

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Detekce tetraspaninů v samčím reprodukčním traktu  
a spermích**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Anna Dobrodinská**

**Obor studia: Reprodukční biotechnologie**

**Vedoucí práce: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.**

**Konzultant práce: Ing. Filipa Bubeníčková**

© 2020 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Detekce tetraspaninů v samčím reprodukčním traktu a spermích“ jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil(la) autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21. 7. 2020

---

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé vedoucí diplomové práce RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D., za její ochotu, čas, odborné a trpělivé vedení při práci v laboratoři i při psaní této diplomové práce a především pak za její optimistický a velmi vstřícný přístup. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Ing. Filipě Bubeníčkové za opatření hřebčího biologického materiálu a za pomoc při jeho zpracování. Můj velký dík patří také mé rodině a nejbližším za jejich neutuchající podporu.

# Detekce tetraspaninů v samčím reprodukčním traktu a spermích

## Souhrn

Jedním z klíčových dějů během oplození je fúze spermie a vajíčka. Aby u savců mohlo dojít k momentu splynutí gamet, jsou nezbytné interakce proteinů, které zahrnují také proteiny z tetraspaninové nadrodiny. Ačkoli je v posledních letech vliv tetraspaninů na mechanismy reprodukce a jejich zapojení v nich předmětem intenzivního zkoumání, prozatím není zcela přesně znám. Nicméně víme, že pro mechanismy oplození je klíčové zapojení tetraspaninových členů a jejich schopnost asociovat s jinými povrchovými proteiny a vytvářet tím tetraspaninovou síť v gametách.

Tetraspaniny CD9, CD81 a CD151 byly a stále jsou intenzivně studovány na plazmatické membráně vajíčka mnoha savčích druhů. Jejich výzkum probíhá v posledních letech taktéž na spermích, nicméně pozornost byla zatím věnována jen několika savčím druhům. Proto bylo cílem naší práce tyto tetraspaniny detekovat na membránách spermíí a v reprodukčním traktu (1) prasat, u nichž byly studovány jen zřídka, a (2) hřebců, u kterých prozatím studovány vůbec nebyly.

Rešeršní část této práce je zaměřena na shrnutí dosavadních informací o CD9, CD81 a CD151. Předmětem experimentální části práce byla jejich detekce a lokalizace v reprodukčním traktu a spermích.

Pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie jsme tyto tetraspaniny lokalizovali v reprodukčních tkáních a v epididymálních a ejakulovaných spermích. Protein CD9 byl pomocí specifických protilátek lokalizován ve spermatických buňkách semenotvorného kanálku a Leydigových buňkách varlat kančů. U hřebců byla lokalizace CD9 prokázána pouze ve spermatických buňkách. V kančím i hřebčím nadvarletí jsme CD9 lokalizovali ve spermích uvnitř kanálku nadvarlete, ve tkáni a také v sekrečním epitelu. Zatímco výsledky detekce CD9 u epididymálních hřebčích spermíí byly negativní, u kančů jsme CD9 lokalizovali na vnitřní akrozomální membráně a u ejakulovaných kančích spermíí navíc ještě v oblasti krčku. V oblasti akrozomu a krčku jsme detekovali CD9 u hřebčích ejakulovaných spermíí. Získané výsledky jsme ověřili metodou Western blot a následně imunodetekce proteinů v extraktech epididymálních a ejakulovaných kančích a hřebčích spermíí, kde byly detekovány proteiny o přibližných molekulových hmotnostech 26 a 28 kDa.

V apikální oblasti akrozomu ejakulovaných kančích spermíí jsme pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie lokalizovali tetraspanin CD81, který jsme rovněž imunodetekcí zaznamenali v extraktech ejakulovaných kančích spermíí. U hřebců byl z extraktů epididymálních spermíí detekován CD81 o molekulové hmotnosti 28 kDa. Zbývající výsledky detekce a lokalizace CD81 u kančího a hřebčího modelu byly negativní.

A konečně byl také lokalizován tetraspanin CD151 ve spermatických buňkách semenotvorného kanálku kančího varlete. Pozitivní reakce protilátky byla rovněž viditelná v sekrečním epitelu kanálku kančího nadvarlete, kde byly zřetelné jednotlivé sekreční váčky. V intersticiální tkáni hřebčího varlete a ve tkáni a sekrečním epitelu kanálku hřebčího

nadvarlete jsme zaznamenali pouze slabou reakci protilátky proti CD151. Výsledky imunolokalizace u hřebčích epididymálních spermií byly negativní. Naproti tomu jsme pozorovali pozitivní vazbu protilátky na protein CD151 u epididymálních kančích spermií, kde jsme CD151 lokalizovali v subekvatoriálním segmentu. U ejakulovaných kančích spermií byl CD151 detekován v oblasti akrozomu a taktéž v subekvatoriálním segmentu. V ekvatoriálním segmentu byl CD151 lokalizován u hřebčích ejakulovaných spermií. Imunodetekci jsme provedli rovněž u tetraspaninu CD151. V extraktech epididymálních kančích spermií jsme detekovali protein o molekulové hmotnosti 50 kDa a u hřebců protein o hmotnosti 49 kDa. Detekce CD151 z extraktů kančích ejakulovaných spermií byla negativní. Na druhou stranu u hřebců byl detekován protein o molekulové hmotnosti 38 kDa. Detekce CD151 ve vyšších molekulových hmotnostech ukazuje na glykosylované formy tohoto proteinu.

Z našich výsledků je patrné, že lokalizace CD9, CD81 a CD151 v samčím reprodukčním traktu a ve spermiích prasat a koní je podobná lokalizaci, jež byla zjištěna u spermií jiných savčích druhů (např. u býka). Můžeme z toho usuzovat, že role těchto tří tetraspaninů na spermiích prasat a koní je velmi podobná funkci u jiných savčích druhů. Významné je především jejich zapojení v interakcích a fúzi spermie s vajíčkem. Do těchto interakcí se zapojují právě díky své schopnosti asociovat s jinými proteiny, a vytvářet tak organizovanou tetraspaninovou síť, pomocí které jsou schopny ovlivňovat mechanismy během oplození.

**Klíčová slova:** CD9, CD81, CD151, testes, prase, hřelec, epididymis

# Detection of tetraspanins in the male reproductive tract and spermatozoa

## Summary

One of the key events during fertilization is the fusion of sperm and egg. In mammals, interactions of tetraspanin superfamily proteins as well as other proteins are necessary for gamete fusion. Although the influence of tetraspanins on the mechanisms of reproduction and on their involvement in those mechanisms has been the subject of intensive research in recent years, it is not fully known yet. However, we know that the involvement of tetraspanin family members and their ability to associate with other surface proteins, and thus form a tetraspanin network in gametes, is crucial for fertilization mechanisms.

The tetraspanins CD9, CD81, and CD151 have been intensively studied on the plasma membrane of eggs of many mammalian species. Their research has also been conducted on sperm in recent years, but so far only few mammalian species have received attention. Therefore, this thesis aimed to detect these tetraspanins on sperm membranes and in the reproductive tract of (1) pigs, in which they have been rarely studied, and (2) stallions, in which they have not been studied at all.

In the research part of this thesis, we focused on summarizing the existing information about CD9, CD81, and CD151. The subject of the experimental part of the thesis was their detection and localization in sperm and reproductive tract.

Using indirect immunofluorescence microscopy, we localized these tetraspanins in reproductive tissues and in epididymal and ejaculated sperm. Using specific antibodies, the CD9 protein was localized in spermatid cells inside the lumen of seminiferous tubules and Leydig cells of boar testes. In stallions, the localization of CD9 was demonstrated only in sperm cells. In boar and stallion epididymis, we localized CD9 in sperm inside the epididymal duct, in the tissue, and in the secretory epithelium. The results of CD9 detection in epididymal stallion sperm were negative; in boars, we localized CD9 on the inner acrosomal membrane, and in ejaculated boar sperm, we localized it on the inner acrosomal membrane and in the neck area. In the acrosome and neck area, we detected CD9 in stallion ejaculated sperm. We verified the obtained results by Western blot and immunodetection of proteins from extracts of epididymal and ejaculated boar and stallion sperm, where proteins with approximate molecular weights of 26 and 28 kDa were detected.

In the apical region of the acrosome of ejaculated boar sperm, we localized tetraspanin CD81 using indirect immunofluorescence microscopy. We also recorded CD81 by immunodetection from ejaculated boar sperm extracts. In stallions, CD81 with a molecular weight of 28 kDa was detected from epididymal sperm extracts. The remaining results of CD81 detection and localization in the boar and stallion models were negative.

Moreover, the tetraspanin CD151 was localized in spermatid cells inside the lumen of seminiferous tubules of boar testes. A positive antibody reaction was also visible in the secretory epithelium of the boar epididymal duct, where individual secretory vesicles were distinct. We observed only a weak anti-CD151 antibody response in the interstitial tissue of the

stallion testes and in the tissue and secretory epithelium of the stallion epididymis. In stallion epididymal sperm, there were negative immunolocalization results. In contrast, we observed positive antibody binding to CD151 protein in epididymal boar sperm, where we localized CD151 in the subequatorial segment. In ejaculated boar sperm, CD151 was detected in the acrosome and also in the subequatorial segment. In the equatorial segment, CD151 was localized in ejaculated stallion sperm. We performed immunodetection on tetraspanin CD151, too. From extracts of epididymal boar sperm, we detected a protein with a molecular weight of 50 kDa; and, in stallions, a protein with a molecular weight of 49 kDa. The detection of CD151 from boar ejaculated sperm extracts was negative. On the other hand, in stallions, a protein with a molecular weight of 38 kDa was detected. Detection of CD151 at higher molecular weights indicates glycosylated forms of this protein.

Our results show that the localization of CD9, CD81, and CD151 in the male reproductive tract and in the sperm of pigs and horses is similar to that found in the sperm of other mammalian species (e.g., bull). Based on that, we may assume that the role of these three tetraspanins in pig and horse sperm is very similar to their function in other mammalian species. Their involvement in interactions of sperm and egg and in the sperm-egg fusion is especially important. They engage in these interactions precisely because of their ability to associate with other proteins, and thus create an organized tetraspanin network, through which they are able to influence mechanisms during fertilization.

**Keywords:** CD9, CD81, CD151, testes, pig, stallion, epididymis

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1 Morfologie pohlavních buněk</b> .....	<b>3</b>
3.1.1 Obecná stavba spermie .....	3
3.1.1.1 Hlavička spermie .....	3
3.1.1.2 Bičík spermie .....	4
3.1.2 Obecná stavba oocyty .....	5
<b>3.2 Vývoj a zrání spermie</b> .....	<b>6</b>
3.2.1 Spermatocytogeneze .....	6
3.2.2 Spermioogeneze (spermatohistogeneze).....	6
3.2.3 Epididymální maturace .....	7
<b>3.3 Kapacitace</b> .....	<b>8</b>
<b>3.4 Akrozomální reakce</b> .....	<b>9</b>
<b>3.5 Vazba spermie na oocyt</b> .....	<b>10</b>
<b>3.6 Fúze spermie a oocyty</b> .....	<b>11</b>
<b>3.7 Tetraspaniny a jejich role v reprodukci</b> .....	<b>14</b>
3.7.1 CD9.....	16
3.7.2 CD81.....	17
3.7.3 CD151.....	19
<b>4 Materiál a metodika</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1 Materiál</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2 Metodika</b> .....	<b>20</b>
4.2.1 Použité protilátky.....	20
4.2.1.1 Primární protilátky.....	20
4.2.1.2 Sekundární protilátky.....	21
4.2.2 Zpracování biologického materiálu .....	21
4.2.3 Příprava vzorků spermií pro SDS elektroforézu.....	22
4.2.3.1 Izolace proteinů se vzorkovým pufrem .....	22
4.2.3.2 Izolace proteinů se vzorkovým pufrem s 2-merkptoethanolem .....	22
4.2.3.3 Izolace proteinů pomocí RIPA pufru a acetonu.....	22
4.2.3.4 Izolace proteinů pomocí RIPA pufru a močoviny .....	23
4.2.3.5 Izolace proteinů pomocí RHB pufru a močoviny .....	23
4.2.4 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	23
4.2.5 Elektropřenos proteinů (Western blot) .....	24
4.2.6 Imunodetekce proteinů .....	24
4.2.7 Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie.....	25



<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>27</b>
5.1	Lokalizace tetraspaninu CD9 ve spermích a tkáni varlete a nadvarlete .....	27
5.2	Detekce tetraspaninu CD9 v extraktech spermíí.....	32
5.3	Lokalizace tetraspaninu CD81 ve spermích a tkáni varlete a nadvarlete.....	35
5.4	Detekce tetraspaninu CD81 v extraktech spermíí.....	40
5.5	Lokalizace tetraspaninu CD151 ve spermích a tkáni varlete a nadvarlete.....	42
5.6	Detekce tetraspaninu CD151 v extraktech spermíí.....	47
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>66</b>
<b>10</b>	<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>68</b>



# 1 Úvod

Oplození je složitý proces, jenž zahrnuje mnoho biologických dějů jak na straně vajíčka, tak na straně spermie. Aby mohlo dojít k úspěšnému oplození, je nezbytné, aby proběhly interakce mezi gametami, a to především adheze spermie na vajíčko a následná fúze těchto dvou pohlavních buněk. Mnoho mechanismů týkajících se interakcí gamet však stále není plně objasněno, a v posledních letech se proto výzkumy zaměřují především na pochopení molekulární úrovně těchto mechanismů.

Na plazmatických membránách savčích oocytů byly nalezeny a popsány proteiny, u kterých se ukázalo, že jejich zapojení do gametových interakcí je velmi důležité, jelikož jejich zablokování či ztráta působí na reprodukci negativně: CD9 (Kaji et al. 2000; Miyado et al. 2000), CD81 (Rubinstein et al. 2006b) a CD151 (Ziyyat et al. 2006).

CD9, CD81 a CD151 jsou integrální membránové proteiny spadající do tetraspaninové rodiny, jež má svoji charakteristickou strukturu, a to čtyři transmembránové domény. První tetraspaniny byly objeveny na povrchu lidských leukocytů, ale jejich exprese byla potvrzena téměř na všech živočišných buňkách, kde jejich funkce souvisí s řadou normálních i patologických buněčných procesů. Významnou vlastností tetraspaninů je tvořit tetraspaninovou síť, do které jsou tetraspaniny schopné zapojovat také jiné proteiny, např. integriny (Boucheix & Rubinstein 2001).

I přes identifikaci těchto tří tetraspaninů na vajíčku několika savčích druhů však nemáme zcela zmapovány jejich funkce během procesu oplození. Nejnovější výzkumy se zabývají komplexním pochopením funkcí tetraspaninů během gametových interakcí, a to nejen na vajíčku, ale také na spermiích. Tetraspanin CD9 byl popsán např. na myších (Ito et al. 2010; Frolikova et al. 2018), prasečích (Kaewmala et al. 2011) či býčích spermiích (Antalíková et al. 2015). Také tetraspanin CD81 byl objeven u býků (Jankovicova et al. 2016) či dalších savčích druhů. Nejnovější poznatky jsou pak zaznamenány u tetraspaninu CD151, který byl detekován na myších, býčích a lidských spermiích (Jankovicova et al. 2020).

Navzdory tomu, že byly a stále jsou tetraspaniny hojně studovány na vajíčku i na spermiích savčích druhů, dosud nám chybí mnoho informací, ať už o detekci u zbylých savčích druhů či o zmapování všech jejich funkcí během procesu oplození a je podstatné se výzkumem tetraspaninů a jejich fungováním v reprodukci zabývat i nadále.

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

Pro tuto práci byla stanovena hypotéza, že některé tetraspaniny, jež byly původně popsány na plazmatické membráně savčího vajíčka, budou rovněž detekovány v membránách spermii.

Na základě této hypotézy byly vytyčeny následující cíle práce:

- 1) detekce a lokalizace vybraných tetraspaninů ve spermii prasete a hřebce,
- 2) detekce a lokalizace vybraných tetraspaninů v reprodukčních orgánech prasete a hřebce.

## 3 Literární rešerše

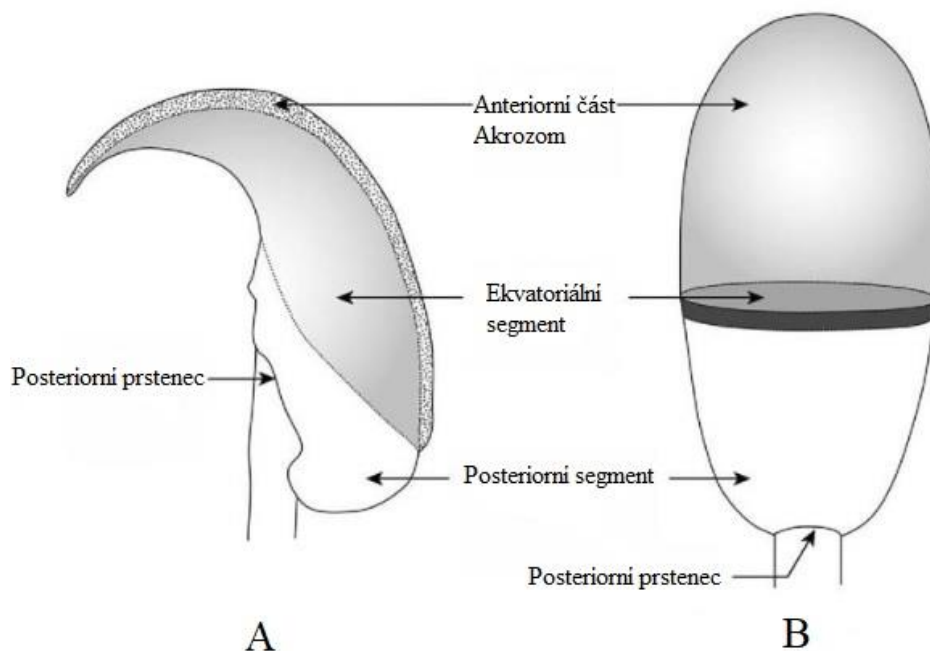
### 3.1 Morfologie pohlavních buněk

#### 3.1.1 Obecná stavba spermie

Spermie je haploidní samčí gameta (pohlavní buňka), schopná pohybu. Jedná se o specializovanou buňku sloužící k jedinému účelu: oplodnit samičí gametu (vajíčko) a přenést svoji genetickou informaci do další generace. Spermii rozdělujeme na hlavičku, krček a nejdelší část spermie bičík, který se dále dělí na několik dalších částí. Jak bude popsáno níže, velikostí i stavbou se od sebe spermie druhově liší.

##### 3.1.1.1 Hlavička spermie

Jedním z nejvýraznějších morfologických rozdílů mezi spermii různých druhů je tvar hlavičky. Hlavičku spermie savců můžeme rozdělit do několika málo skupin: (1) kulaté, které nalezneme například u primátů včetně člověka; (2) oválné, vyskytující se u kance; (3) falciformní – ve tvaru háčku – nacházející se u některých skupin hlodavců; a konečně (4) hlavičky s velkým akrozomem, které nalezneme například u veverek (Dvorakova et al. 2005). Jak můžeme vidět na obrázku č. 1, na hlavičce spermie rozlišujeme tři části: část anteriorní, nazývanou také apikální akrozom (AA), ekvatoriální segment (ES) a posteriorní segment (PS) (Fawcett 1975).



**Obrázek 1: Hlavička spermie (převzato a upraveno dle Eddy 2006)**

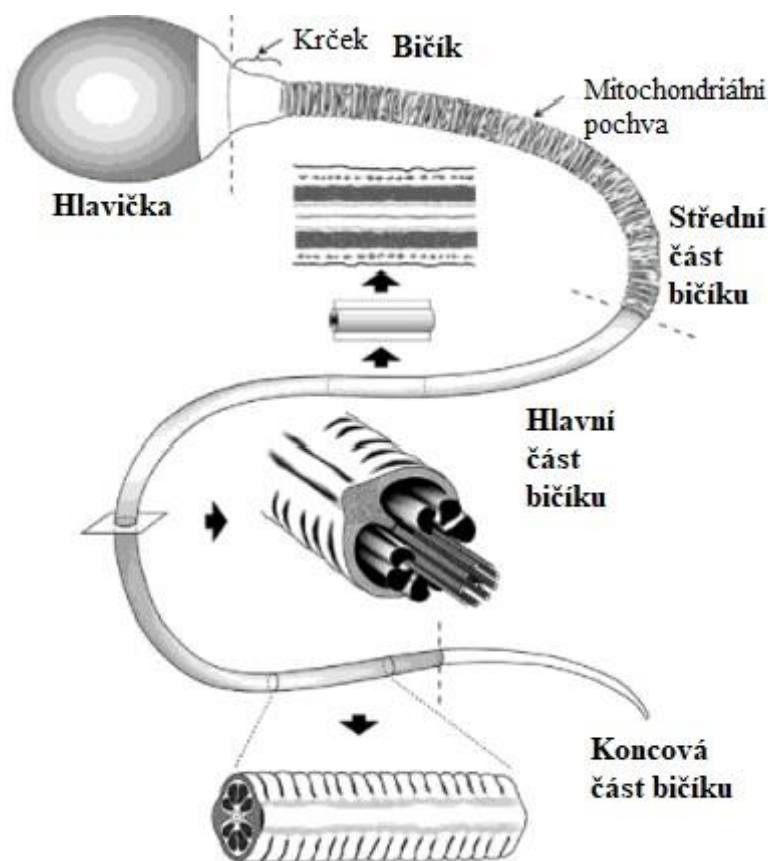
A – falciformní tvar hlavičky; B – oválný tvar hlavičky

Hlavička spermie obsahuje dvě důležité organely – jádro a akrozomální váček, také nazývaný akrozom. Zploštělé jádro je nositelem genetické informace a obsahuje vysoce kondenzovaný chromatin, zahrnující DNA a protaminy. K postupné stabilizaci chromatinu dochází pomocí nahrazení chromozomálních histonů za protaminy a vytvoření disulfidických vazeb. Cílem této jaderné přestavby je usnadnění pohybu spermie díky snížení jaderného obsahu, ale také ochrana genomu před poškozením. Ke kondenzaci chromatinu dochází během spermatogeneze, neboli vývoje samčích pohlavních buněk (Fawcett 1975; Talebi et al. 2013).

Druhou již zmíněnou organelou je akrozomální váček, hrající velmi důležitou roli během vazby spermie na vajíčko. Nezbytnost akrozomálního váčku plyne z výzkumů, které demonstrují, že samci lidí (Schill 1991; Dam et al. 2007) a myši (Sotomayor & Handel 1986; Kang-Decker 2001) nesoucí mutaci genu pro tvorbu akrozomu jsou neplodní či subfertilní. Akrozom je sekreční organela, odvozená od Golgiho aparátu. Připomíná buněčný lysozom, a to mimo jiné proto, že obě organely obsahují základní enzymy. Jedná se např. o proteázy, kyselý fosfatázy či esterázy (Tang et al. 1982; Tulsiani et al. 1998). I přes podobu s lysozomem má akrozomální váček svá specifika. Můžeme ho rozdělit na větší anteriorní část a rovníkovou část neboli ekvatoriální segment. Akrozomální váček je ohraničen jednou membránou, která se dále dělí na dvě části: (1) vnější akrozomální membránu (OAM) a (2) vnitřní akrozomální membránu (IAM). Vnější akrozomální membrána se vyskytuje pod plazmatickou membránou, situovanou po celém povrchu spermie; plazmatická membrána a vnější akrozomální membrána spolu dále interagují během akrozomální reakce (AR) za vzniku hybridních váčků. Vnitřní akrozomální membrána obklopuje jadernou membránu (Austin & Bishop 1958; Berruti 2016).

### 3.1.1.2 Bičik spermie

Bičik je buněčná struktura umožňující motilitu spermie. Hlavním úkolem této organely je dostat spermii v samičím reprodukčním traktu k vajíčku, aby mohlo dojít k jeho oplození. Bičik spermie zahrnuje několik částí. Jedná se o spojovací, střední, hlavní a koncovou část (viz obrázek č. 2). Spojovací část propojuje hlavičku s bičíkem spermie a spíše je známá pod pojmem krček. Energie pro pohyb spermie je zajišťována díky mitochondriím, které se vyskytují v mitochondriální pochvě ve středním segmentu bičíku. Střední část je tvořena axonemou, která tvoří osu bičíku až k jeho koncové části. Axonema je soubor osových vláken, sestávající se z devíti dvojic (dubletů) periferních mikrotubulů, které jsou rozmístěny soustředně kolem dvou centrálních mikrotubulů (Eddy 2006; Gaffney et al. 2011). Spojení mezi dublety se skládají z vnitřních a vnějších dyneinových ramen s ATPázovou aktivitou a představují hlavní hnací motor spermie. Mezi centrálním párem a periferními mikrotubuly nalezneme jinou vazbu: radiální paprsky (Cosson 1996).



Obrázek 2: Schéma spermiu (převzato a upraveno dle Eddy 2006)

### 3.1.2 Obecná stavba oocyty

Oocyt je haploidní pohlavní buňka, tvořená ve vaječníku samice během procesu nazývaného oogeneze, který se skládá ze dvou po sobě jdoucích meiotických dělení. Oocyt je kulovitého tvaru, vyplněný cytoplazmou neboli ooplazmou, ve které se nachází jádro uložené v jaderném obalu a další organely, jako např. mitochondrie či endoplazmatické retikulum. Cytoplazmu obklopuje plazmatická membrána (*oolemma*), kterou dokola pokrývá *zona pellucida*. Mezi těmito dvěma vrstvami se nachází periviteliní prostor. *Zona pellucida* je glykoproteinový obal oocyty, jež má několik významných funkcí během oplození, jako je např. vazba spermiu na vajíčko, indukce akrozomální reakce nebo blokáce polyspermie. *Zona pellucida* je radiálně obklopena folikulárními buňkami (tzv. granulózními buňkami), v jejichž cytoplazmě byly zjištěny glykoproteiny, ze kterých je *zona pellucida* složena. Folikulární buňky se okolo glykoproteinového obalu vyskytují ve dvou až třech vrstvách, přičemž první vrstva, jež těsně přiléhá k oocyty, se nazývá *corona radiata*. Funkce folikulárních buněk spočívá ve výživě a ochraně oocyty (Gilula 1978; Wassarman et al. 1999; Paulini et al. 2014).

Oocyt je ovulován s ukončeným prvním meiotickým dělením a vyděleným pólovým tělískem. Druhé meiotické dělení oocyty je ukončeno oplozením, kdy dochází k vydělení druhého pólového tělíska (Hafez & Hafez 2000).

## 3.2 Vývoj a zrání spermie

Tvorba mužských pohlavních buněk probíhá procesem nazývaným spermatogeneze. U samců na rozdíl od samic začíná vývoj gamet až postnatálně a vyskytuje se nepřetržitě po celé reprodukční období. Celý proces tvorby spermií probíhá v semenotvorných kanálcích varlete, přičemž začíná na periférii a postupuje směrem k lumen kanálku (Garner & Hafez 2000).

Vytvoření zralé spermie pomocí spermatogeneze spočívá v opakovaném mitotickém dělení spermatogoniálních kmenových buněk, dále dvou na sebe navazujících meiotických dělení a morfologické přeměně haploidních spermatid. Na základě těchto událostí můžeme spermatogenezi rozdělit na spermatocytogenezi a spermiogenezi (nazývanou také spermatohistogeneze). Princip tvorby spermií spočívá v několikanásobném rozdělení kmenových buněk za vzniku spermatocytů, které následně podléhají meióze I a II a jejichž genetický materiál se sníží na polovinu. Tyto děje včetně začáteční mitózy označujeme jako spermatocytogenezi. Jejím výsledkem jsou spermatidy, které jsou již díky meióze haploidní. Spermatidy poté prochází procesem zvaným spermiogeneze, kde nastává řada morfologických změn. Výsledkem jsou spermie, které podléhají epididymální maturaci a jsou následně uloženy v epididymis (Garner & Hafez 2000; Hess & de Franca 2008).

### 3.2.1 Spermatocytogeneze

Spermatocytogeneze je zahájena na začátku reprodukčního období samce, kdy gonocyty podléhají diferenciaci a vznikají spermatogonie typu A. Gonocyty jsou několikrát mitózou rozdělené primordiální buňky, které domigrovaly ze zárodečného vaku do místa budoucích gonád. Pomocí několika po sobě jdoucích mitotických dělení vzniká ze spermatogonie typu A spermatogonie typu B. Mitotické dělení různých stádií spermatogonií zajišťuje zachování počtu buněk, ze kterých se dále znovu budou vyvíjet spermie. Spermatogonie typu B se opět pomocí mitózy rozdělí za vzniku primárního spermatocytu, u kterého dochází k syntéze DNA, a můžeme o něm tedy říci, že je tetraploidní. Primární spermatocyt ( $4n$ ) vstupuje do meiózy, kde dochází k redukčnímu dělení na sekundární spermatocyty ( $2n$ ). Sekundární spermatocyty již bez syntézy DNA vstupují do druhého redukčního dělení a stávají se z nich haploidní spermatidy (Bellve 1977; Garner & Hafez 2000; Hess & de Franca 2008).

### 3.2.2 Spermiogeneze (spermatohistogeneze)

Spermatidy, mající kruhový tvar, nyní musí projít řadou transformací na protáhlé a vysoce kondenzované spermie. Jedná se např. o vznik akrozomu díky produkci granul a váčků z Golgiho aparátu, které spolu fúzí a vytvoří tak jediný váček v anteriorní části hlavičky spermie. Dále dochází ke kondenzaci jaderného chromatinu, díky němuž dochází ke zploštění hlavičky spermie. Nadbytečná cytoplazma je vylučována ve formě cytoplazmatické kapky. Další důležitý děj je tvorba bičíku spermie, jenž se vytváří na opačném konci než akrozomální váček. Jako základ bičíku migruje proximální centriola co nejbližší jádru do místa, kde je předpokládáno připevnění bičíku k hlavičce. Celou spermiogenezi můžeme rozdělit podle vývojových stádií spermatid na: (1) Golgiho fázi, (2) fázi čepičky, (3) akrozomální fázi



a (4) fázi zrání. Po dokončení jsou spermie uvolňovány do lumen semenotvorných kanálků. Tento proces se nazývá spermiace (Garner & Hafez 2000; Hess & de Franca 2008).

### 3.2.3 Epididymální maturace

Spermie uvolněné po ukončení spermiogeneze do lumen semenotvorných kanálků jsou pasivně unášeny do epididymu (nadvarlete), kde jsou při jejich průchodu epididymem vystaveny specifickým podmínkám a dochází zde k postgonadální diferenciaci spermií. Jedná se o nezbytný a velmi složitý proces ve vývoji plodných spermií. Zrání testikulárních spermií v podmínkách *in vitro* zatím nebylo úspěšné. Díky průchodu epididymem jsou spermie později schopné projít kapacitací, akrozomální reakcí a navázat se na *zona pellucida* vajíčka. Epididymis se skládá ze tří částí. První část, kde dochází k resorpci tekutin ze semenotvorných kanálků, a tudíž ke zvýšení koncentrace spermií, se nazývá hlava. Dalšími částmi, kde následně dochází ke zpětnému toku tekutin a koncentrace je opět mírně snížena, jsou tělo a ocas (Dacheux et al. 2005; Dacheux et al. 2016).

