

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Detekce N-acetylglukosaminových struktur zony *pellucidy*  
oocytů prasete**

**Diplomová práce**

**Bc. Veronika Zárubová  
Reprodukční biotechnologie**

**Mgr. Ing. Tereza Krejčová, Ph.D.**



## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Detekce N-acetylglukosaminových struktur *zony pellucidy* oocytů prasete" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19.4.2024

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucí mé diplomové práce Mgr. Ing. Tereze Krejčové, Ph.D. za její odbornou pomoc při vypracovávání teoretické i praktické části mé diplomové práce. Také děkuji za její trpělivost a čas věnovaný na naši přípravu pro budoucí povolání. Velké díky patří i mé rodině a příteli za nekonečnou podporu během celého mého studia.

# Detekce N-acetylglukosaminových struktur zony *pellucidy* oocytů prasete

## Souhrn

*Zona pellucida* (ZP) je extracelulární matrice, která u savců obklopuje samičí pohlavní buňku. Tento obal vajíčka je tvořen komplexní sítí glykoproteinů, které mají specifické vlastnosti i funkce. *Zona pellucida* je důležitá nejenom pro ochranu vajíčka, ale hraje klíčovou roli i v procesu oplození. U prasat se skládá ze třech glykoproteinů (ZP2, ZP3, ZP4). Tyto glykoproteiny jsou během meiotického zrání bohatě posttranslačně modifikovány. Dochází k jejich glykosylaci, sializaci a sulfataci, což je ve svém důsledku důležité pro interakci zony *pellucidy* a spermie. Právě specifita složení sacharidových struktur a povrchových proteinů hraje důležitou roli pro rozpoznání gamet, spuštění akrozomální reakce spermie a specifické vazbě spermie na vajíčko. Hlavním cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, že lze detekovat pomocí lektinů specifické N-acetylglukosaminové struktury na *zoně pellucidě* během meiotického zrání prasečích oocytů, a také, že dochází během meiotického zrání k redistribuci těchto sacharidových struktur. Pro ověření dané hypotézy byly provedeny experimenty využívající imunofluorescenční detekci N-acetylglukosaminových struktur pomocí specifických lektinů WGA (Wheat Germ Agglutinin) a sWGA (Succinylated Wheat Germ Agglutinin). Lektin WGA se specificky váže na N-acetylglukosaminové struktury, a také na struktury sialové kyseliny. Lektin sWGA se specificky váže na koncové N-acetylglukosaminové struktury v různých typech vazeb.

Z výsledků experimentů této diplomové práce vyplývá, že během meiotického zrání oocytů u prasat dochází na *zoně pellucidě* k redistribuci N-acetylglukosaminových struktur. U WGA byl statisticky významný rozdíl v intenzitě signálu pozorován mezi oocyty ve stádiu MI a MII, kdy docházelo ke statisticky významnému poklesu relativní intenzity signálu při přechodu oocytů ze stádia z MI do stádia MII. U sWGA byl pozorován statisticky významný rozdíl v relativní intenzitě signálu mezi oocyty ve stádiu MI a MII, kdy opět docházelo k poklesu relativní intenzity signálu, i mezi oocyty ve stádiu GV a MII. N-acetylglukosaminové struktury by mohly být klíčové pro zajištění specifity rozpoznání gamet a vazbě spermie na vajíčko. Pro potvrzení této hypotézy je však potřeba realizovat další experimenty.

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

# Detection of N-acetylglucosamine structures of the porcine oocyte *zona pellucida*

## Summary

*Zona pellucida* (ZP) is the extracellular matrix that surrounds the female sex cell in mammals. This egg envelope is composed of a complex network of glycoproteins that have specific properties and functions. *Zona pellucida* is not only important for the protection of the egg, but also plays a key role in the fertilization process. In pigs it consists of three glycoproteins (ZP2, ZP3, ZP4). During meiotic maturation these glycoproteins are abundantly post-translationally modified. They undergo glycosylation, sialylation and sulphation, which is important for the interaction of *zona pellucida* and sperm. It is the specificity of the composition of carbohydrate structures and surface proteins that plays an important role in gamete recognition, triggering the sperm acrosomal reaction and specific sperm-egg binding. The main objective of this thesis was to test the hypothesis that lectin-specific N-acetylglucosamine structures can be detected at *zona pellucida* during meiotic maturation of porcine oocytes, and that during meiotic maturation redistribution of these carbohydrate structures occurs. In order to test this hypothesis, experiments were performed using immunofluorescence detection of N-acetylglucosamine structures using specific lectins WGA (Wheat Germ Agglutinin) and sWGA (Succinylated Wheat Germ Agglutinin). WGA lectin specifically binds to N-acetylglucosamine structures, and also to sialic acid structures. Lectin sWGA specifically binds to N-terminal acetylglucosamine structures in various types of linkages.

The experimental results of this thesis show that during meiotic maturation of porcine oocytes, redistribution of N-acetylglucosamine structures occurs at *zona pellucida*. In WGA, a statistically significant difference in signal intensity was observed between oocytes at the MI and MII stages, with a statistically significant decrease in relative signal intensity as oocytes transitioned from the MI to the MII stage. For sWGA, a statistically significant difference in relative signal intensity was observed between oocytes in the MI and MII stage, where again there was a decrease in relative signal intensity, and between oocytes in the GV and MII stage. The N-acetylglucosamine structures could be crucial for ensuring the specificity of gamete recognition and sperm-egg binding. However, further experiments are needed to confirm this hypothesis.

**Keywords:** lectins, oocyte, pig, *zona pellucida*

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>2</b>
<b>3 Literární rešerše .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Oogeneze .....</b>	<b>3</b>
3.1.1 Fáze proliferační .....	3
3.1.2 Fáze růstu .....	4
3.1.3 Fáze zrání .....	4
3.1.4 Cytoplazmatické a jaderné zrání .....	5
<b>3.2 Zona pellucida .....</b>	<b>7</b>
3.2.1 Funkce zony pellucidy .....	7
3.2.2 Stavba zony pellucidy .....	8
3.2.2.1 Vznik ZP .....	9
3.2.2.2 Struktura ZP glykoproteinů .....	10
3.2.2.3 ZP1 .....	11
3.2.2.4 ZP2 .....	11
3.2.2.5 ZP3 .....	11
3.2.2.6 ZP4 .....	12
3.2.2.7 Zona pellucida a vazba spermie .....	12
3.2.2.8 Zona pellucida u prasnic .....	13
<b>3.3 Glykosylace .....</b>	<b>14</b>
3.3.1 Glykosylace zony pellucidy .....	14
3.3.2 Glykosylace zony pellucidy u prasat .....	15
<b>3.4 Lektiny .....</b>	<b>17</b>
3.4.1 Význam lektinů .....	17
3.4.2 Využití lektinů .....	17
3.4.3 Struktura .....	18
3.4.4 Dělení lektinů .....	19
3.4.4.1 Rostlinné lektiny .....	19
3.4.4.2 Bakteriální a virové lektiny .....	20
3.4.4.3 Lektiny z hub .....	20
3.4.4.4 Lektiny z mořských řas .....	21

3.4.4.5	Živočišné lektiny .....	21
3.4.4.6	Rozdělení lektinů podle specifity k monosacharidům .....	24
3.4.5	WGA a sWGA .....	25
<b>4</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>26</b>
4.1	Odběr vaječníků a oocytů.....	26
4.2	Výběr oocytů.....	26
4.3	Kultivace <i>in vitro</i> .....	26
4.4	Fixace oocytů .....	26
4.5	Barvení a inkubace oocytů .....	26
4.6	Vyhodnocení .....	27
4.7	Experimentální schéma .....	28
4.7.1	Imunofluorescenční detekce N-acetylglukosaminových struktur <i>zony pellucidy</i> pomocí lektinu WGA během meiotického zrání prasečích oocytů .....	28
4.7.2	Imunofluorescenční detekce N-acetylglukosaminových struktur <i>zony pellucidy</i> pomocí lektinu sWGA během meiotického zrání prasečích oocytů .....	28
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>29</b>
5.1	Imunofluorescenční detekce N-acetylglukosaminových struktur <i>zony pellucidy</i> pomocí lektinu WGA během meiotického zrání prasečích oocytů .....	29
5.2	Imunofluorescenční detekce N-acetylglukosaminových struktur <i>zony pellucidy</i> pomocí lektinu sWGA během meiotického zrání prasečích oocytů .....	32
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>38</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>39</b>



# 1 Úvod

*Zona pellucida* hraje u savců klíčovou roli v procesu oplodnění. Představuje matici tvořenou glykoproteiny (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4). Zastoupení jednotlivých glykoproteinů se u různých druhů zvířat liší (Gupta et al. 2007). U prasat není glykoprotein ZP1 exprimován (Goudet et al. 2008). Tyto glykoproteiny jsou uspořádány do sítě a umožňují spermii prostupovat dále do vajíčka. Zároveň také chrání oocyt a embryo během časně embryogeneze před případným poškozením (Wassarman & Litscher 2018). Po proniknutí první spermie do vajíčka působí *zona pellucida* jako obrana proti oplodnění dalšími spermii. Změní se totiž struktura *zóny pellucidy* a zabrání se tak polyspermii a případné polyploidizaci genetické informace (Fahrenkamp et al. 2020). Struktura *zóny pellucidy* se mění i během meiotického zrání oocytů, například u nezralých oocytů jsou jednotlivá vlákna glykoproteinů uspořádána ve větší vzdálenosti od sebe a povrch *zóny pellucidy* má výrazně porézní charakter. Během meiotického zrání už póry nejsou tak hluboké a síťovitá struktura se zahušťuje (Suzuki et al. 1994). Tento obal má zásadní vliv na úspěšnou interakci mezi spermii a vajíčkem. Studium struktury a funkce glykoproteinů ZP je tedy klíčové pro pochopení mechanismů oplodnění (Yanagimachi 1994; Jovine et al. 2007). Pochopení vazby spermie na *zonu pellucidu* je důležité i pro případnou diagnostiku a následnou terapii neplodnosti a dalšího směřování asistované reprodukce (Tumova et al. 2021).

