

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Studium proteinu Rab-2A v kančích spermích
v souvislosti s jeho *zona pellucida* vázající aktivitou**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Natálie Zelenková

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

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

Konzultant: Ing. Lucie Tůmová

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Studium proteinu Rab-2A v kančích spermiích v souvislosti s jeho *zona pellucida* vázající aktivitou" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. 4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za čas vynaložený při vedení této diplomové práce, ochotu, trpělivost a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Ing. Lucii Tůmové za pomoc s experimenty a také všem pracovníkům KVD za vstřícný přístup. Velký dík patří rovněž mé rodině za podporu při studiu.

Studium proteinu Rab-2A v kančích spermích v souvislosti s jeho *zona pellucida* vázající aktivitou

Souhrn

Protein Rab-2A patří do podskupiny Rab malých GTPáz nadrodiny Ras. Podobně jako ostatní Rab proteiny se Rab-2A účastní regulace intracelulárního membránového transportu na různých úrovních a je nezbytným proteinem pro transport molekul z endoplazmatického retikula do Golgiho komplexu. Protein Rab-2A byl lokalizován u mnoha druhů živočichů v nejrůznějších buňkách a tkáních, ve kterých zastává mnoho různých funkcí. V současnosti je věnována pozornost studiu Rab proteinů i v kontextu reprodukce. Protein Rab-2A byl stejně jako některé jiné Rab proteiny identifikován v savčích spermích, jeho přesná role v těchto buňkách však zatím nebyla plně objasněna. V býčích spermatidách byl protein Rab-2A lokalizován v perinukleární théce a předpokládá se jeho zapojení do biogeneze akrozomu během spermiogeneze. V kančích spermích byla popsána přítomnost Rab-2A na jejich povrchu spolu s vazebnou aktivitou k *zona pellucida* a uvažuje se o jeho možné roli ve vazbě na oocyt.

Cílem této diplomové práce bylo detekovat a lokalizovat protein Rab-2A v kančích spermích v různých stádiích jejich posttestikulárního vývoje. Dále byla studována vazba spermií na *zona pellucida* prasečího oocytu po blokaci proteinu Rab-2A pomocí protilátky. Pomocí metody Western blot jsme detekovali protein Rab-2A v lyzátu kančích spermií během jejich maturace. Protein Rab-2A se nám podařilo detekovat v proteinových extraktech epididymálních, ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií a v extraktu proteinů spermií po akrozomální reakci. Celkem jsme detekovali čtyři různé izoformy proteinu Rab-2A o molekulových hmotnostech 21, 24, 27 a 31 kDa. Imunodetekce rovněž odhalila dvě izoformy Rab-2A o molekulových hmotnostech 21 a 24 kDa v extraktu proteinů perinukleární théky ejakulovaných kančích spermií. Pomocí nepřímé fluorescenční mikroskopie jsme lokalizovali protein Rab-2A v epididymálních, ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermích v oblasti akrozomu. Na spermích po akrozomální reakci protein Rab-2A nebyl detekován. Vazebná aktivita proteinu Rab-2A k *zona pellucida* oocytu byla hodnocena po inkubaci spermií s protilátkou proti Rab-2A. Experiment odhalil, že vazba spermií na *zona pellucida* byla částečně zablokována.

Z našich výsledků vyplývá, že protein Rab-2A je přítomen na kančích epididymálních, ejakulovaných a kapacitovaných spermích v akrozomální oblasti hlavičky a rovněž se nachází v perinukleární théce. Role proteinu Rab-2A ve vazbě spermie na oocyt nebyla jednoznačně potvrzena, nicméně blokace proteinu protilátkou snížila počet spermií vázajících se na oocyt.

Klíčová slova: protilátka, kapacitace, Western blot, imunofluorescence, vazebná studie

Study of Rab-2A protein in boar spermatozoa in connection with its *zona pellucida* binding activity

Summary

Rab-2A protein belongs to the Rab subgroup of small GTPases of the Ras superfamily. Like other Rab proteins, Rab-2A is involved in the regulation of intracellular membrane trafficking at various levels and is an essential protein for the transport of molecules from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. Rab-2A protein has been found in number of animal species in many cells and tissues, in which it has several different functions. At present particular attention is paid to the study of Rab proteins in the context of reproduction. The Rab-2A protein, like some other Rab proteins, has been identified in mammalian spermatozoa, but its exact role in these cells has not yet been fully elucidated. In bovine spermatids, the Rab-2A protein was localized in the perinuclear theca and is thought to be involved in acrosome biogenesis during spermiogenesis. In boar sperm, the presence of Rab-2A on the sperm surface has been described. Moreover, it was shown that the protein coincides with *zona pellucida* binding and its possible role in sperm-oocyte binding has been suggested.

The aim of this diploma thesis was to detect and localize the Rab-2A protein in boar sperm at different stages of their post-testicular development. Furthermore, the binding of sperm to the *zona pellucida* of porcine oocyte after blocking the Rab-2A protein with its antibody was studied. Using Western blot, we detected Rab-2A protein in boar sperm lysate during maturation. Rab-2A protein was detected in protein extracts of epididymal, ejaculated, *in vitro* capacitated, and acrosome-reacted sperm. In total, we were able to detect four different isoforms of Rab-2A protein with molecular weights of 21, 24, 27, and 31 kDa. Two Rab-2A isoforms of 21 and 24 kDa were also detected in proteins extracted from the perinuclear theca of ejaculated boar sperm. Using indirect immunofluorescence microscopy, we localized Rab-2A protein in the acrosome region of epididymal, ejaculated, and *in vitro* capacitated spermatozoa. Rab-2A protein was not detected in sperm after the acrosomal reaction. The binding activity of Rab-2A protein to the *zona pellucida* of the oocyte was evaluated after incubation of sperm with the anti-Rab-2A antibody. The experiment revealed that sperm binding to the *zona pellucida* was partially blocked.

Our results indicate that the Rab-2A protein is localized in boar epididymal, ejaculated, and capacitated sperm in the acrosome region of the sperm head and is also found in the perinuclear theca. The role of Rab-2A protein in sperm-oocyte binding was not unequivocally confirmed, however, blocking the protein with its antibody reduced the number of oocyte-bound sperm.

Keywords: antibody, capacitation, Western blot, immunofluorescence, binding assay

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Morfologie spermie	3
3.1.1 Hlavička spermie	3
3.1.2 Krček.....	4
3.1.3 Bičík.....	4
3.2 Vývoj spermie	5
3.3 Kapacitace	6
3.4 Molekulární mechanismus interakce spermie se zona pellucida	7
3.4.1 Zona pellucida	7
3.4.2 Interakce spermie se ZP	9
3.4.3 Receptory spermie pro primární vazbu na ZP	10
3.4.4 Receptory spermie pro primární vazbu na ZP u prasete.....	11
3.4.5 Akrozomální reakce a sekundární vazba spermie na oocyt.....	12
3.5 Metody studia proteinů účastnících se vazby spermií na ZP	14
3.6 Rab proteiny	15
3.6.1 Struktura Rab proteinů.....	16
3.7 Protein Rab-2A	17
3.7.1 Funkce Rab-2A.....	17
3.7.2 Rab-2A v kontextu reprodukce.....	18
4 Metodika	22
4.1 Zpracování biologického materiálu	22
4.1.1 Příprava ejakulovaných spermií	22
4.1.2 Příprava <i>in vitro</i> kapacitovaných spermií	22
4.1.3 Příprava akrozomově zreagovaných spermií.....	23
4.1.4 Izolace povrchových proteinů spermií.....	23
4.1.5 Imunoprecipitace	24
4.1.6 Izolace perinukleární théky (PT) z ejakulovaných spermií	25
4.1.7 Příprava tkání.....	26
4.2 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)	26
4.2.1 Příprava vzorku pro SDS elektroforézu.....	26
4.2.2 SDS-PAGE	26
4.3 Western blot (elektropřenos)	27
4.4 Imunodetekce pomocí protilátky	28
4.5 Nepřímá fluorescenční mikroskopie	28
4.5.1 Příprava vzorků spermií.....	29

4.5.1.1	Vlhká fixace přímo na mikroskopickém sklíčku.....	29
4.5.1.2	Příprava vzorku v suspenzi	29
4.5.1.3	Fixace paraformaldehydem v suspenzi	29
4.5.2	Příprava kryořezů.....	30
4.5.3	Protokol pro nepřímou imunofluorescenci	30
4.6	Vazebná studie spermie na <i>zona pellucida</i> oocyty.....	30
5	Výsledky.....	32
5.1	Hodnocení <i>in vitro</i> kapacity a akrozomální reakce	32
5.2	Lokalizace proteinu Rab-2A ve spermích.....	33
5.3	Detekce proteinu Rab-2A v extraktech spermíí	38
5.4	Detekce proteinu Rab-2A v povrchových proteinech spermíí.....	41
5.5	Imunoprecipitace.....	42
5.6	Detekce proteinu Rab-2A v perinukleární théce.....	43
5.7	Detekce proteinu Rab-2A v tkáních	44
5.8	Lokalizace proteinu Rab-2A v tkáních reprodukčních orgánů.....	45
5.9	Vazebná studie.....	46
6	Diskuze.....	47
7	Závěr	52
8	Literatura.....	53

1 Úvod

Proces fertilizace sestává z mnoha událostí probíhajících ve spermii i vajíčku, z nichž všechny dosud nebyly plně popsány a vysvětleny. Interakce mezi oběma gametami je jedním z klíčových momentů na cestě k úspěšnému oplození. Pro tuto interakci jsou nezbytné receptorové molekuly na spermii a k nim komplementární molekuly na vajíčku. Mnohé z těchto receptorů přítomných na spermii již byly identifikovány a charakterizovány. Neustále však probíhá objevování nových potenciálních receptorů, zatímco důležitost některých dříve popsaných je zpochybňována (van Gestel *et al.* 2007; Redgrove *et al.* 2012).

Protein Rab-2A je malá GTPáza z rodiny Rab nadrodiny Ras proteinů (Stenmark & Olkkonen 2001). Rab proteiny se hojně vyskytují ve většině tkání a jsou důležitými molekulami pro intracelulární membránový transport. Protein Rab-2A byl rovněž detekován v mnoha tkáních, ve kterých zastává nejrůznější funkce (Sugawara *et al.* 2014; Kajihio *et al.* 2016; Matsunaga *et al.* 2017). Teprve nedávno byla naznačena jeho možná role v reprodukci, když byl identifikován v subakrozomální oblasti perinukleární théky býčích spermatid, ve kterých se pravděpodobně podílí na biogenezi akrozomu během procesu spermatogeneze (Mountjoy *et al.* 2008). V současnosti je přítomnost Rab-2A popsána i na kančích spermiiích a byl vysloven předpoklad, že se tento protein vyskytuje na povrchu spermiiích a mohl by tedy hrát roli v primární vazbě na *zona pellucida* oocyту (Zigo *et al.* 2015).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Tato práce vychází z hypotézy, že protein Rab-2A je přítomen na kančích spermích a účastní se vazby spermie na *zona pellucida* oocyty.

Cílem práce je:

- 1) lokalizace a detekce proteinu Rab-2A v kančích spermích v různých stádiích jejich posttestikulárního vývoje;
- 2) studium vazby spermíí na *zona pellucida* prasečího oocyty po blokaci Rab-2A proteinu pomocí protilátky.

3 Literární rešerše

3.1 Morfologie spermie

Spermie je haploidní geneticky jedinečná samčí pohlavní buňka, která se skládá z hlavičky, krčku a bičíku. Spermie se vyznačují pozoruhodnou variabilitou ve velikosti a tvaru mezi jednotlivými druhy. Všechny části spermie jsou pokryty plazmatickou membránou. Plazmatická membrána obsahuje povrchové domény, jako jsou specifické glykoproteiny a lipidy, které jsou zásadní pro její správnou funkci (Fawcett 1975; Sutovsky & Manandhar 2006).

3.1.1 Hlavička spermie

Tvar hlavičky spermií je druhově specifický, obvykle však bývá dorzoventrálně zploštělý. Hlavička spermií sestává ze dvou hlavních organel, akrozomu a jádra. Cytoplazma a cytoskeletální proteiny jsou přítomny pouze v uzavřených oblastech mezi plazmatickou membránou a akrozomální membránou a také mezi akrozomem a jádrem (Pesch & Bergmann 2006; Sutovsky & Manandhar 2006).

Akrozom je váček odvozený z Golgiho aparátu, který tvoří strukturu připomínající čepičku, jež pokrývá apikální oblast hlavičky. Skládá se ze dvou membrán obklopujících akrozomální matrix, která obsahuje množství hydrolytických enzymů. Tyto enzymy se uvolňují během akrozomální reakce a jsou nezbytné pro penetraci spermie do oocyty. V akrozomu lze rozlišit tři segmenty, anteriorní (apikální), ekvatoriální a posteriorní (Fawcett 1975; Pesch & Bergmann 2006). Vnější akrozomální membrána leží pod plazmatickou membránou, zatímco vnitřní akrozomální membrána splývá se subakrozomálním segmentem perinukleární théky. Perinukleární théka je odolné cytoskeletárním lešení, které obklopuje celé jádro kromě jeho bazální oblasti, v níž se připojuje bičík k hlavičce. Perinukleární théka je rozdělena na tři části, subakrozomální, postakrozomální a periakrozomální (Oko & Maravei 1994; Sutovsky & Manandhar 2006). V apikální části spermie se perinukleární théka nachází mezi vnitřní akrozomální membránou a jaderným obalem a tvoří tak subakrozomální vrstvu, zatímco kaudálně se nachází mezi plazmalemou a jaderným obalem a tvoří tak postakrozomální vrstvu (PAS). Subakrozomální vrstva je strukturálně propojená s částí periakrozomální vrstvy, která se nachází mezi vnější akrozomální membránou a plazmalemou v ekvatoriální oblasti (Oko & Maravei 1994).

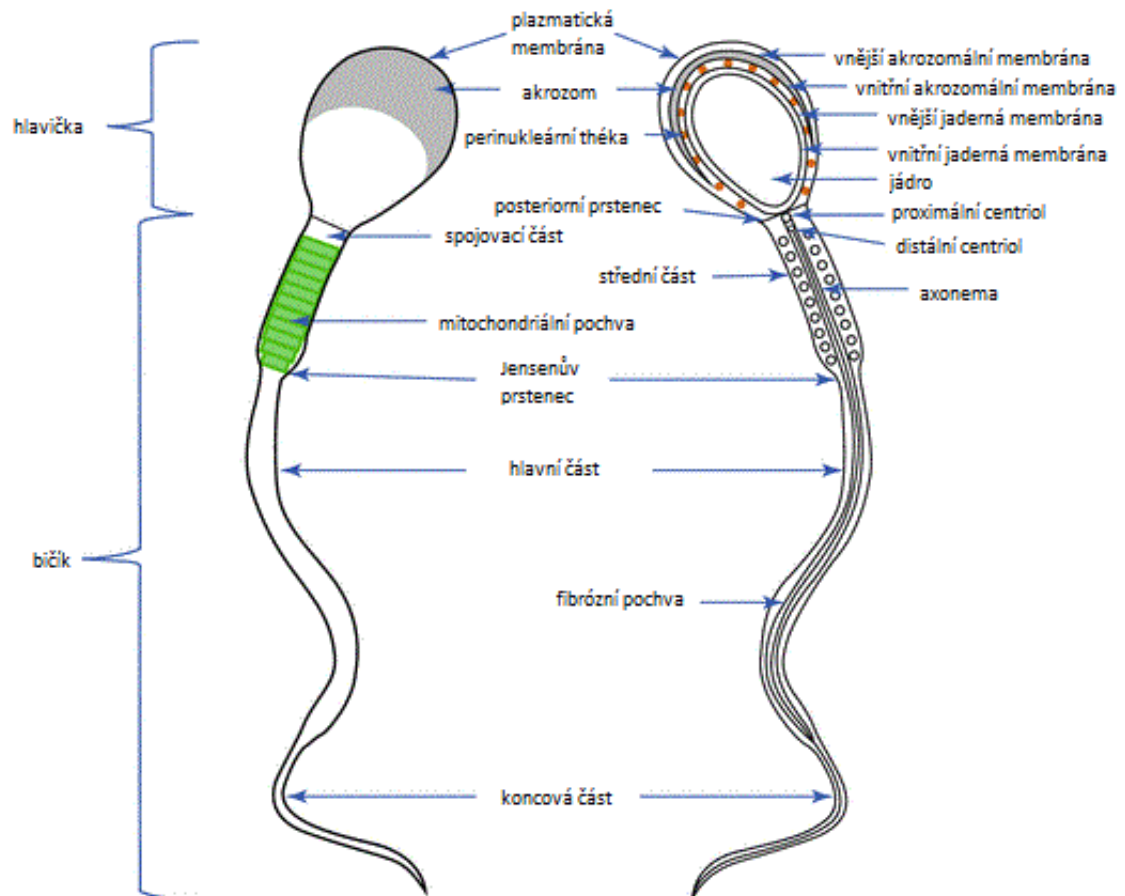
Jádro spermií je pokryto dvěma jadernými membránami a obsahuje velmi hustě nahloučený vysoce kondenzovaný chromatin obsahující genetickou informaci ve formě haploidní deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Samčí spermatické chromozomy jsou nejvíce kondenzovanými chromozomy v eukaryotické říši, protože jsou obvykle nejméně šestkrát kondenzovanější než somatické mitotické chromozomy. To je umožněno existencí protaminů, pozitivně nabitých DNA proteinů, které v průběhu spermiogeneze nahrazují histony v jejich roli strukturálních DNA proteinů. Pouze malá část DNA v jádrech spermií je kondenzována na histonech. Zbytek DNA je sbalen lineárně vedle sebe a vytváří lamelovou strukturu (Ward & Coffey 1991; Pesch & Bergmann 2006).

3.1.2 Krček

Krček, často označovaný jako spojovací část, je nejmenší částí spermie. Připojuje se k bazální destičce hlavičky spermie a slouží jako propojení mezi hlavičkou a bičíkem. Krček se skládá z devíti segmentovaných sloupců. Uvnitř těchto sloupců se nachází hustá vláknitá struktura označovaná jako *capitulum*. Krček spermií většiny savců obsahuje proximální a distální centriol, přičemž ten ve zralých spermiích chybí (Pesch & Bergmann 2006; Sutovsky & Manandhar 2006).

3.1.3 Bičík

Bičík je nejdelší částí spermie a zajišťuje její pohyblivost. Motilitu umožňuje axonemální komplex mikrotubulů formovaný do jedinečného uspořádání 9 + 2. Devět periferních mikrotubulárních dubletů je vzájemně propojeno dyneinovými raménky obklopujícími centrální pár mikrotubulů. Těchto devět mikrotubulárních dubletů je na vnějším povrchu paralelních s devíti hustými vlákny, která poskytují jak flexibilitu, tak oporu během pohybu. Bičík je rozdělen do tří částí, střední, hlavní a koncové (Lindemann & Lesich 2016; Sutovsky & Manandhar 2006). Střední část je pokryta mitochondriální pochvou, která leží těsně pod plazmatickou membránou a sestává ze 75–100 mitochondrií. Mitochondrie poskytují dodávku energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP) a tato energie je využívána k motilitě spermií. Každá z mitochondrií nese otcovskou mitochondriální DNA, ale tyto mitochondrie jsou zničeny řízenou proteolýzou bezprostředně po vstupu do vajíčka, neboť byly během maturace spermií vystaveny mutagennímu oxidativnímu stresu (Sutovsky & Manandhar 2006). Hlavní část je nejdelší částí bičíku. Od střední části je oddělena tzv. Jensenovým prstencem. Hlavní část je obklopena tzv. fibrózní pochvou, pláštěm tvořeným ze dvou podélných sloupců, ventrálního a dorzálního sloupce, které jsou spojeny příčnými žebry. Jak mitochondriální pochva, tak fibrózní pochva poskytují zvláštní podporu bičíku spermií a zvyšují tak jeho tuhost (Fawcett 1975; Sutovsky & Manandhar 2006). Na obou pláštích se navíc nachází mnoho enzymů, zejména proteinových kináz, které jsou důležité pro signalizaci a metabolismus spermií (Lindemann & Lesich 2016). Koncová část bičíku je krátký segment, který se skládá z axonemálních dubletů a koncového segmentu okrajových filament uzavřených pouze plazmatickou membránou. Koncový segment postrádá plášť, takže je podstatně méně tuhý než první dva segmenty (Fawcett 1975; Sutovsky & Manandhar 2006). Struktura celé spermie je zobrazena na obrázku 1.



Obrázek 1 **Struktura spermie**; upraveno podle Sharma & Kumar (2017)

3.2 Vývoj spermie

Spermie se tvoří v semenotvorných kanálcích varlat během procesu zvaného spermatogeneze. Jde o kontinuální proces, který trvá po celou dobu reprodukčního života (de Kretser *et al.* 1998). Spermatogeneze začíná v semenotvorných kanálcích diploidní spermatogonií, která prochází mitózou a tvoří dva typy buněk, spermatogonie A, které dále slouží jako kmenové buňky k udržení kontinuální produkce spermií, a spermatogonie B, které se diferencují na primární spermatocyty. Primární spermatocyty poté vstupují do prvního meiotického dělení, během jehož profáze dochází ke crossing-overu. Po dokončení prvního meiotického dělení vznikají sekundární spermatocyty. Ty následně podstupují druhé meiotické dělení za vzniku haploidních spermatid. Jeden diploidní primární spermatocyt tedy vede ke vzniku čtyř haploidních spermatid. Všechny fáze formujících se spermií jsou uspořádány v postupném pořadí v semenotvorných kanálcích. Spermatogonie leží přímo na bazální membráně kanálek, následované primárními spermatocyty a sekundárními spermatocyty, které postupují směrem k lumen kanálek. Spermatidy jsou umístěny v lumen, kde jsou vnořeny mezi Sertoliho buňky (de Kretser *et al.* 1998; Sutovsky & Manandhar 2006).

Následně vstupují haploidní spermatidy do dalšího kroku spermatogeneze, spermiogeneze, která se někdy také nazývá spermatohistogenezí. V tomto procesu zůstávají spermatidy v semenotvorných kanálcích spojeny se Sertoliho buňkami i navzájem mezi sebou prostřednictvím cytoplazmatických můstků. Během této fáze procházejí spermatidy výraznými morfologickými modifikacemi (de Kretser *et al.* 1998; Sutovsky & Manandhar 2006). Kulaté

spermatidy se protahují, jejich chromatin se kondenzuje, hlavička je remodelována a vytváří se modifikovaný lysozom, akrozom, který se připojuje k apikální části jádra. Tvorbu akrozomu během spermiogeneze lze rozdělit na čtyři fáze. V první fázi (tzv. Golgiho fáze) Golgiho komplex vylučuje mnoho malých hustých sekrečních granul bohatých na hydrolytické enzymy jako je proakrozin. Tato proakrozomická granula se spojují, až vytvoří jeden větší sférický akrozomový vezikul s hustým jádrem, který se spojuje s jaderným obalem přes vrstvu perinukleární théky. Ve druhé fázi (tzv. fáze čepičky) se akrozomový váček zvětšuje fúzí s četnými transportními váčky pocházejícími z trans strany Golgiho komplexu. Dochází tak k neustálému přidávání membrány a glykoproteinů, což umožňuje, aby se méně hustá část akrozomového váčku rozšířila přes povrch jádra a získala tvar čepičky. Ve třetí fázi (akrozomální fáze) se spermatidy prodlužují a akrozom s obsahem hydrolytických enzymů získává svou konečnou podobu. V závěrečné fázi (fáze maturace) je odhozena zbylá cytoplazma, která je fagocytována Sertoliho buňkami (Ramalho-Santos *et al.* 2001; Sutovsky & Manandhar 2006; Oko & Sutovsky 2009). Spermatidy se po snížení množství své cytoplazmy odštěpují se od Sertoliho buněk. Plně diferencované, ale nepohyblivé spermie pak pasivně migrují semenotvornými kanálky unášeny testikulární tekutinou vylučovanou Sertoliho buňkami a vstupují do nadvarlete (de Kretser *et al.* 1998; Sutovsky & Manandhar 2006). Nadvarle neboli epididymis je místem dozrávání spermií a také místem, kde spermie získávají progresivní motilitu. Spermie po vývoji ve varleti ještě není schopná oplození vajíčka, tuto schopnost získává právě až po průchodu epididymem, kde prochází značnými modifikacemi. Většina testikulárních povrchových proteinů mizí z jejího povrchu (Dacheux *et al.* 1989).

3.3 Kapacitace

Při vstupu do samičího reprodukčního ústrojí jsou spermie sice již pohyblivé, ještě však nejsou schopny oplodnění vajíčka. Proto je nutné, aby spermie podstoupily řadu biochemických a fyziologických změn a získaly tak schopnost fertilizace. Tyto změny se souhrnně nazývají jako proces kapacitace (Visconti *et al.* 1998).

Po ejakulaci vstupují savčí spermie do samičího reprodukčního traktu. V tomto okamžiku jsou spermie obklopeny semennou plazmou, která obsahuje stabilizující molekuly, tzv. dekapacitační faktory, které zabraňují předčasné kapacitaci, která by byla pro spermie letální (Bailey 2010). Když spermie dosáhnou oviduktu, silně se vážou na epiteliální buňky v isthmickém regionu a vytvářejí zde zásobu spermií, která se označuje jako oviduktální rezervoár spermií. Rezervoár spermií prodlužuje fertilizační stav spermií a slouží jako synchronizační faktor, který zajišťuje setkání funkčních a oplozeníšopných samčích a samičích gamet ve správný čas. Právě v rezervoáru také dochází k iniciaci kapacitace, která pak snižuje schopnost spermií interagovat s epiteliálními buňkami. Uvolňování spermií z rezervoáru je pravděpodobně spuštěno hormonální signalizací po ovulaci oocytů (Töpfer-Petersen *et al.* 2002; Suarez 2016).

Proces kapacitace zahrnuje mnoho událostí. Jednou z prvních událostí kapacitace spermií je aktivace energické a asymetrické motility bičíků spermií (Ickowicz *et al.* 2012; Visconti 2009). K tomu dochází, jakmile spermie opustí nadvarle a přijdou do styku s vysokými koncentracemi hydrogenuhličitanu (HCO_3^-) a Ca^{2+} v semenné plazmě. HCO_3^- vstupuje do spermií přes $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ přenašeč a je spojen se zvýšením hladiny intracelulárního pH.

Vystavení vysoké koncentraci HCO_3^- okamžitě spouští aktivaci bičků spermií a rovněž indukuje depolarizaci, díky čemuž se zvyšuje intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Důležitá je také signalizace přes cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), který je aktivován rozpustnou adenylylcyklázou (SACY). V důsledku aktivace SACY se intracelulární hladiny cAMP zvyšují a aktivují protein kinázu A (PKA). Aktivovaná protein kináza A pak může fosforylovat cílové proteiny, u nichž se předpokládá, že iniciují další signální dráhy (shrnuto v Salicioni *et al.* 2007). HCO_3^- se také podílí na redistribuci v lipidové dvojvrstvě plazmatické membrány prostřednictvím SACY a PKA. PKA aktivuje fosfolipidový enzym scramblázu, který způsobuje translokaci membránových fosfolipidů jako jsou fosfatidylserin a fosfatidylethanolamin. Scrambláza také zvyšuje dostupnost cholesterolu pro vnější akceptory, například sérový albumin, a usnadňuje jeho odstranění z membrány (Bailey 2010; Ickowicz *et al.* 2012; Salicioni *et al.* 2007). To dále zvyšuje permeabilitu membrány pro Ca^{2+} . Odstranění cholesterolu také indukuje fluidizaci plazmatické membrány, což vede k aktivaci signální dráhy regulující fosforylaci proteinů. Zvýšení koncentrace HCO_3^- opět vede ke zvýšení intracelulárního pH a aktivaci SACY, což dále zvyšuje hladinu cAMP. cAMP následně aktivuje PKA. PKA fosforyluje několik proteinů na serinových a threoninových zbytcích, přičemž aktivuje, přímo nebo nepřímo, další proteinové kinázy. Protein kinázová kaskáda reguluje fosforylaci tyrozinu, pro niž je nezbytná také přítomnost akceptorů cholesterolu, Ca^{2+} a HCO_3^- (Salicioni *et al.* 2007; Visconti 2009; Ickowicz *et al.* 2012).

Hyperaktivace spermií je změna vzoru motility z progresivní na hyperaktivovanou. Bičík hyperaktivovaných spermií vytváří mnohem větší sílu než bičík normálně pohyblivých spermií, takže umožňuje spermiím pronikat vysoce viskózní ovidukální tekutinou i dostat se skrz *zona pellucida* oocyty. Hyperaktivace je zásadní pro oplodnění, a proto se považuje za součást kapacity spermií, i když je tento proces regulován mírně odlišně a nezdá se, že by byl přímo spojen s kapacitací. (Suarez & Ho 2003; Sutovsky & Manandhar 2006; Bailey 2010).