Změny, které jsou patrné během zrání, se týkají složení cytolazmatické membrány pokrývající spermii. Pomocí proteomických studií bylo zjištěno, že během průchodu epididymem testikulární spermie nejen získávají, ale také ztrácí povrchové proteiny. Ke ztrátě značného podílu testikulárních povrchových proteinů dochází kvůli proteolytické aktivitě v první části nadvarlete (Dacheux et al. 2016). Ve většině případů dochází právě proteolytickou aktivitou ke štěpení cílových proteinů na podjednotky, které poté mohou být lokalizovány v jiných povrchových doménách nebo mohou být částečně či úplně uvolněny z povrchu spermie (Phelps et al. 1990; Métayer et al. 2002).

Druhou modifikací spermatické membrány je výskyt nových povrchových proteinů. Počty nově vyskytujících se proteinů jsou však nižší než počty proteinů, které jsou během epididymální maturace ztraceny. Proces získávání nových proteinů by mohl být spojen s epididymosomy, které do spermie mohou přenášet i jiné molekuly – např. fragmenty tRNA (Dacheux et al. 2016; Sharma et al. 2016).

Epididymosomy jsou kulovité extracelulární vezikuly v rozměru 50 – 250 nm nacházející se v epididymální tekutině. Byly již popsány u několika druhů hlodavců (Rejraji et al. 2006; Griffiths et al. 2008; Grimalt et al. 2009), býků (Frenette & Sullivan 2001; Frenette et al. 2002), beranů (Ecroyd et al. 2004) i lidí (Thimon et al. 2008). Yanagimachi et al. (1985) poprvé popsali epididymosomy u křečka jako mikrokuličky, které jsou v těsném kontaktu se spermii během epididymální maturace, a předpokládali, že jejich funkce spočívá ve stabilizaci membrány díky těmito vezikuly přenášenému cholesterolu.

Epididymosomy zahrnují heterogenní populaci vezikulů s průměry uvedenými v předchozím odstavci. Jednotlivé vezikuly se liší právě dle velikosti. Jedním z typů těchto vezikulů jsou exosomy, které obsahují protein CD9 a mezi nimiž a spermii dochází k fúzi membrán, čímž jsou tyto exosomy schopné výměny proteinů i lipidů s různými typy buněk (Caballero et al. 2013; Sullivan 2016). Dále se v exozomech různých buněčných typů nacházejí další členové tetraspaninové proteinové rodiny – např. CD63, CD81, CD82 a také již zmíněný protein CD9 (Théry et al. 2002).

Heterogenní populace extracelulárních vezikulů se nachází také v semenné plazmě ejakulátu. Barranco et al. (2019) ve své studii pomocí ultracentrifugace vyizolovali ze semenné plazmy praset dva typy extracelulárních vezikulů, přičemž v obou typech byly přítomné tetraspaniny CD9, CD63 a CD81.

V epididymis dochází také k přeměně nepohyblivých spermii na spermie motilní s progresivním pohybem vpřed. Cytoplazmatická kapka, která je u ejakulovaných spermii známkou nezralosti, se během průchodu epididymem posouvá z oblasti krčku směrem ke střední části bičíku až do své ztráty (Garner & Hafez 2000; Dacheux et al. 2005; Dacheux et al. 2016).

A konečně epididymis funguje také jako úložiště spermii a zachovává je životaschopné. Tato funkce je zajišťována inhibicí motility. Té je dosaženo pomocí snížení metabolismu spermii, pro kterou je nezbytné snížení teploty, nízký obsah kyslíku v epididymální tekutině a změna pH. Narušení některé z těchto potřeb může vést k poruchám plodnosti (Garner & Hafez 2000; Dacheux et al. 2005; Dacheux et al. 2016).

### 3.3 Kapacitace

Před více než 60 lety nezávisle na sobě Austin (1951; 1952) a Chang (1951) popsali na spermii změny nezbytné pro oplození vajíčka. Soubor těchto změn pojmenovali kapacitace.

Kapacitace je řada intracelulárních biochemických a fyziologických modifikací probíhajících ve spermii během průchodu samičím reprodukčním traktem. Tyto změny spermie podstupuje za účelem navázání se na vajíčko a jeho následné oplození. Pouze kapacitované spermie jsou schopny reagovat na induktory AR a následně ji podstoupit (De Jonge 2005; Hernández-González et al. 2006).

Změny, které proces kapacitace pojímá, se zpočátku týkají zejména vyvázání cholesterolu z plazmatické membrány spermie (jinak nazýváno také jako cholesterolový eflux), což má za následek zvýšení membránové fluidity a propustnosti pro hydrogenuhličitanové ( $\text{HCO}_3^-$ ) a vápníkové ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ionty, jejichž koncentrace se tímto zvyšují. Dochází také k hyperpolarizaci plazmatické membrány. Díky rostoucím hladinám  $\text{HCO}_3^-$  a  $\text{Ca}^{2+}$  se zvyšuje hladina intracelulárního pH, což má za následek navýšení koncentrace cyklického adenosin monofosfátu (cAMP), jenž aktivuje proteinkinázu A (PKA). Tyto děje vedou k fosforylaci některých proteinů spermie, a to především k fosforylaci tyrozinových zbytků. Kapacitace v poslední řadě zahrnuje také změnu motility spermie. Tato změna se označuje jako hyperaktivace (De Jonge 2005; Hernández-González et al. 2006; Alonso et al. 2017).

### 3.4 Akrozomální reakce

Akrozomální reakce je děj závislý na vápníkovém influxu, díky kterému dochází k exocytóze akrozomálního váčku. Tento děj je nezbytný pro pozdější interakce spermie s vajíčkem. Během AR dochází k vícenásobné fúzi vnější akrozomální membrány s plazmatickou membránou pokrývající spermii. Přes fúzní póry se do extracelulárního prostoru dostává akrozomální obsah (např. akrozin a další lytické enzymy), díky čemuž je štěpen glykoproteinový obal vajíčka *zona pellucida* a spermie je schopna jím prostoupit (Sosa et al. 2015).

V *zona pellucida* se nacházejí tzv. ZP glykoproteiny, díky kterým se následně spermie může na vajíčko specificky navázat. Počet těchto glykoproteinů je druhově rozdílný. Ve valné většině se jedná o tři glykoproteiny [např. u myši (Wassarman 1988), býka (Noguchi et al. 1994) či prasete (Hedrick & Wardrip 1987; Gupta & Bhandari 2010; Yonezawa et al. 2012)], ale např. u člověka nalezneme i čtvrtý glykoprotein (Lefievre 2004; Chiu et al. 2008).

Jako iniciátor AR je označován glykoprotein ZP3, na který se spermie naváže. Tímto krokem jsou aktivovány signální kaskády vedoucí ke zvýšení intracelulárních vápenatých iontů, a následně pak spermie podstoupí AR. Jin et al. (2011) publikovali studii, v níž ukázali, že myší spermie jsou schopné projít AR již během průchodu kumulárními buňkami obklopujícími vajíčko a jejich fertilitní schopnost přitom zůstává stejná. Jako kandidát pro indukci AR před kontaktem spermie se *zona pellucida* je progesteron, který je sekretován právě kumulárními buňkami. Již před několika desítkami let se progesteron uváděl jako možný induktor AR u lidí (Osman et al. 1989). Oproti studii od Jin et al. (2011) uvádí Tanihara et al. (2014), že u prasat jsou hlavním induktorem AR ZP glykoproteiny; stejně tomu je u člověka (Gupta 2018).

Indukovat AR lze také *in vitro* přidáním fyziologického induktoru, jímž může být již výše zmiňovaný progesteron, folikulární tekutina či kyselina hyaluronová, anebo přidáním nefyziologického induktoru, jako je např. *calcium ionophor* (Liu & Baker 1998; Gupta & Bhandari 2010). U spermii může docházet ke spontánní AR, tedy bez přidání jakéhokoliv induktoru. Spermie, které prošly spontánní AR, jsou schopné bez obtíží oplodnit vajíčko bez *zona pellucida* (Inoue et al. 2003). Inoue et al. (2003) ve své studii také uvádí, že je za zvýšenou míru spontánní AR zodpovědný protein CD46. CD46 knock-out myši měly vyšší výskyt spontánní AR než kontrolní skupina. Deficiencí proteinu CD46 může být ovlivněna distribuce membránových proteinů, které mohou asociovat s CD46 [např. některé  $\beta$ 1 integriny (Lozahic et al. 2000)], což vede ke změně chování iontových kanálů. Zvyšuje se hladina cytoplazmatického vápníku, a může tedy dojít k AR. Předpokládá se, že hlavní funkcí proteinu CD46 je stabilizace akrozomální membrány. Nepřítomnost tohoto proteinu může vést k rychlejšímu rozpadu aktinových sítí, a tím pádem i k vyššímu výskytu spontánní AR (Inoue et al. 2003; Frolikova et al. 2012).

### 3.5 Vazba spermie na oocyt

Vazba spermie na vajíčko je počátečním krokem samotného oplození. Jak již bylo v předchozí kapitole zmíněno, spermie je schopna se specificky navázat na vajíčko díky ZP glykoproteinům (ZP1 – ZP4, a to dle druhu savce) na *zona pellucida*. Tyto glykoproteiny jsou silně glykosylované s N- a O-vázanými glykany, které mají důležitou roli právě při interakci ZP a spermie.

Specifická vazba spermie na ZP je zprostředkována receptorem a ligandem, jež jsou exprimovány na povrchu spermie a ZP vajíčka. Díky studiím Bleila a Wassarmana (1980a; 1980b; 1989) víme, že ZP3 působí jako primární ligand a u mnoha savců je iniciátorem AR. Neplatí to však u všech savčích druhů. Připomeňme si např. výše zmíněnou studii na myších, kterou provedli Jin et al. (2011), a která poukazuje na indukci AR u myši již během průchodu spermii kumulárními buňkami vajíčka. ZP3 u myši zůstává jako iniciátor AR *in vitro* a jako iniciátor *in vivo* byl navržen progesteron, jenž je kumulárními buňkami sekretován a v minulosti byl v souvislosti s touto funkcí či podporou AR již diskutován i u jiných savčích druhů (Osman et al. 1989; Melendrez et al. 1994; Meyers et al. 1995; Meizel et al. 1997; Therien 2003; Jin et al. 2011).

Glykoprotein ZP2 se váže na vnitřní akrosomální membránu, a proto se zdá, že působí jako sekundární ligand. Předpokládá se také, že se ZP2 podílí na prevenci proti polyspermii, a to pomocí proteolytického štěpení ZP2 na formu ZP2f, ke kterému dochází díky ZP2 proteináze, uvolněné z kortikálních granul během kortikální exocytózy. Změna ZP2 na ZP2f inhibuje vazbu ostatních spermii na *zona pellucida* (Bleil & Wassarman 1980b; Moller & Wassarman 1989; Mortillo & Wassarman 1991).

Jak uvádí Reid et al. (2010) původní model vazby spermie na vajíčko popisoval pouze jednoduchou vazbu dvou molekul – jednoho receptoru a jednoho ligandu. Dnes máme identifikovaných řadu kandidátních molekul na hlavičce spermie, které mohou hrát roli receptoru během této specifické vazebné události (Reid et al. 2010). Vzhledem k tomu, že tyto proteiny nejsou předmětem zkoumání této práce, budou krátce uvedeny jen některé z nich.

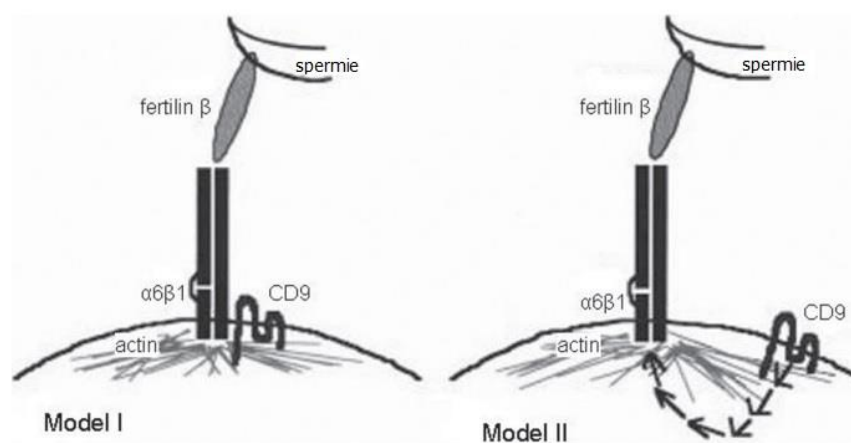
Mezi proteiny na straně spermie, zodpovědné za vazbu na ZP, patří: membránový protein  $\beta$ -1,4-galaktosyltransferasa (GalTase), přičemž stojí za zmínku, že GalTase deficientní myši se vyznačují subfertilitou (Lu & Shur 1997); intraakrosomální lektin sp56, označovaný jako ZP3R (Buffone et al. 2008); proteiny prasečí semenné plazmy spermadhesiny (Rodríguez-Martínez et al. 1998); myší protein SED-1 (Ensslin & Shur 2003); či transmembránový protein zonadhesin, který byl jako první popsán na prasečí spermii (Gao & Garbers 1998).

### 3.6 Fúze spermie a oocyty

Poté, co spermie pomocí lytických enzymů, obsažených v akrozomu, prostoupí glykoproteinovým obalem vajíčka, dochází k další interakci mezi gametami. Než dojde k samotné fúzi gamet je velmi důležitá vazba spermie na oolemu – plazmatickou membránu vajíčka.

Bylo zjištěno, že pro vazbu na oolemu jsou velmi důležití členové proteinové membránové rodiny ADAM (a disintegrin and metalloproteinase), především pak ADAM1 (fertilin  $\alpha$ ) a ADAM2 (fertilin  $\beta$ ). Jedná se o rodinu integrálních membránových proteinů, obsahujících dezintegrinovou a metaloproteázovou doménu. Samci myši s deficitem některého z těchto proteinů mají zhoršenou vazbu spermií na plazmatickou membránu vajíčka (Cho et al. 1998; Nishimura et al. 2001).

Jako potenciální partneři pro fertilin  $\alpha$  a fertilin  $\beta$  jsou uváděny integriny obsažené v plazmatické membráně vajíčka (Rubinstein et al. 2006a). Podle studie Chena et al. (1999) protein CD9 usnadňuje vazbu fertilinu  $\beta$  (ADAM2) na  $\alpha 6\beta 1$  integrin, díky čemuž je spermie schopná navázat se na oolemu, a podstoupit tak fúzi s vajíčkem. Pro roli proteinu CD9 ve vazbě fertilinu  $\beta$  a  $\alpha 6\beta 1$  integrinu byly vytvořeny dva modely (viz obrázek č. 3). První model znázorňuje vazbu fertilinu  $\beta$  na  $\alpha 6\beta 1$  integrin, jež je přítomný v plazmatické membráně oocyty, kde je vázán na aktinový cytoskelet a spojen s tetraspaninem CD9. V druhém modelu nedochází k fyzickému spojení  $\alpha 6\beta 1$  integrinu a CD9. CD9 tak nepřímou ovlivňuje spojení  $\alpha 6\beta 1$  integrinu s aktinovým cytoskeletem, čímž dochází také k ovlivnění způsobilosti  $\alpha 6\beta 1$  integrinu vázat fertilin  $\beta$ .



**Obrázek 3: Modely pro roli CD9 ve vazbě fertilinu  $\beta$  na integrin  $\alpha 6\beta 1$**  (převzato a upraveno dle Fábryová & Simon 2009)

V modelu I se fertilin  $\beta$  (ADAM2) váže na  $\alpha 6\beta 1$  integrin v plazmatické membráně vajíčka, který je fyzicky spojen s CD9 a vázán na aktinový cytoskelet. V modelu II se fertilin  $\beta$  váže na integrin  $\alpha 6\beta 1$ , který je vázán na aktinový cytoskelet – CD9 nepřímou ovlivňuje asociaci  $\alpha 6\beta 1$  integrinu s aktinovým cytoskeletem, a tudíž i jeho schopnost vázat fertilin  $\beta$  (Chen et al. 1999).

Integriny byly v minulosti považovány za hlavní kandidáty hrající roli během fúze gamet. Avšak He et al. (2003) ukázali, že integriny jsou postradatelné a že myši s vyblokovánými podjednotkami  $\alpha 6$  a  $\beta 1$  integrinem jsou zcela plodné. Bylo tedy potřeba nalézt jiné molekuly, jež by během fúze gamet měly stěžejní roli.

Pro tuto roli byl navržen protein Izumo 1. Původně byl označován jako antigen rozpoznávaný monoklonální protilátkou OBF13 (Okabe et al. 1987), nakonec ovšem dostal jméno po japonské svatební svatyni (Inoue et al. 2005). Jedná se o transmembránový protein imunoglobulinové rodiny, jenž obsahuje jednu extracelulární imunoglobulinovou (Ig) doménu a N-koncovou oblast, která je důležitá pro vazbu na oolemu. Izumo 1 byl ze své proteinové rodiny popsán jako první a je exprimován výhradně ve varlatech. Přítomen je ve zralých spermích, kde je detekován až po AR. Proteinová rodina Izumo zahrnuje ještě další tři členy (Izumo 2-4). Izumo 2 a 3 jsou stejně jako první člen exprimovány ve varlatech, kdežto Izumo 4 je kromě varlat exprimován také v dalších tkáních. Všichni členové této rodiny mezi sebou vykazují určitou homologii (Ellerman et al. 2009).

Když Inoue et al. (2005) vytvořili myši s vyblokováním proteinem Izumo 1, samice zůstaly plodné, ale samci vykazovali sterilitu. Spermie těchto samců byly sice schopné projít AR, navázat se na *zona pellucida* a dostat se až do perivitelinního prostoru vajíčka, ovšem žádná spermie nedokázala fúzovat s vajíčkem. Jakmile byly pro kontrolu tyto spermie vneseny do cytoplazmy vajíčka pomocí intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI), byla vajíčka úspěšně aktivována a následně přenesena do pseudoplodných samic, kde se v pořádku implantovala. Je tedy zřejmé, že spermatický protein Izumo 1 je zásadní pro fúzi gamet (Inoue et al. 2005).

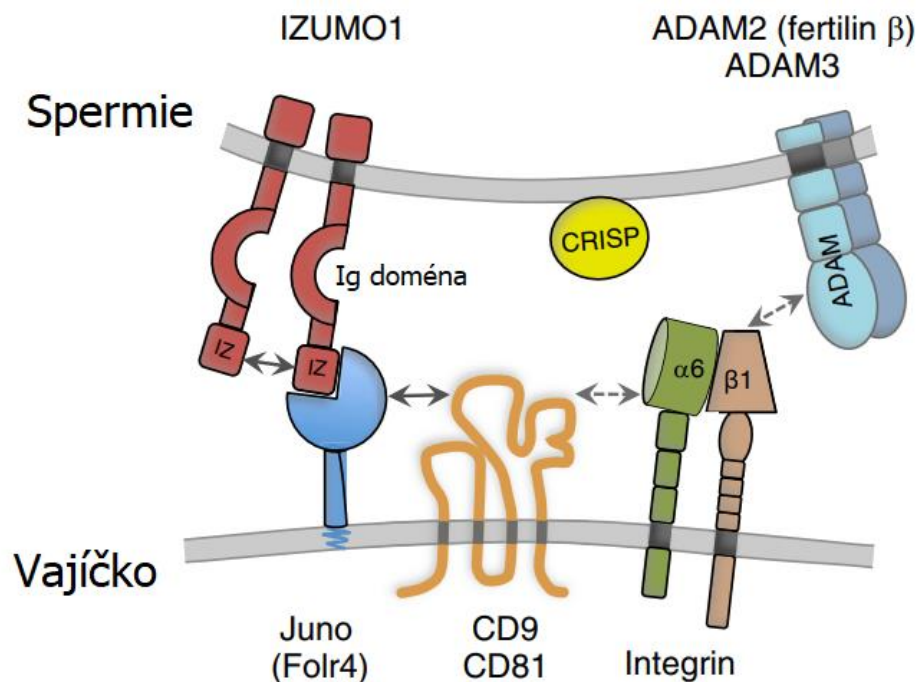
Třebaže se zdálo velmi pravděpodobné, že pro Izumo 1 se na vajíčku bude nacházet vazebný partner, úspěšně popsán byl až v roce 2014. Podle římské bohyně plodnosti a manželství byl tento folátový receptor (Folr4) pojmenován Juno. Je to GPI-ukotvený protein, exprimovaný na povrchu vajíčka (Bianchi et al. 2014).

Pro zjištění úlohy receptoru Juno během oplození byla zprvu použita monoklonální protilátka anti-Juno. Ta blokuje interakci mezi Izumo 1 a Juno a po její aplikaci k oplození opravdu nedocházelo. Byly také vytvořeny Juno deficiční myši, které i přes několika měsíční páření s wild-type samci byly neplodné. Z těchto zjištění je tedy patrné, že interakce mezi Izumo a Juno je pro oplození esenciální. Je také velmi pravděpodobné, že Juno hraje roli i během blokace polyspermie, která nastává krátce po oplození. Pro platnost této teorie svědčí zjištění, že se tento folátový receptor brzy po oplození uvolňuje z vaječné membrány. Ačkoli je ale interakce Izumo 1 s Juno nezbytná během adheze spermie na oolemu, samotná fúze následkem této interakce není (Bianchi et al. 2014).

Během adheze spermie na oolemu je důležitý také vaječný protein CD9, který vytváří cis asociace s receptorem Juno, a proto byl navržen jako jeho partner. Vzhledem ke schopnosti CD9 organizovat další membránové proteiny na povrchu oolemy (např. integriny – viz obrázek č. 3) se zdá, že CD9 má roli i během organizace receptoru Juno. CD9 se hromadí v místě adheze spermatického proteinu Izumo1 s jeho receptorem Juno na oocytu a dále laterálně interaguje s dalšími membránovými proteiny na vajíčku (Dresselhaus et al. 2016). Není však esenciální pro asociaci mezi Izumo 1 a Juno (Chalbi et al. 2014). Několik laboratoří vytvořilo CD9 knock-out myši a výsledkem byly samice s těžkou subfertilitou a sníženou schopností fúze spermí s vajíčkem, kdežto samci při páření s wild-type samicemi vykazovali zcela normální plodnost (Kaji et al. 2000; Le Naour et al. 2000; Miyado et al. 2000).

Dalším proteinem, jenž hraje roli během fúzního procesu spermie s vajíčkem, je CD81, který je v aminokyselinové sekvenci úzce homologní s proteinem CD9. Stejně jako samice s vyblokováním CD9 proteinem, tak i samice mající CD81 knock-out vykazují subfertilní fenotyp se sníženou schopností fúze spermií s vajíčkem. U samic s vyblokováním proteinem CD81 je však subfertilita nižší než u CD9 knock-outu. Spermie s deficitem CD81 jsou plodné (Rubinstein et al. 2006b; Tanigawa et al. 2008). U dvojitého knock-outu, tedy vyblokování jak CD9, tak CD81, došlo k úplné neplodnosti (Rubinstein et al. 2006b).

Jak můžeme vidět na obrázku č. 4, do interakce gamet je v neposlední řadě též zapojena sekreční proteinová rodina bohatá na cystein CRISP (Cysteine-Rich Secretory Proteins). Zapojuje se nejen do fúze gamet, ale také např. do kapacitace či vazby na ZP. Rodina CRISP obsahuje čtyři členy: CRISP1 – 4. Během fúze gamet je důležitý CRISP1, který má na vajíčku komplementární vazebná místa (Busso et al. 2007a), CRISP2 interagující se stejnými místy na vajíčku jako CRISP1 (Busso et al. 2007b) a CRISP4, který byl identifikován pouze na myších spermiích (Jalkanen et al. 2005). O funkcích CRISP3 v reprodukčních procesech bylo zatím zjištěno velmi málo.



Obrázek 4: Schéma proteinů zapojených do fúze gamet (převzato a upraveno dle Dresselhaus et al. 2016)

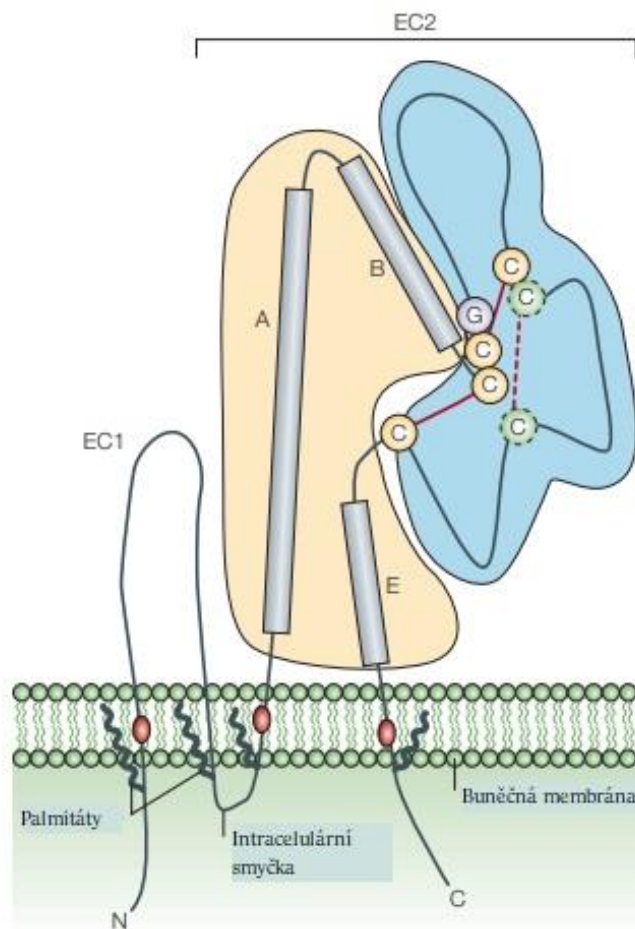
### 3.7 Tetraspaniny a jejich role v reprodukci

Tetraspaninová proteinová nadrodina je známá také pod názvem transmembránová 4 nadrodina (TM4SF). Je to rozsáhlá skupina ubikvitně exprimovaných povrchových proteinů obsahující glykosylované oblasti. Podílejí se na řadě normálních i patologických buněčných procesů jako např. na buněčné signalizaci, imunitní reakci, diferenciaci hematopoetických kmenových buněk, proliferaci, buněčné migraci, metastázy nádorových buněk či fúzi spermií s vajíčkem (Berditchevski & Odintsova 1999; Boucheix & Rubinstein 2001; Hemler 2005).

Tetraspaninovou nadrodinu lze evolučně rozdělit do čtyř subrodin: CD, CD63, uroplakinová a RDS rodina. Tetraspaniny, o kterých bude dále blíže pojednáno v této diplomové práci (CD9, CD81 a CD151) patří do CD rodiny, a to spolu s CD37, CD53 a CD82 (Garcia-España et al. 2008).

Tetraspaniny jsou charakterizovány čtyřmi transmembránovými doménami, dvěma extracelulárními smyčkami – malou smyčkou, dlouhou 20–28 aminokyselin, a velkou extracelulární smyčkou, dlouhou 76–131 aminokyselin – a velmi krátkou intracelulární smyčkou (viz obrázek č. 5), dlouhou typicky čtyři aminokyseliny. Velká extracelulární smyčka obsahuje konstantní oblast obsahující  $\alpha$ -helixy a variabilní oblast, kde se vyskytují místa pro interakce protein–protein. Na tomto základě se předpokládá, že velká extracelulární smyčka zprostředkovává většinu tetraspaninových intermolekulárních interakcí s jinými proteiny. Konce extracelulárních smyček tvoří N-terminální a C-terminální konce. Pro tetraspaniny je charakteristický motiv Cys-Cys-Gly (CCG) a dále čtyři až osm konzervovaných cysteinů tvořících disulfidové vazby. Velká většina tetraspaninů obsahuje membránové palmitoylované cysteiny. Jedná se o posttranslační modifikaci, kdy je k cysteinovým zbytkům kovalentně připojen palmitát (kyselina palmitová). Palmitoylace je důležitá pro tvorbu mikrodomén v membráně obohacených o tetraspanin (TEM) a přispívá k organizaci interakce s jinými tetraspaniny (Berditchevski & Odintsova 1999; Boucheix & Rubinstein 2001; Hemler 2005; Kovalenko et al. 2005; Andreu & Yáñez-Mó 2014; Jankovicova et al. 2016).





**Obrázek 5: Struktura tetraspaninů** (převzato a upraveno dle Hemler 2005)

EC1 – malá extracelulární smyčka; EC2 – velká extracelulární smyčka; A, B, E –  $\alpha$ -helixy v konstatní (žluté) oblasti; červenými čarami jsou znázorněny disulfidové vazby mezi konzervovanými cysteiny ve variabilní (modré) oblasti.

První tetraspaniny byly objeveny na povrchu lidských bílých krvinek – leukocytů. Rychle po jejich objevení byla zjištěna široká tkáňová exprese těchto proteinů, především tetraspaninů CD9, CD81 a CD151 (Boucheix & Rubinstein 2001; Halova & Draber 2016). S výjimkou erytrocytů jsou tetraspaniny exprimovány všemi buněčnými typy (Boucheix & Rubinstein 2001). Jelikož expresi některých tetraspaninů nalzáme i u bezobratlých (např. *Caenorhabditis elegans*), můžeme předpokládat, že se tyto molekuly v průběhu evoluce vyvinuly brzy (Tomlinson & Wright 1996).

Velmi významnou vlastností tetraspaninů je schopnost tvořit multimolekulární komplexy, a to jak s jinými členy tetraspaninové rodiny, tak i s jinými běžnými transmembránovými molekulami, jako např. s integriny. Ukázalo se také, že jsou schopny pojit se s mnoha dalšími povrchovými molekulami, a vytvářet tak mikrodomény obohacené o tetraspanin (TEM), jinak nazývané jako tetraspaninová síť. Díky tomu mohou tetraspaniny regulovat např. integrin-dependetní migraci buněk (Hemler 2005).

Tetraspaninová síť je tvořena interakcemi třech úrovní: první (primární), druhé (sekundární) a třetí (terciární).

Jako interakce primární se označuje kovaletní propojení tetraspanin-tetraspanin či tetraspanin-partner (jako partner je chápána jiná molekula než tetraspanin, se kterou jsou tetraspaniny schopny vytvářet komplexy, např. již zmíněný integrin) za vzniku primárního komplexu. Tyto asociace můžeme ještě rozlišit na homofilní zesílení (např. CD9–CD9) a heterofilní zesílení (CD81–CD151 nebo CD151– $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin). Právě pomocí heterofilního zesílení lze prostřednictvím tetraspaninů přijímat partnerské proteiny do multimolekulárních komplexů. Primární interakce jsou odolné vůči narušení silnými detergenty (Hemler 2005; Deventer et al. 2017).