Během meiotického zrání dochází ke glykosylaci, sializaci a sulfataci jednotlivých glykoproteinů *zóny pellucidy*, což je ve svém důsledku důležité pro interakci *zóny pellucidy* a spermie. Právě specifita složení sacharidových struktur a povrchových proteinů hraje důležitou roli pro rozpoznání gamet, spuštění akrozomální reakce spermie a specifickou vazbu spermie na vajíčko. Proteiny, které jsou schopné specificky vázat sacharidy, jsou důležitým nástrojem pro další výzkum struktury a funkce glykanů. Schopnost lektinů vázat se na sacharidy s vysokou specifitou umožňuje vytváření glykokonjugovaných komplexů a ovlivňuje mnoho biologických procesů (Mishra et al. 2019). Jsou významné pro buněčný vývoj, migraci buněk, imunitu, endocytózu, fagocytózu i proces oplození (Sharon & Lis 1990). Tato diplomová práce se zaměřuje na ověření hypotézy, že u prasečích oocytů dochází na *zoně pellucidě* během meiotického zrání ke změně distribuce N-acetylglukosaminových struktur. Tato hypotéza bude ověřována pomocí imunofluorescenčně značených lektinů WGA a sWGA se specifickou vazbou.

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

Diplomová práce se zaměřuje na ověření hypotézy, že během meiotického zrání prasečích oocytů dochází na *zoně pellucidě* k redistribuci N-acetylglukosaminových struktur. Cílem této práce je potvrdit tuto hypotézu pomocí imunofluorescenčního značení specifickými lektiny WGA a sWGA v různých stádiích meiotického zrání prasečích oocytů.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Oogeneze

Oogeneze či také ovogeneze je děj, při kterém dochází ke vzniku zralé samičí pohlavní buňky neboli vajíčka. Pohlavní buňka samic, také označovaná jako oocyt vzniká už během fetálního vývoje budoucí samice (Wassarman 1988). Postupně v průběhu embryonálního vývoje u samice dochází k apoptóze některých zárodečných buněk (programované buněčné smrti). Počet zaniklých buněk i doba apoptózy se může u jednotlivých druhů lišit (Kaur & Kurokawa 2023). Výrazně menší počet samičích zárodečných buněk se dále vyvíjí a podléhá dalším morfogenetickým změnám. Výsledkem tohoto procesu je zralá samičí pohlavní buňka. Oogeneze tedy končí vznikem oocytu, který je schopný oplození samčí pohlavní buňkou a následného vzniku nového jedince (Wassarman 1988; Limback & Albertini 2013).

#### 3.1.1 Fáze proliferační

Vývoj samičích pohlavních buněk zahrnuje několik vývojových fází. První fází oogeneze je fáze množení. Ve vaječnicích neboli ovarích plodu jsou počátečními buňkami primordiální zárodečné buňky (primordial germ cells). Tyto buňky mají velikost přibližně 12  $\mu\text{m}$  a pocházejí z endodermálního žloutkového váčku (Wassarman 1988). PGCs, které ztratily schopnost migrace se nazývají oogonie (Siracusa 1985). Tyto buňky mají ještě diploidní počet chromozomů, tak jako ostatní somatické buňky. Dochází u nich k výraznému mitotickému dělení a jejich počet se během embryonálního vývoje výrazně zvyšuje. Následně jejich mitotická aktivita klesá a snižuje se i jejich počet důsledkem programované buněčné smrti. Některé zdroje uvádějí, že apoptóze podlehne i více než dvě třetiny zárodečných buněk. Tato buněčná smrt zárodečných buněk probíhá u lidí ještě před narozením, u myši i pár dní po narození (Baker 1963; Pepling & Spradling 2001). U prasnic se v období embryonálního vývoje od 50. dne od oplození do necelého roku po narození snižuje počet zárodečných buněk dokonce až o 70 % (Guthrie & Garrett 1993). Při narození prasnice je tedy ve vaječniku přítomno přibližně 500 000 oogonií (Black & Erickson 1968).

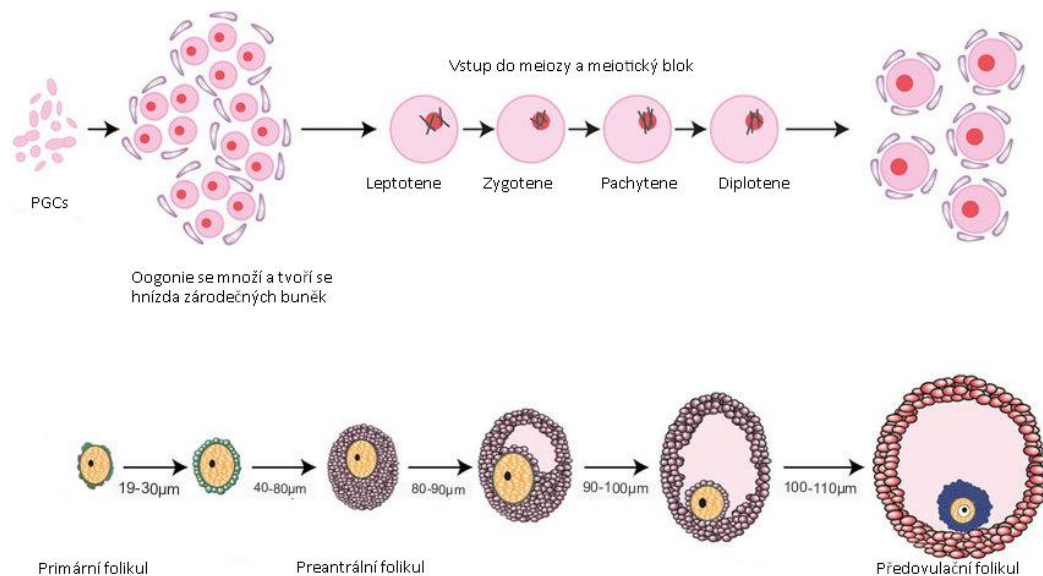
Dříve se předpokládalo, že se během života plodu u samic savců ztrácí schopnost obnovy zárodečných buněk. Znamenalo by to, že ve vaječnicích při narození existuje pevná rezerva oocytů. Později však bylo zjištěno, že může docházet k proliferaci těchto buněk i v postnatálním období (Johnson et al. 2004).

### 3.1.2 Fáze růstu

Během růstové fáze dochází u oogonií k obklopení folikulárními buňkami (Vanderhyden 2002). Významné změny probíhají i ve vnitřní struktuře oocytu. Tyto změny se týkají molekul důležitých pro metabolismus. Také se významně zvyšuje počet ribozomů, mitochondrií i dalších organel. Jádro má kondenzovaný chromatin a dochází k intenzivní syntéze RNA a proteinů. Vytvářejí se kortikální granula a glykoproteiny se začínají ukládat do matrix *zóny pellucidy* (Wassarman 1988). Následně dochází k profázi prvního meiotického dělení. V tomto stádiu nazýváme buňku primárním oocytem (Pinkerton et al. 1961). Tento typ dělení tzv. meióza probíhá jen u pohlavních buněk. U redukčního dělení na rozdíl od mitózy probíhají dvě fáze – první meiotické dělení a druhé meiotické dělení. Dalším rozdílem meiotického dělení je replikace DNA (deoxyribonukleové kyseliny). Replikace DNA probíhá totiž pouze před prvním meiotickým dělením. Mezi prvním meiotickým dělením a druhým meiotickým dělením tedy replikace DNA neprobíhá. Po redukčním dělení vzniknou tedy buňky s haploidním počtem chromozomů (Hunt & Hassold 2008). Cílem celého procesu oogeneze je totiž vznik samičí pohlavní buňky s haploidním počtem chromozomů. Poloviční počet chromozomů ve vajíčku je velmi důležitý kvůli pozdějšímu splynutí se spermii, a tudíž obnovení původního počtu chromozomů pro vznik nového jedince. Po dosažení stádia diplotene profáze prvního redukčního dělení se proces zastavuje (Pollard et al. 2016).

