

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Studium vazby spermií na *zona pellucida* oocytu

Diplomová práce

**Bc. Lucia Hrabovská
Reprodukční biotechnologie**

**Vedoucí práce: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.
Konzultant: Ing. Lucie Tůmová**

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Studium vazby spermií na *zona pellucida* oocytu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. dubna 2021

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala mé vedoucí diplomové práce RNDr. Pavle Postlerové, PhD., a rovněž mé konzultantce Ing. Lucii Tůmové za odborné vedení, ochotu a cenné rady při práci v laboratoři nebo při psaní diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat i dalším pracovníkům z Katedry veterinárních disciplín za ochotu a odbornou pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i celé mojí rodině za obrovskou podporu během mých studií v Praze.

Studium vazby spermií na *zona pellucida* oocytu

Souhrn

Spermie musí podstoupit několik procesů, aby byly schopny navázat se na *zona pellucida* (ZP) oocytu a následně oplodnit oocyt. Mezi tyto procesy patří maturace v epididymu a kapacitace v samičím reprodukčním traktu, během nichž dochází k reorganizaci plazmatické membrány a přeskupení povrchových proteinů spermie. Během kapacitace jsou v důsledku těchto změn na povrchu spermií vystaveny proteiny, které mohou být zapojeny do primární vazby spermií na ZP oocytu. Na povrchu spermií bylo popsáno mnoho proteinů, které vykazují afinitu k ZP, přičemž jedním z možných kandidátů se ZP vázající aktivitou by mohl být také kančí lactadherin (p47).

Cílem této práce bylo lokalizovat a detekovat protein p47 v kančích ejakulovaných, *in vitro* kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných spermiích a zjistit, zda dochází k blokaci vazby na ZP oocytu pomocí specifické protilátky proti p47.

Kančí protein p47 byl lokalizován v ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermiích v akrozomální oblasti hlavičky, zatímco ve spermiích po akrozomální reakci byl nalezen v celé oblasti hlavičky spermie. V extraktech ejakulovaných, *in vitro* kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných spermií byl p47 detekován jako dva proteinové proužky o přibližné molekulové hmotnosti 35 a 45 kDa. Po inkubaci spermií se specifickou protilátkou 1H9 proti p47 byla částečně blokována vazba spermií na ZP oocytů.

Naše výsledky naznačují, že lokalizace proteinu p47 není zřejmě jen na povrchu spermií, ale také uvnitř akrozomu, především pak na vnitřní akrozomální membráně. Redukce počtu spermií navázaných na oocyt v *in vitro* studii po inkubaci s protilátkou proti p47 naznačuje možné zapojení tohoto proteinu do vazby spermií na ZP oocytu.

Klíčová slova: spermie, oocyt, lactadherin, Western blot, imunofluorescence

Study of sperm binding to the zona pellucida of the oocyte

Summary

Sperm must undergo several processes to gain ability to attach the *zona pellucida* (ZP) of the oocyte and subsequently fertilize the oocyte. These processes include maturation in the epididymis and capacitation in the female reproductive tract, during which the plasma membrane is reorganized, and sperm surface proteins rearranged. During capacitation, due to these changes, proteins are exposed on the surface of the sperm, which may be involved in the primary binding of the sperm to the ZP of the oocyte. Many proteins have been described on the surface of spermatozoa that show affinity for ZP, and boar lactadherin (p47) could also be one of the possible candidates for ZP binding activity.

The aim of this work was to localize and detect the p47 protein in boar ejaculated, *in vitro* capacitated and acrosome-reacted spermatozoa and to determine whether binding to the ZP of the oocyte is blocked when using a specific anti-p47 antibody.

Boar p47 protein was localized in ejaculated and *in vitro* capacitated spermatozoa in the acrosomal region of the head, while in the acrosome-reacted spermatozoa, p47 was located in the entire region of the sperm head. In extracts of ejaculated, *in vitro* capacitated and acrosome-reacted spermatozoa, p47 was detected as two protein bands with approximate molecular weights of 35 and 45 kDa. Incubation of spermatozoa with a specific anti-p47 antibody 1H9 partially blocked sperm binding to ZP oocytes.

Our results suggest that the localization of the p47 protein is probably not only on the surface of spermatozoa, but also inside the acrosome, especially in the inner acrosomal membrane. The reduction in the number of oocyte-bound sperm in an *in vitro* study after incubation with an anti-p47 antibody suggests a possible involvement of this protein in sperm binding to the ZP of the oocyte.

Keywords: sperm, oocyte, lactadherin, Western blot, immunofluorescence

Obsah

1	Úvod	1
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3	Literární rešerše.....	3
3.1	Vazba spermií na <i>zona pellucida</i>.....	5
3.1.1	Glykoproteiny <i>zona pellucida</i>	5
3.1.2	Vazebná místa pro spermie na <i>zona pellucida</i>	6
3.2	Vazebné receptory pro <i>zona pellucida</i> na spermii	7
	β1, 4-galaktosyltransferáza (B4GALT1/GalTase)	8
	Zonadhesin (ZAN).....	8
	Arylsulfatáza A (ARSA/AS-A/SLIP1).....	9
	Enzym konvertující angiotenzin 1 (ACE1)	9
	Proakrosin/akrosin (ACR)	10
3.2.1	Vazebné receptory u kanců	10
	Spermadhesiny	10
	DQH/BSP1/pB1	11
3.3	Lactadherin	11
3.3.1	Lactadherin u myší (SED1)	12
3.3.2	Lactadherin u prasat (p47).....	14
4	Materiál a metodika.....	16
4.1	Příprava vzorků spermií pro Western blot detekci a nepřímou imunofluorescenci	16
4.2	Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie.....	17
4.3	SDS elektroforéza a Western blot detekce.....	18
4.4	Vazebné studie.....	19
4.4.1	Příprava oocytů	19
4.4.2	Příprava spermií.....	20
4.4.3	Vazebná studie – metodika č. 1	20
4.4.4	Vazebná studie – metodika č. 2	21
4.4.5	Vazebná studie – metodika č. 3	21
4.4.6	Hodnocení vazby spermií na <i>zona pellucida</i>	22
4.5	Statistické vyhodnocení	22
5	Výsledky.....	23
5.1	Lokalizace kančího lactadherinu ve spermích	23
5.2	Detekce kančího lactadherinu v extraktech spermií.....	27

5.3	Blokace vazby spermií na <i>zona pellucida</i> oocytu s využitím monoklonální protilátky 1H9 proti lactadherinu	28
5.3.1	Studium vazby podle metodiky č. 1	28
5.3.2	Studium vazby podle metodiky č. 2	29
5.3.3	Studium vazby podle metodiky č. 3	30
6	Diskuze	32
7	Závěr.....	36
8	Literatura.....	37

1 Úvod

Spermie jsou po uvolnění z varlat morfologicky zralé, ale nejsou schopny vazby na *zona pellucida* (ZP) oocyty a následného oplození (Gatti et al. 1999). Aby spermie získaly schopnost vázat se na ZP a následně oplodnit oocyt, musí podstoupit epididymální maturaci v nadvarlatech a kapacitaci v samičím reprodukčním traktu, během nichž dochází k reorganizaci plazmatické membrány spermie a přeskupení povrchových proteinů. Během kapacitace v důsledku těchto změn jsou na povrch spermie vystaveny proteiny, které mohou být zapojeny do vazby na ZP oocyty (Florman & Fissore 2015). Na povrchu spermií bylo popsáno mnoho proteinů s afinitou k ZP, které jsou významné pro vazbu spermií na ZP. Konkrétně na kančích spermiích byly popsány jako vazebné proteiny například spermadhesiny, protein DQH, zonadhesin nebo proakrosin/akrosin (Tumova et al. 2021).

U kanců by jedním z možných kandidátů se ZP vázající aktivitou mohl být také lactadherin (p47). Kančí p47 je periferní protein plazmatické membrány lokalizován v apikální oblasti hlavičky spermie, u kterého byla popsána schopnost vazby k sacharidovým strukturám epitelu vejcovodu (Ensslin et al. 1998; Petrunkina et al. 2003). Během kapacitace se p47 dostává do celé akrozomální oblasti hlavičky spermie a předpokládá se, že tato redistribuce proteinu napomáhá odpoutat se spermiím od epitelu vejcovodu (Silva et al. 2014). Nicméně kančí protein p47 na povrchu spermií zůstává i po kapacitaci (Zigo et al. 2015), a tak se lze domnívat, že by mohl být zapojen do dějů spojených s vazbou spermií na ZP. U p47 sice byla popsána vazebná aktivita na sacharidové struktury ZP oocyty (Ensslin et al. 1998), ale zda je skutečně zapojen do vazby spermií na ZP, nebylo doposud pomocí vazebných studií potvrzeno.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

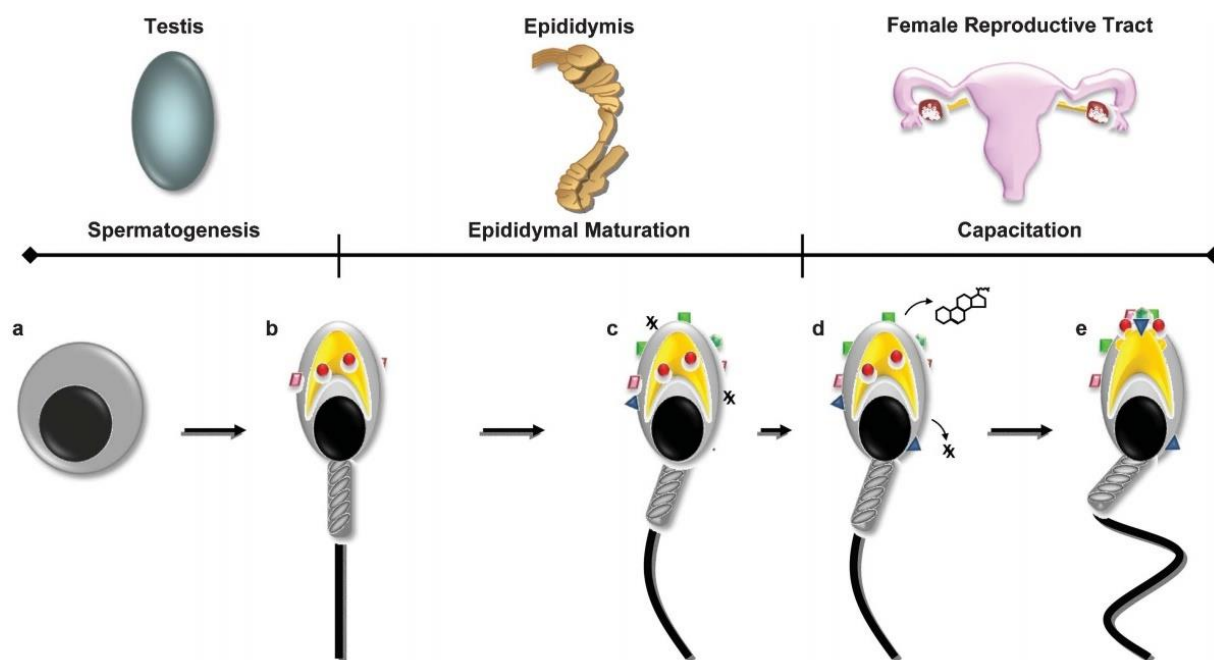
Cílem diplomové práce je ověření hypotézy, podle které dochází k blokaci vazby spermií na *zona pellucida* (ZP) oocytu s využitím protilátky proti vybranému vazebnému receptoru lactadherinu (p47), který je lokalizován na povrchu spermie.

Na základě této hypotézy byly vytyčeny následující cíle práce:

1. lokalizace proteinu p47 ve spermiích kanců pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie
2. detekce proteinu p47 v extraktech kančích spermií
3. blokace vazby spermií na ZP oocytu pomocí protilátky proti p47

3 Literární rešerše

Spermie jsou vysoce diferenciované samčí pohlavní buňky, jejichž vývoj probíhá ve varlatech během spermatogeneze. Spermie jsou po uvolnění z varlat sice morfologicky zralé, ale nejsou schopny vazby na *zona pellucida* (ZP) a následného oplození (Gatti et al. 1999). Pro správný průběh oplození musí spermie nejprve dozrát v nadvarlatech, kde prodělávají řadu fyziologických a biochemických změn, které souhrnně označujeme epididymální maturace (Guyonnet et al. 2011). Během epididymální maturace dochází ke změně rozmístění některých membránových proteinů, některé proteiny jsou posttranslačně upraveny, jiné jsou odstraněny a nahrazeny proteiny z nadvarlate. Proteiny pocházející z nadvarlat se vážou na plazmatickou membránu spermie a některé z nich jsou důležité pro vazbu na ZP oocyty (viz Obr. 1). V průběhu epididymální maturace se mění i fyzikální a chemické vlastnosti lipidů a fosfolipidů plazmatické membrány. Do membrány se zabudovává cholesterol, který společně s některými proteiny na plazmatické membráně, jež mají funkci dekapacitačních faktorů, brání předčasné akrozomální reakci (AR) (Toshimori 2003).



Obrázek 1: Klíčové události nezbytné pro oplození schopnost spermii a s nimi spojené změny na povrchu spermie. Proces spermatogeneze probíhá ve varlatech, kde se ze spermatid (A) stávají spermie (B). Na povrchu spermii se nachází proteiny pocházející z varlat (•), které se mohou účastnit vazby na ZP. C) Spermie opouští varle a přechodem přes nadvarle, probíhá epididymální maturace spermii, kdy dochází k remodelaci plazmatické membrány, nahrazení nebo posttranslační úpravě některých proteinů (••), které mají vazebnou funkci k ZP. Během ejakulace se spermie dostává do kontaktu se semennou plazmou, odkud se na spermii vážou proteiny, dekapacitační faktory (≠), které brání předčasné kapacitaci. Proteiny přítomné na ejakulované spermii mohou mít vazebnou afinitu jak k epitelu vejcovodu, tak k ZP. Po vstupu spermii do samičího reprodukčního traktu se vážou k epitelu vejcovodu, vytváří ovidukální rezervoár a poté podstupují kapacitaci. D) Proces kapacitace je zahájen odstraněním dekapacitačních faktorů (≠) a cholesterolovým efluxem. E) V průběhu kapacitace dochází i k reorganizaci plazmatické membrány a přeskupení povrchových proteinů (•), které jsou zapojeny do vazby na ZP. Převzato a upraveno podle Reid et al. (2011).

Během ejakulace spermie opouští ocas nadvarlete a přes chámovod jsou dopraveny do močové trubice. Z močové trubice jsou pak spermie vypuzeny ven ze samčího reprodukčního traktu společně se semennou plazmou v podobě ejakulátu, přičemž počet spermií a objem ejakulátu se mezi savčími druhy liší (Markham & Coffey 1994). V průběhu ejakulace jsou spermie přímo vystaveny sekretům přídatných pohlavních žláz (semenné váčky, prostata, Cowperovy žlázy). Tyto sekrety souhrnně tvoří semennou plazmu, která spermiím poskytuje vhodné prostředí k přežití v samičím pohlavním traktu úpravou pH. Semenná plazma obsahuje například fruktózu, kyselinu citronovou, volné aminokyseliny, ionty hořčíku, vápníku a zinku, prostaglandiny, cholesterol a proteiny, které se vážou na povrch spermie prostřednictvím membránových fosfolipidů (Markham & Coffey 1994; Jonáková et al. 2007). Proteiny semenné plazmy mají v reprodukci mnoho funkcí. Chrání vazebná místa na povrchu spermií, jsou důležité pro vazbu na sacharidové struktury ve vejcovodu a některé proteiny semenné plazmy fungují jako dekapacitační faktory, jejichž úlohou je bránit předčasně kapacitaci. V neposlední řadě mohou být významné i pro vazbu spermie na ZP oocytu (Petrunkina et al. 2001; Leahy & Gadella 2011).

Ejakulované spermie vstupují do samčího pohlavního traktu a přes děložní krček a dělohu se dostávají až k istmické části vejcovodu, kde se vážou na epitel vejcovodu, čímž vzniká oviduktální rezervoár (Hunter 1981). Vznik oviduktálního rezervoáru je zprostředkován lektinovými vazbami, kdy se povrchové proteiny spermií vážou na sacharidové struktury epitelu vejcovodu. Úlohou oviduktálního rezervoáru je prodloužit životaschopnost spermií a synchronizovat kapacitaci spermií s ovulací oocytu (Töpfer-Petersen et al. 2002). Uvolňování spermií z oviduktálního rezervoáru je doprovázeno mnoha biochemickými a fyziologickými změnami jak vně, tak uvnitř spermie. Tyto změny jsou souhrnně pojmenovány jako kapacitace spermií (Austin 1951; Chang 1951). Kapacitace je zahájena uvolněním dekapacitačních faktorů z povrchu spermie a cholesterolovým efluxem, díky kterému se membrána stává fluidnější. Dochází k mnoha dalším změnám, jako je například reorganizace plazmatické membrány či urychlení metabolismu spermie, ke změnám v koncentracích vápenatých a hydrogenuhličitanových iontů, k hyperpolarizaci membránového potenciálu a ke změně pH (Florman & Fissore 2015). Výsledkem kapacitace jsou hyperaktivované spermie, které jsou schopny uvolnit se z oviduktálního rezervoáru, interagovat se ZP, podstoupit akrozomální reakci a oplodnit oocyt (Tulsiani et al. 2007) (viz Obr. 1).

3.1 Vazba spermií na *zona pellucida*

Důležitým krokem v průběhu oplození je rozpoznání gamet a primární vazba spermie na *zona pellucida* (ZP) oocytu. Tuto schopnost spermie získává po kapacitaci v samičím pohlavním traktu. Primární vazba je důležitá nejen z hlediska vazby spermie k ZP, ale také tím, že iniciuje signální kaskádu, která spouští akrozomální reakci (AR) (Yanagimachi 1994). Existují i výjimky, jako je například myš, u které bylo popsáno, že k AR dochází ještě před kontaktem se ZP oocytu (Jin et al. 2011). V průběhu AR dochází k fúzi apikální plazmatické membrány s vnější akrozomální membránou, čímž se uvolní obsah akrozomu, a to umožní spermií penetrovat ZP. Výsledkem AR je odhalení vazebných míst pro sekundární vazbu spermie na ZP a umožnění průchodu spermie skrz ZP (Yanagimachi 1994).