3.4 Molekulární mechanismus interakce spermie se *zona pellucida*

Interakce spermie se *zona pellucida* oocyty zahrnuje sled událostí, které jsou podmíněny dosažením odpovídajícího stádia maturace obou zúčastněných gamet. Nejdříve dochází k volnému nespecifickému navázání spermie na ZP glykoproteiny, následuje primární vazba spermií na ZP, indukce akrozomální exocytózy a sekundární vazba spermií na ZP. Nakonec spermie penetruje ZP a následuje fúze gamet (Barros *et al.* 1996; Redgrove *et al.* 2012). I navzdory výjimkám, jako jsou například myši, u kterých bylo popsáno, že akrozomální reakce spermií je indukována už během jejich průchodu skrz kumulární buňky oocyty (Jin *et al.* 2011), je rozpoznání gamet a primární vazba spermie na ZP oocyty základním předpokladem pro úspěšný průnik spermie skrz ZP (Redgrove *et al.* 2012).

3.4.1 *Zona pellucida*

Zona pellucida (ZP) je extracelulární glykoproteinový obal vajíčka savců tvořený 3–4 glykoproteiny, který se nachází mezi plazmatickou membránou oocyty a kumulárními buňkami. Morfologicky se ZP skládá z několika vrstev se zřetelnou asymetrií mezi vnějšími a vnitřními vrstvami. Pórovitá struktura umožňuje průnik relativně velkých molekul,

např. imunoglobulinů. Tloušťka ZP i obsah proteinů jsou značně variabilní, v závislosti na druhu může tloušťka ZP dosahovat 1–25 μm a obsah proteinů se pohybuje od 3 ng u myši až do 30 ng u prasete (Wassarman 1988; Gupta *et al.* 2012). ZP chrání vyvíjející se oocyt a hraje také velmi důležitou roli v rozpoznání a vazbě gamet. Po úspěšném oplození rovněž chrání preimplantační embryo před fyzickým poškozením. (Bleil & Wassarman 1980; Wassarman 1988).

Syntéza ZP glykoproteinů je komplexní proces zahrnující pravděpodobně několik různých cest (Sinowatz *et al.* 1995). Glykoproteiny ZP mohou být v závislosti na druhu syntetizovány buď pouze oocytem, nebo pouze folikulárními buňkami, anebo jak oocytem, tak i folikulárními buňkami. Od způsobu syntézy glykoproteinů se odvíjí tloušťka ZP. U myši jsou ZP glykoproteiny syntetizovány výhradně oocytem, a myší ZP je tedy poměrně tenká, na rozdíl od jiných savců, jako je pes, skot, prase či člověk, u kterých se na produkci glykoproteinů podílí oocyt i folikulární buňky a jejich ZP je tedy velmi dobře vyvinutá (Sinowatz *et al.* 1995, 2001).

Specifické oligosacharidové řetězce navázané na peptidová jádra ZP jsou klíčovými molekulami v procesu interakce mezi gametami, neboť slouží jako receptory pro komplementární proteiny na povrchu spermie (Töpfer-Petersen 1999). Aminokyselinové sekvence glykoproteinů ZP vykazují výraznou mezidruhovou homologii, která svědčí o značné evoluční konzervovanosti primární polypeptidové struktury. Vysoce konzervované jsou i počty a umístění většiny cysteinových zbytků a možných N-glykosylačních míst. Glykoproteiny ZP jsou produktem tří genových rodin – *ZPA*, *ZPB* a *ZPC*, seřazených podle velikosti jejich cDNA. Homologie těchto genových rodin je nejvýraznější mezi jednotlivými členy stejného řádu, například mezi myší a křečkem – hlodavci, nebo prasetem a skotem – kopytci (Harris *et al.* 1994; Gupta *et al.* 2012; Tumova *et al.* 2021). Mezidruhová heterogenita zajišťující druhovou specifitu glykoproteinů ZP je tedy způsobena spíše oligosacharidovými řetězci (O- a N-glykosidicky vázanými) než polypeptidovou částí (Harris *et al.* 1994; Töpfer-Petersen 1999).

Nejdéle prozkoumaná je struktura a složení ZP myši, která je významným modelovým druhem pro výzkum fertilizace. Tloušťka myší ZP dosahuje přibližně 5–7 μm a obsah proteinů se pohybuje okolo 3 ng (Wassarman 1988). Myší ZP se skládá ze tří sulfatovaných glykoproteinů označovaných jako mZP1 (200 kDa), mZP2 (83 kDa) a mZP3 (120 kDa) (Bleil & Wassarman 1983; Wassarman 1988). Glykoproteiny mZP2 a mZP3 tvoří heterodimery, které polymerují a dávají tak vznik dlouhým vláknům s pravidelně se opakujícími jednotkami. Tato dlouhá vlákna jsou pospojována pomocí dimeru mZP1, který je největším myším ZP glykoproteinem, a vzniká tak trojrozměrná síť (Wassarman & Mortillo 1991). Každý ZP glykoprotein sestává z unikátního polypeptidového řetězce a je heterogenně glykosylován O- nebo N-vázanými oligosacharidy (Wassarman 1988, 2005). Glykoproteiny myší ZP jsou syntetizovány a produkovány výhradně oocytem (Wassarman & Mortillo 1991). Glykoprotein mZP3 je důležitý pro primární vazbu spermie na oocyt (Bleil & Wassarman 1983), zatímco mZP2 je důležitý pro sekundární vazbu spermií po akrozomální exocytóze (Bleil *et al.* 1988).

V lidských oocytech jsou exprimovány čtyři ZP geny kódující čtyři korespondující ZP glykoproteiny, *hZPB1* (hZP1, ~100 kDa), *hZPA* (hZP2, ~120 kDa), *hZPC* (hZP3, ~58 kDa) a *hZPB2* (hZP4, ~65 kDa) (Bauskin *et al.* 1999; Lefièvre *et al.* 2004; Chiu *et al.* 2008). Bylo prokázáno, že jak hZP3, tak hZP4 jsou důležité pro vazbu kapacitovaných spermií a následnou indukci akrozomální exocytózy, zatímco hZP2 hraje roli v sekundární vazbě jako receptor pro spermie, které již prodělaly akrozomální reakci (Gupta *et al.* 2009). Lefièvre *et al.* (2004) ve

své studii navíc zjistili, že gen ZPB se sice nachází i v myších oocytech, ale pravděpodobně zde kóduje pouze nefunkční protein.

U skotu byly při použití dvourozměrné gelové elektroforézy za redukujících podmínek rozpoznány čtyři ZP glykoproteiny, označované bZP1, bZP2, bZP3 a bZP4, přičemž bZP2 a bZP4 byly poté identifikovány jako fragmenty bZP1. Použitím protilátek proti prasečím ZP glykoproteinů pak bylo zjištěno, že ZP skotu sestává ze 3 proteinů, které odpovídají velikostí, N-koncovou aminokyselinovou sekvencí i antigenními determinanty pZP1, pZP3 α a pZP3 β , které jsou kódovány prasečími ZPA, ZPB a ZPC geny (Topper *et al.* 1997).

Zona pellucida prasečích oocytů je na rozdíl od některých jiných druhů savců velmi dobře vyvinutá, její tloušťka se pohybuje okolo 16 μ m (Nakano & Yonezawa 2001) a obsah proteinů dosahuje až 30 ng (Wassarman 1988). Glykoproteiny prasečí ZP jsou syntetizovány jak oocytem, tak folikulárními buňkami (Sinowatz *et al.* 2001). Prasečí ZP se skládá ze tří biochemicky a imunologicky rozdílných glykoproteinů, kódovaných třemi různými geny. Nomenklatura se v minulosti několikrát změnila a sjednotila, a ve starších studiích jsou tedy prasečí ZP glykoproteiny značeny: ZP1 (92 kDa; ZPA), ZP3 α (55 kDa; ZPB) a ZP3 β (55 kDa; ZPC) (Hedrick & Wardrip 1986). ZP1 se však skládá ze dvou glykoproteinů, ZP2 (69 kDa) a ZP4 (23 kDa), spojených disulfidickým můstkem (Koyama *et al.* 1991; Hasegawa *et al.* 1994; Taya *et al.* 1995). Podle novější nomenklatury se prasečí ZP skládá z glykoproteinů nazývaných pZP2 (ZPA), pZP3 (ZPC/ZP3- β), tak pZP4 (ZPB/ZP3- α) (shrnuto v Tumova *et al.* 2021). Dále bylo zjištěno, že glykoproteiny ZP3 α (ZPB/pZP4) a ZP3 β (ZPC/pZP3) představují asi 80 % celkového obsahu prasečích ZP glykoproteinů, a dohromady vytváří vysokohmotnostní heterokomplexy, které tvoří důležité strukturní a funkční jednotky. Proteiny plazmatické membrány spermie vykazují vysokou afinitu vůči těmto ZP3 α /ZP3 β komplexům, nikoliv však vůči volným glykoproteinovým podjednotkám (Sinowatz *et al.* 1995; Yurewicz *et al.* 1998). Prasečí ZP1 (pZP2) pravděpodobně může odpovídat myšimu ZP2 a ZP3 α (pZP4) by mohl být homologním glykoproteinem k myšimu ZP1, zatímco ZP3- β (pZP3) se zdá být protějškem myšího ZP3 (Töpfer-Petersen *et al.* 1993; Tumova *et al.* 2021). Pro primární vazbu ZP oocytu se spermii je pravděpodobně důležitý glykoprotein ZP3 α (pZP4) (Yurewicz *et al.* 1993; Tumova *et al.* 2021).

3.4.2 Interakce spermie se ZP

Předtím než dojde ke kontaktu spermie se ZP, musí spermie proniknout skrz *cumulus oophorus*, vrstvu granulárních buněk okolo oocytu ukotvených v extracelulární matrix tvořené glykosaminoglykanem hyaluronanem, který tyto buňky samy produkují. Předpokládanými funkcemi této vrstvy jsou zachycení spermie, či její navedení k oocytu, zabránění proniknutí abnormálních spermií a ochrana ZP před předčasným ztvrdnutím (Van Soom *et al.* 2002). *Cumulus oophorus* mohou penetrovat jen kapacitované spermie s intaktním akrozomem, které využívají aktivity enzymu hyaluronidázy (PH-20), GPI ukotveného proteinu, který je přítomen na plazmatické membráně hlavičky spermie (Lin *et al.* 1994). Základním mechanismem rozpoznání gamet a jejich vazby je interakce mezi povrchovými molekulami spermie a oligosacharidovými ligandy glykoproteinů ZP. Tento mechanismus je pravděpodobně značně evolučně konzervovaný, neboť podobný princip byl pozorován u mořských bezobratlých i u suchozemských savců (Töpfer-Petersen 1999).

Jak již bylo zmíněno výše, interakce spermie se ZP začíná dvěma po sobě následujícími fázemi, kterých se účastní spermie s intaktním akrozomem. Nejdříve dochází k prvotnímu kontaktu spermie se ZP, jedná se o dočasné připojení, které je nepevné, druhově nespecifické a vratné. Hned po něm následuje pevná vazba, která je druhově specifická a již nevratná (Hartmann *et al.* 1972; Barros *et al.* 1996; Redgrove *et al.* 2012). ZP receptory spermie důležité pro primární vazbu se nacházejí v apikální oblasti plazmatické membrány hlavičky spermie (van Gestel *et al.* 2007). Jak bylo popsáno na myším modelu, tyto proteinové receptory interagují se specifickými sacharidovými podjednotkami ZP3 glykoproteinu (Töpfer-Petersen 1999). Tato vazba poté spouští signální kaskádu končící akrozomální reakcí. V současné době je navrženo několik alternativních modelů vazby spermie se ZP, jak bylo shrnuto v Redgrove *et al.* 2012:

- Glykanový model – původní model naznačující důležitost O-vázané glykosylace na Ser332 a Ser334.
- Model supramolekulární struktury, ve kterém je oblast vázající spermie tvořena komplexem tří hlavních glykoproteinů *zona pellucida* a regulována štěpením glykoproteinu ZP2.
- Hybridní model, který zahrnuje prvky obou dřívějších modelů tím, že předpokládá, že se spermie vážou na O-glykan, který je konjugován k ZP3 v jiném místě než Ser332 nebo Ser334, a že přístup spermií k tomuto glykanu je regulován proteolytickým štěpením ZP2.
- Doménově specifický model, který předpokládá duální vazebný systém, ve kterém protein (proteiny) spermií interaguje s glykany a/nebo proteinovou kostrou ZP3 v závislosti na svém glykosylačním stavu.
- Nový model, ve kterém je rozpoznávání gamet možné rozdělit na alespoň dva odlišné vazebné jevy, z nichž první zahrnuje přilnutí k oviduktním glykoproteinům, které jsou periferně asociovány s vaječným obalem, před zapojením do ligandu závislého na ZP3.

V současnosti se upouští od dřívějšího předpokladu, že za interakci spermie se ZP oocyty je zodpovědná jediná receptorová molekula. Naopak dnes převládají důkazy naznačující koordinované působení většího počtu receptorových molekul, které mohou dohromady tvořit složený funkční multimerní komplex. Výhodou takto složitějšího systému by mohlo být zvýšení pravděpodobnosti úspěšného navázání spermie na ZP a tedy zvýšení šance na oplození. Tento model by také vysvětloval existenci takového množství popsáných receptorových proteinů spermie zapojených do interakce se ZP (van Gestel *et al.* 2007; Redgrove *et al.* 2012).

3.4.3 Receptory spermie pro primární vazbu na ZP

Současný obecně přijímaný koncept tedy předpokládá, že primární vazby spermie na ZP oocyty se účastní komplex mnoha povrchových proteinů, nikoliv pouze jeden receptor, a spermie je tak zapojena do více souběžných či postupných vazebných událostí s různými ligandy *zona pellucida*. U mnoha druhů bylo dodnes popsáno značné množství proteinů plazmatické membrány hlavičky spermie, které vykazují afinitu k ZP, a seznam těchto receptorů je neustále upřesňován podle toho, jak jsou objevovány nové potenciální proteiny pro primární vazbu a důležitost jiných je naopak vyvrácena třeba na základě knock-outových pokusů (van Gestel

et al. 2007; Redgrove *et al.* 2012). Tyto receptory se společně sdružují do vysokomolekulárních komplexů, které, jak se ukazuje, obsahují řadu proteinů s různými funkcemi včetně chaperonů, enzymů (především kináz), signalizačních proteinů a proteinů buněčné adheze, a tím zprostředkovávají interakci se ZP (Kongmanas *et al.* 2015).

U myších spermií je za hlavní receptor pro vazbu na ZP považován protein β 1,4-galaktosyltransferáza, který se váže na koncové N-acetylglukosaminové zbytky glykoproteinu ZP3 a agregací β 1,4-galaktosyltransferáz na povrchu spermie poté dochází k indukci akrozomální reakce (Macek *et al.* 1991; Shur & Hall 1982). Další výzkum však ukázal, že spermie myších samců s knock-outovaným genem pro galaktosyltransferázu dokážou oplodnit vajíčko *in vivo*. Chyběla jim ale schopnost indukovat AR jako odpověď na vazbu na ZP3. Ačkoliv je u myší AR vyvolaná vazbou na ZP3 postradatelná, jak bude zmíněno dále, její přítomnost dodává spermiím fyziologickou výhodu pro oplodnění (Lu & Shur 1997). β 1,4-galaktosyltransferáza byla lokalizována i na kančích spermiích s neporušeným akrozomem, u nichž také vykazuje vazebnou afinitu k ZP, její zablokování však nesnížilo schopnost spermií vázat se na ZP (Rebeiz & Miller 1999). Mezi další ZP receptory myší spermie patří α -D-manosidáza, integrální plazmatický protein reagující s manosylovými zbytky ZP glykoproteinů, jejíž inhibice vede k blokaci vazby spermie na oocyt (Cornwall *et al.* 1991). Dalšími významnými ZP receptory jsou sp56, myší lektin-like 56-kDa membránový periferní protein, který interaguje s oligosacharidovými jednotkami mZP3 (Cheng *et al.* 1994), p95/zona receptor kináza ZRK, integrální 95-kDa protein v plazmatické membráně akrozomu (Leyton & Saling 1989), SED1, myší p47 homolog (Ensslin & Shur 2003), zonadhezin (Tardif *et al.* 2010), SLIP1 (Tanphaichitr *et al.* 1993), sulfogalaktosylglycerolipid (White *et al.* 2000), arylsulfatáza A (Tantibhedhyangkul *et al.* 2002), fukosyltransferáza (Ram *et al.* 1989) nebo β -galaktózu vázající protein (Mori *et al.* 1997).

U ostatních zvířat nejsou receptory pro vazbu spermií na ZP zdaleka tak dobře prozkoumány jako u myší. β 1,4-galaktosyltransferáza však byla identifikována jako hlavní ZP receptor na spermiích býků (Tengowski *et al.* 2001) i hřebců (Fayrer-Hosken *et al.* 1991). U křeččích spermiích se na vazbě na ZP podílí například protein N-acetylglukosaminidáza (Zitta *et al.* 2006), P26h/26-kDa protein (Montfort *et al.* 2002) a BSp66, 66-kDa bovinní serinová proteáza (Cesari *et al.* 2005). Králičím ZP receptorem spermií je lektin sp17 (Richardson *et al.* 1994) a u morčat vykazuje vazebnou afinitu k ZP povrchový antigen PH-20/hyaluronidáza, 60-64-kDa protein (Primakoff *et al.* 1985).

Na povrchu lidských spermií bylo rovněž identifikováno několik ZP receptorů, například, stejně jako u myší, ZRK/95-kDa protein (Brewis *et al.* 1998; Burks *et al.* 1995), mannose-binding protein/manosidáza (Benoff *et al.* 1993), lektin-like 54 kDa protein (Abdullah *et al.* 1991), selectin-like molekuly odvozené od glykodelinu (Dell *et al.* 1995), sperm agglutination antigen 1 (Diekman *et al.* 1997) nebo akrozin (Tesařík *et al.* 1990; Tesařík *et al.* 1988).

3.4.4 Receptory spermie pro primární vazbu na ZP u prasete

U prasečích oocytů jsou do primární vazby spermií na *zona pellucida* zapojeny neutrální, ale nikoli kyselé triantenární a tetraantenární N-vázané sacharidové struktury, stejně jako určité O-vázané cukerné řetězce glykoproteinu pZP3, vazebného homologu myšího ZP3 glykoproteinu (Noguchi *et al.* 1992; Yurewicz *et al.* 1991). Tato biologická aktivita je spojena

hlavně s oligosacharidy navázanými v N-terminální oblasti pZP3 α , nikoliv pZP3 β (Sacco *et al.* 1989). Předpokládá se, že ve vazbě spermie na ZP hrají roli jak β -galaktosylové, tak α -D-manosylové zbytky glykoproteinů prasečí ZP (Song *et al.* 2007; Yonezawa *et al.* 2005).

Molekuly spermií zapojené do primární vazby na ZP jsou lokalizovány do apikální oblasti kapacitovaných, akrozom-intaktních hlaviček spermií; zatímco ty zapojené do sekundární vazby na ZP jsou lokalizovány na vnitřní akrozomální membráně nebo v akrozomální matrix (Tanphaichitr *et al.* 2007; van Gestel *et al.* 2007; Kongmanas *et al.* 2015). Kančí spermie získávají proteiny s vazebnou afinitou k ZP během maturace v oblasti *corpus epididymis*, což přímo koreluje s vývojovým stádiem, ve kterém spermie získávají schopnost oplodňovat oocyty (Burkin & Miller 2000).

Identifikace konkrétních molekul, které zprostředkovávají primární rozpoznávání a vazbu na ZP, stále zůstává obtížným úkolem. Na prasečích spermiích bylo dosud popsáno několik proteinů důležitých pro primární vazbu na oocyt. Mezi nejvýznamnější patří AWN-1 (Dostálová *et al.* 1995), AQN-1 a AQN-3 (Calvete *et al.* 1996), periferní proteiny ze skupiny spermadhezinů. Zonadhezin je transmembránový protein taktéž vykazující vysokou druhově specifickou vazebnou afinitu k ZP (Hardy & Garbers 1995). Další proteinem, který je pravděpodobně důležitý pro vazbu na ZP oocyty, je lactadherin p47, periferně vázaný protein plazmatické membrány spermie (Ensslin *et al.* 1998; Zigo *et al.* 2015). Protein sp38 byl lokalizován na vnitřní i vnější akrozomální membráně, a je považován za receptor pro sekundární vazbu gamet (Mori *et al.* 1993), později byl však lokalizován i na povrchu spermií, a může tedy hrát roli i v primární vazbě (Mori *et al.* 1995). Periferní protein arylsulfatáza A/P68 byl rovněž označen za protein hrající roli v primární vazbě (Carmona *et al.* 2002; Kelsey *et al.* 2020), stejně jako integrální protein 55-kDa, nazývaný také jako adhesion protein z (APz) (Peterson & Hunt 1989). Dalšími receptory pro primární vazbu jsou protein pB1/DQH (Maňásková *et al.* 2007) a fucose-binding protein (Töpfer-Petersen *et al.* 1985), který byl později identifikován jako akrozin (Töpfer-Petersen & Henschen 1987). Některé proteiny byly původně lokalizovány uvnitř akrozomu, a předpokládala se tedy jejich role v sekundární vazbě na ZP. Později se však ukázalo, že tyto proteiny jsou během kapacitace translokovány na plazmatickou membránu spermie, a mohou se tedy účastnit i primární vazby na ZP. To je i případ komplexu proakrozin/akrozin (Jones & Brown 1987; Tanphaichitr *et al.* 2015; Zigo *et al.* 2013). Bylo prokázáno, že na kapacitovaných spermiích se proakrozin/akrozin přesouvá do apikální oblasti hlavičky, kde bývají lokalizovány receptory pro primární vazbu (Puigmulé *et al.* 2011).

3.4.5 Akrozomální reakce a sekundární vazba spermie na oocyt

Výsledkem kapacitace spermie je její odpověď na vazbu se *zona pellucida* oocyty akrozomální reakcí, která je další klíčovou událostí procesu fertilizace. Při akrozomální reakci dochází k mnohonásobné fúzi vnější akrozomální membrány a plazmatické membrány spermie, po níž následuje vylití obsahu akrozomu a odhalení vnitřní akrozomální membrány pro sekundární vazbu (Florman *et al.* 2008). Jakmile je spermie navázána na ZP, aktivuje se řada signálních transdukčních drah a zahájí se akrozomální exocytóza. Tato složitá sekreční událost pak umožňuje spermiím proniknout vrstvou ZP a vnitřní akrozomální membrána spermie

se poté spojí a fúzuje s plazmatickou membránou vajíčka, oolemou (Breitbart & Spungin 1997; Florman *et al.* 2008).

Je obecně přijímáno, že fyziologickým induktorem akrozomální reakce u mnoha savců je glykoprotein ZP3 (Bleil & Wassarman 1983; Florman *et al.* 2008). Neplatí to však u všech druhů. Výjimku tvoří například myši, u jejichž spermii je akrozomální reakce indukována už během jejich průchodu skrz kumulární buňky oocyty (Jin *et al.* 2011). Akrozomální reakce v tomto případě je pravděpodobně spuštěna progesteronem sekretovaným kumulárními buňkami (Roldan *et al.* 1994; Jin *et al.* 2011). Progesteron se ostatně podílí na indukci akrozomální reakce i u jiných savčích druhů včetně člověka (Meizel *et al.* 1997; Witte & Schäfer-Somi 2007). Indukce AR kontaktem s expandovanými kumulárními buňkami ještě před dosažením ZP byla pozorována i u prasečích spermii (Mattioli *et al.* 1998).

Pro akrozomální reakci je stěžejní zvýšení koncentrace Ca^{2+} , které zvyšuje přechodný příliv iontů vápníku do spermie prostřednictvím Ca^{2+} napěťově řízených kanálů a které vede k aktivaci signálních drah (Breitbart & Spungin 1997). Vše je pravděpodobně regulováno dráhou závislou na G-proteinech aktivovaných kontaktem s glykoproteinem ZP3 (Florman *et al.* 1998). Zvýšení intracelulárních hladin Ca^{2+} a pH spolu s depolymerací F-aktinu umožňuje fúzi membrán a akrozomální exocytózu (Breitbart & Spungin 1997). Fúze vnější akrozomální membrány s plazmatickou membránou spermii umožňuje uvolnění hydrolytických enzymů akrozomu. V něm je přítomno mnoho proteáz, přičemž mezi nejdiskutovanější patří akrozin, který má chymotryptickou aktivitu (Ikawa *et al.* 2010). V akrozomu bylo popsáno i několik dalších proteolytických enzymů. Váček akrozomu uvolňuje také mnoho enzymů štěpících sacharidy, mezi nejvýznamnější patří hyaluronidáza, neuraminidáza a β -galaktosidáza, a také lipázy, fosfolipázu C a fosfolipázu A_2 . Proteázy a glukosidázy štěpí ZP oocyty a umožňují spermii pronikat směrem k vajíčku. Pouhé vylití hydrolytických enzymů však není dostačující k proniknutí skrz ZP, pro úspěšné dosažení vajíčka je nezbytná také hnací síla motilních spermii (Sutovsky & Manandhar 2006). Rovněž se předpokládá, že na průniku spermie skrz ZP se podílí také ubiquitin-proteazomový systém (UPS). Glykoproteiny ZP jsou nejprve označeny ubiquitinem a poté degradovány proteazomem, který se nachází na povrchu nebo uvnitř spermie (Yi *et al.* 2007; Zimmerman *et al.* 2011).

Po akrozomální reakci dochází k odhalení vnitřní akrozomální membrány. V tomto okamžiku nastává další interakce mezi spermii a oocytem, tzv. sekundární vazba. To je nezbytné pro fúzi spermie s plazmatickou membránou oocyty. Jak bylo zmíněno výše, u myši a lidí je pro sekundární vazbu důležitý glykoprotein ZP2 (Bleil *et al.* 1988; Gupta *et al.* 2009). U prasat zatím nebylo jednoznačně prokázáno, který ZP glykoprotein je nejdůležitější pro sekundární vazbu spermie (Tanphaichitr *et al.* 2007). Receptory spermii, které se účastní sekundární vazby na oocyt, pocházejí převážně ze spermatogenních buněk a jsou lokalizovány hlavně na vnitřní akrozomální membráně nebo jako součást akrozomální matrix (Howes & Jones 2002; Tanphaichitr *et al.* 2007). Nejvíce studovaným proteinem lidských i prasečích spermii hrajícím roli v sekundární vazbě na oocyt je proakrozin/akrozin (Tesařík *et al.* 1988; Töpfer-Petersen & Calvete 1995). Protein sp38 je rovněž považován za receptor pro sekundární vazbu (Mori *et al.* 1993). Jako další molekula důležitá pro sekundární vazbu na ZP byla na spermiiích morčat popsána hyaluronidáza/PH-20 (Hunnicuttt *et al.* 1996).

Po sekundární vazbě spermie na oocyt následuje fúze obou gamet. Akrozomální reakce je nutná také pro vystavení proteinu IZUMO1, o kterém se dnes předpokládá, že je zodpovědný

za vazbu plazmatických membrán spermie a vajíčka vedoucích k jejich fúzi (Inoue *et al.* 2005; Bianchi *et al.* 2014). IZUMO1 se váže na folátový receptor JUNO na plazmatické membráně oocyty. JUNO dále interaguje s dalšími proteiny oolemy, jako jsou tetraspaniny CD9 a CD81 nebo integriny $\alpha 6$ a $\beta 1$. Integriny se vážou na proteiny fertilin β (ADAM2 - z angl. A Disintegrin And Metalloprotease) a cyritestin ADAM3 na plazmatické membráně spermie. Kromě těchto molekul jsou do vazby a fúze gamet zapojeny i CRISP (z angl. cysteine-rich secretory proteins) proteiny na spermii, které mají na oocyty také svá komplementární vazebná místa (Primakoff & Myles 2002; Cohen *et al.* 2004; Inoue *et al.* 2005; Bianchi *et al.* 2014).

3.5 Metody studia proteinů účastnících se vazby spermií na ZP

Plazmatická membrána spermií je dynamická struktura s různými mikrodomény, která prochází dramatickými změnami během zrání spermií v nadvarleti, ejakulace a kapacitace spermií. Receptory spermií pro *zona pellucida* tvoří na plazmatické membráně povrchovou multimolekulární strukturu, jejíž komponenty zahrnují proteiny vázající jiné proteiny nebo sacharidy (Chiu *et al.* 2014). Výběr vhodné metody pro izolaci těchto proteinů je klíčovým faktorem jejich úspěšného studia. Kandidátní molekuly pro vazbu na ZP často představují minoritní složky v celkových buněčných extraktech spermií, a pro jejich identifikaci proto musí být používány sofistikované izolační metody (Zigo *et al.* 2013) Pro proteomickou analýzu povrchových proteinů plazmatické membrány spermií je také důležité zabránění kontaminaci subcelulárními organelami a cytozolickými proteiny (Zhao *et al.* 2004).