Pokud tetraspaniny dále interagují vzájemným propojením primárních komplexů, dochází ke vzniku sekundárních interakcí. Ty jsou odolné vůči slabým detergentům a závislé na palmitoylaci – odstranění palmitoylačních míst vedlo k narušení sekundárních interakcí mezi tetraspaniny a integriny (Yang et al. 2004; Deventer et al. 2017).

Terciární interakce jsou slabé a lze je detekovat pouze za přítomnosti velmi slabých detergentů (Deventer et al. 2017).

### 3.7.1 CD9

CD9 je člen tetraspaninové nadrodiny povrchových proteinů. Jedná se o malý protein o velikosti 24–27 kDa, který je exprimován ve velké šíři tělních buněk a také gamet. Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole, i CD9 je zapojen do mnoha buněčných procesů včetně interakcí gamet během oplození (Yubero et al. 2011). Tento protein byl původně identifikován jako povrchový antigen lymfohemopoetických buněk (Kersey et al. 1981).

Studium tetraspaninu CD9 bylo zprvu prováděno především na oocytech. Na oocytech je v různých vývojových stádiích lokalizován na plazmatické membráně (Li et al. 2004) a vezikulech v perivitelinním prostoru (Jankovicova et al. 2019). Hromadí se v místě adheze gamet, která je zprostředkována spermatickým proteinem Izumo 1 a vaječným receptorem Juno. S receptorem Juno vytváří CD9 cis asociace a s velkou pravděpodobností se podílí na jeho membránové organizaci; byl proto navržen jako jeho partner (Chalbi et al. 2014).

Nezbytnost tohoto tetraspaninu během interakcí spermie a vajíčka byla zjištěna pomocí jeho vyblokování. Myši s CD9 knock-outem měly oproti kontrolní skupině zcela normální ovulaci a zrání oocytů do stádia MII, byly však jen velmi zřídka oplodněny. Docházelo k hromadění spermií v perivitelinním prostoru v důsledku neschopnosti fúze gamet (Kaji et al. 2000; Miyado et al. 2000). Pokud byly oocyty zbaveny ZP, spermie byly schopné na plazmatické membráně oocytu ulpívat, ale nebyly schopné podstoupit fúzi s oocytem (Miyado et al. 2000). Obě tato zjištění potvrdila nutnost výskytu CD9 na vaječné membráně pro úspěšné oplození.

Stejného výsledku bylo dosaženo i v případě ošetření oocytů protilátkou proti CD9. Byla blokována vazba spermie na vajíčko i jejich fúze jak u myši (Le Naour et al. 2000; Miyado et al. 2000), prasat (Li et al. 2004), tak i u skotu (Zhou et al. 2009).

Expresí CD9 byla zjištěna a popsána nejen na myších spermiích (Ito et al. 2010), ale také na prasečích (Kaewmala et al. 2011) či býčích spermiích (Cupperová et al. 2014), kde byl o rok později tento protein úspěšně lokalizován na plazmatické membráně v oblasti akrozomu (Antalíková et al. 2015).

Li et al. (2004) se pokoušeli lokalizovat CD9 na prasečích spermích, ale bohužel neúspěšně. Kaewmala et al. (2011) se domnívají, že by důvodem mohl být tekutý dusík, ve kterém byly spermie skladovány. O pár let později se totiž právě této skupině podařilo CD9 lokalizovat na akrozomální membráně prasečích spermií z testes a epididymis (Kaewmala et al. 2011).

Lokalizaci tetraspaninu CD9 na myších spermích popsali Ito et al. (2010) a uvádí, že CD9 je asociován s vnitřní akrozomální membránou. Studie, kterou provedli Frolikova et al. (2018) ale ukazuje, že se tento protein nenachází jen na vnitřní akrozomální membráně, ale rovněž na té vnější. Během AR dochází k relokizaci proteinu do ekvatoriálního segmentu, což platí i pro lidský spermatický CD9, který je lokalizován v apikální části hlavičky spermie (Ito et al. 2010; Frolikova et al. 2018).

Oproti samicím, které s vyblokováním tetraspaninem CD9 vykazují výraznou subfertilitu, spermie zůstávají plodné a jsou schopné podstoupit všechny kroky interakce mezi gametami, které vedou k úspěšnému oplození (Ohnami et al. 2012). Je tedy zřejmé, že spermatický CD9 není na rozdíl od CD9 vyskytující se na oocyty, pro oplození esenciální. Antalíková et al. (2015) navrhli pro spermatický protein CD9 podpůrnou roli během fertilizace a tvrdí, že jeho funkce souvisí především s tvorbou multimolekulárních komplexů, které jsou tetraspaniny schopné vytvářet.

Během fúze gamet byla podrobně zkoumaná interakce CD9 s tetraspaninem CD81, jež se ukázala jako velmi významná. Tetraspaninová síť zahrnující CD9 a CD81 totiž může vést k zakřivení membrány, a to kvůli schopnosti tetraspaninů asociovat s proteiny či lipidy, jejichž následkem dochází k zakřivení membrány či ovlivnění tvorby tubulárních struktur (např. mikrovilli), které se účastní tvorby fúzogenních domén (Zhang & Huang 2012; Frolikova et al. 2018). Právě přítomností cholesterolu v membráně může být tetraspaninová síť CD9 a CD81 ovlivněna, což dále vede ke změnám v jejím zakřivení. CD9 hraje v tomto komplexu především roli jako stabilizátor tetraspaninové sítě a dále může mít funkci při rozpoznávání membrány spermie a vajíčka. Funkci vázat či uvolňovat cholesterol zde má tetraspanin CD81, což působí již zmiňované změny v ohýbání membrány (Frolikova et al. 2018).

### 3.7.2 CD81

Jedná se o dalšího člena tetraspaninové proteinové rodiny, jenž se v mnohém podobá předchozímu tetraspaninu CD9. V aminokyselinové sekvenci jsou tyto dva členové blízké homologní a často spolu interagují. Jejich asociace v TEM je stabilnější, než sdružení s kterýmkoliv jiným studovaným tetraspaninem (Charrin et al. 2002; Tanigawa et al. 2008). CD81 se účastní membránových fúzí, např. u člověka je identifikován jako koreceptor pro hepatitidu C během fúze virus-hostitel (Higginbottom et al. 2000; Cormier et al. 2004). V reprodukci je mu proto také připisována funkce během fúze gamet. Velikost proteinu CD81 je 26 kDa (Boucheix & Rubinstein 2001).

V myších oocytech byl CD81 detekován a lokalizován na vaječné membráně (Takahashi et al. 2001). Ohnami et al. (2012) ale uvádí, že se CD81 na myších oocytech nachází na *zona pellucida* poblíž perivitelinního prostoru a že je produkován převážně v kumulárních buňkách a poté lokalizován v ZP.

Na oocytech skotu studovala lokalizaci skupina Jankovicova et al. (2016) a výsledky jejich studie ukazují, že CD81 je lokalizován na plazmatické membráně oocytů ve stádiích GV, MI a MII a dále na kumulárních buňkách. Nezaznamenali však žádný pozitivní signál na ZP, který je patrný ve studii od Ohnami et al. (2012) provedené na myších. Toto zjištění odpovídá lokalizaci CD81 u lidí, kde je CD81 asociován pouze s plazmatickou membránou oocyty (Ziyyat et al. 2006). CD81 byl v neposlední řadě lokalizován také na prasečích oocytech, kde se jeho lokalizace nijak neliší od CD9, a je tedy lokalizován jak na plazmatické membráně, na vnitřním okraji ZP, tak i částečně v perivitelinním prostoru (Jankovicova et al. 2019).

Myši s vyblokováním tetraspaninu CD81 měly i přes normální páření, ovulaci a standardní počet ovulovaných oocytů sníženou plodnost. Spermie nebyly schopné podstoupit fúzi s oocytem, což potvrzuje fakt, že bylo několik spermií nalezeno v perivitelinním prostoru. Toto zjištění posiluje hypotézu, že CD81 hraje roli během fúze gamet (Rubinstein et al. 2006b).

Dále byla zjišťována inhibice fúze gamet pomocí protilátky proti CD81. Oproti inhibici fúze gamet při použití protilátky proti CD9 bylo zjištěno, že protilátka proti CD81 měla velmi malý až skoro žádný účinek. Z těchto zjištění byly vyvozeny dvě potenciální funkce pro vaječný tetraspanin CD81. Jeho role může spočívat jak v tvorbě tetraspaninové sítě, tak v regulaci a spojení s partnerskými molekulami důležitými pro fúzi gamet prostřednictvím tetraspaninové sítě (Rubinstein et al. 2006b).

Tetraspanin CD81 byl také lokalizován na spermiích. Na myších spermiích byl detekován na plazmatické membráně pokrývající akrozom. Kapacitace na rozdíl od AR neměla na lokalizaci proteinu žádný vliv. Relokalizace nastala až během AR, kdy došlo k přesunu do ekvatoriálního segmentu hlavičky spermie. Po AR se CD9 a CD81 objevují velmi blízko sebe, a byla tak vizualizována kolokalizační oblast CD9 a CD81 (Frolikova et al. 2018). Stejná lokalizace CD81 byla hlášena na myších spermiích již ve studii od skupiny Jankovicova et al. (2016).

V apikální oblasti akrozomu a částečně v postakrozomální oblasti byl tento protein detekován u člověka. Opět nedocházelo ke změně jeho lokalizace během kapacitace, ale po odstranění plazmatické a vnější akrozomální membrány během AR zmizel z apikální části hlavičky spermie a detekovatelný byl pouze v postakrozomální oblasti. U lidského proteinu CD81 tedy nedochází během AR k relokalizaci v rámci hlavičky spermie. Po AR nebyla patrná žádná společná lokalizace CD9 a CD81 (Frolikova et al. 2018). Interakce, která plyne z kolokalizace CD9 a CD81, byla popsána ke konci předchozí kapitoly 3.7.1.

Jankovicova et al. (2016) pozorovali CD81 u býků, kde se nacházel v apikální oblasti hlavičky spermie. U části populace byl signál detekován také v ekvatoriálním segmentu. Vzhledem k tomu, že po AR došlo ke ztrátě CD81 z akrozomální oblasti hlavičky, byla pro tento býčí spermatický protein navržena funkce spočívající především v udržení proteinové organizace spermatické membrány během událostí předcházejících fúzi spermie a vajíčka. U býka, tedy stejně jako u člověka, na rozdíl od myši nedochází k relokalizaci CD81 během AR, což může být důsledek rozdílné morfologie hlavičky spermie či jiné reprodukční strategie těchto druhů (Jankovicova et al. 2016).

Samci myši s CD81 knock-outem zůstali plodní. To stejné platí i pro samce, u kterých byl vytvořen dvojitý knock-out CD9 a CD81 (Rubinstein et al. 2006b).

### 3.7.3 CD151

Protein CD151 (velký 27 kDa) je také členem tetraspaninové rodiny a stejně jako ostatním tetraspaninům jsou i CD151 přisuzovány role během celé řady biologických procesů včetně reprodukce. Díky své velké extracelulární smyčce je CD151 schopen interagovat jak s jinými tetraspaniny, tak i s určitými integriny. Intrakce CD151 probíhá především s integriny vyskytujícími se mimo jiné na vajíčku –  $\alpha 6\beta 1$  a  $\alpha 3\beta 1$ . S těmito dvěma membránovými receptory vytváří CD151 stabilní komplexy i v somatických buňkách (Yauch et al. 1998; Fitter et al. 1999; Serru et al. 1999; Boucheix & Rubinstein 2001). V rámci tetraspaninové sítě CD151 spojuje integriny  $\alpha 6\beta 1$  a  $\alpha 3\beta 1$  s jinými tetraspaniny, např. s CD9. Totéž platí pro CD81, který se sdružuje s integrinem  $\alpha 4\beta 1$ . Jedná se tedy o nepřímou interakci tetraspaninů s integriny prostřednictvím interakcí CD81 a CD151 (Yauch et al. 1998; Serru et al. 1999; Berditchevski et al. 2002; Charrin et al. 2003).

Expresce CD151 byla prokázána na oocytu (Neilson et al. 2000), kde byl také o pár let úspěšně detekován a lokalizován. Na lidských oocytech se nachází na plasmatické membráně, kde se zároveň kolokalizuje společně s  $\alpha 6\beta 1$  integrinem (Ziyyat et al. 2006).

Při použití protilátky proti CD151 byla fúze gamet u lidí inhibovaná až o 50 %, což naznačuje, že by se vaječný CD151 mohl společně s integrinem  $\alpha 6\beta 1$  podílet na funkčním fúzním komplexu. Tato studie také ukázala, že lidská fúze gamet je na tomto integrinu závislá mnohem více, než tomu je u myši. Protilátka proti  $\alpha 6$  podjednotce integrinu silně inhibovala fúzi u lidí (Ziyyat et al. 2006). U myši He et al. (2003) ale poukázali na zcela plodné myši i přes vyblokování podjednotky  $\alpha 6$  a  $\beta 1$  integrinu. Vyplývá z toho tedy, že fúze spermií a vajíčka může záviset na různých proteinech v závislosti na živočišném druhu. U myši byl také vytvořen CD151 knock-out a výsledkem byly zdravé a plodné myši (Wright et al. 2004).

Nejnovější studie od Jankovicova et al. (2020) poskytuje nové informace o detekci a lokalizaci CD151 na myších, býčích a lidských spermiích. Tento protein je exprimován v samčích zárodečných buňkách a během epididymálního transportu a ejakulace zůstává přítomný na spermiích. U ejakulovaných spermií byl CD151 lokalizován v akrozomální části hlavičky, a to výhradně v ekvatoriálním segmentu a dále na vnitřní akrozomální membráně, jejíž proteiny jsou odhaleny těsně po AR. V ekvatoriálním segmentu byla také detekována  $\alpha 6$  podjednotka integrinu, a jak je v této studii ukázáno, CD151, stejně jako v oocytech, s touto integrinovou podjednotkou v myších spermiích interaguje. Jankovicova et al. (2020) rovněž navrhuje existenci transmembránového proteinového systému, jehož funkce spočívá ve stabilizaci multimolekulárních komplexů situovaných do ekvatoriálního segmentu a zajišťujících interakci s vajíčkem.

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Materiál

Reprodukční orgány kanců (varlata a nadvarlata) pocházely od dospělých jedinců miniprasat z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i. v Liběchově. Orgány byly dovezeny na ledu do laboratoře KVD ČZU, kde byly dále zpracovávány. Z ocasu nadvarlete byly injekční stříkačkou odsáty epididymální spermie. Ejakulované spermie kanců pocházely z inseminačních dávek, které byly odebrány dospělým kancům plemene Landrace. Inseminační dávky byly poskytnuty společností Proagro Nymburk a.s. (ČR). Ejakulované spermie byly převezeny v den odběru v plastové nádobě uložené v polystyrenovém boxu a udržované při teplotě 17 °C.

Hřebčí reprodukční orgány pocházely od zdravých hřebců ve věkovém průměru čtyř let, kteří podstoupili plánovanou kastraci, která nebyla podmíněna zdravotními důvody. Epididymální spermie hřebců byly získány z ocasu nadvarlete totožným způsobem jako u epididymálních prasečích spermií. Ejakulované spermie byly odebrány v certifikovaném reprodukčním centru (ERC Ltd., Pardubice-Mnětice, ČR). Do umělé vagíny byly odebrány frakce bohaté na spermie od deseti hřebců.

### 4.2 Metodika

#### 4.2.1 Použité protilátky

##### 4.2.1.1 Primární protilátky

Polyklonální králičí protilátka proti CD9 (MRP-1): bs-2489R, proti aminokyselinám 120-165/228 lidského proteinu (Bioss Antibodies, Woburn, Massachusetts, USA)

Monoklonální myší protilátka proti CD9 (C-4): sc-13118, proti aminokyselinám 101-210 lidského proteinu (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA)

Monoklonální potkaní protilátka proti CD9 (KMC8.8): sc-18869, proti BMS2 myším mezenchymálním stromálním buňkám kostní dřene (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA)

Polyklonální králičí protilátka proti CD81 (H121): sc-9158, proti aminokyselinám 90-210 lidského proteinu (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA)

Polyklonální kozí protilátka proti CD81 (Q-14): sc-31234, proti aminokyselinové sekvenci N-konce extracelulární domény lidského proteinu (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA)

Polyklonální králičí protilátka proti CD151: ab125363, proti C-konci aminokyselin 154-203 lidského proteinu (Abcam, Cambridge, UK)

#### 4.2.1.2 Sekundární protilátky

**Anti-R** (anti-rabbit): Kozí protilátka proti králičím IgG (H+L) konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) (Bio-Rad, Hercules, California, USA)

**Anti-M** (anti-mouse): Kozí protilátka proti myším IgG (H+L) konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) (Bio-Rad, Hercules, California, USA)

**Anti-G** (anti-goat): Králičí protilátka proti kozím IgG (H+L) konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) (Bio-Rad, Hercules, California, USA)

**Anti-R<sub>A</sub>** (anti-rat): Kozí protilátka proti potkaním IgG (H+L) konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA)

**Anti-G<sub>A</sub>** (anti-goat): Oslí protilátka proti kozím IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)

**Anti-R<sub>B</sub>** (anti-rabbit): Kozí protilátka proti králičím IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)

#### 4.2.2 Zpracování biologického materiálu

Z inseminačních dávek bylo odebráno 5 ml. Tento objem byl rozdělen po 1 ml do zkumavek. Pro odmytí ředidla byly do každé zkumavky napipetovány 4 ml promývacího roztoku PBS (0,01 M Phosphate-buffered saline, 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,4; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a centrifugovány (Benchmark LC-8, Benchmark Scientific, Sayreville, New Jersey, USA) při 300 x g po dobu 10 minut. Po dokončení centrifugace byl odebrán supernatant a objem byl doplněn PBS do 5 ml. Tento proces byl zopakován 2krát. Epididymální spermie získané odsátím z ocasu nadvarlete byly promývány v PBS a 3krát centrifugovány při 300 x g 10 minut. Vzniklé suspenze spermií byly připraveny pro nepřímou imunofluorescenční mikroskopii.

Pro další postupy bylo ze vzniklých suspenzí spermií odebráno 100 µl do mikrozkušavek, ke kterým bylo přidáno 500 µl PBS. Byla provedena centrifugace (Hettich Mikro 22 R, Hettich, Tuttlingen, Germany) při 300 x g po dobu 5 minut. Byl odstraněn supernatant a takto připravené peletky byly skladovány v mrazáku při teplotě -18 °C. Tyto vzorky byly dále využity pro metody imunodetekce pomocí protilátek metodou Western blot.

Pro přípravu kryořezů byly tkáně varlat a nadvarlat krájeny na kostky o velikosti 1 cm<sup>3</sup>. Nakrájené kostky tkání byly vkládány do formiček a zality přípravkem TissueTek (OCT Compound for Cryostat Sectioning, Austrálie). V těchto připravených gelových bločcích byly tkáně zamrazeny v tekutém dusíku. Zpracování tkání na kryořezy bylo prováděno na přístroji Cryo-cut (Leica, Biocev, Vestec, ČR). Tloušťka kryořezů byla od 6 do 8 µm. Hotové řezy byly nalepeny na podložní skla a dále uchovávány v mrazáku při teplotě -20 °C. Vzniklé kryořezy byly využity pro metodu nepřímé imunofluorescenční mikroskopie.

## **4.2.3 Příprava vzorků spermií pro SDS elektroforézu**

### **4.2.3.1 Izolace proteinů se vzorkovým pufrem**

Extrakce proteinů byla provedena lyzací ve vzorkovém pufru (0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8; glycerol; 2% SDS; 0,05% bromfenolová modř; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) pro SDS elektroforézu. Vzorkový pufr byl k peletce spermií napipetován v objemu 1:2 (spermie:vzorkový pufr). Vzorek byl řádně rozsuspenzován a umístěn na led, kde po dobu 30 minut probíhala lyzace. Každých 5 minut byl vzorek protřepán. Následně byl vzorek 5 minut povařen při 100 °C. Byla provedena centrifugace (10 000 x g, 4 °C, 3 min) pro odstředění zbytků buněk. Připravený vzorek byl využíván pro SDS elektroforézu.

### **4.2.3.2 Izolace proteinů se vzorkovým pufrem s 2-merkapt ethanolom**

Ke vzorkovému pufru o objemu 450 µl bylo napipetováno 25 µl 2-merkapt ethanolu (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) pro zajištění redukujících podmínek a plnému rozbalení proteinů. Vzorkový pufr s merkapt ethanolom byl napipetován v poměru 1:2 k peletce spermií. Vzorek byl 30 minut lyzován na ledu a každých 5 minut protřepán. Následovalo povaření vzorku při teplotě 100 °C po dobu 5 minut. Poté byl vzorek centrifugován v chlazené centrifuze při 10 000 x g 5 minut.

Tento postup extrakce proteinů byl později modifikován z důvodu srážení vzorku kvůli uvolnění jaderné DNA. Spermie byly lyzovány 30 minut na ledu ve vzorkovém pufru, který byl přidán v objemu 1:2. Vzorek byl každých 5 minut řádně protřepán. Byla provedena centrifugace (10 000 x g 5 minut) a následně byl odpipetován supernatant o objemu 300 µl, ke kterému bylo přidáno 15 µl merkapt ethanolu. Následovalo povaření vzorku (100 °C, 5 minut).

### **4.2.3.3 Izolace proteinů pomocí RIPA pufru a acetonu**

K peletce spermií bylo přidáno 0,5 ml RIPA pufru (pH 7,2, 10 mM fosforečnan sodný, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) deoxycholát sodný, 0,1% 24 (w/v) SDS, 1 mM DTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Proběhla 30 minutová lyzace spermií na ledu. Vzorek byl centrifugován při 10 000 x g 5 minut. Bylo odebráno 200 µl vzorku, ke kterému bylo přidáno 1,2 ml acetonu (Lach: Ner, Neratovice, ČR). Vzorek byl ponechán po dobu 60 minut v mrazáku, aby mohlo dojít k vysrážení. Po vysrážení byl vzorek centrifugován (10 000 x g 5 minut). Aceton byl následně odpipetován a byl přidán vzorkový pufr v poměru 1:2. Vzorek byl důkladně protřepán a povařen 5 minut při teplotě 100 °C. Proběhla centrifugace při 10 000 x g 3 minuty.

Tento postup izolace proteinů byl také prováděn s přidáním merkapt ethanolu do vzorkového pufru.



#### **4.2.3.4 Izolace proteinů pomocí RIPA pufru a močoviny**

Pro extrakci proteinů byly spermie 30 minut lyzovány na ledu v 0,5 ml RIPA pufru, který byl přidán k peletce spermií. Vzorek byl centrifugován (10 000 x g 5 minut) a poté bylo odebráno 200  $\mu$ l. Byl přidán aceton o objemu 1,2 ml a vzorek byl ponechán v mrazáku 60 minut a poté centrifugován (10 000 x g 5 minut). Aceton byl odstraněn a v poměru 1:2 byl napipetován vzorkový pufr s 8 M močovinou. Vzorek byl důkladně protřepán.

Tento postup byl také prováděn s přidáním merkaptoethanolu. Vzorek byl následně inkubován 5 minut při teplotě 37 °C.

#### **4.2.3.5 Izolace proteinů pomocí RHB pufru a močoviny**

K peletce spermií bylo napipetováno 0,5 ml RHB pufru (7 M močovina, 2 M thiomčovina, 2% m/v CHAPS) a na ledu ponecháno 30 minut lyzovat s protřepáváním každých 5 minut. Následující postup byl shodný s postupem izolace proteinů pomocí RIPA pufru a močoviny.

#### **4.2.4 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu**

Pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsiranu sodného (SDS) byl použit vertikální systém Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Byl připraven roztok pro 12% akrylamidový gel (3,5 ml destilovaná voda; 4 ml 30% akrylamid/bis-akrylamid (Bio-Rad, Hercules, California, USA); 2,5 ml 1,5 M Tris. HCl pH 8,8 (Bio-Rad, Hercules, California, USA); 100  $\mu$ l 10% SDS, 4,5  $\mu$ l TEMED, 70  $\mu$ l 10% persíran amonný). Tento roztok gelu byl bez časové prodlevy nalit mezi již připravená a do stojanu uchycená skla a následně byl převrstven destilovanou vodou. Polymerace separačního gelu probíhala 30 minut.

Po 30 minutách byla vylita převrstvená destilovaná voda a byl připraven roztok pro 4% zaostřovací gel (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  $\mu$ l TEMED; 50  $\mu$ l 10% persíran amonný). Takto připravený roztok byl nanesen na ztuhlý separační gel. Ihned po nalití byly do roztoku zaostřovacího gelu vloženy hřebínky pro tvorbu jamek. Gel byl ponechán 15 minut polymerovat. Poté byla skla s gelem přenesena do aparatury určené pro elektroforézu a zalita elektrodoým pufrem (15 g Tris (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 72 g glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 5 g SDS v 1 l destilované vody; následně ředěno destilovanou vodou 1:4). Byly vytaženy hřebínky a do vzniklých jamek byly nanесeny 4  $\mu$ l proteinových molekulárních standardů Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad, Hercules, California, USA) a 20  $\mu$ l připraveného proteinového vzorku. Jako poslední krok byla aparatura zapojena do zdroje elektrického proudu, kdy probíhala při konstantním napětí 80 V 30 minut a poté bylo na 60 minut napětí zvýšeno na 150 V.

Gely se separovanými proteiny byly vyndány z elektroforetické aparatury a promyty destilovanou vodou. Následně byly gely připraveny pro elektropřenos proteinů (Western blot) vložním do transferového pufru.

#### 4.2.5 Elektropřenos proteinů (Western blot)

Pro elektropřenos proteinů z gelu na nitrocelulózovou (NC) membránu Amersham™ Protran (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) byl použit systém od firmy Bio-Rad (Hercules, California, USA). Byl připraven transferový pufr (3,03 g Tris (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA); 14,4 g glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA); 800 ml destilovaná voda; 200 ml methanol). NC membrána, filtrační papír Whatman [Whatman chromatography paper (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA)] a houbičky byly navlhčeny v transferovém pufru po dobu 15 minut.

Kazeta pro Western blot byla uspořádána dle následujícího pořadí: houbička, 2krát filtrační papír Whatman, gel, membrána, 2krát filtrační papír Whatman a houbička. Zkompletovaná kazeta byla vložena do aparatury určené pro Western blot. Aparatura byla zapojena do zdroje a byl nastaven konstantní elektrický proud na 500 mA. Elektropřenos proteinů probíhal 75 minut a po celou dobu byla aparatura chlazena ledem.

Membrána s přenesenými proteiny byla vyjmuta z kazety, opláchnuta v destilované vodě a po dobu 60 sekund obarvena pro vizualizaci proteinů barvou Ponceau (Ponceau S Solution; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Pomocí destilované vody bylo odmyto pozadí membrány a membrána byla zdokumentována. Následně byla barva Ponceau použitím PBS s 0,1 % Tweenem 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (PBS-T) zcela odmyta a membrána byla dále použita pro imunodetekci proteinů.

#### 4.2.6 Imunodetekce proteinů

Pro deaktivaci volných míst na membráně bylo použito 5% sušené mléko Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (Bio-Rad, Hercules, California, USA) rozpuštěné v PBS, se kterým byla membrána inkubována na třepačce 60 minut. Membrána byla následně 2krát promývána v PBS-T. Dále byla provedena inkubace membrány s primárními protilátkami proti CD9, CD81 a CD151 tetraspaninům: MRP-1 polyklonální králičí protilátka, C-4 monoklonální myší protilátka, KMC8.8 monoklonální potkaní protilátka, H121 polyklonální králičí protilátka, Q-14 polyklonální kozí protilátka a ab125363 polyklonální králičí protilátka. Primární protilátky byly ředěny v poměru 1:250 a 1:200 v PBS. Inkubace probíhala přes noc v lednici (4 °C). Membrány pro negativní kontrolu byly inkubovány přes noc v lednici s PBS.

Po inkubaci byly membrány promývány na rotační třepačce 3krát po 10 minutách v PBS-T. Následovala inkubace se sekundárními protilátkami konjugovanými s křenuvou peroxidázou (HRP) Anti-R (anti-rabbit), Anti-M (anti-mouse), Anti-G (anti-goat), Anti-RA (anti-rat). Sekundární protilátky byly ředěny v poměru 1:3000 v PBS. Inkubace probíhala na rotační třepačce při pokojové teplotě po dobu 60 minut. Následně byly membrány promývány na rotační třepačce v PBS-T 6krát po 5 minutách.

Pomocí chemiluminiscenčního substrátu Super Signal West Pico PLUS (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) byla provedena vizualizace specifické detekce proteinu. Vizualizace byla provedena za pomoci přístroje Azure c300 Gel Imaging System (Azure Biosystems, Dublin, California, USA).

#### 4.2.7 Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie

Pro imunofluorescenční metodu byly použity suspenze epididymálních a ejakulovaných spermií a dále kryořezy varlete a ocasu nadvarlete.

Před přípravou preparátů byla zkontrolována koncentrace připravené suspenze spermií pod světelným mikroskopem Nikon (YS100). Koncentrace byla odhadována subjektivně s cílem nepřekrývajících se hlaviček spermií. Při příliš vysoké koncentraci bylo u vzorku dosaženo požadované koncentrace pomocí přidáním většího objemu PBS. Pokud byla koncentrace nízká, snížil se objem přidaného PBS k supernatantu po odstředění.

Pro přípravu preparátů s epididymálními a ejakulovanými spermii byla použita hydrofobní fixa PAN Pen (Liquid Blocker Super PAN Pen; Agar Scientific, Stansted, UK). Pomocí fixy PAN Pen byla na podložní skla připravena dvě kolečka. První bylo použito pro vyhodnocení reakce s protilátkou a druhé bylo určeno pro negativní kontrolu. Do koleček bylo napipetováno 20  $\mu$ l suspenze spermií. Fixace spermií byla provedena metodou vlhké fixace, kdy do kolečka se suspenzí bylo napipetováno 50  $\mu$ l vymraženého aceton-methanolu (Lach: Ner, Neratovice, ČR) v poměru 1:1. Byla provedena inkubace po dobu 5 minut. Preparáty byly opláchnuty PBS a destilovanou vodou a ponechány oschnout. Takto připravené preparáty byly skladovány v lednici (4 °C). Po vytažení z lednice a před dalším postupem byly preparáty znovu promyty v PBS.

Jednotlivé kryořezy na podložním sklíčku byly ohraničeny hydrofobní fixou PAN Pen a opláchnuty PBS. Byla zvolena acetonová fixace. Podložní skla s kryořezy byla ponořena do vymraženého acetonu, kde byla ponechána 30 minut. Následně byla 3krát opláchnuta PBS.

Pro další postupy byly preparáty se spermii i kryořezy blokovány roztokem Super Block v PBS (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Do každého kolečka bylo napipetováno 150  $\mu$ l roztoku Super Block a blokace probíhala 30 minut při pokojové teplotě. Preparáty byly 3krát opláchnuty v PBS a ponechány schnout.