3.1.1 Glykoproteiny *zona pellucida*

Zona pellucida (ZP) je nebuněčný glykoproteinový obal, který obklopuje oocyt. ZP je elastická, fibrilární extracelulární matrix, jejíž povrch je pórovitý a propustný pro makromolekuly (Wassarman & Mortillo 1991). Glykoproteiny ZP mohou být syntetizovány buď jenom oocytem, nebo pouze folikulárními buňkami anebo oocytem i folikulárními buňkami zároveň. U myši jsou glykoproteiny syntetizovány rostoucím oocytem, což se projevuje i na tloušťce ZP (Sinowatz et al. 2001), je tenčí a má přibližně 5 μm (Dunbar et al. 1994). Naopak u prasete a člověka jsou glykoproteiny ZP syntetizovány oocytem a zároveň folikulárními buňkami (Sinowatz et al. 2001) a tloušťka ZP se tak u prasete a člověka pohybuje mezi 13-16 μm (Dunbar et al. 1994).

ZP chrání oocyt a brání polyspermnímu oplození (Epifano & Dean 1994). ZP kromě oocytu chrání také embryo v jeho raném stádiu vývoje. Pomáhá zachovávat jeho integritu během několika prvních dělení, brání přichycení blastomer k epiteliální výstelce vejcovodu a chrání před potenciálním imunologickým odmítnutím matky (Gupta et al. 2012). Nicméně ZP má kromě fyzické ochrany mnoho dalších důležitých funkcí. Poskytuje vazebná místa pro receptory lokalizované na povrchu spermií, čímž zprostředkovává následnou vazbu spermií na ZP a podílí se na zahájení AR spermií u některých savčích druhů (Epifano & Dean 1994; Ozgur et al. 1998).

Savčí ZP se skládá ze tří nebo čtyř glykoproteinů (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4) v závislosti na druhu (Goudet et al. 2008). Glykoproteiny ZP mohou být také označeny podle tří hlavní genů *ZPA*, *ZPB* a *ZPC*, kterými jsou kódovány (Harris et al. 1994). Heterogenitu glykoproteinů ZP zajišťují posttranslační modifikace, jako například glykosylace a sulfatace, díky kterým mají glykoproteiny u různých savčích druhů odlišné molekulové hmotnosti (Wassarman 1990; Hedrick 1996). Mezidruhové rozdíly ve složení glykoproteinů ZP jsou uvedeny v Tab. 1.

Tabulka 1: Složení glykoproteinů zona pellucida u vybraných savčích druhů.

Druh	ZP gen	ZP protein	Molekulární hmotnost (kDa)
myš	ZP1 (ZPB1)	ZP1	200 (dimer)
	ZP2 (ZPA)	ZP2	120
	ZP3 (ZPC)	ZP3	83
	ZP4 (ZPB/ZPB2)	není exprimován	-
člověk	ZP1 (ZPB1)	ZP1	65
	ZP2 (ZPA)	ZP2	120
	ZP3 (ZPC)	ZP3	58
	ZP4 (ZPB/ZPB2)	ZP4	65
prase	ZP1 (ZPB1)	není exprimován	-
	ZP2 (ZPA)	ZP2/PZPL	90
	ZP3 (ZPC)	ZP3/ZP3-β	55
	ZP4 (ZPB/ZPB2)	ZP4/ZP-α	55

Převzato a upraveno podle Tumova et al. (2021).

3.1.2 Vazebná místa pro spermie na zona pellucida

Stejně jako zastoupení, tak i role jednotlivých glykoproteinů zona pellucida (ZP) není u všech savčích druhů stejná a vazebná místa se mohou lišit.

U myši se původně za vazebné místo pro spermie považoval glykoprotein ZP3, který byl důležitý z hlediska primární vazby spermie na ZP a následného spuštění akrozomální reakce (AR) (Bleil & Wassarman 1980, 1983; Beebe et al. 1992). Nicméně tento fakt byl vyvrácen autory Jin et al. (2011) kteří zjistili, že u myši dochází k AR ještě před dosažením ZP. Použili transgenní myši s fluorescenčně značeným akrozomem a zjistili, že spermie, které neprodělaly AR před kontaktem se ZP oocyty, jen zřídka penetrovaly skrz ZP. Zatímco spermie, které začaly AR před dosažením ZP, byly schopny penetrovat přes ZP snadněji (Jin et al. 2011). Vazebná místa se u myši nacházejí i na glykoproteinu ZP2, který funguje jako sekundární receptor pro vazbu spermie na ZP oocyty a váže spermie po AR (Bleil & Wassarman 1988). Glykoprotein ZP1 zajišťuje stabilitu ZP tím, že připojuje vlákna, která vytváří glykoproteiny ZP2 a ZP3 (Greve & Wassarman 1985).

U lidí bylo zjištěno, že primární vazby se účastní glykoproteiny ZP1, ZP3 a ZP4, které jsou schopny vázat kapacitované spermie a spouští AR (Gupta et al. 2012). Glykoprotein ZP2 funguje jako sekundární receptor a je schopen vázat jenom akrozomálně zreagované spermie (Chiu et al. 2008).

U prasat je pro primární vazbu na ZP důležitá spolupráce dvou glykoproteinů, a to ZP3 a ZP4, u kterých je nezbytné, aby tvořily heterokomplex. Na samotný glykoprotein ZP3 se spermie nejsou schopny vázat a následně podstoupit AR (Yurewicz et al. 1998). Glykoprotein ZP2 pak zastává úlohu sekundárního vazebného místa a váže spermie po AR (Prasad et al. 2000).

3.2 Vazebné receptory pro *zona pellucida* na spermii

Na povrchu spermii bylo popsáno mnoho receptorů s afinitou k *zona pellucida* (ZP), které jsou významné pro primární vazbu. Primární vazebné receptory jsou lokalizovány v apikální oblasti hlavičky spermie, kam se dostanou v průběhu spermiogeneze nebo během maturace v nadvarleti, či přímo ze semenné plazmy. Naopak receptory, které jsou zapojeny do sekundární vazby na ZP, pocházejí z varlat a jsou lokalizovány na vnitřní akrozomální membráně anebo přímo v akrozomální matrix (Yanagimachi 1994).

V této kapitole jsou uvedeny pouze příklady nejznámějších receptorů, které byly u myši, člověka a prasete popsány jako vazebné (viz Tab. 2). Kromě zmíněných molekul byla u mnoha savčích druhů nalezena řada dalších receptorů lokalizovaných na spermii, jež jsou pro vazbu na ZP významné, ale jejich popis je již nad rámec této práce.

Tabulka 2: Přehled nejznámějších vazebných receptorů spermii u vybraných savčích druhů a jejich lokalizace na spermii.

Protein	Druh	Lokalizace na spermii	Zdroje
β1, 4 - galaktosyltransferáza (B4GALT1/GalTase)	myš	PM akrozomální oblasti	(Lopez et al. 1985)
	člověk	neznámá	(Huszar et al. 1997)
	kanec	PM akrozomální oblasti	(Larson & Miller 1997)
Zonadhesin (ZAN)	myš	OAM, akrozomální matrix, apikální oblast hlavičky	(Gao & Garbers 1998)
	člověk	PM akrozomální oblasti	(Gao et al. 1997)
	kanec	OAM, akrozomální matrix	(Bi 2002)
Arylsulfatáza A (ARSA/AS-A/SLIP1)	myš	PM akrozomální oblasti, akrozomální matrix	(Tanphaichitr et al. 1993)
	člověk	oblast akrozomu	(Redgrove et al. 2012)
	kanec	PM akrozomální oblasti	(Carmona et al. 2002a)
Enzym konvertující angiotenzin 1 (ACE1)	myš	PM akrozomální oblasti	(Langford et al. 1993)
	člověk	PM akrozomální oblasti, ekvatoriálního segmentu a postakrozomální oblasti a střední část bičíku	(Köhn et al. 1998)

Tabulka 2 (pokračování)

ACE1	kanec	PM akrozomální oblasti	(Williams et al. 1992)
Proakrosin/akrosin (ACR)	myš	oblast akrozomu	(Kallajoki et al. 1986)
	člověk	IAM, ekvatoriální oblast akrozomu	(Tesařík et al. 1988)
	kanec	IAM, akrozom, povrch akrozomu	(Schill et al. 1975)
Lactadherin (MFGES8/SED1/p47)	myš	PM akrozomální oblasti	(Ensslin & Shur 2003)
	člověk	PM akrozomální oblasti	(Copland et al. 2009)
	kanec	PM apikální oblasti hlavičky	(Ensslin et al. 1998)

Vysvětlivky: PM – plazmatická membrána, OAM – vnější akrozomální membrána, IAM – vnitřní akrozomální membrána. Převzato a upraveno podle Tumova et al. (2021).

β1, 4-galaktosyltransferáza (B4GALT1/GalTase)

Jedním z prvních prozkoumaných receptorů pro vazbu spermií na ZP je β1,4-galaktosyltransferáza (B4GALT1/GalTase), který byl popsán u myši (Shur & Hall 1982) a u prasat (Rebeiz & Miller 1999). B4GALT1 je transmembránový protein, který je inkorporován do plazmatické membrány v oblasti akrozomu spermie během jejího vývoje ve varlatech.

U prasat a myši se B4GALT1 váže na sacharidové zbytky na ZP3 (Shur & Hall 1982; Larson & Miller 1997; Rebeiz & Miller 1999). Po vazbě na glykoproteiny ZP3 dochází k agregaci B4GALT1 na povrchu spermií, což spouští jejich akrozomální reakci (AR) (Miller et al. 1992). Původně se předpokládalo, že myši B4GALT1 je důležitým vazebným receptorem. Později Lu & Shur (1997) zjistili, že myši s knockoutovaným genem pro B4GALT1 jsou oplození schopné, a tudíž B4GALT1 není nepostradatelným nebo jediným vazebným receptorem pro ZP na spermiích. Přítomnost B4GALT1 ale poskytuje spermiím výhodu při vazbě na ZP, neboť myši spermie s knockoutovaným genem pro B4GALT1 se na oocyty vázaly v menším počtu oproti spermiím, které na svém povrchu B4GALT1 exprimovaly (Lu & Shur 1997).

Zonadhesin (ZAN)

Zonadhesin (ZAN) je protein s multifunkční mozaikovou doménou, který byl poprvé izolován z kančích spermií (Hardy & Garbers 1994). Později byl ZAN nalezen také ve spermiích myši (Gao & Garbers 1998) a lidí (Wilson et al. 2001). ZAN vykazuje mezi zmíněnými druhy velice podobnou strukturu (Gao & Garbers 1998).

ZAN byl detekován již ve spermatidách v akrozomálním váčku a u kapacitovaných spermií je lokalizován v plazmatické membráně apikální oblasti hlavičky (Bi et al. 2003; Olson et al. 2004). Přítomnost ZAN na kapacitovaných spermiích napovídá, že se účastní vazby na ZP. Bylo zjištěno, že ZAN je významný z hlediska kontroly druhové specifity během adheze gamet. Jeho absence totiž umožňuje spermiím vázat se na ZP jiných druhů. Myší spermie, které neexprimovaly na svém povrchu ZAN se s vyšší afinitou vázaly k ZP prasete, krávy nebo králíka (Tardif & Cormier 2011).

Arylsulfatáza A (ARSA/AS-A/SLIP1)

Arylsulfatáza A (ARSA/AS-A/SLIP1) byla popsána u spermií prasat (Dudkiewicz 1984), myší (White et al. 2000) a lidí (Rattanachaiyanont et al. 2001). ARSA byla nalezena v epididymální tekutině, kam je sekretována epiteliálními buňkami nadvarlat (Weerachayanukul et al. 2003; Ngernsoungnern et al. 2004) a také na plazmatické membráně hlavičky spermie v její akrozomální oblasti (White et al. 2000). U myší bylo zjištěno, že se ARSA nachází i na vnitřní akrozomální membráně spermie a má schopnost vázat se nejen na glykoprotein ZP3, ale i ZP2 (Xu et al. 2012).

Bylo popsáno, že ARSA se nachází v místech, kde na spermiích nacházíme sulfogalaktoylglycerolipid (SGG). SGG je lipid nacházející se na plazmatické membráně hlavičky spermií (White et al. 2000), který může interagovat se sacharidovými zbytky na ZP, a tím pomáhá stabilizovat vazbu spermie na ZP oocytu (Carmona et al. 2002b). ARSA se na SGG váže při průchodu nadvarletem a společně se vážou na glykoprotein ZP3 (Carmona et al. 2002a; Tantibhedhyangkul et al. 2002).

Enzym konvertující angiotenzin 1 (ACE1)

Enzym konvertující angiotenzin 1 (ACE1) byl popsán u myší (Langford et al. 1993), prasat (Williams et al. 1992) a lidí (Pauls et al. 2003).

ACE1 byl identifikován ve dvou formách – somatická (sACE) a zárodečná (tACE) (Hubert et al. 1991). Somatickou formu nacházíme v Leydigových buňkách, nadvarlatech a prostatě (Pauls et al. 2003), zatímco zárodečná forma tACE1 se nachází na spermatidách a spermiích (Lanzillo et al. 1985; Langford et al. 1993). U lidí jsou molekuly tACE1 vystaveny na povrch spermií v průběhu kapacitace a následně i v průběhu AR (Foresta et al. 1987; Köhn et al. 1995).

Hagaman et al. (1998) prokázali, že ACE1 má důležitou úlohu v procesu oplození. Myši, kterým byly knockoutovány obě formy ACE1, vykazovaly horší motilitu spermií ve vejcovodu a také nižší schopnost vazby na ZP oocytu. Později se Kessler et al. (2000) zaměřili na studium pouze tACE1 a zjistili, že myši s knockoutovaným genem pro tACE1 jsou neplodné a oplození schopnost znovu získají po zapnutí genu pro tento protein.

Proakrosin/akrosin (ACR)

Akrosin (ACR) je enzym, který byl popsán jako vazebný receptor a je lokalizován v akrozomální matrix (Jones et al. 1996). ACR byl nalezen nejen u myši (Kallajoki et al. 1986), ale také u prasat (Töpfer-Petersen et al. 1985) a u člověka (Liu & Baker 1993). Ve spermatidách byl nalezen jako neaktivní forma (zymogen) proakrosin, který se díky zvýšení intraakrozomálního pH v průběhu kapacitace mění na svojí aktivní formu akrosin (Baba et al. 1989a, 1989b).

ACR se účastní AR, vazby spermie k ZP oocytu a také napomáhá penetraci spermie skrz ZP (Mao & Yang 2013). ACR je sekundární vazebný receptor, který se váže na glykoprotein ZP2 (Howes et al. 2001). Zajímavé je, že myši spermie s knockoutovaným genem pro ACR jsou oplození schopné, ale skrz ZP penetrují pomaleji oproti spermii s exprimovaným ACR. ACR urychluje rozptýlení akrozomální matrix, tudíž spermie, které exprimují ACR dokážou oplodnit oocyt rychleji než spermie, kterým byl gen pro ACR knockoutován. U myši s knockoutovaným genem pro ACR dochází k pomalejšímu uvolňování některých akrozomálních proteinů (Adham et al. 1997; Mao & Yang 2013).

3.2.1 Vazebné receptory u kanců

Nejnámější a nejlépe popsané vazebné receptory specifické pro kance jsou proteiny semenné plazmy, které patří do skupiny spermadhesinů a protein DQH.

Spermadhesiny

Spermadhesiny jsou periferní membránové proteiny, které tvoří většinu proteinů semenné plazmy (Dostálová et al. 1994). K nejlépe prozkoumaným spermadhesinům patří AWN, AQN1, AQN3, PSP-I a PSP-II, které mají různě glykosylované izoformy (Töpfer-Petersen et al. 1998). Spermadhesiny jsou sekretovány semennými vajíčky, ale také prostatou a nadvarletem (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002; Manásková & Jonáková 2008). Jedině AWN je zároveň syntetizován i epiteliálními buňkami v *rete testis* a *tubuli recti* (Sinowatz et al. 1995; Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002). Spermadhesiny jsou lokalizovány v akrozomální oblasti hlavičky spermie, kam se vážou v průběhu ejakulace (Töpfer-Petersen et al. 1998; Jonáková & Tichá 2004; Manásková & Jonáková 2008).

Spermadhesiny mají v reprodukci mnoho funkcí. Stabilizují plazmatickou membránu a účastní se tvorby ovidukálního rezervoáru (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005; Liberda et al. 2006). Kančí AQN1 je protein vázající glykany, který je zapojen do vazby spermii k ovidukálnímu rezervoáru. AQN1 váže manosové a galaktosové zbytky na buňkách epitelu vejcovodu (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005). Dále spermadhesiny fungují jako dekapacitační faktory. AWN a AQN3 se váží na povrch spermii prostřednictvím interakcí s fosfolipidy v plazmatické membráně a brání předčasné AR (Dostálová et al. 1995). V průběhu kapacitace je část spermadhesinů z povrchu spermii uvolněna (Dostálová et al. 1994). Část spermadhesinů, která zůstává na povrchu spermii po kapacitaci je zapojena do vazby spermii na ZP oocytu

(Ensslin et al. 1995; Töpfer-Petersen et al. 1998). Hlavními kandidáty pro vazbu na ZP jsou AWN, AQN1 a AQN3, které mají schopnost vázat se na sacharidové struktury ZP (Töpfer-Petersen et al. 2008).

DQH/BSP1/pB1

DQH/pB1 je povrchový protein spermií, který patří mezi adhezní proteiny (Calvete et al. 1997; Jonáková et al. 1998; Bezouska et al. 1999). DQH protein je homologní s bovinním proteinem semenné plazmy (BSP) a s hřebčím HSP-1 a 2 (Seidah et al. 1987; Calvete et al. 1995). DQH byl nalezen v tekutině a tkáni semenných váčků a na povrch spermií se váže během ejakulace. Je lokalizován v akrozomální oblasti hlavičky spermií (Manásková et al. 2007). DQH protein má sice oproti spermadhesinům odlišnou strukturu, ale vykazuje velmi podobné vazebné vlastnosti (Manásková et al. 2007). DQH interaguje s epiteliálními buňkami vejcovodu a pravděpodobně se účastní tvorby oviduktálního rezervoáru (Liberda et al. 2006). Interaguje nejen se sulfatovanými polysacharidy, ale také s hyaluronovú kyselinou, která se nachází ve vejcovodu (Manásková et al. 2007). DQH je schopen vázat glykoproteiny ZP a monoklonální protilátky připravené proti tomuto proteinu snižovaly vazbu spermií na oocyty (Jonáková et al. 1998; Manásková et al. 2007).

