycler Nano (Roche) stanovil hodnotu efficiency dle této ředící řady.

S jednotlivými vzorky ředící řady cDNA byla provedena qRT-PCR a pro každé ředění byla získána C_q hodnota. Na základě získaných hodnot byla vytvořena standardní křivka, která vznikla propojením C_q hodnot s hodnotami daných ředění. Pomocí hodnoty sklonu křivky byla vypočtena efficiency reakce dle vzorce (Labquide 2014):

$$E = (10^{(-1/\text{Slope})} - 1) \times 100$$

Efficiency amplifikace musela být u obou CD genů a house keepingového genu *co* nejpodobnější.

4.6.4 Sekvenční analýza

Sekvenace proběhla u vzorku hřebce 2, tkáně *testes*, biologického replikátu A. Byly sekvenovány amplikony vzniklé při použití navržených primerových párů, které splňovaly všechny výše uvedené požadavky (primerové páry F4 a R4 pro gen CD9, F2 a R2 pro gen CD81 a ACTB R a F). Sekvenován byl i house keepingový gen ACTB.

4.6.4.1 Čištění RT-PCR produktů

Amplikony vzniklé při použití navržených primerových párů byly z gelu vyizolovány pomocí MinElute PCR Purification Kit (Qiagen). Cílem čištění bylo odstranění nezabudovaných nukleotidů, zbytků primerů a teplátové DNA.

Sterilním skalpelem byla vyjmuta co nejmenší oblast gelu obsahující DNA fragment. Vyříznutý vzorek byl zvážen a vložen do 1,5ml zkumavky. V poměru 1:1 byl přidán Binding Buffer a směs byla inkubována při 50 °C do momentu, kdy byl gel zcela v kapalném stavu. Poté bylo 800 µl směsi gelu a pufru přeneseno na kolonku ve zkumavce. Následovala centrifugace při 12 000 x g po dobu 1 minuty. Tekutina ve zkumavce byla vylita, zkumavka osušena a kolonka vrácena do zkumavky. Na kolonku bylo nanášeno 100 µl Binding Bufferu, opět následovala centrifugace při 12 000 x g po dobu 1 minuty a vylití tekutiny ve zkumavce. Dále bylo na kolonku přeneseno 700 µl Wash Bufferu. Vzorek byl centrifugován při 12 000 x g po dobu 1 minuty. Tekutina byla opět slita. Následovala další centrifugace vzorku při 12 000 x g po dobu 1 minuty, aby se vzorek pročistil od zbylého promývacího pufru. Na kolonku bylo

naneseno 25 μl H_2O ($\text{pH}=8,1$) a vzorek se nechal inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 2 minut. Poté byl stočen v centrifuze při 12 000 x g po dobu 1 minuty. Ve zkumavce zůstala DNA zbavená nečistot.

Vzorek DNA byl kvantifikován stejným postupem jako při izolaci RNA pomocí NanoPhorometeru, nicméně přístroj byl kalibrován 3 μl H_2O , jelikož H_2O byla použita jako eluční roztok při izolaci DNA z gelu.

4.6.4.2 Sekvence

Sekvence amplikonů byla provedena ve 3 replikátech od obou CD genů a ACTB genu pomocí kitu The BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) a kapilární elektroforézy ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Následně byly výsledné sekvence srovnány s NCBI (mezinárodní nukleotidová databáze) pomocí programu BioEdit version 7.2.5 (Hall 1999).

4.7 Stanovení parametru Ratio ΔC_q

Parametr Ratio ΔC_q byl vyhodnocen pomocí termocykleru LightCycler Nano (Roche). Pro následné statistické vyhodnocení byla data zaznamenávána v programu Microsoft Excel, kde byly souběžně vypočteny parametry ΔC_q . Hodnoty Ratio ΔC_q zobrazují míru exprese genu CD9 a CD81 normalizované k house keepingovému genu ACTB. Rozdíl mezi C_q cílového genu (target) a C_q house keepingového genu (hg) se označuje jako ΔC_q vzorku (Rao et al. 2013):

$$\begin{aligned} \text{C}_q(\text{target}) - \text{C}_q(\text{hg}) &= \Delta\text{C}_q \\ \text{C}_q(\text{CD9/CD81}) - \text{C}_q(\text{ACTB}) &= \Delta\text{C}_q \\ \text{Ratio } \Delta\text{C}_q &= 2^{-\Delta\text{C}_q} \end{aligned}$$

4.8 Statistické zpracování výsledků

V rámci experimentu byly získány hodnoty Ratio ΔC_q , které normalizují relativní expresi CD genů k expresi house keepingového genu. Jejich variabilita mohla být ovlivněna následujícími efekty: CD gen, tkáň, hřebec, biologický replikát.

Normalita rozdělení byla testována na základě Kolmogorova–Smirnovova testu homogenity (graficky znázorněného histogramem) a pomocí p-grafu. Homogenita rozptylů pro jednotlivé efekty byla hodnocena pomocí Levenova testu. Tyto testy určené pro splnění předpokladu analýzy rozptylu byly hodnoceny na hladině významnosti $\alpha=0,05$.

Pro určení, které z výše uvedených efektů hrají statisticky významnou roli ve variabilitě hodnot ΔC_q , byla použita GLM-ANOVA hlavních efektů ($\alpha =0,05$). Výsledky ANOVY byly hodnoceny graficky v podobě krabicových grafů s vyznačeným 0,95 intervalu spolehlivosti. U efektů, které představovaly statisticky významný vliv na variabilitu bylo provedeno podrobné vyhodnocení ANOVY (post-hoc) pomocí Tukeyova HSD testu ($\alpha =0,05$) s grafickým vyjádřením pomocí homogenních skupin. Pro všechny statistické analýzy byl použit program Dell Statistika version 13.

5 Výsledky

5.1 Kvantifikace totální RNA

Tabulka 2 (části 1 a 2) znázorňuje výsledné hodnoty absorbance a koncentrace izolované RNA vyhodnocené pomocí UV spektrofotometru. Tyto hodnoty byly vyhodnoceny u všech odebraných vzorků a pohybují se v rozmezí $A_{260/280} = 1,81-2,21$ a $A_{260/230} = 1,85-2,25$.

Tabulka 2/1. Výsledné hodnoty koncentrace a absorbance u vzorků koně 1, 2 a 3.

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

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

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

Tabulka 2/2. Výsledné hodnoty koncentrace a absorbance u vzorků koně 4 a 5.

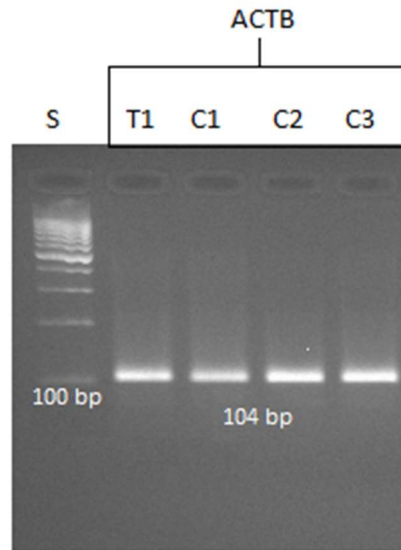
Kůň 4	Koncentrace RNA ng/μl	A260/280	A260/230
C1a	53	1,90	2,03
C1b	41	2,16	2,22
C2a	40	1,93	2,01
C2b	47	1,95	1,99
C3a	25	1,87	1,89
C3b	32	2,01	1,85
Ta	31	1,96	2,08
Tb	28	1,89	1,90

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

5.2 Testování navržených primerů

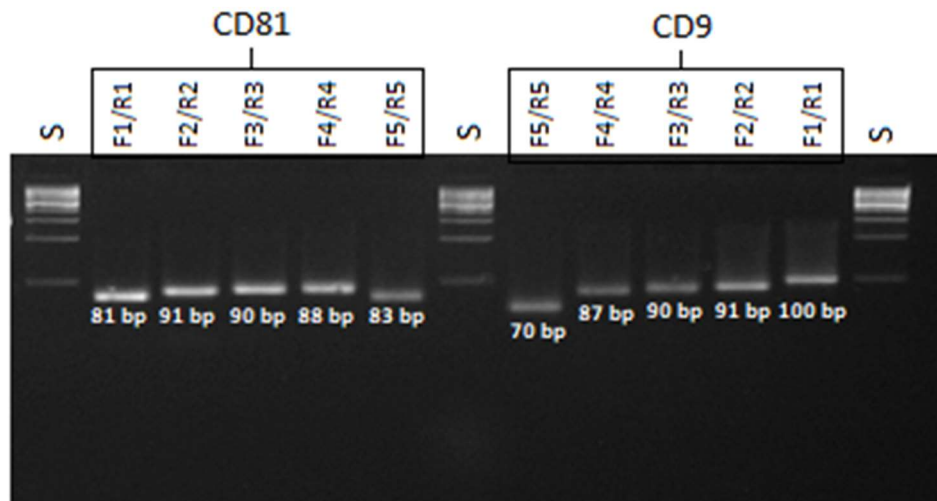
5.2.1 Elektroforetický test specifičnosti amplifikace

U všech použitých primerů pro oba studované CD geny i pro house keepingový gen ACTB byly získány amplikony, které byly separovány v agarozové elektroforéze a jsou zobrazeny na obrázcích 20 a 21. Testem byly ověřeny nastavené podmínky pro amplifikaci a specifičnost primerů.



S – Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder

Obrázek 20. Elektroforéza amplikonu cDNA genu ACTB v různých tkání hřebce 2, biologického replikátu A.

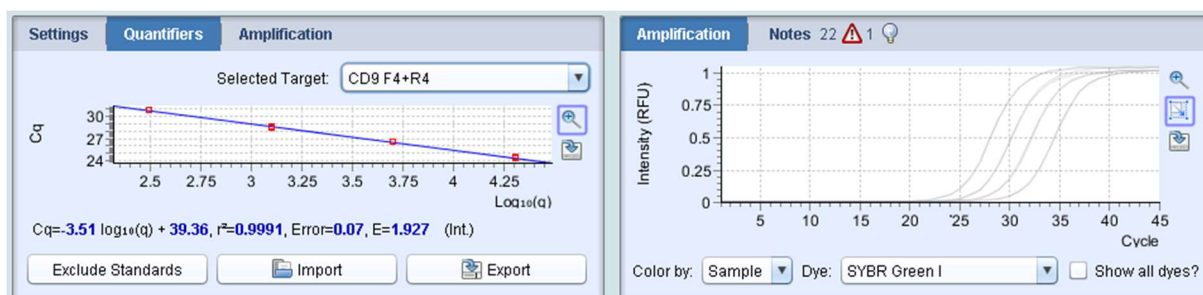


S – Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder

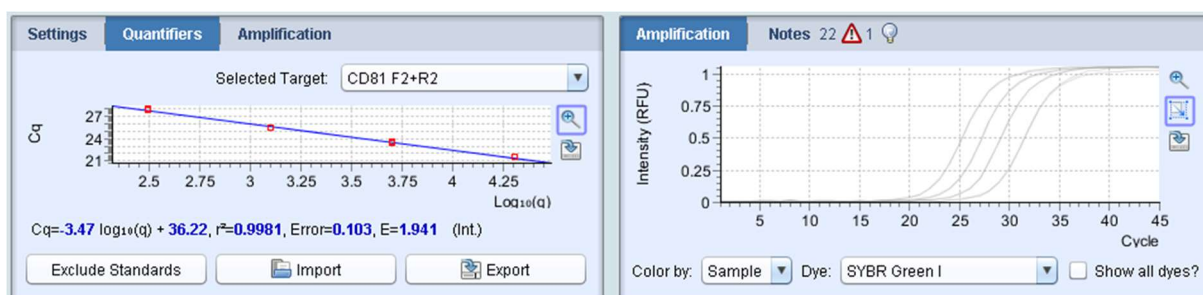
Obrázek 21. Elektroforéza amplikonu cDNA genů CD9 a CD81 (primerové páry F1/R1 až F5/R5). Vzorek: tkáň *testes*, hřebce 2, biologického replikátu A

5.2.2 Hodnoty efience reakce

Standartní křivka amplifikace byla vyhotovena na základě ředící řady cDNA. Dle této křivky byla vypočtena hodnota efience znázorňující účinnost reakce. Obrázky 22 a 23 znázorňují eficienci pro oba CD geny s vybranými primery a fázi plató. Hodnoty eficiencí vybraných primerových párů genů CD a ACTB zobrazuje Tabulka 3.