Na každé kolečko bylo napipetováno 100  $\mu$ l primárních protilátek, ředěných v poměru 1:100, 1:50 nebo 1:20. Byly použity protilátky proti CD9, CD81 a CD151 tetraspaninům: MRP-1 králičí polyklonální protilátka, H121 králičí polyklonální protilátka, Q-14 kozí polyklonální protilátka a ab125363 králičí polyklonální protilátka. Preparáty byly inkubovány s primárními protilátkami ve vlhké komůrce, která byla umístěna přes noc v lednici. Kontroly byly inkubovány s PBS. Další den byly preparáty 3krát promyty PBS, ponechány oschnout a inkubovány se sekundárními protilátkami značenými Alexa Fluor 488 Anti-G<sub>A</sub> (anti-goat) a Anti-R<sub>B</sub> (anti-rabbit). Sekundární protilátky byly zprvu ředěny v poměru 1:300 v PBS. Pro omezení nespecifických interakcí byly posléze ředěny v poměru 1:500 v PBS. Bylo napipetováno 100  $\mu$ l do každého kolečka. Preparáty byly se sekundárními protilátkami inkubovány 45 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Po inkubaci byla skla 3krát promyta v PBS. Preparáty s epididymálními a ejakulovanými spermii byly inkubovány s PNA lektinem konjugovaným s rhodaminem (Rhodamine Peanut Agglutinin; Vector laboratories, Burlingame, California, USA), který byl ředěn v poměru 1:500 v PBS. Bylo napipetováno 100  $\mu$ l do každého kolečka. Po 30 minutách inkubační doby byly preparáty promyty PBS a destilovanou vodou.

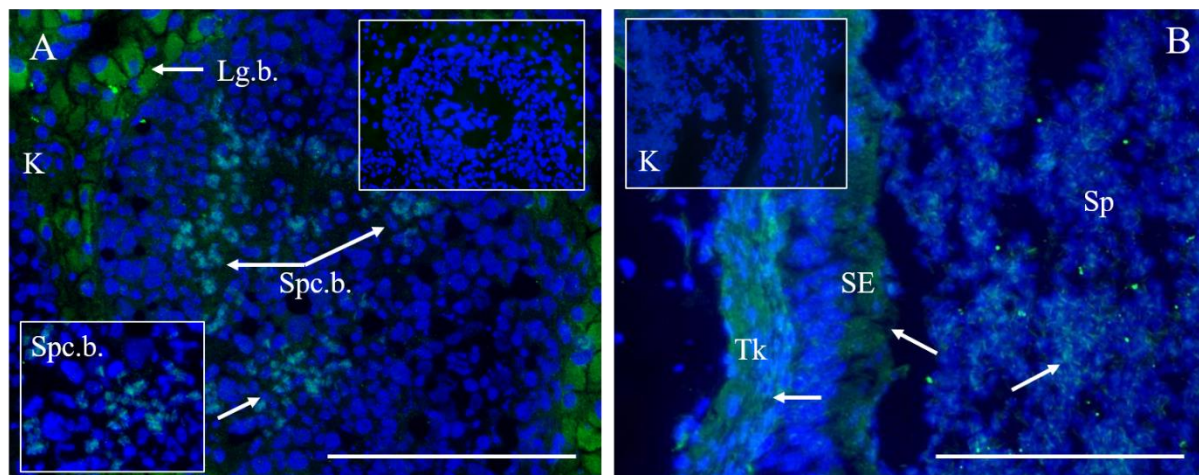
Na preparáty s kryořezy i spermiemi bylo pro značení jaderné DNA naneseno 10  $\mu$ l montovacího média VectaShield DAPI (Antifade Mounting Medium; Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) a překryto krycím sklíčkem, které bylo zafixováno lakem na nehty. Takto vzniklé preparáty byly prohlédnuty pod fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E 600, zdokumentovány pomocí kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi 1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

## 5 Výsledky

### 5.1 Lokalizace tetraspaninu CD9 ve spermiích a tkáni varlete a nadvarlete

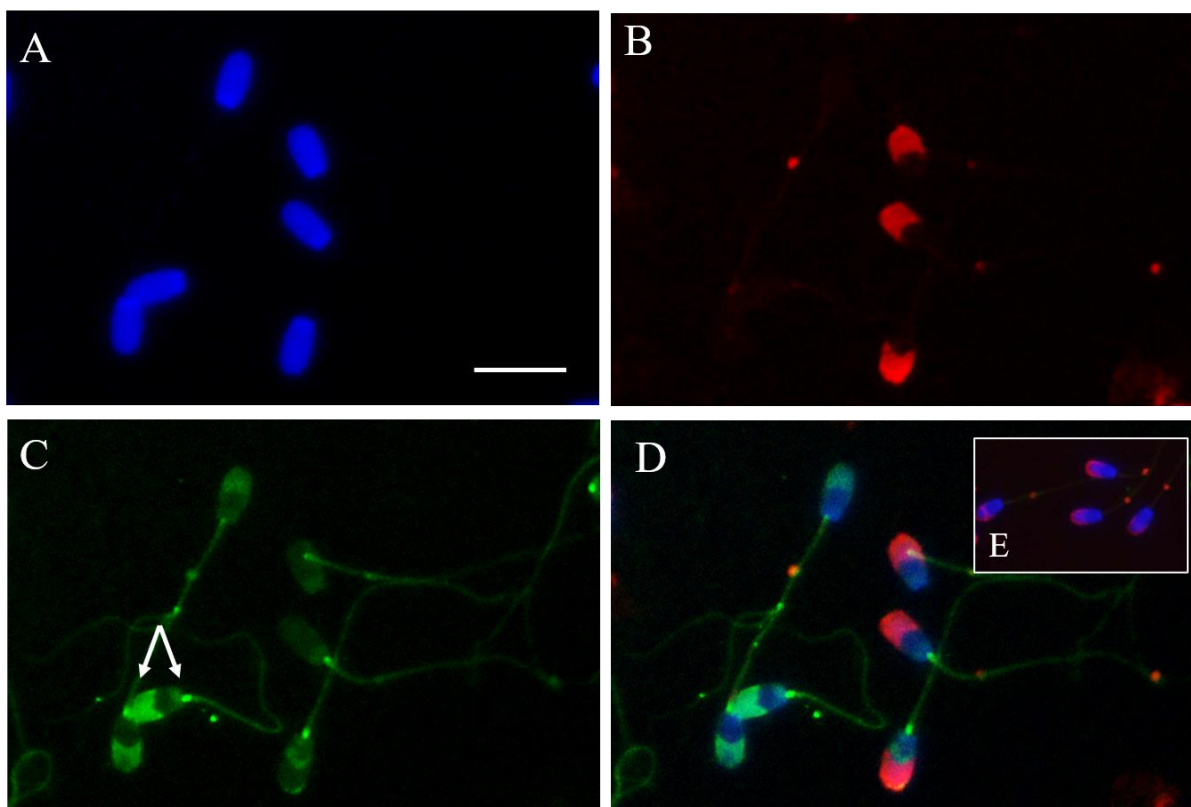
Pro detekci a lokalizaci tetraspaninu CD9 v samčích reprodukčních orgánech a spermiích byla využita metoda nepřímé fluorescenční mikroskopie (kap. 4.2.7). Byly použity kryořezy (kap. 4.2.2) a preparáty fixovaných epididymálních a ejakulovaných kančích a hřebčích spermií (kap. 4.2.7). K detekci proteinu CD9 byla použita primární polyklonální králičí protilátka MRP-1. Pro vizualizaci byla následně použita sekundární protilátka konjugovaná s FITC (zelená fluorescence), jádro bylo značeno DAPI (modrá fluorescence) a akrozom obarven lektinem PNA (červená fluorescence). Při detekci proteinu CD9 v kryořezech nebyl používán PNA lektin. Negativní kontrola byla inkubována pouze se sekundární protilátkou konjugovanou s FITC a je vždy součástí snímků u spermií s označením E a u řezů s označením K.

Detekce CD9 v tkáni varlete a ocasu (*cauda*) nadvarlete u kančů je ukázána na obrázku 6. Na snímku A je zobrazen semenotvorný kanálek varlete. Šipkami je označena detekce proteinu CD9. Protilátka MRP-1 značila spermatické buňky ve varletním kanálku, a také cytoplazmu Leydigových buněk. Šipkou je také označen úsek spermatických buněk, který je pro lepší viditelnost zvětšený. V levém horním rohu snímku A se nachází negativní kontrola. Na snímku B vidíme řez ocasem (*cauda*) nadvarlete s protilátkou MRP-1. Šipky označují reakci s protilátkou, která byla lokalizována v buňkách tkáně (Tk), v sekrečním epitelu (SE) a ve spermiích (Sp). Negativní kontrola se nachází v levém horním rohu snímku B s označením K.



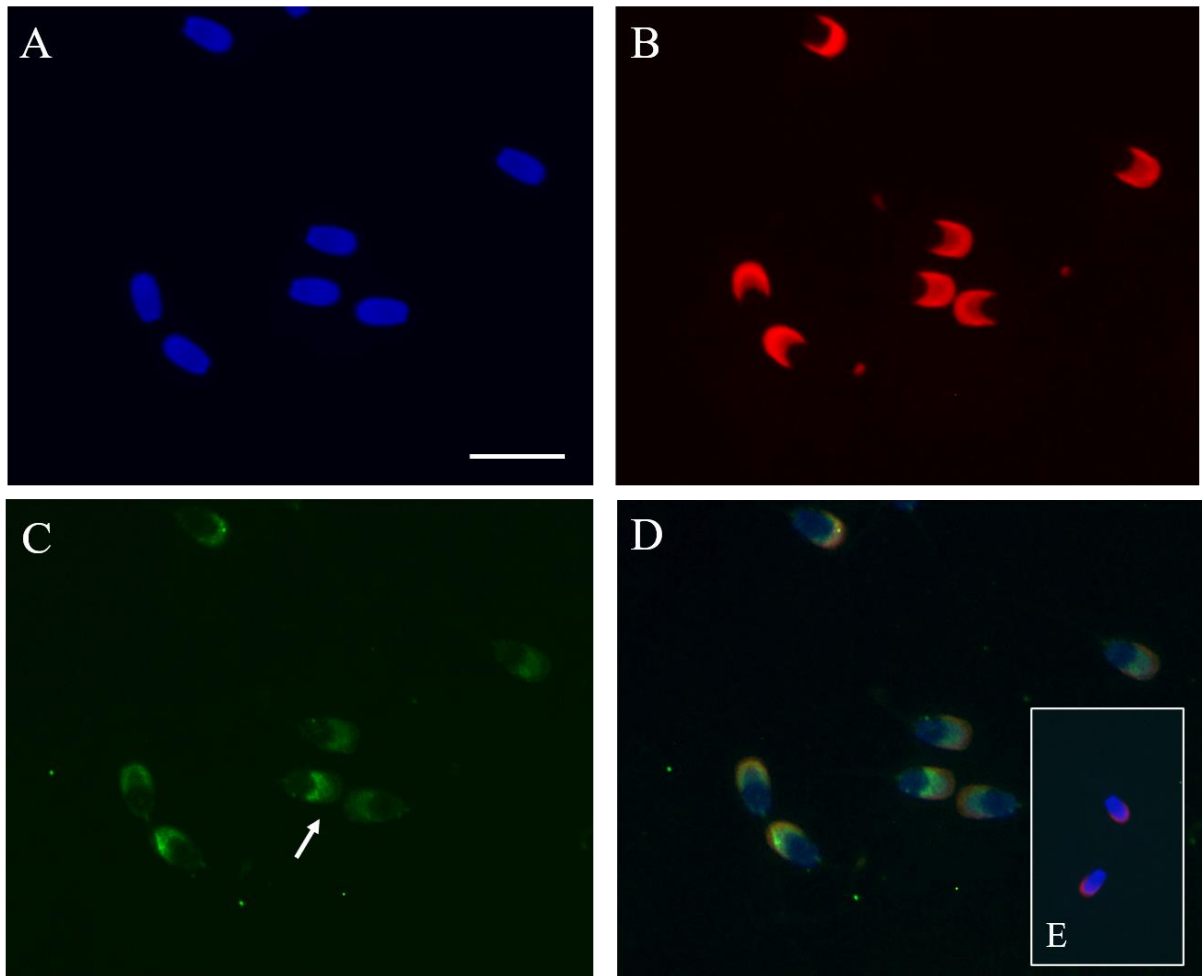
**Obrázek 6: Lokalizace proteinu CD9 v řezu kančího varlete a ocasu (*cauda*) nadvarlete pomocí protilátky MRP-1: A – testes, B – cauda epididymis, Spc.b. – spermatické buňky, Lg. b. – Leydigovy buňky, Tk – tkáň, SE – sekreční epitel, Sp – spermie, K – kontrola, měřítko 100  $\mu$ m, zvětšení 400x.**

Na obrázku 7 je zobrazena lokalizace proteinu CD9 v kančích epididymálních spermích, které byly izolovány z ocasu (*cauda*) nadvarlete. Na snímku D můžeme vidět heterogenní populaci spermíí. U první subpopulace spermíí s chybějícím akrozomem byla pozorována vazba protilátky s proteinem CD9 v oblasti vnitřní akrozomální membrány (bílá šipka). U spermíí z druhé populace, u kterých se akrozom vyskytoval, nebyla detekována vazba proteinu CD9 s protilátkou MRP-1. Přibližně u poloviny spermíí bylo viditelné fluorescenční značení v oblasti krčku (bílá šipka).



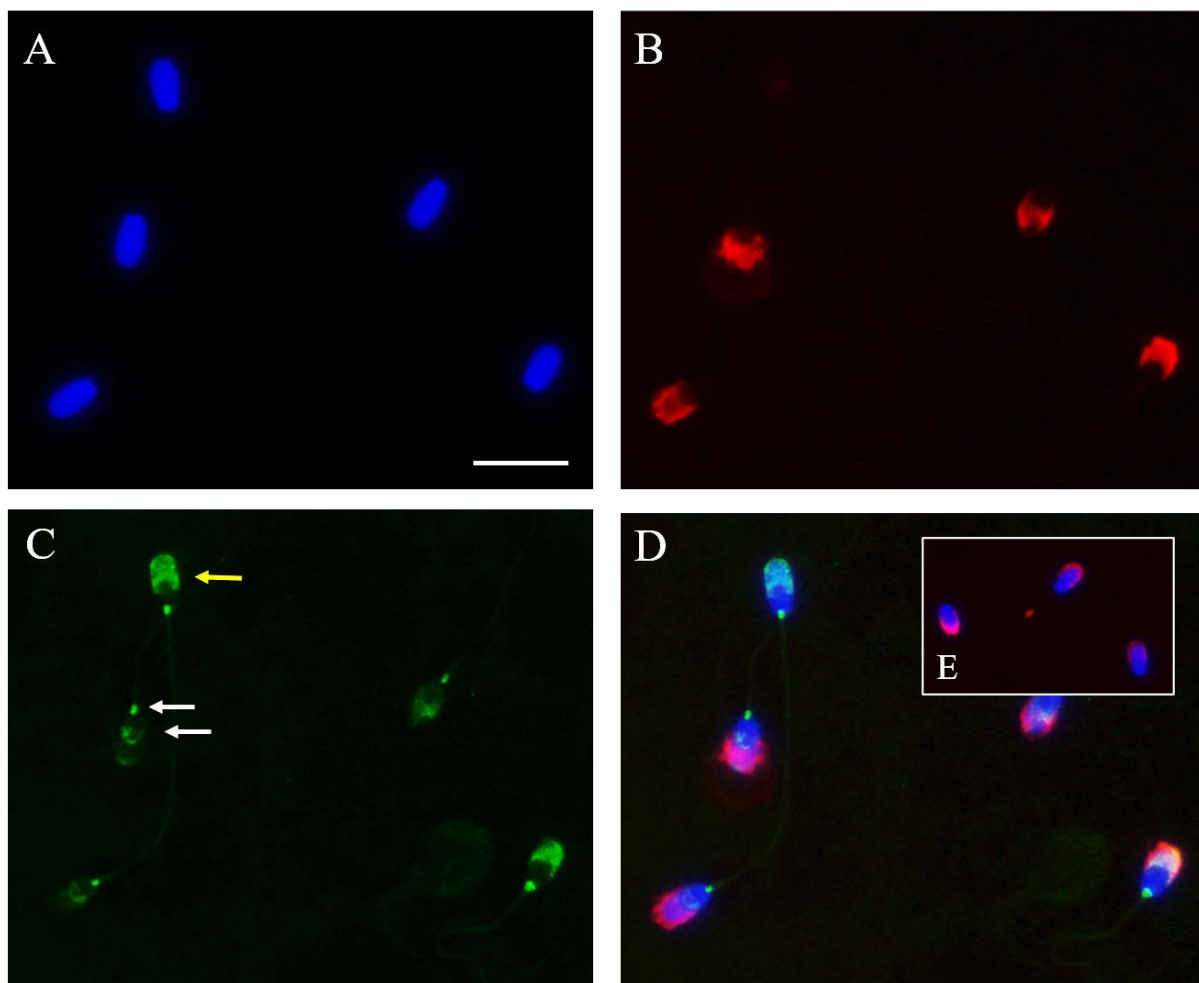
**Obrázek 7: Lokalizace proteinu CD9 v kančích epididymálních spermích pomocí protilátky MRP-1:** A – jádro značené DAPI, B – akrozom značený lektinem PNA, C – reakce s protilátkou proti CD9, D – složený obrázek (DAPI, FITC, PNA), E – negativní kontrola, bílé šipky značí reakci s protilátkou MRP-1 v oblasti vnitřní akrozomální membrány a krčku, měřítko 10  $\mu$ m, zvětšení 400x.

Lokalizace proteinu CD9 v ejakulovaných kančích spermích je zobrazena na obrázku 8 a 9. Na obrázku 8 se u většiny ejakulovaných spermíí vyskytovaly neporušené akrozomy a protein CD9 byl detekován protilátkou MRP-1 v oblasti akrozomu ejakulovaných spermíí.



**Obrázek 8: Lokalizace proteinu CD9 v kančích ejakulovaných spermích s neporušenými akrozomy pomocí protilátky MRP-1:** A – jádro značené DAPI, B – akrozom značený lektinem PNA, C – reakce s protilátkou proti CD9, D – složený obrázek (DAPI, FITC, PNA), E – negativní kontrola, šipka značí reakci s protilátkou MRP-1 v akrozomální oblasti hlavičky, měřítko 10  $\mu\text{m}$ , zvětšení 400x.

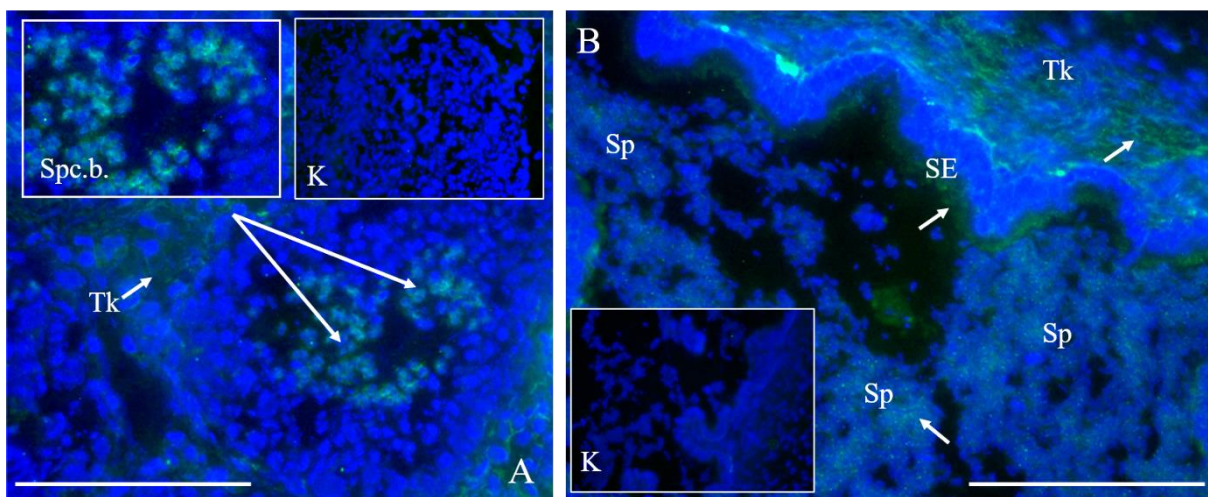
Obrázek 9 zobrazuje kančí ejakulované spermie s porušenými akrozomy. Detekce proteinu byla patrná na vnitřní akrozomální membráně u akrozomově zreagovaných spermii (žlutá šipka). Částečná detekce byla rovněž zaznamenána u spermii s porušenými akrozomy (bíla šipka). Protein CD9 byl detekován také v krčku spermii.



**Obrázek 9: Lokalizace proteinu CD9 v kančích ejakulovaných spermích s porušenými akrozomy pomocí protilátky MRP-1:** A – jádro značené DAPI, B – akrozom značený lektinem PNA, C – reakce s protilátkou proti CD9, D – složený obrázek (DAPI, FITC, PNA), E – negativní kontrola, bílé šipky značí částečnou reakci s protilátkou MRP-1 v oblasti vnitřní akrozomální membrány a dále pak reakci v oblasti krčku, žlutá šipka značí reakci s protilátkou MRP-1 na vnitřní akrozomální membráně, měřítko 10  $\mu$ m, zvětšení 400x.

Na obrázku 10 jsou zachyceny řezy hřebčím varlatem a ocasem (*cauda*) nadvarlete s protilátkou proti CD9 MRP-1. Šipkami je na snímku A označena lokalizace proteinu CD9 na spermatických buňkách. Byla také zachycena slabá intenzita signálu v intersticiální tkáni v okolí semenotvorného kanálku. Lumen kanálku se spermatickými buňkami je zvětšen a vložen do levého horního okraje snímku A. V pravém horním rohu se nachází negativní kontrola K. Na snímku B byla zachycena slabší intenzita fluorescence v oblasti tkáně (Tk), sekrečního epitelu (SE) a spermíí (Sp). I u tohoto snímku se nachází negativní kontrola K.

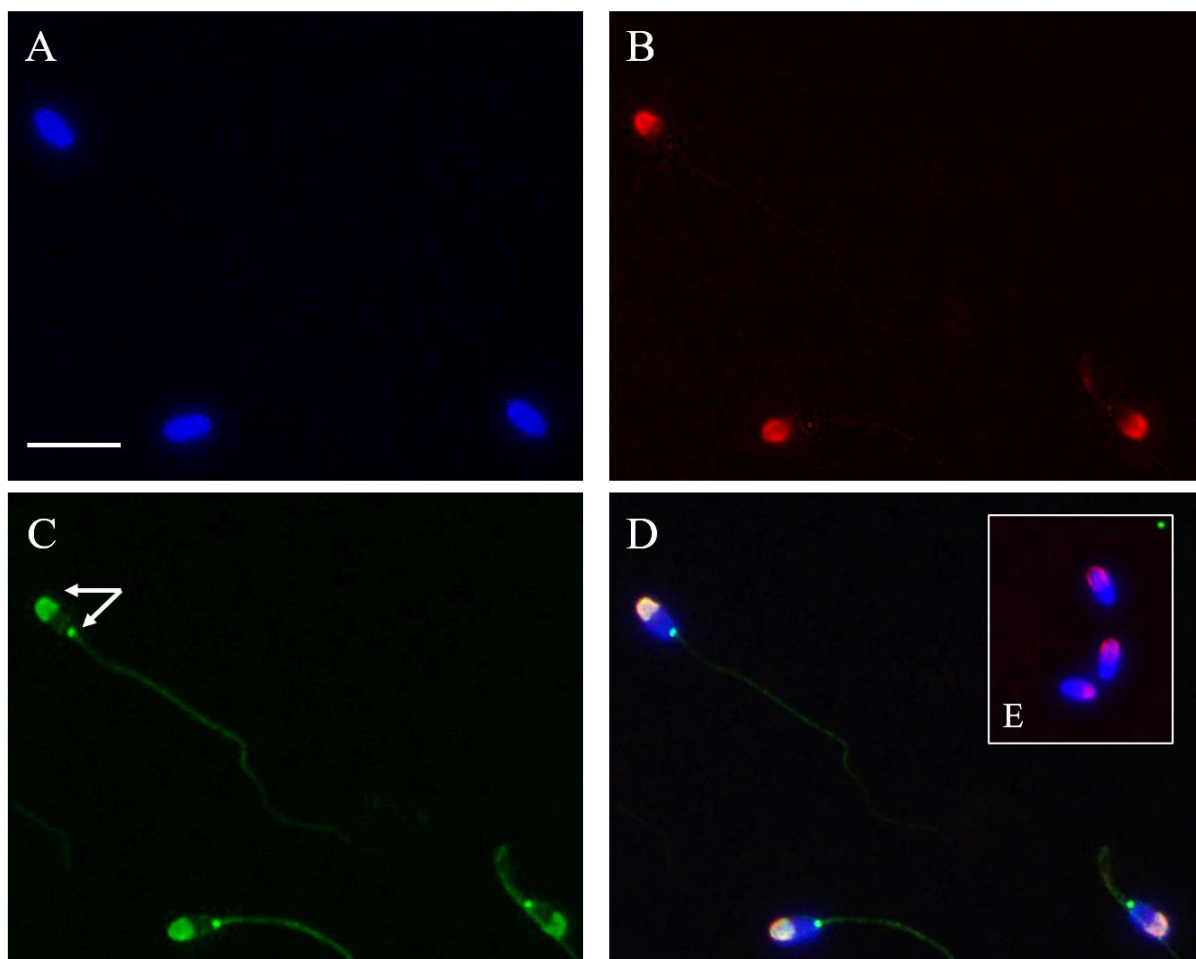




**Obrázek 10: Lokalizace proteinu CD9 v řezu hřebčívho varlete a ocasu (*cauda*) nadvarlete pomocí protilátky MRP-1:** A – testes, B – cauda epididymis, Spc.b. – spermatické buňky, Tk – tkáň, SE – sekreční epitel, Sp – spermie, K – kontrola, měřítko 100 μm, zvětšení 400x.

Epididymální hřebčí spermie získané z ocasu (*cauda*) nadvarlete a ejakulované hřebčí spermie byly nejprve inkubovány s primární protilátkou MRP-1, poté se sekundární protilátkou konjugovanou s FITC. Stejně jako u kančích spermií bylo i zde jádro hřebčích spermií značeno DAPI a akrozom pomocí lektinu PNA. U epididymálních hřebčích spermií nebyla detekce proteinu CD9 úspěšná.

Lokalizace tetraspaninu CD9 na ejakulovaných hřebčích spermiích primární protilátkou MRP-1 je zaznamenána na obrázku 11. Detekovaný protein je značen šipkami, které ukazují zřetelnou vazbu protilátky v oblasti akrozomu hlavičky a krčku spermií. Negativní kontrola je vložena v pravém dolním rohu obrázku pod označením E.

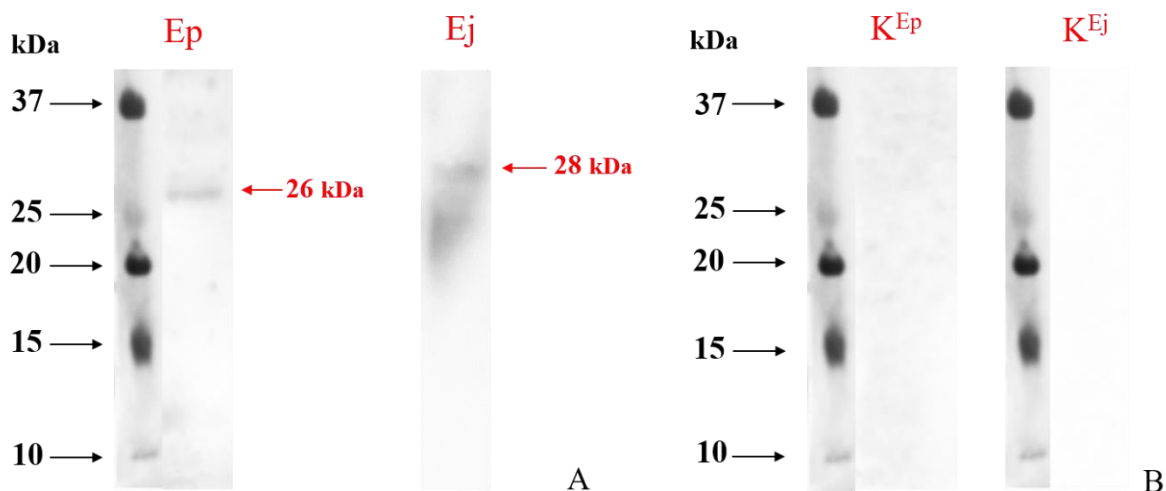


**Obrázek 11: Lokalizace proteinu CD9 v hřebčích ejakulovaných spermích pomocí protilátky MRP-1:** A – jádro značené DAPI, B – akrozom značený lektinem PNA, C – reakce s protilátkou proti CD9, D – složený obrázek (DAPI, FITC, PNA), E – negativní kontrola, šipky značí reakci s protilátkou MRP-1 v akrozomu a krčku, měřítko 10  $\mu\text{m}$ , zvětšení 400x.

## 5.2 Detekce tetraspaninu CD9 v extraktech spermíí

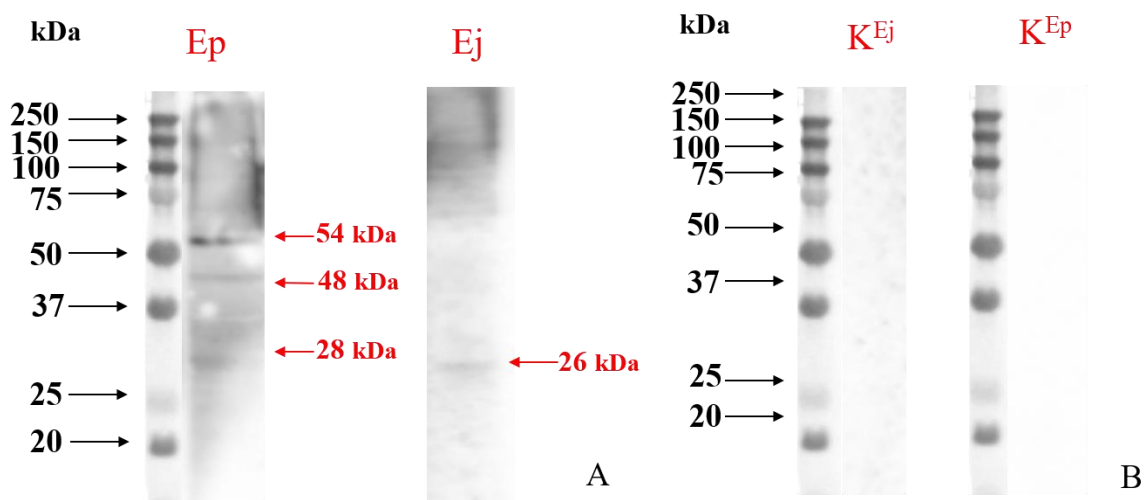
Detekce proteinu CD9 byla provedena v extraktech proteinů z epididymálních a ejakulovaných spermích kance a hřebce (viz kap. 4.2.3), po elektroforetické separaci (kap. 4.2.4). Poté byly separované proteiny přeneseny na nitrocelulózovou membránu (kap. 4.2.5). Tetraspanin CD9 byl detekován pomocí polyklonální králičí protilátky MRP-1.