U kanců byly popsány i další proteiny, které se účastní vazby spermie na ZP oocyty. Kromě výše zmíněných k nim patří například adhezní protein z (APz). APz je membránový protein, patří k primárním vazebným receptorům spermií pro ZP a váže se na glykoprotein ZP3 (Peterson et al. 1991). Dále kančí sp38, který je homologem myšího IAM 38 a lidského ZPB1 a má podobnou charakteristiku výskytu ve spermiích jako proakrosin. Protein sp38 je lokalizován na vnitřní a vnější akrozomální membráně a v akrozomální matrix a pravděpodobně je zapojen do sekundární vazby spermií na ZP oocyty (Mori et al. 1993, 1995; McLeskey et al. 1997; Yu et al. 2006). Jedním z podrobněji prozkoumaných možných kandidátů se ZP vázající aktivitou na kančích spermiích je také lactadherin, jehož úloha v reprodukci je popsána níže.

3.3 Lactadherin

Lactadherin je glykoprotein, který byl nalezen u více savčích druhů (viz Tab. 3). Patří mezi proteiny, které jsou sekretovány extracelulární matrix. Lactadherin má multidoménovou strukturu a účastní se mnoha biologických a fyziologických procesů, jako například fagocytóza, ateroskleróza, angiogeneze, či regulace hemostázy (Kamińska et al. 2018). Lactadherin byl nalezen nejen v mléčné žláze u myší a lidí, či v mléku krav, ale také v mozku potkanů, v myších varlatech nebo na kančích spermiích (Shur et al. 2004) (viz Tab. 3).

Tabulka 3: Lokalizace a nomenklatura lactadherinu v různých savčích tkáních a tělních tekutinách.

Druh	Zdroj	Nomenklatura	Zdroje
myš	varlata	SED1	(Ensslin & Shur 2003)
	mléčná žláza	MFG8	(Stubbs et al. 1990)
potkan	mozek	rAGS	(Ogura et al. 1996)
kráva	mléko	PAS-6/7	(Andersen et al. 1997)
	mléko	Lactadherin	(Andersen et al. 2000)
prase	spermie	p47	(Ensslin et al. 1998)
člověk	mléčná žláza	BA46	(Couto et al. 1995)

Převzato a upraveno podle Shur et al. (2004).

Zajímavá je úloha myšího lactadherinu v mléčné žláze, kde je zapojen do remodelace mléčné žlázy a do procesů spojených s rozpoznáním buněk podstupujících apoptózu. Nedostatek lactadherinu vede k akumulaci tukových kapének v mléčných kanálcích, což způsobuje jejich zánět a mastididu (Hanayama & Nagata 2005).

Za zmínku stojí i lactadherin nalezen v mléčné žláze u lidí a izolovaný z mléka (Giuffrida et al. 1998). Jeho zvýšená hladina v mléčné žláze může indikovat výskyt nádorového onemocnění mléčných žláz. Zajímavé je, že protilátky proti lactadherinu z mléčné žlázy lidí blokují tvorbu nádoru u myši, a právě proto by mohl sloužit jako marker karcinomu mléčných žláz (Ceriani et al. 1982; Larocca et al. 1991; Couto et al. 1995; Carmon et al. 2002). Fyziologická koncentrace lactadherinu v mléce poskytuje ochranu proti rotavirové infekci u kojeneckých dětí. K imobilizaci viru pravděpodobně dochází po navázání viru na jednu z lactadherinových domén (Newburg et al. 1998; Kvistgaard et al. 2004).

Nicméně lactadherin má svou důležitou úlohu i v reprodukci, kde je mimo jiné jedním z kandidátů zapojených do vazby na *zona pellucida* (ZP) oocyty.

3.3.1 Lactadherin u myši (SED1)

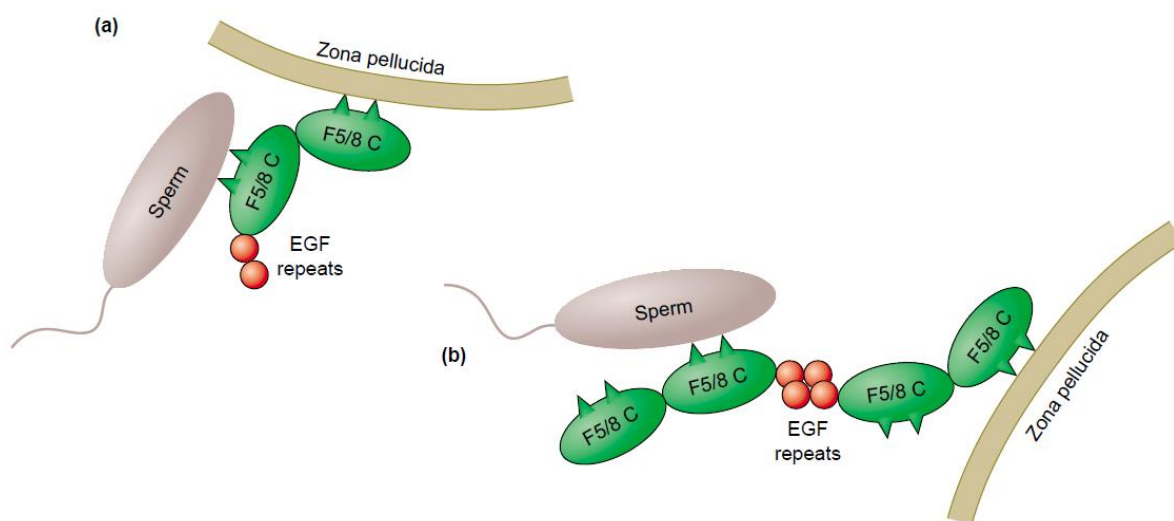
Myší SED1 je mozaikový protein o molekulové hmotnosti přibližně 53 kDa, který se skládá ze dvou discoidinových domén (F5/8 C domény) a ze dvou EGF domén (z angl. epidermal growth factor) (Raymond et al. 2009). SED1 je protein nalezen na spermiích, u kterého byla popsána vazebná aktivita na ZP oocyty. Kromě spermií je SED1 exprimován i v dalších tkáních, jako například v mozku, plicích, srdci, brzlíku, ledvinách, děloze, nadledvinách, mandlích, svalech, slezině, pankreasu, potních žlázách a žlučníku. Nicméně jeho přesná funkce v těchto tkáních zůstává neznámá (Ensslin et al. 1998; Ensslin & Shur 2003; Shur et al. 2004).

Spermatický SED1 se poprvé objevuje ve vyvíjejících se gonádách. Dále je lokalizován v Golgiho komplexu spermatogenních buněk. V průběhu epididymální maturace a při průchodu spermií nadvarlaty se SED1 dostává na povrch spermií (Shur et al. 2006). SED1 se nachází

na plazmatické membráně hlavičky spermie v oblasti překrývající akrozom v místě, kde dochází k vazbě spermie na ZP oocyty (Ensslin & Shur 2003; Petrunkina et al. 2003).

Myší SED1 se váže na sacharidové zbytky glykoproteinů ZP2 a ZP3. Domény discoidinu jsou zodpovědné za připojení SED1 na povrch spermie a za interakci se ZP (Reitherman et al. 1975; Wassarman et al. 2001; Fuentes-Prior et al. 2002). Discoidinová doména zprostředkovává vazbu široké škály proteinů jak na buněčné membrány, tak i na složky extracelulární matrix (Fuentes-Prior et al. 2002).

Byly navrženy dva modely, které vysvětlují funkci SED1 během vazby spermie na ZP. Podle prvního modelu SED1 funguje jako monomer a obsahuje dvě discoidinové domény, přičemž jedna je navázána na plazmatickou membránu spermie, zatímco druhá má vyšší afinitu k ZP (viz Obr. 2a) (Fuentes-Prior et al. 2002; Shur et al. 2004). Druhou možností je, že SED1 funguje jako dimer nebo oligomer, kdy je vazba v dimeru zprostředkována dvěma EGF doménami, které se vážou antiparalelně. Předpokládá se, že jedna discoidinová doména dimeru SED1 zodpovídá za vazbu SED1 na plazmatickou membránu spermie a na ZP oocyty, zatímco druhá discoidinová doména vytváří boční interakce, které vedou k tvorbě tetrameru. Tetramery představují první a nezbytný krok k vytvoření mezibuněčných kontaktů (viz Obr. 2b) (Balzar et al. 2001; Shur et al. 2004).



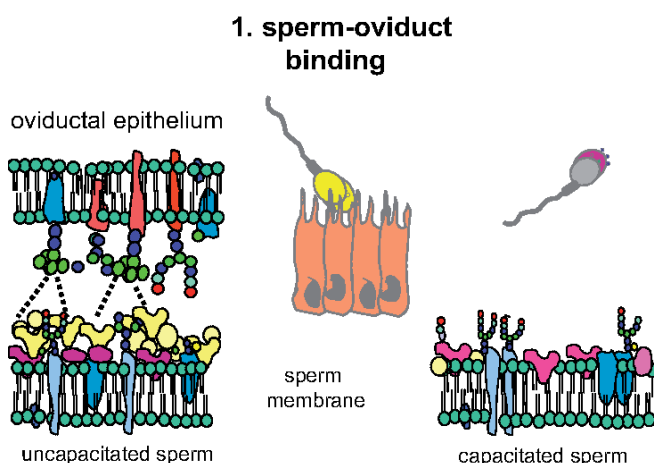
Obrázek 2: Možné způsoby vazby SED1 na plazmatickou membránu spermie a zona pellucida (ZP) oocyty. A) SED1 funguje jako monomer – jedna discoidinová doména se váže na plazmatickou membránu spermie, druhá discoidinová doména se váže na ZP oocyty. B) SED1 funguje jako dimer – jedna discoidinová doména se váže na plazmatickou membránu spermie a ZP oocyty, druhá discoidinová doména zprostředkovává tvorbu tetrameru z EGF domén, kterým vytváří mezibuněčnou interakci mezi spermii a oocytem. F5/8 C – discoidin domain, EGF – z angl. epidermal growth factor. Převzato a upraveno podle Shur et al. (2004).

3.3.2 Lactadherin u prasat (p47)

Na kančích spermích byl lactadherin (p47) detekován jako 47 kDa protein (Ensslin et al. 1998). p47 je periferní protein plazmatické membrány spermie lokalizován v apikální oblasti hlavičky. Spermie opouštějící varlata mají na svém povrchu p47, který je maskován dalšími testikulárními proteiny. Protein p47 se na spermie váže i během jejich průchodu nadvarlaty a může být odhalen v průběhu epididymální maturace díky remodelaci plazmatické membrány (Ensslin et al. 1998; Petrunkina et al. 2003).

Kančí p47 je schopen vázat se na sacharidové struktury epitelu vejcovodu (viz Obr. 3) (Töpfer-Petersen et al. 2008). Součástí epitelu vejcovodu jsou sacharidové Lewis X struktury (Kadirvel et al. 2012). Lewis X je trisacharidová struktura, která je tvořena z monosacharidů N-acetyl glukosaminu, galaktózy a fukózy (Pérez et al. 1996). Protein p47 se účastní rozpoznávání Lewis X struktur v epitelu vejcovodu a tím napomáhá spermím navázat se do ovidukálního rezervoáru (Kadirvel et al. 2012; Machado et al. 2014). Silva et al. (2017) potvrdili účast p47 při vazbě spermí na epitel vejcovodu. Inkubovali buňky vejcovodu s rekombinantním p47, který obsadil vazebná místa pro p47 na buňkách vejcovodu a spermie pak nebyly schopny se na epitel vejcovodu navázat (Silva et al. 2017).

Kromě vazby na sacharidové Lewis X struktury je p47 zapojen i do vazby s integriny v epitelu vejcovodu (Andersen et al. 2000; Chegini et al. 2001). Integriny jsou transmembránové glykoproteiny, které jsou složeny ze dvou podjednotek a vytvářejí heterodimery. Zprostředkovávají vazbu na extracelulární matrix nebo pomáhají buňkám vázat se na jiné buňky prostřednictvím integrinových receptorů (Alberts et al. 2002).



Obrázek 3: Úloha proteinu p47 ve vazbě spermí k epitelu vejcovodu. Ejakulované spermie se prostřednictvím proteinu p47, který je přítomen na jejich povrchu, vážou na sacharidové struktury epitelu vejcovodu, kde podstupují kapacitaci. Při kapacitaci dochází k reorganizaci plazmatické membrány a redistribuci proteinu p47. Převzato a upraveno podle Töpfer-Petersen et al. (2008).

Během kapacitace se mění distribuce kančího p47. Z apikální oblasti hlavičky se dostává do celé akrozomální oblasti spermie (Petrunkina et al. 2003). Předpokládá se, že redistribuce p47 napomáhá spermii odpoutat se od epitelu vejcovodu (Silva et al. 2014). Dále se předpokládá, že se redistribuce a degradace kančího p47 v průběhu kapacitace účastní ubiquitin-proteasomový systém (UPS). Během degradace proteinu pomocí UPS dochází k ubiquitinaci lactadherinu a k jeho následné degradaci 26S proteasomem na kančích spermích (Zigo et al. 2019).

Nicméně kančí protein p47 na spermích zůstává i po kapacitaci (Zigo et al. 2015), což napovídá, že by se mohl účastnit také procesů spojených s vazbou spermie na ZP oocytu, stejně jako to bylo popsáno u myšího SED1. U p47 sice byla popsána vazebná aktivita na sacharidové struktury ZP oocytu (Ensslin et al. 1998), ale zda je skutečně zapojen do primární vazby spermii na ZP, nebylo doposud pomocí vazebných studií potvrzeno.

4 Materiál a metodika

K experimentům byl použit kančí ejakulát z inseminační stanice (IS) Skršín (NATURAL, spol. s.r.o.) a z IS Kout na Šumavě (CHOVSERVIS a.s.), který byl v podobě inseminačních dávek převážen do laboratoře v termoboxu při teplotě 17 °C. Prasečí vaječníky byly získány z jatek v Příbrami a do laboratoře byly transportovány v termoboxu ve fyziologickém roztoku při teplotě 39 °C.

Pokud v práci není uvedeno jinak, pro všechny experimenty byly použity chemikálie značky Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA.

4.1 Příprava vzorků spermií pro Western blot detekci a nepřímou imunofluorescenci

Pro Western blot detekci a nepřímou imunofluorescenční mikroskopii byly spermie rozděleny do tří skupin – ejakulované, kapacitované a akrozomálně zreagované. Spermie byly nejprve stočeny (5 min, 250 x g, 17 °C) a následně 3x promyty v PBS (0,01 M Phosphate-buffered saline, 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,4). Poté byla část spermií kapacitována po dobu 1,5 hod při teplotě 38 °C a 5 % CO₂ v kapacitačním médiu (složení kapacitačního média viz Tab. 4). Po kapacitaci byla část zkapacitovaných spermií odebrána a 3x promyta v PBS (5 min, 250 x g). K druhé části kapacitovaných spermií byl přidán 10 μM kalcium ionofor pro navození akrozomální reakce. Spermie byly inkubovány s kalcium ionoforem při teplotě 38 °C a 5 % CO₂ po dobu 1 hod. Poté byly akrozomálně zreagované spermie 3x promyty v PBS. Takto připravené spermie (ejakulované, kapacitované a akrozomálně zreagované) byly použity pro přípravu vzorků pro SDS elektroforézu a pro nepřímou imunofluorescenční mikroskopii.

Pro extrakci proteinů pro SDS elektroforézu byl k peletě ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných spermií o přibližné koncentraci 5×10^7 spermií/ml přidán redukcující pufr (3,8 ml H₂O, 1,0 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (Bio-Rad, Hercules, California, USA), 0,8 ml glycerol, 1,6 ml 10% SDS, 0,4 ml 0,05% bromfenolová modř, 0,4 ml 2-merkaptoetanol) v poměru 1:2 (peleta:množství vzorkového pufru). Vzorky byly ponechány na ledu pro lepší lýzu buněk po dobu 30 min a každých 5 min byly řádně promíchány. Poté byly vzorky povařeny při 100 °C po dobu 5 min a následně byly stočeny (3 min, 10 000 x g). Takto připravené vzorky byly použity pro SDS elektroforézu.

Pro nepřímou imunofluorescenci bylo k peletě promytých ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných spermií přidáno PBS, aby finální koncentrace činila přibližně 1×10^5 spermií/ml.

Tabulka 4: Složení kapacitačního média

Chemikálie	Množství rozpuštěno v 1 l destilované vody
NaCl	6,663 g
KCl	0,238 g
Na ₂ HPO ₄	0,041 g
laktát sodný	1,4 ml
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,102 g
HEPES	2,383 g
pyruvát sodný	0,022 g
sorbitol	2,186 g
gentamicin	0,025 g
penicilin	0,065 g
PVA	0,100 g
glukóza	1,980 g
pyruvát sodný	0,550 g
BSA	20 g
NaHCO ₃	0,168 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,294 g

4.2 Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie

Pro nepřímou imunofluorescenci byla použita suspenze spermií ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných (viz 4.1 Příprava vzorků spermií). Před nanesením suspenze spermií byla na podložní skříčka pomocí PAN Pen (Liquid Blocker Super PAN Pen, Agar Scientific, Stansted, UK) nakreslena kolečka. Do koleček bylo naneseno 20 µl suspenze spermií a do suspenze spermií bylo přidáno 50 µl acetonu. Suspenze spermií byla fixována 10 min.