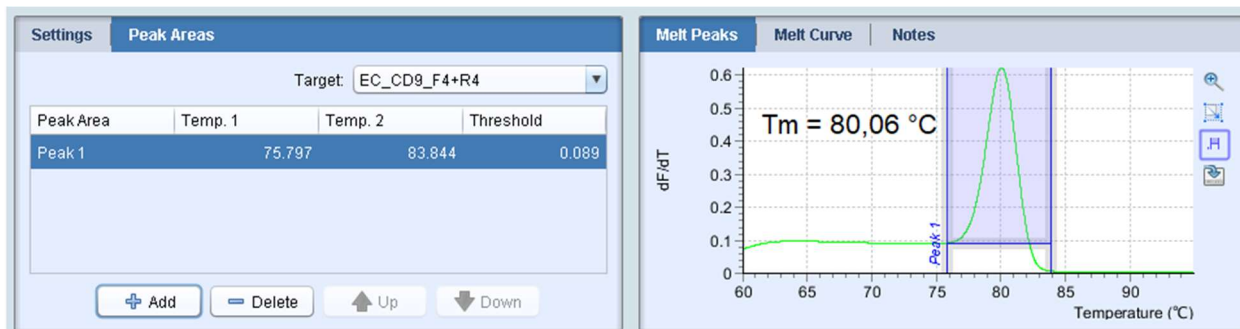
Obrázek 22. Standartní křivka amplifikace cDNA pro gen CD9 a primerů F4 a R4. Výstup z programu LightCycler Nano.



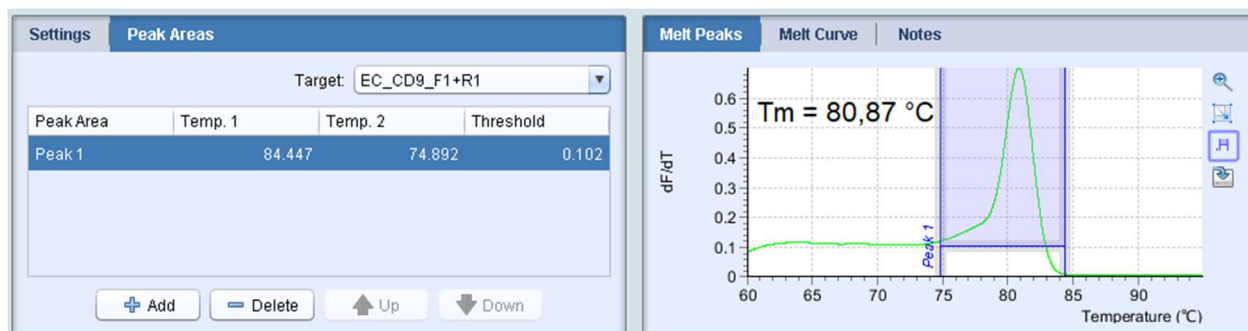
Obrázek 23. Standartní křivka amplifikace cDNA pro gen CD81 a primery F2 a R2. Výstup z programu LightCycler Nano.

5.2.3 Specifita amplifikace pomocí vyhodnocení křivek tání

Na základě výsledných křivek z programu LightCycler® Nano (Roche) byla hodnocena specifita amplifikace pomocí tvaru peaku, který znázorňuje uvolňování barviva SYBR Green I (Obrázek 24 a 25). Hodnoty teplot tání vybraných primerových párů genů CD a ACTB popisuje Tabulka 3.



Obrázek 24. Křivka tání a hodnota T_m u amplikonu CD9 a primerů F4 a R4.



Obrázek 25. Křivka tání a hodnota T_m u amplikonu CD9 a primerů F1 a R1.

5.2.4 Sekvence amplikonů

Sekvence amplikonu CD9 (F4/R4) a CD81 (F2/R2) má potvrdit specifčnost amplifikace u vybraných primerových párů. Sekvence byla provedena u amplikonu vzorku hřebce 2, tkáň *testes*, biologického replikátu. Obrázky 26, 27 a 28 porovnávají námi získaný amplikon s databázemi NCBI a Ensembl. Databáze Ensembl popisuje tři sestřihové varianty genu CD81, Obrázky 29-31 znázorňují porovnání námi získané sekvence se sekvencemi všech tří sestřihů v databázi Ensembl.

ACTB.F.R.CZU
Sequence
Contribs
Sequence
ACTB.F.R.CZU
Genes: (Ensembl)

cdNA alignment

All sequence SNPs/...
SV - Smaller variants
%GC

Gene Legend

Ensembl protein coding

There are currently 72 tracks turned off.
Ensembl Equus caballus version: 100.3 (Enucab3.0) Primary_assembly: 13: 4,382,603 - 4,382,717

115 bp

4,382,610 4,382,620 4,382,630 4,382,640 4,382,650 4,382,660 4,382,670 4,382,680 4,382,690 4,382,700 4,382,710

Forward strand

13>

CAAGGCGTGTGATCTCCTTCGATCCTGTCCGGGTACATGGTGGTCCAGCAGCACTGTGGCGTACAGGTCCTTACGGATGTCGACGTCACTTCATG
GTCCGACACTAGAGGAGAGCGTAAAGACAGCCGCTACGGAGGACCCATGTACCACCCAGGGTGGGTGTCTGTGACACAAACCGCATGCCAAGGATGCTTACAGAGTGA
ACACTAGTAGAAGAAAGACGTAAAGACAGCCGCTACGGAGGACCCATGTACCACCCAGGGTGGGTGTCTGTGACACAAACCGCATGTCCAGGAATGCCCTACAGCTGCAAGTGA

Reverse strand

4,382,610 4,382,620 4,382,630 4,382,640 4,382,650 4,382,660 4,382,670 4,382,680 4,382,690 4,382,700 4,382,710

115 bp

Reverse strand

Protein Coding

Ensembl protein coding

No Sequence variants (dSNP and all other sources) data for this region
No Smaller structural variants (all sources) data for this region
Blocks show the locations of G/C base pairs.

1

PREDICTED: Equus caballus actin beta (ACTB), transcript variant X1, mRNA

Sequence ID: [XM_023655002.1](#) Length: 1888 Number of Matches: 1

Range 1: 989 to 1092 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
193 bits(104)	2e-45	104/104(100%)	0/104(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGTGTGACCGTGCAGATCCGTTAAGGACCTGTACGCCAACACAGTGTGTCGGGTGGACCA			60
Sbjct 989	AGTGTGACCGTGCAGATCCGTTAAGGACCTGTACGCCAACACAGTGTGTCGGGTGGACCA			1048
Query 61	CCATGTACCCAGGCGATGCCCGACAGGATGCAAGAGGATCACA			104
Sbjct 1049	CCATGTACCCAGGCGATGCCCGACAGGATGCAAGAGGATCACA			1092

2

Obrázek 26. Porovnání námi získané sekvence genu ACTB (F/R) (Query) se sekvenčí transkripční varianty X1 databáze Ensembl (1) a NCBI (2).

103 way GERP elements (Ensembl)

CD9, F4/R4, CZU

Sequence

Contigs

Sequence

CD9, F4/R4, CZU

All sequence SNPs/.....

SV - Smaller variants %GC

Variant Legend

Gene Legend

Protein Coding

Ensembl protein coding

There are currently 72 tracks turned off.

Ensembl Equus caballus version 100.3 (Ensembl3.0) Primary assembly 6: 34,826,096 - 34,826,191

34,826,100 34,826,110 34,826,120 34,826,130 34,826,140 34,826,150 34,826,160 34,826,170 34,826,180 34,826,190

56 bp

Constrained elements for 103 eutherian mammals EPO-Low-Coverage

CD9-201 >

protein coding

CTGGATTGCTGTGTAATCGTTGGGGGAGTGGGAACAGATTATCTCGGACATCTGCCCCAAAGGATGTAACCTCAGAGCTCAGCAACCG
 TGCAGCTGGATTTGGCTGTGTTATCGTTGGGGAGTGGGAACAGATTATCTCGGACATCTGCCCCAAAGGATGTAACCTCAGAGCTCAGCAACCG
 ACGTCGACCTAAAGACACCAATAGCAACCCTCACCCTTGTCAAATAGAGGCTGTAGAGCGGGGTTTCTCAACATGAGAGTTCGAAAGTGTGCTCC

Sequence variants (dbSNP and all other sources)

SV - Smaller variants

splice donor variant

Protein Coding

Ensembl protein coding

There are currently 72 tracks turned off.

Ensembl Equus caballus version 100.3 (Ensembl3.0) Primary assembly 6: 34,826,096 - 34,826,191

34,826,100 34,826,110 34,826,120 34,826,130 34,826,140 34,826,150 34,826,160 34,826,170 34,826,180 34,826,190

96 bp

Reverse strand

Forward strand

Drag Select: ⇄

PREDICTED: Equus caballus CD9 molecule (CD9), mRNA

Sequence ID: [XM_023643014.1](#) Length: 1261 Number of Matches: 1

Range 1: 590 to 676 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
161 bits(87)	3e-36	87/87(100%)	0/87(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTGGATTGCTGTGTAATCGTTGGGGGAGTGGGAACAGATTATCTCGGACATCTGCCCCAA	60		
Sbjct 590	CTGGATTGCTGTGTAATCGTTGGGGGAGTGGGAACAGATTATCTCGGACATCTGCCCCAA	649		
Query 61	AAGGATGTAACCTCAGAGCTCAGCAACCG	87		
Sbjct 650	AAGGATGTAACCTCAGAGCTCAGCAACCG	676		

2

1

Obrázek 27. Porovnání námi získané sekvence genu CD9 (F4/R4) (Query) se sekvencí databáze Ensembl (1) a NCBI (2)

Genes (Ensembl): CD81, F2, R2, CZU

CD81-201 > protein coding
 CD81-202 > protein coding
 CD81-203 > protein coding

Sequence: **GCATCTACCATCCTCATTTGGCTGTGGGGGGCCGTGATGATGTTCGTCGGATTTCCTGGGCTGATGGGGCCATCCAGGAGTCCCAAGTGGCCTGCT**
 CGAGGCACTACTACATCTCATTTGCTGTGGGGGGCCGTGATGATGTTCGTCGGATTTCCTGGGCTGATGGGGCCATCCAGGAGTCCCAAGTGGCCTGCT
 GTGTCCTAAGATGTAGGAGTAAAGACACCCGGGCACTACTACAAAGCAGCTAAGGAACCCGACGATACCCCGGTAGGTCTCTCAGGTCAAGGACGACCC

Sequence variants (dbSNP and all other sources):
 R 34
 SV - Smaller variants

SV - Smaller variants: No smaller structural variants (all sources) data for this region. Blocks show the locations of G/C base pairs.

Variant Legend: splice region variant, synonymous variant

Protein Coding: Ensembl protein coding

There are currently 72 tracks turned off.
 Ensembl Equus caballus version 100.3 (Enucb3.0) Primary assembly 12: 34,628,443 - 34,628,542

PREDICTED: Equus caballus CD81 molecule (CD81), mRNA
 Sequence ID: [XM_023654709.1](#) Length: 1338 Number of Matches: 1

Range 1: 277 to 367 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
169 bits(91)	2e-38	91/91(100%)	0/91(0%)	Plus/Plus

Query 1 GCATCTACCATCCTCATTTGGCTGTGGGGGGCCGTGATGATGTTCGTCGGATTTCCTGGGCTGCT 60
 |||
 Sbjct 277 GCATCTACCATCCTCATTTGGCTGTGGGGGGCCGTGATGATGTTCGTCGGATTTCCTGGGCTGCT 336

Query 61 ATGGGGCCATCCAGGAGTCCCAAGTGGCCTGCT 91
 |||
 Sbjct 337 ATGGGGCCATCCAGGAGTCCCAAGTGGCCTGCT 367

1
 2

Obrázek 28. Porovnání námi získané sekvence genu CD81 (F2/R2) (Query) se sekvencí databáze Ensembl (1) a NCBI (2).

5.2.5 Výběr primerů

Pro následující analýzu byly vybrány tyto primery:

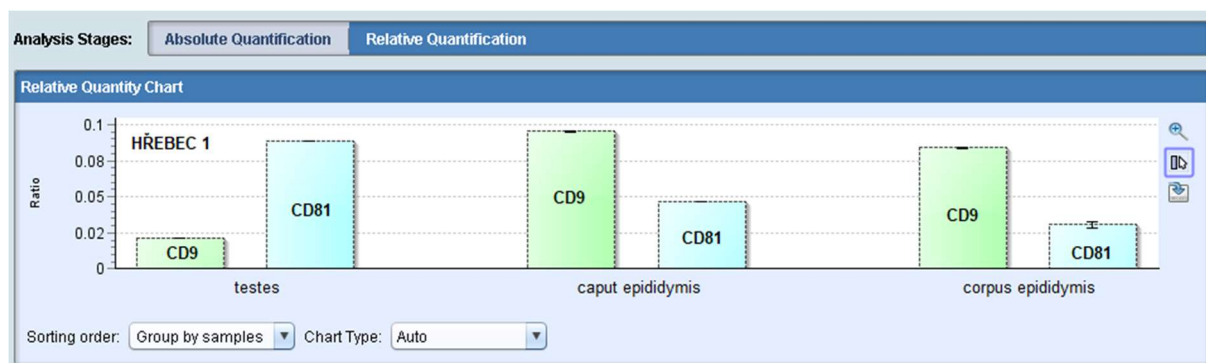
- pro gen CD9 byly vybrány primery R4 a F4.
- pro gen CD81 byly vybrány primery R2 a F2.
-

Tabulka 3. Hodnoty teplot tání (T_m) a eficient (E) vybraných primerových párů.