Extrakce proteinů z biologických membrán se obvykle provádí pomocí různých extrakčních činidel či detergentů, které proteiny solubilizují a purifikují (Orwick-Rydmark *et al.* 2016). Některé membránové proteiny se totiž agregují do tzv. detergent-rezistentních membrán, nerozpustných membránových frakcí (Nixon *et al.* 2009). Často používaným silným detergentem je například SDS, dodecylsírán sodný, který kompletně denaturuje proteiny. SDS se používá většinou pro lýzu buněk a elektroforetické rozdělení proteinů. Šetrnějším a také hojně používaným detergentem je neiontový povrchově aktivní Triton X-100 nebo Brij-35. Komerčně vyráběných detergentů existuje velké množství, což umožňuje zvolit nejvhodnější detergent pro daný účel (Orwick-Rydmark *et al.* 2016).

Další metodou používanou pro studium proteinů plazmatické membrány spermií je tzv. nitrogenová kavítace, kavítace použitím tekutého dusíku, díky níž dochází k frakcionaci buněk. Plazmatické membrány buněk jsou poté izolovány diferencíální centrifugací od akrozomálních membrán, mitochondriálních membrán a zbytků spermií. Z plazmatických membrán pak mohou být následně extrahovány proteiny (Gillis *et al.* 1978; Flesch *et al.* 1998).

Pro cílenou izolaci periferních i integrálních proteinů plazmatické membrány spermií se také používá metoda založená na selektivním značení proteinů speciální značkou, kovalentně se vázající na proteiny. To umožňuje selektivní separaci označených proteinů od ostatních proteinů po lýzaci buněk. Membránové proteiny lze značit biotinem, a poté následuje lýzace spermií. Označené proteiny mohou být následně izolovány pomocí mikročástic konjugovaných se streptavidinem. Redukcí disulfidových vazeb se poté získají izolované membránové proteiny z povrchu buňky (Zhao *et al.* 2004).

K selekci povrchových proteinů spermie vykazujících vazebnou afinitu k ZP se dá využít i afinitní chromatografie. Ke gelové matrix s navázanými fragmenty *zona pellucida* je

přidána solubilizovaná plazmatická membrána z apikální oblasti spermií, a tak se dají izolovat proteiny, které se vážaly na fragmenty ZP (Flesch *et al.* 2001).

Často používaná metoda Far-Western blot využívá vazebných studií přímo na membráně a je vhodná pro počáteční identifikaci proteinů spermií vykazujících vazebnou afinitu k ZP. Membrána je po provedení elektropřenosu separovaných povrchových proteinů spermií nejdříve inkubována s biotinem značenými glykoproteiny ZP, a poté inkubována s avidinem konjugovaným s křenovou peroxidázou (Zigo *et al.* 2013).

Zigo *et al.* (2015) představili metodu využívající panel monoklonálních protilátek vytvořených proti proteinům z povrchu spermií. Tento panel monoklonálních protilátek byl využit k rozpoznání a lokalizaci proteinů na spermiích nebo v reprodukčních tkáních či tekutinách za použití nepřímé imunofluorescenční mikroskopie. Dále byla sledována vazebná afinita panelem rozpoznávaných proteinů k ZP. Následně byl panel monoklonálních protilátek použit k precipitaci vybraných proteinů s vazebnou afinitou k ZP, a tyto proteiny byly poté sekvenovány a identifikovány (Zigo *et al.* 2015).

3.6 Rab proteiny

Rab proteiny tvoří nejpočetnější rodinu nadrodiny Ras G-proteinů. V lidském genomu bylo dosud identifikováno okolo 70 genů kódujících proteiny Rab rodiny (Goud *et al.* 2018). Rab proteiny jsou malé monomerní GTPázy, tedy enzymy, které hydrolyzují GTP na GDP. Rab GTPázy jsou obvykle lokalizovány specificky na intracelulárních membránách, kde zajišťují napojení na cytoskelet a spolu se svými efektorů se podílejí na regulaci všech fází intracelulárního membránového transportu, zajišťujícího sekreci, endocytózu, recyklaci nebo degradaci molekul. Kontrolují transportní dráhy včetně tvorby a transportu vezikul, třídění nákladu, vazby vezikul k cílovým membránám a jejich fúzi, a zařizují tak, že se vezikuly dostanou vždy přesně na místo svého určení (Zerial & McBride 2001; Liu & Storrie 2012).

Rab proteiny se stejně jako jiné GTPázy v eukaryotické buňce vyskytují ve dvou formách, kterými regulují buněčnou aktivitu, a to v aktivní GTP-vázající konformaci a v neaktivní GDP-vázající konformaci. Konverze GDP-vázající formy na GTP-vázanou formu je způsobena výměnou nukleotidů katalyzovanou výměnným faktorem GDP / GTP (RabGEF). Ke konverzi z GTP-vázané formy na GDP-vázanou dochází hydrolýzou GTP, usnadněnou proteinem aktivujícím GTPázu (RabGAP). Neaktivní GDP-vázaná forma proteinu interaguje s doprovodným proteinem Rab (REP) a disociačním inhibitorem GDP (GDI) (Stenmark & Olkkonen 2001).

Po výměně nukleotidů na aktivní konformaci Rab GTPázy interagují s funkčně rozmanitými efektorovými molekulami včetně proteinových motorů a fúzních komplexů. Rab efektorů je mnoho a vykazují velkou strukturní heterogenitu, což naznačuje, že se jedná o vysoce specializované molekuly, jejichž aktivita je výhradně přizpůsobena jednotlivým organelám a transportním systémům uvnitř buňky (Pereira-Leal & Seabra 2000; Stenmark & Olkkonen 2001).

Rab proteiny byly lokalizovány na mnoha různých intracelulárních organelách, a dá se tedy usuzovat, že každý krok membránového transportu zahrnuje jiný Rab protein. Za normálních okolností se v buňkách Rab proteiny shromažďují u svých cílových organel a mohou tedy sloužit jako markery těchto organel (Chavrier *et al.* 1991; Bhuijn & Roy 2014).

Rab proteiny jsou důležitými signalizačními molekulami a regulují nejrůznější endocytické, transcytické a exocytické transportní dráhy. Jejich deregulace je proto často příčinou různých onemocnění (Bhain & Roy 2014).

3.6.1 Struktura Rab proteinů

Většina Rab GTPázy má molekulovou hmotnost okolo 24 kDa a skládá se přibližně z 220 aminokyselin (Brighthouse *et al.* 2010). Proteiny se vyskytují ve dvou různých konformacích, přičemž hlavní rozdíly tvořené záměnou nukleotidů se vyskytují v oblastech označených jako „switch I“ a „switch II“. Tyto přepínací oblasti se v trojrozměrné struktuře nacházejí na povrchu molekuly. Četné studie mutagenese ukázaly, že tyto přepínací oblasti jsou klíčové pro interakci proteinů Rab s regulačními proteinovými partnery, jako jsou RabGEF a RabGAP (Stenmark & Olkkonen 2001).

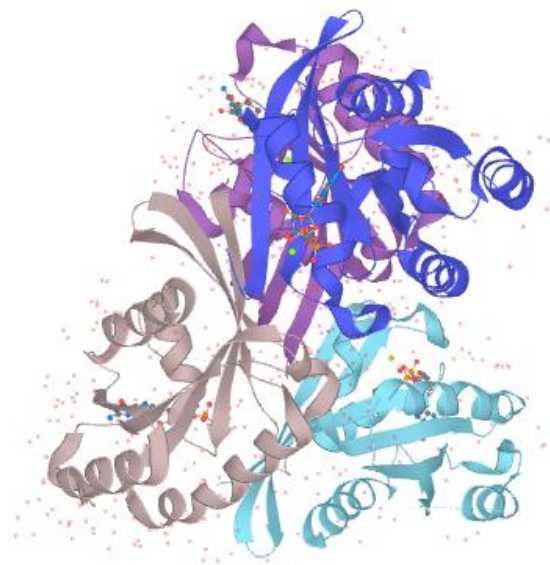
Rab proteiny se vyznačují přítomností několika vysoce konzervovaných oblastí, které se nacházejí i u ostatních členů Ras nadrodiny. Bylo identifikováno pět různých krátkých úseků označovaných jako RabF1-5, které se nacházejí jen u členů Rab rodiny. Tyto takzvané RabF oblasti se shlukují v přepínacích oblastech I a II a kolem nich. Dále byly identifikovány čtyři oblasti, označované RabSF1-4, které mají významně vyšší konzervovanost v rámci Rab podskupin než mezi nimi. Byl navržen model, ve kterém se efekторы a regulátory vážou jak na RabF motivy v přepínacích I a II oblastech proteinu, aby rozlišovaly mezi aktivními a neaktivními konformacemi, tak na RabSF oblasti pro specificitu (Stenmark & Olkkonen 2001; Brighthouse *et al.* 2010).

Rab proteiny sdílejí prostorové uspořádání, které je víceméně charakteristické pro všechny malé GTPázy nadrodiny Ras. Základní struktura těchto proteinů se skládá ze šestivláknového β -skládaného listu, který obsahuje pět paralelních vláken a jedno vlákno antiparalelní, a který je obklopený pěti α šroubovicemi. Oblasti odpovědné za vazbu guaninového nukleotidu a Mg^{2+} , stejně jako hydrolyzu GTP, jsou v této struktuře umístěny v pěti smyčkách, které spojují α helixy a β řetězce. Aminokyselinové zbytky, které se spojují v prostoru za vzniku tohoto aktivního místa, jsou úzce spojeny s fosfátovými skupinami vázaného nukleotidu a Mg^{2+} , a jsou vysoce konzervované napříč celou Ras nadrodinou. Využívají se tedy k snadnému rozpoznání jakékoli malé GTPázy (Stenmark & Olkkonen 2001).

Hlavním úsekem, který od sebe odlišuje jednotlivé Rab proteiny, je C-terminální oblast. Tato oblast je stěžejní pro správnou lokalizaci proteinů v buňce (Gomes *et al.* 2003). Rab proteiny jsou v rámci posttranslačních modifikací prenylovány přidáním jedné nebo dvou 20uhlíkových geranylgeranylových skupin k cysteinovým zbytkům na karboxylovém konci proteinu pomocí enzymu geranylgeranyl transferázy. Prenylační motivy sestávají ze dvou C-koncových cysteinových zbytků, nalezených v jedné z následujících kombinací: XXXCC, XXCCX, XCCXX, CCXXX nebo XXCXC, kde X značí libovolnou aminokyselinu. Přítomnost motivu dvojitého cysteinu na C-konci je obecně velmi dobrou diagnostikou Rab proteinů. Některé Rab proteiny však mají k dispozici pouze jeden cysteinový zbytek pro prenylaci. Motiv prenylovaného dvojitého cysteinu proto může potvrdit, že daná malá GTPáza je Rab, ale jeho absence nemůže Rab vyloučit (Pereira-Leal a Seabra 2000). Prenylace je nutná pro ukotvení proteinů do buněčných membrán. Při absenci této modifikace zůstávají takto postižené proteiny v cytozolu a nejsou schopny správně fungovat (Gomes *et al.* 2003).

3.7 Protein Rab-2A

Protein Rab-2A patří do podskupiny Rab malých GTPáz nadrodiny Ras. Podobně jako ostatní členové rodiny Rab proteinů se řadí mezi nezbytné regulátory vezikulárního transportu včetně tvorby vezikul, pohybu vezikul závislého na aktinu a tubulinu a zacílení a fúze s membránami (Stenmark & Olkkonen 2001). Proteiny Rab-2A a Rab-2B jsou vysoce homologní savčí ortology evolučně konzervovaného Rab-2, jejichž aminokyselinová sekvence je identická z 85,8 %. Funkce proteinu Rab-2B je nezávislá na Rab-2A, také však působí v oblasti Golgiho aparátu (Aizawa & Fukuda 2015). Struktura Rab-2A je zobrazena na obrázku 2. Molekulová hmotnost tohoto proteinu se pohybuje okolo 24–25 kDa nebo 27 kDa (Zigo *et al.* 2015; Bae *et al.* 2019).



Obrázek 2 Struktura proteinu Rab-2A; převzato z UniProtKB databáze, uniprot.org

3.7.1 Funkce Rab-2A

Podobně jako ostatní Rab proteiny se i Rab-2A účastní regulace intracelulárního membránového transportu a pravděpodobně se podílí na vytvoření a zachování struktury Golgiho komplexu (Aizawa & Fukuda 2015; Liu & Storrie 2012). Rab-2A je nezbytným proteinem pro transport molekul z endoplazmatického retikula (ER) do Golgiho komplexu (Tisdale *et al.* 1992). Do současnosti byl Rab-2A identifikován u mnoha druhů v nejrůznějších buňkách a tkání, ve kterých zastává mnoho různých funkcí.

Nedávná studie ukázala, že protein Rab-2A se podílí na regulaci stresu ER v buňkách vylučujících inzulin. Rab-2A byl v těchto buňkách lokalizován v tzv. ERGIC kompartmentu, přechodné tubulární membránové oblasti mezi drsným ER a Golgiho aparátem. ERGIC kompartment funguje jako první třídící stanice po ER pro anterográdní i retrográdní transport. Rab-2A je pravděpodobně stěžejním přepínačem, který zde kontroluje, zda by měl být inzulin sekretován nebo degradován (Sugawara *et al.*, 2014). V pankreatických β -buňkách rovněž protein Rab-2A společně s proteinem Rab-27A kontrolují všechny fáze exocytózy sekrečních granulí, od vzniku transportních váček z trans-Golgi sítě, třídění a maturace „cargo“ proteinů, až po přenos a fúzi váček s cílovou plazmatickou membránou (Matsunaga *et al.* 2017).

Protein UNC-108, vysoce konzervovaný homolog Rab-2, byl detekován i u háďátka *Caenorhabditis elegans*, u něhož vykazuje velmi silnou expresi v neuronech. Bylo zjištěno, že je potřebný pro zrání neuronálních transportních váčků. Rab-2 je také potřeba k zabránění tomu, aby byl váček s nákladem během svého zrání předčasně odstraněn do pozdních endozomálních oddílů (Sumakovic *et al.* 2009). Ze studií *C. elegans* i lidí se hromadí důkazy o významné roli Rab-2 nebo Rab-2A v nervové soustavě. Nedávno se ukázalo, že polymorfismus genu pro Rab-2A ovlivňuje prefrontální kortikální morfologii, funkční konektivitu a pracovní paměť, což jsou všechny klíčové deficity spojené s etiologií poruch neuronálního vývoje, včetně schizofrenie a poruch autistického spektra (Li *et al.* 2015; Takata *et al.* 2016).

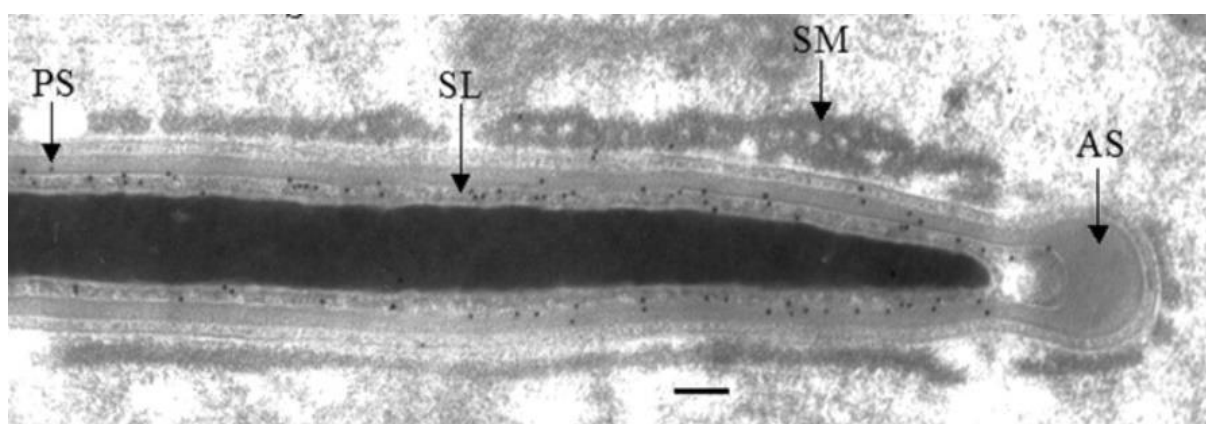
V savčích buňkách se Rab-2A také účastní regulace tvorby autofagozomů a autolysozomů v procesu makroautofágie, lysozomální degradační dráhy nezbytné pro vývoj a homeostázu buňky. Rab-2A podporuje autofágni dráhu dodáváním membrán z Golgiho sítě a postupným zapojováním odlišných autofagických mechanismů (Ding *et al.* 2019).

V posledních letech je věnována pozornost souvislosti deregulace exprese některých Rab proteinů nebo proteinů s nimi spolupracujících s některými onemocněními. Bylo zjištěno, že blíže nespecifikovaný Rab-2 protein bývá často nadměrně exprimován v mononukleárních buňkách periferní krve (buňky typu lymfocytů nebo monocytů/makrofágů) u lidí se Sézaryho syndromem, což je maligní kožní lymfom z T-buněk s výskytem nádorových buněk v krvi (Culine *et al.* 1993). Protein Rab-2A je také zásadní pro podporu proteolytické aktivity a invazivity buněčných linií rakoviny prsu, v nichž reguluje transport E-kadherinu, který je důležitým proteinem pro tvorbu mezibuněčných spojů, a MT1-MMP (z angl. membrane type I-matrix metalloproteinase), což je základní metaloproteáza pro degradaci a remodelaci pojivové tkáně (Kajihio *et al.* 2016). Hladina Rab-2A je zvýšena v lidských buňkách rakoviny prsu a jeho zvýšená exprese je silným a nezávislým prediktorem recidivy (Kajihio *et al.* 2016; Luo *et al.* 2015). Nadměrná exprese Rab-2A také koreluje se špatným klinickým průběhem a vysokou mortalitou, což naznačuje, že Rab-2A by mohl sloužit jako biomarker prognózy u tohoto onemocnění (Luo *et al.* 2015). Rab-2A byl rovněž identifikován jako potenciální biomarker spinocelulárního karcinomu dutiny ústní, neboť byla odhalena zvýšená exprese Rab-2A genu v buňkách rakovinné tkáně v 80 % testovaných klinických případech (Dey *et al.* 2015). Následující studie potvrdila, že exprese Rab-2A je podstatně vyšší v rakovinných buňkách tkáně ústní dutiny než v sousedících normálních buňkách. Rab-2A byl lokalizován v cytoplazmě buněk rakovinné tkáně, kde se účastní signální dráhy podporující invazivitu buněk a lokální progresi nádoru (Dey *et al.* 2016).

3.7.2 Rab-2A v kontextu reprodukce

Přesná role ani mechanismus funkce Rab proteinů ve spermiích zatím nebyly plně objasněny. Předpokládá se, že by mohly být klíčovými proteiny souvisejícími s kapacitací, a také by mohly sloužit jako biomarkery samčí fertility (Bae *et al.* 2019). Dosud byla ve spermiích prokázána existence několika Rab proteinů, kromě Rab-2A jde o proteiny Rab-3A, Rab-5, Rab-8A, Rab-9, Rab-11, Rab-14, Rab-25, Rab-27A a Rab-34A (Yunes *et al.* 2000; Mountjoy *et al.* 2008; Bustos *et al.* 2012; Bae *et al.* 2019). Kromě spermií byl Rab-2A již identifikován i v oocytech, konkrétně būvolích, kde se také předpokládá jeho zapojení do vezikulárního transportu (Chen *et al.* 2016).

Poměrně nedávno bylo zjištěno, že protein Rab-2A se během spermiogeneze podílí na biogenezi akrozomu býčích spermií. Účastní se regulace vezikulárního transportu z trans-Golgiho sítě na akrozomální membránu, což je směr transportu, který se u jiných proteinů skupiny Rab-2 nepředpokládá, přinejmenším ne v somatických buňkách. Ve spermatidách tak Rab-2A reguluje transport a fúzi malých sekrečních vezikul do rostoucích proakrozomových a akrozomových vezikul a zajišťuje jejich další fúzi. Po dokončení spermiogeneze zůstává Rab-2A ve zralých spermatidách zabalen do proteinového komplexu jako součást subakrozomální vrstvy perinukleární théky, jak je vyznačeno na obrázku 3 (Mountjoy *et al.* 2008; Oko & Sutovsky 2009). Subakrozomální vrstva je struktura obsahující F-aktin a keratin, která se nachází mezi akrozomální membránou a jadernou membránou, a pevně ukotvuje akrozom k jádru během tvarování hlavičky spermie, čímž akrozom stabilizuje (Kierszenbaum *et al.* 2003).

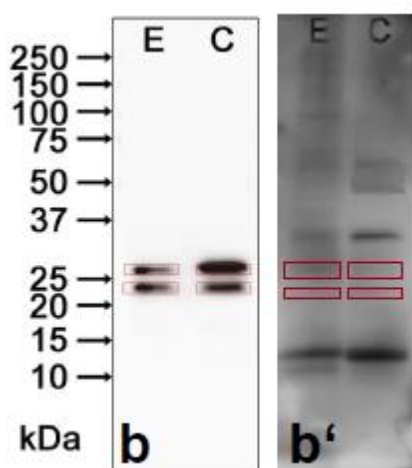


Obrázek 3 Lokalizace proteinu Rab-2A v subakrozomální oblasti perinukleární théky spermatidy, PS - postakrozomální oblast, SL - subakrozomální oblast, SM – část Sertoliho buňky, AS – apikální oblast akrozomu; převzato z Mountjoy *et al.* (2008)

Později byl na spermatidách identifikován také nový RabGAP specifický pro varlata, jehož aminokyselinová sekvence byla vysoce konzervativní mezi hlodavci a lidmi. RabGAP byl ko-lokalizován s proteinem Rab-3A v periakrozomální oblasti a kolem subakrozomální vrstvy. Tento nový RabGAP specifický pro varlata je výlučně exprimován během spermiogeneze, což naznačuje, že rovněž může být zapojen do regulace tvorby akrozomu nebo subakrozomální vrstvy a cytoskeletální reorganizace během konečné diferenciaci zárodečných buněk (Lin *et al.* 2011).

Mountjoy *et al.* (2008) lokalizovali Rab-2A v perinukleární théce spermatických buněk býka během spermatogeneze. Ve studii, kterou provedli Kwon *et al.* (2015b), byl Rab-2 pozorován na hlavičce i bičíku kančích spermií. To potvrdila i studie od Bae *et al.* (2019) na myších spermiích, ve které byl nalezen navíc signál pro Rab-2A silnější ve středním oddílu než v hlavním oddílu bičíku spermie. Zigo *et al.* (2015) jako první lokalizovali Rab-2A pomocí monoklonální protilátky 5C5 na povrchu plazmatické membrány prasečích spermií. Rab-2A byl přítomen na epididymálních, ejakulovaných i kapacitovaných spermiích, přičemž nejsilnější signál byl detekován na kapacitovaných spermiích, oproti signálu na epididymálních a ejakulovaných spermiích (Zigo *et al.* 2015). Rab-2A byl také detekován v epididymální tekutině kance, v níž se vyskytoval ve dvou formách, 24-kDa a 27-kDa. Existence dvou forem tohoto proteinu je ve studii vysvětlována hypervariabilitou C-terminální domény. Existuje

předpoklad, že by se Rab-2A mohl do epididymální tekutiny prasete dostávat prostřednictvím epididymozomů, membránových sekrečních váčků vylučovaných do lumen nadvarlete (Zigo et al. 2015). Tato hypotéza vychází ze studie Utleg *et al.* (2003), která prokázala, že u lidí jsou Rab-2 proteiny asociovány s exozomy pocházejícími z prostaty, tzv. prostazomy. Z povrchového proteomu prasečích spermií se naopak podařilo získat pouze 24-kDa formu, a to pouze z kapacitovaných spermií. Autoři to vysvětlují tím, že 27-kDa forma by na rozdíl od 24-kDa formy mohla obsahovat další geranylgeranylové skupiny, a byla proto odolnější vůči izolaci za daných extrakčních podmínek (Zigo et al. 2015). Také bylo zjištěno, že 24-kDa i 27-kDa formy Rab-2A interagují s glykoproteiny *zona pellucida* (obr. 4; Zigo et al. 2015; Maňásková-Postlerová et al. 2018).



Obrázek 4 Rab-2A vykazující vazebnou afinitu k ZP glykoproteinům v extraktech ejakulovaných (E) a kapacitovaných (C) spermií; převzato z Zigo *et al.* (2015) a Maňásková-Postlerová *et al.* (2018)

V jiných studiích byla exprese Rab-2 po *in vitro* kapacitaci kančích spermií výrazně snížena (Kwon *et al.* 2014). Bae *et al.* (2019) provedli Western blot analýzu několika Rab proteinů včetně Rab-2A za účelem vyhodnocení jejich exprese v nekapacitovaných a kapacitovaných myších spermiích. Po kapacitaci byla významně snížena exprese všech Rab proteinů i Rab regulátorů RabGDI a RabGEF. Jedinou výjimku tvořil RabGAP, jehož úroveň nevykazovala žádný výrazný rozdíl, což autoři vysvětlují tím, že na rozdíl od somatických buněk je ve spermiích dráha Rab proteinů nevratná, a po kapacitaci se nevrací do deaktivované formy. Snížená exprese Rab-2A po kapacitaci by mohla naznačovat, že Rab-2A se podílí na strukturální modifikaci akrozomu k indukci akrozomální exocytózy po kapacitaci (Kwon *et al.* 2014). To bylo prokázáno u Rab-3A, který je lokalizován v akrozomální oblasti hlavičky spermie a funguje jako induktor akrozomální exocytózy u lidských spermií (Yunes *et al.* 2000). Rab-2A je v posledních letech testován také jako potenciální marker samčí fertility. Kwon *et al.* (2015a) zkoumali prediktivní biomarkery pro velikost vrhu u prasat a prokázali, že Rab-2A byl vysoce exprimován ve spermiích kanců dávajících nízké vrhy selat a jeho exprese byla negativně korelována s velikostí vrhu. Prediktivní hodnota Rab-2A jakožto markeru však byla nižší, než autoři očekávali. Další studie od Kwon *et al.* (2015b), v níž byla celková přesnost exprese Rab-2A pro predikci velikosti vrhu 88 %, tedy o 15 % vyšší než v předchozí studii, prokázala, že Rab-2A byl více zastoupen v kapacitovaných spermiích kanců vykazujících nízkou velikost vrhu. Rahman *et al.* (2017) zdůrazňují fakt, že povrchově vázané proteiny na savčích spermiích jsou různě modifikovány a uvolňovány během kapacitace, aby se usnadnilo navázání

spermií na receptory *zona pellucida*, a pokud je tedy Rab-2a přítomen ve velkém množství na kapacitovaných spermiích, může to znamenat, že nebyl modifikován nebo uvolněn, a vazba na těchto spermiích na ZP tak může být ztížena. To by vysvětlovalo negativní korelaci exprese Rab-2A na kapacitovaných spermiích s velikostí vrhu. Další studie od Kwon *et al.* (2017) však ukázala, že s velikostí vrhu negativně korelovala hladina Rab-2A jak v ejakulovaných tak kapacitovaných spermiích a Rab-2A byl označen jako účinný biomarker pro predikci velikosti vrhu u prasat plemene Yorkshire i Duroc.

Funkce proteinu Rab-2A na povrchu kančích spermií zatím nebyla uspokojivě objasněna, ačkoliv existuje předpoklad, že by mohl hrát roli ve vazbě na ZP, neboť obě jeho formy vykazovaly vazebnou afinitu k ZP. Pokud Rab-2A skutečně může vázat ZP, pak vyvstává otázka, zda slouží jako klíčový ZP receptor nebo pouze jako molekula zprostředkovávající vazbu na ZP (Zigo *et al.* 2015).

4 Metodika

4.1 Zpracování biologického materiálu

Vzorky spermií pocházely z inseminačních dávek kanců plemene Landrace nebo Duroc od dodavatele CHOVSERVIS, a.s. Spermie byly převáženy v chladicím boxu při 17 °C. Inseminační dávky byly zpracovány do dvou dnů od odběru ejakulátu. Epididymální spermie byly izolovány *post mortem* z nadvarlete dospělého kance pomocí injekční jehly.