### 3.1.3 Fáze zrání

Při fázi zrání dochází ke vzniku zralého vajíčka. Až po nástupu puberty, pomocí působení gonadotropních hormonů, se znovuzahájí a dokončuje první meiotické dělení a vzniká tak první pólové tělísko a sekundární oocyt (Vanderhyden 2002). Meiotické dělení dále pokračuje a sekundární oocyt postupně přechází až do stádia metafáze druhého meiotického dělení, kde se meiotické dělení opět zastavuje. V tomto stádiu je oocyt připravený k fertilizaci. Pokud k oplození nedojde oocyt zaniká apoptózou. V případě, že dojde ke splynutí oocytu a spermie, dokončí se druhé meiotické dělení a vydělí se druhé pólové tělísko (Hunter 2000). Po dvou meiotických děleních vznikne tedy pouze jedna gameta schopná oplození a až tři pólová tělíška. To je zapříčiněno asymetrickým dělením cytoplazmy během redukčního dělení (Pollard et al. 2016). Jednotlivé fáze oogeneze jsou podrobně znázorněny na Obrázku 1 (Telfer & Anderson 2019).



*Obrázek 1.* Obecné schéma oogeneze a folikulogeneze myších oocytů. Horní část zobrazuje postup od primordiální zárodečné buňky (PGCs), přes stádium oogonie a následného vstupu do meiózy až do tvorby primordiálních folikulů. Spodní část obrázku znázorňuje také růst folikulů. Uvedené velikosti vyjadřují velikost oocytů (převzato a upraveno z Telfer & Anderson 2019).

### 3.1.4 Cytoplazmatické a jaderné zrání

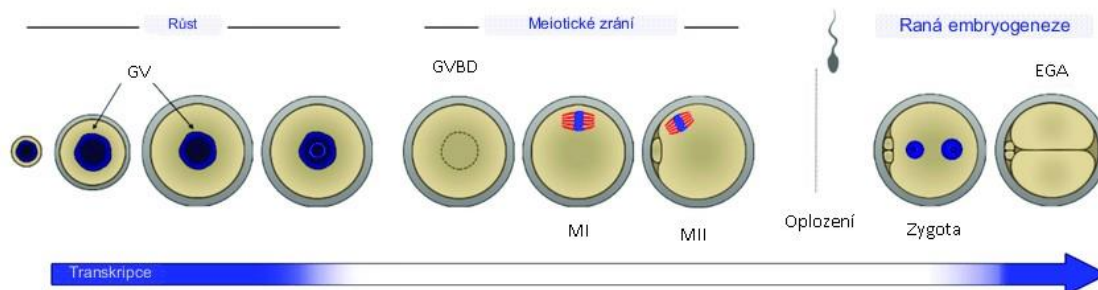
Během oogeneze nastávají změny také v cytoplasmě a jádře. Oocyty samic nejdříve musí podstoupit fázi růstu a následně dochází k cytoplazmatickému a jadernému zrání (Van Den Hurk & Zhao 2005). V průběhu cytoplazmatického zrání dochází k redistribuci organel. Změna lokalizace organel probíhá pomocí mikrotubulů a mikrofilament. Přesouvají se buněčné organely jako Golgiho aparát, mitochondrie i endoplazmatické retikulum. Dochází také k přesunu cytoskeletu a posunu kortikálních granul (Rahman et al. 2008; Ferreira et al. 2009). Ve stádiu zárodečného váčku (GV) jsou kortikální granula umístěna po celé buňce. Golgiho aparát vytváří kruh a je umístěn u kumulárních buněk (Morocard & Morocard 1975).

Při rozpadu zárodečného váčku (GVBD) jsou mitochondrie umístěny u jádra. Později při tvorbě prvního pólového tělíska dochází k jejich poměrně rovnoměrnému rozptýlení po buňce. Počet mitochondrií se během zrání mění. Z množství u primárního oocytu (6000) na více než 100 000. Tyto organely jsou totiž velice důležité pro produkci energie ve formě adenosintrifosfátu, a tudíž i pro následné procesy (Shoubridge & Wai 2007).

Ke konci cytoplazmatického zrání se kortikální granula posouvají k cytoplazmatické membráně. Významná jsou při průniku spermie do vajíčka, kdy proběhne kortikální reakce. Po exocytóze granul nastávají změny v *zoně pellucidě*, které vedou k prevenci polyspermie (Ferreira et al. 2009).

Zralost jádra oocyty je klíčová pro oplození a možnost buněčného dělení. Jednotlivá stádia zrání jádra jsou zobrazena na Obrázku 2. Při znovuzahájení meiózy se jádro oocyty nachází ve stádiu zárodečného váčku. Jaderná membrána je kompaktní a chromatin je dekondenzovaný (Motlík & Fulka 1976). Následuje rozpad zárodečného váčku, kdy se jádrko a jaderná membrána rozpadají (Wassarman 1988). U prasat trvá stádium GVBD (germinal vesicle breakdown – rozpad zárodečného váčku) přibližně jeden den a rozděluje se na čtyři fáze (GV1 – GV4). První stádium je charakteristické uspořádáním chromozomů do tvaru podkovy. V druhém stádiu jsou přítomné shluky chromatinu u jaderné membrány. Pro třetí stádium je typický kondenzovaný chromatin. V GV4 stádiu se jádrko nedá rozeznat a jaderná membrána je rozpadlá (Lucas et al. 2002). Následně prasečí oocyt vstupuje do metafáze prvního meiotického dělení (Wehrend & Meinecke 2001). Chromozomy jsou lokalizovány do ekvatoriální roviny. Poté probíhá prodlužování a odtahování chromozomů k opačným pólům (Ocampo et al. 1991). Znovu vzniká jaderná membrána a vyděluje se první pólové tělísko. Následně u oocyty probíhá druhé meiotické dělení, které probíhá až do meiotického bloku. Tento meiotický blok je v metafázi druhého meiotického dělení a dochází při něm k zastavení meiotického dělení. Až po oplození se meióza obnovuje a dokončuje se druhé meiotické dělení (Wassarman 1988).

Cytoplazmatické i jaderné zrání je mimo jiné kontrolováno molekulami, které jsou produkovány kumulárními buňkami (Cha & Chian 1998). Mezi tyto molekuly může patřit glutathion, ATP (Luciano et al. 2005), peroxidáza, kataláza a superoxid dismutáza (Cetica et al. 2001).



Obrázek 2. Schéma oogeneze a časného vývoje myšího embrya. Modrá šipka znázorňuje transkripční aktivitu. Na obrázku je zobrazený zárodečný váček (GV), rozpad zárodečného váčku (GVBD), oocyt v metafázi prvního meiotického dělení (MI), v metafázi druhého meiotického dělení (MII), zygota a EGA neboli embryo s aktivovaným embryonálním genomem (převzato a upraveno dle Christou-Kent et al. 2020).

## 3.2 *Zona pellucida*

*Zonu pellucidu* můžeme charakterizovat jako obal, který obklopuje samičí pohlavní buňku savců. Skládá se z glykoproteinů a je tvořen pomocí oocyty a folikulárních buněk již během oogeneze (Jovine et al. 2007). Složení *zony pellucidy* se může podobat jiným obalům okolo vajíčka, např. vitelinní membráně u jiných obratlovců (Lindsay et al. 2001; Nishio et al. 2018).

### 3.2.1 Funkce *zony pellucidy*

Tento speciální glykoproteinový obal u oocytů poskytuje mechanickou ochranu a hraje důležitou roli i v dalších procesech (Wassarman & Litscher 2018). Velký význam má i pro oplození. Při oplození totiž probíhá interakce mezi spermii a *zonou pellucidou*. Přesněji dochází k navázání membránových proteinových receptorů spermie a sacharidové skupiny *zony pellucidy* (Yanagimachi 1994). Jednotlivé rozdíly mezi druhy v povrchových proteinech spermií a rozdílných sacharidových skupinách *zony pellucidy* jsou považovány za jeden z hlavních důvodů druhově specifického rozpoznávání a vazby spermie a vajíčka. To potvrzuje přísná druhová specifická u myši (Wassarman 2005) a lidí (Rosano et al. 2007). Avšak u zvířat jako je prase a skot některé výsledky naznačily, že vazba mezi spermii a *zonou pellucidou* nemusí být tak striktně druhově specifická (Töfer-Petersen et al. 2008; Takahashi et al. 2013). Celkové pochopení mechanismu vazby spermie na *zonu pellucidu* je podstatné pro diagnostiku a terapii neplodnosti a budoucí směřování asistované reprodukce (Tumova et al. 2021).

Po navázání a vniknutí spermie do vajíčka působí *zona pellucida* jako obrana proti vniknutí a oplodnění dalšími spermii a následnému vzniku polyploidie. Polyploidie je stav, při kterém má jedinec více než dvě chromozomové sady. Tento jev je pro embryo u většiny živočišných druhů fatální (Fahrenkamp et al. 2020). Aby k tomuto stavu nedošlo, dochází tedy po fúzi pohlavních buněk ke kortikální reakci. Kortikální granula uvolní svůj obsah do perivitelinního prostoru a tím se změní struktura *zony pellucidy*. V kortikálních granulích se nacházejí enzymy tzv. proteázy, které napomáhají štěpit ZP2. Tento glykoprotein pomáhá udržet spermii ve vazbě na *zonu pellucidu* (Bleil et al. 1981). Po uvolnění proteinů z kortikálních granulí dojde k znesnadnění navázání dalších spermií (Hedrick 2007). Mezi další důležité biochemické změny, které mohou souviset se ztvrdnutím *zony pellucidy* patří odštěpení sacharidů ze ZP3 a včlenění zinku do *zony pellucidy* (Fahrenkamp et al. 2020).