	CD9 (R4/F4)	CD81 (F2/R2)	ACTB
T_m	80,06 °C	84,78 °C	85,32 °C
E	1,927	1,941	1,971

5.3 qRT-PCR – vyhodnocení relativní exprese CD9 a CD81

Obrázek 32 znázorňuje relativní expresi genů CD9 (primerový pár F4/R4) a CD81 (primerový pár F2/R2) v tkáních hřebce 1, biologického replikátu A, na základě výsledků Ratio ΔC_q . Obrázek 32 dokumentuje vzorový výstup hodnocení programem LightCycler Nano (Roche). Z tohoto obrázku je patrné, že ve varleti byla intenzivnější exprese CD81 vůči genu CD9. Ve všech částech nadvarlete byla naopak vyšší exprese genu CD9 oproti genu CD81. Tento výsledek byl obecně platný pro všech pět hodnocených hřebců.

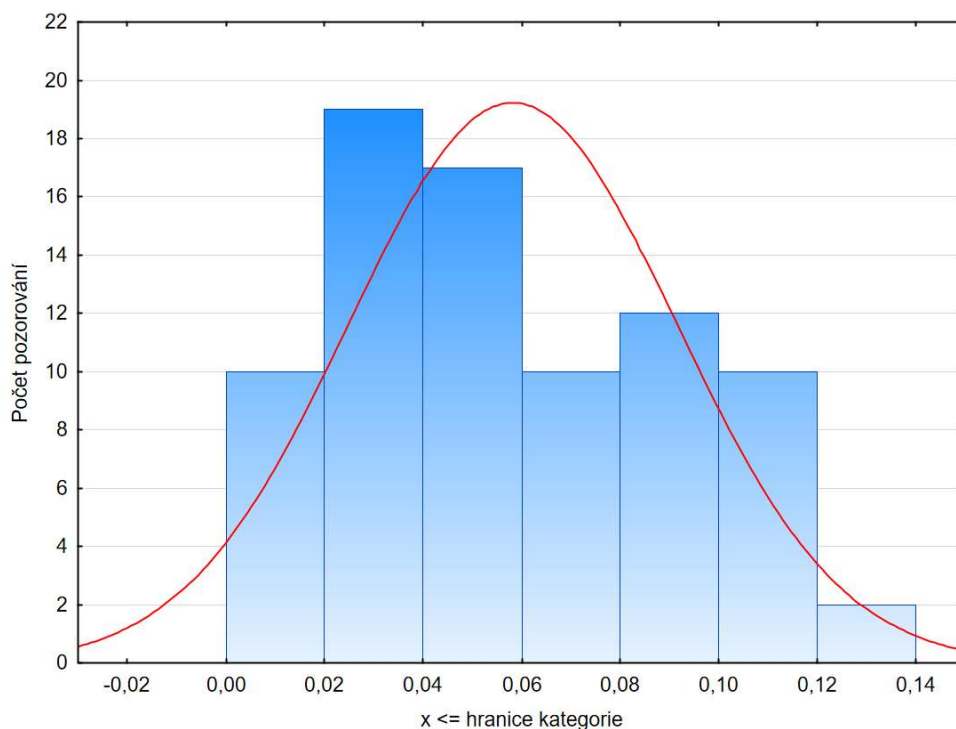


Obrázek 32. Výstup z programu LightCycler Nano (Roche)

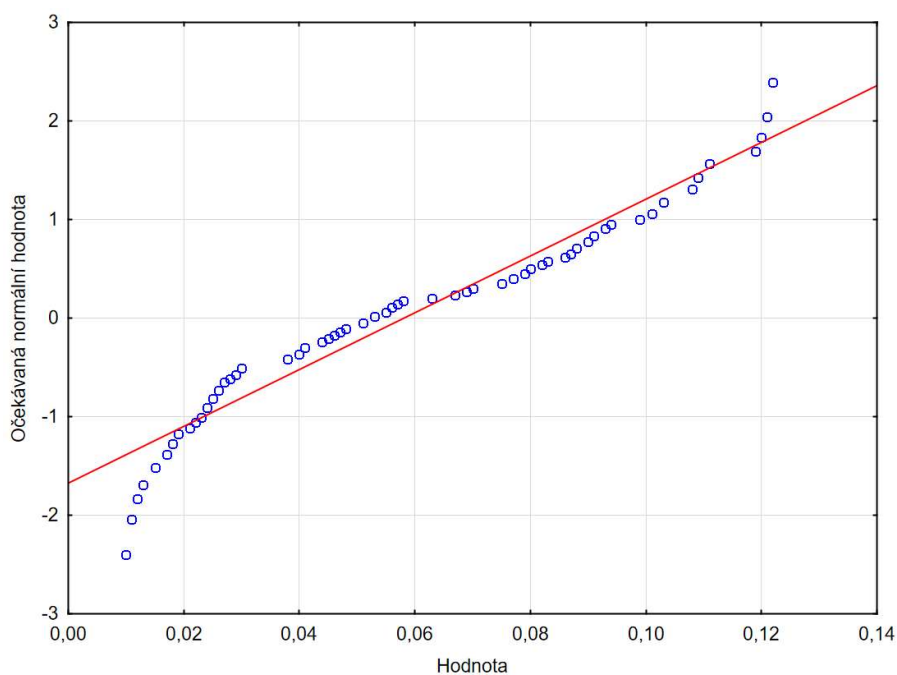
5.4 Statistické šetření

1.1.1 Test normality dat

Před vlastním statistickým šetřením byla ověřena homogenita rozptylů. Kolmogorovův–Smirnovův test homogenity prokázal, že získaná data (ΔC_q) jsou distribuována v souladu s normálním rozdělením ($d=0,12705$; $p>0,05$). Distribuci dat znázorňuje histogram a P-graf (Obrázek 33 a 34), kde lze vidět, že body opisují přibližně průběh přímky.



Obrázek 33. Hodnocení normality rozdělení pomocí histogramu.



Obrázek 34. Hodnocení normality rozdělení pomocí P-grafu

Homogenita rozptylu byla potvrzena pomocí Levenova testu pro následující efekty: biologický replikát ($p=0,850587$), hřelec ($p=0,832364$), gen ($p=0,919407$); $p>0,05$. Homogenita rozptylu nebyla potvrzena pro efekt tkáň z důvodu vysoké variability exprese v jednotlivých tkáních.

5.4.1 Hodnocení variability tkání, biologických replikátů, hřebců a genů

Tato práce měla za úkol navržení markerů, exprese byla hodnocena pomocí ΔCq (Tabulka 4) a nikoliv pomocí $\Delta\Delta Cq$, která se používá při hodnocení dvou a více genů. Důvod byl takový, že jsme chtěli data vyhodnotit parametricky, pomocí parametrického testu. ANOVA má předpoklad, aby vstupní data nebyla vnitřně korelovaná (dva nezávislé datové soubory). Cílem nebylo porovnat, jestli je větší procentická exprese u genu CD81 nebo CD9, ale porovnat který z faktorů má vliv na expresi daných genů.

Tabulka 4. Výsledné hodnoty Ratio ΔCq u všech koní, tkání a replikátů s vybranými primery.

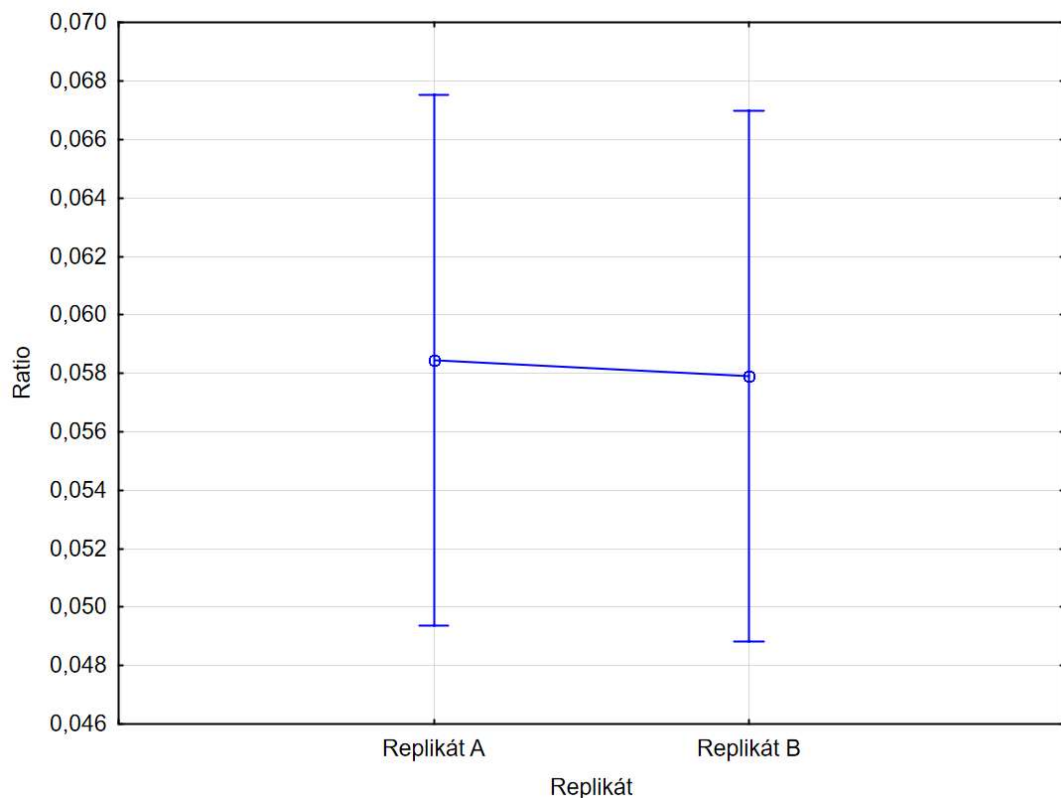
Hřelec	Tkáň	RATIO ΔCq			
		CD9 A	CD9 B	CD81 A	CD81 B
1	testes	0,021	0,023	0,088	0,087
1	caput epididymis	0,094	0,091	0,046	0,044
1	corpus epididymis	0,083	0,08	0,03	0,03
1	cauda epididymis	0,048	0,051	0,013	0,011
2	testes	0,026	0,025	0,111	0,109
2	caput epididymis	0,108	0,103	0,057	0,055
2	corpus epididymis	0,099	0,091	0,038	0,041
2	cauda epididymis.	0,056	0,058	0,019	0,018
3	testes	0,018	0,015	0,075	0,077
3	caput epididymis	0,088	0,086	0,041	0,04
3	corpus epididymis	0,079	0,075	0,024	0,026
3	cauda epididymis	0,038	0,041	0,01	0,012
4	testes	0,024	0,026	0,103	0,109
4	caput epididymis	0,103	0,101	0,055	0,051
4	corpus epididymis	0,079	0,082	0,027	0,03
4	cauda epididymis	0,051	0,053	0,017	0,015
5	testes	0,029	0,028	0,119	0,122
5	caput epidymis	0,121	0,12	0,069	0,07
5	corpus epididymis	0,093	0,09	0,047	0,045
5	cauda epididymis	0,067	0,063	0,024	0,022

Tabulka 5 znázorňuje výsledky statistického testu ANOVA. Pokud je hodnota $p < 0,05$ (červené pole), znamená to, že značený faktor má statisticky významný vliv na variabilitu hodnot Ratio ΔCq ($\alpha=0,05$). Jako závislá proměnná byla zvolena hodnota Ratio ΔCq , jako nezávislé byly zvoleny faktory: biologický replikát, gen, hřelec a tkáň. V tomto případě je

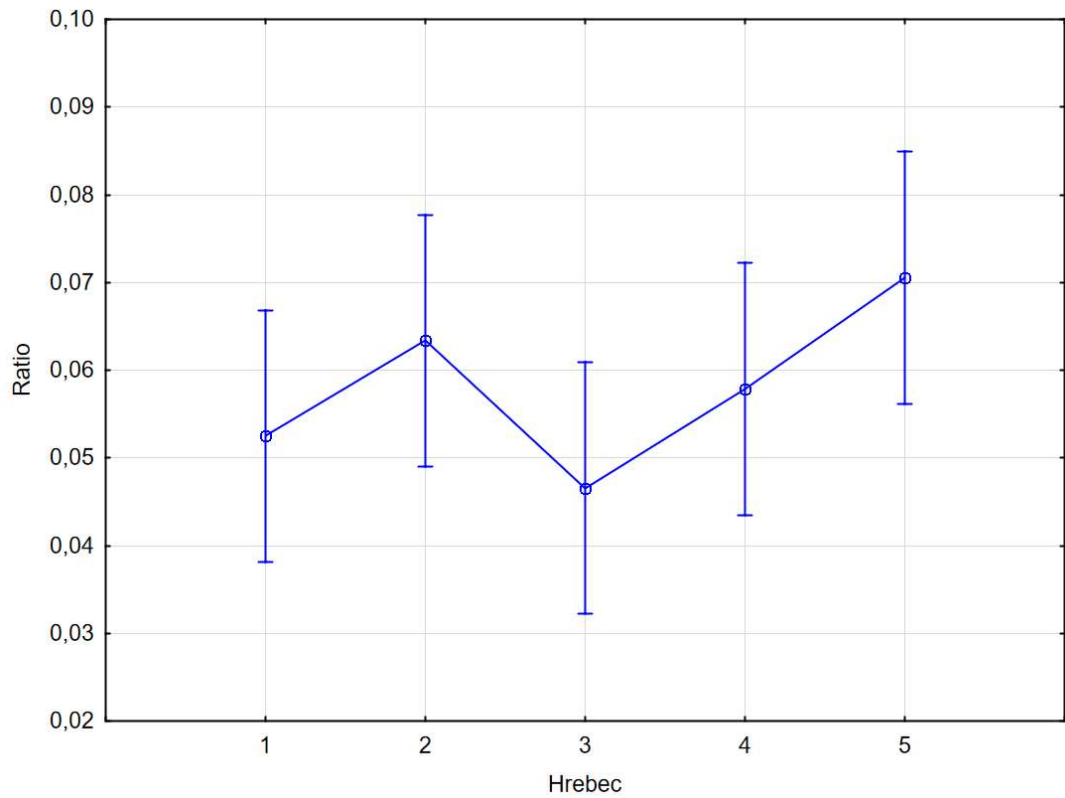
statisticky významný faktor tkáň a gen. Rozdíly mezi kategoriemi třídících faktorů byly graficky vyhodnoceny pomocí krabicových grafů (Obrázek 35 až 38).