Na obrázku 12 jsou zobrazeny membrány po inkubaci s protilátkou MRP-1 a kontrolní membrány, které byly negativní. Na membráně A byl u epididymálních kančích spermíí pozorovaný proteinový proužek o přibližné molekulové hmotnosti 26 kDa. Proteinový extrakt epididymálních spermíí byl získán lyzací spermíí ve vzorkovém pufru (kap. 4.2.3.2.) Z ejakulovaných spermíí byly proteiny izolovány pomocí RIPA pufru (kap. 4.2.3.3). Izolace obou proteinových extraktů probíhala v redukujících podmínkách. U ejakulovaných kančích spermíí (obr. 12B) byl patrný proteinový proužek o molekulové hmotnosti cca 28 kDa. Oba detekované proteiny odpovídaly molekulovou hmotností tetraspaninu CD9 (24–27 kDa).



**Obrázek 12: Imunodetekce proteinu CD9 v extraktech kančích spermii pomocí protilátky MRP-1:** A – membrány s extrakty epididymálních a ejakulovaných kančích spermii, B – kontroly, Ep – epididymální kančí spermie, Ej – ejakulované kančí spermie,  $K^{Ep}$  – kontrola epididymálních kančích spermii,  $K^{Ej}$  – kontrola ejakulovaných kančích spermii.

Na obrázku 13 jsou zobrazeny membrány, na nichž byla vidět vazba protilátky MRP-1 na izolované proteiny epididymálních a ejakulovaných hřebčích spermii. Na membránách B jsou zobrazeny také kontroly, které byly negativní. Na membráně A u epididymálních spermii byla zaznamenána vazba u proteinů o molekulové hmotnosti přibližně 28, 48 a 54 kDa. Izolace těchto proteinů byla provedena pomocí RIPA pufru (kap. 4.2.3.3). Proteinový proužek viditelný u ejakulovaných spermii měl velikost cca 26 kDa. Proteinový extrakt ejakulovaných hřebčích spermii byl získán v redukujícím vzorkovém pufru (kap. 4.2.3.2).

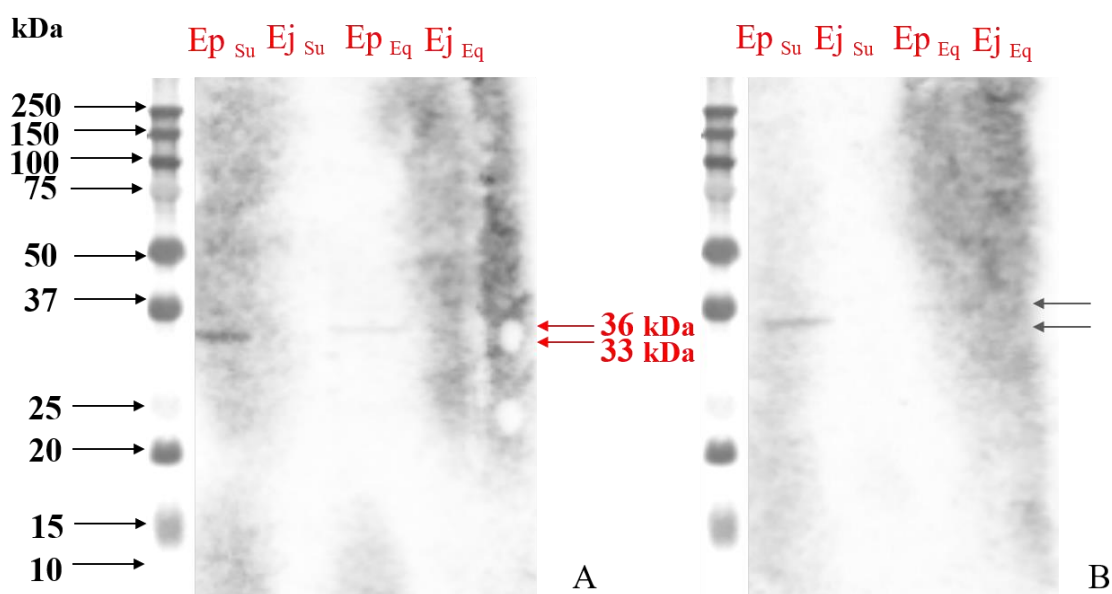


**Obrázek 13: Imunodetekce proteinu CD9 v extraktech hřebčích spermii pomocí protilátky MRP-1:** A – membrány s extrakty epididymálních a ejakulovaných hřebčích spermii, B – kontroly, Ep – epididymální hřebčí spermie, Ej – ejakulované hřebčí spermie,  $K^{Ep}$  – kontrola epididymálních hřebčích spermii,  $K^{Ej}$  – kontrola ejakulovaných hřebčích spermii.

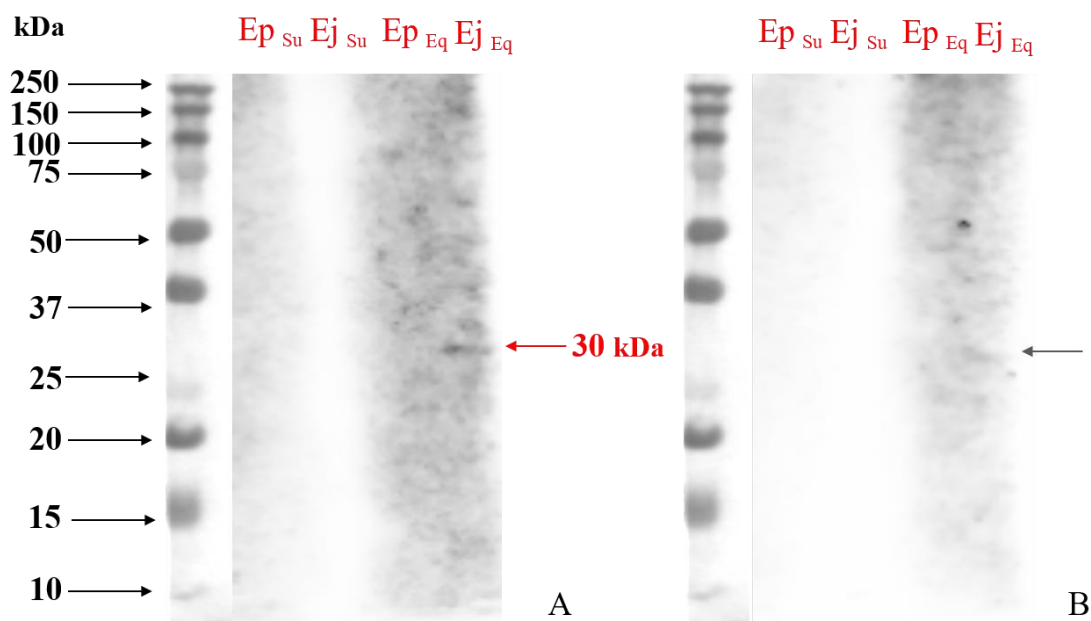
Pro detekci tetraspaninu CD9 u epididymálních a ejakulovaných kančích a hřebčích spermii byla také použita monoklonální potkaní protilátka KMC8.8 a monoklonální myší protilátka C-4. S těmito protilátkami byla však detekce proteinu CD9 neúspěšná.

Obrázek 14 znázorňuje vazbu monoklonální protilátky KMC8.8 na proteiny epididymálních a ejakulovaných kančích a hřebčích spermií. Proteinové extrakty byly získány po lyzaci spermií pomocí vzorkového pufru s následným přidavkem merkptoethanolu (kap. 4.2.3.2). Na membráně A byly patrné proteinové proužky o přibližné molekulové hmotnosti 33 a 36 kDa u epididymálních kančích a hřebčích spermií. Zobrazena je zde i kontrolní membrána (B), na které byly viditelné totožné proteinové proužky o stejných molekulových hmotnostech.

Obrázek 15 zobrazuje membrány, jež byly inkubovány s monoklonální myší protilátkou C-4. U ejakulovaných hřebčích spermií na membráně A je viditelný proteinový proužek o molekulové hmotnosti cca 30 kDa. Membrána B byla použita jako kontrolní membrána. Kontrola není negativní a i zde byl patrný protein u ejakulovaných hřebčích spermií o přibližné molekulové hmotnosti 30 kDa. Izolace proteinů byla provedena pomocí redukujícího vzorkového pufru (kap. 4.2.3.2).



**Obrázek 14: Imunodetekce proteinu CD9 v extraktech kančích a hřebčích spermií pomocí protilátky KMC8.8:** A – membrána s vazbou protilátky na protein, B – kontrola s nespecifickými reakcemi, Ep<sub>Su</sub> – epididymální kančí spermie, Ej<sub>Su</sub> – ejakulované kančí spermie, Ep<sub>Eq</sub> – epididymální hřebčí spermie, Ej<sub>Eq</sub> – ejakulované hřebčí spermie, 33kDa, 36kDa – nespecifické reakce, šedé šipky značí nespecifické reakce v kontrolní membráně.

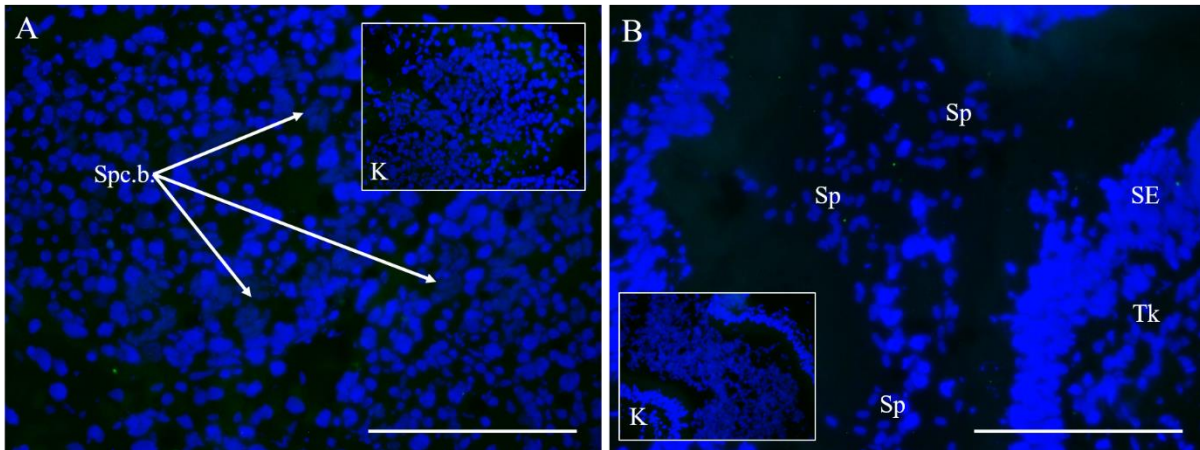


**Obrázek 15: Imunodetekce proteinu CD9 v extraktech kančích a hřebčích spermii pomocí protilátky C-4:** A – membrána s vazbou protilátky na protein, B – kontrola s nespecifickou reakcí, Ep<sub>Su</sub> – epididymální kančí spermie, Ej<sub>Su</sub> – ejakulované kančí spermie, Ep<sub>Eq</sub> – epididymální hřebčí spermie, Ej<sub>Eq</sub> – ejakulované hřebčí spermie, 30kDa – nespecifická reakce, šedá šipka značí nespecifickou reakci v kontrolní membráně.

### 5.3 Lokalizace tetraspaninu CD81 ve spermiiích a tkáni varlete a nadvarlete

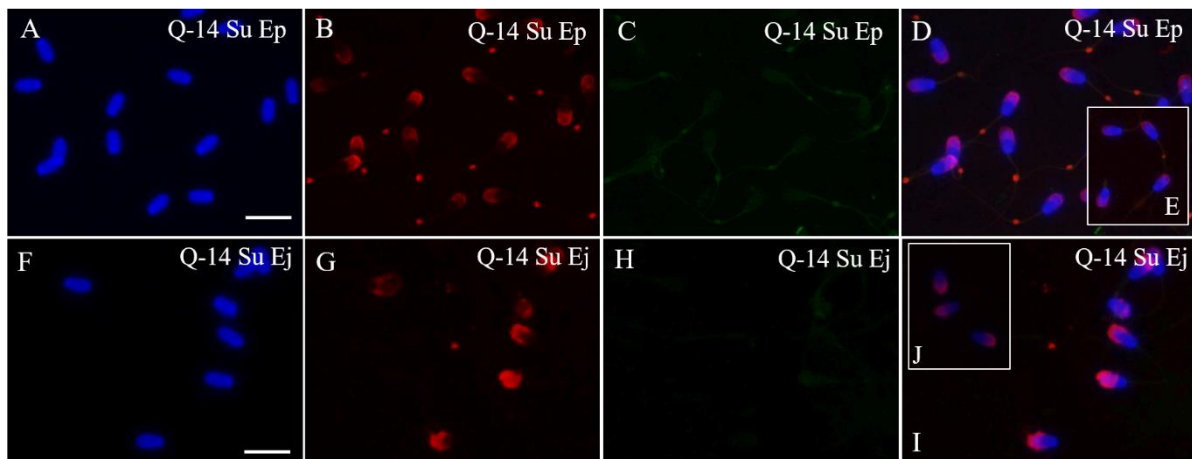
Pro metodu nepřímé fluorescenční mikroskopie (kap. 4.2.7), která sloužila k detekci proteinu CD81, byla využita primární polyklonální králičí protilátka H121 a polyklonální koží protilátka Q-14. Řezy a spermie byly dále inkubovány se sekundárními protilátkami konjugovanými s FITC (zelená fluorescence). Integrita akrozomu byla pozorována pomocí PNA lektinu (červená fluorescence). Při lokalizaci proteinu CD81 v kryorezech PNA lektin nebyl používán. Jádru bylo značeno DAPI (modrá fluorescence). Kontroly byly inkubovány pouze se sekundární protilátkou a jsou vždy uvedeny.

Na obrázku 16 jsou snímky řezů kančího varlete a ocasu (*cauda*) nadvarlete, kde byl protein CD81 detekován a lokalizován pomocí protilátky Q-14. Na snímku A je zobrazen řez testes. Detekce v řezu testes byla negativní. Obrázek B ukazuje řez ocasem (*cauda*) nadvarlete; i zde byla detekce negativní.



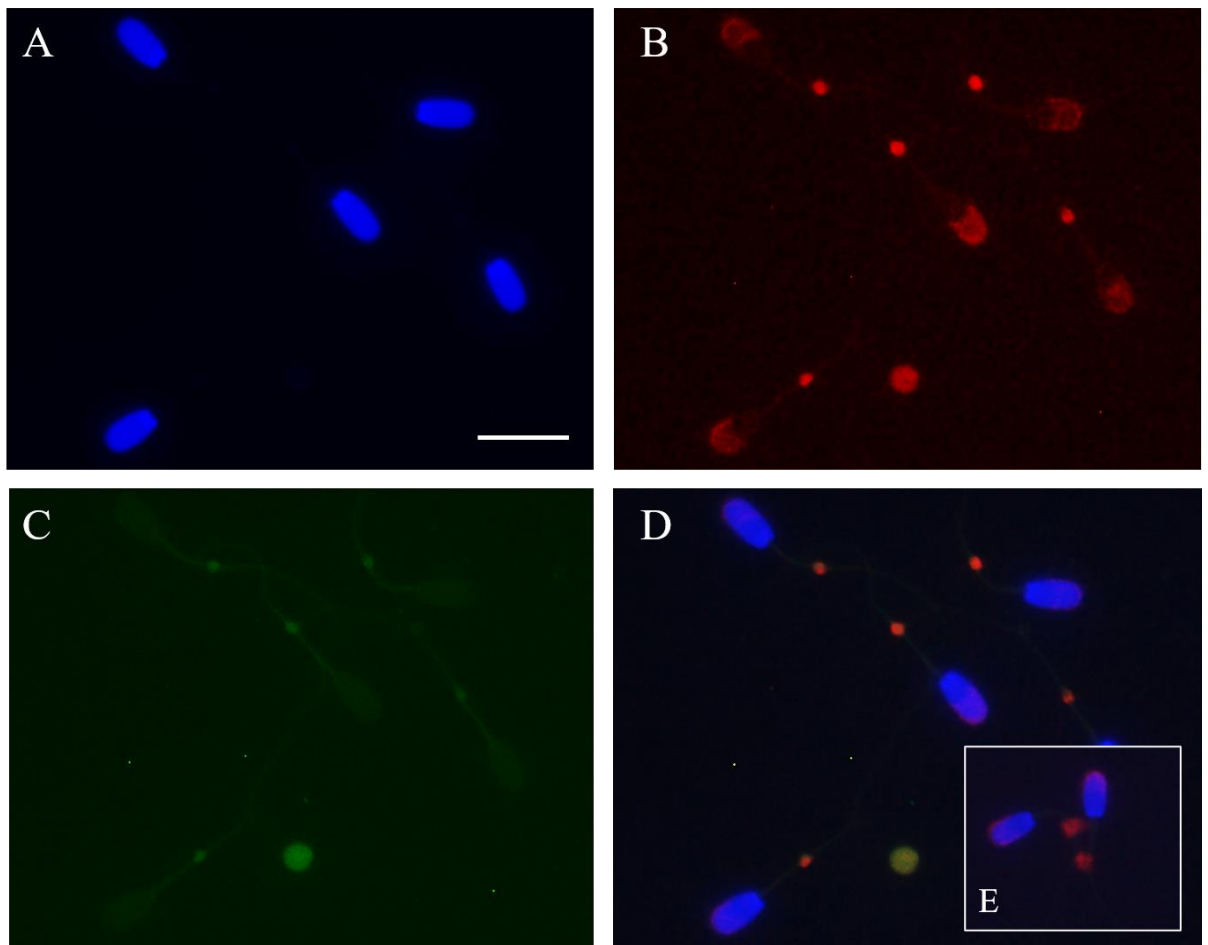
**Obrázek 16: Lokalizace proteinu CD81 v řezu kančího varlete a ocasu (*cauda*) nadvarlete pomocí protilátky Q-14:** A – testes, B – cauda epididymis, Spc.b. – spermatické buňky, Tk – tkáň, SE – sekreční epitel, Sp – spermie, K – kontrola, šipky označují spermatické buňky, měřítko 100  $\mu\text{m}$ , zvětšení 400x.

Pro detekci tetraspaninu CD81 byly spermie dále inkubovány s primární polyklonální kozí protilátkou Q-14. Na obrázku 17 je zobrazena detekce CD81 u epididymálních a ejakulovaných kančích spermií pomocí protilátky Q-14. U obou skupin spermií byla detekce proteinu CD81 negativní.



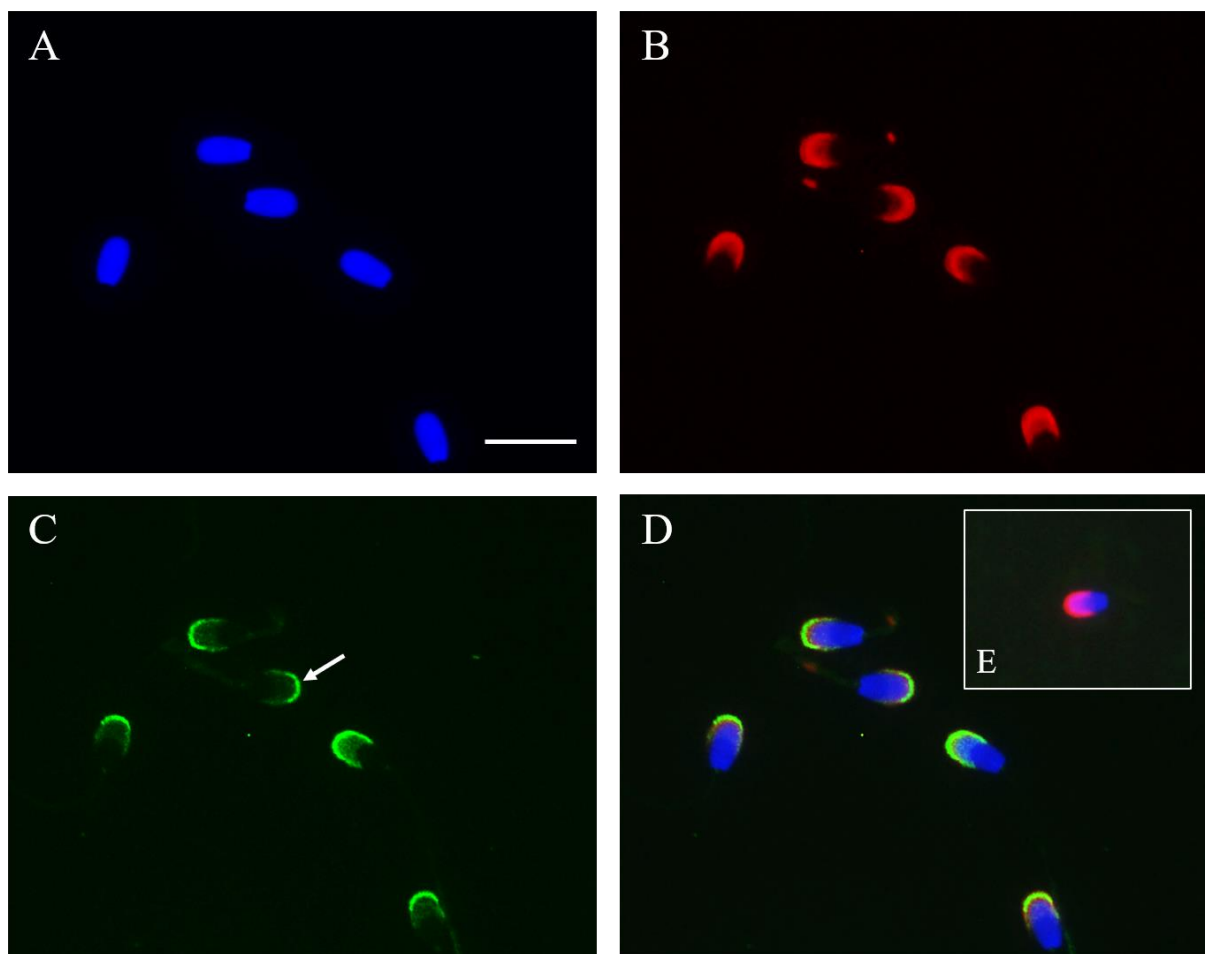
**Obrázek 17: Lokalizace proteinu CD81 v kančích epididymálních a ejakulovaných spermiích pomocí protilátky Q-14:** A, F – jádro značené DAPI, B, G – akrozom značený lektinem PNA, C, H – reakce s protilátkou proti CD81, D, I – složený obrázek (DAPI, FITC, PNA), E, J – negativní kontrola, Su Ep – epididymální kančí spermie, Su Ej – ejakulované kančí spermie měřítko 10  $\mu\text{m}$ , zvětšení 400x.

Detekce proteinu CD81 v epididymálních kančích spermích pomocí protilátky H121 je ukázána na následujícím obrázku 18. Na žádné spermii nebyla patrná detekce proteinu CD81.



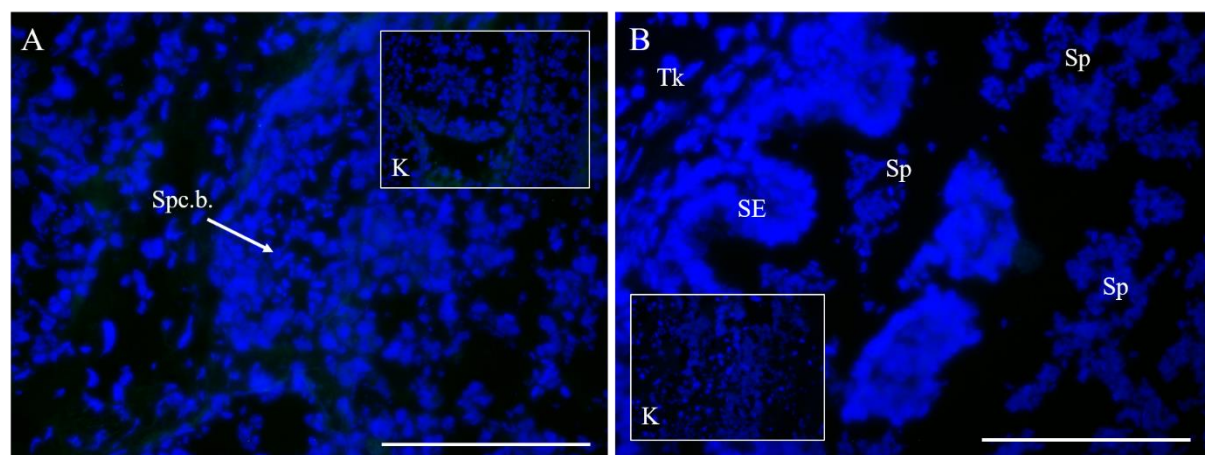
**Obrázek 18: Lokalizace proteinu CD81 v kančích epididymálních spermích pomocí protilátky H121:** A – jádro značené DAPI, B – akrozom značený lektinem PNA, C – reakce s protilátkou proti CD81, D – složený obrázek (DAPI, FITC, PNA), E – negativní kontrola, měřítko 10  $\mu$ m, zvětšení 400x.

Ejakulované kančí spermie inkubované s primární protilátkou H121 jsou zobrazeny na obrázku 19. Lokalizace proteinu CD81 byla zřetelná v apikální oblasti akrozomu. Negativní kontrola je vložena v obrázku pod označením E.



**Obrázek 19: Lokalizace proteinu CD81 v kančích ejakulovaných spermích pomocí protilátky H121:** A – jádro značené DAPI, B – akrozom značený lektinem PNA, C – reakce s protilátkou proti CD81, D – složený obrázek (DAPI, FITC, PNA), E – negativní kontrola, bílá šipka značí reakci s protilátkou H121 v apikální oblasti akrozomu, měřítko 10  $\mu\text{m}$ , zvětšení 400x.

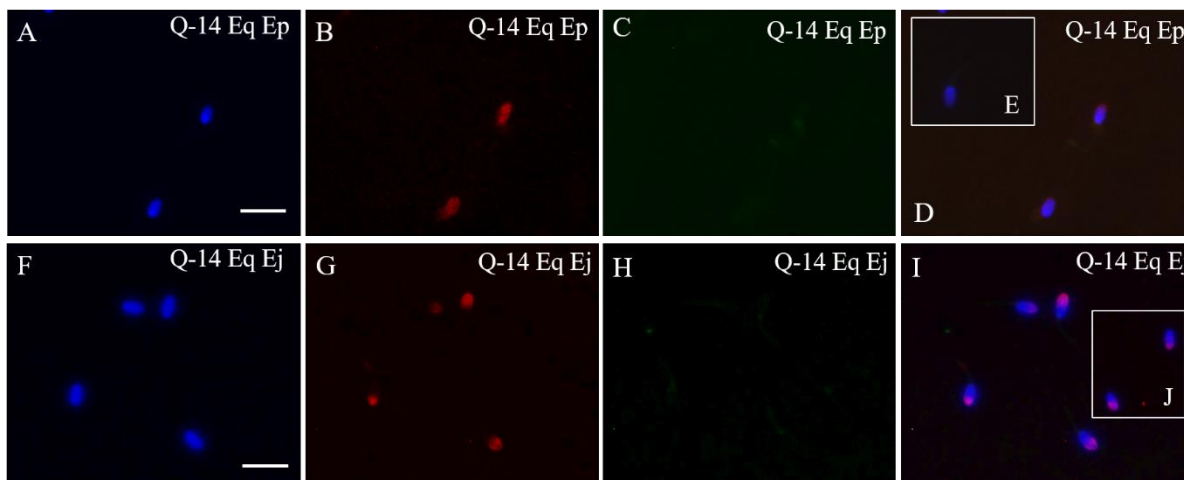
Lokalizaci CD81 v tkáních varlete a ocasu (*cauda*) nadvarlete hřebců pomocí protilátky Q-14 můžeme vidět na obrázku 20. Na snímku A je zachycena detekce proteinu CD81 v hřebčím řezu varletem, jež byla negativní. Na snímku B, na kterém je řez hřebčím ocasem (*cauda*) nadvarlete, byla detekce taktéž negativní.



**Obrázek 20: Lokalizace proteinu CD81 v řezu hřebčím varlete a ocasu (*cauda*) nadvarlete pomocí protilátky Q-14:** A – testes, B – cauda epididymis, Spc.b. – spermatické buňky, Tk – tkáň, SE – sekreční epitel, Sp – spermie, K – kontrola, šipka označuje spermatické buňky, měřítko 100  $\mu\text{m}$ , zvětšení 400x.

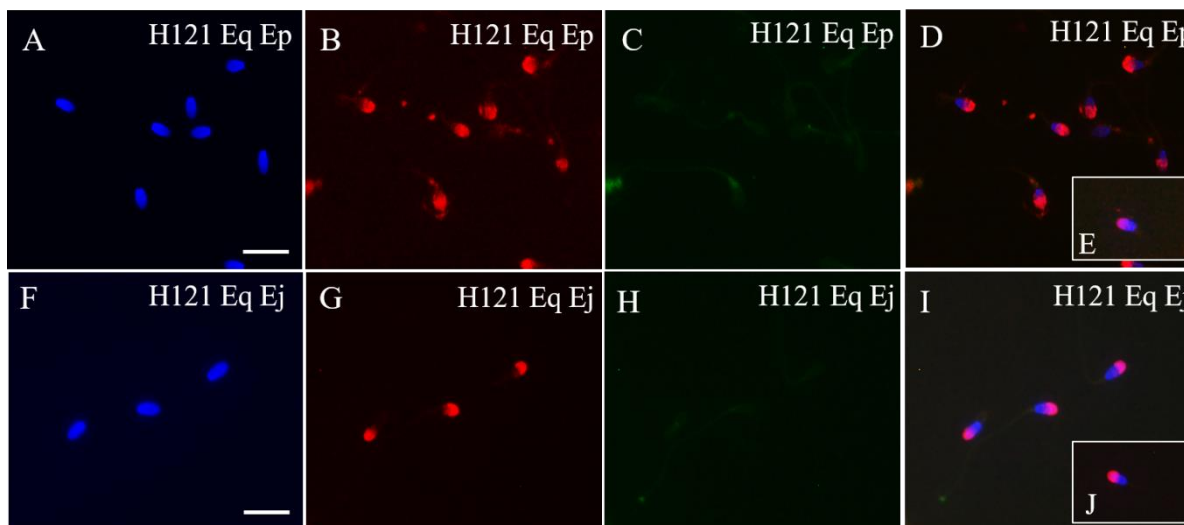


Polyklonální koží protilátka Q-14 byla využita též k detekci CD81 v epididymálních a ejakulovaných hřebčích spermích (viz obr. 21). Detekce byla u obou skupin negativní.