Významná je role *zony pellucidy* i během časně embryogeneze. Chrání totiž embryo při průchodu samičím pohlavním traktem, aby nedošlo k jeho uhnízdění již v epitelu vejcovodu, a tak k mimoděložní graviditě. To je závažný stav, který může být pro samici fatální. *Zona pellucida* tak zůstává přítomna až do stádia blastocysty, kdy se embryo dostává do dělohy, poté *zona pellucida* praskne a embryo se uhnízdí v děložní sliznici (Rankin & Dean 2000).

### 3.2.2 Stavba zony *pellucida*

*Zona pellucida* je tvořena glykoproteiny, což jsou proteiny, na které se naváží sacharidy (glycidy). Tento specifický obal může být tvořen třemi až čtyřmi glykoproteiny (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4). Zastoupení těchto jednotlivých glykoproteinů se u různých druhů zvířat liší (Gupta et al. 2007). U prasat se *zona pellucida* skládá konkrétně z glykoproteinů ZP2, ZP3 a ZP4. Glykoprotein ZP1 není u prasat exprimován (Goudet et al. 2008). Naopak u potkanů (Hoodbhoy et al. 2005), křečků a lidí (Izquierdo-Rico et al. 2009) je *zona pellucida* tvořena všemi čtyřmi zmíněnými glykoproteiny (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4). Druhá odlišnost ve složení glykoproteinů je pravděpodobně způsobena evolucí genových rodin. Dochází u nich totiž k rozdílným duplikacím a pseudogenizaci (Moros-Nicolás et al. 2021).

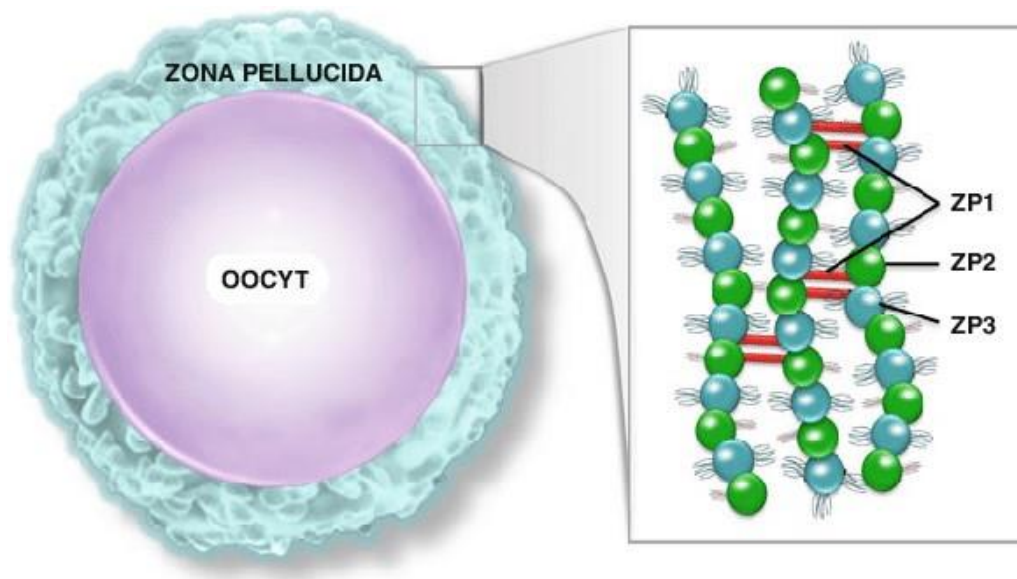
ZP geny se dříve dělily do šesti podrodin, a to na ZP1, ZP2, ZP3, ZP4, ZPAX a ZPD. S tím, že ZP1, ZP2, ZP4, ZPAX a ZPD se fylogeneticky řadily do jedné skupiny. Druhou skupinu tvořily geny z podrodiny ZP3 (Goudet et al. 2008). U této genové podrodiny byly zaznamenány tři různé duplikované geny - ZP3-a, ZP3-b a ZP3-c (Moros-Nicolás et al. 2021). V novějších studiích se geny rozdělují do minimálně osmi podrodin: ZP1/4, ZP2, ZPAX, ZPY, ZPD, ZP3-1, ZP3-2 a ZP3-3. Do genové podrodiny ZP3-1 patří již dříve zmíněné duplikované geny ZP3-a, ZP3-b a ZP3-c (Feng et al. 2018).

U obojživelníků je charakteristický výskyt ZPAX a ZPD. Právě proto se vědci domnívají, že tyto dvě genové podrodiny budou fylogeneticky starší. Naopak pokud se podíváme na savce, tak jsou u většiny druhů přítomny genové podrodiny ZP1, ZP2, ZP3, ZP4. U některých druhů savců jsou přítomny pouze tři genové podrodiny. U těchto druhů nejsou přítomné podrodiny ZP1 nebo ZP4 (Moros-Nicolás et al. 2021). Podle novější nomenklatury jsou tyto čtyři glykoproteiny *zony pellucida* produkty genů ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4 (Gupta 2018). Dříve se uváděli tři geny pojmenované ZPA, ZPB, ZPC (Harris et al. 2009).

U jednotlivých druhů savců se tloušťka *zony pellucida* mění a pohybuje se mezi 1-25  $\mu\text{m}$  (Wassarman 2003). Na povrchu *zony pellucida* se vyskytují póry, které se směrem do oocyty zužují a zřejmě napomáhají k proniknutí spermie do vajíčka (Gupta et al. 2012). Vnější houbovitý povrch *zony pellucida* s většími póry usnadňuje schopnost průniku spermii přes *zonu pellucidu* (Familiari et al. 1988).

Struktura *zony pellucida* se časem mění. U nezralých oocytů je charakteristická svou síťovitou strukturou. Jednotlivá vlákna glykoproteinů jsou od sebe daleko a povrch je typický výraznými a hlubokými póry. Při dozrávání se síťovitá struktura zahušťuje a póry už nejsou tak hluboké jako u nezralého oocyty. Po oplození je *zona pellucida* tvořena velice hustou sítí uspořádaných glykoproteinových vláken a póry se na povrchu téměř nevyskytují. Tento stav pravděpodobně bývá způsoben splynutím jednotlivých vrstev (Suzuki et al. 1994). *Zona pellucida* je u myšího modelu složena z opakujících se dimerů glykoproteinů ZP2 a ZP3 a je spojena glykoproteinem ZP1. Struktura *zony pellucida* s konkrétními glykoproteiny je zobrazena na Obrázku 3 (Dun et al. 2010).





Obrázek 3. Schéma oocyty a struktura ZP glykoproteinů zony pellucidy u myši (převzato a upraveno dle Dun et al. 2010).

Schopnost molekul prostupovat přes póry zony pellucidy zřejmě není primárně závislá na velikosti molekul, ale na jejich biochemických nebo fyzikálně-chemických vlastnostech. Důležitým faktorem může být povrchový náboj molekuly. U glykoproteinů zony pellucidy lidského oocyty byla prokázána výrazná odlišnost v jejich náboji. To je pravděpodobně způsobeno různou mírou glykosylace (Bercegeay et al. 1995). Co se týče prostupování látek, tak bylo zjištěno, že imunoglobuliny, což jsou relativně velké molekuly, penetrují přes zonu pellucidu bez výrazných problémů. Naopak menší molekuly jako je heparin, prostupovat přes tento obal nemohou (Shivers & Dunbar 1977; Sinowatz et al. 2001).

### 3.2.2.1 Vznik ZP

U myši je syntéza glykoproteinů, které tvoří zonu pellucidu zajištěna rostoucím oocytem (Wassarman & Litscher 2018). U lidí, prasat a jiných druhů zvířat jsou glykoproteiny syntetizovány i folikulárními buňkami okolo oocyty zvanými cumulus oophorus (Gupta 2018). Nejdříve dochází k sekreci glykoproteinů, která probíhá nerovnoměrně a postupuje do prostoru mezi okolními folikulárními buňkami a povrchem oocyty. Následně se tvoří vlákna glykoproteinů s hexagonální strukturou a se stejnou velikostí pórů (Wassarman & Mortillo 1991). Vznikající glykoproteiny se začleňují do matrice zony pellucidy na nejvnitřnějším povrchu. Zona pellucida tedy zesiluje svou strukturu směrem zevnitř ven (Qi et al. 2002).

Jak se oocyt zvětšuje, tak se tato vlákna spojují a vytvářejí rovnoměrný obal. Také se postupně zvyšuje počet mikrokleků, které se dostávají do kontaktu s buněčnými výběžky kumulárních buněk. To pak způsobuje vytváření kanálů přes zonu pellucidu, které umožňují poskytnout výživu rostoucí vaječné buňce (Wassarman & Mortillo 1991). Důležitou roli



### 3.2.2.3 ZP1

*Zona pellucida sperm-binding protein 1* (ZP1) je také uváděný v dřívějších publikacích jako ZPB1. Tento glykoprotein je významný především pro propojení dalších glykoproteinů ZP2 se ZP3 a následnou tvorbu trojrozměrné síťovité struktury *zóny pellucidy* (Familiari et al. 2006). Předpokládá se, že ZP1 má důležitou roli i v indukci akrozomální reakce a vazbě spermií na *zonu pellucidu*. Toto tvrzení bylo zaznamenáno u kuřat (Okumura et al. 2004), křepelek (Sasanami et al. 2007) a lidí. V rozporu je však s informacemi získanými z myšního modelu. Je tedy pravděpodobné, že ZP1 může u různých druhů zastávat poněkud odlišnou funkci (Gupta et al. 2012). Jak již bylo zmíněno, u prasat tento glykoprotein není syntetizován (Goudet et al. 2008).