Tabulka 5. Výsledky testu GLM-ANOVA označující statisticky významné faktory (červeně).

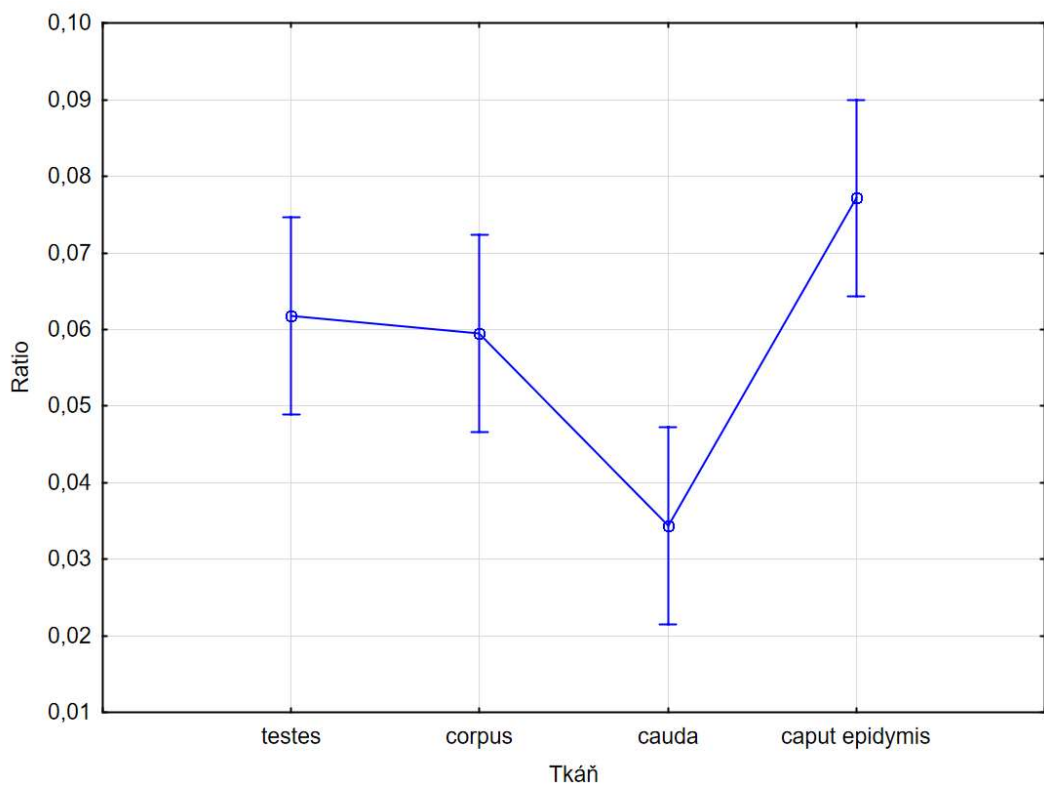
	SČ	Stupně (volnosti)	PČ	F	p
Abs. člen	0,270746	1	0,270746	326,1917	0,000000
Replikát	0,000006	1	0,000006	0,0073	0,932207
Hřeben	0,005562	4	0,001391	1,6753	0,165443
Tkáň	0,018842	3	0,006281	7,5668	0,000187
Gen	0,004500	1	0,004500	5,4215	0,022784
Chyba	0,058102	70	0,000830		



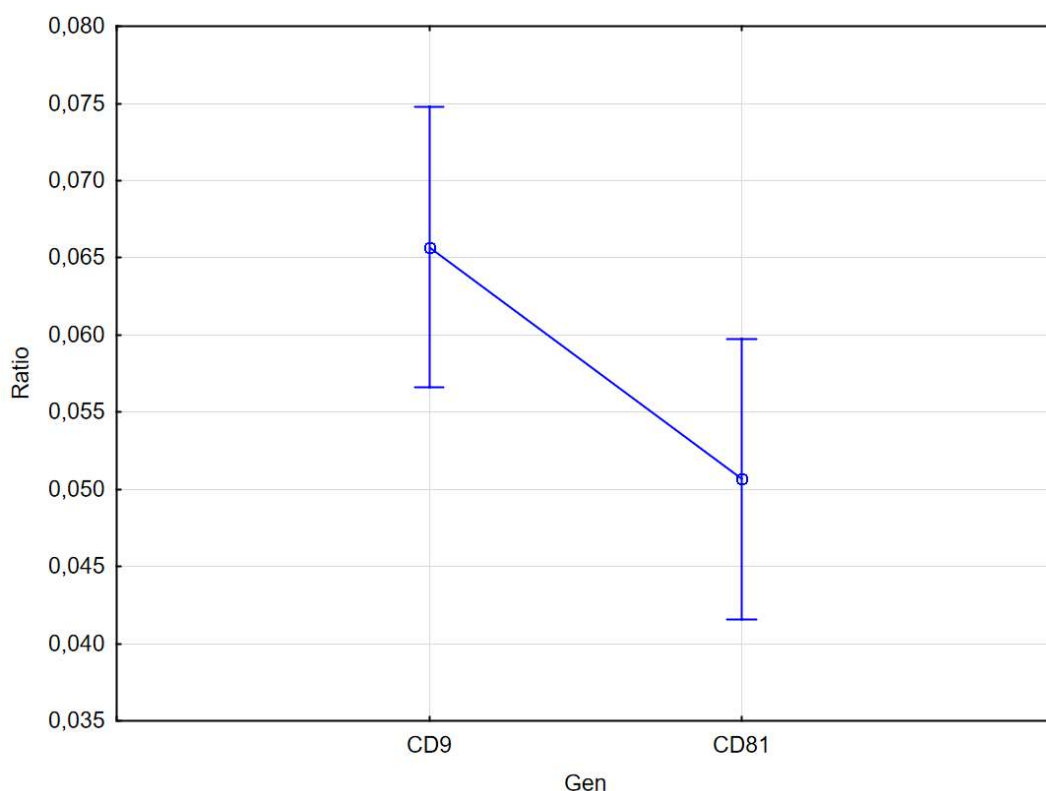
Obrázek 35. Výstup ANOVA: krabicový graf pro třídící faktor replikát, který nepředstavuje statisticky významný zdroj variability ($p=0,93221$).



Obrázek 36. Výstup ANOVA: krabicový graf pro třídící faktor hřelec, který nepředstavuje statisticky významný zdroj variability ($p=0,16544$).



Obrázek 37. Výstup ANOVA: krabicový graf pro třídící faktor tkáň, který představuje stat. významný zdroj variability ($p=0.0019$).



Obrázek 38. Výstup ANOVA: krabicový graf pro třídící faktor gen, který představuje statisticky významný zdroj variability ($p=0,02278$).

Vzhledem k tomu, že ANOVA prokázala jako statisticky významné efekty tkáň a gen, byla provedena post-hoc analýza (Tukeyův HSD test, $\alpha=0,05$). Tukeyův HSD test pro proměnou Ratio ΔCq vytvořil homogenní skupiny.

Pro faktor tkáň se jednalo o 2 homogenní skupiny: *corpus epididymis*, *caput epididymis* a *testes* tvořily jednu homogenní skupinu a *cauda epididymis* tvořila druhou homogenní skupinu (Tabulka 6). Pro faktor gen se jednalo také o dvě homogenní skupiny: gen CD81 a CD9 (Tabulka 7).

Tabulka 6. Výsledky Tukeyova HSD testu pro faktor tkáň.

Tkáň	Ratio (Průměr)	1	2
Cauda epididymis	0,034350		****
Corpus epididymis	0,059450	****	
Testes	0,061750	****	
Caput epididymis	0,077150	****	

Tabulka 7. Výsledky Tukeyova HSD testu pro faktor gen.

Gen	Ratio (Průměr)	1	2
CD81	0,050675	****	
CD9	0,065675		****

6 Diskuze

6.1 Biologický materiál

Das et al. (2010) izoloval RNA ze vzorků získaných biopsií nadvarletní tkáně hřebce. Tkáň byla odebrána pomocí jehly a vzorek pro izolaci odpovídal velikosti 11 mm této jehly určené k biopsii. Ke každému vzorku přidal 1 ml RNAlateru (protektor RNA) a vzorky ihned zmrazil a uchovával při -80°C . V této diplomové práci byly použity vzorky varlat získané po kastraci veterinárním lékařem. Použito bylo 25-45 mg varletní tkáně, které byly také ihned zmrazeny a uchovány při -80°C . I bez použití protektoru RNA byla výtěžnost izolované RNA v této práci uspokojující (Tabulky 2/1 a 2/2).

6.2 Metodika izolace RNA

Důležitým aspektem pro výběr metody a kitu izolace RNA je cílový produkt. Je rozdíl v izolaci celkové RNA nebo jen určitého typu RNA. Příkladem kitu, který izoluje jen velmi malé RNA bez použití neekologického fenolu nebo chloroformu, je CatchGene Cell/Exosome miRNA Kit (Biovendor) (Bird 2005).

Izolovat RNA lze pomocí kyselé pH extrakce guanidinium thiokyanátu, fenolu nebo chloroformu. Pomocí komerčně dostupné kyseliny fenolové lze jedním krokem provést úplný rozklad tkáně (RNáza-free ošetřeno) (Bird 2005; Chomczynski & Sacchi 2006). Nejčastěji využívaná metoda je izolace pomocí vazebné kolony. Metoda je jednoduchá a skládá se ze čtyř obecných kroků: (1) buněčná lyzace, (2) selektivní vazba nukleových kyselin na rotační kolony, (3) odstranění zbytkových kontaminantů a inhibitorů a (4) eluce vyčištěných nukleových kyselin. Kity, které využívají vazebných kolonek, jsou např. innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Analytic Jena), jež byl využit např. ve studii Chatmahamongkol et al. (2019). Tento kit má výhodu v tom, že není potřeba použít DNázu, jelikož obsahuje „předkolonku“, která vzorek očistí od genomové DNA. V případě, že je potřeba izolace DNA i RNA, tento kit je schopen izolovat obě nukleové kyseliny z jednoho výchozího vzorku.

Metoda izolace RNA pomocí vazebných kolonek byla využita i v této diplomové práci za použití kitu Gen EluteTM Mammalian Total DNA/RNA Miniprep (Sigma). Izolace RNA z varlat hřebců probíhala za pomoci tohoto kitu bez obtíží. Vzorky RNA byly okamžitě zmrazeny v kapalném dusíku a uchovávány při teplotě -80°C . Během postupu nedošlo k degradaci RNA, izolovaná RNA měla uspokojivou výtěžnost a neobsahovala kontaminanty, mj. i proto, že byl použit produkt RNaseZAPTM (Sigma), který odstraní nežádoucí RNázy. Studie Chong et al. (2020) porovnávala metodu izolace mražené RNA a metodou izolace RNA při laboratorní teplotě za využití stabilizačního činidla. Jedna skupina vzorků byla uchovávána při teplotě -20°C a druhá skupina (s přidaným stabilizačním činidlem) byla skladována při laboratorní teplotě po dobu 7 dnů. Vzorky chráněné stabilizačním roztokem RNAProtect cell Reagent (Qiagen) a RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen) vykazovaly uspokojivou koncentraci a výtěžnost odpovídající skupině vzorků uchovávaných při teplotě -20°C .