**Obrázek 21: Lokalizace proteinu CD81 v hřebčích epididymálních a ejakulovaných spermích pomocí protilátky Q-14:** A, F – jádro značené DAPI, B, G – akrozom značený lektinem PNA, C, H – reakce s protilátkou proti CD81, D, I – složený obrázek (DAPI, FITC, PNA), E, J – negativní kontrola, Eq Ep – epididymální hřebčí spermie, Eq Ej – ejakulované hřebčí spermie měřítko 10  $\mu$ m, zvětšení 400x.

Na obrázku 22 je uvedena dokumentace epididymálních a ejakulovaných hřebčích spermíí. Detekce proteinu CD81 protilátkou H121 byla negativní, a to jak u epididymálních spermíí, tak u ejakulovaných spermíí.

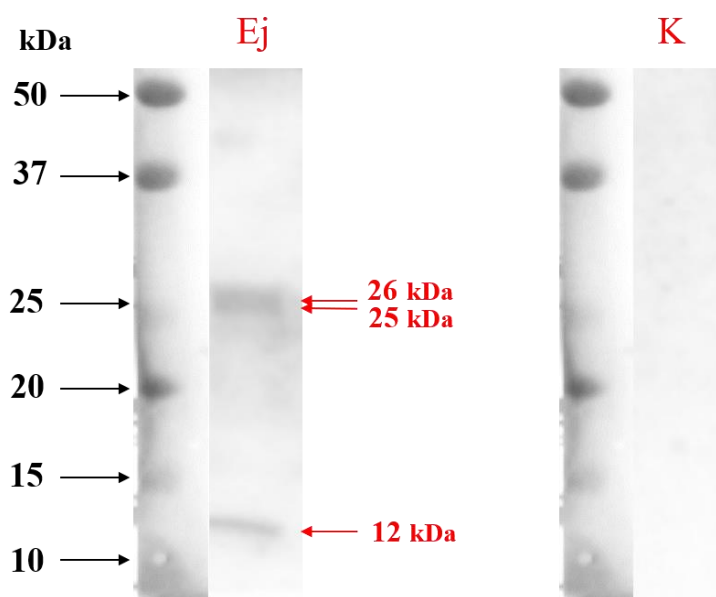


**Obrázek 22: Lokalizace proteinu CD81 v hřebčích epididymálních a ejakulovaných spermích pomocí protilátky H121:** A, F – jádro značené DAPI, B, G – akrozom značený lektinem PNA, C, H – reakce s protilátkou proti CD81, D, I – složený obrázek (DAPI, FITC, PNA), E, J – negativní kontrola, Eq Ep – epididymální hřebčí spermie, Eq Ej – ejakulované hřebčí spermie měřítko 10  $\mu$ m, zvětšení 400x.

## 5.4 Detekce tetraspaninu CD81 v extraktech spermii

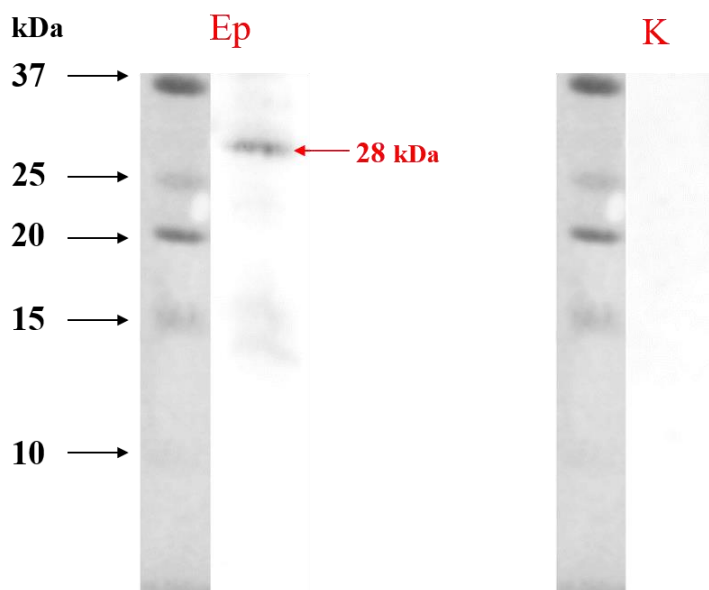
Byla provedena izolace proteinů (kap. 4.2.3). Proteinové extrakty byly nanесeny na gel, elektroforeticky separovány (kap. 4.2.4) a pomocí metody Western blot (kap. 4.2.5) přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Pro imunodetekci tetraspaninu CD81 byly membrány s přenesenými proteiny inkubovány s polyklonální králičí protilátkou H121 a polyklonální kozí protilátkou Q-14. Pomocí polyklonální králičí protilátky H121 byl detekován protein CD81 u ejakulovaných kančích spermii a epididymálních hřebčích spermii. U zbylých skupin nebyla detekce pomocí protilátky H121 úspěšná. Na membránách, které byly inkubovány s polyklonální kozí protilátkou Q-14, nebyla detekce proteinu CD81 úspěšná u žádné skupiny proteinových extraktů.

Membrána s vyizolovanými proteiny z ejakulovaných kančích spermii je zobrazena na obrázku 23. Proteiny byly izolovány metodou RIPA pufru a močoviny (kap. 4.2.3.4). Membrána byla inkubována s primární protilátkou proti CD81 H121. Byly patrné proteinové proužky o přibližných molekulových hmotnostech 12, 25 a 26 kDa. Membrána s označením K sloužila jako negativní kontrola.



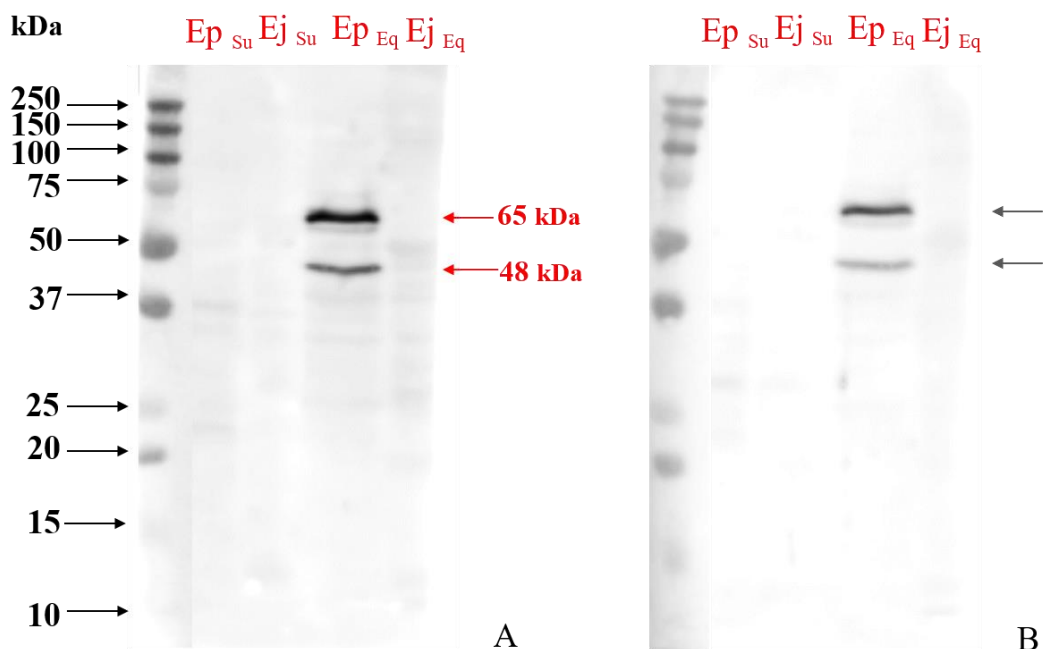
**Obrázek 23: Imunodetekce proteinu CD81 v extraktech kančích ejakulovaných spermii pomocí protilátky H121: Ej – ejakulované kančí spermie, K – kontrola.**

Pomocí vzorkového pufru a merkaptoethanolu (kap. 4.2.3.2) byly vyizolovány proteiny z epididymálních hřebčích spermii. Pro imunodetekci byla použita protilátka H121. Vazby protilátky H121 a vyizolovaných hřebčích epididymálních proteinů jsou ukázány na obrázku 24. Byla zřetelná vazba na protein okolo 28 kDa. Membrána s označením K byla použita jako negativní kontrola.



**Obrázek 24: Imunodetekce proteinu CD81 v extraktech hřebčích epididymálních spermii pomocí protilátky H121: Ep – epididymální hřebčí spermie, K – kontrola.**

Pro detekci proteinu CD81 byla membrána s přenesenými proteiny inkubována také s polyklonální koží protilátkou Q-14. Membrána je zobrazena na obrázku 25. Membrána A sloužila pro reakci s protilátkou Q-14. Membrána s označením B byla využita jako kontrolní membrána. Byly pozorovány dvě silné vazby na proteiny o molekulové hmotnosti 48 a 65 kDa. Oba proteiny byly pozorovány rovněž v kontrolní membráně.

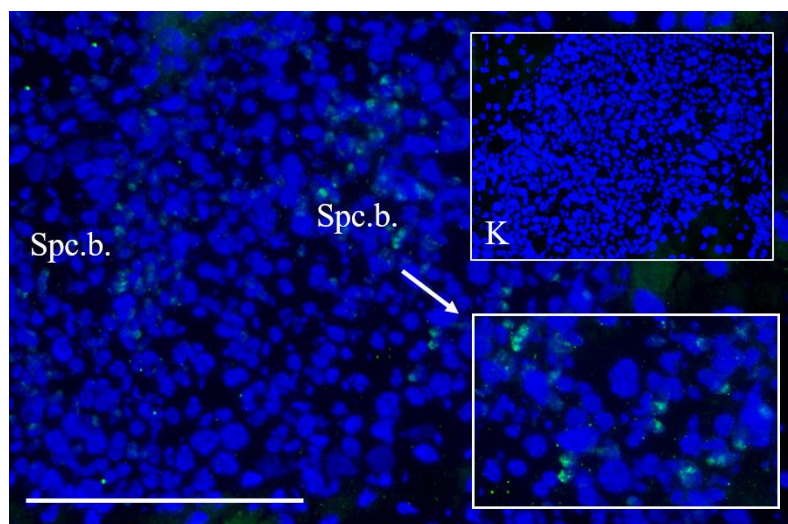


**Obrázek 25: Imunodetekce proteinu CD81 v extraktech kančích a hřebčích spermii pomocí protilátky Q-14: A – membrána s vazbou protilátky na protein, B – kontrola s nespecifickými reakcemi, Ep<sub>Su</sub> – epididymální kančí spermie, Ej<sub>Su</sub> – ejakulované kančí spermie, Ep<sub>Eq</sub> – epididymální hřebčí spermie, Ej<sub>Eq</sub> – ejakulované hřebčí spermie, 48 kDa, 65 kDa – nespecifické reakce, šedé šipky značí nespecifické reakce v kontrolní membráně.**

## 5.5 Lokalizace tetraspaninu CD151 ve spermíích a tkáni varlete a nadvarlete

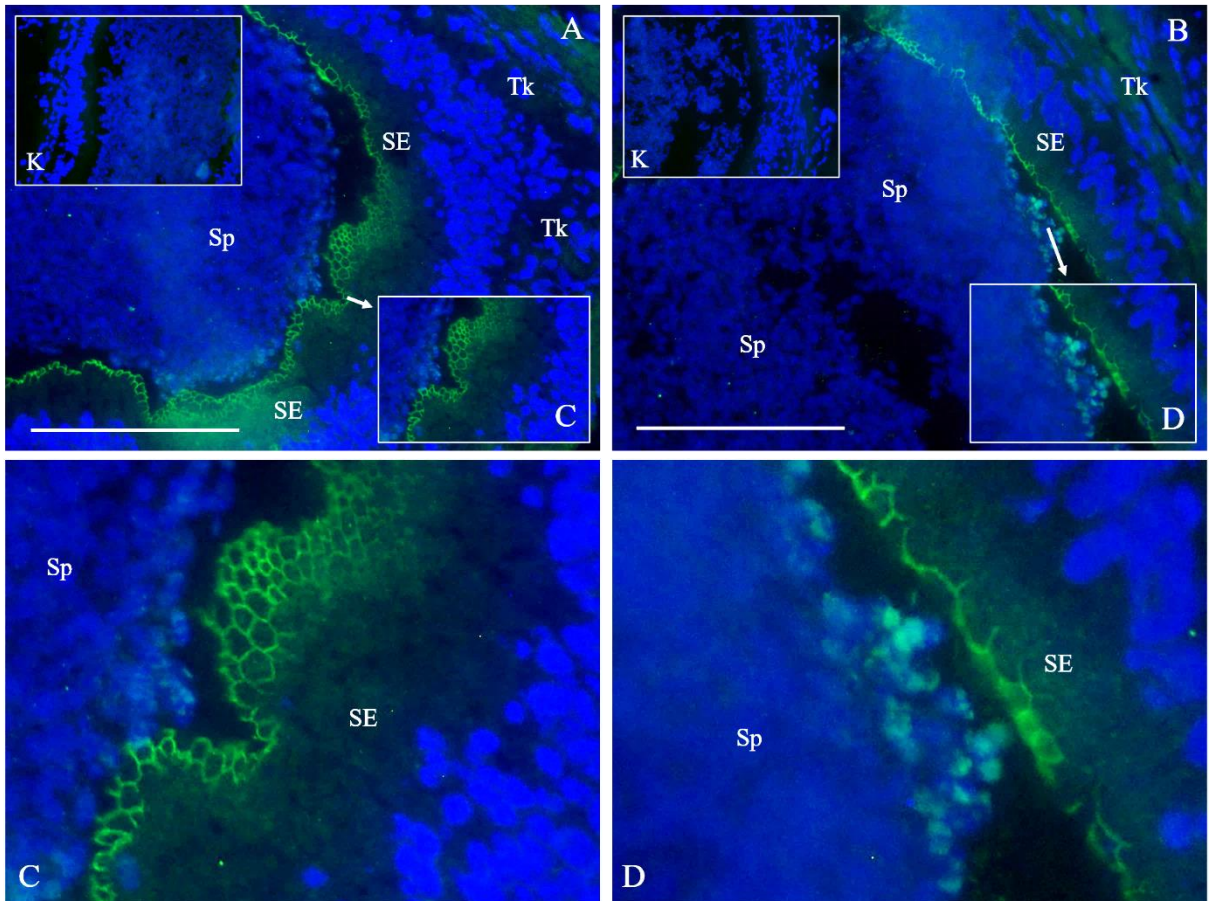
Metoda nepřímé fluorescenční mikroskopie (kap. 4.2.7) byla využita rovněž pro lokalizaci proteinu CD151 v suspenzi epididymálních, ejakulovaných kančích a hřebčích spermíích a kryorezech (kap. 4.2.2). Řezy i spermie byly inkubovány s primární protilátkou proti proteinu CD151 ab12536 a dále se sekundární protilátkou konjugovanou s FITC (zelená fluorescence). Jádra buněk jsou obarvená DAPI (modrá fluorescence) a akrozomy lektinem PNA (červená fluorescence). Řezy s lektinem PNA inkubovány nebyly, proto není na snímcích řezů patrný signál červené fluorescence. Kontroly, které jsou vždy u snímku uvedeny, nebyly inkubovány s primární protilátkou, ale pouze s PBS.

Jak je vidět na obrázku 26, protein CD151 byl lokalizován v kančích spermatických buňkách nacházejících se v semenotvorném kanálku varlete. V pravém dolním rohu se nachází zvětšené spermatické buňky pro lepší viditelnost. V pravém horním rohu snímku je umístěna negativní kontrola.



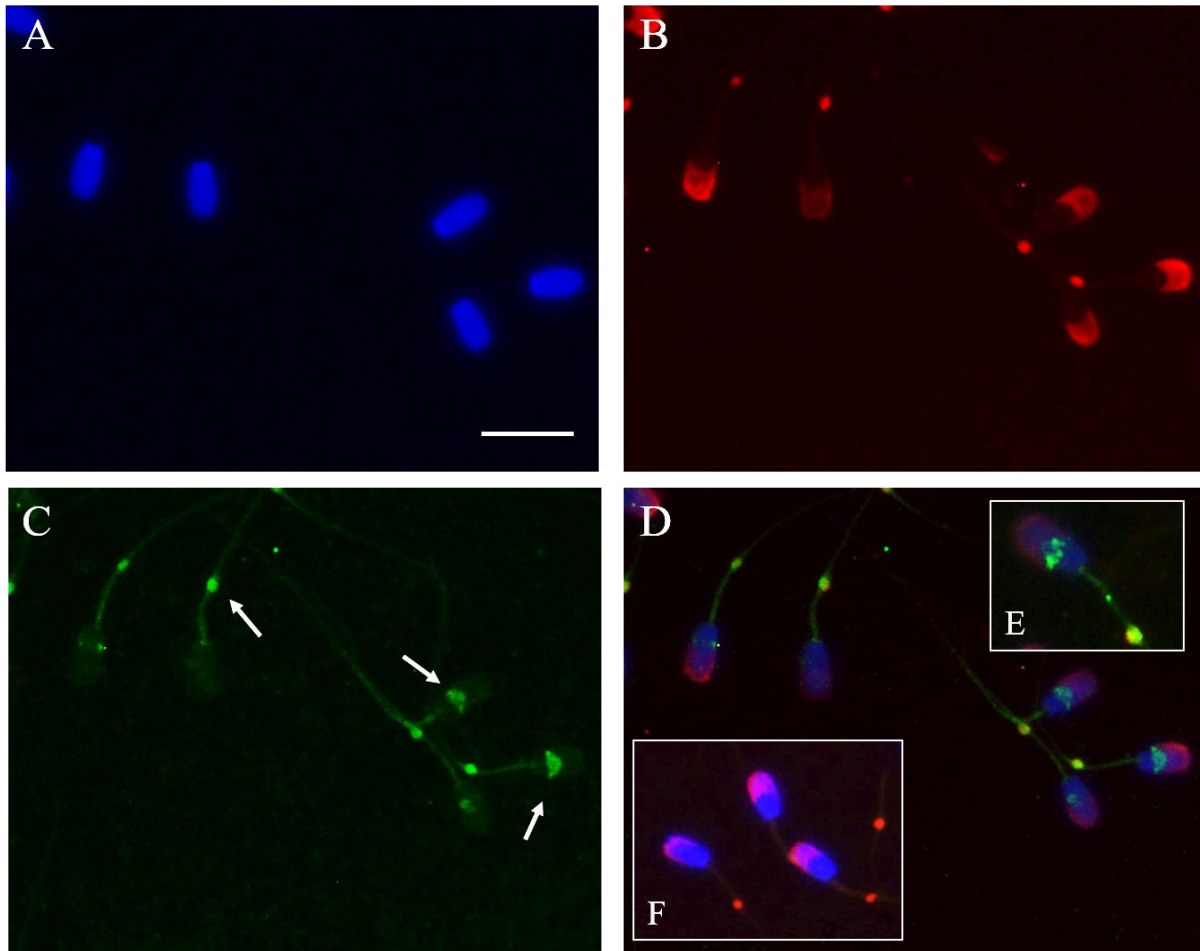
**Obrázek 26: Lokalizace proteinu CD151 v řezu kančího varlete pomocí protilátky ab125363:** Spc.b. – spermatické buňky, K – kontrola, měřítko 100  $\mu$ m, zvětšení 400x.

Obrázek 27 zobrazuje vazbu protilátky ab12536 na protein CD151 v řezu kančího ocasu (*cauda*) nadvarlete. Na snímcích A i B je zřetelná pozitivní reakce protilátky s proteinem CD151. Značení proteinu CD151 se nacházelo v tkáni ocasu (*cauda*) nadvarlete, v sekrečním epitelu, kde byly patrné jednotlivé sekreční váčky, a také ve spermíích, které byly v těsné blízkosti se sekrečními váčky (viditelné na zvětšených snímcích C a D). U snímků A a B jsou uvedeny kontroly K, které byly negativní.



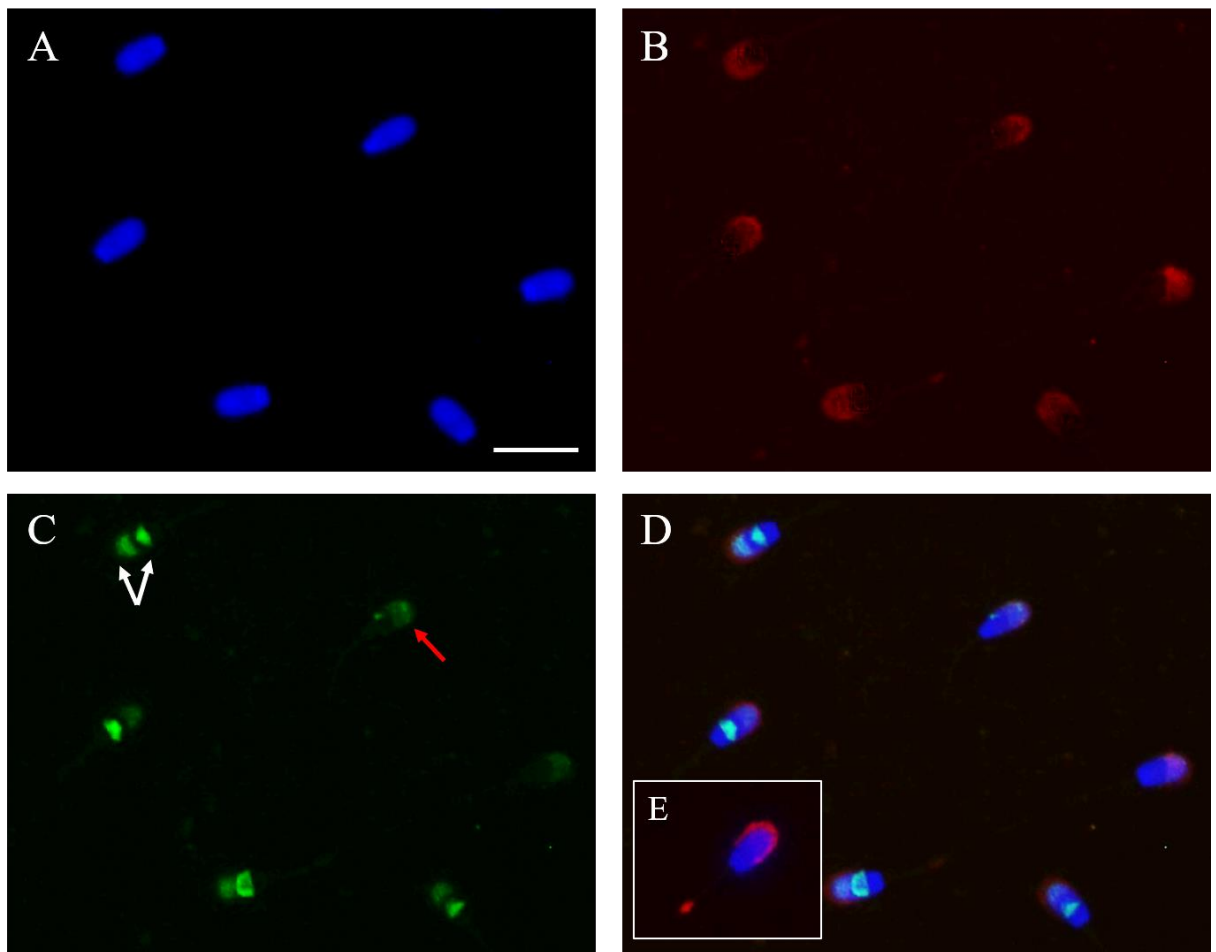
**Obrázek 27: Lokalizace proteinu CD151 v řezu kančího ocasu (*cauda*) nadvarlete pomocí protilátky **ab125363**: A – cauda epididymis, B – cauda epididymis, C, D – zvětšené snímky, Tk – tkáň, SE – sekreční epitel, Sp – spermie, K – kontrola, měřítko 100  $\mu$ m, zvětšení 400x.**

Lokalizace proteinu CD151 v epididymálních kančích spermích je zobrazena na obrázku 28. Vazba protilátky ab12536 na protein CD151 byla lokalizována v cytoplazmatické kapce a v subkvatoriálním segmentu hlavičky spermie. Na snímku E je zvětšená spermie. Kontrola s označením F je negativní.



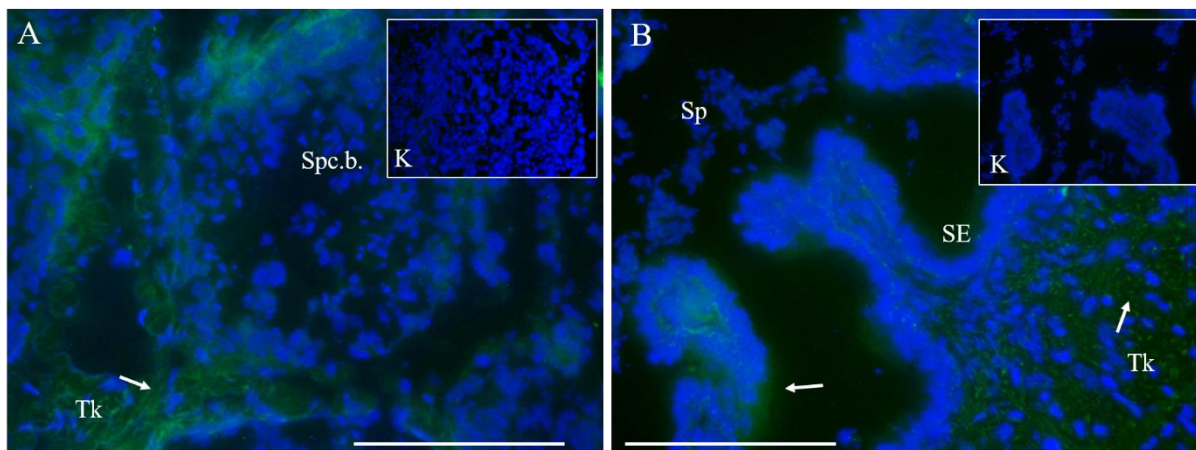
**Obrázek 28: Lokalizace proteinu CD151 v kančích epididymálních spermích pomocí protilátky ab125363:**  
 A – jádro značené DAPI, B – akrozom značený lektinem PNA, C – reakce s protilátkou proti CD151, D – složený obrázek (DAPI, FITC, PNA), E – zvětšený snímek spermie, F – negativní kontrola, šipky značí reakci s protilátkou ab12536 v subekvatoriálním segmentu hlavičky a v cytoplazmatické kapce, měřítko 10  $\mu\text{m}$ , zvětšení 400x.

U ejakulovaných spermíí byly patrné dvě subpopulace, u kterých byla rozdílná detekce vazby proteinu s protilátkou ab12536 (obr. 29). U subpopulace, do které patří spermie označená bílými šipkami, byla pozorována lokalizace proteinu CD151 silnějším signálem v subekvatoriálním segmentu hlavičky. O něco slabší signál byl detekovaný v anteriorní části akrozomu spermíí. U druhé subpopulace (červená šipka) chyběla lokalizace proteinu C151 v subekvatoriální části a slabý signál byl detekovaný pouze v akrozomální části hlavičky. Tato subpopulace byla zastoupena méně. Kontrola byla negativní a je zobrazena pod snímkem E.



**Obrázek 29: Lokalizace proteinu CD151 v kančích ejakulovaných spermích pomocí protilátky ab125363:**  
 A – jádro značené DAPI, B – akrozom značený lektinem PNA, C – reakce s protilátkou proti CD151, D – složený obrázek (DAPI, FITC, PNA), E – negativní kontrola, bílé šipky značí reakci s protilátkou ab12536 v akrozomálním a ekvatoriálním segmentu hlavičky, červená šipka značí reakci s protilátkou ab12536 v akrozomální oblasti hlavičky, měřítko 10  $\mu\text{m}$ , zvětšení 400x.

Na obrázku 30 jsou zobrazeny snímky s řezy hřebčího varlete a ocasu (*cauda*) nadvarlete. Snímek A zachycuje vazbu protilátky ab12536 na protein CD151 ve varletní tkáni. Protilátka značila intersticiální tkáň v okolí semenotvorného kanálku. Na snímku B je ukázán řez ocasem (*cauda*) nadvarlete, jenž byl inkubován také s protilátkou ab12536. Byla pozorována slabá vazba v intersticiální tkáni a sekrečním epitelu. Negativní kontroly pro oba snímky jsou v rozích pod označením K.

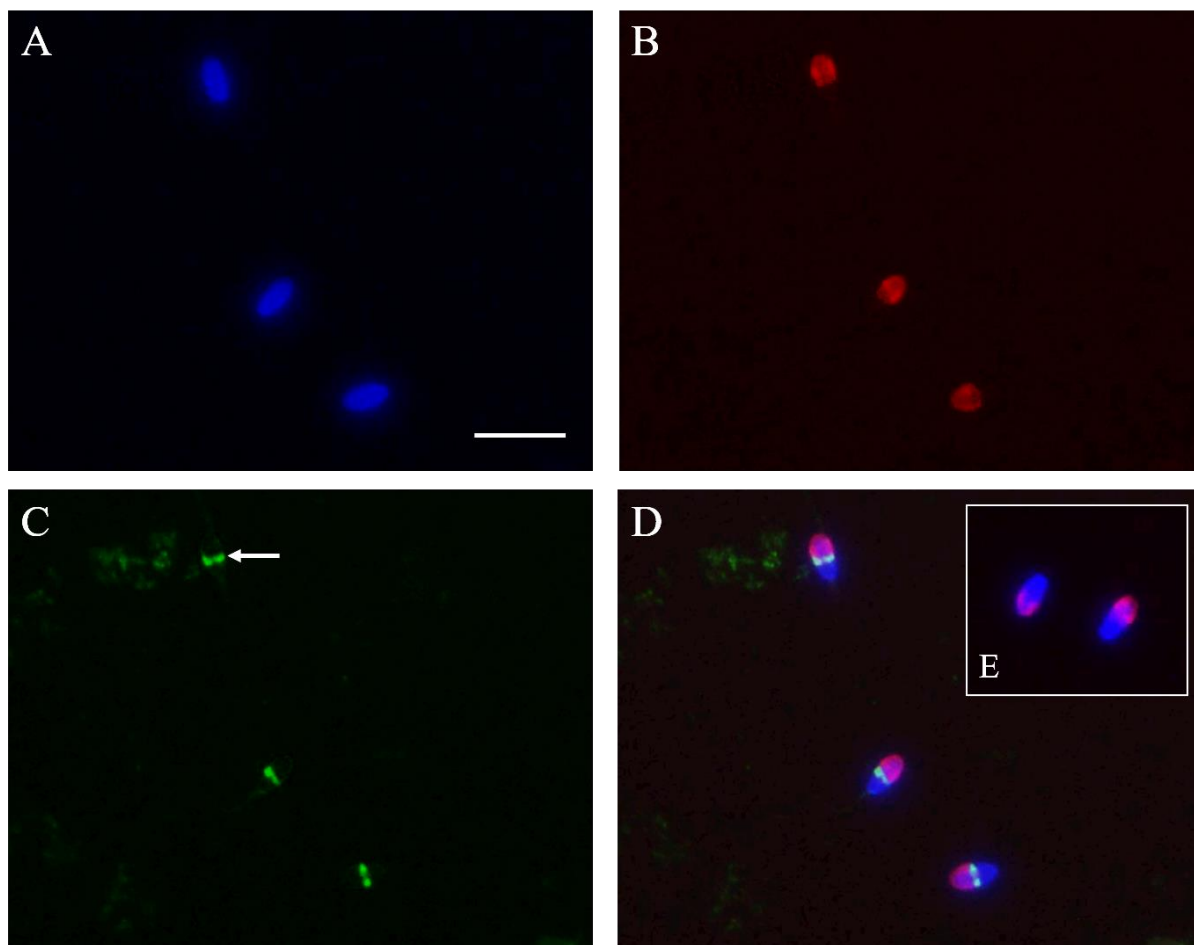


**Obrázek 30: Lokalizace proteinu CD151 v řezu hřebčího varlete a ocasu (*cauda*) nadvarlete pomocí protilátky ab125363:** A – testes, B – cauda epididymis, Spc.b. – spermatické buňky, Tk – tkáň, SE – sekreční epitel, Sp – spermie, K – kontrola, měřítko 100  $\mu\text{m}$ , zvětšení 400x.