Po fixaci byla skříčka se spermiemi opláchnuta PBS a destilovanou vodou. Po zaschnutí byla na skříčka nanesena primární protilátka 1H9 proti lactadherinu (p47) (Zigo et al. 2015) v poměru 1:10 a inkubována přes noc při 4 °C ve tmě a vlhké komůrce. Vzorky spermií, které byly ponechány pro negativní kontrolu, byly inkubovány pouze s PBS přes noc při 4 °C ve tmě a vlhké komůrce. Po inkubaci byla skříčka opláchnuta PBS a destilovanou vodou. Po zaschnutí byla na vzorky nanesena sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům Alexa Flour™ 488 anti-mouse IgG (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) ředěná v poměru 1:300 v PBS a inkubována po dobu 1 hod při pokojové teplotě ve tmě a vlhké komůrce. Po inkubaci se sekundární protilátkou byla skříčka opláchnuta PBS a destilovanou vodou a byla ponechána k zaschnutí. Poté byl na skříčka nanesen PNA lektin konjugovaný s Rhodaminem (Rhodamine

Peanut Agglutinin; Vector laboratories, Burlingame, California, USA) ředěný 1:500 v PBS. Preparáty byly s PNA inkubovány při pokojové teplotě, ve vlhké komůrce a tmě po dobu 30 min. Po inkubaci a promytí sklíček PBS a destilovanou vodou bylo na preparáty aplikováno 10 µl montovacího média DAPI (Vecta-Shield DAPI, Antifade Mounting Medium, Vector laboratories, Burlingame, California, USA). Sklíčka s preparáty spermií byla překryta krycím sklem a zafixována pomocí laku na nehty. Takto připravené preparáty byly nasnímány pod fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E 600 a zdokumentovány pomocí kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

4.3 SDS elektroforéza a Western blot detekce

Pro SDS elektroforézu byla použita aparatura pro vertikální elektroforézu – systém Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Do skel s připraveným 15% akrylamidovým separačním gelem: 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (Bio-Rad, Hercules, California, USA), 5,0 ml 30% akrylamid/bis-akrylamid (Bio-Rad, Hercules, California, USA), 2,5 ml destilovaná voda, 100 µl 10% SDS, 4,5 µl TEMED, 70 µl 10% persíran amonný a 4% zaostrůvacím gelem: 1,52 ml destilovaná voda, 0,625 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (Bio-Rad, Hercules, California, USA), 0,325 ml 30% akrylamid/bis-akrylamid (Bio-Rad, Hercules, California, USA), 0,025 ml 10% SDS, 3,8 µl TEMED, 50 µl 10% APS byl vložen hřebínek pro tvorbu jamek. Skla byla po ztuhnutí gelů přenesena do aparatury a zalita 5x koncentrovaným elektrodovým pufrům (15 g TRIS, 72 g glycin, 5 g SDS, rozpuštěno v 1 l destilované vody, ředěno 1:4). Poté byly vytaženy hřebínky a následně byly do jamek naneseny proteinové extrakty jednotlivých skupin spermií o objemu 15 µl a 3 µl proteinového standardu Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad, Hercules, California, USA) pro odhad molekulové hmotnosti separovaného proteinu. Elektroforéza probíhala 20 min při konstantním napětí 80 V a poté 1,5 hod při 140 V.

Pro elektropřenos proteinů na PVDF (Millipore, Burlington, Massachusetts, USA) byl použit systém od firmy Bio-Rad (Hercules, California, USA). Nejprve byl připraven transferový pufr (3,03 g TRIS, 14,4 g glycin, 200 ml metanol, rozpuštěno v 800 ml destilované vody), do kterého byl namáčen materiál pro elektropřenos. Kazeta pro Western blot byla sestavena následovně: houbička, filtrační papír membránu (Whatman chromatography paper, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA), gel se separovanými proteiny, PVDF membrána, která byla před použitím aktivována v metanolu po dobu cca 1 minuty, filtrační papír a houbička. Takto zkompletována kazeta byla vložena do aparatury pro elektropřenos. Přenos proteinů byl prováděn při konstantním proudu 500 mA po dobu 45 min.

Membrána s přenesenými proteiny byla po vyjmutí z kazety po dobu 30 vteřin barvena Ponceau (Ponceau S Solution) pro vizualizaci proteinů. Poté bylo pozadí membrány odmyto destilovanou vodou a promyto v PBS s 0,5% Tweenem (PBS-T). Volná místa na membráně byla deaktivována 5% sušeným mlékem (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk; Bio-Rad, Hercules, California, USA) rozpuštěným v PBS po dobu 1 hodiny. Následovala inkubace s myší monoklonální protilátkou 1H9 proti p47 (Zigo et al. 2015) ředěnou 1:100 v 1% mléce při 4 °C přes noc. Pro negativní kontrolu byla membrána inkubována pouze v 1% mléce při 4 °C přes noc. Pro normalizaci množství proteinů ve vzorku byla membrána inkubována

s myší monoklonální protilátkou proti α -tubulinu DM1A ředěnou v poměru 1:5000 v PBS při 4 °C přes noc. Po inkubaci s primární protilátkou 1H9 proti p47, s protilátkou proti α - tubulinu DM1A nebo pouze v 1% mléku byla membrána promývána 3x po dobu 10 min PBS-T a poté inkubována se sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům (Goat anti-mouse IgG (L+H), Horseradish Peroxidase-Linked; Bio-Rad, California, USA) ředěnou v poměru 1: 3 000 v 1% mléce po dobu 1 hod při pokojové teplotě. Po inkubaci byla membrána 6x promyta po dobu 10 min v PBS-T.

Pomocí chemiluminiscenčního substrátu (Super Signal West Pico Plus, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) byla v přístroji Azure c300 (Azure Biosystems, Dublin, California, USA) provedena vizualizace specifické detekce proteinu.

4.4 Vazebné studie

4.4.1 Příprava oocytů

Oocyty byly získávány aspirací z folikulů o velikosti 2-5 mm injekční stříkačkou s jehlou 18 G. Bylo připraveno modifikované kultivační médium M199 obohacené o laktát vápenatý (0,6 mg/ml), pyruvát sodný (0,25 mg/ml), HEPES (1,5 mg/ml), gentamicin (0,025 mg/ml), sérový albumin (0,005 g/ml) a fetální bovinní sérum (50 μ l/ml). Pro experiment byly pod stereomikroskopem vybrány pouze oocyty s kompaktním obalem kumulárních buněk a nepoškozenou cytoplazmou. Oocyty byly přeneseny do čtyřjamkových Petriho misek a do kultivačního média byly přidány tři kapky P. G. 600 (15,5 IU eCG : 6,6 IU hCG/ml) (Intervet, Boxmeer, Holland). Oocyty byly kultivovány při 39 °C v 5 % CO₂ po dobu 48 hodin. Po 48 hodinách byly z oocytů odstraněny kumulární buňky a poté byly oocyty 3x promyty v mTBM médiu (složení média viz Tab. 5).

Tabulka 5: Složení mTBM média

Chemikálie	Množství rozpuštěné v 100 ml destilované vody
NaCl	0,6611 g
KCl	0,0224 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1102 g
TRIS	0,2423 g
glukóza	0,1982 g
pyruvát sodný	0,0550 g
kofein	0,0667 g
BSA	0,2000 g

4.4.2 Příprava spermií

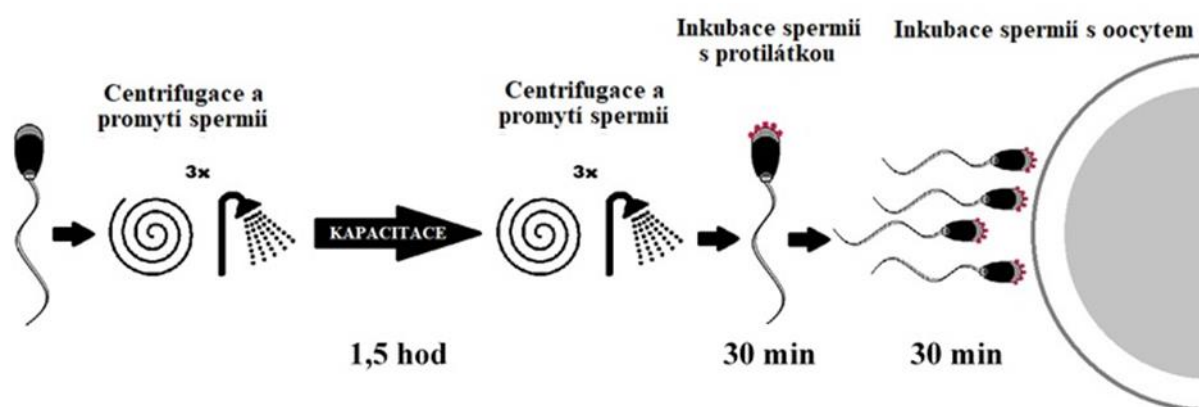
Kančí spermie byly nejprve spočítány v Bürkerově komůrce. Poté byly spermie stočeny (5 min, 250 x g, 17 °C). Následně byl odebrán supernatant a k peletě spermií byl přidán 1 ml PBS-PVA (4 g NaCl, 0,1 g KCl, 0,13 g KH₂PO₄, 0,55 g Na₂HPO₄, 0,50 g PVA, 500 ml destilované vody). Spermie byly lehce resuspendovány a promyty (5 min, 250 x g, 17 °C). Spermie byly promyty celkem 3x. Po promytí byla koncentrace spermií upravena na 10⁵ spermií/ml a poté byly spermie použity pro vazebné studie.

Pro vazebné studie byly použity tři odlišné metodiky. V rámci jedné metodiky byly spermie rozděleny do tří experimentálních skupin pro sledování vazebné aktivity lactadherinu:

1. skupina – monoklonální protilátka 1H9 proti lactadherinu v poměru 1:1
2. skupina – pozitivní kontrola s použitím myšního IgG v poměru 1:500
3. skupina – negativní kontrola bez použití protilátky

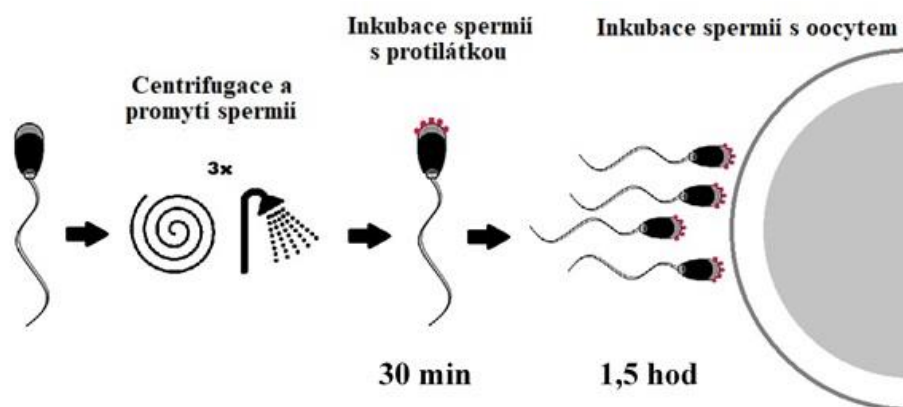
4.4.3 Vazebná studie – metodika č. 1

Po promytí spermií bylo k peletě přidáno 5 ml kapacitačního média (složení média viz Tab. 4) a suspenze byla resuspendována. Spermie byly kapacitovány po dobu 1,5 hod při teplotě 38 °C a 5 % CO₂. Po kapacitaci byly spermie opět 3x promyty v PBS-PVA (5 min, 250 x g, 17 °C). Promyté spermie byly resuspendovány v 1 ml mTBM média (složení média viz Tab. 5). Poté byly spermie rozděleny do tří skupin (viz 4.4.2 Příprava spermií) a spermie byly ponechány na 30 min při teplotě 38 °C a 5 % CO₂. Po inkubaci bylo 10 µl spermií přidáno k promytým oocytům v 50 µl mTBM média. Suspenze spermií s oocyty byla převrstvena minerálním olejem a poté byly společně inkubovány ve vazebném mTBM médiu 30 min při teplotě 39 °C a 5 % CO₂.



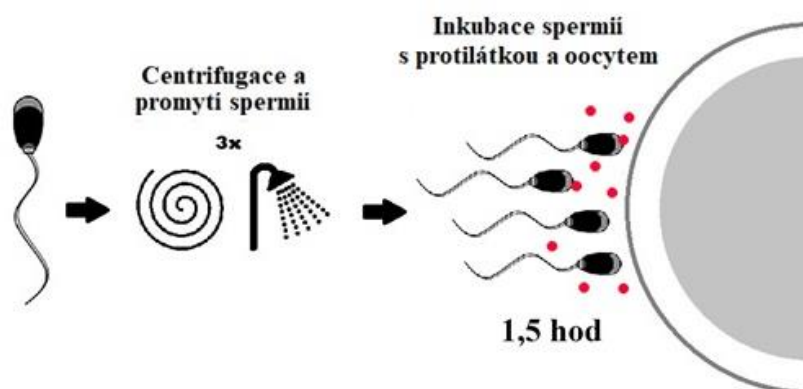
4.4.4 Vazebná studie – metodika č. 2

Promyté spermie byly rozděleny do tří skupin (viz 4.4.2 Příprava spermií) a inkubovány s protilátkou 30 min při teplotě 38 °C a 5 % CO₂. Po inkubaci bylo 10 μl spermií přidáno k promytým oocytům v 50 μl mTBM média, kde byly spermie zároveň kapacitovány. Suspenze spermií s oocyty byla převrstvena minerálním olejem a poté byly společně inkubovány ve vazebném mTBM médiu 1,5 hodiny při teplotě 39 °C a 5 % CO₂.



4.4.5 Vazebná studie – metodika č. 3

Promyté spermie byly rozděleny do tří skupin (viz 4.4.2 Příprava spermií). Ze suspenze spermií bylo odebráno 10 μl spermií a přidáno k promytým oocytům v 50 μl mTBM média, kde byly spermie zároveň kapacitovány. Suspenze spermií s oocyty byla převrstvena minerálním olejem a poté byly společně inkubovány ve vazebném mTBM médiu 1,5 hodiny při teplotě 39 °C a 5 % CO₂.



4.4.6 Hodnocení vazby spermií na *zona pellucida*

Po inkubaci byly oocyty s navázanými spermii přeneseny na teflonová sklíčka. Do kapky s oocyty s navázanými spermii bylo přidáno 5 μ l montovacího média VectaShield DAPI (Anifade Mounting Medium; Vector Laboratories, Burlingame, California, USA). Teflonové sklíčko byly překryto krycím sklíčkem a zafixováno pomocí laku na nehty. Zhotovené preparáty byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E 600, zdokumentovány pomocí kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

4.5 Statistické vyhodnocení

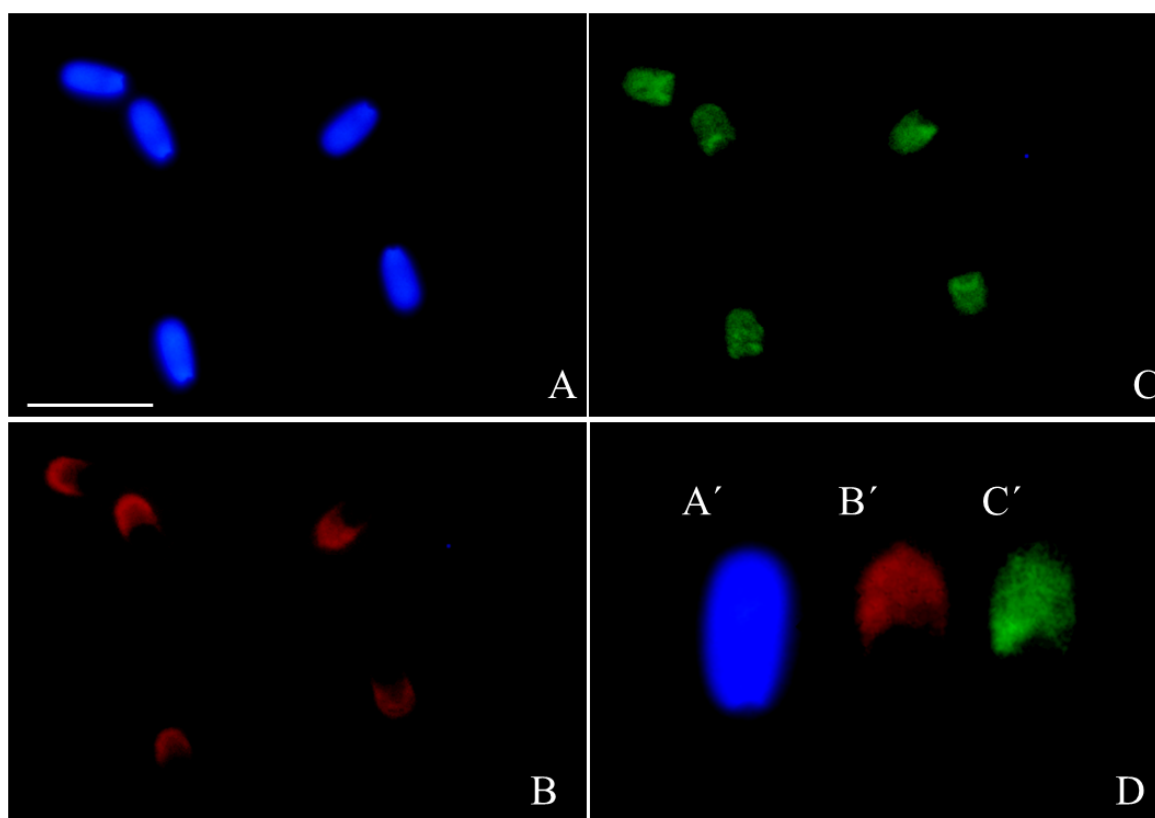
Výsledky detekce lactadherinu ze čtyř opakování byly denzitometricky zpracovány pomocí programu C-Digit Image Studio (verze 4.0). Data získaná z denzitometrické analýzy jsou prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD) a byla statisticky vyhodnocena použitím jednovýběrového testu – analýzy rozptylu (ANOVA) pomocí programu Excel (Microsoft Office Professional Plus 2016).