Izolace RNA nemusí být jen manuální. Existuje řada automatických izolátorů, např. QIAcube RNA izolátor (QIAGEN) pro izolaci virové RNA. Systém je zcela automatický. Na přístroji se zvolí vybraný extrakční kit, objem vzorku, počet vzorků (pro centrifugaci) a zkontroluje se nanáška pufrů na příslušných pozicích. Vzorky s lyzačním pufrem se vloží do QIAcube a probíhá automatická izolace. Po skončení izolace je doporučeno spustit dvanáctiminutový UV run pro sterilizaci (Bremer et al. 2018).

Das et al. (2010) izoloval RNA ze spermií a varlat hřebců pomocí RNeasy Mini Kitu s kolonkami (Qiagen). Izolace RNA ze spermií je složitější než izolace RNA z varlat, množství RNA u spermií je velmi nízké, protože mají haploidní sadu chromozomů (Gilbert et al. 2007). Spermie jsou vysoce kondenzovanými buňkami s rozdíly mezi druhy savců, i to značně znesnadňuje izolaci RNA (Varner & Johnson 2007).

6.3 Výtěžnost izolované RNA

Výtěžnost izolovaných nukleových kyselin se nejčastěji stanovuje absorbcí při vlnové délce 260 nm a 280 nm (Madubashetha et al. 2019). A_{260} udává koncentraci nukleové kyseliny, A_{280} udává míru kontaminace nukleové kyseliny proteiny. Poměr mezi A_{260} a A_{280} informuje o čistotě roztoku, čistá RNA vykazuje hodnotu kolem $A_{260}/A_{280} = 2$, hodnoty $A_{260}/A_{280} < 2$ značí kontaminaci (Barbas et al. 2007). Hodnota A_{260}/A_{230} je používána jako sekundární míra čistoty nukleových kyselin. Nekontaminovaná nukleová kyselina vykazuje hodnotu A_{260}/A_{230} v rozmezí 2,0-2,2. Pokud je poměr nižší, ve vzorku jsou přítomné kontaminanty, které absorbují při vlnové délce 230 nm (fenol, karbohydráty) (NanoDrop Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific)).

Stejně jako v této práci, ve studii Chong et al. (2020) a Das et al. (2010) byla hodnocena čistota RNA pomocí parametrů A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} . Hodnoty A_{260}/A_{280} se pohybovaly v rozmezí 1,8-2,0 a A_{260}/A_{230} v rozmezí 1,8-2,2 což naznačuje, že RNA nebyla kontaminována (Chong et al. 2020). V této práci se pohybovala výtěžnost izolované RNA v rozmezí $A_{260}/280 = 1,81-2,21$ a $A_{260}/230 = 1,85-2,25$ (Tabulky 2/1 a 2/2) a proto, lze říci, že izolace RNA proběhla v pořádku. Pro výpočet absorbcí byl využit UV spektrofotometr (NanoPhotometer, Implen), ale existuje i řada dalších spektrofotometrů, např. Nano One spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) (Chong et al. 2020) nebo NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) (Das et al. 2010).

6.4 Návrh a výběr primerů

Primery byly navrženy pomocí programu Primer3 Input 0.4.0 (Rozen & Skaletsky 2000). Program Primer BLAST ověřil specifickou nasedání primerů v genomu koně domácího (Ye et al. 2012). Oba programy jsou hojně využívány pro navrhování primerů (Das et al. 2010; Wahyuni & Seprianto 2018; Khoirinisah et al. 2020).

K ověření velikosti ampliconů bylo využito separace v gelové elektroforéze v TBE pufru. Na základě elektroforetického grafu (Obrázek 20 a 21) lze říci, že všech pět párů navržených primerů obou CD genů i house keepingového genu ACTB amplifikovalo produkt očekávané velikosti vyplývající z návrhu primerů. Pro vizualizaci fragmentů bylo použito barvivo ethidium bromid a zobrazení pod UV světlem.

Tato metoda ověření specifické amplifikace je často využívána i jinými autory (Callejón et al. 2012; Khoirinisah et al. 2020) Koncentrace agarózového gelu byla 3%, jelikož byly separovány produkty o velikost 70 až 100 bp. Koncentrace byla dostačující, separace produktů odlišila produkty s rozdílem jednotek bp. Ve studii Siddappa et al. (2013) byl taktéž použit agarózový gel a barvivo ethidium bromid, nicméně koncentrace gelu byla 1%. Nižší koncentrace agarózového gelu byla pravděpodobně zvolena proto, že velikost sledovaného amplikonu této studie byla větší, a to 437bp. Khoirinisah et al. (2020) použil pro detekci produktu o 100 bp 2% agarózový gel a taktéž barvivo ethidium bromid, stejně tomu bylo ve studii Das et al. (2010), který detekoval produkty v rozmezí velikosti 150-350 bp.

Specifičnost amplifikace vybraných párů primerů potvrdila i sekvenace amplikonu na Obrázcích 26-31. Námí získaná sekvence genů CD9, CD81 a ACTB byla identická se sekvencemi v databázích NCBI i Ensembl (Obrázek 26-31). Primery byly navrženy dle databáze NCBI pro všechny tři geny. Dle dat z této databáze, se předpokládalo, že gen CD81 má jednu sestříhovou variantu, jak je uvedeno v NCBI. Nicméně v průběhu 2 let, kdy probíhalo zpracování výsledků a jejich diskutování, databáze Ensembl přidala informace, že u genu CD81 mohou existovat 3 transkripční varianty (sestříhové varianty CD81-201 až 203). Při navrhování primerů jsme měli štěstí, že jsme si vybrali exon, který je součástí všech třech sestříhových variant uvedených v databázi Ensembl. Námí získaná sekvence se nachází v exonu č. 3 všech třech sestříhových variant (Obrázek 29-31).

Analýza teploty tání ověřila specifičnost amplikonů pomocí programu LightCycler® Nano (Roche). Peak znázorňuje rozrušení vodíkových můstků a uvolňování barviva SYBR Green I. Křivka tání má u genu CD9 (primerový pár R4 a F4) požadovaný symetrický tvar (Obrázek 24). Naopak u vzorku genu CD81 a použitého primerového páru F1 a R1, lze vidět mírnou asymetrii (Obrázek 25), bez výraznějšího druhého peaku, který by značil nescifickou amplifikaci nebo tvorbu primerů-dimerů. Teplotu tání lze i vypočítat pomocí rovnice, do které se dosazují počty zastoupení dusíkatých bází (Nakano et al. 1999). Výpočet T_m touto cestou je pouze odhadovaný daleko přesnější je výpočet programem.

6.5 Přepis RNA do cDNA a qRT-PCR

K přepisu RNA do cDNA byl použit kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche) a FastStart Taq DNA polymeráza (Roche). Ve studii Das et al. (2010) byla použita Platinum Taq DNA polymeráza a Superscript III One-Step RT-PCR Systém (Invitrogen Corporation). Reverzní transkripce probíhala před prvním krokem RT-PCR při 55 °C po dobu 30 minut (Das et al. 2010).

Pro provedení RT-PCR amplifikace a vyhodnocení výsledků byl použit LightCycler Nano (Roche). Dalšími termocyklery, které jsou využívány k amplifikaci jsou např. LightCycler® Nano Instrument (Roche), který ve studii Simões et al. (2011) prokázal vysokou citlivost a specifičnost.

V dnešní době lze pro amplifikaci DNA použít digitální PCR (Vogelstein & Kinzler 1999). RT-PCR je užitečná metoda pro relativní měření, ale pouze nepřímo pomocí hodnoty ΔC_q , kterou ovlivňuje eficeence reakce, což omezuje přesnost (Hindson et al. 2011). V dPCR jsou fragmenty DNA izolovány s reakční směsí ve velkém množství alikvót o objemu v řádech piko až x desítek nanolitrů a následně dochází k amplifikaci v jednotlivých alikvótách. Alikvóty

jsou dvojí, buď se teplátová DNA rozdělí pomocí emulze olejových kapiček nebo do mikročipů. Měření fluorescence koncových bodů v každé oddělené oblasti umožňuje absolutní kvantifikaci cílové nukleové kyseliny bez nutnosti použití kalibrační křivky. Na obrázcích 22 a 23 jsou znázorněny kalibrační křivky a hodnoty eficiency, které se mezi CD geny s vybranými primery a ACTB liší pouze v řádech setin (Tabulka 3), což zaručuje platnost a efektivnost relativní kvantifikace.

V dPCR se využívá fluorescenčního barviva nebo fluorescenčně značených sond (Bustin & Nolan 2004; Catarsi 2019; Fialová et al. 2019). Dle postupu Hindson et al. (2011) čte automatizovaný kapičkový průtokový cytometr každou sadu kapiček po PCR rychlostí 32 jamek za hodinu.

Studie Takahashi et al. (2014) se zabývala detekcí mikroRNA. Pro detekci takto malých RNA není vhodné použít qRT-PCR, která je omezena citlivostí na malé množství RNA ve vzorku, a proto bylo využito citlivější metody dPCR (Hindson et al. 2013; Takahashi et al. 2014).

6.6 Relativní exprese CD9 a CD81

6.6.1 House keepingové geny

K vyhodnocení relativní exprese se využívá house keepingových genů, dle nichž je normalizována relativní exprese genu pomocí hodnot ΔCq (Pfaffl 2001; Rao et al. 2013).

V této studii byl použit house keepingový gen β -aktin jako v mnoha dalších studiích (Bas et al. 2004; Eisenberg & Levanon 2013), avšak pro detekci miRNA není vhodný (Sikand et al. 2012). β -aktin je jeden z nejhojněji exprimovaných buněčných proteinů savců a ptáků. Společně s γ -aktinem je β -aktin hlavní složkou mikrofilamentární sítě buňky (Clarke & Spudich 1977). Podílí se na intracelulárním pohybu organel, cytokinezi a motilitě buněk (Weeds 1982). Nicméně β -aktin nejspíše není vhodný pro studium exprese genů pro bezobratlé. Ve studii Zhou et al. (2018) byla zaznamenána různá míra exprese β -aktinu mezi jedinci i tkáněmi. Jako vhodné house keepingové geny byly vybrány GAPDH a cyklofilin A.

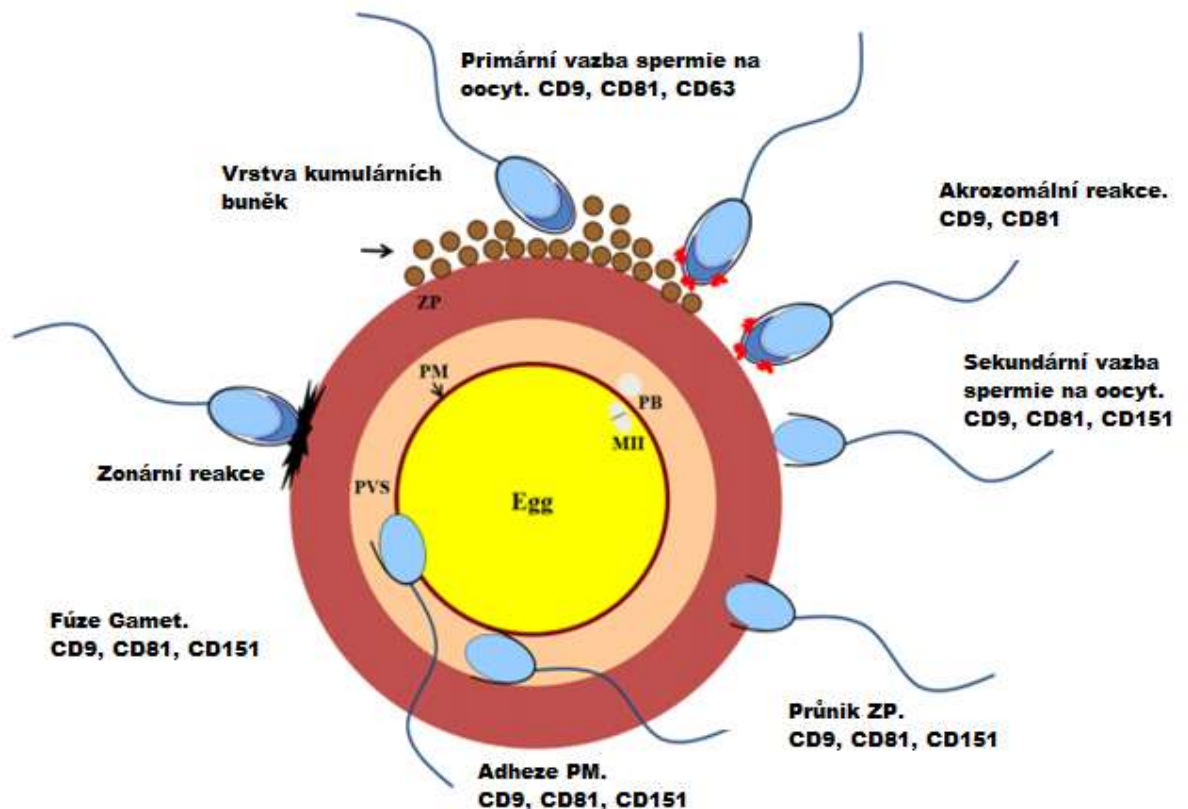
Mimo β -aktinu existuje celá řada jiných house keepingových genů: 18S rRNA, tubulin HGPRT (Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza), G6PD (glukózo-6-fosfát dehydrogenáza) a další (Lee et al. 2002; Bas et al. 2004; de Kok et al. 2005).