Polyklonální králičí protilátka ab125363 byla použita na lokalizaci proteinu CD151 taktéž v hřebčích spermiiích a reprodukčních orgánech. U hřebčích epididymálních spermii, které byly izolované z ocasu (*cauda*) nadvarlete nebyla detekce proteinu CD151 úspěšná.

Na snímcích ejakulovaných hřebčích spermii (obr. 31) byla viditelná lokalizace proteinu CD151 v ekvatoriálním segmentu hlavičky spermie. Šipka označuje pozitivní reakci CD151 s protilátkou ab12536. Snímek negativní kontroly je vložen pod označením E.



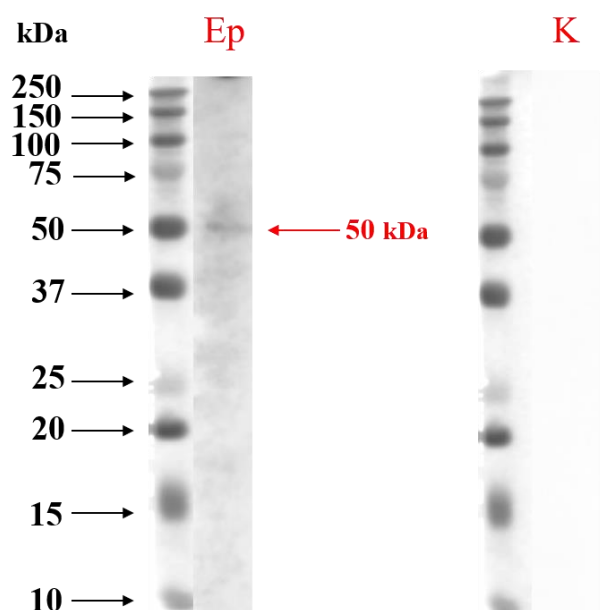


**Obrázek 31: Lokalizace proteinu CD151 v hřebčích ejakulovaných spermích pomocí protilátky ab125363:** A – jádro značené DAPI, B – akrozom značený lektinem PNA, C – reakce s protilátkou proti CD151, D – složený obrázek (DAPI, FITC, PNA), E – negativní kontrola, šipka značí reakci s protilátkou ab12536 v ekvatoriálním segmentu hlavičky, měřítko 10  $\mu\text{m}$ , zvětšení 400x.

## 5.6 Detekce tetraspaninu CD151 v extraktech spermíí

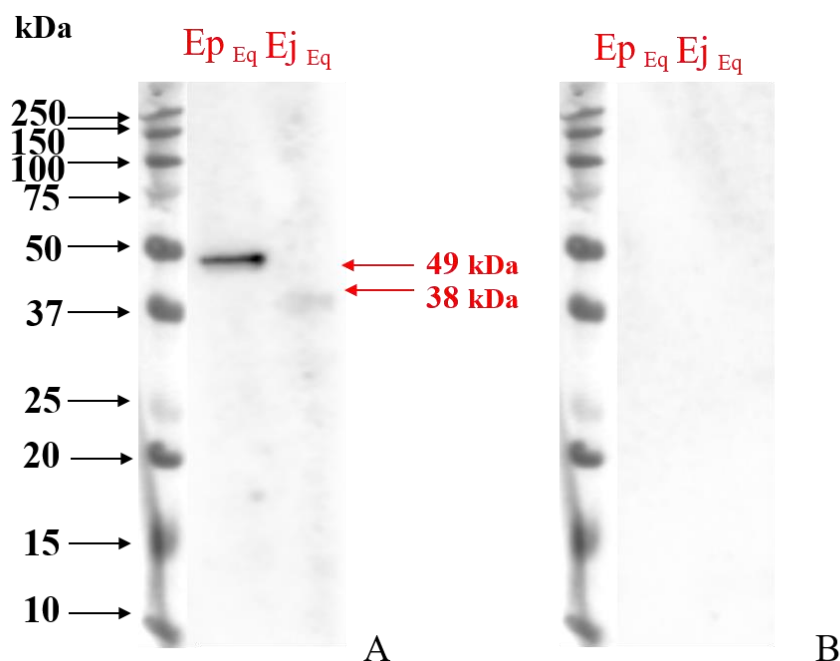
Z epididymálních a ejakulovaných kančích a hřebčích spermíí byly vyizolovány proteiny (kap. 4.2.3), které byly separovány pomocí SDS elektroforézy (kap. 4.2.4) a přeneseny metodou Western blot (kap. 4.2.5) na nitrocelulózovou membránu. Vyizolované proteiny byly detekovány pomocí polyklonální králičí protilátky proti tetraspaninu CD151 ab125363. U ejakulovaných kančích spermíí nebyla detekce proteinu CD151 úspěšná.

Membrána s proteinovými extrakty z epididymálních kančích spermíí, jež byla inkubována s polyklonální králičí protilátkou ab12536, je zobrazena na obrázku 32. Proteinový extrakt byl získán izolací s RIPA pufrem, močovinou a merkaptoethanolem (kap. 4.2.3.4). Na membráně označené Ep (epididymální spermie) byl detekován protein o molekulové hmotnosti přibližně 50 kDa. Je přiložena také membrána s označením K, která sloužila jako negativní kontrola.



**Obrázek 32: Imunodetekce proteinu CD151 v extraktech kančích epididymálních spermii pomocí protilátky ab125363: Ep – epididymální kančí spermie, K – kontrola.**

Na obrázku 33 na membráně A jsou vidět proteiny epididymálních a ejakulovaných hřebčích spermii, které byly detekovány polyklonální králičí protilátkou ab12536. Proteiny byly vyizolovány postupem s RIPA puřem v redukujících podmínkách (kap. 4.2.3.3). U epididymálních spermii byla detekována silnější vazba na protein o molekulové hmotnosti cca 49 kDa. Slabší vazba byla patrná u ejakulovaných hřebčích spermii, kde se jednalo o vazbu na protein o molekulové hmotnosti přibližně 38 kDa.



**Obrázek 33: Imunodetekce proteinu CD151 v extraktech epididymálních a ejakulovaných hřebčích spermii pomocí protilátky ab125363: A – membrána s vazbou protilátky na protein, B – kontrola, Ep<sub>Eq</sub> – epididymální hřebčí spermie, Ej<sub>Eq</sub> – ejakulované hřebčí spermie.**

## 6 Diskuze

Tetraspaniny jsou malé membránové proteiny spadající do rodiny příbuzných molekul, pro které jsou charakteristické čtyři transmembránové domény. Nejzásadnější vlastností tetraspaninů je jejich schopnost interagovat jednak mezi sebou, ale také s jinými povrchovými proteiny. Díky tomu jsou schopné vytvářet multimolekulární komplexy, tzv. tetraspaninovou síť. Pomocí těchto komplexů jsou tetraspaniny schopny ovlivňovat nejrůznější buněčné procesy týkající se somatických buněk i gamet (Rubinstein 2011).

Výzkumy tetraspaninů se v posledních letech snaží pochopit a popsat jejich funkci během oplození. Aby bylo možné funkci tetraspaninů v reprodukci zcela porozumět, je nezbytné, abychom o nich věděli co nejvíce. Tetraspaniny CD9, CD81 a CD151 již byly popsány na vaječné membráně několika savčích druhů, my jsme se proto zaměřili na detekci a lokalizaci těchto tří tetraspaninů v samčích reprodukčních orgánech a spermích u dvou savčích druhů – prasat a koní. V odborné literatuře není mnoho informací o lokalizaci a detekci těchto tetraspaninů u kanců; na hřebčím modelu tyto informace doposud neexistují. Naše výsledky jsou na hřebčím modelu tedy ojedinělé.

Přítomnost tetraspaninu CD9 byla potvrzena ve tkáni varlat potkanů (Kierszenbaum et al. 2006) a myši (Kanatsu-Shinohara et al. 2004). Detekce u obou savčích druhů byla zaznamenána ve spermatogoniích (Kanatsu-Shinohara et al. 2004; Kierszenbaum et al. 2006). Mimo spermatogonie byl tetraspanin CD9 také detekován v cytoplasmě myších zárodečných buněk varlat, ve spermatocytech a také ve spermatidách (Ito et al. 2010). Kaewmala et al. (2011) detekovali CD9 v zárodečných buňkách kančích varlat a rovněž v Leydigových a Sertoliho buňkách. Nicméně na snímcích u Kaewmala et al. (2011) nejsou zcela rozpoznatelné Sertoliho buňky, proto není jasné, zda jsou také značeny. My jsme pomocí polyklonální králičí protilátky MRP-1 detekovali tetraspanin CD9 ve spermatických buňkách uvnitř semenotvorných kanálků varlete jak u kanců, tak i u hřebců. Na základě našeho značení nebylo zcela možné určit jednotlivá vývojová stádia spermií. Navíc jsme vazbu protilátky s proteinem CD9 zaznamenali také v cytoplasmě Leydigových buněk v kančím varleti stejně jako Kaewmala et al. (2011).

O lokalizaci proteinu CD9 ve tkáních nadvarlete zatím nebylo v odborné literatuře mnoho publikováno. V řezu těla nadvarlete kance lokalizovali CD9 Kaewmala et al. (2011) a zaznamenali signál v epitelových buňkách, streociliích, fibromuskulárních buňkách a také ve spermích uvnitř kanálku. My jsme z důvodu nedostatečného množství čerstvého materiálu prováděli detekci u všech tří tetraspaninů pouze na kryorezech ocasu nadvarlete. Naše výsledky jak u kanců, tak u hřebců ukazují detekci CD9 ve spermích uvnitř kanálku nadvarlete a dále ve tkáni a sekrečním epitelu nadvarlete.

Lokalizaci všech tří tetraspaninů jsme prováděli pouze na epididymálních spermích izolovaných z ocasu nadvarlete. Na epididymálních spermích byl tetraspanin CD9 poprvé lokalizován na myších spermích, kde byl nalezen na vnitřní akrozomální membráně (Ito et al. 2010). Ve studii Frolíkova et al. (2018) se však ukázalo, že by protein CD9 mohl být u myši asociován s oběma akrozomálními membránami. Také v prasečích epididymálních spermích byl CD9 již detekován, a to v řezu těla nadvarlete. Kaewmala et al. (2011) detekovali přítomnost CD9 v akrozomálním regionu a akrozomální membráně epididymální kančí spermie. V naší studii není protilátkou zcela zřetelně značen akrozom kančích epididymálních spermií, pokud jej mají neporušený. U spermií, které již akrozom nemají, je zřetelná vazba

protilátky na protein CD9 na vnitřní akrozomální membráně. Slabý fluorescenční signál CD9 protilátky může být pravděpodobně z důvodu překrytí vnitřní akrozomální membrány akrozomálním obsahem a epitop není pro protilátku dobře přístupný. Přibližně u poloviny spermií jsme pozorovali lokalizaci rovněž v krčku. Detekce CD9 u hřebčích epididymálních spermií byla negativní. Možným důvodem bylo poškození spermií u starého preparátu.

Li et al. (2004) se pokusili detekovat CD9 na ejakulovaných prasečích spermiích, které byly předtím zmrazené v tekutém dusíku. Výsledek byl však negativní. Vzhledem k citlivosti prasečích spermií na zmrazení by podle Kaewmala et al. (2011) mohl být důvodem právě tekutý dusík. My jsme lokalizovali CD9 u prasečích čerstvých ejakulovaných spermií s neporušenými akrozomy v oblasti akrozomu. Taktéž jsme zaznamenali různou intenzitu vazby polyklonální králičí protilátky MRP-1 na protein CD9 na vnitřní akrozomální membráně u spermií, jež měly akrozomy porušené. Zhruba u poloviny spermií jsme detekovali také fluorescenční signál v krčku. Lokalizace CD9 u ejakulovaných kančích spermií s neporušenými akrozomy může být zapříčiněna typem fixace. Metoda vlhké fixace, jež jsme použili, může narušovat samotný epitop proteinu rozpoznávaný protilátkou. Pro toto potvrzení by bylo nutné neprovádět lokalizaci CD9 na již fixovaných spermiích, nýbrž v suspenzi spermií, stejně jako to provedli Jankovicova et al. (2020) u tetraspaninu CD151 na lidských spermiích. Tetraspanin CD9 jsme detekovali rovněž v hřebčích ejakulovaných spermiích, kdy jsme zaznamenali vazbu protilátky na protein v oblasti akrozomu a krčku spermie. Úspěšně byl tetraspanin CD9 také lokalizován na ejakulovaných spermiích býků (Antalíkova et al. 2015). Vzhledem k obtížné přesné lokalizaci CD9 provedli Antalíkova et al. (2015) frakcionaci membrán a zjistili, že CD9 je u býků lokalizován na plazmatické membráně a po akrozomální reakci zcela mizí z hlavičky spermie. U člověka je CD9 lokalizován v apikální oblasti akrozomu a po AR zůstává přítomen na vnitřní akrozomální membráně (Frolikova et al. 2018).

Informace o detekci proteinu CD9 pomocí metody Western blot v epididymálních kančích spermiích v odborné literatuře chybí. Kaewmala et al. (2011) prováděli detekci proteinu CD9 z extraktů kančí tkáň těla a ocasu nadvarlete a detekovali protein o molekulové hmotnosti 24 kDa (Kaewmala et al. 2011). My jsme u extraktu epididymálních kančích spermií našli reakci polyklonální králičí protilátky MRP-1 u proteinu o molekulové hmotnosti 26 kDa. Protein CD9 byl také detekován u myších epididymálních spermií. Frolikova et al. (2018) pozorovali proteinové pruhy v molekulových hmotnostech 45, 75 a 160 kDa. Rozdíl v našich výsledcích a výsledcích Frolikova et al. (2018) může být zapříčiněn odlišnými podmínkami během izolace proteinů. V našem případě byla zvolena izolace v redukcujících podmínkách, kdežto ve studii Frolikova et al. (2018) byly zvoleny neredukující podmínky, kdy nebyly redukovány disulfidové můstky mezi proteiny. U vyšších molekulových hmotností se ve výsledcích Frolikova et al. (2018) jedná pravděpodobně o komplexy tvořené CD9 s jinými molekulami.

Z extraktu epididymálních hřebčích spermií jsme stejnou protilátkou detekovali proteiny o hmotnostech 28, 48 a 54 kDa. V případě proteinových pruhů o hmotnostech 48 a 54 kDa se pravděpodobně jednalo o nespecifické vazby zapříčiněné výběrem primární protilátky a její úzkou specifitou. U proteinu o velikosti 28 kDa můžeme předpokládat, že se jedná o protein CD9. Nicméně pro potvrzení, zda se opravdu jednalo o námi hledaný protein CD9, by bylo zapotřebí provést identifikaci proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie, protože molekula CD9 nebyla doposud ve spermiích hřebce popsána.

V extraktech kančích ejakulovaných spermii jsme tetraspanin CD9 detekovali protein o molekulové hmotnosti 28 kDa. CD9 v ejakulovaných spermii byl popsán u býků, a to o molekulové hmotnosti 25 kDa (Antalikova et al. 2015) a také u člověka (Frolikova et al. 2018), kdy byly v neredukujících podmínkách pozorovány proteinové pruhy o molekulových hmotnostech 20, 25, 60 a 100 kDa. V případě detekce proteinových pruhů o 60 kDa a vyšších se pravděpodobně jedná o kovalentní molekulové komplexy (Frolikova et al. 2018). Rozdíl v molekulové hmotnosti námi nalezeného proteinu u kance (28 kDa) může být způsobený výsledkem posttranslačních úprav jako např. glykosylace či palmitoylace (Boucheix et al. 1991; Rubinstein et al. 1993; Engering et al. 2003; Caballero et al. 2013). U hřebčích ejakulovaných spermii jsme detekovali protein o velmi podobné molekulové hmotnosti jako u býků (Antalikova et al. 2015) a lidí (Frolikova et al. 2018), a to 26 kDa.

Pro detekci proteinu CD9 v extraktech epididymálních a ejakulovaných kančích i hřebčích spermii jsme dále použili monoklonální potkaní protilátku KMC8.8. Detekce touto protilátkou však nebyla úspěšná. Proteinové pruhy o molekulových hmotnostech 33 kDa u epididymálních kančích spermii a 36 kDa u epididymálních hřebčích spermii se nacházely také v kontrole. Při použití monoklonální myší protilátky C-4 jsme pozorovali proteinový pruh o hmotnosti 30 kDa, který se taktéž nacházel i v kontrolní membráně. Důvodem těchto nespecifických reakcí je opět výběr primárních protilátek a jejich úzká specifita.

Lokalizace tetraspaninu CD81 v reprodukčních tkáních kanců a hřebců nebo v jejich epididymálních a ejakulovaných spermii pomocí kozí polyklonální protilátky Q-14 byla v naší studii negativní. Důvodem může být úzká specifita vybrané primární protilátky. Lokalizaci CD81 v tkáních kančích a hřebčích varlat a nadvarlat pomocí polyklonální králičí protilátky H121 jsme neprováděli z důvodu jejího nedostatečného množství. Nicméně Kierszenbaum et al. (2006) detekovali CD81 ve spermatogoniích ve varlatech potkanů a prozatím zůstávají jediní, kteří tetraspanin CD81 v reprodukčních orgánech samců detekovali.

Také imunolokalizace CD81 polyklonální králičí protilátkou H121 v epididymálních spermii kanců a hřebců byla v našem případě negativní. Jankovicova et al. (2016) popsali lokalizaci CD81 u býků a myší. Na býčích epididymálních spermii byla vazba stejnou polyklonální králičí protilátkou H121 zaznamenána v apikální oblasti akrozomu a v části populace byl fluorescenční signál zachycen také v ekvatoriálním segmentu hlavičky. U myších spermii byl CD81 lokalizován pomocí polyklonální kozí protilátky Q-14 v plazmatické membráně pokrývající akrozom (Jankovicova et al. 2016).

Naše výsledky lokalizace proteinu CD81 u ejakulovaných kančích spermii korespondují s výsledky Jankovicova et al. (2016). Taktéž jsme u kanců zaznamenali výraznou vazbu polyklonální králičí protilátky H121 s proteinem CD81 v apikální části akrozomu. Pro potvrzení, zda se jedná o plazmatickou membránu, by bylo nutné provést další zkoumání s provedením např. frakcionace všech tří membrán pokrývajících spermii nebo využít techniku s vyšší rozlišovací schopností. Protein CD81 byl lokalizován taktéž v ejakulovaných spermii člověka. Frolikova et al. (2018) použili polyklonální kozí protilátku Q-14 a lokalizovali CD81 v apikální akrozomální membráně a částečně v postakrozomální části hlavičky. Pro lokalizaci u ejakulovaných hřebčích spermii jsme použili totožnou protilátku jako u kančích spermii, nicméně detekce CD81 nebyla úspěšná.

Detekci proteinu CD81 v extraktech epididymálních kančích spermií jsme prováděli pomocí dvou protilátek, a to jednak polyklonální králičí protilátky H121 a jednak polyklonální kozí protilátky Q-14. Detekce oběma protilátkami byla v případě kančích spermií negativní. Nicméně u hřebčích epididymálních spermií jsme při použití protilátky H121 detekovali protein o molekulové hmotnosti 28 kDa. Frolikova et al. (2018) použili u detekce tetraspaninu CD81 u epididymálních myších spermií stejnou protilátku a detekovali proteinové pruhy o molekulových hmotnostech 45, 75 a 160 kDa. Podobně jako u proteinu CD9 se v případě proteinu CD81 u studie Frolikova et al. (2018) nejspíše jedná o komplexy CD81 s jinými molekulami. Může se také jednat o dimery CD81, o kterých je známo, že se spojují kovalentními vazbami a tvoří tak rozsáhlé tetraspaninové sítě (Stipp et al. 2001; Frolikova et al. 2018).

V extraktech ejakulovaných spermií jsme detekovali CD81 pouze u kančích spermií. Použili jsme polyklonální králičí protilátku H121 a zaznamenali jsme vazbu na proteiny o molekulové hmotnosti 12, 25 a 26 kDa. Detekce proteinu o velikosti 12 kDa může ukazovat na zkrácenou či odštěpenou formu proteinu Za použití stejné protilátky Frolikova et al. (2018) detekovali u lidských ejakulovaných spermií protein o hmotnosti 48 kDa a se slabším signálem proteiny o hmotnostech 75 a 100 kDa, kdy se opět zřejmě jednalo o molekulové komplexy.

Výsledky detekce CD81 s polyklonální kozí protilátkou Q-14 byly negativní. Při detekci CD81 v extraktech epididymálních hřebčích spermií jsme pozorovali dva proteinové pruhy o hmotnostech 48 a 65 kDa. Jednalo se o nespecifickou vazbu, neboť jsme ji zaznamenali také v kontrolní membráně.

O detekci a lokalizaci tetraspaninu CD151 na samčích gametách není v odborné literatuře publikováno mnoho. My jsme v kryořezech kančích varlat lokalizovali CD151 na spermatických buňkách. Stejný výsledek publikovali Jankovicova et al. (2020) u myši a býků, kteří se zatím jako jediní věnovali výzkumu CD151 v samčích reprodukčních orgánech a spermiích. V našich výsledcích u hřebců protilátka proti CD151 neznačila spermatické buňky v semenotvorných kanálcích varlat, zaznamenali jsme však slabý signál v intersticiální tkáni. V tomto případě by izotypová kontrola odhalila, zda se jednalo o specifickou, či nespecifickou reakci.

Protein CD151 byl lokalizován v kryořezech všech částí byčích nadvarlat, kde byl fluorescenční signál zachycen na spermiích (Jankovičova et al. 2020). V naší studii stejná protilátka zřetelně značila sekreční epitel a jednotlivé váčky, jež se z něj oddělují. Dále jsme zachytili fluorescenční signál ve spermiích, které se nacházely buď v těsném kontaktu s váčky, nebo byly v jejich blízkosti. Může se zde jednat o přenos proteinu CD151 extracelulárními vezikuly během epididymální maturace v ocasu nadvarlete, stejně jako to bylo popsáno u býků a tetraspaninu CD9 (Caballero et al. 2013). Jiným důvodem pro nalezení fluorescenčního signálu pouze na spermiích nacházejících se zkraje kanálku nadvarlete může být velký shluk spermií v kanálku nadvarlete, což by mohlo zapříčinit, že epitop byl špatně přístupný pro protilátku. Stejně jako v případě lokalizace CD151 v kryořezech varlete hřebců, i v nadvarleti hřebců jsme zaznamenali pouze slabý fluorescenční signál v tkáni a sekrečním epitelu.

Na epididymálních kančích spermiích jsme lokalizovali CD151 v subekvatoriálním segmentu a v cytoplazmatické kapénce. U hřebců byl výsledek negativní nejspíše z důvodu poškození spermií. Jankovicova et al. (2020) lokalizovali CD151 na myších a býčích epididymálních spermiích v místě vnitřní akrozomální membrány a v ekvatoriálního segmentu. Tento výsledek potvrdili také pomocí Western blot analýzy, kde byly patrné proteinové pruhy právě ve frakci vnitřní akrozomální membrány.

Také informace o lokalizaci proteinu CD151 pomocí nepřímé fluorescenční mikroskopie u ejakulovaných spermií přináší pouze studie od Jankovicova et al. (2020). Podle ní byl u lidských spermií tetraspanin CD151 nalezen v ekvatoriálním segmentu a po akrozomální reakci také na vnitřní akrozomální membráně a stejné výsledky byly zjištěny u býčích ejakulovaných spermií. My jsme lokalizovali CD151 na kančích ejakulovaných spermiích, kde nám protilátka značila subekvatoriální segment. Slabší signál jsme detekovali také v akrozomální oblasti hlavičky, což může být způsobeno mírným poškozením akrozomu. Protilátka by se tedy mohla vázat do oblasti vnitřní akrozomální membrány, stejně jako tomu je u býčích či lidských spermií. U hřebčích ejakulovaných spermií jsme lokalizovali CD151 pouze v ekvatoriálním segmentu. To může být naopak důsledek překrytí vnitřní akrozomální membrány akrozomálním obsahem a vnější akrozomální membránou. Abychom tyto předpoklady mohli potvrdit, bylo by nutné provést např. již zmiňovanou frakcionaci membrán či lokalizaci CD151 u kančích a hřebčích spermií po akrozomální reakci.

V extraktu kančích epididymálních spermií jsme pomocí protilátky proti CD151 detekovali protein o molekulové hmotnosti 50 kDa a u hřebčích spermií protein o hmotnosti 49 kDa. Pro získání našich výsledků detekce proteinu CD151 jsme použili polyklonální králičí protilátku ab125363 (Abcam). Tutéž protilátku použili ve své studii i Jankovicova et al. (2020), kteří v extraktu epididymálních myších spermií detekovali CD151 jako proteiny o molekulových hmotnostech 32 a 35 kDa. Pro bližší lokalizaci CD151 provedli detekci v membránových frakcích spermií, kdy zaznamenali proteiny o stejných velikostech a také navíc protein o hmotnosti 38 kDa ve frakci vnitřní akrozomální membrány. Vzhledem k velikosti proteinu CD151, která je 27-28 kDa (Fitter et al. 1995; Boucheix & Rubinstein 2001), je podle Jankovicova et al. (2020) pravděpodobné, že se u proteinů, které detekovali, jedná o glykosylované izoformy proteinu CD151. Glykosylační místo v proteinu CD151 již bylo popsáno (Fitter et al. 1995), a je tedy možné, že i u námi detekovaného kančího a hřebčího proteinu se jedná o glykosylovanou izoformu s rozsáhlejším sacharidovým řetězem, který udělí proteinu vyšší molekulovou hmotnost.

Námi provedená detekce CD151 v extraktu kančích ejakulovaných spermií nebyla úspěšná. Nicméně u hřebčích ejakulovaných spermií jsme opět pomocí polyklonální králičí protilátky ab125363 detekovali protein o molekulové hmotnosti 38 kDa, což koresponduje s výsledky Jankovicova et al. (2020). Zdá se, že taktéž u těchto výsledků se jedná o glykosylovanou izoformu proteinu CD151. V lidských spermiích byly detekovány proteiny o molekulových hmotnostech 28 a 35 kDa (Jankovicova et al. 2020).

## 7 Závěr

Tato práce je úvodní studií detekce a lokalizace tetraspaninů CD9, CD81 a CD151 v kančích a hřebčích reprodukčních orgánech a spermiiích. Vycházeli jsme v ní z hypotézy, že tetraspaniny, které byly původně detekovány a lokalizovány na plazmatické membráně savčího vajíčka, budou taktéž popsány v membránách savčích spermiiích. Cílem práce byla detekce a lokalizace uvedených tetraspaninů: (1) v reprodukčních orgánech prasete a hřebce a (2) ve spermiiích prasete a hřebce.

Tetraspanin CD9 byl pomocí specifických protilátek lokalizován ve spermatických buňkách semenotvorného kanálku kančích i hřebčích varlat. U kančího modelu byl fluorescenční signál navíc zachycen také v Leydigových buňkách. Lokalizace CD9 byla prokázána v sekrečním epitelu, tkáni a spermiiích uvnitř kanálku nadvarlete jak kanců, tak hřebců. U epididymálních kančích spermiiích byl tetraspanin CD9 lokalizován na vnitřní akrozomální membráně. Stejný výsledek byl rovněž u ejakulovaných kančích spermiiích. Tato zjištění byla podpořena také detekcí proteinu CD9 v extraktech epididymálních spermiiích, kde byl nalezen protein o molekulové hmotnosti 26 kDa. V extraktu ejakulovaných spermiiích jsme detekovali protein o hmotnosti 28 kDa. Výsledky lokalizace tetraspaninu CD9 u epididymálních hřebčích spermiiích byly negativní. U ejakulovaných hřebčích spermiiích protilátka proti CD9 značila akrozomálních oblast. Také u hřebců byly nalezeny proteiny v extraktech epididymálních spermiiích, a to o molekulových hmotnostech 28, 48 a 54 kDa. Protein o hmotnosti 26 kDa byl detekován v extraktech ejakulovaných hřebčích spermiiích.

Výsledky detekce a lokalizace tetraspaninu CD81 byly převážně negativní. Lokalizován byl v apikální oblasti akrozomu u ejakulovaných kančích spermiiích. Tento výsledek byl podpořen také detekcí proteinů o molekulové hmotnosti 12, 25 a 26 kDa v extraktu ejakulovaných kančích spermiiích. V extraktu epididymálních hřebčích spermiiích byl detekován protein o molekulové hmotnosti 28 kDa. Zbývající výsledky u kančího a hřebčího modelu byly negativní.

Lokalizace tetraspaninu CD151 v kančích varlatech byla zaznamenána ve spermatických buňkách semenotvorného kanálku. U hřebců byla zaznamenána slabá vazba protilátky proti CD151 v intersticiální tkáni varlete a v sekrečním epitelu a tkáni nadvarlete. V kančím nadvarletí byl CD151 lokalizován v sekrečním epitelu, v oddělovacích se váčcích a ve spermiiích, které se nacházely zkráje kanálku nadvarlete. V epididymálních a ejakulovaných spermiiích kance byl CD151 lokalizován v subekvatoriálním segmentu. U ejakulovaných kančích spermiiích navíc také v oblasti akrozomu. Výsledek lokalizace tetraspaninu CD151 byl u epididymálních hřebčích spermiiích negativní. U ejakulovaných hřebčích spermiiích byl CD151 nalezen v ekvatoriálním segmentu. Tento protein byl také detekován v extraktech epididymálních spermiiích kanců, a to jak u kančího modelu, kde byl nalezen protein o molekulové hmotnosti 50 kDa, tak u hřebčího modelu, kde byl zaznamenán protein o hmotnosti 49 kDa. Detekce proteinu CD151 v extraktu ejakulovaných kančích spermiiích byla negativní. U hřebčích ejakulovaných spermiiích byl detekován protein o molekulové hmotnosti 38 kDa.