### 3.2.2.4 ZP2

*Zona pellucida sperm-binding protein 2* (ZP2) hraje významnou roli při udržení vazby *zóny pellucidy* se spermií, u které již proběhla akrozomální reakce (Bleil et al. 1988). V průběhu kortikální reakce je ZP2 štěpen. Rozdělením na dvě části zabraňuje vzniku polyspermie. K tomu dochází štěpením N-terminální oblasti působením enzymu metaloendopeptidázy ASLT a po štěpení vzniká N-terminální peptid a C-terminální peptidy. Tyto peptidy jsou spojeny disulfidickým můstkem (Taya et al. 1995). ZP2 je tvořen polypeptidovým řetězcem, který se skládá ze 716 aminokyselin. Avšak pro vznik hotového proteinu je potřebné, aby došlo k odštěpení signálního peptidu a propeptidu. Tento specifický signální peptid obsahuje 1-35 aminokyselin a odštěpuje se z N-konce. Naopak propeptid, který obsahuje 77 aminokyselin je odštěpován z C-konce. Hotový protein je tak tvořen ze 603 aminokyselin a má velikost přibližně 80 kDa bez navázaných sacharidových zbytků. V dřívějším názvosloví je ZP2 také označován jako ZPA (Taya et al. 1995).

### 3.2.2.5 ZP3

*Zona pellucida sperm-binding protein 3* (ZP3) také dříve označován jako ZPC představuje na *zoně pellucidě* s velkou pravděpodobností právě primární spermiový receptor. Potvrzené to bylo už v roce 1980 na myším modelu (Bleil & Wassarman 1980). Nezralá forma tohoto glykoproteinu je tvořena 421 aminokyselinami. Zralá forma vzniká až po odštěpení propeptidu (333-421 aminokyselin) a signálního peptidu (1-22 aminokyselin). Hotový glykoprotein je složený z 310 aminokyselin a má molekulární velikost 46 kDa (Yurewicz et al. 1992; Gupta et al. 1995; Yonezawa & Nakano 2003).

Struktura ZP3 a doména podílející se na indukci akrozomové reakce byla zkoumána u kuřat (Han et al. 2010) a lidí. U těchto glykoproteinů byly zaznamenány dvě odlišné N-koncové domény. Každá z nich se skládala z antiparalelně skládaných  $\beta$  listů a také dvou disulfidických vazeb. Struktura připomínala model dvou smyček a jedné šroubovice uprostřed. U C-koncové domény se nacházely dvě subdomény. První základní struktura byla tvořena dvěma antiparalelními  $\beta$ -listy. Druhá subdoména byla tvořena C-koncovou oblastí, ve které se vyskytovaly tři disulfidické můstky (Laskowski et al. 1993).

U lidí bylo zjištěno, že ZP3 může mít vliv i na akrozomální reakci a následně, že i podporuje fúzi vajíčka a spermie (Van Duin et al. 1994). Tato funkční aktivita se u lidí nachází v C-koncové doméně (Bansal et al. 2009). Úloha glykoproteinu ZP3 při akrozomální reakci je však nejasná. U některých dalších studií totiž nebyly pozorovány žádné výrazné změny v indukci akrozomální reakce. A to i přes to, že byly spermie již kapacitované a navázané na *zonu pellucidu* přední částí hlavičky. Glykosylace ZP3 tedy nemusí být zásadní pro vazbu kapacitované spermie, ale může být nezbytná pro optimální indukci akrozomové reakce, a to alespoň u lidí (Chakravarty et al. 2008). Pokud se podíváme na ZP3 u prasat, tak bylo zaznamenáno, že jeho vazebná aktivita je zesílena komplexem ZP3 a ZP4 (Yurewicz et al. 1998; Gupta et al. 2012).

#### 3.2.2.6 ZP4

*Zona pellucida sperm-binding protein 4* (ZP4) je glykoprotein, který má molekulární hmotnost 60 kDa a byl dříve označován jako ZP1/ZPB. Nezralá forma tohoto glykoproteinu je složena z 636 aminokyselin. Následně dochází k odštěpení signálního peptidu, který obsahuje 1-18 aminokyselin. Také se odštěpuje propeptid složený z 463-540 aminokyselin. Ve zralé formě je složen ze 441 aminokyselin (Yurewicz et al. 1992; Yurewicz et al. 1993; Yonezawa & Nakano 2003).

ZP4 se nutně nemusí vyskytovat u všech zvířat. U mnohých druhů může být přítomen jen ZP4 nebo ZP1. V některých případech jsou přítomny oba tyto glykoproteiny. ZP4 se vyskytuje u druhů jako jsou psi (Goudet et al. 2008), prasata (Hedrick & Wardrip 1987) a skot (Noguchi et al. 1994). Naopak u myši je ve formě pseudogenu (Goudet et al. 2008). Předpokládá se, že se glykoproteiny ZP1 a ZP4 vyvinuly z genu společného předka pomocí duplikace. To by měl být hlavní důvod, proč mají maximální podobnost sekvencí a nazývají se tak někdy paralogy (Goudet et al. 2008).

Uvádí se, že jedním z hlavních významů tohoto glykoproteinu v *zoně pellucidě* je vliv na akrozomovou reakci. Buď samotný glykoprotein ZP4 nebo heterokomplexy složené i se ZP3 vyvolávají exocytózu akrozomu u prasat (Yurewicz et al. 1998), králíků (Prasad et al. 1996) a opic (Govind et al. 2001). U lidí je tato funkce ZP4 poněkud nejasná. V některých případech rekombinantní lidský ZP4 exprimovaný u *Escherichii coli* (Migula, 1895) akrozomovou reakci nedokázal vyvolat (Chakravarty et al. 2008). V dalších studiích došlo, jak k vazbě na akrozom spermie, tak i k vyvolání akrozomové reakce (Chakravarty et al. 2005; Caballero-Campo et al. 2006).

#### 3.2.2.7 *Zona pellucida* a vazba spermie

Vazba kapacitovaných spermií na *zonu pellucidu* aktivuje transmembránové signály, které následně vedou ke spuštění signální kaskády vedoucí k akrozomové reakci. Za exocytózu akrozomu jsou zodpovědné mimo jiné dvě signální dráhy. První pomocí receptoru spřaženého s G proteiny aktivuje signální dráhu zprostředkovanou fosfolipázou C $\beta$ 1 (PLC $\beta$ 1). Fosfolipáza C vede k hydrolýze fosfatidylinositolu bisfosfátu (PIP2) na diacylglycerol (DAG) a inositol trifosfát (IP3).

Následně dochází k translokaci proteinkinázy C do cytoplazmatické membrány a její aktivaci (Patrat et al. 2000). Inositol trifosfát dále zvyšuje hladiny intracelulárního vápníku (Walensky & Snyder 1995).

Druhá dráha je aktivována přes receptorové tyrosinkinázy (TK) spojené s PLC $\gamma$  (Doherty et al. 1995; Baldi et al. 2002). Zvláště pak ZP3 a ZP4 se u člověka podílejí na aktivaci tyrosinkináz. Avšak přesná úloha v ZP1 zprostředkované aktivaci tyrosinkináz a spuštění akrozomové reakce musí být ještě objasněna (Chiu et al. 2008). Vazba spermie na *zonu pellucidu* doprovází také depolarizace plazmatické membrány spermie a zvýšení vnitrobuněčného pH aktivací Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> výměníku a zvýšení koncentrace vápníku prostřednictvím napětově ovládaných vápníkových kanálů (José et al. 2010).

Pro vyvolání akrozomové reakce u myši jsou především důležité O-vázané glykany glykoproteinu ZP3. Naopak u lidí jsou významnější N-vázané glykany. Zároveň existují drobné rozdíly i v aktivaci nadcházející signalizace, která vede k akrozomové reakci. Odlišnosti po navázání spermie na proteiny lidské *zóny pellucidy* jsou jak u ZP3, tak i ZP1 a ZP4. Význam glykoproteinů ať už vzhledem k akrozomové reakci nebo celkově k oplození by se měl tedy popsat pro každý druh samostatně. Raději než zobecňovat informace získané z myšního modelu (Gupta et al. 2012).

### 3.2.2.8 *Zona pellucida* u prasnic

U prasnic dosahuje *zona pellucida* průměru přibližně 13 – 16  $\mu$ m a vyznačuje se velkým množstvím O- a N-glykanů (Dunbar et al. 1994; Sinowatz et al. 2001). Jak již bylo zmíněno, u prasnic je *zona pellucida* tvořena jen ze tří glykoproteinů. Jsou to ZP2, ZP3, ZP4. Odhadovaný molární poměr je u těchto glykoproteinů 1:6:6 (Nakano et al. 1996). *Zona pellucida sperm-binding protein 1* (ZP1) je u prasat pseudogenem, takže nedochází k přepisu této sekvence DNA do RNA, a tudíž není ZP1 exprimován (Hedrick & Wardrip 1986; Hedrick & Wardrip 1987). Některé zdroje předpokládají, že pZP4 má stejnou funkci jako mZP1. Mohou tedy ztrátu ZP1 kompenzovat (Töpfer-Petersen et al. 1993).