Ve studii Chatmahamongkol et al. (2019) byl použit jako house keepingový gen GAPDH (Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza). Tento protein slouží jako katalyzátor jednoho z kroků glykolýzy (Barber et al. 2005). Studie Barber et al. (2005) se zaměřila na detekci mRNA genu GAPDH v různých tkáních člověka a vyvrátila předpoklad konstantní exprese house keepingových genů napříč tkáněmi organismu. Tato studie došla k závěru, že míra exprese mRNA genu GAPDH se může lišit až patnáctinásobně napříč tkáněmi a jedinci.

6.6.2 Úloha proteinů CD9 a CD81 ve vazbě spermie-oocyt

Proteiny CD9 a CD81 spolu s CD63 se účastní primární vazby spermie s kumulárními buňkami a ZP oocyty. V průběhu akrozomální reakce dochází k přemístění proteinu CD9 a CD81 (myši), které se po sléze účastní sekundární vazby (skot) spolu s CD151 (myš, člověk).

Spermie pronikají ZP a pomocí CD9, CD81 a CD151 dochází k adhezi k membráně oocytu následované fúzí jader gamet a dochází k zonární reakci (Jankovičová et al. 2020). Tento review je velice kvalitním shrnutím problematiky tetraspaninových proteinů při interakci oocytu a spermie (Obrázek 39). Tato publikace dokazuje, že CD9 a CD81 mají důležitou roli při kontaktu spermie-oocyt a že hypotéza, která předpokládala expresi genů CD81 a CD9 ve varleti a nadvarleti koně, byla správná. Avšak jedná se o publikaci typu review, kde se nevěnují CD genům na úrovni RNA, a proto se domnívám, že výsledky této diplomové práce jsou pilotními výsledky na úrovni RNA u koně domácího.



Obrázek 39. Interakce mezi spermii a oocytem a zastoupení tetraspaninů CD9, CD81 a CD151 na spermii (upraveno dle Jankovičová et al. 2020).

6.6.3 Exprese CD9 a CD81 ve spermích a varlatech savců

Příliš mnoho studií nepopisuje expresi studovaných CD genů ve varleti a nadvarleti. Existuje však řada studií popisující proteiny těchto genů na spermích savců (Ito et al. 2010; Jankovičová et al. 2015; Frolíkova et al. 2018; Jankovičová et al. 2020). Jelikož spermie vznikají a dozrávají ve varlatech a nadvarlatech (Reece 2010), mohou být jakýmsi odrazem exprese genů v pohlavních orgánech samců.

Spermie jsou transkripčně neaktivní buňky. Savčí spermie opouštějí varlata jako funkčně nekompetentní buňky, které nemají ani schopnost progresivní motility, ani schopnost fúzovat s oocytem (Nixon et al. 2007). Transformace spermii na fertilní buňky musí být založena na postranlačních modifikacích a přeskupení povrchu spermie (Jervis & Robaire 2001; Galti et al. 2004). Fertilita spermii také souvisí s vystavením spermii chaperonovým molekulám v *epididymis*. Chaperony migrují z lumenu *epididymis* na povrch spermie a

předpokládá se, že tento přesun molekul (pravděpodobně nejsou jediné) dokončuje molekulární mechanismus nezbytný k provedení následné organizované prezentace membránových molekul spermií. U myši je schopnost epididymálních spermií vázat se na ZP poprvé pozorována v *corpus epididymis* a zdá se, že se kryje se získáním schopnosti motility (Asquith et al. 2004; Nixon et al. 2007). Podobné výsledky lze nalézt ve studii Caballero et al. (2013) provedené na býcích, který ve své studii popisuje membránové váčky zvané epididymosomy, které jsou přítomné v epididymální tekutině, a obsahují molekuly CD9. Epididymosom navede tetraspanin CD9 k hlavičce spermií a spojí ho s proteiny na spermii v oblasti akrozomu. Tyto váčky s uschovaným CD9 mohou mít vliv na výsledky relativních expresí mRNA a expresí proteinů. Modulace exprese je klíčovým rysem nekódujících RNA jako je mikroRNA. Přenos extracelulární RNA se jeví jako důležitý proces pro mezibuněčnou komunikaci. Schopnost přenosu funkčně aktivních molekul RNA uvnitř vezikul mezi buňkami, umožňuje buňce zpracovávat buněčnou signalizaci a biologické procesy (Takahashi et al. 2014). Dle výsledků statistické analýzy Ratio ΔC_q dochází k expresi genů CD9 a CD81 ve varletní i nadvarletní tkáni. K větší míře exprese obou CD genů v tkáni varlete a v hlavě a tělu nadvarlete, kde dochází k zrání spermií. Tyto výsledky odpovídají studiím Frolíková et al. (2018), která detekovala CD9 a CD81 na spermiích ve všech částech nadvarlete (Obrázek 6) a Ito et al. (2010). Ito et al. (2010) se zaměřil na výskyt CD9 na spermiích v průběhu spermatogeneze. mRNA CD9 byla u myši detekována v různých vývojových stádiích: spermatogonie, spermatocyty a kulaté spermatidy. Tyto stádia spermií se vyskytují ve varletí, kde byla prokázána exprese obou CD genů (Marvan et al. 1998).

Barraud-Lange et al. (2012) detekoval přítomnost molekuly CD9 v 10 % zralých/kapacitovaných spermiích v ocasu nadvarlete a na 60-75 % spermiích, které prodělali akrozomální reakci. U spermií, které vykazují nižší progresivní pohyb, dochází k menší míře exprese CD9 (Salvolini et al. 2013). Tyto výsledky podporuje i menší míra exprese genů CD9 a CD81 v ocasu nadvarlete, kdy spermiie dozrávají a jejich metabolická, a tedy i motilická funkce je utlumena (Tabulka 6, Obrázek 37) (Marvan et al. 1998; Reece 2010).

Statistické šetření ANOVA hodnotilo faktory způsobující variabilitu exprese CD genů (Obrázek 35 až 38, Tabulka 5). Dle výsledků byly faktory tkáň a gen označeny, jako faktory, které ovlivňují variabilitu exprese genu CD9 a CD81 (Tabulka 5) a jejich míra exprese je rozdílná (Tabulka 7). Gen CD81 byl více exprimovaný v tkáních varlete a gen CD9 v tkáních *corpus* a *caput epididymis* (Obrázek 32). Větší míru exprese CD9 v *epididymis* nepotvrdila databáze The human protein atlas, nicméně to není příliš překvapivé, jelikož studovaným druhem není kůň ale člověk.

Obrázky 40 a 41 zobrazují relativní expresi mRNA v rozmnožovací soustavě mužů. Lze vidět, že nejvíce jsou exprimovány oba CD geny v chámovodech (*Ductus deferens*) a semenných váčkách (*Seminal vesicle*) (Uhlén et al. 2015), což může souviset s výše zmíněnými váčky v epididymální tekutině. Tyto data částečně korelují s výsledky této práce, jelikož dle Uhlén et al. (2015), se více exprimuje CD81 oproti CD9 ve varlatech, ale současně i v nadvarlatech, což se s našimi výsledky rozchází (Obrázek 32). Nicméně jde o porovnání dvou odlišných druhů a variabilita napříč savci je značná (Jankovičová et al. 2020).



Obrázek 40. Relativní exprese RNA a proteinu CD81 v samčím pohlavním ústrojí člověka (upraveno dle Uhlén et al. 2015)



Obrázek 41. Relativní exprese RNA a proteinu CD9 v samčím pohlavním ústrojí člověka (upraveno dle Uhlén et al. 2015)

6.7 Závěr

Závěr diplomové práce bych ráda formulovala způsobem odpovědi na vědecké hypotézy, které byly stanoveny na začátku diplomové práce.

Přestože geny CD9 a CD81 jsou geny s bazální expresí, bylo prokázáno, že použitý způsob izolace celkové RNA, tvorba cDNA i navržený expresní marker (SYBR Green) byly dostatečně citlivé a spolehlivé metody, které prokázaly existenci mRNA ve všech sledovaných částech varlete i nadvarlete. První vědecká hypotéza byla tudíž potvrzena.

U genu CD9 byly navrženy primery do jediné expresní varianty. Během řešení této diplomové práce byly publikovány informace, že gen CD81 vykazuje tři transkripční varianty.

Experimenty této diplomové práce byly zaměřeny na navržení expresního markru CD81, který je lokalizován v třetím exonu vyskytujícím se ve všech třech transkripčních variantách, tímto způsobem byla potvrzena druhá vědecká hypotéza.

Byla rovněž potvrzena třetí vědecká hypotéza, pomocí ANOVA bylo statisticky prokázáno, že exprese je významně ovlivněna hodnocenou tkání (varle, nadvarle). Obecně se prokázalo, že ve varleti je vyšší exprese CD81 a u genu CD9 je vyšší exprese v nadvarleti. Sekvenční analýza získaných amplikonů s cDNA templátem prokázala, že navržené dvojice primerů amplifikují očekávanou část genomu koně domácího. Čtvrtá vědecká hypotéza byla touto analýzou také potvrzena.

Vzhledem ke zjištění tří sestřihových variant, doporučuji vývoj dalších expresních markrů, které by mohly teoreticky vyhodnotit relativní expresi jednotlivých sestřihových variant genu CD81. Primery by měly být navrhnuté do míst exonů, kterými se tyto tři transkripční varianty liší.

7 Zdroje

Abou-Haila A, Tulsiani DR. 2000. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **379**:173-82.

Allen CA, Green DPL. 1997. The mammalian acrosome reaction: Gateway to sperm fusion with the oocyte. *BioEssays* **19**: 241-247.

Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ. 2004. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J. Cell Science* **117**:3645–3657.

Augustyn A, Bauer P, Duignan B, Eldridge A, Gregersen E, McKenna A, Petruzzello M, Rafferty JP, Ray M, Rogers K, Tikkanen A, Wallenfeldt J, Zeidan A, Zelazko A. 2019. Gene. *Britannica. Encyclopædia Britannica, inc.* Available from <https://www.britannica.com/science/gene> (accessed January 2020).

Barbas FC, Burton DR, ScoTT JK, Silverman G. 2007. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols* **11** DOI: 10.1101/pdb.ip47.

Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* **21**:389-395.

Barraud-Lange V, Chalas Boissonnas C, Seres C, Auer J, Schmitt A, Lefèvre B, Wolf JP, Ziyat A. 2012. Membrane transfer from oocyte to sperm occurs in two CD9-independent ways that do not supply the fertilizing ability of CD9-deleted oocytes. *Reproduction* **144**:53-66.

Barraud-Lange V, Naud-Barriant N, Bomsel M, Wolf JP, Ziyat A. 2007. Transfer of oocyte membrane fragments to fertilizing spermatozoa. *FASEB Journal* **21**:3446-3449.

Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. 2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, b-actin and glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunology* **59**: 566–573.

Bassani S, Cingolani LA. 2012. Tetraspanins: Interactions and interplay with integrins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **44**:703–708.

Berditchevski F. 2001. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Science* **114**:4143–51.

Berditchevski F, Odintsova E. 1999. Characterization of integrin–tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *The Journal of cell biology* **146**:477-492.

Berdichevski F, Zutter MM, Hemler ME. 1996. Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Molecular Biology of the Cell* **7**:193–207.

Bermingham N, Luettich K. 2003. Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology* **9**:159-164.

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

Bianchi E, Wright GJ. 2014. Izumo meets Juno: preventing polyspermy in fertilization. *Cell Cycle* **13**: 2019–2020.

Bird IM. 2005. Extraction of RNA from cells and tissue. *Methods in Molecular Medicine*. **108**: 139–48.

Blanchard TL, Dickson D, Varner DD, Schumacher J. 1998. *Manual of equine reproduction*. Mosby, St. Louis.

Bosakova T, Tockstein A, Sebkova N, Simonik O, Adamusova H, Albrechtova J, Albrecht T, Bosakova Z, Dvorakova-Hortova K. 2018. New Insight into Sperm Capacitation: A Novel Mechanism of 17 β -Estradiol Signalling. *Int J Mol Science* **19**:4011.

Bremer B, Anastasiou OE, Ciesek S, Wedemeyer H. 2018. Automated nucleic acid isolation methods for HDV viral load quantification can lead to viral load underestimation. *Antiviral Therapy* **4** DOI: 10.3851/IMP3281.