5 Výsledky

5.1 Lokalizace kančího lactadherinu ve spermích

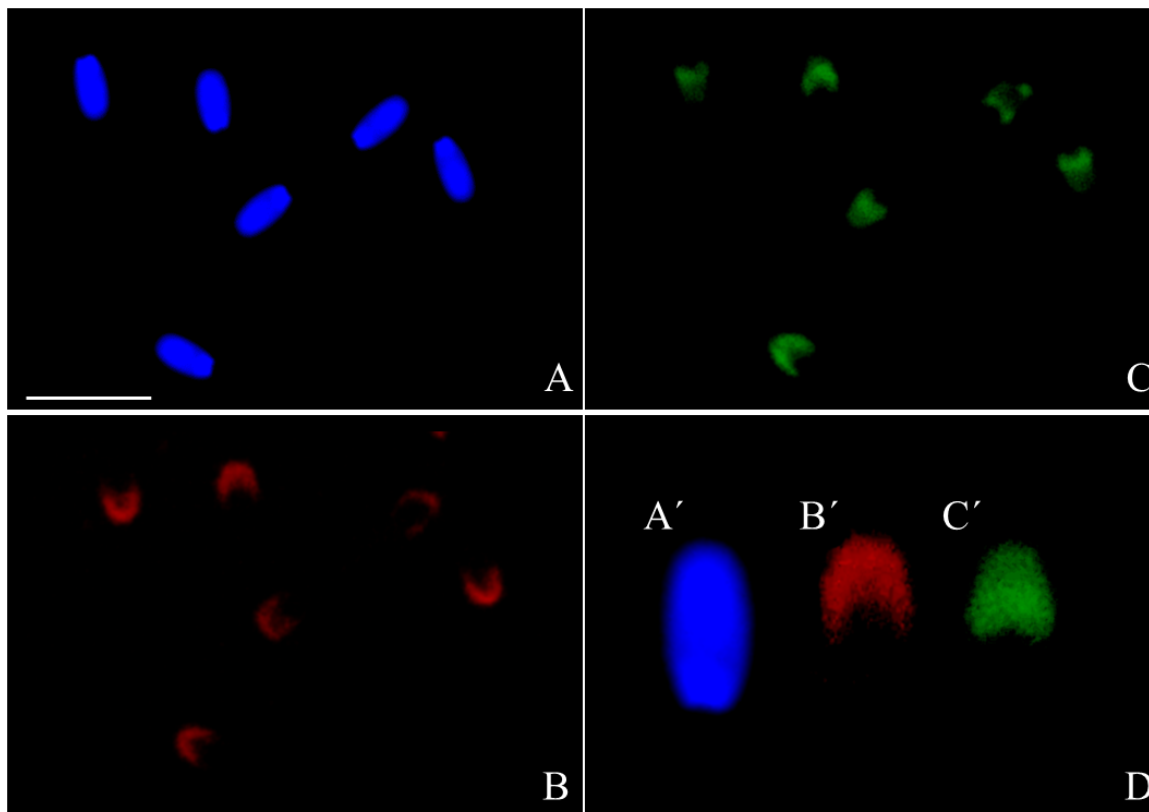
Nepřímou imunofluorescenční mikroskopií byla sledována lokalizace kančího lactadherinu (p47) v ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných spermích fixovaných a permeabilizovaných acetonem. K detekci byla použita myší monoklonální protilátka 1H9 proti p47 a k vizualizaci sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům Alexa Flour™ 488 anti-mouse IgG (zelená fluorescence). Akrozom byl označen PNA lektinem konjugovaným s Rhodaminem (červená fluorescence) a jádro bylo značeno DAPI (modrá fluorescence). U negativní kontroly byly vzorky inkubovány pouze se sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům Alexa Flour™ 488 anti-mouse IgG.

Na obrázku 4 jsou zobrazeny kančí ejakulované spermie, které byly fixovány a permeabilizovány acetonem. Protein p47 byl lokalizován pomocí protilátky v akrozomální oblasti hlavičky spermie. Na obrázku 4D je zobrazen detail ejakulované spermie fixované a permeabilizované acetonem.



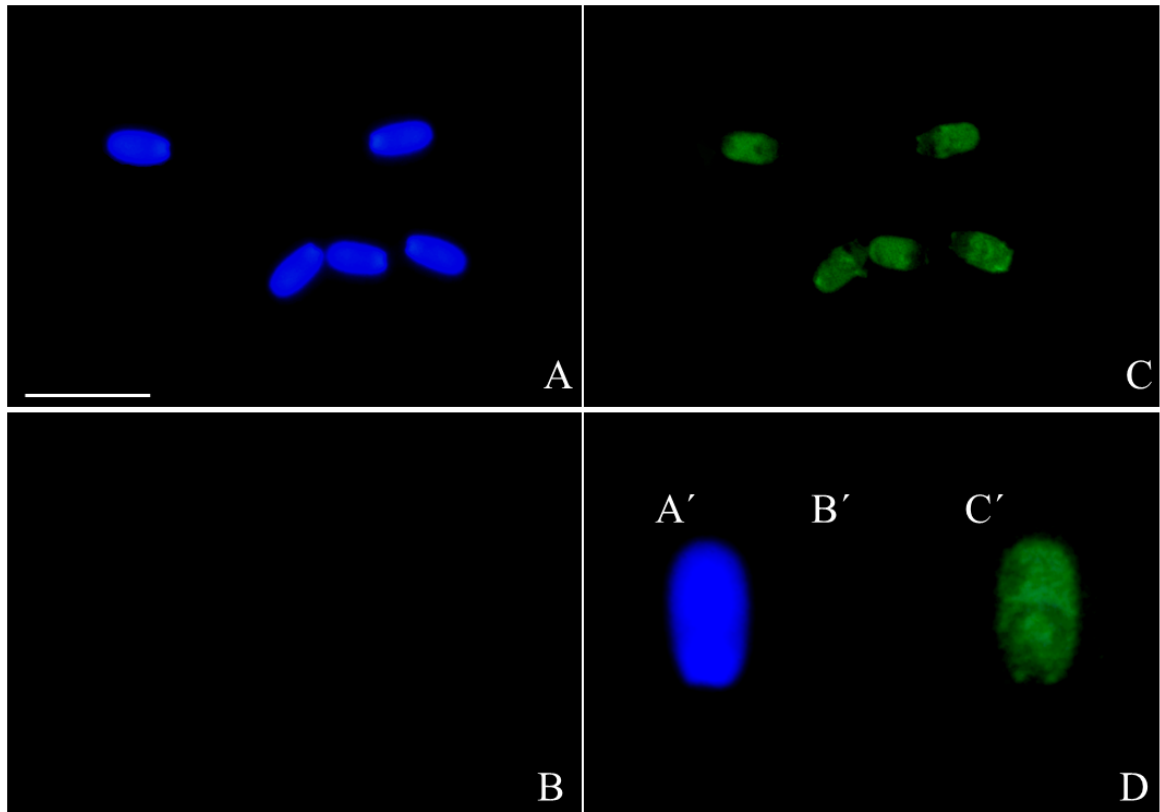
Obrázek 4: Ejakulované kančí spermie fixované a permeabilizované acetonem. Detail ejakulované spermie (D). Jádro označené DAPI (A, A'), akrozom označený PNA lektinem konjugovaným s Rhodaminem (B, B'), reakce s protilátkou 1H9 proti p47 (C, C'). Měřítko 10 μm , zvětšení 400x.

Na obrázku 5 jsou zobrazeny kančí kapacitované spermie, které byly fixovány a permeabilizovány acetonem. Protein p47 byl lokalizován pomocí protilátky v akrozomální oblasti hlavičky spermie. Na obrázku 5D je zobrazen detail kapacitované spermie fixované a permeabilizované acetonem.



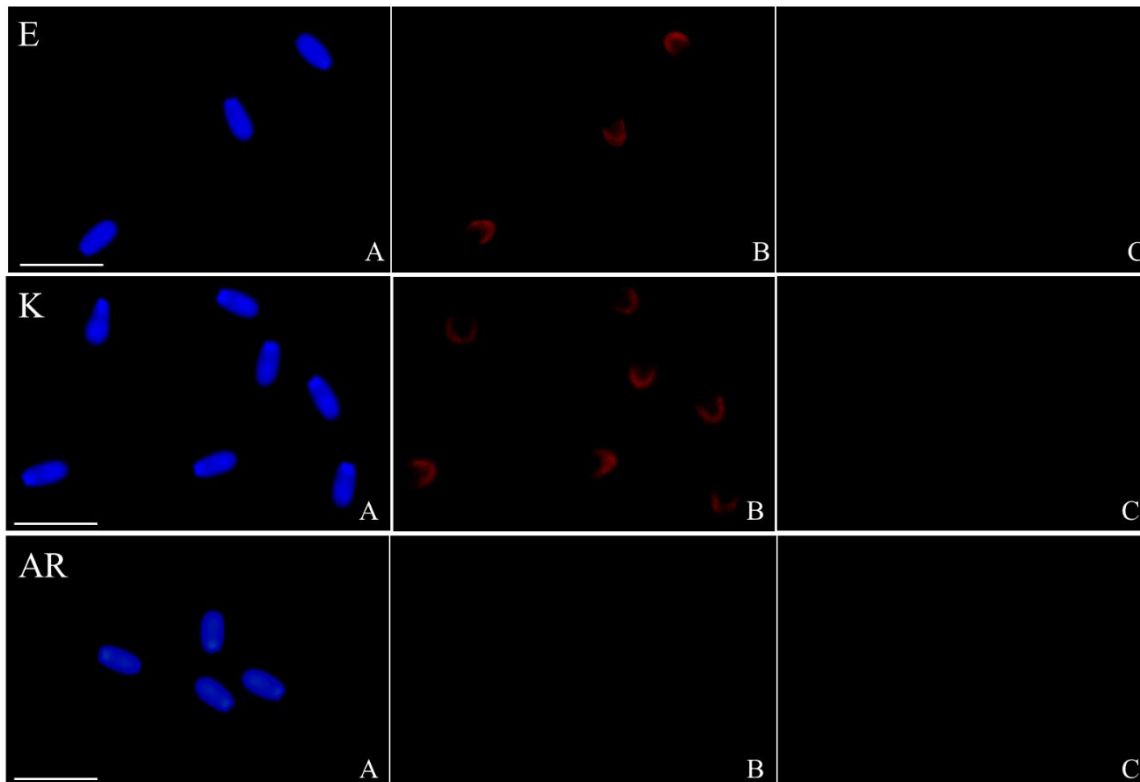
Obrázek 5: Kapacitované kančí spermie fixované a permeabilizované acetonem. Detail kapacitované spermie (D). Jádro označené DAPI (A, A'), akrozom označený PNA lektinem konjugovaným s Rhodaminem (B, B'), reakce s protilátkou 1H9 proti p47 (C, C'). Měřítka 10 μm , zvětšení 400x.

Na obrázku 6 jsou zobrazeny kančí akrozomálně zreagované spermie, které byly fixovány a permeabilizovány acetonem. Protein p47 byl lokalizován v celé oblasti hlavičky spermie. Na obrázku 6D je zobrazen detail akrozomálně zreagované spermie fixované a permeabilizované acetonem.



Obrázek 6: Akrozomálně zreagované kančí spermie fixované a permeabilizované acetonem. Detail akrozomálně zreagované spermie (D). Jádro označené DAPI (A, A'), akrozom označený PNA lektinem konjugovaným s Rhodaminem (B, B'), reakce s protilátkou 1H9 proti p47 (C, C'). Měřítko 10 μ m, zvětšení 400x.

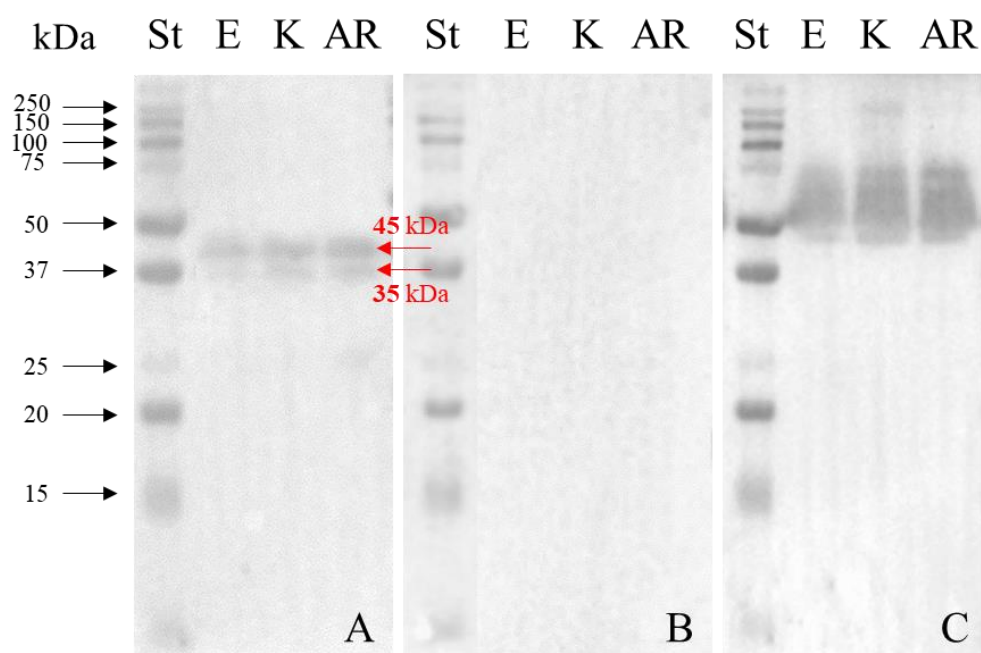
Na obrázku 7 jsou zobrazeny negativní kontroly pro kančí spermie, které byly fixovány a permeabilizovány acetonem a inkubovány pouze se sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům Alexa Flour™ 488 anti-mouse IgG. Negativní kontrola potvrdila, že nedošlo k nespecifické reakci.



Obrázek 7: Kančí ejakulované (E), kapacitované (K) a akrozomálně zreagované (AR) spermie fixované a permeabilizované acetonem. Jádro označené DAPI (A), akrozom označený PNA lektinem konjugovaným s Rhodaminem (B), reakce s protilátkou proti myším IgG (C). Měřítko 10 μm , zvětšení 400x.

5.2 Detekce kančího lactadherinu v extraktech spermií

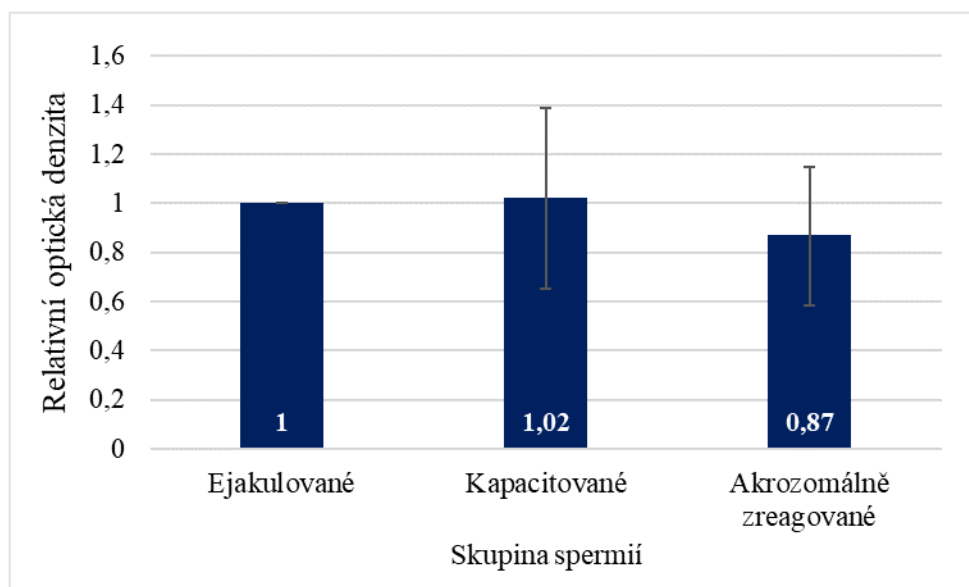
Kančí lactadherin (p47) byl detekován za redukujících podmínek v extraktech ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných spermií. Membrána se separovanými proteiny z extraktů kančích spermií je zobrazena na obrázku 8A. Byly patrné dva proteinové proužky o molekulových hmotnostech přibližně 35 a 45 kDa. Membrána na obrázku 8B sloužila jako negativní kontrola inkubovaná pouze se sekundární protilátkou. Na obrázku 8C je zobrazena membrána s detekcí α -tubulinu pro normalizaci optické denzity detekovaného proteinu p47.



Obrázek 8: Imunodetekce proteinu p47 v extraktech kančích spermií pomocí protilátky 1H9. Detekce p47 protilátkou 1H9 (A), negativní kontrola (B), detekce tubulinu pro normalizaci optické denzity (C). St – standardy molekulových hmotností, E – ejakulované spermie, K – kapacitované spermie, AR – akrozomálně zreagované spermie.

Extrakty proteinů z membrány vizualizované chemiluminiscenčním substrátem a z membrány, kde byl detekován α -tubulin, byly denzitometricky vyhodnoceny a získaná data byla analyzována. Byl zjištěn podíl denzitometrických hodnot detekce proteinu p47 a α -tubulinu jako referenčního proteinu v každém extraktu.

Hodnoty relativní optické denzity ze čtyř opakování byly vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD) a množství p47 ve vzorcích bylo vztahováno k hodnotě relativní optické denzity ejakulovaných spermií. Průměrná hodnota intenzity signálu ve vzorku kapacitovaných spermií činila $1,02 \pm 0,36$ a akrozomálně zreagovaných spermií $0,87 \pm 0,28$ (viz Graf 1).



Graf 1: Průměrná hodnota signálu reakce protilátky 1H9 s proteinem p47 u ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných spermií vztažena k optické denzitě detekce p47 v ejakulovaných spermiích.

Hodnoty relativní optické denzity byly podrobeny jednofaktorovému testu ANOVA. V množství proteinu p47 nebyl nalezen mezi ejakulovanými, kapacitovanými a akrozomálně zreagovanými spermiemi statisticky významný rozdíl ($P > 0,05$).

5.3 Blokace vazby spermií na *zona pellucida* oocyty s využitím monoklonální protilátky 1H9 proti lactadherinu

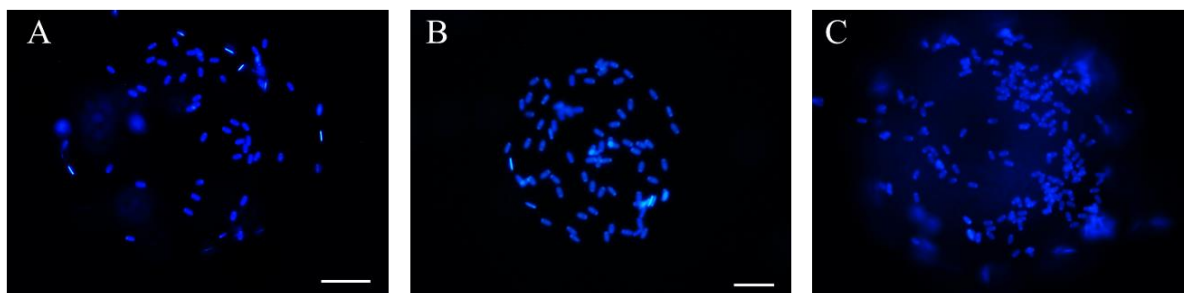
Pro sledování vazebné aktivity kančího lactadherinu (p47) se *zona pellucida* (ZP) oocyty byly spermie rozděleny do tří skupin – spermie inkubované s monoklonální protilátkou 1H9 proti p47, spermie inkubované s myším IgG (negativní kontrola) a spermie bez inkubace s protilátkou (pozitivní kontrola). Jádra spermií byla označena DAPI (modrá fluorescence).