Co se týče struktury, tak se předpokládá, že je *zona pellucida* u prasat uspořádána podobně jako u myši. Vlákná glykoproteinů jsou tvořena heterodimery pZP3 a pZP4, které jsou pospojované pomocí pZP2 (Nakano et al. 1996). Hlavní glykoproteiny pZP3 a pZP4 tvoří přibližně 80 % celkových glykoproteinů (Hedrick & Wardrip 1987; Hasegawa et al. 1994). Tato struktura drží pomocí nekovalentních vazeb (Sinowatz et al. 2001).

Obsah sacharidů v *zoně pellucidě* se odhaduje na 15 až 54 %. U mnoha živočišných druhů se glykosylační místa oligosacharidů a proteinů vzájemných sacharidů účastní vazby se spermií podle druhové specifity (Hoodbhoy & Dean 2004). Jejich sacharidová struktura a podíl sacharidů se mohou lišit. U prasat zastupují neutrální oligosacharidy z celkového podílu sacharidů přibližně 25 % (Töpfer-Petersen 1999).

### 3.3 Glykosylace

Glykoproteiny vznikají procesem zvaným glykosylace. Během této reakce dochází k navázání sacharidů nebo polysacharidů (glykanů) pomocí kovalentní vazby na lipidy nebo proteiny. Glykosylace se v rámci biologie popisuje jako enzymatická reakce, zatímco glykace je charakterizovaná jako neenzymatická glykosylace. Je to tedy reakce bez zapojení enzymů. Po enzymatickém procesu, při kterém dochází k připojení donoru glykosylu (glykanu) a akceptoru glykosylu (jiné molekuly) vzniká tzv. glykokonjugát (Lima & Baynes 2013).

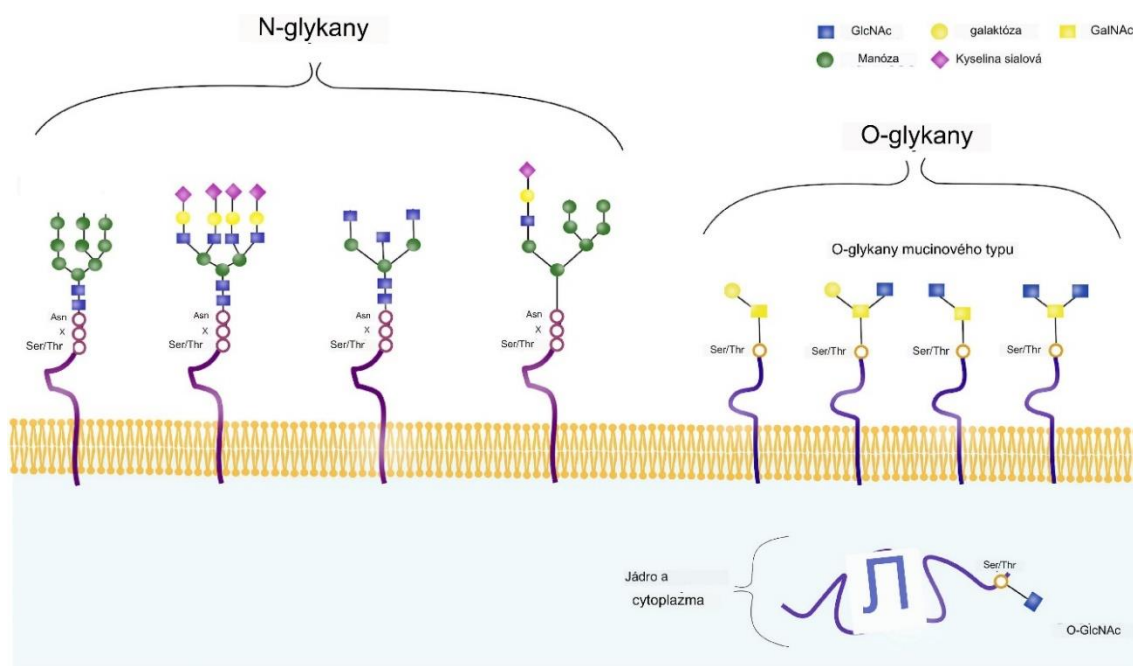
Glykosylace probíhá v endoplazmatickém retikulu, Golgiho aparátu, cytoplazmě a jádru. Glykokonjugáty vzniklé glykosylací se mohou lišit různým spojením mezi sebou, sekvencí glykanů a svou délkou. Jejich tvorbu ovlivňuje mnoho faktorů jako jsou organelové struktury, enzymy, typy buněk a buněčných signálů (Reily et al. 2019). Glykosylace proteinů je tak považována za nejrozmantější reakci ze všech úprav proteinů po jejich nasyntetizování (posttranslační modifikace). K navázání totiž mohou být použity sacharidy se značně odlišnou strukturou. Na jaderné a cytoplazmatické proteiny se mohou vázat nejrozličnější monosacharidy. Naopak může docházet i k navázání velmi složitých molekul, které umožňují specificky rozpoznávat další molekuly a mohou se napojit na proteoglykany nebo extracelulární N- a O-glykany (Hart 1992).

Glykosylace je významná pro mnoho funkcí buňky, a proto je také nutná pro správný průběh biologických procesů. Pokud dojde k odchýlkám v glykosylaci, tato skutečnost může způsobit, že se začne podporovat množení rakovinných buněk. Ovlivní to také zánětlivé reakce, apoptózu buněk a umožní to průnik virů do buňky. Tento proces je tedy zásadní i pro imunitní systém. Může ovlivnit také interakce mezi molekulami na povrchu buňky, a tudíž je důležitý i pro rozpoznávání cizích molekul. Poruchy glykosylace mohou být spojeny se vzácnými genetickými poruchami a metabolickými i imunitními nemocemi. Studium tohoto významného procesu glykosylace může pravděpodobně ovlivnit do budoucna i vývoj případné terapie těchto onemocnění (Reily et al. 2019).

#### 3.3.1 Glykosylace zony *pellucidy*

Glykoproteiny zony *pellucidy* jsou velmi rozmanité kvůli posttranslačním modifikacím. U glykosylace O – vázaných glykanů dochází k připojení na aminokyseliny serin nebo threonin a u N – vázaných glykanů nastává připojení na aminokyselinu asparagin. Většinou také probíhají procesy sulfatace a sialylace (Yonezawa 2014). U lidských glykoproteinů ZP2, ZP3 a ZP4 obecně převažuje N-vázaná glykosylace (Chiu et al. 2008).

N-glykany se skládají ze stejného jádra z GlcNAc (N-acetylglukosaminu) a manózy. Dále mohou být upraveny a modifikovány připojením galaktózy, fukózy nebo sialové kyseliny. Naopak O-glykany mají různé jádrové struktury, které se skládají z GalNAc (N-acetylgalactosaminu) nebo GlcNAc. O-glykany mucinového typu jsou složeny z O-GalNAc a běžně se nacházejí na proteinech v membráně a extracelulárních proteinech. O-GalNAcylyace je komplexní forma O-glykosylace. Na druhé straně O-GlcNAc se zpravidla vyskytují na intercelulárních proteinech. Rozdíl mezi N-glykany a O-glykany je znázorněn na Obrázku 5 (Haukedal & Freude 2021).



Obrázek 5. Zobrazení rozdílu glykanových struktur u N- a O-glykanů (převzato a upraveno z Haukedal & Freude 2021).

### 3.3.2 Glykosylace zony pellucidy u prasat

Zrání oocytů je jedním z hlavních předpokladů úspěšného oplodnění. Přibývající informace naznačují, že i sama *zona pellucida* potřebuje projít určitými změnami, aby u ní došlo k dozrání. Konkrétně bylo prokázáno histologickými studiemi, že dochází k syntéze kyselých glykokonjugátů v kumulárních buňkách a po dozrání oocytu je zvýšený výskyt kyselých glykanů v *zoně pellucidě*. Během procesu zrání tudíž dochází u prasnic k posunu o 1,5 – 2 jednotky pH (Witzendorff et al. 2009).

V průběhu meiotického zrání u prasat dochází k N-glykosylaci glykoproteinů *zony pellucidy*. Což je reakce, která je velmi důležitá pro interakci *zony pellucidy* se spermií, následné vazby spermie a pravděpodobně je to také klíčové pro akrozomální reakci u navázaných spermií (Lay et al. 2012). Avšak pro indukci akrozomální reakce a vazbu kančích spermií není potřeba terminálních sekvencí Gal $\alpha$ 1-3Gal (Clark et al. 2010).