Bustin S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**: 169–193.

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* **34**: 597–601.

Bustin SA, Nolan T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of biomolecular techniques* **15**:155-166.

Burns T, Chenier T, Munroe G. 2011. Male reproductive tract. Prages 326-373 in Monroe GA, Weese JS, editors. *Equine clinical medicine, surgery and reproduction*. CRC Press, London.

Caballero JN, Frenette G, Belleannée C, Sullivan R. 2013. CD9-positive microvesicles mediate the transfer of molecules to Bovine Spermatozoa during epididymal maturation. *PLoS One* **8**:e65364 DOI:10.1371/journal.pone.0065364.

Callejón R, Halajian A, De Rojas M, Marrugal A, Guevara D, Cutillas C. 2012. 16S partial gene mitochondrial DNA and internal transcribed spacers ribosomal DNA as differential markers of *Trichuris discolor* populations. *Veterinary parasitology* **186**: 350-363.

Catarsi P. 2019. Digital PCR - Methods and Protocols. *European journal of histochemistry: EJH* **63** DOI: 10.4081/ejh.2019.3074.

Clarke M, Spudich JA. 1977. Nonmuscle contractile proteins: the role of actin and myosin in cell motility and shape determination. *Annual Review of Biochemistry* **46**:797-822.

Clermont Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews* **52**: 198–236.

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

Das PJ, Paria N, Gustafson-Seabury A, Vishnoi M, Chaki SP, Love CC, Varner DD, Chowdhary BP, Raudsepp T. 2010. Total RNA isolation from stallion sperm and testis biopsies. *Theriogenology* **74**:1099-1106.

Degen HJ, Deufel A, Doris E, Grunewald-Janho S, Keesey J, editors. 2006. PCR applications manual 3rd edition. Roche diagnostics GmbH, Mannheim.

de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN. 2005. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Laboratory Investigation* **85**: 154–159.

Dieffenbach CW, Lowe TMJ, Dveksler GS. 1995. General Concepts for PCR Primer Design. Pages 133-155 in *PCR Primer, A Laboratory Manual*, Dieffenbach CW, Dveksler GS, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Eisenberg E, Levanon. EY. 2013. Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics* **29**:569-574.

Ellerman DA, Ha C, Primakoff P, Myles DG, Dveksler GS. 2003. Direct binding of the ligand PSG17 to CD9 requires a CD9 site essential for sperm-egg fusion. *Mol Biol Cell* **14**: 5098-5103.

Ellerman DA, Pel J, Gupta S, Snell WJ, Myles D, Primakoff P. 2009. Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. *Molecular Reproduction and Development* **76**:1188–1199.

Ensembl. 2020. Horse (EquCab3.0). Available from http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index?db=core%3Bg%3DENSECAG00000024654%3Br%3D12:34612501-34636548 (Accessed June 2020).

Fanaei M, Monk PN, Partridge LJ. 2011. The role of tetraspanins in fusion. *Biochemical Society transactions* **39**: 524–528.

Fialová E, Zdeňková K, Jablonská E, Demnerová K, Ovesná J. 2019. Digitální PCR: Princip a aplikace. *Chem. Listy* **113**: 545-552.

Frolíková M, Manaskova-Postlerova P, Cerny J, Jankovicova J, Simonik O, Pohlova A, Secova P, Antalikova J, Dvorakova-Hortova K. 2018. CD9 and CD81 Interactions and Their Structural Modelling in Sperm Prior to Fertilization. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 1236.

Gadella BM. 2008. The Assembly of a Zona Pellucida Binding Protein Complex in Sperm. *Reprod Dom Animals* **43**:12-19.

Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science* **68**:249–265.

Galti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Metayer S, Thimon V, Dacheux JL. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reprod. Science* **82–83**: 321–339.

Gardner AJ, Evans JP. 2006. Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reproduction, Fertility and Development* **18**:53–61.

Gerton GL. 2002. Function of the sperm acrosome. Pages 265-302 in Hardy DM, editor. *Fertilization*. Academic Press, San Diego.

Gilbert I, Bissonnette N, Boissonneault G, Vallee M, Robert C. 2007. A molecular analysis of the population of mRNA in bovine spermatozoa. *Reproduction* **133**:1073– 86.

Gordon-Alonso M, Yanez-Mo M, Barreiro O, Alvarez S, Munoz-Fernandez MA, Valenzuela Fernandez A, Sanchez-Madrid F. 2006. Tetraspanins CD9 and Cd81 modulate HIV-1 induced membrane fusion. *J. Immunology* **15**:5129–5137.

Graham M, Campbell M, Munroe Z, Hanks M. 2011. Female reproductive tract. Pages 242-325 in Monroe GA, Weese JS, editors. *Equine clinical medicine, surgery and reproduction*. CRC Press, London.

Hafez B, Hafez ESE, editors. 2000. *Reproduction in farm animals*. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**:95-98.

Hassuna N, Monk PN, Moseley GW, Partridge LJ. 2009. Strategies for targeting tetraspanin proteins: potential therapeutic applications in microbial infections. *Biodrugs* **23**:1–19.

He Q, Marjamaki M, Soini H, Mertsola J, Viljanen MK. 1994. Primers are decisive for sensitivity of PCR. *Biotechniques* **17**: 82-87.

Hemler ME. 2001. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biology* **155**:1103–1108.

Hemler ME. 2003. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biology* **19**:397–422.

Hemler ME. 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biology* **6**:801–811.

Hemler ME. 2008. Targeting of tetraspanin proteins—potential benefits and strategies. *Nat Rev Drug Discovery* **7**:747–58.

Hemler ME. 2014. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nat Rev Cancer* **14**:49–60.

Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. 2010a. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: Background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microscopy Research and Technique* **73**: 241–278.

Hermo L, Pelletier R.-M, Cyr DG, Smith CE. 2010b. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 5: Intercellular junctions and contacts between germ cells and Sertoli cells and their regulatory interactions, testicular cholesterol, and genes/proteins associated with more than one germ cell generation. *Microscopy Research and Technique* **73**:409–494

Higgingbottom A, Takahashi Y, Bolling L, Coonrod SA, White JM, Partridge LJ, Monk PN. 2003. Structural requirements for the inhibitory action of the CD9 large extracellular domain in sperm/oocyte binding and fusion. *Biochem Biophys Res Commun* **311**: 208-214.

Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, Vessella RL, Tewari M. 2013. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *NatMethods* **10**:1003–5.

Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz JA, Isaac J, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen LA, Legler TC, Kitano TK, Hodel MR, Petersen JF, Wyatt PW, Steenblock ER, Shah PH, Bousse LJ, Troup CB, Mellen JC, Wittmann DK, Erndt NG, Cauley TH, Koehler RT, So AP, Dube S, Rose KA, Montesclaros L, Wang S, Stumbo DP, Hodges SP, Romine S, Milanovich FP, White HE, Regan JF, Karlin-Neumann GA, Hindson CM, Saxonov S, Colston BW. 2011. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Anal. Chemistry* **83**:8604–8610.

Horváth G, Serru V, Clay D, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E. 1998. CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *J. Biol. Chemistry* **273**:30537–30543.

Hynes RO. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**:673–87.

Chalbi M, Barraud-Lange V, Ravaux B, Howan K, Rodriguez N, Soule P, Nzdoudi A, Boucheix C, Rubinstein E, Wolf JP, Ziyyat A, Perez E, Pincet F, Gourier Ch. 2014. Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. *Development* **141**:732-3739.

Charrin S, Le Naour F, Silvie O, Milhiet P-E, Boucheix C, Rubinstein E. 2009. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochemical Journal* **420**:133-154.

Chatmahamongkol C, Pravitharangul A, Suttapreyasri S, Leethanakul C. 2019. The effect of compressive force combined with mechanical vibration on human alveolar bone osteoblasts. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* **9**:81-85.

Chernomordik LV, Kozlov MM. 2008. Mechanics of membranefusion. *Nat. Struct. Mol. Biology* **15**:675–683.

Chen EH, Groteb E, Mohler W, Vignery A. 2007. Cell–cell fusion. *FEBS Letters* **581**:2181–2193.

Chomczynski P, Sacchi N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* **1**:581-585.

Chong GO, Han HS, Lee SD, Lee YH. 2020, Improvement in RNA quantity and quality in cervico-vaginal cytology. *Virology Journal* **17**:1-7.

Chowdhury IH, Koyanagi Y, Suzuki M, Kobayashi S, Yamaguchi K, Yamamoto N. 1992. Increased production of human immunodeficiency virus (HIV) in HIV-induced syncytia formation: An efficient infection process. *Virus Genes* **6**:63–78.

Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M. 2010 Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *Journal of Clinical Investigation* **120**:984–994.

Innis MA, Gelfand DH. 1990. Optimization of PCRs. Pages 3-12 in Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic press Inc, San Diego.

Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* **434**:234-8.

Inoue N, Satouh Y, Ikawa M, Okabe M, Yanagimachi R. 2011. Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:20008–20011.

Ishibashi T, Ding L, Ikenaka K, Inoue Y, Miyado K, Mekada E, Baba H. 2004. Tetraspanin protein CD9 is a novel paranodal component regulating paranodal junctional formation. *Journal of Neuroscience* **24**:96–102.

Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Maekawa, Miyado K, Toshimori K. 2010. Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell and Tissue Research* **340**:583-594.

Jankovičová J, Frolíková M, Sebkova N, Simon M, Cupperova P, Lipcseyova D, Michalkova K, Horovska L, Sedlacek R, Stopka P, Antalíkova J, Dvorakova-Hortova K. 2016. Characterization of tetraspanin protein CD81 in mouse spermatozoa and bovine gametes. *Reproduction* **152**:785–793.

Jankovičová J, Neuerová Z, Sečová P, Bartóková M, Bubeníčková F, Komrsková K, Postlerová P, Antalíková, J. 2020. Tetraspanins in mammalian reproduction: spermatozoa, oocytes and embryos. *Medical Microbiology and Immunology* DOI:10.1007/s00430-020-00676-0.

Jankovičová J, Secova P, Manaskova-Postlerova P, Simonik O, Frolikova M, Chmelikova E, Horovska L, Michalkova K, Dvorakova-Hortova K, Antalíkova J. 2019. Detection of CD9 and CD81 tetraspanins in bovine and porcine oocytes and embryos. *International Journal of Biological Macromolecules* **123**:931–938.

Jankovičová J, Simon M, Antalíková J, Cupperová P, Michalková K. 2015. Role of tetraspanin CD9 molecule in fertilization of mammals. *PHYSIOLOGICAL RESEARCH* **64**:279-293.

- Jégou A, Ziyat A, Barraud-Lange V, Perez E, Wolf JP, Pincet F, Gourier C. 2011. CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:10946–10951.
- Jervis KM, Robaire B. 2001. Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol. Reproduction* **65**:696–703.
- Ji YZ, Wolf JP, Jouannet P, Bomsel M. 1998. Human gamete fusion can bypass beta1 integrin requirement. *Hum. Reproduction* **13**:682-689.
- Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:4892-6.
- Johnson L. 1991. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. *Biology of reproduction* **44**: 284-291.
- Johnson L, Blanchard TL, Varner DD, Scrutchfield WL. 1997. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology* **48**: 1199–1216.
- Kaji K, Oda S, Miyazaki S, Kudo A. 2002. Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, mouse CD81: polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm–egg fusion. *Dev. Biology* **247**:327–334.
- Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S, Kudo A. 2000. The gamete fusion process is defective in eggs of CD9-deficient mice. *Nat. Genetics* **24**:279–282.
- Kaltenboeck B, Wang C. 2005. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Advances in Clinical Chemistry* **40**:219-259.
- Kamel AA-E. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology* **2**: 91–95.
- Karp G, Iwasa J, Marshall WF. 2017. *Karp's cell biology: Global Edition*. John Wiley & Sons Inc, New Jersey.
- Kim E, Kim J-S, Lee Y, Song B-S, Sim B-W, Saitoh T, Yazawa H, Nunoya T, Chang K-T. 2013. Molecular Cloning, Characterization of Porcine IZUMO1, an IgSF Family Member. *Reproduction in Domestic Animals* **48**:90-97.

Khoirinisah T, Fadhila A, Wibowo T, Kartikasari LR, Cahydi M. 2020. Specific Primer Design of COI Gene and Its Potential Application for Species Identification of Meats. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science **478**:012040 DOI:10.1088/1755-1315/478/1/012040.

Klinovská K, Sebkova N, Dvorakova-Hortova K. 2014. Sperm-Egg Fusion: A Molecular Enigma of Mammalian Reproduction. International Journal of Molecular Sciences **15**:10652–10668.

Krementsov DN, Weng J, Lambelé M, Roy HN, Thali M. 2009. Tetraspanins regulate cell-to cell transmission of HIV-1. Retrovirology **6**:65–76.

Labguide. 2014. Real-time PCR. Available from <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/> (accessed June 2020).