4.1.1 Příprava ejakulovaných spermií

Z inseminační dávky bylo do zkumavek odměřeno po 5 ml tekutiny a suspenze spermií byla za účelem odmytí ředidla stočena na centrifuze (LC-8 5000, Benchmark Scientific Inc., USA) 10 minut při 300 x g při laboratorní teplotě. Po dokončení centrifugace byl odstraněn supernatant a bylo přidáno 5 ml promývacího roztoku PBS (Phosphate-buffered saline; 0,01 M fosfátový pufr, 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA). Peleta spermií byla opatrně rozsuspendována a vzorek byl opět centrifugován 10 minut při 300 x g při laboratorní teplotě, poté byl odstraněn supernatant a celý proces byl ještě jednou zopakován. Po odstranění supernatantu byl vzorek dále použit buď pro kapacitaci, nebo byla peleta opět resuspendována v 5 ml PBS a takto připravený vzorek byl rozpipetován po 1 ml do mikrozkušavek a stočen na centrifuze (Mikro 22R Hettich Zentrifugen, DJB Labcare, UK) po dobu 5 minut při 300 x g a 17 °C. Vzniklé peletky byly po odsátí supernatantu připraveny pro SDS elektroforézu a následnou Western blot analýzu.

4.1.2 Příprava *in vitro* kapacitovaných spermií

K promyté peletě ejakulovaných kančích spermií bylo přidáno kapacitační médium do celkového objemu 10 ml. Poté byly zkumavky s pootevřenými víčky uloženy na 1,5 h do termostatu, který byl nastaven na 38 °C a 5 % CO₂.

Kapacitační médium:

- Základní pufr – Basic TL-Hepes (6,6634 g NaCl, 0,2386 g KCl, 0,0408 g NaH₂PO₄, 1,4 ml laktátu sodného, 0,1018 g MgCl₂ x 6H₂O, 2,383 g Hepes, 0,0220 g pyruvátu sodného, 2,186 g sorbitolu, 0,025 g gentamicinu, 0,065 g penicilinu, 0,1 g PVA (Polyvinyl alkohol) v 1 litru destilované vody)
- Do 50 ml Basic TL-Hepes bylo přidáno 0,099 g 11 mM glukózy, 0,0275 g 5 mM pyruvátu g, 1,00 g 2% BSA (bovinní sérový albumin), 0,0084 g NaHCO₃ a 0,0147 g 2 mM CaCl₂ x 2H₂O

Po inkubaci byl vzorek odstředěn na centrifuze při 300 x g po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Poté byl odstraněn supernatant a k peletě bylo přidáno 5 ml PBS. Po resuspendaci byla směs opět odstředěna na centrifuze při 300 x g a 17 °C 10 minut. Po odstředění byl odebrán supernatant a zkumavka s peletou byla opět doplněna do 5 ml PBS a promyta tímto způsobem ještě dvakrát. Poté byla peleta opět doplněna do 5 ml PBS a suspenze byla rozpipetována po 1 ml do mikrozkušavek a stočena na centrifuze (300 x g, 17 °C, 10 minut). Poté byl odstraněn supernatant.

4.1.3 Příprava akrozomově zreagovaných spermií

Ihned po kapacitaci byl do 10 ml suspenze spermií v kapacitačním médiu přidán calcium ionofor (A23187; Sigma-Aldrich, USA) do finální koncentrace 10 μ M. Opět proběhla inkubace zkumavky s pootevřeným víčkem v termostatu nastaveném na 38 °C v atmosféře 5 % CO₂ po dobu 1 hodiny. Poté byl vzorek stočen na centrifuze a 3x promyt PBS. Peleta byla doplněna do 5 ml PBS a suspenze byla rozpipetována po 1 ml do mikrozkuavek a stočena na centrifuze při 300 x g, 17 °C na 10 minut. Poté byl odstraněn supernatant.

4.1.4 Izolace povrchových proteinů spermií

Promyté ejakulované vzorky spermií byly použity pro izolaci povrchových proteinů za pomoci soupravy Pierce® Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Jedna lahvička (12 mg) Sulfo-NHS-SS-Biotinu byla rozpuštěna ve 48 ml chlazeného PBS. Po promytí spermií a odsátí supernatantu bylo ke každému vzorku spermií (5 x 10⁷ buněk) přidáno 10 ml biotinylačního činidla, zkumavky byly lehce promíchány v ruce a uloženy na 30 minut do lednice (průběžně byly občas jemně promíchány). Po inkubaci byl obsah každé zkumavky rozdělen do dvou zkumavek. Vzorky pak byly stočeny na centrifuze 10 minut při 300 x g, poté byl odsán supernatant a k peletce bylo přidáno 10 ml 1x konc. TBS pufru (Tris buffered saline; 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,8). Směs byla rozsuspendována a 2x promyta. Po odsátí supernatantu bylo přidáno 500 μ l TBS k peletce, obsah byl rozsuspendován, přepipetován do nových mikrozkuavek a stočen na centrifuze na 10 minut při 10 000 x g a 20 °C. Následně byl odsán supernatant a do každé mikrozkuavky bylo přidáno 250 μ l lyzačního pufru z kitu (Lysis Buffer). Takto připravené vzorky byly protřepány a ponechány na ledu na cca 30 minut, přičemž byly několikrát znovu důkladně protřepány. Poté následovala centrifugace 2 minuty při 10 000 x g a teplotě 4 °C. Byly připraveny dvě kolonky z kitu (Column Accessory Pack). Kolonky byly složeny a do vrchní části bylo přidáno 500 μ l avidinu imobilizovaného na gelových mikrokuličkách (Immobilized NeutrAvidin™ Gel). Kolonky byly vloženy do mikrozkuavek a centrifugovány 1 minutu při 1000 x g a 4 °C. Následně byl odstraněn supernatant a na povrch kolonky bylo přidáno 500 μ l promývacího pufru z kitu (Wash Buffer). Kolonky byly opakovaně promyty pufrem pomocí centrifugace. Poté byly kolonky dole uzavřeny a byl do nich nanesen lyzát buněk. Inkubace s avidinem probíhala 60 minut na rotační třepačce (MX-T6-Pro, DLAB Scientific, USA) při pokojové teplotě. Po inkubaci byly kolonky otevřeny a provedena centrifugace 1 minutu při 1000 x g a 4 °C. Byl odstraněn supernatant, který protekl do sběrné mikrozkuavky, a avidinový nosič byl 3x promyt 500 μ l promývacího pufru (Wash Buffer) s přidavkem proteázových inhibitorů (Complete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Švýcarsko). Po každém promytí proběhla centrifugace 1 minutu při 1000 x g a 4 °C. Poté byl připraven vzorkový pufr s dithiotreitem (DTT). Obsah 1 lahvičky DTT z kitu byl rozpuštěn v 50 μ l destilované vody a potom byl vzniklý roztok smíchan s 1 ml vzorkového pufru pro SDS elektroforézu (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 – Bio-Rad, USA; glycerol; 2% SDS; 0,05% bromfenolová modř – Sigma-Aldrich, USA). Do každé mikrozkuavky se vzorkem bylo přidáno 200 μ l připraveného vzorkového pufru s DTT. Vzorky byly 5 minut povařeny, a následně byly odstředěny při 1000 x g po dobu 2 minut. Vzniklý supernatant byl

odebrán do nové mikrozkuřavky a připraven pro SDS elektroforézu. Jako kontrolní vzorky byly použity:

- 1) Peletka biotinylovaných spermií po lyzaci, ke které bylo přidáno 100 μl redukujícího vzorkového pufru. Vzorek byl 5 minut povařen, a poté z něj byl odebrán supernatant.
- 2) Lyzát biotinylovaných proteinů, ke kterému bylo přidáno 1200 μl vymraženého acetonu a následovala inkubace při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 hodiny. Poté byl vzorek centrifugován při 5000 x g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 minuty, pak byl odstraněn supernatant a k peletě bylo přidáno 100 μl redukujícího vzorkového pufru. Vzorek byl 5 minut povařen.
- 3) Supernatant s avidinem nezachycenými proteiny, ke kterému bylo také přidáno 1200 μl vymraženého acetonu a následovala inkubace při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 hodiny. Poté byl vzorek centrifugován při 5000 x g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 minuty, pak byl odstraněn supernatant a k peletě bylo přidáno 100 μl redukujícího vzorkového pufru. Vzorek byl 5 minut povařen.

4.1.5 Imunoprecipitace

Ejakulované spermie byly promyty, a poté bylo k peletě spermií (5×10^7 buněk) přidáno 500 μl lyzačního pufru s přířavkem proteázových inhibitorů. Spermie byly inkubovány 1 hodinu na ledu, a každých 5 minut byly protřepány na vortexu. Poté byla směs stočena na centrifuze při 10 000 x g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 2 minut. Vznikla peletka a supernatant/vstupní lyzát:

- 1) K peletce bylo přidáno 100 μl neredukujícího vzorkového pufru a byla 5 minut povařena. Tento vzorek byl použit jako kontrola.
- 2) Ke 100 μl lyzátu bylo přidáno 600 μl vymraženého acetonu a následovala inkubace po dobu 1 hodiny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byl vzorek centrifugován při 5000 x g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 minuty, pak byl odstraněn supernatant a k peletě bylo přidáno 100 μl neredukujícího vzorkového pufru. Vzorek byl 5 minut povařen, a byl připraven jako kontrola.

Ze zbylého lyzátu bylo odebráno 2x50 μl . K jednomu vzorku bylo přidáno 50 μl protilátky 5C5 a následovala inkubace při pokojové teplotě 2 hodiny. Druhý vzorek byl ponechán bez protilátky jako kontrola. Po inkubaci byly k oběma vzorkům přidány agarózové kuličky s konjugovaným proteinem A/G, které byly předtím 2x promyty 200 μl PBS. Pro zachycení imunoprecipitátu následovala inkubace při pokojové teplotě 1 hodinu. Vzorek s 5C5 i vzorek bez 5C5 byl po inkubaci s A/G proteinem stočen na centrifuze při 1000 x g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 minutu a 2x promyt PBS. Vznikly peletky se zachycenými proteiny a supernatanty s nezachycenými proteiny:

- 3) K peletce s 5C5 se zachycenými proteiny bylo přidáno 50 μl neredukujícího vzorkového pufru a vzorek byl 5 minut povařen. Poté byl vzorek stočen na centrifuze a byl odebrán supernatant. Tento vzorek představoval vlastní imunoprecipitát.
- 4) K peletce bez 5C5 se zachycenými proteiny bylo přidáno 50 μl neredukujícího vzorkového pufru a vzorek byl 5 minut povařen. Poté byl vzorek stočen na centrifuze, a byl odebrán supernatant.
- 5) K 200 μl supernatantu s 5C5 s nezachycenými proteiny bylo přidáno 1200 μl vymraženého acetonu, a následovala inkubace při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 hodiny. Poté byl vzorek stočen na centrifuze při 5000 x g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 minuty. Supernatant byl odstraněn

- a k peletce bylo přidáno 100 μ l neredukujícího vzorkového pufru a vzorek byl povařen 5 minut.
- 6) K 200 μ l supernatantu bez 5C5 s nezachycenými proteiny bylo přidáno 1200 μ l vymraženého acetonu, a následovala inkubace při -20 °C po dobu 1 hodiny. Poté byl vzorek stočen na centrifuze při 5000 x g, 4 °C 2 minuty. Supernatant byl odstraněn a k peletce bylo přidáno 100 μ l neredukujícího vzorkového pufru a vzorek byl povařen 5 minut.
 - 7) Pro kontrolu bylo k 5 μ l protilátky 5C5 přidáno 20 μ l neredukujícího vzorkového pufru a povařeno 5 minut.

4.1.6 Izolace perinukleární thény (PT) z ejakulovaných spermií

Ejakulát byl centrifugován při 300 x g a vzniklá peletka spermií byla rozsuspensována a promyta několikrát centrifugací v 25 mM TBS (pH 7,6) při 4 °C. Poté byla peletka resuspendována v TBS s koktejlem proteázových inhibitorů (Complete, Mini, EDTA-free; Roche, Kanada) (pufr:spermie 10:1 obj./obj.). Následovala sonikace na ledu pomocí sonikátoru Hielscher UP 50H (Hielscher Ultrasound Technology, Německo). Sonikace se opakovala v 15sekundových dávkách s 1minutovými intervaly (1 hod), dokud se od hlaviček spermií neoddělovalo >99 % bičíků. Suspenze hlaviček a bičíků byla poté opět dvakrát promyta centrifugací v TBS a finální peletka byla resuspendována v TBS obsahujícím 80% roztok sacharózy v TBS. Následovala ultracentrifugace při 50 000 ot./min po dobu 65 minut v úhlovém rotoru 55Ti a ultracentrifuze Beckman J26XP (Beckman, Kanada). Hlavičky spermií, které mají vyšší hustotu než 80% sacharóza, utvořily peletku na odstředivé straně centrifugační zkumavky (vnější stěna), zatímco peletka bičíků spermií vznikla na vnitřní stěně. Peletka hlaviček byla oddělena od peletky bičíků, a pak byla dvakrát promyta v TBS. Promytá peletka byla vystavena třem po sobě jdoucím extrakčním krokům spočívajícím v inkubaci v 0,2% Tritonu X-100 (20 ml 1% Tritonu X-100 v 80 ml TBS), 1 M KCl (7,46 g doplněno na 100 ml TBS) a 100 mM NaOH (0,4 g NaOH doplněno na 100 ml TBS) za stálého míchání při 4 °C. Po inkubaci v 0,2% Tritonu X-100 po dobu 1 hodiny byla suspenze centrifugována při 2500 x g 10 minut, supernatant s vnitřními akrozomálními membránami byl odložen a výsledná peleta hlaviček spermií byla dvakrát promyta resuspendováním a centrifugací v TBS před dalším extrakčním krokem. Následovala extrakce inkubací v 1 M KCl po dobu 1 hodiny, poté byla suspenze centrifugována při 2500 x g 10 minut a supernatant obsahující iontově vázané proteiny PT byl odložen. Výsledná peleta hlaviček spermií byla dvakrát promyta resuspendováním a centrifugací v TBS před posledním extrakčním krokem. Následovala inkubace s 100 mM NaOH přes noc, poté poté byla suspenze centrifugována při 2500 x g 10 minut, supernatant obsahující kovalentně vázané proteiny PT byl odložen. První krok extrakce solubilizuje proteiny spojené se zadrženou vnitřní akrozomální membránou, zatímco druhý krok extrakce extrahuje iontově vázané proteiny PT. Poslední krok extrakce, který je pro nás nejdůležitější, je označován jako alkalická extrakce, a uvolňuje kovalentně připojené proteiny PT, které tvoří podstatnou část PT. Tento lyzát byl poté zakoncentrován pomocí koncentrační kolonky (Pierce Concentrator, 3K MWCO; Thermo Fisher Scientific, USA) centrifugací a výměnou alkalického roztoku za PBS po dobu asi 1 h při 15 000 x g. Supernatanty získané z jednotlivých extrakčních kroků byl poté přesráženy acetonem pro SDS-PAGE analýzu.

4.1.7 Příprava tkání

Části (100 mg) testikulární a epididymální tkáně z *caput, corpus a cauda epididymis* byly homogenizovány v 500 µl 1% Tritonu X-100 v 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) s 50 mM NaCl za použití homogenizátoru IKA T10 basic (IKA Werke, Německo). Homogenizovaná tkáň byla poté centrifugována při 10 000 x g, 5 minut při 4 °C. Bylo odebráno 100 µl supernatantu a k němu bylo přidáno 600 µl vymraženého acetonu. Vzorek byl ponechán 1 hodinu při -20 °C a následně byl stočen na centrifuze při 5000 x g, 5 minut při 4 °C. Poté byl odstraněn supernatant a k peletce bylo přidáno 150 µl neredukujícího vzorkového pufru. Pro redukující podmínky bylo ke každým 50 µl vzorkového pufru přidáno 2,5 µl merkaptoetanolu. Vzorek byl nakonec 5 minut povařen.

4.2 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

SDS-PAGE je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS), detergentu, který rozbaluje proteiny a uděluje jim uniformní záporný náboj. Záporně nabitě proteiny putují v elektrickém poli ke kladné elektrodě a jsou rozděleny na základě své molekulové hmotnosti. Pro SDS elektroforézu byly používány vzorky epididymálních, ejakulovaných a kapacitovaných spermií a spermií po akrozomální reakci připravených výše uvedeným způsobem a rovněž vzorky tkání. Z těchto vzorků byly extrahovány proteiny, které byly poté rozděleny na elektroforéze.

4.2.1 Příprava vzorku pro SDS elektroforézu

Extrakce proteinů ze vzorků spermií byla provedena jejich lyzací ve vzorkovém pufru. K 50 µl peletky spermií (5×10^7 buněk) bylo přidáno 150 µl vzorkového pufru a vzorek byl důkladně rozsuspendován. Extrakce probíhala na ledu 30 minut, vzorek byl každých 5 minut protřepán, a poté byl 5 minut povařen. Nakonec proběhla centrifugace pro odstředění zbytků buněk 2 minuty při 10 000 x g, 4 °C a, po které byl odebrán supernatant, který byl dále rovnou použit pro SDS elektroforézu nebo byl uchován při -20 °C.

4.2.2 SDS-PAGE

Byla sestavena aparatura pro vertikální elektroforézu (Mini-PROTEAN Tetra, Bio-Rad, USA) se skly a vložena do stojanu. Následně byl připraven 12% separační gel.

12% separační gel:

- Resolving gel buffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; Bio-Rad, USA) 2,5 ml
- Acrylamide/bis-acrylamide 30% solution (Bio-Rad, USA) 4,0 ml
- destilovaná H₂O 3,5 ml
- 10% roztok SDS (dodecyl sulfát sodný; Bio-Rad, USA) v destilované vodě 100 µl

Těsně před aplikací 4,5 µl TEMED (Pharmacia Biotech, Švédsko) a 70 µl 10% roztok APS (persíran amonný; Amersham Biosciences, Švédsko).

Separáčnı gel byl napipetován mezi skla a byl převrstven 1 ml destilované vody. Poté proběhla polymerace gelu při pokojové teplotě po dobu asi 30 minut. Mezitím byl připraven roztok pro zaostřovací gel.

4% zaostřovací gel:

- destilovaná H₂O 1,52 ml
- Stacking gel buffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; Bio-Rad, USA) 0,625 ml
- Acrylamide/bis-acrylamide 30% solution (Bio-Rad, USA) 0,325 ml
- 10% roztok SDS (dodecylsulfát sodný; Bio-Rad, USA) 0,025 ml

Těsně před aplikací 3,8 µl TEMED (Pharmacia Biotech, Švédsko) a 50 µl 10% roztoku APS (persíran amonný; Amersham Biosciences, Švédsko)

Po ztuhnutí separáčního gelu byla z jeho povrchu odlita destilovaná voda a místo ní byl nanesen zaostřovací gel. Do zaostřovacího gelu byly ihned po nanesení vloženy 10jamkové hřebínky, které v něm byly ponechány asi 15 minut, než došlo k polymeraci. Aparatura s připraveným gelem byla vložena do vany, která byla zalita elektrodoým pufrem (Tris 15 g, glycin 72 g, SDS 5 g, dest. H₂O 1 l; ředěno 1:4 s dest. H₂O). Po zalití byly vyndány hřebínky a do vzniklých jamek byly naneseny 4 µl molekulárních proteinových standardů (Precision Plus Protein™ WesternC™ Blotting Standards; Bio-Rad, USA) a 15 µl lyzátu vzorkových spermií (resp. 3 µl standardů a 12 µl lyzátu vzorkových spermií při použití 15jamkového hřebínku). Elektroforéza probíhala cca 30 minut při 80 V (průchod vzorku přes zaostřovací gel) a poté cca 1 hodinu při 150 V.

4.3 Western blot (elektropřenos)

Western blot navazuje na proteinovou elektroforézu (SDS-PAGE). Jde o elektropřenos proteinů rozdělených pomocí SDS-PAGE na membránu, v tomto případě na PVDF membránu.

Komponenty pro elektropřenos:

- 4 výstřížky chromatografického papíru Whatman (GE Healthcare, USA)
- PVDF (polyvinylidenfluorid) membrána (předem aktivována 1 minutu v metanolu)
- 2 houbičky

Vše bylo namočeno na 15 minut do transferového pufru. Pro výrobu transferového pufru bylo použito 3,03 g Tris (Sigma-Aldrich, USA) a 14,4 g glycin (Sigma-Aldrich, USA). Tyto dvě složky byly rozpuštěny ve 200 ml destilované vody, dále bylo přidáno 200 ml metanolu a 600 ml destilované vody. Do kazety byla mezi houbičky a chromatografické papíry vložena PVDF membrána přiložená na gel s rozdělenými proteiny. Jednotlivé komponenty pro elektropřenos byly orientovány tak, aby proteiny z gelu, které mají stále záporný náboj, putovaly směrem k membráně, tedy k záporné elektrodě. Kazeta byla vložena do kazety s elektrodami a ta pak do vaničky s transferovým pufrem. Aparatura byla chlazena ledem a elektropřenos probíhal 70 minut při konstantním elektrickém proudu 500 mA. Po elektropřenosu byla kazeta vyjmuta, rozebrána a membrána vyndána a byla provedena imunodetekce proteinů pomocí specifické protilátky.

4.4 Imunodetekce pomocí protilátky

PVDF membrána byla po elektropřenosu omyta destilovanou vodou. Kontrola průběhu SDS elektroforézy a elektropřenosu byla provedena pomocí barvení proteinů na membráně barvičkou Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA) po dobu jedné minuty. Poté bylo obarvené pozadí odmyto destilovanou vodou a PBS do odmytí Ponceau. Deaktivace volných míst na membráně byla provedena pomocí 5% sušeného mléka (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad, USA) v PBS 1 hodinu na třepače. Následně byla membrána 2x promyta po pěti minutách v PBS s 0,1% Tweenem pro odstranění nespecifických interakcí. Promývání stále probíhalo na třepače. Následovala inkubace membrány v parafilmové kapsičce s primární myší monoklonální protilátkou 5C5 proti Rab-2A (protilátka je součástí panelu monoklonálních protilátek vyrobených proti povrchovým proteinům kančích ejakulovaných spermii; Zigo et al. 2015) ředěnou v PBS v poměru 1:1. Pro kontrolu proteinové koncentrace v jednotlivých vzorcích byla použita imunodetekce α -tubulinu pomocí myší monoklonální protilátky (DM1A; Sigma-Aldrich, USA) v koncentraci 1:1000 v PBS. Inkubace probíhala přes noc v lednici. Druhý den byla membrána promyta 3x po 10 minutách v PBS s 0,1% Tweenem. Dále byla provedena inkubace se sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům konjugované s křenovou peroxidázou (Goat Anti-Mouse IgG (L+H), Horseradish Peroxidase-Linked; Bio-Rad, USA) 1 hodinu na rotační třepače. Sekundární protilátka byla ředěna v PBS v poměru 1:3000. Poté byla membrána promyta 4x po pěti minutách v PBS s 0,1% Tweenem a 2x po pěti minutách v PBS bez Tweenu. Následovala vizualizace specifické detekce proteinu protilátkou pomocí chemiluminiscenčního substrátu (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific, USA) při použití přístroje Azure c300 Gel Imaging System (Azure Biosystems, USA). Molekulové hmotnosti detekovaných proteinů byly určeny podle kalibračních křivek vytvořených v programu Microsoft Excel (2019). Rovněž byla provedena denzitometrická analýza detekovaných proteinů v programu Image Studio Digits (LI-COR Biosciences, USA). Pro statistické vyhodnocení denzitometrické analýzy byla využita analýza rozptylu ANOVA pomocí softwaru GraphPad (GraphPad Software Inc., USA). Jako statisticky významný byl hodnocen rozdíl na hladině významnosti $p=0,05$.

4.5 Nepřímá fluorescenční mikroskopie

Nepřímá fluorescenční mikroskopie je metoda sloužící k detekci a lokalizaci antigenů po jejich reakci s protilátkami označenými fluorescenčními barvivy. Imunofluorescenční mikroskopie využívá značení buněčných struktur pomocí primární specifické protilátky proti danému proteinu s vizualizací pomocí sekundární protilátky konjugované s fluorochromem. Nepřímá imunofluorescence byla provedena na roztěrech epididymálních spermii odebraných z *cauda epididymis*, ejakulovaných spermii, kapacitovaných spermii a spermii po akrozomální reakci. Na podložní sklíčka byly vyznačeny kroužky pomocí hydrofobní fixy PAN Pen liquid rocker (Sigma-Aldrich, USA). K fixaci spermii bylo využito několik přístupů, které jsou dále popsány.

4.5.1 Příprava vzorků spermií

4.5.1.1 Vlhká fixace přímo na mikroskopickém sklíčku

Do vyznačených koleček bylo napipetováno 20 μ l suspenze spermií a ta byla zakápnuta 50 μ l vymraženého roztoku acetonu s metanolem v poměru 1:1. Po 5 minutách inkubace byl preparát opláchnut PBS a osušen.

Dalším způsobem vlhké fixace bylo použití 2% formaldehydu s 2% BSA (bovinní sérový albumin; Sigma-Aldrich, USA) ve vodě. Na vyznačená kolečka bylo napipetováno 20 μ l suspenze spermií a 50 μ l fixačního roztoku. Vzorky byly inkubovány po dobu 30 minut. Po uplynutí inkubační doby byla sklíčka opláchnuta PBS a osušena. Tento způsob fixace byl používán u vzorků sloužících pro detekci kapacitace pomocí protilátky proti fosfotyrozinu.

4.5.1.2 Příprava vzorku v suspenzi

Příprava vzorku v suspenzi se používá pro navázání protilátky na epitopy na plazmatické membráně spermií a je vhodná pro lokalizaci proteinů na povrchu spermie. Po promytí byly suspenze ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermií a spermií po akrozomální reakci naředěny PBS na koncentraci 1×10^6 spermií na ml. Do 100 μ l suspenze bylo přidáno 50 μ l primární myší protilátky 5C5. Do mikrozkuřavky určené pro negativní kontrolu nebyla protilátka přidána. Mikrozkuřavky byly vloženy na 2 hodiny do vyhříváné třepačky (TS-100 BioSan, Litva) při 37 °C a občas byly krátce protřepány. Následně byly vloženy do centrifugy a stočeny při 300 x g, 5 minut při pokojové teplotě. Poté byl odsán supernatant a bylo přidáno 100 μ l PBS a spermie byly ještě 2x promyty v PBS při 300 x g, 5 minut. Po posledním promytí byl odsán supernatant a bylo přidáno jen 50 μ l PBS. Takto připravená suspenze byla nanesena po 20 μ l na připravená kolečka na sklíčkách a zafixována pomocí roztoku aceton/metanol.

4.5.1.3 Fixace paraformaldehydem v suspenzi

Fixace paraformaldehydem v suspenzi se využívá pro ochranu spermií před permeabilizací membrány. Do připravené mikrozkuřavky byl napipetován 1 ml suspenze spermií v přibližné koncentraci 1×10^6 spermií na ml. Tato suspenze byla stočena na centrifuze při 300 x g, 20 °C po dobu 5 minut. Po stočení byl odstraněn supernatant a k peletce bylo přidáno 500 μ l roztoku 4% paraformaldehydu v PBS (0,4 g paraformaldehydu byly rozpuštěny v 10 ml PBS v digestoři při 70 °C za stálého míchání, poté bylo přidáno několik kapek 5 M roztoku NaOH, až došlo k vyčeření, a pH bylo upraveno na 7,4). Takto připravená suspenze byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubační doby byla suspenze znovu zcentrifugována a 2x promyta v PBS. Po druhém promytí byl odsán supernatant a peletka byla rozsuspendována v 1 ml PBS. Následně bylo napipetováno na připravená kolečka 20 μ l suspenze spermií a byl opatrně proveden roztěr. Sklíčka byla poté ponechána k zaschnutí volně na vzduchu.

4.5.2 Příprava kryořezů

Části *testes* a *cauda epididymis* byly zality přípravkem TissueTek (OCT Compound for Cryostat Sectioning; Sakura Finetek, Nizozemí) a opatrně ponořeny do tekutého dusíku. Poté byly zpracovány jako kryořezy na přístroji Cryocut Leica (Leica, Německo) v laboratoři Biotechnologického ústavu AV ČR, Biocev, Vestec. Kryořezy o tloušťce 5 μm byly zachyceny na podložní sklíčka a dále byly uchovávány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Připravené kryořezy byly poté využity pro nepřímou imunofluorescenční mikroskopii. Jednotlivé kryořezy na podložním sklíčku byly ohraničeny hydrofobní fixou, opláchnuty PBS a osušeny. Poté byla provedena acetonová fixace. Na každý ohraničený řez bylo nanášeno 100 μl vymraženého acetonu a sklíčka byla ponechána k fixaci po dobu 30 minut. Poté byla opláchnuta PBS a osušena.