U prasat, podobně jako u jiných druhů savců, mají glykoproteiny *zony pellucidy* velmi heterogenní strukturu. To je způsobeno různým množstvím sialylovaného a sulfatovaného poly-N-acetyllaktosaminu (Yonezawa et al. 1997). Kyselé a vysoce sulfatované N-glykany jsou tvořeny ze sekvencí poly-N-acetyllaktosaminu, které mají různou délku. Sulfatace u nich probíhá v poloze C-6 GlcNAc (Noguchi & Nakano 1992). Míra sulfatace glykanů *zony pellucidy* se může měnit u jedinců i v průběhu života. Kupříkladu nižší výskyt sulfatace glykanů byl popsán v prepubertálním období prasnice (Witzendorff et al. 2009).

N-vázané řetězce jsou složeny z neutrálních a kyselých řetězců. Jejich molární poměr se pohybuje přibližně v poměru 1:3. Tyto řetězce tvoří N-glykanový komplex s  $\alpha$ -fukosylovým zbytkem v nejvnitřnějším N-acetyllaktosaminu. N-glykanové komplexy mohou být diantenární, triantenární a tetraantenární (Nakano & Yonezawa 2001). Nejdůležitější neutrální N-glykany prasečích glykoproteinů *zony pellucidy* spadají mezi diantenární fukosylované glykany obsahujícím N-acetyllaktosaminové řetězce (Töpfer-Petersen 1999). Významné jsou především proto, že se podílejí na rozpoznávání spermie (Nakano et al. 1996).

Počet N-glykosylačních míst se u jednotlivých glykoproteinů liší. ZP2, který je u prasat největším glykoproteinem má šest potencionálních míst. ZP3 má tři a ZP4 má pět N-glykosylačních míst (Yurewicz et al. 1991). Všechny tři potencionální N-glykosylační místa u ZP4 (Asn203, Asn220 a Asn333) nesou neutrální diantenární řetězce. Konkrétně glykosylační místo Asn220 je také glykosylováno neutrálními triantenárními a tetraantenárními N-glykany. V N-terminální části ZP4 mezi sousedními cysteinovými zbytky (Cys224 a Cys243) je umístěna alespoň jedna disulfidová vazba (Kudo et al. 1998; Töpfer-Petersen 1999). U prasat N-vázané glykany obsahují fukózové zbytky, ale žádné vysokomannosové zbytky (Katsumata et al. 1996).

Na rozdíl od N-glykosylačních míst se potencionálních O-glykosylačních míst nachází u ZP3 šest a u ZP4 jsou tři (Yurewicz et al. 1991). U O-vázaných glykanů probíhá sulfatace v poloze C-6 GlcNAc, což je obdobně jako u N-vázaných glykanů. Mohou také podléhat sialylaci. Co se týče složení, O-vázané glykany obsahují 26 kyselých nerozvětvených řetězců typu core-1 ON-acetylgalaktosamin a 9 neutrálních řetězců (Hokke et al. 1994). Některé ligandové kompetiční biologické testy naznačily, že O-glykany alespoň částečně zprostředkovávají adhezní vlastnosti zonárního glykoproteinu ZP3 (Yurewicz et al. 1991).



### 3.4 Lektiny

Lektiny jsou látky charakteristické svou vlastností specificky vázat sacharidy. Jedná se o proteiny vyskytující se u většiny žijících organismů. Jejich výskyt je zaznamenán, jak u živočichů a rostlin, tak i u bakterií a virů. Pro mnoho druhů jsou velice důležité a uplatnění nacházejí v mnoha biologických procesech. Tyto proteiny se váží k sacharidům nekovalentně a reverzibilně s vysokou specifitou a následně vytvářejí glykokonjugované komplexy (Mishra et al. 2019). I přesto, že se některé lektiny účastní imunitních procesů, tak se nezařazují do protilátek. Nejsou totiž produktem primární imunitní odpovědi. Tyto proteiny většinou nemají ani katalytickou aktivitu, což je typická vlastnost pro enzymy. Nemůžeme je tedy řadit ani do této skupiny látek (Sharon 1998; André et al. 2015).

Lektiny mají schopnost v závislosti na druhu a krevní skupině aglutinovat červené krvinky. Právě první popis lektinů byl pomocí erytrocytů již na přelomu 19. století. Tehdy doktor Peter Hermann Stillmark zaznamenal hemaglutinaci s výtažkem ze semen z rostliny skočce obecného (*Ricinus communis* (Linnaeus, 1753)). Frakce proteinu, která způsobila shlukování červených krvinek byla pojmenována jako ricin. Dříve byly lektiny nazývány fytohemaglutininy. Zřejmě kvůli tomu, že byly nejprve izolovány z rostlin a měly schopnost aglutinovat červené krvinky. Až imunochemik William Clouser Boyd v roce 1954 zavedl termín lektin, který vychází z latinského slova *legere* – vybrat/volit si (Walker 1985; Sharon 1998; Gabius 2013).

#### 3.4.1 Význam lektinů

Lektiny jsou významné pro buněčný vývoj, imunitu, endocytózu, migraci buněk, fagocytózu, vzájemnou symbiózu i proces oplodnění (Sharon & Lis 1990). Svou roli mají i při vzniku ovidukálního rezervoáru. Tento rezervoár je oblast ve vejcovodu, ve které se na určitou chvíli navazují spermie na sliznici oviduktu. Hlavní snahou je možnost prodloužení životaschopnosti spermií a sladění kapacity spermií s ovulací oocyty. Právě vazba na sacharidové struktury epitelu oviduktu s povrchovými proteiny spermií probíhá pomocí lektinových vazeb (Töpfer-Petersen et al. 2002). Na povrchu jaterních buněk pomáhají lektiny rozpoznávat zbytky galaktózy a navazovat tak nežádoucí glykoproteiny (Stockert & Morell 1983). Další lektiny mohou podporovat růst kostí, a tudíž by mohly vést k novým způsobům léčby různých poruch osifikace kostí (Chan et al. 2016). Mezi lektiny však patří i jedovaté látky. Mezi silné toxiny spadá první popsáný lektin ricin (Olsnes 2004). U surových rostlin se tyto toxické lektiny inaktivují správným zpracováním a přípravou (Sharon & Lis 1972).

#### 3.4.2 Využití lektinů

Použití lektinů může být rozmanité, tak jako jejich význam v organismu. Aplikovat se mohou na izolaci, detekci i charakterizaci glykokonjugátů. Lektiny tedy umožňují rozeznávat různé sacharidové struktury a také jejich umístění. Využívat se mohou konkrétně pro charakterizaci oligosacharidových řetězců proteinů zony *pellucidy* (Sinowatz et al. 2001).

A to u různých živočišných druhů. Prokázáno to například bylo u prasečích, potkaních (Barbeito et al. 2013), králíciích i psích oocytů (Parillo et al. 2000). Uplatnit se mohou také při popisu fyziologických nebo patologických změn na povrchu buněk. Mezi takové procesy může patřit adheze infekčního původce onemocnění na hostitelskou buňku či diferenciace buněk (Lis & Sharon 1998). Lektiny mohou také pomoci rozpoznávat nádorové buňky. Bylo dokonce zjištěno, že určité rostlinné lektiny mají až protirakovinné účinky. Naváží se totiž na membrány anebo receptory karcinogenních buněk a způsobují až zamezení růstu nádoru. Nejsou tedy po dalších výzkumech v budoucnu vyloučeny případné terapeutické postupy protinádorové léčby pomocí lektinů (De Mejía & Prisecaru 2007).

Lektiny vedou také k pochopení různých molekulárních mechanismů buněčných procesů (Sharon 2008). Zároveň mohou zvyšovat fagocytární aktivitu makrofágů, působit tak podobně jako vakcína a poskytovat dlouhodobou ochranu před patologickými mikroorganismy (Mishra et al. 2019). Hlavními výhodami použití lektinů je vysoká stabilita, komerční dostupnost a aktivita i v malých koncentracích. Také umožňují zkoumat nepatrné strukturní rozdíly na povrchu buněk i mezi jednotlivými izoláty (Slifkin & Doyle 1990).

### 3.4.3 Struktura

Lektiny jsou tvořeny převážně z proteinů či glykoproteinů, které se váží na buňky nebo glykokonjugáty. Jejich struktura se liší svou velikostí, trojrozměrnou strukturou, uspořádáním i počtem podjednotek (Goldstein et al. 1980). Glykokonjugáty jsou přítomné v prostředí volně nebo jsou vázané na povrchu buněk. Mnohonásobně rozvětvené oligosacharidy se vyznačují větší afinitou k vazbě s lektiny než sacharidy s lineární strukturou. Pravděpodobně je to způsobeno součinností vazebných mechanismů komplexu lektin-sacharid (Helliwell 1997).

Specifická vazebná schopnost lektinů závisí na jednoduchých oligosacharidech nebo monosacharidech. Nezvyklou výjimkou jsou sacharidy spojené s enzymy. V případě, že má enzym více vazebných míst a má schopnost srážet nebo aglutinovat glykokonjugáty, můžeme takové komplexy řadit mezi lektiny (Vakri 2009).