Lalam N. 2006. Estimation of the reaction efficiency in polymerase chain reaction. J Theor Biology **242**:947–953.

Lee PD, Sladek R, Greenwood CM, Hudson TJ. 2002. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. Genome Research **12**:292–297.

Levy S, Shoham T. 2005a. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. Physiology **20**:218–224.

Levy S, Shoham T. 2005b. The tetraspanin web modulates immune-signaling complexes. Nature Reviews Immunology **5**:136–148.

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

Lopate Ch. Le Blanc M. Knottenbelt CD. 2003. The stallion. Pages 43-112 in Knottenbelt CD. Le Blanc M. Lopate Ch. Pascoe RR. Equine stud farm medicine and surgery. Saunders Ltd.

Madubashetha H, Wikramasinghe S, De Silva N, Warnakula L, Cooray R. 2019. Development of an Optimized Protocol for the Extraction of DNA from Human Blood Using a Commercial DNA Extraction Kit. Rajarata International Research Conference, Colombo.

Maecker HT, Todd SC, Levy S. 1997. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. FASEB J **11**:428–442.

Marvan F, Hampl A, Hložánková E, Kresan J, Massanyi L, Vernerová E, Jelínek K. 1998. Morfologie hospodářských zvířat – 2. vydání. Brázda, Praha.

Masciopinto F, Giovani C, Campagnoli S, Galli-Stampino S, Colombatto P, Brunetto M, Yen TSB, Houghton M, Pileri M, Abrignani S. 2004. Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *European Journal of Immunology* **34**:2834–2842.

McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. 2011. *Equine Reproduction*, second edition. Wiley-Blackwell, West Sussex.

Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Russell LD. 1990. Abnormal manchette development in spermatids of azh/azh mutant mice. *American Journal of Anatomy* **188**:74–86.

Miller BJ, Georges-Labouesse E, Primakoff P, Myles DG. 2000. Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin $\alpha 6\beta 1$ and is CD9-dependent. *J. Cell Biology* **149**:1289–1296.

Min G, Wang H, Sun T-T, Kong X-P. 2006. Structural basis for tetraspanin functions as revealed by the cryo-EM structure of uroplakin complexes at 6-Å resolution. *Journal of cell biology* **173**:975-983.

Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M, Mekada E. 2000. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* **287**:321-324.

Morel MCGD. 2008. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*, 3rd edition. CABI International, Londýn.

Moreno RD, Schatten G. 2000. Microtubule configurations and post-translational alpha-tubulin modifications during mammalian spermatogenesis. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **46**: 235–246.

Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**:335-3351.

Nakano S, Fujimoto M, Hara H, Sugimoto N. 1999. Nucleic acid duplex stability: influence of base composition on cation effects. *Oxford University Press* **27**:2957-65.

Nakazawa Y, Sato S, Naito M, Kato Y, Mishima K, Arai H, Tsuruo T, Fujita N. 2008. Tetraspanin Family Member CD9 Inhibits Aggrus/podoplanin-induced Platelet Aggregation and Suppresses Pulmonary Metastasis. *Blood* **112**:1730-9.

Nixon B, Aitken RJ, McLaughlin EA. 2007. New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**:1805-1823.

Nydegger S, Khurana S, Krementsov DN, Foti M, Thali M. 2006. Mapping of tetraspanin enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J. Cell Biology* **173**:795–807.

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

Okabe M. 2013. The cell biology of mammalian fertilization. *Development* **140**:4471–4479.

Perkins JR, Dawes JM, McMahon SB, Bennett DLH, Orenge C, Kohl M. 2012. Read qPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data. *BMC Genomics* **13**:1-8.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**:2002-2007.

Pfaffl MW. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. Pages 87-112 in Bustin SA, editor. *A-Z of quantitative PCR*. International University Line. La Jolla, CA.

Pfaffl MW. 2006. Relative quantification. Pages 63-80 in Dvorak T, editor. *Real-time PCR*. Taylor & Francis Ltd, New York.

Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. 2013. An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinformatics Biomath* **3**:71-85.

Reece WO. 2010. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat 2., rozšířené vydání*. Grada, Praha.

Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* **8**:597-608.

Ricker DD, Chamness SL, Hinton BT, Chang TSK. 1996. Changes in luminal fluid protein composition in the rat cauda epididymidis following partial sympathetic denervation. *J Andrology* **17**:117-126.

Rozen S, Skaletsky H. 2000. PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* **132**:365-386.

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

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

Rubinstein E, Ziyat A, Wolf JP, Le Naour F, Boucheix C. 2006a. The molecular players of sperm–egg fusion in mammals. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **17**:254-263.

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

Salvolini E, Buldreghini E, Lucarini G, Vignini A, Lenzi A, Di Primio R, Balercia G. 2013. Involvement of sperm plasma membrane and cytoskeletal proteins in human male infertility. *Fertility and Sterility* **99**:697-704.

Secrist H, Levy S, DeKruyff RH, Umetsu DT. 1996. Ligation of TAPA-1 (CD81) or major histocompatibility complex class II in co-cultures of human B and T lymphocytes enhances interleukin-4 synthesis by antigen-specific CD4⁺ T cells. *Eur J Immunology* **26**:1435-1442.

Seigneuret M, Delaguillaumie A, Lagaudrière-Gesbert C, Conjeaud H. 2001. Structure of the tetraspanin main extracellular domain: A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *Journal of Biological Chemistry* **276**:40055–40064.

Siddappa CM, Saini M, Das A, Doreswamy R, Sharma AK, Gupta PK. 2013. Sequence Characterization of Mitochondrial 12S rRNA Gene in Mouse Deer (*Moschiola indica*) for PCR-RFLP Based Species Identification. *Molecular Biology International* **2013** DOI:10.1155/2013/783925.

Schill WB, Töpfer-petersen E, Heissler E. 1988. The sperm acrosome: Functional and clinical aspects. *Human Reproduction* **3**:139–145.

Sikand K, Singh J, Ebron JS, Shukla GC. 2012. Housekeeping Gene Selection Advisory: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and β -Actin Are Targets of miR-644a. *PLOS ONE* **7**:e47510 DOI: org/10.1371/journal.pone.0047510.

Simões PM, Mialdea G, Reiss D, Sagot MF, Charlat S. 2011. Wolbachia detection: an assessment of standard PCR protocols. *Molecular Ecology Resources* **11**:567-572.

Singethan K, Muller N, Schubert S, Luttge D, Kremmentsov DN, Khurana SR, Krohne G, Schneider-Schaulies S, Thali M, Schneider-Schaulies J. 2008. CD9 clustering and formation of microvillizippers between contacting cells regulates virus-induced cell fusion. *Traffic* **9**:924-935.

Sláma P, Pavlík A, Tančín V. 2015. Morfologie a fyziologie hospodářských zvířat. Mendelova univerzita v Brně, Brno.

Sutovsky P. 2009. Sperm-egg adhesion and fusion in mammals. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **11**:11.

Schmidt C, Kunemund V, Wintergerst ES, Schmitz B, Schachner M. 1996. CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. *Journal of Neuroscience Research* **43**:12–31.

Schwander M, Leu M, Stumm M, Dorchies OM, Ruegg, UT, Schittny J, Muller U. 2003. β 1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev. Cell* **4**:673–685.

Schwarz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. 1995. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **11**:549-599.

Stein KK, Primakoff P, Myles D. 2004. Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *Journal of Cell Science* **117**:6269-6274.

Stipp CS, Hemler ME. 2000. Transmembrane-4-superfamily proteins CD151 and CD81 associate with alpha 3 beta 1 integrin, and selectively contribute to alpha 3 beta 1-dependent neurite outgrowth. *J Cell Science* **113**:1871–82.

Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J. 2005. *Metody molekulární biologie* Masaryk University Press, Brno.

Takahashi K, Yan IK, Kim Ch, Kim J, Patel T. 2014. Analysis of extracellular RNA by digital PCR. *Frontiers in Oncology* **4**:1-6.

Takeda Y, Tachibana I, Miyado K, Kobayashi M, Miyazaki T, Funakoshi T, Kimura H, Yamane H, Saito Y, Goto H, Yoneda T, Yoshida M, Kumagai T, Osaki T, Hayashi S, Kawase I, Mekada E. 2003. Tetraspanins CD9 and CD81 Function to Prevent the Fusion of Mononuclear Phagocytes. *J Cell Biology* **161**:945-56.

Todres E, Nardi JB, Robertson HM. 2000. The tetraspanin superfamily in insects. *Insect. Mol. Biology* **9**:581–590.

Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Pontén F. 2015. The Human Protein Atlas. Available from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000010278-CD9/tissue> (accessed June 2020).

Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR. 2008. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *The Plant Cell* **20**:1736-1737.

van Spruiel AB, Figdor CG. 2010. The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect* **12**:106–112.

van Zelm MC, Smet J, Adams B, Mascart F, Schandene L, Janssen F, Ferster A, Kuo Ch-Ch, Levy S, van Dongen JJM, van der Burg M. 2010. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *JCI* **120**:1265–74.

Varner DD, Gibb Z, Aitken RJ. 2015. Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. *Equine Veterinary Journal* **47**:16–24.

Varner DD, Johnson L. 2007. From a sperm's eye view-revisiting our perception of this intriguing cell. *AAEP Proceedings* **53**:104-77.

Vicens A, Roldan ERS. 2014. Coevolution of positively selected IZUMO1 and CD9 in rodents: Evidence of interaction between gamete fusion proteins? *Biol Reproduction* **90**:1-9.

Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121**:1129–1137.

Vogelstein B, Kinzler KW. 1999. Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**:9236-9241.

Wahyuni F, Seprianto S. 2018. Analisis Bioinformatika Gen Penyandi HalichondrinB Dari Spons Laut Sebagai Kandidat Anti Kanker. *IJOB* **2**:57-66.

Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biology* **3**:59–64.

Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM. 1987. *Molecular biology of the gene Volume II (4th Edition)*. Benjamin Cummings, Kalifornie.

Weeds A. 1982. Actin-binding proteins: regulators of cell architecture and motility. *Nature (London)* **296**:811-816.

Weng J, Kremontsov DN, Khurana S, Roy NH, Thali M. 2009. Formation of syncytia is repressed by tetraspanins in human immunodeficiency virus type 1-producing cells. *J. Virology* **83**:7467–7474.

Wong MI, Medrado JF. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* **39**:75-85.

Wolosewick JJ, Bryan JHD. 1977. Ultrastructural characterization of the manchette microtubules in the seminiferous epithelium of the mouse. *American Journal of Anatomy* **150**: 301–331.

Wright GJ. 2009. Signal initiation in biological systems: the properties and detection of transient extracellular protein interactions. *Molecular BioSystems* **5**:1405-1412.

Wu DYW, Ugozzoli L, Pal BK, Qian J, Wallace RB. 1991. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biology* **10**:233-238.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. Pages 189-317 in Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York.

Yanagimachi R. 1981. Mechanisms of Fertilization in Mammals. Pages 81-82 in Mastroianni L, Biggers JD, editors. *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. Springer, Boston.

Yano R, Matsuyama T, Kaneko T, Kurino H, Murayama E, Toshimori K, Iida H. 2010. Bactericidal/Permeability-Increasing Protein Is Associated With the Acrosome Region of Rodent Epididymal Spermatozoa. *Journal of Andrology* **31**:201-214.

Yauch RL, Hemler ME. 2000. Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase. *Biochemical Journal* **351**:629-637.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**:134.

Yoshida K, Kawano N, Harada Y, Miyado K. 2014. Role of CD9 in Sperm–Egg Fusion and Virus-Induced Cell Fusion in Mammals. Pages 383-391 in Sawada H, Inoue N, Iwano M, editors. *Sexual Reproduction in Animals and Plants*. Springer, Tokyo.

Yzama F, Nishida T, Kurohmaru M, Hayashi Y. 1988. The fine structure of the blood-testis barrier in the boar. *Jap J Vet Science* **50**:1259-1261.

Zhang L, Li W-H. 2004. Mammalian Housekeeping Genes Evolve More Slowly Than Tissue-Specific Genes. *Molecular Biology and Evolution* **21**:236-9.

Zhu X, Evans JP. 2002. Analysis of the roles of RGD-binding integrins, $\alpha 4/\alpha 9$ integrins, $\alpha 6$ integrins, and CD9 in the interaction of the fertilin β (ADAM2) disintegrin domain with the mouse egg membrane. *Biol. Reproduction* **66**:1193–1202.

Zhou S-M, Tao Z, Shen C, Qian D, Wang C-L, Zhou Q-C, Jin S. 2018. β -actin gene expression is variable among individuals and not suitable for normalizing mRNA levels in *Portunus trituberculatus*. *Fish and Shellfish Immunology* **81**:338-342.

Ziyyat A, Rubistein E, Monier-Gavalle F, Barraud V, Kulski O, Prenant M, Boucheix C, Bomsel M, Wolf JP. 2006. CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin $\alpha 6\beta 1$, which are involved in human and mouse gamete fusion. *J Cell Science* **119**:416-424.