4.5.3 Protokol pro nepřímou imunofluorescenci

Připravené vzorky byly skladovány v lednici při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo byly rovnou použity pro imunofluorescenci. Na každý vzorek bylo nanášeno 150 μl blokovacího média SuperBlock (Blocking Buffer in PBS; Thermo Fisher Scientific, USA). Poté byla sklíčka přenesena do připravené temné vlhké komůrky, která obsahovala navlhčenou buničinu. V komůrce byly vzorky inkubovány po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla sklíčka opláchnuta PBS a osušena. Do koleček určených k detekci proteinu Rab-2A bylo přidáno 100 μl primární protilátky 5C5 ředěné v PBS v poměru 1:5. Do kontrolních koleček bylo nanášeno 100 μl PBS. Do koleček určených k detekci fosfotyrozinu pro kontrolu kapacitace bylo nanášeno 100 μl primární myši monoklonální protilátky proti fosfotyrozinu (klon 4G10; EMD Millipore, USA) v PBS v poměru 1:300. Do kontrolních koleček bylo opět nanášeno 100 μl PBS. Tímto způsobem připravené vzorky byly inkubovány ve vlhké komůrce přes noc v lednici. Druhý den byly vzorky promyty PBS a inkubovány se sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům konjugovanou s fluorochromem (anti-mouse Alexa FluorTM 488 Invitrogen, USA) naředěnou PBS v poměru 1:300. Sekundární protilátka byla napipetována po 100 μl do každého kolečka a sklíčka byla ponechána ve vlhké komůrce 1 hodinu. Po inkubaci byly vzorky omyty PBS a osušeny. Pro kontrolu integrity akrozomu bylo dále ke vzorkům přidáno 100 μl PNA lektinu konjugovaného s rhodaminem (Rhodamin Peanut agglutinin; Vector Laboratories, USA) v PBS v poměru 1:1000. Vzorky byly inkubovány opět ve vlhké komůrce po dobu 30 minut. Inkubované vzorky byly opět omyty PBS a poté destilovanou vodou. Vzorky byly důkladně osušeny a do všech koleček bylo nanášeno 5 μl montovacího média s DAPI (Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI; Vector Laboratories, USA) označujícího jádro buňky. Vzorky byly následně překryty krycími sklíčky a ponechány k inkubaci v temné komůrce na 10 minut. Poté byly vzorky připraveny k vyhodnocení pod fluorescenčním mikroskopem (Nikon, Japonsko) a obrázky byly snímány pomocí programu NIS.

4.6 Vazebná studie spermie na *zona pellucida* oocyty

Oocyty pro *in vitro* kultivaci byly izolovány aspirací z folikulů prasečích vaječníků pomocí jehly a injekční stříkačky. Získané oocyty byly třikrát promyty v kultivačním médiu, modifikovaném médiu M199 (GibcoBRL, Life Technologies, UK) obsahujícím uhličitan sodný (0,039 ml 7% roztoku na 1 ml média, Sigma-Aldrich, USA), laktát sodný (0,6 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, Sigma

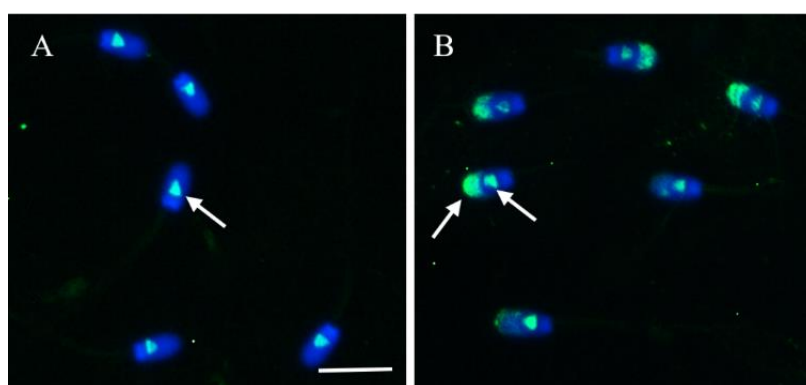
Aldrich, USA), pyruvát sodný (0,25 mg.ml⁻¹, Sigma Aldrich, USA), gentamicin (0,025 mg.ml⁻¹, Sigma-Aldrich, USA), HEPES (1,5 mg.ml⁻¹, Sigma-Aldrich), 13,5 IU eCG:6,6 IU hCG.ml⁻¹ (P.G. 600, Intervet, Holandsko) a 10% fetální telecí sérum (GibcoBRL, Life Technologies, Německo). Poté byly oocyty ponechány k zrání v kultivačním médiu v termostatu při 38 °C 48 hodin.

Z inseminační dávky byl do zkumavky odměřen 1 ml suspenze spermií a odstředěna za účelem odmytí ředidla 5 minut při 300 x g při laboratorní teplotě. Po dokončení centrifugace byl odstraněn supernatant a bylo přidáno 5 ml promývacího 0,1% roztoku PBS s PVA (polyvinyl alkohol P8136; Sigma-Aldrich, USA; 0,05 g PVA bylo přidáno do 50 ml PBS). Peleta spermií byla opatrně rozsuspendována a vzorek byl opět centrifugován 5 minut při 300 x g při laboratorní teplotě, poté byl odstraněn supernatant, a celý proces byl ještě 2x zopakován. Poté bylo k peletce přidáno 5 ml kapacitačního média (4.1.2) a zkumavka byla uložena s pootevřeným víčkem na 1,5 h do termostatu, který byl nastaven na 38 °C a 5 % CO₂. Po inkubaci byl vzorek odstředěn na centrifuze při 300 x g po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Poté byl odstraněn supernatant a k peletce bylo přidáno 5 ml PBS s PVA. Po resuspendaci byla suspenze opět odstředěna na centrifuze při 300 x g 10 minut. Po odstředění byl odebrán supernatant a zkumavka s peletou byla opět doplněna do 5 ml PBS a promyta tímto způsobem ještě dvakrát. Poté byla peleta spermií opět doplněna do 1 ml mTBM (modifikované Tris-buffered medium; 0,6611 g NaCl, 0,0224 g KCl, 0,1102 g CaCl₂ x 2 H₂O, 0,2423 g Tris, 0,1982 g glukóza, 0,055 g pyruvát sodný, 0,0667 g kofein a 0,2 g BSA ve 100 ml dH₂O) pro finální koncentraci 1x10⁵ spermií na ml. Suspenze byla resuspendována a bylo z ní odebráno 15 µl na jamku. K této kapce bylo přidáno 15 µl protilátky 5C5. Dále bylo odebráno 500 µl suspenze spermií do mikrozkušavky a byl přidán 1 µl myšího IgG (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, USA) jako kontrola blokace vazby. Do další mikrozkušavky pro pozitivní kontrolu vazby bylo přidáno pouze 500 µl suspenze spermií. Destička i mikrozkušavky byly inkubovány v termostatu při 38 °C 30 minut. Po inkubaci bylo z mikrozkušavek s oběma kontrolními vzorky odebráno po 10 µl na jamku vedle kapky se směsí spermií s 5C5 a ke každé kapce byly přidány oocyty po 48 hodinách zrání. Destička byla poté inkubována v termostatu 30 minut při 38 °C. Po inkubaci byly vzorky zafixovány na teflonová sklíčka pomocí montovacího média s DAPI (Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI), překryty krycím sklíčkem a zalakovány. Následovalo zhodnocení vazby spermií na oocyty pod fluorescenčním mikroskopem (Nikon, Japonsko) a obrázky byly snímány pomocí programu NIS.

5 Výsledky

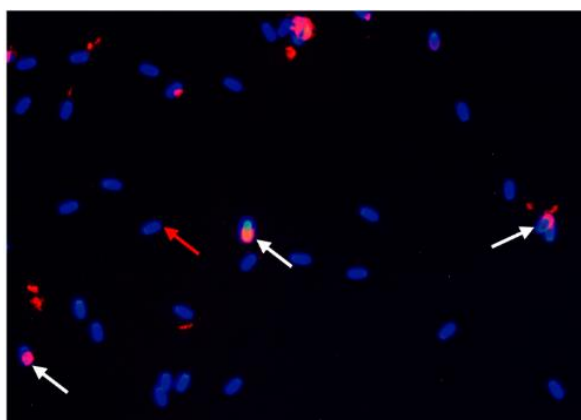
5.1 Hodnocení *in vitro* kapacity a akrozomální reakce

Pro hodnocení *in vitro* kapacity spermií (kap. 4.1.2) byla použita metoda nepřímé fluorescenční mikroskopie (kap. 4.5). K detekci fosforylace byla použita protilátka proti fosfotyrozinu 4G10 (kap. 4.5.3), se kterou byly inkubovány vzorky ejakulovaných a kapacitovaných spermií fixovaných na sklíčku pomocí 2% formaldehydu (kap. 4.5.1.1). Pro vizualizaci detekce byla poté použita sekundární protilátka konjugovaná s Alexa 488 (zelený signál) a pro označení jádra bylo použito DAPI (modrý signál). Na obrázku 5 je zobrazen rozdíl intenzit signálu reakce protilátky proti fosfotyrozinu mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermii. U kapacitovaných spermií je patrný signál v oblasti akrozomu, což značí úspěšnou kapacitaci.



Obrázek 5 Detekce fosfotyrozinu na ejakulovaných (A) a kapacitovaných (B) spermii: A – fosfotyrozin je lokalizován v subekvatoriálním segmentu, B – fosfotyrozin je lokalizován v subekvatoriálním segmentu a v akrozomu, jádro značené DAPI (modrá), reakce s protilátkou proti fosfotyrozinu (4G10) značená fluorescenčně (zelená), zvětšení 400x, měřítko 10 μ m

Úspěšnost indukce akrozomální reakce u spermií inkubovaných bezprostředně po kapacitaci s calcium ionoforem (kap. 4.1.3) byla hodnocena na základě podílu spermií s akrozomem a bez akrozomu pod fluorescenčním mikroskopem. Bylo odhadnuto, že AR úspěšně proběhla průměrně u 82 % spermií. Poměr spermií bez akrozomu a s akrozomem je pro ilustraci zobrazen na obrázku 6.

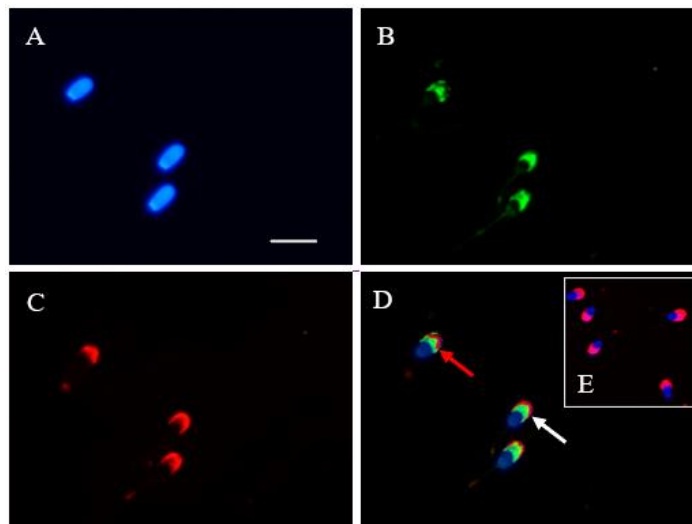


Obrázek 6 Kontrola akrozomální reakce na spermii po indukci AR: jádro značené DAPI (modrá), akrozom značený lektinem PNA (červená), většina spermií nemá akrozom (červená šipka) a zbylé spermie mají akrozom výrazně poškozen (bílé šipky), zvětšení 400x

5.2 Lokalizace proteinu Rab-2A ve spermiích

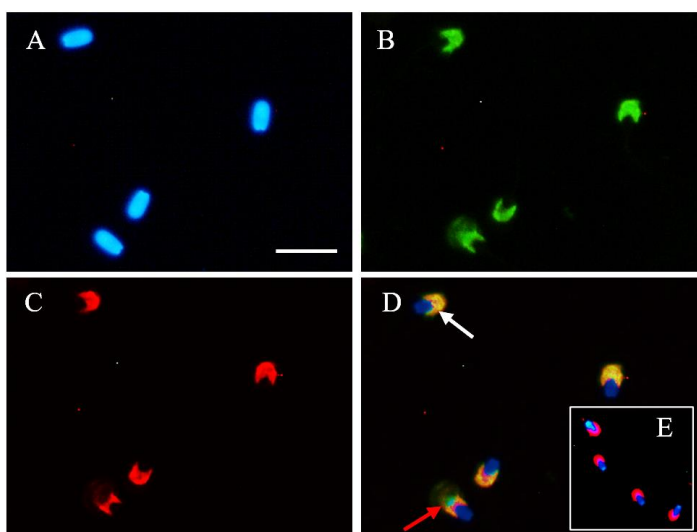
Pro lokalizaci proteinu Rab-2A ve spermiích byla použita metoda nepřímé fluorescenční mikroskopie (kap. 4.5). K detekci proteinu byla použita primární monoklonální myší protilátka 5C5. Pro vizualizaci detekce byla poté použita sekundární protilátka konjugovaná s Alexa 488. Pro vizualizaci akrozomu byly vzorky inkubovány s lektinem PNA konjugovaným s rhodaminem a pro označení jádra bylo použito DAPI v montovacím médiu. Imunolokalizace byla provedena na epididymálních, ejakulovaných a kapacitovaných spermiích, a také na spermiích po indukci akrozomální reakce. Vzorky byly fixovány pomocí roztoku aceton/metanol (kap. 4.5.1.1).

Na obrázku 7 je zobrazena lokalizace proteinu Rab-2A v kančích epididymálních spermiích, které byly izolovány z *cauda epididymis*. Některé spermie měly poškozené akrozomy, nicméně je vidět fluorescenční značení proteinu Rab-2A (zeleně) v oblasti akrozomu.



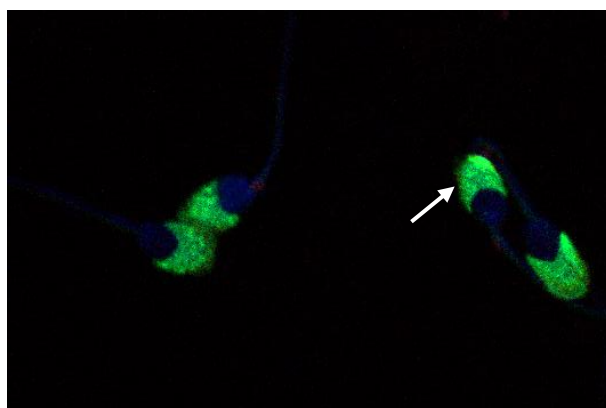
Obrázek 7 **Imunolokalizace Rab-2A v epididymálních spermiích:** A – jádro značené DAPI (modrá), B – reakce s protilátkou proti Rab-2A (5C5) značená fluorescenčně (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (DAPI, 5C5, PNA), E – negativní kontrola pouze se sekundární protilátkou (DAPI, PNA), bílá šipka ukazuje pozitivní detekci, červená šipka ukazuje poškozený akrozom, zvětšení 400x, měřítko 10 μm

Na obrázku 8 je zobrazena lokalizace Rab-2A v kančích ejakulovaných spermích. Protein byl opět detekován výhradně v oblasti akrozomu. U spermíí s částečně rozvolněným akrozomálním obsahem je vidět difúzní reakce protilátky s Rab-2A.



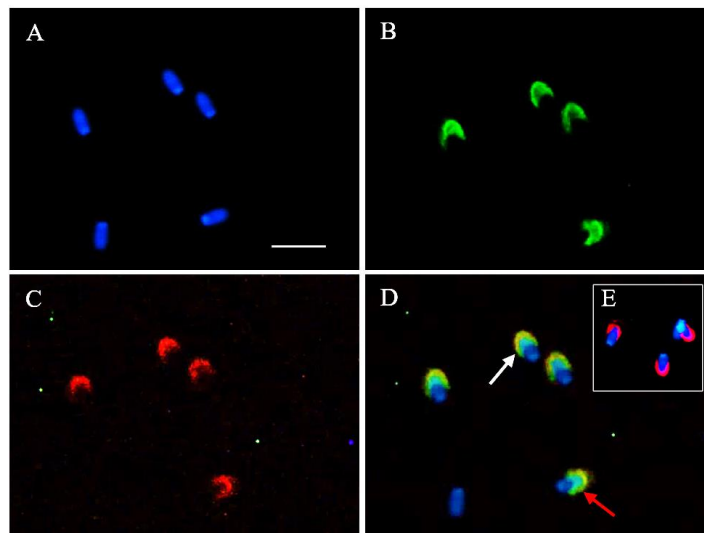
Obrázek 8 **Imunolokalizace Rab-2A v ejakulovaných spermích:** A – jádro značené DAPI (modrá), B – reakce s protilátkou proti Rab-2A (5C5) značená fluorescenčně (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (DAPI, 5C5, PNA), E – negativní kontrola pouze se sekundární protilátkou (DAPI, PNA), bílá šipka ukazuje pozitivní detekci, červená šipka ukazuje poškozený akrozom, zvětšení 400x, měřítko 10 μm

Pro lepší rozlišení byly ejakulované spermie nasnímány pomocí konfokálního mikroskopu, jak je vidět na obrázku 9, kde je jasně zřetelný signál značící protein Rab-2A v oblasti akrozomu.



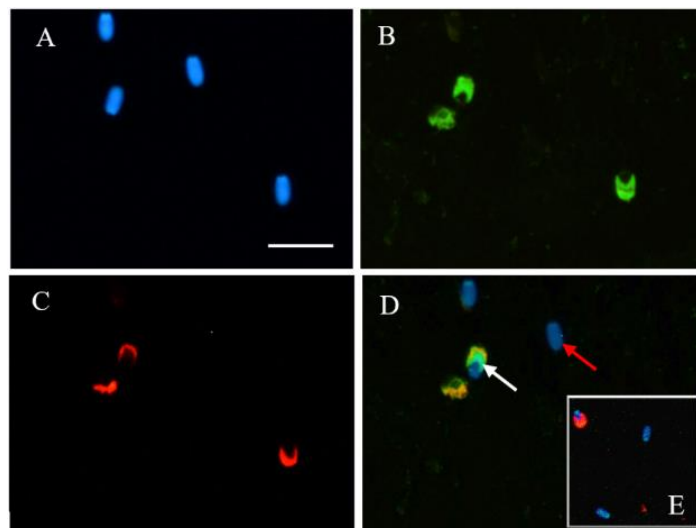
Obrázek 9 **Imunolokalizace Rab-2A v ejakulovaných spermích:** snímek z konfokálního mikroskopu, jádro značené DAPI (modrá), reakce s protilátkou proti Rab-2A (5C5) značená fluorescenčně (zelená), šipka ukazuje pozitivní detekci v oblasti akrozomu, zvětšení 400x

Obrázek 10 zobrazuje lokalizaci Rab-2A na kapacitovaných spermích opět v oblasti akrozomu. Na obrázku jsou vidět spermie s mírně poškozeným akrozomem, u nichž již začala probíhat akrozomální reakce (viz červená šipka).



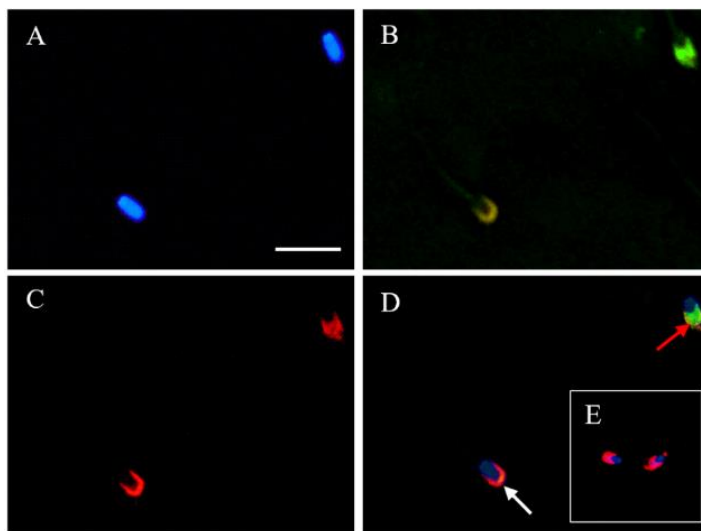
Obrázek 10 **Imunolokalizace Rab-2A v kapacitovaných spermích:** A – jádro značené DAPI (modrá), B – reakce s protilátkou proti Rab-2A (5C5) značená fluorescenčně (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (DAPI, 5C5, PNA), E – negativní kontrola pouze se sekundární protilátkou (DAPI, PNA), bílá šipka ukazuje pozitivní detekci, červená šipka ukazuje poškozený akrozom; zvětšení 400x, měřítko 10 μm

Na obrázku 11 je zobrazena lokalizace proteinu Rab-2A ve spermích po akrozomální reakci. Je vidět, že některé spermie již ztratily akrozom. Rab-2A byl pomocí protilátky 5C5 detekován pouze ve spermích, které neprovedly akrozomální reakci a akrozom zůstal přítomen.

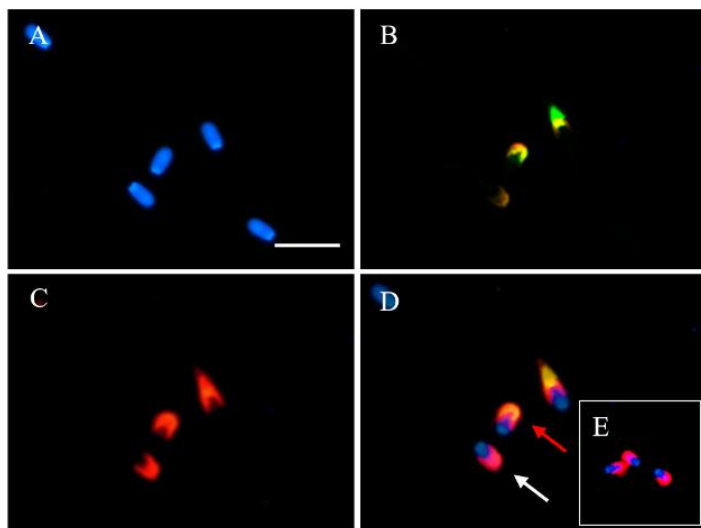


Obrázek 11 **Imunolokalizace Rab-2A v akrozomově zreagovaných spermích:** A – jádro značené DAPI (modrá), B – reakce s protilátkou proti Rab-2A (5C5) značená fluorescenčně (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (DAPI, 5C5, PNA), E – negativní kontrola pouze se sekundární protilátkou (DAPI, PNA), bílá šipka ukazuje pozitivní detekci, červená šipka ukazuje spermii po AR, zvětšení 400x, měřítko 10 μm

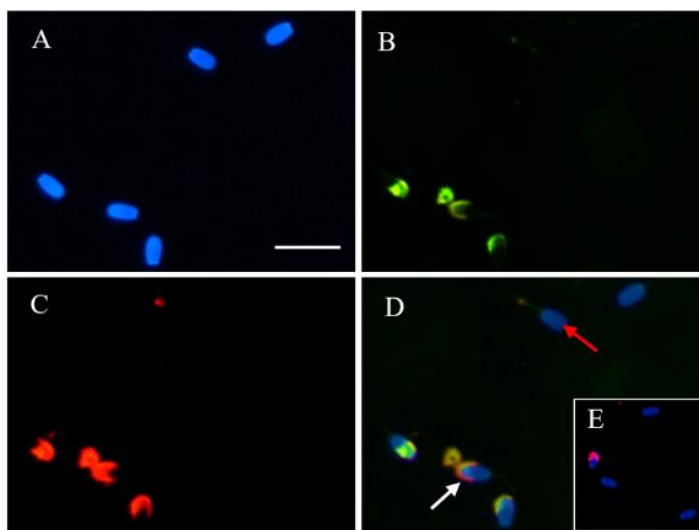
Pro detekci Rab-2A ve spermiích byly spermie permeabilizovány a fixovány pomocí směsi aceton/metanol (obrázky 7-11). Oproti tomu pro lokalizaci Rab-2A na povrchu spermií byla zvolena metoda vazby protilátky přímo na spermie v suspenzi (kap. 4.5.1.2), jejíž výsledky jsou vidět na obrázcích 12-14. Bohužel během přípravy vzorků došlo k poškození akrozomů spermií a při hodnocení nebyly nalezeny téměř žádné spermie s nepoškozeným akrozomem. U spermií s neporušeným akrozomem (viz bílá šipka) je vidět slabá fluorescence, což naznačuje lokalizaci Rab-2A na povrchu spermií.



Obrázek 12 **Lokalizace Rab-2A na ejakulovaných spermiích v suspenzi:** A – jádro značené DAPI (modrá), B – reakce s protilátkou proti Rab-2A (5C5) značená fluorescenčně (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (DAPI, 5C5, PNA), E – negativní kontrola pouze se sekundární protilátkou (DAPI, PNA), bílá šipka ukazuje pozitivní detekci, červená šipka ukazuje poškozený akrozom, zvětšení 400x, měřítko 10 μm

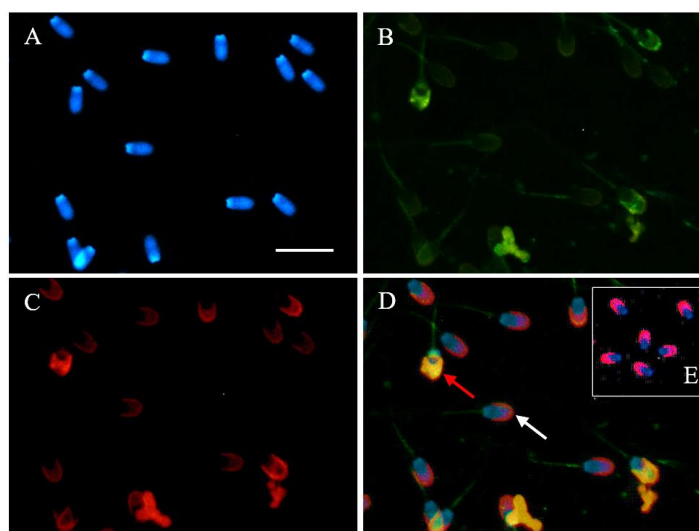


Obrázek 13 **Lokalizace Rab-2A na kapacitovaných spermiích v suspenzi:** A – jádro značené DAPI (modrá), B - reakce s protilátkou proti Rab-2A (5C5) značená fluorescenčně (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (DAPI, 5C5, PNA), E – negativní kontrola pouze se sekundární protilátkou (DAPI, PNA), bílá šipka ukazuje pozitivní detekci, červená šipka ukazuje poškozený akrozom, zvětšení 400x, měřítko 10 μm



Obrázek 14 **Lokalizace Rab-2A na spermích po AR v suspenzi** A – jádro značené DAPI (modrá), B - reakce s protilátkou proti Rab-2A (5C5) značená fluorescenčně (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (DAPI, 5C5, PNA), E – negativní kontrola pouze se sekundární protilátkou (DAPI, PNA), bílá šipka ukazuje pozitivní detekci, červená šipka ukazuje spermii po AR, zvětšení 400x, měřítko 10 μm

Pro detekci proteinu Rab-2A na povrchu fixovaných buněk byla využita metoda fixace paraformaldehydem v suspenzi spermí (kap. 4.5.1.3). Tato metoda zabraňuje průniku protilátky a lektinu PNA značícímu akrozom dovnitř takto fixovaných spermí. Výsledek imunolokalizace proteinu Rab-2A na ejakulovaných spermích za použití této metody je zobrazen na obrázku 15. Ze snímků je patrné, že spermie, které mají zelený signál značící vazbu protilátky na protein Rab-2A, mají také silný červený signál, tedy PNA proniklo do akrozomu. Tyto spermie měly nejspíše poškozenou plazmatickou membránu, a tím se zvýšila přístupnost protilátky k epitopu. U ostatních spermí je zelený signál pro vazbu protilátky i červený signál označující vazbu lektinu PNA na vnější akrozomální membránu velmi slabý. To by znamenalo, že téměř všechny spermie ve vzorku mají narušenou plazmatickou membránu.