5.3.1 Studium vazby podle metodiky č. 1

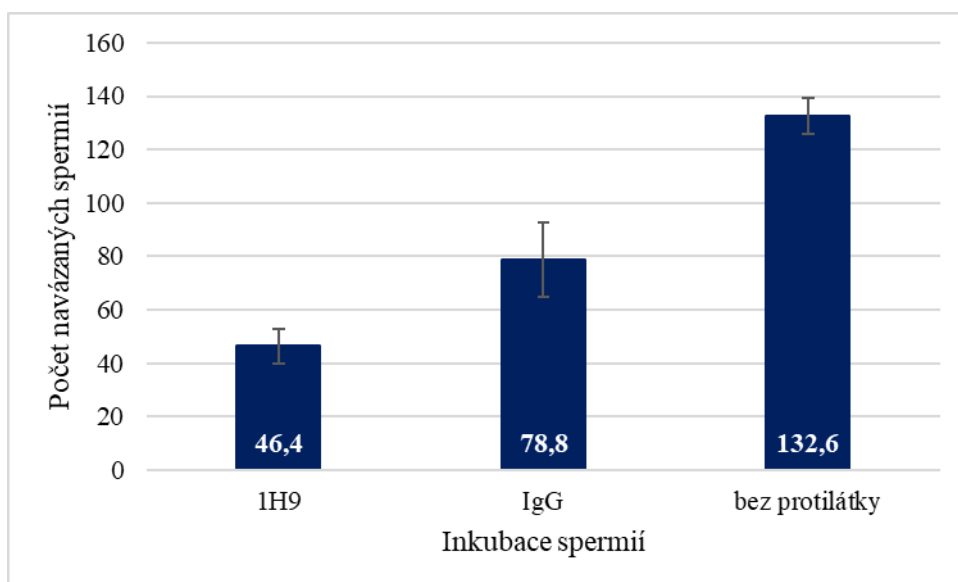
V metodice č. 1 (viz kap. 4.4.3 Vazebná studie – metodika č. 1) byly pro vazbu spermií na oocyty použity kapacitované spermie. Spermie byly rozděleny do tří skupin (viz výše) a po dobu 30 min inkubovány v příslušných skupinách s protilátkou 1H9 proti p47, s myším IgG a bez protilátky. Poté byly spermie ve skupinách přidány k 5 oocytům a společně inkubovány ve vazebném médiu mTBM po dobu 30 min.

Na obrázku 9 jsou zobrazeny oocyty s navázanými spermiemi. Nejvíce spermií se na oocyt navázalo v kontrolní skupině bez předešlé inkubace spermií s protilátkou (viz obrázek 9C). V porovnání s pozitivní kontrolou bylo na oocyttech ve skupině po inkubaci

spermií s myším IgG méně navázaných spermií (viz obrázek 9B). Nejméně spermií bylo na oocytech navázáno ve skupině po inkubaci spermií s monoklonální protilátkou 1H9 proti p47 (viz obrázek 9A). Průměrný počet spermií navázaných na 5 oocytů je zobrazen v grafu 2.



Obrázek 9: Kapacitované spermie navázané na oocyty po inkubaci ve vazebném médiu mTBM s protilátkou 1H9 proti p47 (A), s protilátkou proti myším IgG – negativní kontrola (B), bez přidané protilátky – pozitivní kontrola (C). Měřítko 20 μm , zvětšení 400x.

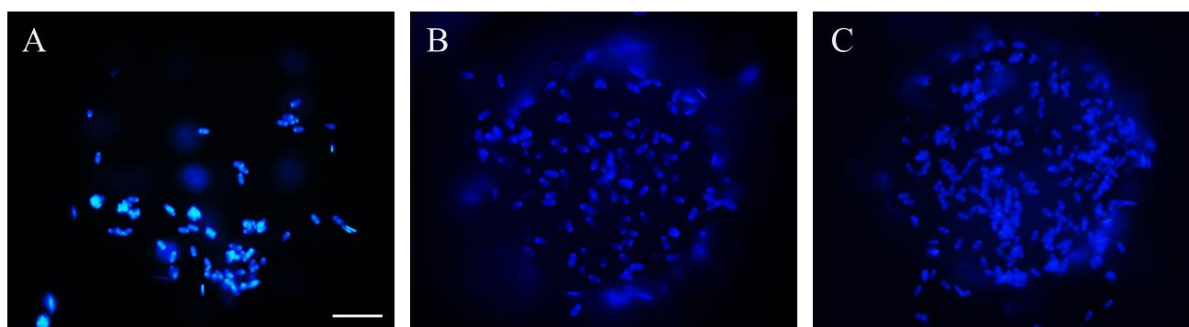


Graf 2: Průměrný počet spermií navázaných na 5 oocytů podle metodiky č. 1. Spermie inkubované s protilátkou 1H9 proti p47, s myším IgG a spermie inkubované bez protilátky.

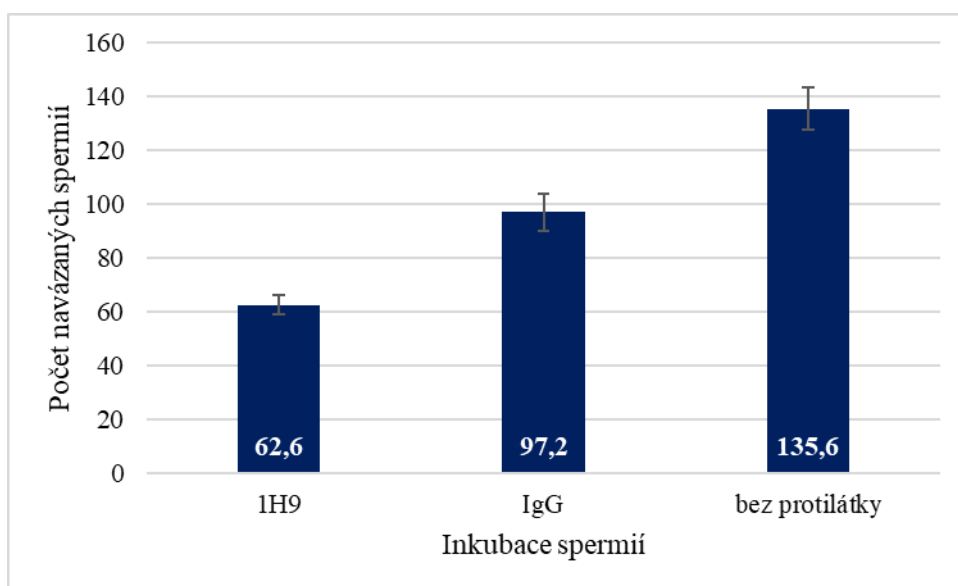
5.3.2 Studium vazby podle metodiky č. 2

V metodice č. 2 (viz kap. 4.4.4 Vazebná studie – metodika č. 2) byly pro vazbu spermií na oocyty použity ejakulované spermie. Spermie byly rozděleny do tří skupiny (viz výše) a po dobu 30 min inkubovány v příslušných skupinách s protilátkou 1H9 proti p47, s myším IgG a bez protilátky. Poté byly spermie ve skupinách přidány k 5 oocytům a společně inkubovány ve vazebném médiu mTBM po dobu 30 min, kde byly spermie zároveň i kapacitovány.

Na obrázku 10 jsou zobrazeny oocyty s navázanými spermii. Nejvíce spermii se na oocyt navázalo v kontrolní skupině bez předešlé inkubace spermii s protilátkou (viz obrázek 10C). V porovnání s pozitivní kontrolou bylo na oocytech ve skupině po inkubaci spermii s myším IgG méně navázaných spermii (viz obrázek 10B). Nejméně spermii bylo na oocytech navázáno ve skupině po inkubaci spermii s monoklonální protilátkou 1H9 proti p47 (viz obrázek 10A). Průměrný počet spermii navázaných na oocyty je zobrazen v grafu 3.



Obrázek 10: Kančí spermie navázané na oocyty po inkubaci ve vazebném médiu mTBM s protilátkou 1H9 proti p47 (A), s myším IgG – negativní kontrola (B), bez přidané protilátky – pozitivní kontrola (C). Měřítko 20 μm , zvětšení 400x.



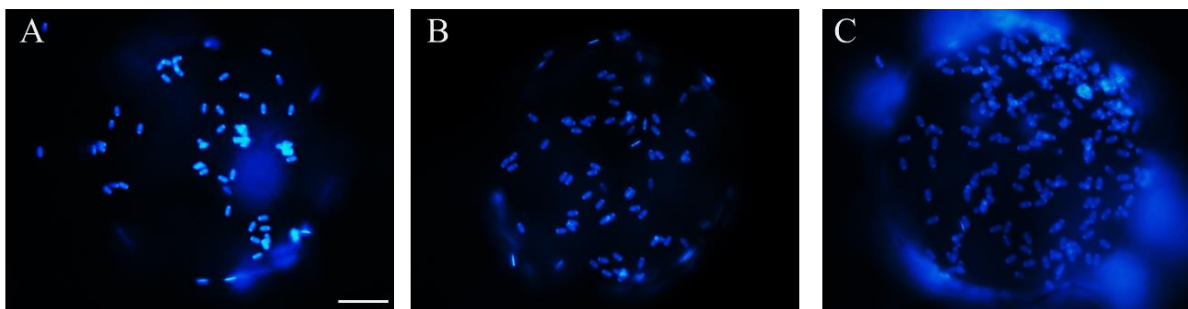
Graf 3: Průměrný počet spermii navázaných na 5 oocytů podle metodiky č. 2. Spermie inkubované s protilátkou 1H9 proti p47, s myším IgG a spermie inkubované bez protilátky.

5.3.3 Studium vazby podle metodiky č. 3

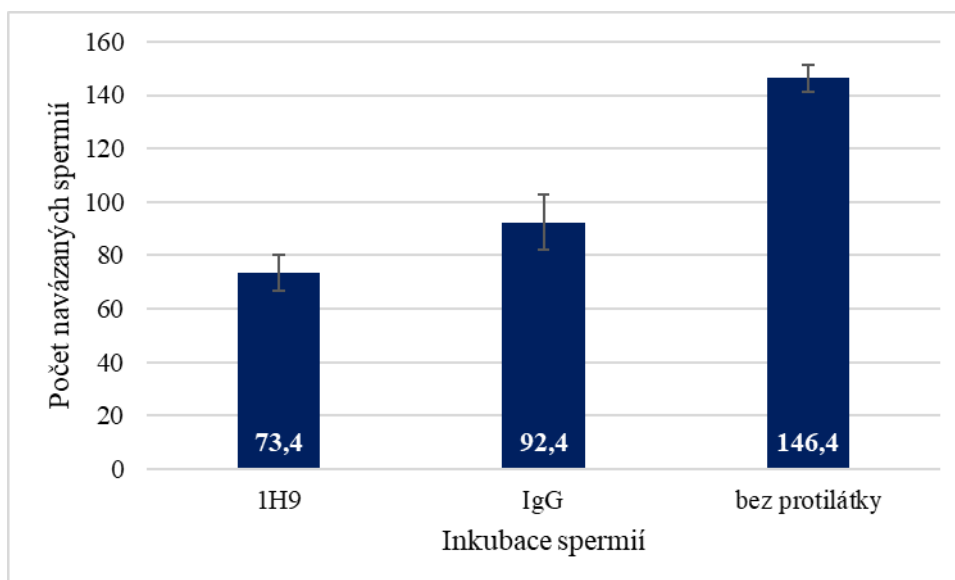
V metodice č. 3 (viz kap. 4.4.5 Vazebná studie – metodika č. 3) byly pro vazbu spermii na oocyty použity ejakulované spermie, které byly rozděleny do tří skupin a přidány k pěti oocytům. Ke skupinám byly přidány protilátky proti p47, proti myším IgG a jedna skupina byla

inkubována bez protilátek. Poté byly společně inkubovány ve vazebném médiu mTBM po dobu 1,5 hod, kdy spermie zároveň podstoupily kapacitaci.

Na obrázku 11 jsou zobrazeny oocyty s navázanými spermii. Nejvíce navázaných spermií bylo v kontrolní skupině, kde spermie nebyly inkubovány s protilátkou ani myším IgG (viz obrázek 11C). Méně navázaných spermií na oocytech bylo ve skupině, kde spermie byly inkubovány s myším IgG (viz obrázek 11B). Nejméně navázaných spermií na oocytech bylo ve skupině, kde spermie byly inkubovány s protilátkou proti p47 (viz obrázek 11A). Průměrný počet spermií navázaných na oocyty je zobrazen v grafu 4.



Obrázek 11: Kančí spermie navázané na oocyty po inkubaci ve vazebném médiu mTBM s protilátkou 1H9 proti p47 (A), s myším IgG – negativní kontrola (B), bez přidané protilátky – pozitivní kontrola (C). Měřítko 20 μm , zvětšení 400x.



Graf 4: Průměrný počet spermií navázaných na 5 oocytů podle metodiky č. 3. Spermie inkubované s protilátkou 1H9 proti p47, s myším IgG a spermie inkubované bez protilátky.

Vzhledem k nízkému počtu oocytů použitých v jednotlivých metodikách nebylo možné statistické vyhodnocení výsledků průměrného počtu spermií navázaných na oocyty v rámci skupin.

6 Diskuze

Spermie musí podstoupit několik procesů, aby byly schopny navázat se na oocyt a následně jej oplodnit. Mezi tyto procesy patří epididymální maturace, která probíhá v nadvarlatech a kapacitace v samičím pohlavním traktu, během nichž dochází k reorganizaci plazmatické membrány a přeskupení povrchových proteinů (Toshimori 2003). Během kapacitace dochází k odhalení povrchových proteinů, které mohou být zapojeny do primární vazby spermií k *zona pellucida* (ZP) oocytu (Florman & Fissore 2015). Primární vazba spermií k ZP oocytu iniciuje signální kaskádu, která spouští akrozomální reakci (AR), během které dochází k odkrytí sekundárních vazebných receptorů (Yanagimachi 1994).

Vazebných receptorů s afinitou k ZP byla na povrchu spermií různých druhů popsána celá řada (viz kapitola 3.2 Vazebné receptory pro ZP na spermií). Na kančích spermiích byly charakterizovány spermadhesiny nebo například protein DQH a jako kandidát pro vazbu k ZP oocytu byl navržen i kančí lactadherin (p47).

V naší práci jsme se zaměřili na lokalizaci proteinu p47 v kančích spermiích v různých stádiích jejich post-testikulárního vývoje, kdy jsme protein p47 detekovali v akrozomální oblasti hlavičky ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií. Naše výsledky jsou částečně v souladu s již dříve publikovanými daty. Ensslin et al. (1998) a Petrunkina et al. (2003) se zabývali lokalizací p47 ve spermiích pocházejících z varlat a nadvarlat a také spermiích po *in vitro* kapacitaci. Autoři ve svých studiích lokalizovali protein p47 v apikální oblasti akrozomální čepičky ejakulovaných spermiích a po celé akrozomální oblasti u kapacitovaných spermií. Ensslin et al. (1998) ve své práci využili fixaci spermií v metanolu, na rozdíl od Petrunkina et al. (2003), kteří fixovali spermie paraformaldehydem. V naší studii jsme protein p47 lokalizovali po fixaci spermií acetonem. Naše výsledky jsou navíc doplněny o lokalizaci proteinu p47 v akrozomálně zreagovaných spermiích, kde byl p47 nalezen v celé oblasti hlavičky spermie, což znamená jeho pravděpodobnou lokalizaci ve vnitřní akrozomální membráně.

Pomocí protilátky 1H9 jsme detekovali protein p47 v extraktech kančích spermií. Vycházeli jsme ze studie Zigo et al. (2015), který použil protilátku 1H9 k detekci proteinu p47 v ejakulovaných a kapacitovaných spermiích a pozoroval dva proteinové proužky o přibližné molekulové hmotnosti 35 a 45 kDa. Naše studie je v souladu s publikovaným výsledkem, a navíc je doplněna o detekci proteinu p47 v extraktech akrozomálně zreagovaných spermiích, kde byly detekovány dva proteinové proužky o stejné molekulové hmotnosti (35 a 45 kDa) jako v ejakulovaných a kapacitovaných spermiích. Proteinový proužek s nižší molekulovou hmotností je pravděpodobně zkrácenou formou proteinu p47. Domníváme se tak z toho důvodu, protože výskyt dlouhé a krátké formy lactadherinu byl zaznamenán v tkáních nadvarlat u myši (Raymond & Shur 2009). Naše výsledky částečně korespondují i s výsledky, které uvádí ve svých studiích Ensslin et al. (1998) i Petrunkina et al. (2003). Zmínění autoři detekovali protein p47 jako protein s molekulární hmotností 47 kDa. Absence kratší formy p47 v jejich studii může být způsobena rozdílnou reaktivitou zvolené protilátky, která nemusí tuto izoformu rozpoznávat oproti naší protilátce 1H9 vyrobené imunizací myši proteiny izolovanými z povrchu kančí spermie (Zigo et al. 2015).

Zároveň jsme v naší studii zjistili, že množství detekovaného proteinu v ejakulovaných a kapacitovaných spermiích se neměnilo a po akrozomální reakci množství proteinu

ve spermiích zdánlivě ubývalo, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný. Nicméně je potřeba udělat více opakování detekce proteinu p47 ve spermiích, abychom mohli potvrdit úbytek detekovaného proteinu v akrozomálně zreagovaných spermiích. Nižší úbytek detekovaného proteinu by mohl být způsoben i tím, že ne všechny spermie mohly prodělat AR. Pro specifitější detekci p47 ve spermiích po AR bychom mohli využít třídění spermií s neporušeným akrozomem a spermií bez akrozomu pomocí průtokové cytometrie – konkrétně FACS (z angl. Fluorescent Activated Cell Sorting). Následně bychom detekovali množství proteinu pouze v extraktech spermií, které byly bez akrozomu. Pro konkrétní odlišení původu izolovaného proteinu ve spermiích by bylo dobré v budoucnu vyzkoušet i jiné extrakční postupy, které by cíleně izolovaly proteiny z určitých částí buňky. Možným extrakčním postupem by mohla být kyselá extrakce proteinu p47 z kančích spermií použitím 2% kyseliny octové, kdy dochází k izolaci proteinů jak z povrchu spermií (Jonáková et al. 1991), tak i z akrozomu (Wolff & Schill 1975; Čechová et al. 1988). Jak jsme pomocí imunofluorescence zjistili, protein p47 by mohl být lokalizován jak na povrchu spermií, tak i uvnitř – nejen v akrozomální matrix, ale i ve vnitřní akrozomální membráně. Abychom tyto předpoklady mohli potvrdit, bylo by nutné provést další zkoumání provedením například frakcionalizace membrán spermií na plazmatickou, vnější a vnitřní akrozomální membránu (Jankovicova et al. 2020) nebo bychom mohli použít cílenou izolaci proteinů z povrchu spermií (Zigo et al. 2015). Dále bychom mohli využít také mikroskopii s vyšší schopností rozlišení pro lepší lokalizaci proteinu p47 ve spermiích.