Z těchto výsledků vyplývá, že stanovená hypotéza o detekci tetraspaninů v membránách savčích spermii byla potvrzena. Přestože do budoucna bude třeba shromáždit více detailnějších informací právě o detekci a lokalizaci tetraspaninů, abychom získali komplexnější přehled o zapojení těchto molekul v reprodukčních procesech, přináší tato práce zcela nové informace o detekci a lokalizaci CD9, CD81 a CD151 u prasat a především pak u koní.

## 8 Literatura

- Alonso, CAI et al. 2017. Extracellular cAMP activates molecular signalling pathways associated with sperm capacitation in bovines. *MHR: Basic science of reproductive medicine* **23**:521–534.
- Andreu Z, Yáñez-Mó M. 2014. Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. *Frontiers in Immunology* **5**.
- Antalíková J, Jankovicova J, Simon M, Cupperová P, Michalková K, Horovská L. 2015. Localization of CD9 Molecule on Bull Spermatozoa: Its Involvement in the Sperm-Egg Interaction. *Reproduction in Domestic Animals* **50**:423-430.
- Austin C, Bishop M. 1958. Some features of the acrosome and perforatorium in mammalian spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* **149**:234-240.
- Austin, CR 1951. Observations on the Penetration of the Sperm into the Mammalian Egg. *Australian Journal of Biological Sciences* **4**:581-96.
- Austin, CR. 1952. The ‘Capacitation’ of the Mammalian Sperm. *Nature* **170**:326-326.
- Barranco I, Padilla L, Parrilla I, Álvarez-Barrientos A, Pérez-Patiño C, Peña FJ, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J. 2019. Extracellular vesicles isolated from porcine seminal plasma exhibit different tetraspanin expression profiles. *Scientific Reports* **9**.
- Bellve A. 1977. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse: isolation and morphological characterization. *The Journal of Cell Biology* **74**:68-85.
- Berditchevski F, Odintsova E, Sawada S, Gilbert E. 2002. Expression of the Palmitoylation-deficient CD151 Weakens the Association of  $\alpha 3 \beta 1$  Integrin with the Tetraspanin-enriched Microdomains and Affects Integrin-dependent Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **277**:36991-37000.
- Berditchevski F, Odintsova E. 1999. Characterization of Integrin–Tetraspanin Adhesion Complexes. *The Journal of Cell Biology* **146**:477-492.
- Berruti G. 2016. Towards defining an ‘origin’—The case for the mammalian acrosome. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **59**:46-53.
- Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* **508**:483-487.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1980a. 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. 1980b. Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Developmental Biology* **76**:185-202.

- Boucheix C, Benoit P, Billard M, Frachet P, Billard M, Worthington RE, Uzan G. 1991. Molecular Cloning of the CD9 Antigen: a new family of cell surface proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **266**:117-122.
- Boucheix C, Rubinstein E, 2001. Tetraspanins. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**:1189-1205.
- Buffone MG, Zhuang T, Ord TS, Hui L, Moss SB, Gerton GL. 2008. Recombinant Mouse Sperm ZP3-binding Protein (ZP3R/sp56) Forms a High Order Oligomer That Binds Eggs and Inhibits Mouse Fertilization in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* **283**:12438-12445.
- Busso D, Cohen DJ, Maldera JA, Dematteis A, Cuasnicu PS. 2007a. A Novel Function for CRISP1 in Rodent Fertilization: Involvement in Sperm-Zona Pellucida Interaction1. *Biology of Reproduction* **77**:848-854.
- Busso D, Goldweic NM, Hayashi M, Kasahara M, Cuasnicú PS. 2007b. Evidence for the Involvement of Testicular Protein CRISP2 in Mouse Sperm-Egg Fusion1. *Biology of Reproduction* **76**:701-708.
- Caballero JN, Frenette G, Belleannée C, Sullivan R, Drevet JR. 2013. CD9-Positive Microvesicles Mediate the Transfer of Molecules to Bovine Spermatozoa during Epididymal Maturation. *PLoS ONE* **8**.
- Cormier EG, Tsamis F, Kajumo F, Durso RJ, Gardner JP, Dragic. 2004. CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**:7270-7274.
- Cosson J. 1996. A Moving Image Of Flagella: News And Views On The Mechanisms Involved In Axonemal Beating. *Cell Biology International* **20**:83-94.
- Cupperová P, Simon S, Antalíková J, Hluchý S, Hluchý S. 2014. Distribution of tetraspanin family protein CD9 in bull reproductive system. *Czech J. Anim. Sci.* **59**:134-139.
- Dacheux J, Castella S, Gatti J, Dacheux F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* **63**:319-341.
- Dacheux J, Dacheux F, Druart X. 2016. Epididymal protein markers and fertility. *Animal Reproduction Science* **169**:76-87.
- Dam A, Feenstra I, Westphal J, Ramos L, van Golde R, Kremer J. 2007. Globozoospermia revisited. *Human Reproduction Update* **13**:63-75.
- De Jonge C, 2005. Biological basis for human capacitation. *Human Reproduction Update* **11**:205-214.
- Deventer SJ van, Dunlock V-ME, van Spriel AB. 2017. Molecular interactions shaping the tetraspanin web. *Biochemical Society Transactions* **45**:741-750.
- Dresselhaus T, Sprunck S, Wessel G M. 2016. Fertilization Mechanisms in Flowering Plants. *Current Biology* **26**:R125-R139.

- Dvorakova K, Moore H, Sebkova N, Palecek J. 2005. Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction* **130**:61-69.
- Ecroyd H, Sarradin P, Dacheux J, Gatti J. 2004. Compartmentalization of Prion Isoforms Within the Reproductive Tract of the Ram1. *Biology of Reproduction* **71**:993-1001.
- Eddy E. 2006. The Spermatozoon. Pages 3-55 in J. Neill, editor., J. Challis, editor., D. Pfaff, editor., T. Plant, editor., D. Kretser, editor., J. Richards, editor. and P. Wassarman, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3rd ed.. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Ellerman DA, Pei J, Gupta S, Snell WJ, Myles D, Primakoff P. 2009. Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. *Molecular Reproduction and Development* **76**:1188-1199.
- Engering A, Kuhn L, Fluitsma D, Hoefsmit E, Pieters J. 2003. Differential post-translational modification of CD63 molecules during maturation of human dendritic cells. *European Journal of Biochemistry* **270**:2412-2420.
- 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.
- Fábryová K, Simon M. 2009. Function of the cell surface molecules (CD molecules) in the reproduction processes. *Gen. Physiol. Biophys.* **28**:1-7.
- Fawcett D. 1975. The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology* **44**:394-436.
- Fitter S, Sincock PM, Jolliffe CN, Ashman LK. 1999. Transmembrane 4 superfamily protein CD151 (PETA-3) associates with  $\beta 1$  and  $\alpha IIb\beta 3$  integrins in haemopoietic cell lines and modulates cell-cell adhesion. *Biochemical Journal* **338**:61-70.
- Fitter S, Tetaz TJ, Berndt MC, Ashman LK. 1995. Molecular cloning of cDNA encoding a novel platelet-endothelial cell tetra-span antigen, PETA-3. *Blood* **86**:1348-1355.
- Frenette G, Lessard C, Sullivan R. 2002. Selected Proteins of "Prostasome-Like Particles" from Epididymal Cauda Fluid Are Transferred to Epididymal Caput Spermatozoa in Bull1. *Biology of Reproduction* **67**:308-313.
- Frenette G, Sullivan R. 2001. Prostasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Mol Reprod Dev* **59**:115-121.
- Frolikova M, Manaskova-Postlerova P, Cerny J, Jankovicova J, Simonik O, Pohlova A, Secova P, Antalikova J, Dvorakova-Hortova K. 2018. CD9 and CD81 Interactions and Their Structural Modelling in Sperm Prior to Fertilization. *International Journal of Molecular Sciences* **19**.
- Frolikova M, Stopkova R, Antalikova J, Johnson PM, Stopka P, Dvorakova-Hortova K. 2012. Role of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 in reproduction. *Folia Zoologica* **61**:84-94.
- Gaffney E, Gadêlha H, Smith D, Blake J, Kirkman-Brown J. 2011. Mammalian Sperm Motility: Observation and Theory. *Annual Review of Fluid Mechanics* **43**:501-528.

- 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.
- Garcia-España A, Chung P-J, Sarkar IN, Stiner E, Sun T-T, DeSalle R. 2008. Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution. *Genomics* **91**:326-334.
- Garner D, Hafez E. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. Pages 96-109 in B. Hafez, editor. and E. Hafez, editor. *Reproduction in Farm Animals*, 7th ed.. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- Gilula N. 1978. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *The Journal of Cell Biology* **78**:58-75.
- Griffiths G, Galileo D, Reese K, Martin-DeLeon P. 2008. Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. *Molecular Reproduction and Development* **75**:1627-1636.
- Grimalt P, Bertini F, Fornes M. 2009. High-affinity sites for beta -d-galactosidase on membrane-bound vesicles isolated from rat epididymal fluid. *Archives of Andrology* **44**:85-91.
- Gupta SK, Bhandari B, 2010. Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian Journal of Andrology* **13**:97-105.
- Gupta SK. 2018. The Human Egg's Zona Pellucida. *Current Topics in Developmental Biology* **130**:379-411.
- Hafez E, Hafez B. 2000. Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation. Pages 68-81 in E. Hafez, editor. and B. Hafez, editor. *Reproduction in Farm Animals*, 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- Halova I, Draber P. 2016. Tetraspanins and Transmembrane Adaptor Proteins As Plasma Membrane Organizers—Mast Cell Case. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **4**.
- He Z-Y, Brakebusch C, Fässler R, Kreidberg JA, Primakoff P, Myles DG. 2003. None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Developmental Biology* **254**:226-237.
- Hedrick JL, Wardrip NJ. 1987. On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Developmental Biology* **121**:478-488.
- Hemler ME, 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**:801-811.
- Hernández-González EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, López-González I, Demarco I, Wertheimer E, Darszon A, Visconti PE. 2006. Sodium and Epithelial Sodium Channels Participate in the Regulation of the Capacitation-associated Hyperpolarization in Mouse Sperm. *Journal of Biological Chemistry* **281**:5623-5633.

- Hess R, de Franca L. 2008. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Pages 1-15 in C. Cheng, editor. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. Landes Bioscience, Austin, Tex.
- Higginbottom A, Quinn ER, Kuo C-C, Flint M, Wilson LH, Bianchi E, Nicosia A, Monk PN, McKeating JA, Levy S. 2000. Identification of Amino Acid Residues in CD81 Critical for Interaction with Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2. *Journal of Virology* **74**:3642–3649.
- Chalbi M et al. 2014. Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. *Development* **141**:3732-3739.
- Chang MC, 1951. Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature* **168**:697-698.
- Charrin S, Manié S, Billard M, Ashman L, Gerlier D, Boucheix C, Rubinstein E. 2003. Multiple levels of interactions within the tetraspanin web. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**:107-112.
- Charrin S, Manié S, Oualid M, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E. 2002. Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions. *FEBS Letters* **516**:139-144.
- Chen MS, Tung KSK, Coonrod SA, Takahashi Y, Bigler D, Chang A, Yamashita Y, Kincade PW, Herr JC, White JM. 1999. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha 6beta 1: Implications for murine fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**:11830-11835.
- Chiu PCN, Wong BST, Chung M-K, Lam KKW, Pang RTK, Lee K-F, Sumitro SB, Gupta SK, Yeung WSB. 2008. Effects of Native Human Zona Pellucida Glycoproteins 3 and 4 on Acrosome Reaction and Zona Pellucida Binding of Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction* **79**:869-877.
- Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, Myles DG. 1998. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* **281**:1857-1859.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* **434**:234-238.
- Inoue N, Ikawa M, Nakanishi T, Matsumoto M, Nomura M, Seya T, Okabe M. 2003. Disruption of Mouse CD46 Causes an Accelerated Spontaneous Acrosome Reaction in Sperm. *Molecular and Cellular Biology* **23**:2614-2622.
- Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Maekawa M, Miyado K, Toshimori K. 2010. Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell and Tissue Research* **340**:583-594.
- Jalkanen J, Huhtaniemi I, Poutanen M. 2005. Mouse Cysteine-Rich Secretory Protein 4 (CRISP4): A Member of the Crisp Family Exclusively Expressed in the Epididymis in an Androgen-Dependent Manner. *Biology of Reproduction* **72**:1268-1274.

- Jankovicova J et al. 2016. Characterization of tetraspanin protein CD81 in mouse spermatozoa and bovine gametes. *Reproduction* **152**:785-793.
- Jankovicova J et al. 2020. Expression and distribution of CD151 as a partner of alpha6 integrin in male germ cells. *Scientific Reports* **10**:4374.
- Jankovicova J, Secova P, Manaskova-Postlerova P, Simonik O, Frolikova M, Chmelikova E, Horovska L, Michalkova K, Dvorakova-Hortova K, Antalikova J. 2019. Detection of CD9 and CD81 tetraspanins in bovine and porcine oocytes and embryos. *International Journal of Biological Macromolecules* **123**:931-938.
- 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* **108**:4892-4896.
- Kaewmala K, Uddin MJ, Cinar MU, Große-Brinkhaus C, Jonas E, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K. 2011. Association study and expression analysis of CD9 as candidate gene for boar sperm quality and fertility traits. *Animal Reproduction Science* **125**:170-179.
- Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S, Kudo A. 2000. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nature Genetics* **24**:279-282.
- Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. 2004. CD9 Is a Surface Marker on Mouse and Rat Male Germline Stem Cells1. *Biology of Reproduction* **70**:70-75.
- Kang-Decker N. 2001. Lack of Acrosome Formation in Hrb-Deficient Mice. *Science* **294**:1531-1533.
- Kersey JH, LeBien TW, Abramson CS, Newman R, Sutherland R, Greaves M. 1981. P-24: a human leukemia-associated and lymphohemopoietic progenitor cell surface structure identified with monoclonal antibody. *The Journal of Experimental Medicine* **153**:726-731.
- Kierszenbaum AL, Rosselot C, Rivkin E, Tres LL. 2006. Role of integrins, tetraspanins, and ADAM proteins during the development of apoptotic bodies by spermatogenic cells. *Molecular Reproduction and Development* **73**:906-917.
- Kovalenko OV, Metcalf DG, DeGrado WF, Hemler ME. 2005. Structural organization and interactions of transmembrane domains in tetraspanin proteins. *BMC Structural Biology* **5**.
- Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C. 2000. Severely Reduced Female Fertility in CD9-Deficient Mice. *Science* **287**:319-321.
- Lefievre L. 2004. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reproduction* **19**:1580-1586.
- Li Y-H, Hou Y, Ma W, Yuan J-X, Zhang D, Sun Q-Y, Wang W-H. 2004. Localization of CD9 in pig oocytes and its effects on sperm–egg interaction. *Reproduction* **127**:151-157.

- Liu DY, Baker HW. 1998. Calcium ionophore-induced acrosome reaction correlates with fertilization rates in vitro in patients with teratozoospermic semen. *Human Reproduction* **13**:905-910.
- Lozahic S, Christiansen D, Manié S, Gerlier D, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E. 2000. CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *Eur J Immunol.* **30**:900-7.
- 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* **124**:4121-4131.
- Meizel S, Turner KO, Nuccitelli R. 1997. Progesterone Triggers a Wave of Increased Free Calcium during the Human Sperm Acrosome Reaction. *Developmental Biology* **182**:67-75.
- Melendrez CS, Meizel S, Berger T. 1994. Comparison of the ability of progesterone and heat solubilized porcine zona pellucida to initiate the porcine sperm acrosome reaction in vitro. *Molecular Reproduction and Development* **39**:433-438.
- Métayer S, Dacheux F, Dacheux J, Gatti J. 2002. Comparison, Characterization, and Identification of Proteases and Protease Inhibitors in Epididymal Fluids of Domestic Mammals. Matrix Metalloproteinases Are Major Fluid Gelatinases1. *Biology of Reproduction* **66**:1219-1229.
- Meyers SA, Overstreet JW, Liu IK, Drobnis EZ. 1995. Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. *J Androl.* **16**:47-54.
- Miyado K et al. 2000. Requirement of CD9 on the Egg Plasma Membrane for Fertilization. *Science* **287**:321-324.
- Moller CC, Wassarman PM. 1989. Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Developmental Biology* **132**:103-112.
- Mortillo S, Wassarman PM. 1991. Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development* **113**:141-149.
- Neilson L, Andalibi A, Kang D, Coutifaris C, Strauss JF, Stanton J-AL, Green DPL. 2000. Molecular Phenotype of the Human Oocyte by PCR-SAGE. *Genomics* **63**:13-24.
- Nishimura H, Cho C, Branciforte DR, Myles DG, Primakoff P. 2001. Analysis of Loss of Adhesive Function in Sperm Lacking Cyritestin or Fertilin  $\beta$ . *Developmental Biology* **233**:204-213.



- Noguchi S, Yonezawa N, Katsumata T, Hashizume K, Kuwayama M, Hamano S, Watanabe S, Nakano M. 1994. Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1201**:7-14.
- Ohnami N et al. 2012. CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biology Open* **1**:640-647.
- Okabe M, Adachi T, Takada K, Oda H, Yagasaki M, Kohama, Mimura T. 1987. Capacitation-related changes in antigen distribution on mouse sperm heads and its relation to fertilization rate in vitro. *Journal of Reproductive Immunology* **11**:91-100.
- Osman RA, Andria ML, Jones AD, Meizel S. 1989. Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **160**:828-833.
- Paulini F, Silva R, de Paula Rôlo J, Lucci C. 2014. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *Journal of Ovarian Research*. **7**.
- Phelps B, Koppel D, Primakoff P, Myles D. 1990. Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domains. *The Journal of Cell Biology* **111**:1839-1847.
- Reid AT, Redgrove K, Aitken RJ, Nixon B. 2010. Cellular mechanisms regulating sperm–zona pellucida interaction. *Asian Journal of Andrology* **13**:88-96.
- Rejraji H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, Frenoux J, Vericel E, Grizard G, Vernet P, Drevet J. 2006. Lipid Remodeling of Murine Epididymosomes and Spermatozoa During Epididymal Maturation I. *Biology of Reproduction* **74**:1104-1113.
- Rodríguez-Martínez H, Iborra A, Martínez P, Calvete JJ. 1998. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. *Reproduction, Fertility and Development* **10**:491–497.
- Rubinstein E, Billard M, Plaisance S, Prenant M, Boucheix C. 1993. Molecular cloning of the mouse equivalent of CD9 antigen. *Thrombosis Research* **71**:377-383.
- Rubinstein E, Ziyat A, Prenant M, Wrobel E, Wolf J-P, Levy S, Le Naour F, Boucheix C. 2006b. Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Developmental Biology* **290**:351-358.
- Rubinstein E, Ziyat A, Wolf J, Lenaour F, Boucheix C. 2006a. The molecular players of sperm–egg fusion in mammals. *Cell & Developmental Biology* **17**:254-263.
- Rubinstein E. 2011. The complexity of tetraspanins. *Biochemical Society Transactions* **39**:501-505.
- Serru V, Le Naour F, Billard M, Azorsa DO, Lanza F, Boucheix C, Rubinstein E. 1999. Selective tetraspan–integrin complexes (CD81/ $\alpha$ 4 $\beta$ 1, CD151/ $\alpha$ 3 $\beta$ 1, CD151/ $\alpha$ 6 $\beta$ 1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochemical Journal* **340**:103-111.

- Sharma U et al. 2016. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science* **351**:391-396.
- Schill W. 1991. Review. *Human Reproduction* **6**:969-978.
- Sosa CM, Pavarotti MA, Zanetti MN, Zoppino FCM, De Blas GA, Mayorga LS. 2015. Kinetics of human sperm acrosomal exocytosis. *MHR: Basic science of reproductive medicine* **21**:244-254.
- Sotomayor R, Handel M. 1986. Failure of Acrosome Assembly in a Male Sterile Mouse Mutant1. *Biology of Reproduction* **34**:171-182.
- Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. 2001. EWI-2 Is a Major CD9 and CD81 Partner and Member of a Novel Ig Protein Subfamily. *Journal of Biological Chemistry* **276**:40545-40554.
- Sullivan R. 2016. Epididymosomes Role of extracellular microvesicles in sperm maturation. *Frontiers in Bioscience* **8**:106-114.
- Takahashi Y, Bigler D, Ito Y, White JM, Hynes R. 2001. Sequence-Specific Interaction between the Disintegrin Domain of Mouse ADAM 3 and Murine Eggs: Role of  $\beta$ 1 Integrin-associated Proteins CD9, CD81, and CD98. *Molecular Biology of the Cell* **12**:809-820.
- Talebi A, Khalili M, Vahidi S, Ghasemzadeh J, Tabibnejad N. 2013. Sperm chromatin condensation, DNA integrity, and apoptosis in men with spinal cord injury. *The Journal of Spinal Cord Medicine* **36**:140-146.
- Tang X, Lalli M, Clermont Y. 1982. A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *American Journal of Anatomy* **163**:283-294.
- Tanigawa M et al. 2008. Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. *Molecular Reproduction and Development* **75**:150-155.
- Tanihara F, Nakai M, Men NT, Kato N, Kaneko H, Noguchi J, Otoi T, Kikuchi K. 2014. Roles of the zona pellucida and functional exposure of the sperm-egg fusion factor 'IZUMO' during in vitro fertilization in pigs. *Animal Science Journal* **85**:395-404.
- Therien I. 2003. Effect of Progesterone on Bovine Sperm Capacitation and Acrosome Reaction. *Biology of Reproduction* **69**:1408-1415.
- Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology* **2**:569-579.
- Thimon V, Frenette G, Saez F, Thabet M, Sullivan R. 2008. Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Human Reproduction* **23**:1698-1707.
- Tomlinson MG, Wright MD. 1996. A new transmembrane 4 superfamily molecule in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Evolution* **43**:312-314.

- Tulsiani D, Abou-Haila A, Loeser C, Pereira B. 1998. The Biological and Functional Significance of the Sperm Acrosome and Acrosomal Enzymes in Mammalian Fertilization. *Experimental Cell Research* **240**:151-164.
- Vazquez MH, Phillips DM, Wassarman PM. 1989. Interaction of mouse sperm with purified sperm receptors covalently linked to silica beads. *Journal of Cell Science* **92**:713-722.
- Wassarman P, Chen J, Cohen N, Litscher E, Liu C, Qi H, Williams Z. 1999. Structure and Function of the Mammalian Egg Zona Pellucida. *Journal of experimental zoology* **285**:251-258.
- Wassarman PM. 1988. Zona Pellucida Glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry* **57**:415-442.
- Wright MD, Geary SM, Fitter S, Moseley GW, Lau L-M, Sheng K-C, Apostolopoulos V, Stanley EG, Jackson DE, Ashman LK. 2004. Characterization of Mice Lacking the Tetraspanin Superfamily Member CD151. *Molecular and Cellular Biology* **24**:5978-5988.
- Yanagimachi R, Kamiguchi Y, Mikamo K, Suzuki F, Yanagimachi H. 1985. Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. *American Journal of Anatomy* **172**:317-330.
- Yang X, Kovalenko OV, Tang W, Claas C, Stipp CS, Hemler ME. 2004. Palmitoylation supports assembly and function of integrin–tetraspanin complexes. *The Journal of Cell Biology* **167**:1231-1240.
- Yauch RL, Berditchevski F, Harler MB, Reichner J, Hemler ME, Ginsberg M. 1998. Highly Stoichiometric, Stable, and Specific Association of Integrin  $\alpha 3\beta 1$  with CD151 Provides a Major Link to Phosphatidylinositol 4-Kinase, and May Regulate Cell Migration. *Molecular Biology of the Cell* **9**:2751-2765.
- Yonezawa N, Kanai-Kitayama S, Kitayama T, Hamano A, Nakano M. 2012. Porcine zona pellucida glycoprotein ZP4 is responsible for the sperm-binding activity of the ZP3/ZP4 complex. *Zygote* **20**:389-397.
- Yubero N, Jiménez-Marín Á, Lucena C, Barbancho M, Garrido JJ. 2011. Immunohistochemical distribution of the tetraspanin CD9 in normal porcine tissues. *Molecular Biology Reports* **38**:1021-1028.
- Zhang XA, Huang C. 2012. Tetraspanins and cell membrane tubular structures. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**:2843-2852.
- Zhou G-B, Liu G-S, Meng Q-G, Liu Y, Hou Y-P, Wang X-X, Li N, Zhu S-E. 2009. Tetraspanin CD9 in bovine oocytes and its role in fertilization. *Journal of Reproduction and Development* **55**:305-8.
- Ziyyat A, Rubinstein E, Monier-Gavelle F, Barraud V, Kulski O, Prenant M, Boucheix C, Bomsel M. 2006. CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin  $\alpha 6\beta 1$ , which are involved in human and mouse gamete fusion. *Journal of Cell Science* **119**:416-424.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
AR	akrozomální reakce
ATP	adenosin trifosfát
AV ČR	Akademie věd České republiky
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CRISP	Cystein-Rich Secretory Proteins
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC1	malá extracelulární smyčka
EC2	velká extracelulární smyčka
Ej	ejakulované spermie
Ej Eq	ejakulované hřebčí spermie
Ej Su	ejakulované kančí spermie
Ep	epididymální spermie
Ep Eq	epididymální hřebčí spermie
Ep Su	epididymální kančí spermie
GPI	glykofosfatidylinositol
GV	zárodečný váček
IAM	inner acrosomal membrane (vnitřní akrozomální membrána)
ICSI	intracytoplazmatická injekce spermie
Ig	imunoglobulin
K	kontrola
KVD ČZU	katedra veterinárních disciplín České zemědělské univerzity
L.g.	Leydigovy buňky
NC	nitrocelulózová membrána
OAM	outer acrosomal membrane (vnější akrozomální membrána)
PAK	proteinkináza A
PNA	rhodamine peanut agglutinin
SDS	dodecylsulfát sodný
SE	sekreční epitel
Sp	spermie

Spc.b.	spermatické buňky
RNA	ribonukleová kyselina
TEM	mikrodomény obohacené o tetraspanin
Tk	tkáň
TM4SF	transmembránová 4 nadrodina
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
ZP	zona pellucida
ZP1	zona pellucida protein 1
ZP2	zona pellucida protein 2
ZP3	zona pellucida protein 3
ZP4	zona pellucida protein 4

## 10 Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Hlavička spermie .....	3
<b>Obrázek 2:</b> Schéma spermie.....	5
<b>Obrázek 3:</b> Modely pro roli CD9 ve vazbě fertilinu $\beta$ na integrin $\alpha 6\beta 1$ .....	11
<b>Obrázek 4:</b> Schéma proteinů zapojených do fúze gamet .....	13
<b>Obrázek 5:</b> Struktura tetraspaninů.....	15
<b>Obrázek 6:</b> Lokalizace proteinu CD9 v řezu kančího varlete a ocasu (cauda) nadvarlete pomocí protilátky MRP-1 .....	27
<b>Obrázek 7:</b> Lokalizace proteinu CD9 v kančích epididymálních spermích pomocí protilátky MRP-1.....	28
<b>Obrázek 8:</b> Lokalizace proteinu CD9 v kančích ejakulovaných spermích s neporušenými akrozomy pomocí protilátky MRP-1 .....	29
<b>Obrázek 9:</b> Lokalizace proteinu CD9 v kančích ejakulovaných spermích s porušenými akrozomy pomocí protilátky MRP-1 .....	30
<b>Obrázek 10:</b> Lokalizace proteinu CD9 v řezu hřebčího varlete a ocasu (cauda) nadvarlete pomocí protilátky MRP-1 .....	31
<b>Obrázek 11:</b> Lokalizace proteinu CD9 v hřebčích ejakulovaných spermích pomocí protilátky MRP-1.....	32
<b>Obrázek 12:</b> Imunodetekce proteinu CD9 v extraktech kančích spermíí pomocí protilátky MRP-1.....	33
<b>Obrázek 13:</b> Imunodetekce proteinu CD9 v extraktech hřebčích spermíí pomocí protilátky MRP-1.....	33
<b>Obrázek 14:</b> Imunodetekce proteinu CD9 v extraktech kančích a hřebčích spermíí pomocí protilátky KMC8.8.....	34
<b>Obrázek 15:</b> Imunodetekce proteinu CD9 v extraktech kančích a hřebčích spermíí pomocí protilátky C-4.....	35
<b>Obrázek 16:</b> Lokalizace proteinu CD81 v řezu kančího varlete a ocasu (cauda) nadvarlete pomocí protilátky Q-14.....	36
<b>Obrázek 17:</b> Lokalizace proteinu CD81 v kančích epididymálních a ejakulovaných spermích pomocí protilátky Q-14.....	36
<b>Obrázek 18:</b> Lokalizace proteinu CD81 v kančích epididymálních spermích pomocí protilátky H121 .....	37

<b>Obrázek 19:</b> Lokalizace proteinu CD81 v kančích ejakulovaných spermích pomocí protilátky H121.....	38
<b>Obrázek 20:</b> Lokalizace proteinu CD81 v řezu hřebčího varlete a ocasu (cauda) nadvarlete pomocí protilátky Q-14.....	38
<b>Obrázek 21:</b> Lokalizace proteinu CD81 v hřebčích epididymálních a ejakulovaných spermích pomocí protilátky Q-14.....	39
<b>Obrázek 22:</b> Lokalizace proteinu CD81 v hřebčích epididymálních a ejakulovaných spermích pomocí protilátky H121 .....	39
<b>Obrázek 23:</b> Imunodetekce proteinu CD81 v extraktech kančích ejakulovaných spermíí pomocí protilátky H121 .....	40
<b>Obrázek 24:</b> Imunodetekce proteinu CD81 v extraktech hřebčích epididymálních spermíí pomocí protilátky H121 .....	41
<b>Obrázek 25:</b> Imunodetekce proteinu CD81 v extraktech kančích a hřebčích spermíí pomocí protilátky Q-14.....	41
<b>Obrázek 26:</b> Lokalizace proteinu CD151 v řezu kančího varlete pomocí protilátky ab125363. ....	42
<b>Obrázek 27:</b> Lokalizace proteinu CD151 v řezu kančího ocasu (cauda) nadvarlete pomocí protilátky ab125363. ....	43
<b>Obrázek 28:</b> Lokalizace proteinu CD151 v kančích epididymálních spermích pomocí protilátky ab125363. ....	44
<b>Obrázek 29:</b> Lokalizace proteinu CD151 v kančích ejakulovaných spermích pomocí protilátky ab125363. ....	45
<b>Obrázek 30:</b> Lokalizace proteinu CD151 v řezu hřebčího varlete a ocasu (cauda) nadvarlete pomocí protilátky ab125363. ....	46
<b>Obrázek 31:</b> Lokalizace proteinu CD151 v hřebčích ejakulovaných spermích pomocí protilátky ab125363. ....	47
<b>Obrázek 32:</b> Imunodetekce proteinu CD151 v extraktech kančích epididymálních spermíí pomocí protilátky ab125363 .....	48
<b>Obrázek 33:</b> Imunodetekce proteinu CD151 v extraktech epididymálních a ejakulovaných hřebčích spermíí pomocí protilátky ab125363 .....	48