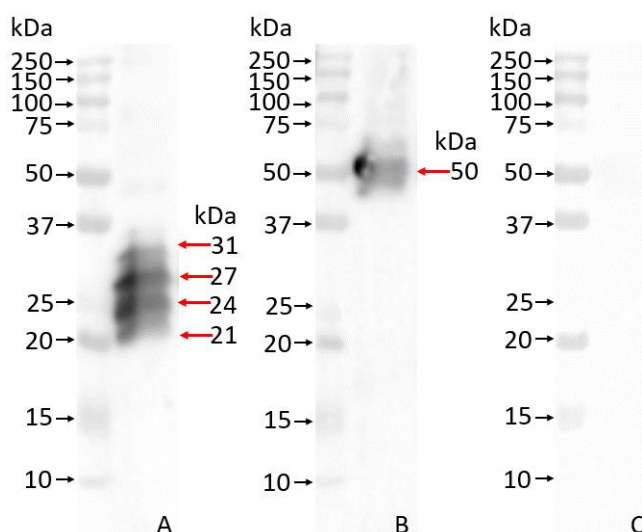


Obrázek 15 **Imunolokalizace Rab-2A na ejakulovaných spermích v suspenzi pomocí 4% paraformaldehydu:** A – jádro značené DAPI (modrá), B – reakce s protilátkou proti Rab-2A (5C5) značená fluorescenčně (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (DAPI, 5C5, PNA), E – negativní kontrola pouze se sekundární protilátkou (DAPI, PNA), bílá šipka ukazuje správně fixovanou spermii, červená šipka ukazuje poškozený akrozom, zvětšení 400x, měřítko 10 μm

5.3 Detekce proteinu Rab-2A v extraktech spermií

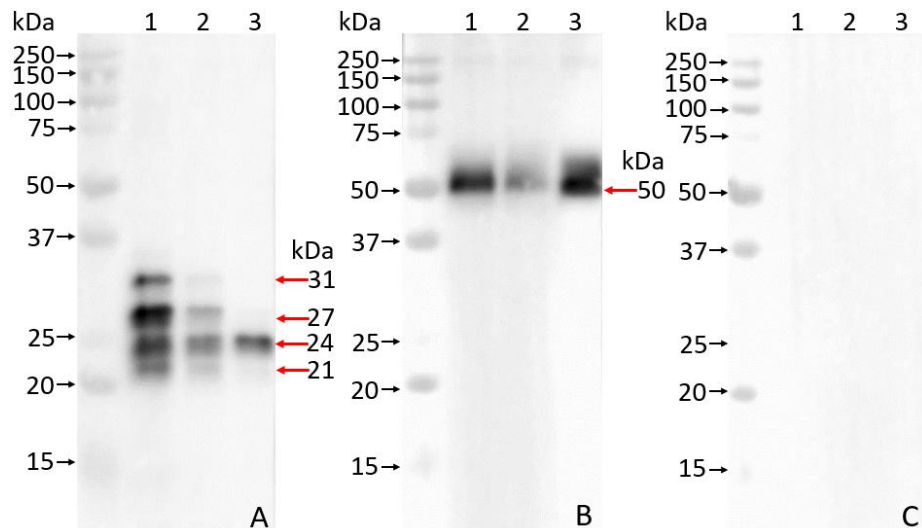
Pro charakterizaci a separaci proteinů spermií byla použita SDS elektroforéza (kap. 4.2) a rozdělené proteiny byly poté přeneseny na membránu metodou Western blot (kap. 4.3). Membrána byla následně přes noc inkubována s protilátkou 5C5 proti proteinu Rab-2A. Pro kontrolu nanášky proteinů ve vzorku spermií byla použita protilátka proti α -tubulinu. Membrána sloužící pro negativní kontrolu byla ponechána bez protilátky. Byla provedena detekce proteinu Rab-2A v extraktech epididymálních, ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomově zreagovaných spermií. Pokud není uvedeno jinak, všechny vzorky spermií pocházejí od kanců plemene Landrace. Vzorky byly připraveny v neredukujících podmínkách.

Protein Rab-2A byl detekován v extraktech z epididymálních spermiích, jak je zobrazeno na obrázku 16A. Vzorky byly v tomto případě připraveny také v neredukujícím prostředí. Na epididymálních spermiích detekce odhalila čtyři izoformy Rab-2A (21, 24, 27 a 31 kDa). Na obrázku 16B je ukázána kontrolní detekce α -tubulinu (50 kDa) a obrázek 16C zobrazuje negativní kontrolu, kdy byla membrána inkubována pouze se sekundární protilátkou.



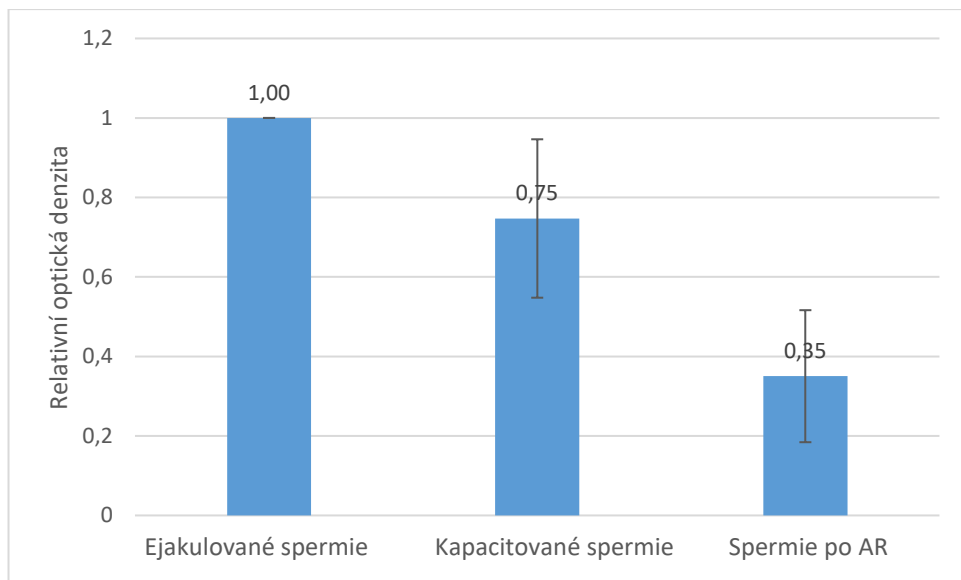
Obrázek 16 Imunodetekce proteinu Rab-2A v extraktu epididymálních spermií pomocí myší protilátky 5C5 (A), pozitivní kontrola detekcí α -tubulinu (B), negativní kontrola po inkubaci pouze s myší sekundární protilátkou (C)

Na obrázku 17A je zobrazena membrána, na níž je vidět detekce proteinu Rab-2A pomocí protilátky 5C5 v proteinových extraktech z ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomově zreagovaných spermií. Ze snímku je patrné, že v ejakulovaných i kapacitovaných spermiích byly detekovány čtyři izoformy proteinu (21, 24, 27 a 31 kDa), zatímco ve spermiích po akrozomální reakci zůstaly pouze tři izoformy (21, 24 a 27 kDa). Na obrázku 17B je ukázána kontrolní detekce α -tubulinu (50 kDa) a obrázek 17C zobrazuje negativní kontrolu, kdy byla membrána inkubována pouze se sekundární protilátkou.



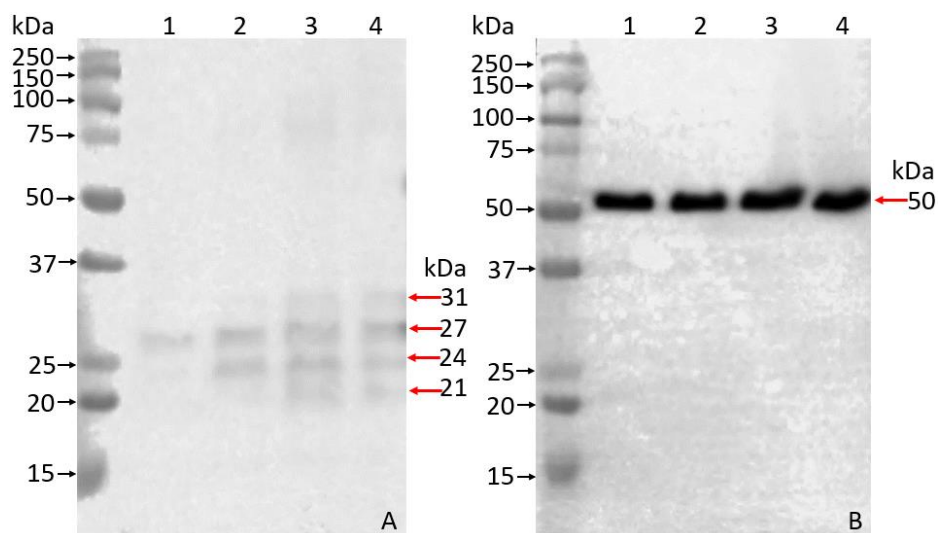
Obrázek 17 Imunodetekce proteinu Rab-2A v extraktech spermií pomocí myší protilátky 5C5 (A), pozitivní kontrola detekcí α -tubulinu (B), negativní kontrola po inkubaci pouze s myší sekundární protilátkou (C): 1 – ejakulované spermie, 2 – kapacitované spermie, 3 – spermie po akrozomální reakci

Pro vyhodnocení zastoupení proteinu Rab-2A v ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomově zreagovaných spermiích byla provedena denzitometrická analýza, jejíž výsledky jsou znázorněny v grafu 1. Graf ukazuje hodnoty průměru signálu protilátky 5C5 reagující s proteinem Rab-2A ze 3 měření v extraktech spermií vztaženého k signálu protilátky proti α -tubulinu. Nejvyšší výskyt Rab-2A byl detekován v ejakulovaných spermiích. Pokles v množství proteinu v akrozomově zreagovaných spermiích byl viditelný, ale nebyl statisticky významný kvůli velké směrodatné odchylce a malému počtu opakování ($p > 0,05$).



Graf 1 Průměr intenzity signálu protilátky 5C5 proti proteinu Rab-2A vztaženého k detekci α -tubulinu v extraktech z ejakulovaných spermií, kapacitovaných spermií a spermií po akrozomální reakci (AR)

Detekce proteinu Rab-2A byla provedena i v redukcujících podmínkách, jak je vidět na obrázku 18. Tato membrána zobrazuje imunodetekci v extraktech ejakulovaných a kapacitovaných spermích kance plemene Duroc a kance plemene Landrace. Mezi oběma plemeny nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly v množství proteinu Rab-2A. Na rozdíl od dvou membrán výše, které obsahovaly vzorky plemene Landrace, však byly v tomto případě detekovány na ejakulovaných i kapacitovaných spermích plemene Duroc jen dvě izoformy Rab-2A (24 a 27 kDa). Na ejakulovaných i kapacitovaných spermích plemene Landrace byly detekovány opět všechny čtyři izoformy (21, 24, 27, 31 kDa). Jako pozitivní kontrola byla použita detekce α -tubulinu.

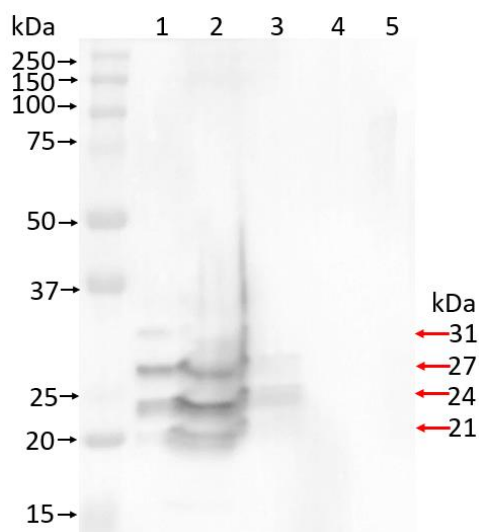


Obrázek 18 Imunodetekce proteinu Rab-2A v extraktech spermíí pomocí myší protilátky 5C5 (A) a pozitivní kontrola detekcí α -tubulinu (B): 1 – ejakulované spermie Duroc, 2 – kapacitované spermie Duroc, 3 – ejakulované spermie Landrace, 4 – kapacitované spermie Landrace

5.4 Detekce proteinu Rab-2A v povrchových proteinech spermií

Za účelem cílené izolace povrchových proteinů (kap. 4.1.4) byly ejakulované spermie biotinylovány přes $-NH_2$ skupiny aminokyselin proteinů přítomných na plazmatické membráně spermií. Teprve poté došlo k lyzaci spermií inkubací s lyzačním pufrem. Po lyzaci byla použita afinitní kolonka s avidinem, který vychytává proteiny s biotinylační značkou. Poté byla kolonka propláchnuta redukujícím vzorkovým pufrem, čímž došlo k přerušení disulfidických vazeb a označené proteiny byly uvolněny. V takto připraveném vzorku obsahujícím povrchové proteiny spermií byl po separaci a elektropřenosu detekován pomocí protilátky protein Rab-2A. Jako kontroly byly použity vzorky extraktu ejakulovaných spermií, pelety biotinylovaných spermií po lyzaci, lyzát biotinylovaných proteinů a avidinem nezachycené proteiny. Všechny vzorky byly připraveny v redukujícím vzorkovém pufru.

Výsledky detekce jsou zobrazeny na obrázku 19. Čtyři izoformy proteinu Rab-2A (21, 24, 27 a 31 kDa) byly detekovány kromě extraktu ejakulovaných spermií i v peletě spermií po inkubaci s lyzačním pufrem a dvě z těchto forem (24 a 27 kDa) také v lyzátu biotinem značených proteinů. Navzdory předpokladu však protein Rab-2A nebyl detekován mezi povrchovými proteiny zachycenými avidinem a ani na povrchových proteinech avidinem nezachycených.

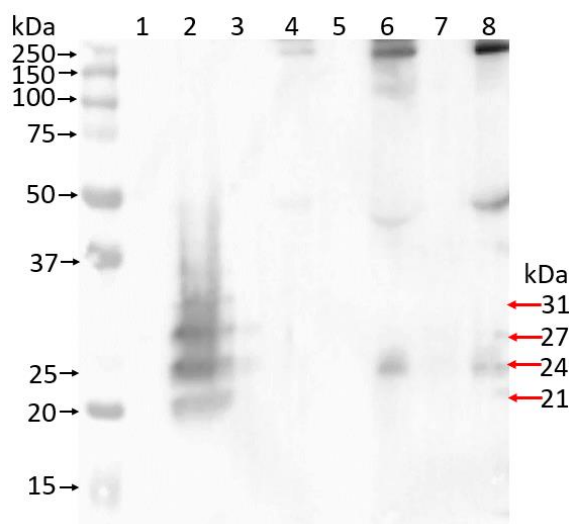


Obrázek 19 Imunodetekce proteinu Rab-2A v povrchových proteinech ejakulovaných spermií pomocí myší protilátky 5C5: 1 – ejakulované spermie, 2 – peleta biotinylovaných spermií po lyzaci, 3 – lyzát obsahující biotinem značené proteiny, 4 – povrchové proteiny zachycené avidinem, 5 – avidinem nezachycené proteiny

5.5 Imunoprecipitace

Pro cílenou izolaci proteinu Rab-2A z lyzátu spermií byla provedena imunoprecipitace (kap. 4.1.5). Promyté ejakulované spermie byly nejprve lyzovány v lyzačním pufru s přidavkem proteázových inhibitorů. K lyzátu byla následně přidána protilátkou 5C5 a po inkubaci agarózové kuličky s konjugovaným proteinem A/G pro vychytání precipitátu. Jako kontroly byly použity vzorky extraktu ejakulovaných spermií, peleta spermií po lyzaci, vstupní lyzát, imunoprecipitát bez přidané protilátky, proteiny nezachycené proteinem A/G po inkubaci s protilátkou, proteiny nezachycené A/G proteinem bez protilátky a protilátka 5C5 se vzorkovým pufrům. Všechny vzorky byly připraveny v neredukujícím vzorkovém pufru.

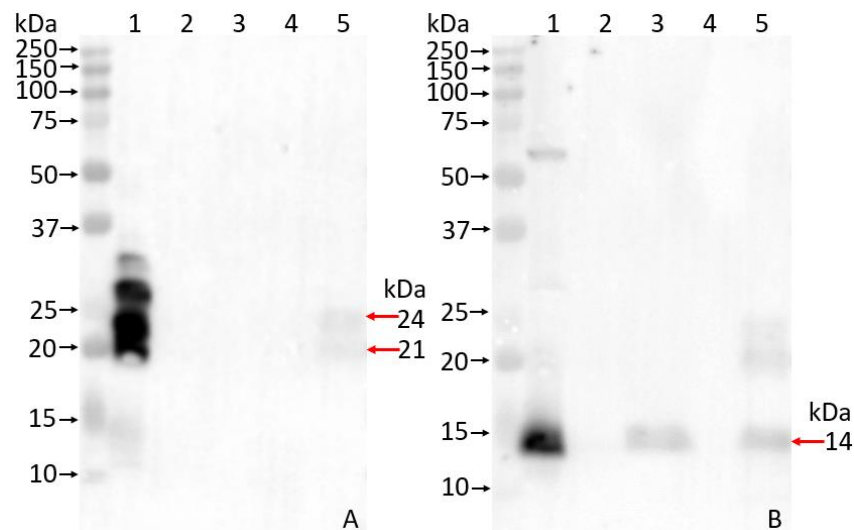
Na obrázku 20 je zobrazena membrána se vzorky s rozdělenými proteiny detekovaná pomocí protilátky 5C5 proti proteinu Rab-2A. Nanáška vzorku extraktu ejakulovaných spermií na gel byla pravděpodobně příliš malá, a není tedy viditelná detekce proteinu Rab-2A. Rab-2A byl detekován pouze v peletě po lyzaci, ale nikoliv v imunoprecipitátu. Použitý lyzační pufr pravděpodobně nebyl dostatečně efektivní pro izolaci proteinu Rab-2A, a proto nebyla ani imunoprecipitace úspěšná.



Obrázek 20 **Imunoprecipitace proteinu Rab-2A z lyzátu ejakulovaných spermií pomocí myší protilátky 5C5:** 1 – ejakulované spermie, 2 – peleta spermií po lyzaci, 3 – lyzát, 4 – imunoprecipitát s protilátkou, 5 – imunoprecipitát bez protilátky, 6 – nezachycené proteiny s protilátkou, 7 – nezachycené proteiny bez protilátky, 8 – protilátka 5C5

5.6 Detekce proteinu Rab-2A v perinukleární théce

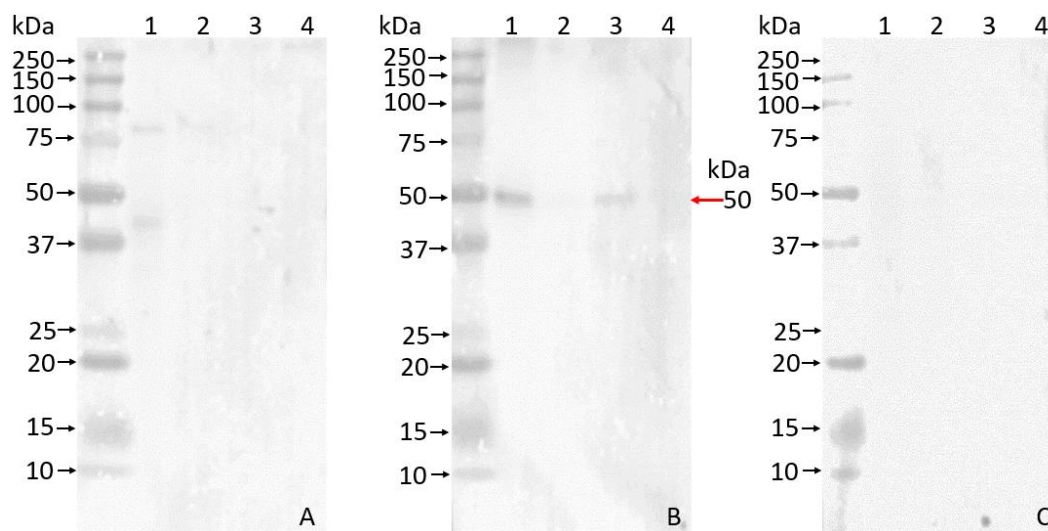
Za účelem potvrzení hypotézy, že protein Rab-2A se nachází v perinukleární théce (PT) spermií (Mountjoy *et al.* 2008), byla provedena extrakce proteinů PT (kap. 4.1.6) a následná imunodetekce na membráně. Jako kontrola byly použity extrakt ejakulovaných spermií, extrakt vnitřních akrozomálních membrán a extrakt jader spermií, meziproducty izolace proteinů PT. Na obrázku 21A lze vidět, že na ejakulovaných spermiích byly opět detekovány čtyři izoformy Rab-2A (21, 24, 27 a 31 kDa), zatímco v extraktech vnitřních akrozomálních membrán, jader spermií a iontově vázaných proteinů PT byla detekce negativní. V extraktu kovalentně vázaných proteinů PT byly detekovány dvě izoformy proteinu Rab-2A (21 a 24 kDa). Jako pozitivní kontrola izolace proteinů PT byl detekován histon H2B (obr. 21B) o molekulové hmotnosti 14 kDa. Histon H2B byl detekován v extraktu ejakulovaných spermií, jader spermií i v extraktu kovalentně vázaných proteinů PT.



Obrázek 21 Imunodetekce proteinu Rab-2A v perinukleární théce pomocí myší protilátky 5C5 (A), pozitivní kontrola detekcí histonu H2B (B): 1 – ejakulované spermie, 2 – vnitřní akrozomální membrány, 3 – jádra spermií, 4 – iontově vázané proteiny PT, 5 – kovalentně vázané proteiny PT

5.7 Detekce proteinu Rab-2A v tkáních

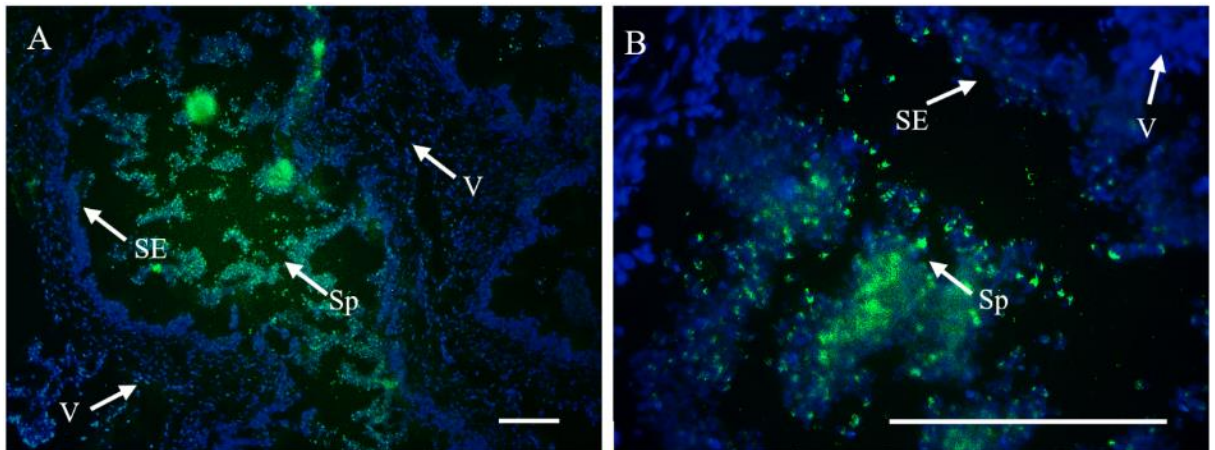
Imunodetekce proteinu Rab-2A byla provedena rovněž v extraktech tkání varlete a hlavy, těla a ocasu nadvarlete. Části tkání byly homogenizovány a lyzovány (kap. 4.1.7) a vzorky byly připraveny v redukujícím i neredukujícím pufru. V obou případech však detekce byla neúspěšná. Jak je možné vidět na obrázku 22A, který zobrazuje výsledky imunodetekce na extraktech tkání v redukujících podmínkách, protein Rab-2A se nepodařilo detekovat v žádné tkáni. Detekce α -tubulinu (obr. 22B) na membráně představující pozitivní kontrolu nanášky proteinů byla velmi slabá, což naznačuje možný problém s nedostatečnou lyzací vzorků.



Obrázek 22 Detekce proteinu Rab-2A v extraktech tkání pomocí myší protilátky 5C5 (A), pozitivní kontrola detekcí α -tubulinu (B), negativní kontrola po inkubaci pouze s myší sekundární protilátkou (C): 1 – testes, 2 – caput epididymis, 3 – corpus epididymis, 4 – cauda epididymis

5.8 Lokalizace proteinu Rab-2A v tkáních reprodukčních orgánů

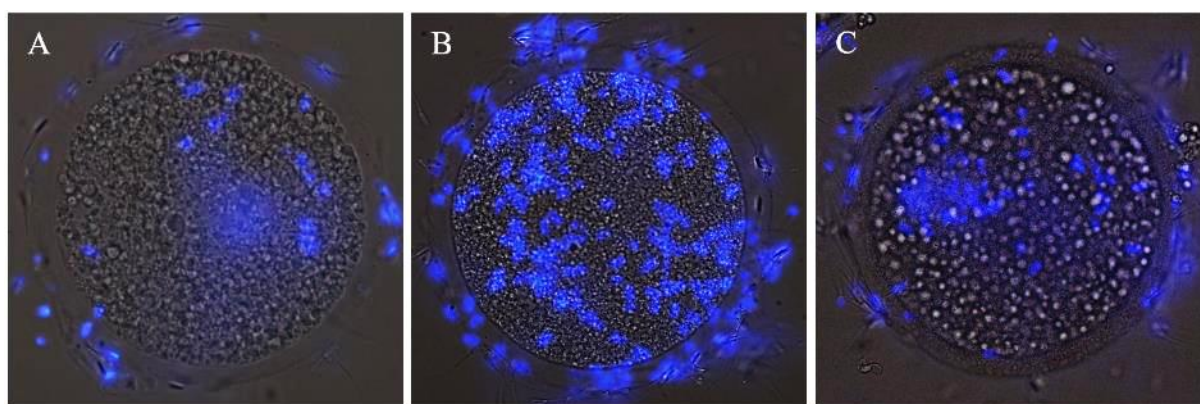
Pomocí nepřímé fluorescenční mikroskopie byla provedena lokalizace proteinu Rab-2A ve varleti a v ocasu nadvarlete. Kryorezy varlete nebyly kvalitní, a tedy použitelné pro detekci Rab-2A v této práci. Na obrázku 23 jsou zobrazeny snímky kryorezů nadvarlete (kap. 4.5.2) po inkubaci s protilátkou 5C5 proti proteinu Rab-2A. Pro vizualizaci byla použita sekundární protilátka konjugovaná s Alexa 488 (zelený signál) a následně bylo použito montovací médium s DAPI značící jádra buněk modře. Signál reakce s protilátkou byl detekován na spermatických buňkách v lumen nadvarlete. Žádný viditelný signál nebyl detekován v sekrečním epitelu nadvarlete.



Obrázek 23 **Imunolokalizace proteinu Rab-2A v cauda epididymis pomocí protilátky 5C5:** Sp - spermatické buňky, SE – sekreční epitel, V – vazivo, zvětšení 100x (A), zvětšení 400x (B), měřítko 100 μ m

5.9 Vazebná studie

Za účelem zjištění, zda protein Rab-2A hraje roli ve vazbě spermie na ZP oocytu, byla provedena blokáce vazby spermie na oocyt se ZP pomocí myší monoklonální protilátky 5C5. Kapacitované spermie byly inkubovány s protilátkou 5C5 proti Rab-2A, a poté následovala inkubace spermii s oocyty (kap. 4.6). Jako kontrola blokáce vazby byly spermie a oocyt inkubovány s myšími IgG. Kapacitované spermie bez inkubace s 5C5 nebo IgG byly použity jako pozitivní kontrola vazby spermii na oocyt. Byly provedeny dva pokusy. Na obrázku 24 jsou zobrazeny prolnuté snímky oocytů po inkubaci se spermii z fluorescenčního a světelného mikroskopu. Ze snímků by se dalo usuzovat, že protilátka proti Rab-2A částečně blokuje vazbu spermii na oocyt ve srovnání s kontrolními vzorky. Oocyty však nezrály do požadovaného stádia metafáze II, a bylo by tedy potřeba experiment zopakovat pro jednoznačný výsledek.



Obrázek 24 Detekce blokáce vazby spermii na oocyt: A – oocyt a spermie inkubované s protilátkou proti Rab-2A značené DAPI, B - oocyt a spermie inkubované s IgG značené DAPI, C – NK, oocyt a spermie značené DAPI

Tabulka 1 znázorňuje průměrné počty spermii navázaných na oocyty z obou opakování. Spermie byly spočítány pro každý oocyt ze skupin pozitivní kontroly vazby, IgG a protilátky 5C5 proti Rab-2A. V obou experimentech byly ve skupině s protilátkou 4 oocyty a v kontrolních skupinách 2 oocyty. Průměrně nejvíce spermii bylo navázáno na oocyty ve skupině s přidaným IgG. Oocyty z kontrolní skupiny měly navázaných více spermii než oocyty ze skupiny s protilátkou 5C5. Vzhledem k malému počtu oocytů ve skupinách nebyly experimenty statisticky vyhodnoceny.