Lokalizaci kančího p47 na povrchu spermií také dokazuje jeho vazebná aktivita jak k sacharidovým Lewis X strukturám epitelu vejcovodu, kterou ve své studii popisují Silva et al. (2017), tak i k integrinům na povrchu ovidukálních buněk (Andersen et al. 2000; Chegini et al. 2001). Jakou má protein p47 úlohu ve vazbě spermií na ZP oocyty se doposud nepodařilo objasnit.

Myším homologem ke kančímu proteinu p47 je protein SED1, který byl detekován na povrchu myších spermií. Stejně jako kančí p47 je myší SED1 lokalizován v akrozomální oblasti hlavičky zralých spermií (Ensslin & Shur 2003). Ensslin & Shur (2003) ve své studii zkoumali účast SED1 na rozpoznání a vazbě gamet. Zjistili, že SED1 se váže na neoplozené oocyty a na fragmenty ZP získané z vaječníků (Ensslin & Shur 2003). Pro správnou biologickou funkci SED1 potřebuje svojí discoidinovou doménu, kterou se váže k plazmatické membráně spermie a na ZP oocyty (Shur et al. 2004). Dále bylo zjištěno, že myší SED1 rozpoznává a váže se na glykoproteiny mZP2 i mZP3. Je zajímavé, že SED1 má afinitu jak k primárnímu receptoru, což je glykoprotein mZP3, ale zároveň se váže i na glykoprotein mZP2, který hraje roli v sekundární vazbě a je ligandem pro akrozomálně zreagované spermie (Wassarman et al. 2001; Shur et al. 2004). Stejně jako byla popsána vazba myšího SED1 na glykoproteiny ZP, tak se předpokládá, že i kančí p47 se účastní vazby k sacharidovým strukturám na ZP (Ensslin et al. 1998; Zigo et al. 2015).

Jedním z cílů práce bylo i sledování vazebné aktivity proteinu p47 k ZP. Vycházeli jsme ze studie Zigo et al. (2015), který identifikoval protein p47 na povrchu ejakulovaných a kapacitovaných spermií. Zároveň ve své studii určil vazebnou aktivitu proteinu p47, izolovaného z povrchu ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií s biotinem značenými glykoproteiny ZP. Vzhledem k tomu, že neznáme přesnou lokalizaci proteinu p47 ve spermiích a protein může být přítomen na plazmatické membráně spermií, ale i na vnitřní akrozomální

membráně, popřípadě v akrozomální matrix, kde může hrát roli sekundárního vazebného receptoru, rozhodli jsme se využít třech různých postupů k blokaci vazby pomocí protilátky 1H9 proti p47. V naší studii jsme využili předpoklad přítomnosti proteinu p47 na povrchu ejakulovaných spermií, proto jsme je před vazbou na oocyt inkubovali s protilátkou 1H9 proti p47 a následně přidali k oocytům. Během společné inkubace spermií s oocyty došlo ke kapacitaci spermií a jejich navázání na ZP oocytu v nižším počtu, než když spermie nebyly inkubovány s protilátkou. Z tohoto experimentu i našich výsledků z imunofluorescenční analýzy spolu s detekcí v extraktech spermií vyplývá, že protein p47 v průběhu kapacitace zcela z povrchu spermií neodchází a může se tak účastnit vazby na ZP oocytu. Během naší druhé navržené metodiky jsme blokovali protein p47 na plazmatické membráně *in vitro* kapacitovaných spermií, kdy byly spermie nejprve kapacitovány a následně inkubovány s protilátkou 1H9 proti p47 a poté přidány k oocytům. Během společné inkubace již kapacitovaných spermií s oocyty došlo k částečné blokaci vazby spermií na ZP, což ukazuje na přítomnost proteinu p47 na kapacitovaných spermiích a jeho možném zapojení ve vazbě na oocyt. Jak již bylo řečeno, protein p47 zůstává na spermiích i po kapacitaci a jeho přítomnost jsme prokázali i na akrozomálně zreagovaných spermiích, kde je přítomen na vnitřní akrozomální membráně. Podle imunofluorescenčního značení na permeabilizovaných spermiích můžeme odhadovat i jeho přítomnost v akrozomální matrix spermií. Podle těchto předpokladů by se protein p47 mohl účastnit sekundární vazby na ZP oocytu. Ejakulované spermie byly inkubovány společně s oocyty a protilátkou 1H9 proti p47 v médiu, kde byly spermie zároveň kapacitovány. V tomto případě mohlo dojít k blokaci vazby až po spuštění akrozomální reakce a odkrytí vazebných míst spermií pro ZP uvnitř akrozomu nebo na vnitřní akrozomální membráně, na něž se v případě přítomnosti p47 mohla protilátka 1H9 navázat. Ve všech případech experimentů během blokace pomocí protilátky 1H9 došlo k redukci vazby spermií na oocyt. Nicméně je potřeba do experimentů zahrnout větší skupiny oocytů a námi navržené metodiky studia vazby více propracovat. Původně jsme v naší studii předpokládali pravděpodobnou úlohu proteinu p47 jenom v primární vazbě spermií na ZP oocytu. Pro správné nastavení metodiky je klíčové, aby byly oocyty v odpovídajícím stádiu jejich meiotické kompetence. Například studie vazebné aktivity proteinu p47 s glykoproteiny ZP v práci Zigo et al. (2015) neuvádí, v jakém stádiu zrání se oocyty nacházely. Autoři ve své studii pouze uvádí, že protein p47 přítomný na kapacitovaných spermiích se váže k ZP víc než p47 pocházející z ejakulovaných spermií.

Dále je nutné sledovat, zda spermie navázané na oocyty mají akrozomy. Přítomnost akrozomu na navázaných spermiích bychom mohli sledovat pod fluorescenčním mikroskopem použitím lektinu PNA, kterým bychom mohli přítomnost akrozomu potvrdit nebo vyvrátit. Zapojení p47 proteinu do sekundární vazby spermií na ZP bychom mohli ověřit na spermiích, u kterých by byla předem navozena AR a následně by byly inkubovány s protilátkou 1H9. Pro kontrolu bychom mohly vyzkoušet inkubaci spermií s oocytem kratší nebo delší dobu než 1,5 hodiny u metodik, kde předpokládáme přítomnost p47 na ejakulovaných a akrozomálně zreagovaných spermiích a kratší nebo delší dobu než 30 min u kapacitovaných spermií.

Ze všech našich experimentů je patrné, že protein p47 je přítomen jak na povrchu, tak i uvnitř spermií. Částečně jsme blokovali vazbu proteinu p47 na úrovni plazmatické membrány, tak případně na úrovni akrozomálního obsahu. Ačkoliv byl protein p47, na základě studií na myších spermiích, považován za vazebný receptor pro ZP, jeho aktivita ve vazbě

na ZP oocytu nebyla doposud uspokojivě prozkoumaná. Nicméně naše předběžná studie vede k potvrzení předpokladu, že protein p47 by mohl být do vazby spermií na ZP oocytu zapojen.

7 Závěr

V této práci jsme vycházeli z hypotézy, podle které dochází k blokaci vazby spermií na *zona pellucida* (ZP) oocyty s využitím protilátky proti proteinu lactadherinu (p47), který je lokalizován na povrchu kančích spermií. Cílem práce bylo lokalizovat p47 ve spermiích kanců pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie, detekovat p47 v extraktech kančích spermií a blokovat vazbu spermií na ZP oocyty pomocí monoklonální protilátky 1H9 proti p47.

Kančí p47 byl lokalizován v akrozomální oblasti hlavičky ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií. V akrozomálně zreagovaných spermiích byl p47 lokalizován v celé oblasti hlavičky spermie. Kančí p47 byl také detekován v extraktech ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných spermií. Byly detekovány dva proteinové proužky o přibližné molekulové hmotnosti 35 a 45 kDa. K úbytku množství detekovaného proteinu docházelo ve spermiích po akrozomální reakci, nicméně tento úbytek nebyl statisticky významný. Pomocí vazebných studií se nám podařilo pomocí inkubace s protilátkou 1H9 proti p47 částečně zablockovat vazbu spermií na ZP oocyty.

Z našich výsledků vyplývá, že stanovená hypotéza o blokaci spermií na ZP oocyty byla pomocí specifické protilátky proti p47 částečně potvrzena a můžeme předpokládat, že tento spermatický protein se může vazby se ZP účastnit i na více úrovních. Navíc by bylo vhodné do dalších experimentů zahrnout více oocytů v odpovídajícím stádiu jejich meiotické kompetence a využít ke studiu vazby spermie po indukci akrozomální reakce. U takovýchto spermií bychom po inkubaci se specifickou protilátkou proti p47 mohli zjistit, zda se protein p47 skutečně účastní i sekundární vazby spermie k ZP.

8 Literatura

- Adham IM, Nayernia K, Engel W. 1997. Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Molecular Reproduction and Development* **46**:370–376.
- Alberts, Bruce, et al. 2002. Integrins. In: *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science, 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26867/> (accessed April 2021).
- Andersen MH, Berglund L, Rasmussen JT, Petersen TE. 1997. Bovine PAS-6/7 binds $\alpha\beta 5$ integrin and anionic phospholipids through two domains. *Biochemistry* **36**:5441–5446.
- Andersen MH, Graversen H, Fedosov SN, Petersen TE, Rasmussen JT. 2000. Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin. *Biochemistry* **39**:6200–6206.
- Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Australian Journal of Biological Sciences* **4**:581–596.
- Baba T, Kashiwabara S, Watanabe K, Itoh H, Michikawa Y, Kimura K, Takada M, Fukamizu A, Arai Y. 1989a. Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. *Journal of Biological Chemistry* **264**:11920–11927.
- Baba T, Michikawa Y, Kawakura K, Arai Y. 1989b. Activation of boar proacrosin is effected by processing at both N- and C-terminal portions of the zymogen molecule. *FEBS Letters* **244**:132–136.
- Balzar M et al. 2001. Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. *Molecular and Cellular Biology* **21**:2570–2580.
- Beebe SJ, Leyton L, Burks D, Ishikawa M, Fuerst T, Dean J, Saling P. 1992. Recombinant mouse ZP3 inhibits sperm binding and induces the acrosome reaction. *Developmental Biology* **151**:48–54.
- Bezouska K, Sklenár J, Novák P, Halada P, Havlíček V, Kraus M, Tichá M, Jonáková V. 1999. Determination of the complete covalent structure of the major glycoform of DQH sperm surface protein, a novel trypsin-resistant boar seminal plasma O-glycoprotein related to pB1 protein. *Protein science: a publication of the Protein Society* **8**:1551–1556.
- Bi M. 2002. Biochemical and functional characterization of zonadhesin: a sperm protein potentially mediating species-specific sperm-egg adhesion during fertilization. PhD Thesis. Texas Tech University.
- Bi M, Hickox JR, Winfrey VP, Olson GE, Hardy DM. 2003. Processing, localization and binding activity of zonadhesin suggest a function in sperm adhesion to the zona pellucida during exocytosis of the acrosome. *The Biochemical Journal* **375**:477–488.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1980. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell*

20:873–882.

- Bleil JD, Wassarman PM. 1983. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Developmental Biology* **95**:317–324.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1988. Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**:6778–6782.
- Calvete JJ, Mann K, Schäfer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Töpfer-Petersen E. 1995. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochemical Journal* **310**:615–622.
- Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1997. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Letters* **407**:201–206.
- Carmon L et al. 2002. Characterization of novel breast carcinoma-associated BA46-derived peptides in HLA-A2.1/Db- β 2m transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation* **110**:453–462.
- Carmona E, Weerachayanukul W, Soboloff T, Fluharty AL, White D, Promdee L, Ekker M, Berger T, Buhr M, Tanphaichitr N. 2002a. Arylsulfatase a is present on the pig sperm surface and is involved in sperm-zona pellucida binding. *Developmental Biology* **247**:182–196.
- Carmona E, Weerachayanukul W, Xu H, Fluharty A, Anupriwan A, Shoushtarian A, Chakrabandhu K, Tanphaichitr N. 2002b. Binding of Arylsulfatase A to Mouse Sperm Inhibits Gamete Interaction and Induces the Acrosome Reaction. *Biology of Reproduction* **66**:1820–1827.
- Čechová D, Töpfer-Petersen E, Henschen A. 1988. Boar proacrosin is a single-chain molecule which has the N-terminus of the acrosin A-chain (light chain). *FEBS Letters* **241**:136–140.
- Ceriani RL, Sasaki M, Sussman H, Wara WM, Blank EW. 1982. Circulating human mammary epithelial antigens in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**:5420–5424.
- Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* **168**:697–698.
- Chegini N, Kotseos K, Ma C, Williams RS, Diamond MP, Holmdahl L, Skinner K. 2001. Differential expression of integrin α v and β 3 in serosal tissue of human intraperitoneal organs and adhesion. *Fertility and Sterility* **75**:791–796.
- Chiu PCN, Wong BST, Lee CL, Pang RTK, Lee K-F, Sumitro SB, Gupta SK, Yeung WSB. 2008. Native human zona pellucida glycoproteins: purification and binding properties.

- Human Reproduction **23**:1385–1393.
- Copland SD, Murphy AA, Shur BD. 2009. The mouse gamete adhesin, SED1, is expressed on the surface of acrosome-intact human sperm. *Fertility and Sterility* **92**:2014–2019.
- Couto JR, Blank EW, Peterson JA, Ceriani RL. 1995. Anti-BA46 monoclonal antibody Mc3: humanization using a novel positional consensus and in vivo and in vitro characterization. *Cancer Research* **55**:1717–1722.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1994. Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *BBA - General Subjects* **1200**:48–54.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1995. Boar spermadhesin AWN-1: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *European Journal of Biochemistry* **230**:329–336.
- Dudkiewicz AB. 1984. Purification of boar acrosomal arylsulfatase A and possible role in the penetration of cumulus cells. *Biology of Reproduction* **30**:1005–1014.
- Dunbar BS, Avery S, Lee V, Prasad S, Schwahn D, Schwoebel E, Skinner S, Wilkins B. 1994. The mammalian zona pellucida: Its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reproduction, Fertility and Development* **6**:331–337.
- Ekhlesi-Hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsoлова M, Petrunkina A, Töpfer-Petersen E. 2005. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biology of Reproduction* **73**:536–545.
- Ekhlesi-Hundrieser M, Sinowatz F, De Wilke IG, Waberski D, Töpfer-Petersen E. 2002. Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Molecular Reproduction and Development* **61**:32–41.
- Ensslin M, Calvete JJ, Thole HH, Sierralta WD, Adermann K, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1995. Identification by affinity chromatography of boar sperm membrane-associated proteins bound to immobilized porcine zona pellucida. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* **376**:733–738.
- Ensslin M, Vogel T, Calvete JJ, Thole HH, Schmidtke J, Matsuda T, Töpfer-Petersen E. 1998. Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. *Biology of Reproduction* **58**:1057–1064.
- Ensslin MA, Shur BD. 2003. Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell* **114**:405–417.
- Epifano O, Dean J. 1994. Biology and structure of the zona pellucida: A target for immunocontraception. *Reproduction, Fertility and Development* **6**:319–330.
- Florman HM, Fissore RA. 2015. Fertilization in Mammals. In: Knobil and Neill's physiology of reproduction **1**:149-196.

- Foresta C, Indino M, Manoni F, Scandellari C. 1987. Angiotensin-converting enzyme content of human spermatozoa and its release during capacitation. *Fertility and Sterility* **47**:1000–1003.
- Fuentes-Prior P, Fujikawa K, Pratt KP. 2002. New insights into binding interfaces of coagulation factors V and VIII and their homologues-lessons from high resolution crystal structures. *Current Protein and Peptide Science* **3**:313–339.
- Gao Z, Garbers DL. 1998. Species diversity in the structure of zonadhesin, a sperm-specific membrane protein containing multiple cell adhesion molecule-like domains. *Journal of Biological Chemistry* **273**:3415–3421.
- Gao Z, Harumi T, Garbers DL. 1997. Chromosome localization of the mouse zonadhesin gene and the human zonadhesin gene (ZAN). *Genomics* **41**:119–122.
- Gatti JL, Druart X, Guérin Y, Dacheux F, Dacheux JL. 1999. A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. *Biology of Reproduction* **60**:937–945.
- Giuffrida MG, Cavaletto M, Giunta C, Conti A, Godovac-Zimmermann J. 1998. Isolation and characterization of full and truncated forms of human breast carcinoma protein BA46 from human milk fat globule membranes. *Journal of Protein Chemistry* **17**:143–148.
- Goudet G, Mugnier S, Callebaut I, Monget P. 2008. Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. *Biology of Reproduction* **78**:796–806.
- Greve JM, Wassarman PM. 1985. Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *Journal of Molecular Biology* **181**:253–264.
- Gupta SK, Bhandari B, Shrestha A, Biswal BK, Palaniappan C, Malhotra SS, Gupta N. 2012. Mammalian zona pellucida glycoproteins: Structure and function during fertilization. *Cell and Tissue Research* **349**:665–678.
- Gur Y, Breitbart H. 2006. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes & Development* **20**:411–416.
- Guyonnet B, Dacheux F, Dacheux J, Gatti J. 2011. The epididymal transcriptome and proteome provide some insights into new epididymal regulations. *Journal of Andrology* **32**:651–664.
- Hagaman JR, Moyer JS, Bachman ES, Sibony M, Magyar PL, Welch JE, Smithies O, Krege JH, O'Brien DA. 1998. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**:2552–2557.
- Hanayama R, Nagata S. 2005. Impaired involution of mammary glands in the absence of milk fat globule EGF factor 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:6886–6891.
- Hardy DM, Garbers DL. 1994. Species-specific binding of sperm proteins to the extracellular matrix (zona pellucida) of the egg. *The Journal of Biological Chemistry* **269**:19000–

19004.

- Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG. 1994. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA sequence* **4**:361–393.
- Hedrick JL. 1996. Comparative structural and antigenic properties of zona pellucida glycoproteins. *Journal of Reproduction and Fertility* **50**:9–17.
- Howes E, Pascall JC, Engel W, Jones R. 2001. Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *Journal of Cell Science* **114**:4127–4136.
- Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. 1991. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *Journal of Biological Chemistry* **266**:15377–15383.
- Hunter RHF. 1981. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *Reproduction* **63**:109–117.
- Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. 1997. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane β 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biology of Reproduction* **56**:1020–1024.
- Jankovicova J, et al. 2020. Expression and distribution of CD151 as a partner of alpha6 integrin in male germ cells. *Scientific reports* **10**: 1-12.
- Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:4892–4896.
- Jonáková V, Kraus M, Veselský L, Cechová D, Bezouska K, Tichá M. 1998. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility* **114**:25–34.
- Jonáková V, Manásková P, Tichá M. 2007. Separation, characterization and identification of boar seminal plasma proteins. *Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **849**:307–314.
- Jonáková V, Sanz L, Calvete JJ, Henschen A, Čechová D, Töpfer-Petersen E. 1991. Isolation and biochemical characterization of a zona pellucida-binding glycoprotein of boar spermatozoa. *FEBS Letters* **280**:183–186.
- Jonáková V, Tichá M. 2004. Boar seminal plasma proteins and their binding properties. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **69**:461–475.

- Jones R, Parry R, Leggio L Lo, Nickel P. 1996. Inhibition of sperm-zona binding by suramin, a potential 'lead' compound for design of new anti-fertility agents. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine* **2**:597–605.
- Kadirvel G, Machado SA, Korneli C, Collins E, Miller P, Bess KN, Aoki K, Tiemeyer M, Bovin N, Miller DJ. 2012. Porcine sperm bind to specific 6-sialylated biantennary glycans to form the oviduct reservoir. *Biology of Reproduction* **87**:141–147.
- Kallajoki M, Parvinen M, Suominen JJ. 1986. Expression of acrosin during mouse spermatogenesis: a biochemical and immunocytochemical analysis by a monoclonal antibody C 11 H. *Biology of Reproduction* **35**:157–165.
- Kamińska A, Enguita FJ, Stępień E. 2018. Lactadherin: An unappreciated haemostasis regulator and potential therapeutic agent. *Vascular Pharmacology* **101**:21–28.
- Kessler SP, Rowe TM, Gomos JB, Kessler PM, Sen GC. 2000. Physiological non-equivalence of the two isoforms of angiotensin-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **275**:26259–26264.
- Köhn FM, Damshäuser I, Neukamm C, Renneberg H, Siems WE, Schill WB, Aumüller G. 1998. Ultrastructural localization of angiotensin-converting enzyme in ejaculated human spermatozoa. *Human Reproduction (Oxford, England)* **13**:604–610.
- Köhn FM, Miska W, Schill WB. 1995. Release of angiotensin-converting enzyme (ACE) from human spermatozoa during capacitation and acrosome reaction. *Journal of Andrology* **16**:259–265.
- Kvistgaard AS, Pallesen LT, Arias CF, Lopez S, Petersen TE, Heegaard CW, Rasmussen JT. 2004. Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections. *Journal of Dairy Science* **87**:4088–4096.
- Kwon WS, Rahman MS, Lee JS, Kim J, Yoon SJ, Park YJ, You YA, Hwang S, Pang MG. 2014. A comprehensive proteomic approach to identifying capacitation related proteins in boar spermatozoa. *BMC Genomics* **15**:1–13.
- Langford KG, Zhou Y, Russell LD, Wilcox JN, Bernstein KE. 1993. Regulated expression of testis angiotensin-converting enzyme during spermatogenesis in mice. *Biology of Reproduction* **48**:1210–1218.
- Lanzillo JJ, Stevens J, Dasarathy Y, Yotsumoto H, Fanburg BL. 1985. Angiotensin-converting enzyme from human tissues. Physicochemical, catalytic, and immunological properties. *Journal of Biological Chemistry* **260**:14938–14944.
- Larocca D, Peterson JA, Urrea R, Kuniyoshi J, Bistrain AM, Ceriani RL. 1991. A Mr 46,000 human milk fat globule protein that is highly expressed in human breast tumors contains factor VIII-like domains. *Cancer Research* **51**:4994–4998.
- Larson JL, Miller DJ. 1997. Sperm from a variety of mammalian species express beta1,4-galactosyltransferase on their surface. *Biology of Reproduction* **57**:442–453.

- Leahy T, Gadella BM. 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction* **142**:759–778.
- Liberda J, Manásková P, Prelovská L, Tichá M, Jonáková V. 2006. Saccharide-mediated interactions of boar sperm surface proteins with components of the porcine oviduct. *Journal of Reproductive Immunology* **71**:112–125.
- Liu DY, Baker HW. 1993. Inhibition of acrosin activity with a trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida. *Biology of Reproduction* **48**:340–348.
- Lopez LC, Bayna EM, Litoff D, Shaper NL, Shaper JH, Shur BD. 1985. Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *The Journal of Cell Biology* **101**:1501–1510.
- Lu Q, Shur BD. 1997. Sperm from beta 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. *Development (Cambridge, England)* **124**:4121–4131.
- Machado SA, Kadirvel G, Daigneault BW, Korneli C, Miller P, Bovin N, Miller DJ. 2014. LewisX-containing glycans on the porcine oviductal epithelium contribute to formation of the sperm reservoir. *Biology of Reproduction* **91**:140.
- Manásková P, Jonáková V. 2008. Localization of porcine seminal plasma (PSP) proteins in the boar reproductive tract and spermatozoa. *Journal of Reproductive Immunology* **78**:40–48.
- Manásková P, Peknicová J, Elzeinová F, Tichá M, Jonáková V. 2007. Origin, localization and binding abilities of boar DQH sperm surface protein tested by specific monoclonal antibodies. *Journal of Reproductive Immunology* **74**:103–113.
- Mao H-T, Yang W-X. 2013. Modes of acrosin functioning during fertilization. *Gene* **526**:75–79.
- Markham, CL, Coffey, DS. 1994. The Male Sex Accessory Tissues In: *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition, E. Knobil, J. D. Neill (eds). Raven Press, Ltd., New York. 1435–1487
- McLeskey SB, Dowds C, Carballada R, White RR, Saling PM. 1997. Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *International Review of Cytology* **177**:57–113.
- Miller D, Ostermeier GC. 2006. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Human Reproduction Update* **12**:757–767.
- Miller DJ, Macek MB, Shur BD. 1992. Complementarity between sperm surface β -1, 4-galactosyl-transferase and egg-coat ZP3 mediates sperm–egg binding. *Nature* **357**:589–593.
- Mori E, Baba T, Iwamatsu A, Mori T. 1993. Purification and characterization of a 38-kDa protein, sp38, with zona pellucida-binding property from porcine epididymal sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **196**:196–202.

- Mori E, Kashiwabara S, Baba T, Inagaki Y, Mori T. 1995. Amino acid sequences of porcine Sp38 and proacrosin required for binding to the zona pellucida. *Developmental Biology* **168**:575–583.
- Newburg DS, Peterson JA, Ruiz-Palacios GM, Matson DO, Morrow AL, Shults J, de Lourdes Guerrero M, Chaturvedi P, Newburg SO, Scallan CD. 1998. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *The Lancet* **351**:1160–1164.
- Ngernsounnern A, Weerachayanukul W, Saewu A, Thitilertdecha S, Sobhon P, Sretarugsa P. 2004. Rat sperm AS-A: subcellular localization in testis and epididymis and surface distribution in epididymal sperm. *Cell and Tissue Research* **318**:353–363.
- Ogura K, Nara K, Watanabe Y, Kohno K, Tai T, Sanai Y. 1996. Cloning and Expression of cDNA for O-Acetylation of GD3 Ganglioside. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **225**:932–938.
- Olson GE, Winfrey VP, Bi M, Hardy DM, NagDas SK. 2004. Zonadhesin assembly into the hamster sperm acrosomal matrix occurs by distinct targeting strategies during spermiogenesis and maturation in the epididymis. *Biology of Reproduction* **71**:1128–1134.
- Ozgun K, Patankar MS, Oehninger S, Clark GF. 1998. Direct evidence for the involvement of carbohydrate sequences in human sperm-zona pellucida binding. *Molecular Human Reproduction* **4**:318–324.
- Pauls K, Metzger R, Steger K, Klonisch T, Danilov S, Franke FE. 2003. Isoforms of angiotensin I-converting enzyme in the development and differentiation of human testis and epididymis. *Andrologia* **35**:32–43.
- Peréz S, Mouhous-Riou N, Nifant'ev NE, Tsvetkov YE, Bachet B, Imberty A. 1996. Crystal and molecular structure of a histo-blood group antigen involved in cell adhesion: the Lewis x trisaccharide. *Glycobiology* **6**:537–542.
- Peterson RN, Campbell P, Hunt WP, Bozzola JJ. 1991. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis characterization of APz, a sperm protein involved in zona binding in the pig and evidence for its binding to specific zona glycoproteins. *Molecular Reproduction and Development* **28**:260–271.
- Petrunkina AM, Gehlhaar R, Drommer W, Waberski D, Töpfer-Petersen E. 2001. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)* **121**:889–896.
- Petrunkina AM, Läkamp A, Gentzel M, Ekhlesi-Hundrieser M, Töpfer-Petersen E. 2003. Fate of lactadherin P47 during post-testicular maturation and capacitation of boar spermatozoa. *Reproduction* **125**:377–387.
- Prasad S V., Skinner SM, Carino C, Wang N, Cartwright J, Dunbar BS. 2000. Structure and function of the proteins of the mammalian zona pellucida. *Cells Tissues Organs* **166**:148–164.

- Rattanachaiyanont M, Weerachayanukul W, Léveillé M-C, Taylor T, D'Amours D, Rivers D, Leader A, Tanphaichitr N. 2001. Anti-SLIP1-reactive proteins exist on human spermatozoa and are involved in zona pellucida binding. *Molecular Human Reproduction* **7**:633–640.
- Raymond A, Ensslin MA, Shur BD. 2009. SED1/MFG-E8: a bi-motif protein that orchestrates diverse cellular interactions. *Journal of Cellular Biochemistry* **106**:957–966.
- Raymond AS, Shur BD. 2009. A novel role for SED1 (MFG-E8) in maintaining the integrity of the epididymal epithelium. *Journal of Cell Science* **122**:849–858.
- Rebeiz M, Miller DJ. 1999. Porcine sperm surface β 1,4-galactosyltransferase binds to the zona pellucida but is not necessary or sufficient to mediate sperm–zona pellucida binding. *Molecular Reproduction and Development* **54**:379–387.
- Redgrove, KA, Nixon, B, Baker, MA, Hetherington, L, Baker, G, Liu, DY, & Aitken, RJ (2012). The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition. *PLoS One* **11**: e50851.
- Reid AT, Redgrove K, Aitken RJ, Nixon B. 2011. Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian Journal of Andrology* **13**:88–96.
- Reitherman RW, Rosen SD, Frasier WA, Barondes SH. 1975. Cell surface species-specific high affinity receptors for discoidin: developmental regulation in *Dictyostelium discoideum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **72**:3541–3545.
- Schill W-B, Schleuning W-D, Fritz H, Wendt V, Heimburger N. 1975. Immunofluorescent localization of acrosin in spermatozoa by boar acrosin antibodies. *Naturwissenschaften* **62**:540–541.
- Seidah NG, Manjunath P, Rochemont J, Sairam MR, Chrétien M. 1987. Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin. *The Biochemical Journal* **243**:195–203.
- Shur BD, Ensslin MA, Rodeheffer C. 2004. SED1 function during mammalian sperm-egg adhesion. *Current Opinion in Cell Biology* **16**:477–485.
- Shur BD, Hall NG. 1982. A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *The Journal of Cell Biology* **95**:574–579.
- Shur BD, Rodeheffer C, Ensslin MA, Lyng R, Raymond A. 2006. Identification of novel gamete receptors that mediate sperm adhesion to the egg coat. *Molecular and Cellular Endocrinology* **250**:137–148.
- Silva E, Frost D, Li L, Bovin N, Miller DJ. 2017. Lactadherin is a candidate oviduct Lewis X trisaccharide receptor on porcine spermatozoa. *Andrology* **5**:589–597.
- Silva E, Kadirvel G, Jiang R, Bovin N, Miller D. 2014. Multiple proteins from ejaculated and epididymal porcine spermatozoa bind glycan motifs found in the oviduct. *Andrology*

2:763–771.

- Sinowatz F, Amselgruber W, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ, Sanz L, Plendl J. 1995. Immunohistochemical localization of spermadhesin AWN in the porcine male genital tract. *Cell and Tissue Research* **282**:175–179.
- Sinowatz F, Töpfer-Petersen E, Kölle S, Palma G. 2001. Functional morphology of the zona pellucida. *Anatomia, Histologia, Embryologia* **30**:257–263.
- Stubbs JD, Lekutis C, Singer KL, Bui A, Yuzuki D, Srinivasan U, Parry G. 1990. cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**:8417–8421.
- Suarez SS. 2002. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reproduction in Domestic Animals* **37**:140–143.
- Tanphaichitr N, Smith J, Mongkolsirikieart S, Gradil C, Lingwood CA. 1993. Role of a gamete-specific sulfoglycolipid immobilizing protein on mouse sperm-egg binding. *Developmental Biology* **156**:164–175.
- Tantibhedhyangkul J, Weerachayanukul W, Carmona E, Xu H, Anupriwan A, Michaud D, Tanphaichitr N. 2002. Role of sperm surface Arylsulfatase A in mouse sperm-zona pellucida binding. *Biology of Reproduction* **67**:212–219.
- Tardif S, Cormier N. 2011. Role of zonadhesin during sperm-egg interaction: a species-specific acrosomal molecule with multiple functions. *Molecular Human Reproduction* **17**:661–668.
- Tesařík J, Drahorád J, Pěkníková J. 1988. Subcellular immunochemical localization of acrosin in human spermatozoa during the acrosome reaction and zona pellucida penetration. *Fertility and Sterility* **50**:133–141.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Tsoleva M. 2008. Glycobiology of fertilization in the pig. *The International Journal of Developmental Biology* **52**:717–736.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostálová Z, Sanz L, Calvete JJ. 1998. Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* **30**:217–224.
- Töpfer-Petersen E, Wagner A, Friedrich J, Petrunkina A, Ekhlasi-Hundrieser M, Waberski D, Drommer W. 2002. Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *Journal of Experimental Zoology* **292**:210–215.
- Töpfer-Petersen F, Friess AE, Nguyen H, Schill W-B. 1985. Evidence for a fucose-binding protein in boar spermatozoa. *Histochemistry* **83**:139–145.
- Toshimori K. 2003. Testicular and epididymal maturation of mammalian spermatozoa. In: *Introduction to Mammalian Reproduction*. Springer, Boston, MA, 2003. 93–111.

- Tulsiani DRP, Zeng H-T, Abou-Haila A. 2007. Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signalling pathways. *Society of Reproduction and Fertility Supplement* **63**:257–272.
- Tumova L, Zigo M, Sutovsky P, Sedmikova M, Postlerova P. 2021. Ligands and Receptors Involved in the Sperm-Zona Pellucida Interactions in Mammals. *Cells* **10**:133.
- Wassarman PM. 1990. Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins. *Journal of Reproduction and Fertility*:79–87.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology* **3**:59–64.
- Wassarman PM, Mortillo S. 1991. Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *International review of cytology* **130**:85–110.
- Weerachayanukul W et al. 2003. Acquisition of Arylsulfatase A onto the mouse sperm surface during epididymal transit. *Biology of Reproduction* **69**:1183–1192.
- White D, Weerachayanukul W, Gadella B, Kamolvarin N, Attar M, Tanphaichitr N. 2000. Role of sperm sulfogalactosylglycerolipid in mouse sperm-zona pellucida binding. *Biology of Reproduction* **63**:147–155.
- Williams TA, Barnes K, Kenny AJ, Turner AJ, Hooper NM. 1992. A comparison of the zinc contents and substrate specificities of the endothelial and testicular forms of porcine angiotensin converting enzyme and the preparation of isoenzyme-specific antisera. *The Biochemical Journal* **288**:875–881.
- Wilson MD, Riemer C, Martindale DW, Schnupf P, Boright AP, Cheung TL, Hardy DM, Schwartz S, Scherer SW, Tsui L-C. 2001. Comparative analysis of the gene-dense ACHE/TFR2 region on human chromosome 7q22 with the orthologous region on mouse chromosome 5. *Nucleic acids research* **29**:1352–1365.
- Wolff HH, Schill W-B. 1975. Ultrastructural study of human sperm acrosome during acetic acid extraction of acrosin. *Reproduction* **42**:385–387.
- Xu H, Liu F, Srakaew N, Koppisetty C, Nyholm P-G, Carmona E, Tanphaichitr N. 2012. Sperm arylsulfatase A binds to mZP2 and mZP3 glycoproteins in a nonenzymatic manner. *Reproduction* **144**:209.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press.189–317.
- Yu Y, Xu W, Yi Y-J, Sutovsky P, Oko R. 2006. The extracellular protein coat of the inner acrosomal membrane is involved in zona pellucida binding and penetration during fertilization: characterization of its most prominent polypeptide (IAM38). *Developmental Biology* **290**:32–43.
- Yurewicz EC, Sacco AG, Gupta SK, Xu N, Gage DA. 1998. Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane

vesicles. *The Journal of Biological Chemistry* **273**:7488–7494.

Zigo M, Dorosh A, Pohlová A, Jonáková V, Šulc M, Maňásková-Postlerová P. 2015. Panel of monoclonal antibodies to sperm surface proteins as a tool for monitoring localization and identification of sperm-zona pellucida receptors. *Cell and Tissue Research* **359**:895–908.

Zigo M, Manaskova-Postlerova P, Jonakova V, Kerns K, Sutovsky P. 2019. Compartmentalization of the proteasome-interacting proteins during sperm capacitation. *Scientific Reports* **9**:1–18.