Tabulka 1 Průměrné počty spermii navázaných na oocyty

	5C5	IgG	Kontrola
Počet spermii	55	220	112

6 Diskuze

Protein Rab-2A je malá GTPáza z rodiny Rab proteinů, které jsou důležitými molekulami intracelulárního vezikulárního transportu (Stenmark & Olkkonen 2001). Rab-2A byl dosud lokalizován v různých tkáních, v nichž se účastní mnoha signálních drah a plní nejrůznější funkce (Tisdale *et al.* 1992; Sugawara *et al.* 2014; Takata *et al.* 2016). Na spermiích byl však tento protein objeven teprve nedávno a jeho funkce zatím nebyla uspokojivě popsána (Mountjoy *et al.* 2008; Zigo *et al.* 2015). Studium proteinu Rab-2A se zaměřuje na jeho roli ve spermatogenezi (Mountjoy *et al.* 2008), v současnosti je zkoumán také jeho možný přínos jakožto markeru plodnosti (Kwon *et al.* 2015a) a v neposlední řadě je věnována pozornost jeho možnému zapojení do vazby na *zona pellucida* oocyty (Zigo *et al.* 2015).

V experimentech v rámci této diplomové práce jsme pro detekci a lokalizaci proteinu Rab-2A na kančích spermiích i v reprodukčních tkáních používali primární monoklonální protilátka 5C5. Protilátka 5C5 byla připravena imunizací myši pomocí povrchových proteinů izolovaných z ejakulovaných spermií prasete. Specifita protilátky byla potvrzena pomocí imunoprecipitace proteinu Rab-2A z lyzátu spermií a imunoprecipitovaný protein byl identifikován jako Rab-2A pomocí hmotnostní spektrometrie (Zigo *et al.* 2015).

Za pomoci nepřímé fluorescenční mikroskopie jsme provedli lokalizaci proteinu Rab-2A na epididymálních spermiích izolovaných z ocasu nadvarlete, na spermiích ejakulovaných a kapacitovaných a na spermiích po indukci akrozomální reakce (AR). Pro lokalizaci proteinu ve spermiích byly tyto spermie permeabilizovány a fixovány na sklíčku pomocí acetonu a metanolu. Z výsledků bylo patrné, že epididymální spermie byly značně poškozené. Kanec, od kterého byly tyto spermie získány, vykazoval 20 % patologických spermií. Přesto však byl v akrozomální oblasti epididymálních spermií jasně detekován fluorescenční signál značící přítomnost Rab-2A. V oblasti akrozomu byl Rab-2A lokalizován i v ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermiích. U spermií po indukci AR bylo zřejmé, že fluorescenční signál je viditelný pouze na spermiích, u kterých AR neproběhla, zatímco spermie, které již neměly akrozom, byly zcela bez signálu. Z našich výsledků tedy vyplývá, že Rab-2A se ve spermiích prasete ve všech fázích vývoje vyskytuje pouze v oblasti akrozomu. Kwon *et al.* (2015b) i Bae *et al.* (2019) protein lokalizovali i na bičíku spermií, a to jak kančích, tak myších. Tento rozdíl však může být způsoben použitím jiné protilátky v těchto dvou studiích, která rozpoznává odlišný epitop proteinu Rab-2A, případně lokalizace proteinu v myších spermiích může být odlišná.

Co se týká přesné lokalizace Rab-2A na hlavičce kančích spermií, předpokládali jsme, že protein je přítomen jak uvnitř akrozomu, tak na povrchu hlavičky spermií, podobně jako protein proakrozin/akrozin s vazebnou aktivitou k ZP. Ten byl popsán uvnitř akrozomu a na vnitřní akrozomální membráně, a předpokládá se tedy jeho role jako receptoru během sekundární vazby na ZP (Jones & Brown 1987; Jones *et al.* 1988). Později byl však lokalizován i na povrchu plazmatické membrány kančích a lidských spermií, kam se pravděpodobně relokuluje z akrozomální matrix během kapacitace, a mohl by tedy hrát roli i během primární vazby na ZP (Tesařík *et al.* 1988; Kongmanas *et al.* 2015; Tanphaichitr *et al.* 2015; Zigo *et al.* 2013; 2015). Zigo *et al.* (2015) za použití imunofluorescence lokalizovali protein Rab-2A na povrchu nepermeabilizovaných epididymálních, ejakulovaných i kapacitovaných spermií, přičemž na kapacitovaných spermiích byl fluorescenční signál nejsilnější. Pokusili jsme se tedy

také lokalizovat Rab-2A na povrchu spermií pomocí nepřímé fluorescenční mikroskopie. Pro tento účel byla zvolena metoda vazby protilátky přímo na spermie v suspenzi. Během přípravy vzorků však došlo k poškození akrozomů spermií a při hodnocení nebyly nalezeny téměř žádné spermie bez nepoškozeného akrozomu. Zbylé spermie tak nebylo možné hodnotit. Pro lokalizaci Rab-2A na povrchu spermií byly připraveny také vzorky spermií fixovaných paraformaldehydem v suspenzi. Touto metodou by mělo dojít k zafixování buňky bez permeabilizace, a tím znemožnění přístupu protilátky dovnitř do buňky. Protilátka by tedy měla značit epitopy přístupné pouze na povrchu. Z výsledných snímků však bylo patrné, že pravděpodobně došlo k částečné permeabilizaci membrány, neboť byl detekován signál vazby PNA lektinu značící vnější akrozomální membránu. Tento přístup tedy nepotvrdil, že je protein Rab-2A lokalizován na povrchu spermie. Důvodem, proč se nám nepovedlo protein na povrchu spermií detekovat, by mohlo být také to, že epitop interagující s protilátkou 5C5 se může nacházet na N-konci molekuly blízko membrány, a není tedy pro protilátku dostatečně přístupný.

Za účelem zjištění, zda se protein Rab-2A nachází na povrchu plazmatické membrány spermií, a mohl by tak hrát roli v primární vazbě spermie na ZP oocyty, byla využita také imunodetekce na biotinem značených povrchových proteinech ejakulovaných spermií. Rab-2A však nebyl mezi povrchovými proteiny detekován. Zigo et al. (2015) detekovali Rab-2A pouze v lyzátu povrchových proteinů z *in vitro* kapacitovaných spermií, nikoliv ejakulovaných, a to jen jeho 24-kDa izoformu. Protilátka však byla produkována na základě imunizace myši povrchovými proteiny právě z ejakulovaných spermií. Nabízí se tedy otázka, zda nemohly být spermie při izolaci proteinů pro výrobu protilátky poškozeny a do izolovaných povrchových proteinů se dostal i Rab-2A z akrozomu spermie. Další možností je, že množství Rab-2A na povrchu spermií je velmi malé a myši po imunizaci sice zareagovaly, protože byl protein vysoce imunogenní, ale imunodetekce ho nezachytila. Nicméně náš imunoprecipitační experiment byl proveden pouze jednou a bylo by vhodné ho zopakovat.

Dále jsme provedli imunodetekci proteinu Rab-2A v extraktech spermií v různých fázích jejich posttestikulárního vývoje. Rab-2A byl detekován ve spermiích epididymálních, ejakulovaných a kapacitovaných, a ve spermiích po indukci akrozomální reakce. V extraktech epididymálních, ejakulovaných i kapacitovaných spermiích se nám podařilo detekovat čtyři izoformy Rab-2A o molekulové hmotnosti 21, 24, 27 a 31 kDa. Přítomnost více izoform proteinu může být dána hypervariabilitou jeho C-koncové oblasti (Pereira-Leal & Seabra 2000; Zigo et al. 2015). Na spermiích po akrozomální reakci byly detekovány pouze tři izoformy o molekulové hmotnosti 21, 24 a 27 kDa. Pomocí denzitometrické analýzy bylo vyhodnoceno zastoupení proteinu v ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomově zreagovaných spermiích. Z našich výsledků vyplývá, že protein Rab-2A ubývá viditelně až v extraktu spermií po akrozomální reakci. Úbytek proteinu byl viditelný, ale nebyl signifikantní, neboť bylo provedeno málo opakování a byla zjištěna velká směrodatná odchylka. Zigo et al. (2015) pomocí imunodetekce na membráně detekovali signál protilátky značící Rab-2A silnější na kapacitovaných než na ejakulovaných spermiích. Silnější signál na kapacitovaných spermiích pozorovali i při použití nepřímé fluorescenční mikroskopie, její výsledky však nebyly vyhodnoceny analýzou obrazu. Naše výsledky výrazně vyšší signál u kapacitovaných spermií nepotvrdily. Ostatní studie pozorovali naopak úbytek Rab-2A po kapacitaci na myších spermiích (Bae et al. 2019) i na kančích spermiích Kwon et al. (2014). Kwon et al. (2014)

předpokládají, že snížená exprese Rab-2A na kapacitovaných spermiiích by mohla naznačovat, že se Rab-2A po kapacitaci podílí na strukturální modifikaci akrozomu k indukci akrozomální exocytózy. To bylo prokázáno u Rab-3A, který je lokalizován v akrozomální oblasti hlavičky spermie a funguje jako induktor akrozomální exocytózy u lidských spermii (Yunes *et al.* 2000).

Rab-2A byl v našem experimentu slabě detekován i v extraktu spermii po akrozomální reakci, konkrétně izoformy 21, 24 a 27 kDa, izoforma 31 kDa po AR mizela. Z výsledků nepřímé fluorescenční mikroskopie však bylo patrné, že Rab-2A byl po indukci akrozomální reakce přítomen pouze na spermiiích, u kterých akrozomální exocytóza neproběhla. Dalo by se tedy předpokládat, že signál v extraktech spermii po akrozomální reakci by mohl pocházet od spermii, které AR neprodělaly, a tedy na nich zůstal akrozom. Zároveň však signál může částečně pocházet z proteinu vázaného v perinukleární théce, ve které jsme detekovali 21-kDa a 24-kDa izoformy Rab-2A, jak je níže diskutováno. Abychom mohli jednoznačně potvrdit nebo vyvrátit přítomnost Rab-2A na spermiiích po AR, museli bychom využít například metodu FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting), což je typ průtokové cytometrie pro třídění (sorting) jednotlivých buněk (Tao *et al.* 1993), a roztřídit spermie s akrozomem a spermie bez akrozomu. Až poté by bylo možné provést imunodetekci na spermiiích prokazatelně bez akrozomu a zjistit, zda se v jejich extraktu Rab-2A vyskytuje. Metodu FACS bychom ostatně mohli použít i pro vytřídění spermii, které prokazatelně prošly kapacitací, a tak definitivně potvrdit či vyvrátit přítomnost některých izoform Rab-2A na kapacitovaných spermiiích.

Kwon *et al.* (2015b) pomocí komerční polyklonální anti-Rab-2A protilátky (Amersham, UK) detekovali pouze jednu izoformu Rab-2A o molekulové hmotnosti 24 kDa. Bae *et al.* (2019) detekovali v myších spermiiích také jen jednu izoformu Rab-2A, v tomto případě o molekulové hmotnosti 25 kDa, přičemž použili králičí polyklonální protilátku (ab154729; Abcam, UK), která byla připravena proti rekombinantnímu fragmentu odpovídajícímu oblasti 1-177 AMK proteinu Rab-2. Zigo *et al.* (2015) pomocí myší monoklonální protilátky 5C5 na spermiiích detekovali dvě izoformy proteinu Rab-2A o molekulové hmotnosti 24 a 27 kDa, my jsme pomocí stejné protilátky detekovali čtyři izoformy o molekulové hmotnosti 21, 24, 27 a 31 kDa. Důvodem tohoto rozdílu by mohla být námi použitá citlivější kamera pro snímání detekce nebo plemeno, od něhož byly spermie odebrány. Naše spermie pocházely od plemene Landrace. Když jsme pro zajímavost srovnali tyto spermie se spermiiemi plemene Duroc, zjistili jsme, že zatímco na spermiiích plemene Landrace jsme detekovali všechny čtyři izoformy, na plemeni Duroc byly přítomny pouze izoformy o molekulové hmotnosti 24 a 27 kDa, což koresponduje s výsledky detekce ve studii od Zigo *et al.* (2015). Je tedy otázkou, jaké plemeno pro svou studii využili.

Za účelem izolace všech izoform proteinu Rab-2A přítomných v kančích spermii byla provedena metoda imunoprecipitace pomocí protilátky 5C5 podle Zigo *et al.* (2015). Imunoprecipitace však nebyla úspěšná, neboť Rab-2A byl detekován pouze v peletě po lyzaci spermii, nikoliv v imunoprecipitátu. Důvodem mohlo být, že zatímco Zigo *et al.* (2015) ve své studii použili RIPA pufr, my jsme použili lyzační pufr určený pro imunoprecipitace, který pravděpodobně nebyl dostatečně účinný pro izolaci proteinu Rab-2A ze spermii.

Mountjoy *et al.* (2008) jako první lokalizovali protein Rab-2A v subakrozomální vrstvě perinukleární théky býčích spermatid. Za použití jedné vlastní polyklonální protilátky produkované imunizací králiků alkalickým extraktem PT a dvou komerčních polyklonálních protilátek P19 a Q13 (Santa Cruz Biotechnology, USA) vyrobených proti syntetickým

oligopeptidovým sekvencím z jedinečné C-koncové oblasti Rab-2A detekovali 24-kDa izoformu Rab-2A. Pomocí elektronové mikroskopie se jim podařilo lokalizovat Rab-2A na cytozolické straně vnitřní akrozomální membrány, v níž je ukotven prenylací. Během spermiogeneze Rab-2A postupně mizí z povrchu vnější akrozomální membrány, ale zůstává zachován v ekvatoriální oblasti vnější akrozomální membrány a pod vnitřní akrozomální membránou, kde zůstává jako součást perinukleární théky zralých spermií (Mountjoy *et al.* 2008; Oko & Sutovsky 2009). My jsme se v návaznosti na tento objev pokusili o detekci Rab-2A v PT izolované z kančích ejakulovaných spermií. Shodně s předpokladem se nám podařilo detekovat Rab-2A pouze v extraktu kovalentně vázaných proteinů perinukleární théky, nikoliv mezi iontově vázanými proteiny, neboť Rab proteiny jsou posttranslačně prenylovány a jsou tedy kovalentně připojeny k lipidům uloženým ve vezikulární membráně (Mountjoy *et al.* 2008). Z našich výsledků za použití protilátky 5C5 vyplývá, že Rab-2A je v perinukleární théce ejakulovaných kančích spermií přítomen ve dvou izoformách o molekulové hmotnosti 21 a 24 kDa a mohli bychom tedy spekulovat, že i v kančích spermiích se Rab-2A účastní biogeneze akrozomu během spermatogeneze podobně jako je tomu u býčích spermií. V rámci tohoto experimentu jsme provedli detekci Rab-2A i v extraktu proteinů izolovaných z vnitřních akrozomálních membrán, a také v extraktu proteinů z jader spermií. V obou případech však byla imunodetekce negativní.

Po shrnutí našich výsledků se zdá, že protein Rab-2A se nenachází na vnitřní akrozomální membráně a na rozdíl od Zigo *et al.* (2015) se nám ho nepodařilo detekovat na plazmatické membráně. Je však přítomen v perinukleární théce a mohl by se nacházet ve vnější akrozomální membráně nebo uvnitř akrozomu. Podle našich výsledků po akrozomální reakci ze spermií mizí 31-kDa forma Rab-2A, což by mohla být forma zakotvená ve vnější akrozomální membráně nebo plazmatické membráně spermií. V akrozomální matrix by protein mohl být přítomen i ve volné formě, která je zkrácena o geranylgeranylový motiv na C-konci molekuly, který je nutný pro její ukotvení v membráně (viz Pereira-Leal & Seabra 2000). Abychom zjistili, kde přesně se na spermií protein Rab-2A nachází, mohli bychom v budoucnu využít metodu subcelulární extrakce nebo frakcionace jednotlivých membrán (viz Jankovicova *et al.* 2020). Rovněž se nabízí lokalizace proteinu pomocí elektronové mikroskopie.

Původ proteinu Rab-2A ve spermiích dosud nebyl uspokojivě objasněn. Zigo *et al.* (2015) detekovali 24 i 27-kDa izoformu proteinu Rab-2A v epididymální tekutině, a naznačili tak jeho možný původ v nadvarleti. Rab proteiny jsou obvykle prenylovány, aby byly ukotveny v membránách, a je tedy pravděpodobné, že sekrece Rab-2A do lumen epididymu se může uskutečňovat pomocí epididymálních sekrečních vezikulů, tzv. epididymozomů (Simpson *et al.* 2008; Zigo *et al.* 2015). Některé Rab proteiny již byly identifikovány v epididymozomech z hlavy a ocasu nadvarlete u býků (Girouard *et al.* 2011). Zigo *et al.* (2015) se pokusili detekovat protein Rab-2A v tekutině kančích semenných váčků i v kančí semenné plazmě, nicméně detekce byla v obou případech negativní. Nedávno se ovšem podařilo detekovat Rab-2A v extracelulárních vezikulech izolovaných z beraní semenné plazmy (Leahy *et al.* 2020). Uteg *et al.* (2003) již dříve objevili Rab proteiny také v prostazomech u lidí. V této práci jsme se za účelem zjištění původu Rab-2A ve spermiích protein snažili detekovat v reprodukčních tkáních, konkrétně ve varleti a v hlavě, těle a ocasu nadvarlete. Imunodetekce proteinu Rab-2A však nebyla úspěšná v extraktech tkání připravených jak v neredukujících, tak v redukujících podmínkách. Pomocí nepřímé fluorescenční mikroskopie jsme se chtěli pokusit detekovat

Rab-2A ve spermiích v časných stádiích spermatogeneze v semenotvorných kanálcích varlete, ale bohužel jsme měli neuspokojivý preparát kryořezu. Na řezech nadvarlete nebyl ve tkáni detekován žádný signál. Viditelná byla pouze reakce protilátky v akrozomální oblasti spermií přítomných v kanálku nadvarlete. Nezdá se tedy, že by byl protein v tkáních přítomen. Dalo by se tedy polemizovat, že signál detekovaný v epididymální tekutině ve studii od Zigo *et al.* (2015) by mohl pocházet z uvolněných proteinů z poškozených epididymálních spermií. Příčinou naší neúspěšné imunodetekce na membránách by však mohlo být i nevhodně zvolené extrakční činidlo pro přípravu vzorků. Pro potvrzení nepřítomnosti proteinu Rab-2A v tkáních varlete a nadvarlete by proto bylo potřeba provést experiment znovu za použití jiného extrakčního činidla. Také by bylo vhodné provést v budoucnu imunodetekci proteinu Rab-2A v izolovaných extracelulárních vezikulech epididymální tekutiny a semenné plazmy.

Zigo *et al.* (2015) v návaznosti na svou úspěšnou detekci proteinu Rab-2A na povrchu kančích spermií a popsání jeho *zona pellucida* vazebné aktivity předložili hypotézu, že Rab-2A by se mohl podílet na vazbě spermie na oocyt. My jsme v této práci za účelem potvrzení či vyvrácení této hypotézy provedli blokaci vazby spermie na oocyt pomocí protilátky u 5C5. Spermie byly inkubovány s protilátkou a následně přidány spolu s ní k oocytům. Vazba spermií na oocyt byla vyhodnocena na základě počtu spermií navázaných na *zona pellucida* oocytu pod fluorescenčním mikroskopem. Experiment byl proveden dvakrát a pokaždé byly hodnoceny čtyři oocyty s navázanými spermiemi. Jako kontrola byly vyhodnoceny oocyty inkubované se spermiemi bez protilátky a oocyty se spermiemi inkubovanými s IgG. Z výsledků se dalo soudit, že vazba spermií na oocyt byla do jisté míry zablokována. Z takových výsledků by mohlo plynout, že protein Rab-2A nemusí být klíčovým receptorem pro vazbu na oocyt, nicméně mohl by se na vazbě nějakým způsobem podílet. Oocyty použité v experimentech však ani v jednom případě nedozrály do požadovaného stádia metafáze II. Kvůli malému počtu oocytů k vyhodnocení a nesprávnému stádiu jejich vývoje, které mohlo vazbu spermií na oocyt ovlivnit, tak nelze výsledky této vazebné studie považovat za směrodatné.

Tato diplomová práce je studií proteinu Rab-2A na kančích spermiích. Hlavní náplní této práce byla lokalizace tohoto proteinu ve spermiích a studium jeho role ve vazbě na oocyt. Z důvodu nedostatku času v souvislosti s aktuální situací však nebyly všechny experimenty dostatečně zopakovány, aby mohly být výsledky jednoznačně vyhodnoceny. Především vazebná studie pak neproběhla za ideálních podmínek, ani nemohla být zopakována, a výsledky proto nemohou být uspokojivě interpretovány.

7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala studiem proteinu Rab-2A v kančích spermích. Vycházeli jsme z hypotézy, že protein Rab-2A se nachází na kančích spermích a hraje roli ve vazbě na *zona pellucida* oocyty. Cílem této práce byla (1) detekce a lokalizace proteinu Rab-2A na kančích spermích a (2) blokace vazby spermí na *zona pellucida* oocyty pomocí protilátky.

Protein Rab-2A jsme pomocí protilátky 5C5 za použití nepřímé fluorescenční mikroskopie lokalizovali v akrozomální oblasti epididymálních, ejakulovaných a kapacitovaných spermí. Na spermích po akrozomální reakci nebyla viditelná reakce s protilátkou. Výsledky lokalizace Rab-2A v tkáni ocasu nadvarlete byly negativní.

Imunodetekcí proteinu Rab-2A v extraktech spermí pomocí protilátky 5C5 jsme zjistili, že v kančích epididymálních, ejakulovaných a kapacitovaných spermích se vyskytují čtyři izoformy Rab-2A o molekulových hmotnostech 21, 24, 27 a 31 kDa. Z našich výsledků vyplývá, že množství proteinu bylo viditelně sníženo ve spermích po akrozomální reakci, kde byly detekovány pouze izoformy o molekulových hmotnostech 21, 24 a 27 kDa. Úbytek Rab-2A však nebyl statisticky významný. Dvě izoformy (21 a 24 kDa) proteinu Rab-2A se nám také podařilo detekovat v extraktech proteinů perinukleární thény spermí. Detekce Rab-2A v extraktech tkáni varlete a nadvarlete byla negativní.

Blokace vazby na *zona pellucida* zablokováním proteinu Rab-2A na spermích pomocí protilátky 5C5 byla provedena pouze dvakrát a na malém množství oocytů. Role proteinu Rab-2A ve vazbě spermie na oocyt tak nemohla být jednoznačně potvrzena, nicméně blokace proteinu protilátkou snížila počet spermí vázajících se na oocyt.

Z výsledků této diplomové práce vyplývá, že první část stanovené hypotézy o přítomnosti proteinu Rab-2A na kančích spermích v různých stádiích jejich maturace byla potvrzena. Druhou část hypotézy předpokládající jeho roli ve vazbě na *zona pellucida* oocyty bude nutné potvrdit dalšími experimenty. Tato práce může být považována za předběžnou studii proteinu Rab-2A ve vazbě kančích spermí na ZP, avšak do budoucna bude třeba některé experimenty zopakovat a získat více podrobnějších dat, aby bylo možné podat uspokojivé závěry. Rovněž bude potřeba zaměřit se na detekci Rab-2A v extracelulárních vezikulech epididymální tekutiny a semenné plazmy.

8 Literatura

- Abdullah M, Widgren EE, O'Rand MG. 1991. A mammalian sperm lectin related to rat hepatocyte lectin-2/3. *Molecular and Cellular Biochemistry* 103(2): 155–161.
- Aizawa M, Fukuda M. 2015. Small GTPase Rab2B and its specific binding protein Golgi-associated Rab2B interactor-like 4 (GARI-L4) regulate Golgi morphology. *Journal of Biological Chemistry* 290(36): 22250–22261.
- Bae J-W, Kim S-H, Kim D-H, Ha JJ, Yi JK, Hwang S, Ryu B-Y, Pang M-G, Kwon W-S. 2019. Ras-related proteins (Rab) are key proteins related to male fertility following a unique activation mechanism. *Reproductive Biology* 19(4): 356–362.
- Bailey JL. 2010. Factors regulating sperm capacitation. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 56(5): 334–348.
- Barros C, Crosby JA, Moreno RD. 1996. Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. *Cell Biology International* 20(1): 33–39.
- Bauskin AR, Franken DR, Eberspaecher U, Donner P. 1999. Characterization of human zona pellucida glycoproteins. *Molecular Human Reproduction* 5(6): 534–540.
- Benoff S, Cooper GW, Hurley I, Napolitano B, Rosenfeld DL, Scholl GM, Hershlag A. 1993. Human sperm fertilizing potential in vitro is correlated with differential expression of a head-specific mannose-ligand receptor. *Fertility and sterility* 59(4): 854–862.
- Bhuin T, Roy JK. 2014. Rab proteins: The key regulators of intracellular vesicle transport. *Experimental Cell Research* 328(1): 1–19.
- Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 508(7497): 483–487.
- Bleil JD, Greve J M, Wassarman PM. 1988. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: Role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Developmental Biology* 128(2): 376–385.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1980. Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Developmental Biology* 76(1): 185–202.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1983. Sperm-egg interactions in the mouse: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Developmental Biology* 95(2): 317–324.
- Breitbart H, Spungin B. 1997. The biochemistry of the acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction* 3(3): 195–202.
- Brewis IA, Clayton R, Browes CE, Martin M, Barratt CL, Hornby DP, Moore HD. 1998. Tyrosine phosphorylation of a 95 kDa protein and induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by recombinant human zona pellucida glycoprotein 3. *Molecular Human Reproduction* 4(12): 1136–1144.
- Brighouse A, Dacks JB, Field MC. 2010. Rab protein evolution and the history of the eukaryotic endomembrane system. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(20): 3449–3465.
- Burkin HR, Miller DJ. 2000. Zona pellucida protein binding ability of porcine sperm during epididymal maturation and the acrosome reaction. *Developmental Biology* 222(1): 99–109.

- Burks DJ, Carballada R, Moore HD, Saling PM. 1995. Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science* 269(5220): 83–86.
- Bustos MA, Lucchesi O, Ruete MC, Mayorga LS, Tomes CN. 2012. Rab27 and Rab3 sequentially regulate human sperm dense-core granule exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(30): E2057–E2066.
- Calvete JJ, Carrera E, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1996. Boar Spermadhesins AQN-1 and AQN-3: Oligosaccharide and Zona Pellucida Binding Characteristics. *Biological Chemistry* 377(7–8): 521–528.
- Carmona E, Weerachayanukul W, Soboloff T, Fluharty AL, White D, Promdee L, Ekker M, Berger T, Buhr M, Tanphaichitr N. 2002. Arylsulfatase A Is Present on the Pig Sperm Surface and Is Involved in Sperm–Zona Pellucida Binding. *Developmental Biology* 247(1): 182–196.
- Cesari A, Katunar MR, Monclus MA, Vincenti A, de Rosas JC, Fornés MW. 2005. Serine protease activity, bovine sperm protease, 66 kDa (BSP66), is present in hamster sperm and is involved in sperm-zona interaction. *Reproduction* 129(3): 291–298.
- Chavrier P, Gorvel J-P, Stelzer E, Simons K, Gruenberg J, Zerial M. 1991. Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* 353(6346): 769–772.
- Chen L, Zhai L, Qu C, Zhang C, Li S, Wu F, Qi Y, Lu F, Xu P, Li X, Shi D. 2016. Comparative Proteomic Analysis of Buffalo Oocytes Matured in vitro Using iTRAQ Technique. *Scientific Reports* 6(1): 31795.
- Cheng A, Le T, Palacios M, Bookbinder LH, Wassarman PM, Suzuki F, Bleil JD. 1994. Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. *Journal of Cell Biology* 125(4): 867–878.
- Chiu PCN, Lam KKW, Wong RCW, Yeung WSB. 2014. The identity of zona pellucida receptor on spermatozoa: An unresolved issue in developmental biology. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 30: 86–95.
- Chiu PCN, Wong BST, Lee CL, Pang RTK, Lee K-F, Sumitro SB, Gupta SK, Yeung WSB. 2008. Native human zona pellucida glycoproteins: purification and binding properties. *Human Reproduction* 23(6): 1385–1393.
- Cohen DJ, Busso D, Da Ros V, Ellerman DA, Maldera JA, Goldweic N, Cuasnicu PS. 2004. Participation of cysteine-rich secretory proteins (CRISP) in mammalian sperm-egg interaction. *International Journal of Developmental Biology* 52(5–6): 737–742.
- Cornwall GA, Tulsiani DRP, Orgebin-Crist MC. 1991. Inhibition of the Mouse Sperm Surface α -D-Mannosidase Inhibits Sperm-Egg Binding in Vitro. *Biology of Reproduction* 44(5): 913–921.
- Culine S, Honore N, Closson V, Lang P, Bertoglio J, Laroche L, Bussel A, Racadot E, Hovnanian A, Dubertret L. 1993. A CD2+ subset of non-malignant peripheral blood lymphocytes from patients with Sézary syndromes overexpress the low-molecular-weight GTP-binding protein Rab2. *Leukemia* 7(4): 601–608.
- Dacheux JL, Dacheux F, Paquignon M. 1989. Changes in Sperm Surface Membrane and Luminal Protein Fluid Content during Epididymal Transit in the Boar. *Biology of Reproduction* 40(3): 635–651.
- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Human Reproduction* 13(suppl_1): 1–8.

- Dell A, Morris HR, Easton RL, Panico M, Patankar M, Oehninger S, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Clark GF. 1995. Structural Analysis of the Oligosaccharides Derived from Glycodelin, a Human Glycoprotein with Potent Immunosuppressive and Contraceptive Activities. *Journal of Biological Chemistry* 270(41): 24116–24126.
- Dey KK, Bharti R, Dey G, Pal I, Rajesh Y, Chavan S, Das S, Das CK, Jena BC, Halder P, Ray JG, Kulavi I, Mandal M. 2016. S100A7 has an oncogenic role in oral squamous cell carcinoma by activating p38/MAPK and RAB2A signaling pathway. *Cancer Gene Therapy* 23(11): 382–391.
- Dey KK, Pal I, Bharti R, Dey G, Kumar BNP, Rajput S, Parekh A, Parida S, Halder P, Kulavi I, Mandal M. 2015. Identification of RAB2A and PRDX1 as the potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma using mass spectrometry-based comparative proteomic approach. *Tumor Biology* 36(12): 9829–9837.
- Diekman AB, Westbrook-Case VA, Naaby-Hansen S, Klotz KL, Flickinger CJ, Herr JC. 1997. Biochemical Characterization of Sperm Agglutination Antigen-1, a Human Sperm Surface Antigen Implicated in Gamete Interactions. *Biology of Reproduction* 57(5): 1136–1144.
- Ding X, Jiang X, Tian R, Zhao P, Li L, Wang X, Chen S, Zhu Y, Mei M, Bao S, Liu W, Tang Z, Sun Q. 2019. RAB2 regulates the formation of autophagosome and autolysosome in mammalian cells. *Autophagy* 15(10): 1774–1786.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1995. Boar Spermadhesin AWN-1. *European Journal of Biochemistry* 230(1): 329–336.
- 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(4): 405–417.
- Ensslin M, Vogel T, Calvete JJ, Thole HH, Schmidtke J, Matsuda T, Töpfer-Petersen E. 1998. Molecular Cloning and Characterization of P47, a Novel Boar Sperm-Associated Zona Pellucida-Binding Protein Homologous to a Family of Mammalian Secretory Proteins. *Biology of Reproduction* 58(4): 1057–1064.
- Fawcett DW. 1975. The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology* 44(2): 394–436.
- Fayrer-Hosken RA, Caudle AB, Shur BD. 1991. Galactosyltransferase activity is restricted to the plasma membranes of equine and bovine sperm. *Molecular Reproduction and Development* 28(1): 74–78.
- Flesch FM, Voorhout WF, Colenbrander B, van Golde LMG, Gadella BM. 1998. Use of Lectins to Characterize Plasma Membrane Preparations from Boar Spermatozoa: A Novel Technique for Monitoring Membrane Purity and Quantity. *Biology of Reproduction* 59(6): 1530–1539.
- Flesch FM, Wijnand E, van de Lest CHA, Colenbrander B, van Golde LMG, Gadella BM. 2001. Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. *Molecular Reproduction and Development* 60(1): 107–115.
- Florman HM, Arnoult C, Kazam IG, Li C, O’Toole CMB. 1998. A Perspective on the Control of Mammalian Fertilization by Egg-Activated Ion Channels in Sperm: A Tale of Two Channels. *Biology of Reproduction* 59(1): 12–16.
- Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. 2008. Regulating the acrosome reaction. *The International Journal of Developmental Biology* 52(5–6): 503.
- Gillis G, Peterson R, Russell L, Hook L, Freund M. 1978. Isolation and Characterization of

- Membrane Vesicles from Human and Boar Spermatozoa: Methods Using Nitrogen Cavitation and Ionophore Induced Vesiculation. *Preparative Biochemistry* 8(5): 363–378.
- Girouard J, Frenette G, Sullivan R. 2011. Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis. *International Journal of Andrology* 34(5pt2): e475–e486.
- Gomes AQ, Ali BR, Ramalho JS, Godfrey RF, Barral DC, Hume AN, Seabra MC. 2003. Membrane Targeting of Rab GTPases Is Influenced by the Prenylation Motif. *Molecular Biology of the Cell* 14(5): 1882–1899.
- Goud B, Liu S, Storrie B. 2018. Rab proteins as major determinants of the Golgi complex structure. *Small GTPases* 9(1–2): 66–75.
- Gupta SK, Bansal P, Ganguly A, Bhandari B, Chakrabarti K. 2009. Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization. *Journal of Reproductive Immunology* 83(1): 50–55.
- Gupta SK, Bhandari B, Shrestha A, Biswal BK, Palaniappan C, Malhotra SS, Gupta N. 2012. Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell and Tissue Research* 349(3): 665–678.
- Hardy DM, Garbers DL. 1995. A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. *The Journal of Biological Chemistry* 270(44): 26025–26028.
- Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG. 1994. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Sequence* 4(6): 361–393.
- Hartmann JF, Gwatkin RBL, Hutchison CF. 1972. Early contact interactions between mammalian gametes in vitro: evidence that the vitellus influences adherence between sperm and zona pellucida. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69(10): 2767–2769.
- Hasegawa A, Koyama K, Okazaki Y, Sugimoto M, Isojima S. 1994. Amino acid sequence of a porcine zona pellucida glycoprotein ZP4 determined by peptide mapping and cDNA cloning. *Reproduction* 100(1): 245–255.
- Hedrick JL, Wardrip NJ. 1986. Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. *Analytical Biochemistry* 157(1): 63–70.
- Howes L, Jones R. 2002. Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *Journal of Reproductive Immunology* 53(1): 181–192.
- Hunnicuttt GR, Primakoff P, Myles DG. 1996. Sperm Surface Protein PH-20 is Bifunctional: One Activity is a Hyaluronidase and a Second, Distinct Activity is Required in Secondary Sperm-Zona Binding. *Biology of Reproduction* 55(1): 80–86.
- Ickowicz D, Finkelstein M, Breitbart H. 2012. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian Journal of Andrology* 14(6): 816–821.
- Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M. 2010. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *The Journal of Clinical Investigation* 120(4): 984–994.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434(7030): 234–238.

- Jankovicova J, Frolikova M, Palenikova V, Valaskova E, Cerny J, Secova P, Bartokova M, Horovska L, Manaskova-Postlerova P, Antalikova J, Komrskova K. 2020. Expression and distribution of CD151 as a partner of alpha6 integrin in male germ cells. *Scientific Reports* 10(1): 4374.
- 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(12): 4892–4896.
- Jones R, Brown CR. 1987. Identification of a zona-binding protein from boar spermatozoa as proacrosin. *Experimental Cell Research* 171(2): 503–508.
- Jones R, Brown CR, Lancaster RT. 1988. Carbohydrate-binding properties of boar sperm proacrosin and assessment of its role in sperm-egg recognition and adhesion during fertilization. *Development* 102(4): 781–792.
- Kajiho H, Kajiho Y, Frittoli E, Confalonieri S, Bertalot G, Viale G, Di Fiore PP, Oldani A, Garre M, Beznoussenko GV, Palamidessi A, Vecchi M, Chavrier P, Perez F, Scita G. 2016. RAB2A controls MT1-MMP endocytic and E-cadherin polarized Golgi trafficking to promote invasive breast cancer programs. *EMBO Reports* 17(7): 1061–1080.
- Kelsey KM, Zigo M, Thompson WE, Kerns K, Manandhar G, Sutovsky M, Sutovsky P. 2020. Reciprocal surface expression of arylsulfatase A and ubiquitin in normal and defective mammalian spermatozoa. *Cell and Tissue Research* 379(3): 561–576.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. 2003. Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Molecular Biology of the Cell* 14(11): 4628–4640.
- Kongmanas K, Kruevaisayawan H, Saewu A, Sugeng C, Fernandes J, Souda P, Angel JB, Faull KF, Aitken RJ, Whitelegge J, Hardy D, Berger T, Baker MA, Tanphaichitr N. 2015. Proteomic Characterization of Pig Sperm Anterior Head Plasma Membrane Reveals Roles of Acrosomal Proteins in ZP3 Binding. *Journal of Cellular Physiology* 230(2): 449–463.
- Koyama K, Hasegawa A, Isojima S. 1991. Further characterization of the porcine zona pellucida antigen corresponding to monoclonal antibody 3A4-2G1 exclusively cross-reactive with porcine and human zonae pellucidae. *Journal of Reproductive Immunology* 19(2): 131–148.
- Kwon WS, Rahman MS, Lee JS, Kim J, Yoon S-J, Park Y-J, You Y-A, Hwang S, Pang M-G. 2014. A comprehensive proteomic approach to identifying capacitation related proteins in boar spermatozoa. *BMC Genomics* 15(1): 897.
- Kwon WS, Rahman MS, Lee JS, Yoon S-J, Park Y-J, Pang M-G. 2015a. Discovery of predictive biomarkers for litter size in boar spermatozoa. *Molecular & Cellular Proteomics* 14(5): 1230–1240.
- Kwon WS, Rahman MS, Ryu D-Y, Park Y-J, Pang M-G. 2015b. Increased male fertility using fertility-related biomarkers. *Scientific Reports* 5(1): 15654.
- Kwon WS, Rahman MS, Ryu D-Y, Khatun A, Pang M-G. 2017. Comparison of markers predicting litter size in different pig breeds. *Andrology* 5(3): 568–577.
- Leahy T, Rickard JP, Pini T, Gadella BM, de Graaf SP. 2020. Quantitative Proteomic Analysis of Seminal Plasma, Sperm Membrane Proteins, and Seminal Extracellular Vesicles Suggests Vesicular Mechanisms Aid in the Removal and Addition of Proteins to the Ram Sperm Membrane. *Proteomics* 20(12): 1900289.

- Lefièvre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton B, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, Barratt CLR. 2004. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reproduction* 19(7): 1580–1586.
- Leyton L, Saling P. 1989. 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 57(7): 1123–1130.
- Li J, Liu B, Chen C, Cui Y, Shang L, Zhang Y, Wang C, Zhang X, He Q, Zhang W, Bi W, Jiang T. 2015. RAB2A Polymorphism impacts prefrontal morphology, functional connectivity, and working memory. *Human Brain Mapping* 36(11): 4372–4382.
- Lin Y-H, Lin Y-M, Kuo Y-C, Wang Y-Y, Kuo P-L. 2011. Identification and characterization of a novel Rab GTPase-activating protein in spermatids. *International Journal of Andrology* 34(5pt2): e358–e367.
- Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P. 1994. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *Journal of Cell Biology* 125(5): 1157–1163.
- Lindemann CB, Lesich KA. 2016. Functional anatomy of the mammalian sperm flagellum. *Cytoskeleton* 73(11): 652–669.
- Liu S, Storrie B. 2012. Are Rab proteins the link between Golgi organization and membrane trafficking? *Cellular and Molecular Life Sciences* 69(24): 4093–4106.
- 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(20): 4121–4131.
- Luo M-L, Gong C, Chen C-H, Hu H, Huang P, Zheng M, Yao Y, Wei S, Wulf G, Lieberman J, Zhou XZ, Song E, Lu KP. 2015. The Rab2A GTPase Promotes Breast Cancer Stem Cells and Tumorigenesis via Erk Signaling Activation. *Cell Reports* 11(1): 111–124.
- Macek MB, Lopez LC, Shur BD. 1991. Aggregation of β -1,4-galactosyltransferase on mouse sperm induces the acrosome reaction. *Developmental Biology* 147(2): 440–444.
- Maňásková P, Pěkníková J, Elzeinová F, Tichá M, Jonáková V. 2007. Origin, localization and binding abilities of boar DQH sperm surface protein tested by specific monoclonal antibodies. *Journal of Reproductive Immunology* 74(1): 103–113.
- Maňásková-Postlerová P, Pohlová A, Zigo M, Jonáková V, Jankovičová J, Antalíková J, Dvořáková-Hortová K. 2018. Sperm surface proteins as potential binding receptors for zona pellucida. *The International Symposium on Spermatology, Karolinska University Hospital in Stockholm, Sweden.*
- Matsunaga K, Taoka M, Isobe T, Izumi T. 2017. Rab2a and Rab27a cooperatively regulate the transition from granule maturation to exocytosis through the dual effector Noc2. *Journal of Cell Science* 130(3): 541–550.
- Mattioli M, Lucidi P, Barboni B. (1998). Expanded cumuli induce acrosome reaction in boar sperm. *Molecular Reproduction and Development* 51(4): 445–453.
- Meizel S, Turner KO, Nuccitelli R. 1997. Progesterone Triggers a Wave of Increased Free Calcium during the Human Sperm Acrosome Reaction. *Developmental Biology* 182(1): 67–75.
- Montfort L, Frenette G, Sullivan R. 2002. Sperm–zona pellucida interaction involves a carbonyl reductase activity in the hamster. *Molecular Reproduction and Development* 61(1): 113–119.

- Mori E, Baba T, Iwamatsu A, Mori T. 1993. Purification and Characterization of a 38-kDa Protein, sp38, with Zona Pellucida-Binding Property from Porcine Epididymal Sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 196(1): 196–202.
- Mori E, Kashiwabara S, Baba T, Inagaki Y, Mori T. 1995. Amino acid sequences of porcine Sp38 and proacrosin required for binding to the zona pellucida. *Developmental Biology* 168(2): 575–583.
- Mori E, Mori T, Takasaki S. 1997. Binding of Mouse Sperm to β -Galactose Residues on Egg Zona Pellucida and Asialofetuin-Coupled Beads. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 238(1): 95–99.
- Mountjoy JR, Xu W, McLeod D, Hyndman D, Oko R. 2008. RAB2A: A Major Subacrosomal Protein of Bovine Spermatozoa Implicated in Acrosomal Biogenesis. *Biology of Reproduction* 79(2): 223–232.
- Nakano M, Yonezawa N. 2001. Localization of sperm ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins. *Cells Tissues Organs* 168(1–2): 65–75.
- Nixon B, Bielanowicz A, Mclaughlin EA, Tanphaichitr N, Ensslin MA, Aitken RJ. 2009. Composition and significance of detergent resistant membranes in mouse spermatozoa. *Journal of Cellular Physiology* 218(1): 122–134.
- Noguchi S, Hatanaka Y, Tobita T, Nakano M. 1992. Structural analysis of the N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (PZP3) from porcine zona pellucida. *European Journal of Biochemistry* 204(3): 1089–1100.
- Oko R, Maravei D. 1994. Protein Composition of the Perinuclear Theca of Bull Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 50(5): 1000–1014.
- Oko R, Sutovsky P. 2009. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *Journal of Reproductive Immunology* 83(1): 2–7.
- Orwick-Rydmark M, Arnold T, Linke D. 2016. The Use of Detergents to Purify Membrane Proteins. *Current Protocols in Protein Science* 84(1): 4.8.1–4.8.35.
- Pereira-Leal JB, Seabra MC. 2000. The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *Journal of Molecular Biology* 301(4): 1077–1087.
- Pesch S, Bergmann M. 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* 37(7): 597–612.
- Peterson RN, Hunt WP. 1989. Identification, isolation, and properties of a plasma membrane protein involved in the adhesion of boar sperm to the porcine zona pellucida. *Gamete Research* 23(1): 103–118.
- Primakoff P, Hyatt H, Myles DG. 1985. A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *Journal of Cell Biology* 101(6): 2239–2244.
- Primakoff P, Myles DG. 2002. Penetration, Adhesion, and Fusion in Mammalian Sperm-Egg Interaction. *Science* 296(5576): 2183–185.
- Puigmulé M, Fàbrega A, Yeste M, Bonet S, Pinart E. 2011. Study of the proacrosin–acrosin system in epididymal, ejaculated and in vitro capacitated boar spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development* 23(7): 837–845.
- Rahman MS, Kwon W-S, Pang M-G. 2017. Prediction of male fertility using capacitation-

- associated proteins in spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 84(9): 749–759.
- Ram PA, Cardullo RA, Millette CF. 1989. Expression and topographical localization of cell surface fucosyltransferase activity during epididymal sperm maturation in the mouse. *Gamete Research* 22(3): 321–332.
- Ramalho-Santos J, Moreno RD, Wessel GM, Chan EKL, Schatten G. 2001. Membrane Trafficking Machinery Components Associated with the Mammalian Acrosome during Spermiogenesis. *Experimental Cell Research* 267(1): 45–60.
- Rebeiz M, Miller DJ. 1999. Porcine sperm surface β 1,4Galactosyltransferase binds to the zona pellucida but is not necessary or sufficient to mediate sperm–zona pellucida binding. *Molecular Reproduction and Development* 54(4): 379–387.
- Redgrove KA, Aitken RJ, Nixon B. 2012. More than a simple lock and key mechanism: unraveling the intricacies of sperm–zona pellucida binding. *Binding Protein*. Rijeka: InTech: 73–122.
- Richardson RT, Yamasaki N, O’Rand MG. 1994. Sequence of a Rabbit Sperm Zona Pellucida Binding Protein and Localization during the Acrosome Reaction. *Developmental Biology* 165(2): 688–701.
- Roldan ER, Murase T, Shi QX. 1994. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 266(5190): 1578–1581.
- Sacco AG, Yurewicz EC, Subramanian MG, Matzat PD. 1989. Porcine Zona Pellucida: Association of Sperm Receptor Activity with the α -Glycoprotein Component of the Mr = 55,000 Family. *Biology of Reproduction* 41(3): 523–532.
- Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Society of Reproduction and Fertility Supplement* 65: 245.
- Sharma M, Kumar A. 2017. *The Sperm BT - Basics of Human Andrology: A Textbook*. Singapore: Springer Singapore: 171–204.
- Shur BD, Hall NG. 1982. A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *Journal of Cell Biology* 95(2): 574–579.
- Simpson RJ, Jensen SS, Lim JWE. 2008. Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. *Proteomics* 8(19): 4083–4099.
- Sinowatz F, Amselgruber W, Töpfer-Petersen E, Totzauer I, Calvete J, Plendl J. 1995. Immunocytochemical characterization of porcine zona pellucida during follicular development. *Anatomy and Embryology* 191(1): 41–46.
- Sinowatz F, Töpfer-Petersen E, Kölle S, Palma G. (2001). Functional Morphology of the Zona Pellucida. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 30(5): 257–263.
- Song X, Li F, Cao G, Zhang J, Han Y. 2007. Distribution of α -D-mannose residues on zona pellucida and their role(s) in fertilization in pigs. *Science in China Series C: Life Sciences* 50(2): 170–177.
- Stenmark H, Olkkonen VM. 2001. The Rab GTPase family. *Genome Biology* 2(5): 1–7.
- Suarez SS. 2016. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell and Tissue Research* 363(1): 185–194.
- Suarez SS, Ho H-C. 2003. Hyperactivated Motility in Sperm. *Reproduction in Domestic*

- Animals 38(2): 119–124.
- Sugawara T, Kano F, Murata M. 2014. Rab2A is a pivotal switch protein that promotes either secretion or ER-associated degradation of (pro)insulin in insulin-secreting cells. *Scientific Reports* 4(1): 1–14.
- Sumakovic M, Hegermann J, Luo L, Husson SJ, Schwarze K, Olendrowitz C, Schoofs L, Richmond J, Eimer S. 2009. UNC-108/RAB-2 and its effector RIC-19 are involved in dense core vesicle maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Cell Biology* 186(6): 897–914.
- Sutovsky P, Manandhar G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*: 1–30.
- Takata A, Ionita-Laza I, Gogos JA, Xu B, Karayiorgou M. 2016. De Novo Synonymous Mutations in Regulatory Elements Contribute to the Genetic Etiology of Autism and Schizophrenia. *Neuron* 89(5): 940–947.
- Tanphaichitr N, Carmona E, Bou Khalil M, Xu H, Berger T, Gerton GL. 2007. New insights into sperm-zona pellucida interaction: involvement of sperm lipid rafts. *Frontiers in Bioscience* 12: 1748–1766.
- Tanphaichitr N, Kongmanas K, Kruevaisayawan H, Saewu A, Sugeng C, Fernandes J, Souda P, Angel JB, Faull KF, Aitken RJ, Whitelegge J, Hardy D, Berger T, Baker M. 2015. Remodeling of the plasma membrane in preparation for sperm–egg recognition: roles of acrosomal proteins. *Asian Journal of Andrology* 17(4): 574–582.
- Tanphaichitr N, Smith J, Mongkolsirikieart S, Gradil C, Lingwood CA. 1993. Role of a Gamete-Specific Sulfoglycolipid Immobilizing Protein on Mouse Sperm-Egg Binding. *Developmental Biology* 156(1): 164–175.
- Tantibhedhyangkul J, Weerachayanukul W, Carmona E, Xu H, Anupriwan A, Michaud D, Tanphaichitr N. 2002. Role of Sperm Surface Arylsulfatase A in Mouse Sperm-Zona Pellucida Binding. *Biology of Reproduction* 67(1): 212–219.
- Tao J, Critser ES, Critser JK. 1993. Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. *Molecular Reproduction and Development* 36(2): 183–194.
- Tardif S, Wilson MD, Wagner R, Hunt P, Gertsenstein M, Nagy A, Lobe C, Koop BF, Hardy DM. 2010. Zonadhesin Is Essential for Species Specificity of Sperm Adhesion to the Egg Zona Pellucida. *Journal of Biological Chemistry* 285(32): 24863–24870.
- Taya T, Yamasaki N, Tsubamoto H, Hasegawa A, Koyama K. 1995. Cloning of a cDNA Coding for Porcine Zona Pellucida Glycoprotein ZP1 and Its Genomic Organization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 207(2): 790–799.
- Tengowski MW, Wassler MJ, Shur BD, Schatten G. 2001. Subcellular localization of β 1,4-galactosyltransferase on bull sperm and its function during sperm–egg interactions. *Molecular Reproduction and Development* 58(2): 236–244.
- Tesařík J, Drahorád J, Pěkníková J. 1988. Subcellular immunochemical localization of acrosin in human spermatozoa during the acrosome reaction and zona pellucida penetration. *Fertility and Sterility* 50(1): 133–141.
- Tesarik J, Drahorad J, Testart J, Mendoza C. 1990. Acrosin activation follows its surface exposure and precedes membrane fusion in human sperm acrosome reaction. *Development* 110(2): 391–400.

- Tisdale EJ, Bourne JR, Khosravi-Far R, Der CJ, Balch WE. 1992. GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Journal of Cell Biology* 119(4): 749–761.
- Töpfer-Petersen E. 1999. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Human Reproduction Update* 5(4): 314–329.
- Töpfer-Petersen E, Calvete JJ. 1995. Molecular mechanisms of the interaction between sperm and the zona pellucida in mammals: studies on the pig. *International Journal of Andrology* 18: 20–26.
- Töpfer-Petersen E, Henschen A. 1987. Acrosin shows zona and fucose binding, novel properties for a serine proteinase. *FEBS Letters* 226(1): 38–42.
- Töpfer-Petersen E, Mann K, Calvete JJ. 1993. Identification of Porcine Oocyte 55 kDa α and β Proteins within the Zona Pellucida Glycoprotein Families Indicates that Oocyte Sperm Receptor Activity is Associated with Different Zona Pellucida Proteins in Different Mammalian Species. *Biological Chemistry* 374(7): 411–417.
- Töpfer-Petersen E, Wagner A, Friedrich J, Petrunkina A, Ekhlesi-Hundrieser M, Waberski D, Drommer W. 2002. Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *Journal of Experimental Zoology* 292(2): 210–215.
- Töpfer-Petersen F, Friess AE, Nguyen H, Schill W-B. 1985. Evidence for a fucose-binding protein in boar spermatozoa. *Histochemistry* 83(2): 139–145.
- Topper EK, Kruijt L, Calvete J, Mann K, Töpfer-Petersen E, Woelders H. 1997. Identification of bovine zona pellucida glycoproteins. *Molecular Reproduction and Development* 46(3): 344–350.
- Tumova L, Zigo M, Sutovsky P, Sedmikova M, Postlerova P. 2021. Ligands and Receptors Involved in the Sperm-Zona Pellucida Interactions in Mammals. *Cells* 10(1): 133.
- Utleg AG, Yi EC, Xie T, Shannon P, White JT, Goodlett DR, Hood L, Lin B. 2003. Proteomic analysis of human prostasomes. *The Prostate* 56(2): 150–161.
- van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Brouwers JF, Gadella BM. 2007. Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *Molecular Human Reproduction* 13(7): 445–454.
- Van Soom A, Tanghe S, De Pauw I, Maes D, De Kruif A. 2002. Function of the Cumulus Oophorus Before and During Mammalian Fertilization. *Reproduction in Domestic Animals* 37(3): 144–151.
- Visconti PE. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(3): 667–668.
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning X, Fornes M, Kopf GS. 1998. The molecular basis of sperm capacitation. *Journal of Andrology* 19(2): 242–248.
- Ward WS, Coffey DS. 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction* 44(4): 569–574.
- Wassarman PM. 1988. Zona Pellucida Glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry* 57(1): 415–442.
- Wassarman PM. 2005. Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *Journal of Cellular Physiology* 204(2): 388–391.
- Wassarman PM, Mortillo S. 1991. Structure of the Mouse Egg Extracellular Coat, the Zona

- Pellucida. *International review of cytology* 130: 85–110.
- White D, Weerachayanukul W, Gadella B, Kamolvarin N, Attar M, Tanphaichitr N. 2000. Role of Sperm Sulfogalactosylglycerolipid in Mouse Sperm-Zona Pellucida Binding. *Biology of Reproduction* 63(1): 147–155.
- Witte TS, Schäfer-Somi S. 2007. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 102(3): 181–193.
- Yi Y, Manandhar G, Oko RJ, Breed WG, Sutovsky P. 2007. Mechanism of sperm-zona pellucida penetration during mammalian fertilization: 26S proteasome as a candidate egg coat lysin. *Society of Reproduction and Fertility Supplement* 63: 385.
- Yonezawa N, Amari S, Takahashi K, Ikeda K, Imai FL, Kanai S, Kikuchi K, Nakano M. 2005. Participation of the nonreducing terminal β -galactosyl residues of the neutral N-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Molecular Reproduction and Development* 70(2): 222–227.
- Yunes R, Michaut M, Tomes C, Mayorga LS. 2000. Rab3A Triggers the Acrosome Reaction in Permeabilized Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 62(4): 1084–1089.
- Yurewicz EC, Pack BA, Armant DR, Sacco AG. 1993. Porcine zona pellucida ZP3 α glycoprotein mediates binding of the biotin-labeled Mr 55,000 family (ZP3) to boar sperm membrane vesicles. *Molecular Reproduction and Development* 36(3): 382–389.
- Yurewicz EC, Pack BA, Sacco AG. 1991. Isolation, composition, and biological activity of sugar chains of porcine oocyte zona pellucida 55K glycoproteins. *Molecular Reproduction and Development* 30(2): 126–134.
- Yurewicz EC, Sacco AG, Gupta SK, Xu N, Gage DA. 1998. Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *Journal of Biological Chemistry* 273(13): 7488–7494.
- Zerial M, McBride H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2(2): 107–117.
- Zhao Y, Zhang W, Kho Y, Zhao Y. 2004. Proteomic Analysis of Integral Plasma Membrane Proteins. *Analytical Chemistry* 76(7): 1817–1823.
- Zigo M, Dorosh A, Pohlová A, Jonáková V, Šulc M, Maňásková-Postlerová P. 2015. Panel of monoclonal antibodies to sperm surface proteins as a tool for monitoring localization and identification of sperm-zona pellucida receptors. *Cell and Tissue Research* 359(3): 895–908.
- Zigo M, Jonáková V, Šulc M, Maňásková-Postlerová P. 2013. Characterization of sperm surface protein patterns of ejaculated and capacitated boar sperm, with the detection of ZP binding candidates. *International Journal of Biological Macromolecules* 61: 322–328.
- Zimmerman SW, Manandhar G, Yi Y-J, Gupta SK, Sutovsky M, Odhiambo JF, Powell MD, Miller DJ, Sutovsky P. 2011. Sperm Proteasomes Degrade Sperm Receptor on the Egg Zona Pellucida during Mammalian Fertilization. *PLoS ONE* 6(2): e17256.
- Zitta K, Wertheimer EV, Miranda PV. 2006. Sperm N-acetylglucosaminidase is involved in primary binding to the zona pellucida. *Molecular Human Reproduction* 12(9): 557–563.
- Online zdroje:
- UniprotKB. 2002. RAB2A - Ras-related protein Rab-2A - Homo sapiens (Human) - RAB2A

gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 10.04.2021]. Dostupné z:
<https://www.uniprot.org/uniprot/P61019>