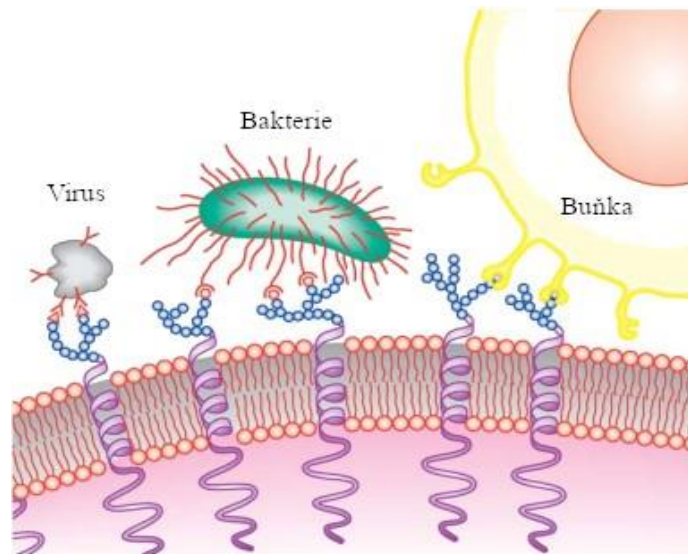
Klíčová je pro lektiny především oblast CRD (carbohydrate recognition/binding domain), která představuje vazebné místo. Tato doména umožňuje specificky rozpoznávat a vázat sacharidy (Sharon 2009). Při této vazbě mezi lektinem a sacharidem se vyskytuje rozmanité množství vazeb. Zejména se zde uplatňují vodíkové můstky, iontové vazby, ale i Van der Waalsovy síly a hydrofobní interakce. Také se zde mohou pozorovat tzv.  $\pi$ - $\pi$  interakce mezi aminokyselinami v CRD doménách a monomerech sacharidů. U některých tříd lektinů je potřeba k jejich funkci přítomnost bivalentních kationtů. Stabilizují totiž vazebné místo, a poté dochází k fixaci pozice aminokyselin reagujících se sacharidy (Weis & Drickamer 2003). K vazbě lektinů s komplexními či jednoduchými sacharidy je běžně potřebný výskyt  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$  iontů (Sharon & Lis 1990).

Jedna molekula lektinů může obsahovat dvě nebo více vazebných míst (Ghazarian et al. 2011). Můžeme je tudíž dělit na bivalentní a polyvalentní. Lektiny s více než dvěma CRD doménami jsou polyvalentní. Mají schopnost se vázat na exprimované glykolipidy či glykoproteiny, které jsou umístěné na povrchu buněk a způsobovat u nich shlukování.

Některé z těchto polyvalentních lektinů mají možnost pomocí vazby na sacharidové receptory vyvolat signalizaci nebo internalizaci buňky. Mají dokonce i schopnost pozměňovat chování zúčastněných sacharidů (Sharon 2006).

#### 3.4.4 Dělení lektinů

Lektiny se mohou odlišovat svou strukturou, ale i svým původem. Podle toho, z jakého organismu pocházejí, je můžeme rozdělovat na bakteriální, virové, rostlinné a živočišné (Mishra et al. 2019). U všech těchto organismů mají funkce jako je například adheze, která je znázorněná na Obrázku 6 (Sharon & Lis 1993).



Obrázek 6. Povrchové lektiny zprostředkovávají buněčnou adhezi vazbou na specifické sacharidy na povrchu buněk u různých organismů (převzato a upraveno z Sharon & Lis 1993).

Lektiny lze řadit do skupin i dle jejich lokalizace v organismu nebo v konkrétních buňkách. Zohledňuje se také jejich specifita vůči glykokonjugátům a sacharidům. Dalším faktorem může být uspořádání domén a epitopů (místo, které má každá proteinová molekula a slouží k navázání protilátky). Z těchto hledisek se mohou lektiny různě dělit a jejich třídy různě překrývat (Lakhtin et al. 2011).

##### 3.4.4.1 Rostlinné lektiny

Lektiny se vyskytují téměř u všech krytosemenných, nahosemenných a nižších rostlin v různých částech. Konkrétně se nacházejí v cibulkách, hlízách, oddencích, stoncích, kůře, listech a semenech. Jak již bylo zmíněno, první studované lektiny byly právě u rostlin. Pravděpodobně kvůli jednoduše izolaci a distribuci lektinů (Etzler 1985). Tyto lektiny obsahují alespoň jednu nekatalytickou doménu. Na ni se poté reverzibilně vážou specifické monosacharidy či oligosacharidy (Van Damme 2007). U rostlin byla pozorována vyšší afinita

k oligosacharidům než k jednoduchým sacharidům. Pozoruhodné je, že právě oligosacharidy se u rostlin nevyskytují a jsou více běžné u jiných organismů. Vyskytují se kupříkladu u zvířat, hub i hmyzu (Peumans & Van Damme 1995).

Důležité jsou pro separaci a analýzu glykoproteinů a oligosacharidů na povrchu buňky. Svůj význam mají v rámci interakcí hostitele a patogenu. Také bylo zaznamenáno, že jsou významné při vývoji a buněčné signalizaci (Sharon & Lis 2004). Uplatňují se i při vztahu rostlin s nitrogenními bakteriemi (Díaz et al. 1989). Poskytují také ochranu rostlin proti hmyzu i fytopatogenním mikroorganismům (Bohloul & Schmidt 1974). Předpokládá se, že právě lektinové receptorové kinázy mají svůj význam při rozpoznávání molekulárních vzorců spojených s poškozením rostlin (DAMP), které může být zapříčiněno fyzickým poškozením od mikrobů či býložravců (Hou et al. 2019).

Lektiny rostlin můžeme dělit podle struktury na hololektiny, merolektiny, chimerolektiny a superlektiny. Merolektiny nemají katalytické schopnosti a jsou složeny především z jedné CRD domény (Peumans et al. 2001). Celkově bylo popsáno okolo 500 rostlinných lektinů (Van Damme et al. 1998). Mezi významné lektiny rostlin patří RCA (*Ricinus communis agglutinin*) ze skočce obecného a WGA (*wheat germ agglutinin*) ze pšenice seté neboli *Triticum vulgare* (Etzler 1985).

#### 3.4.4.2 Bakteriální a virové lektiny

Lektiny se mohou vyskytovat u prokaryotních organismů, a dokonce i u nebuněčných virů. V bakteriích jsou lektiny běžně přítomné ve fimbriích (pilusech), což jsou mikroskopické výběžky na povrchu bakterií sloužící ke konjugaci, ale i jiným buněčným interakcím (Sharon 1987). Svůj význam mají při usnadnění adheze a podstatné jsou i pro symbiózu (Nizet et al. 2017). Důležitou roli mají při určování tropismu (orientace organismů podle různé stimulace) symbionta nebo patogenu v průběhu interakce s hostitelskými glykany. Bakteriální a virové lektiny umožňují během infekce připojení těchto organismů k hostitelské buňce. Pomocí domény rozpoznávající sacharidy (CRD) se váží na glykanový receptor hostitele. Pro tuto svoji funkci se lektiny také nazývají adheziny (Hooper & Gordon 2001).

Většina bakterií má rozmanité množství adhezínů s odlišnou sacharidovou specifitou. U některých adhezínů nastává vazba pomocí CRD na koncové sacharidové zbytky. Avšak navázat se mohou i na vnitřní sekvence lineárních nebo i rozvětvených oligosacharidových řetězců (Nizet et al. 2017). Další lektiny, které se vážou na specifické glykany glykoproteinů na povrchu hostitelských buněk jsou hemagglutiny. Tento mechanismus navázání a vstoupení do cílových buněk využívají některé chřipkové viry a viry z čeledi Paramyxoviridae (Takimoto et al. 2002).

#### 3.4.4.3 Lektiny z hub

Většina lektinů hub se vyskytuje v plodnicích, výjimečně také v podhoubí (Khan & Khan 2011). Mají významnou roli při vývoji, růstu a morfogenezi hub. Klíčové jsou i při molekulárním rozpoznávání během symbiotického soužití hub s kořeny vyšších rostlin (mykorrhize). Účastní se také na začátku infekce při interakci s glykokonjugátem hostitele

(Singh et al. 2010). Byly popsány různé houbové lektiny. Z 82 % pocházely z hub, 15 % pocházelo z plísní a 3 % z kvasinek. Lektiny hub jsou charakteristické vysokou specifikou vůči mucinu a N-acetylgalaktosaminovým (GalNAc) zbytkům (Singh et al. 2011; Kobayashi & Kawagishi 2014).

#### 3.4.4.4 Lektiny z mořských řas

V biomedicínském výzkumu se lektiny řas využívají kvůli svým antivirovým, protizánětlivým a protinádorovým vlastnostem (Singh et al. 2015). Lektiny z řas jsou označovány také jako fykolektiny. Specifické jsou spíše v rámci glykoproteinů než u monosacharidů. Obsahují velké množství kyselých aminokyselin (glutamin, arginin, kyselina asparagová a glutamová). Pro svou biologickou aktivitu nevyžadují přítomnost kovových iontů. Mohou se dělit do tří skupin podle vazebných schopností na lektiny specifické pro vazbu na komplex N-glykanů, specifické lektiny typu N-glykanů s vysokým obsahem manózy a třetí skupinu, která obsahuje obě zmíněné vlastnosti (Hori et al. 1990; Rogers & Hori 1993).

#### 3.4.4.5 Živočišné lektiny

Lektiny u živočichů se podílejí na mnoha biologických procesech. Mezi ně patří fagocytóza, opsonizace, aktivace dráhy komplementu i imunitní odpověď (Sharon & Halina 1986; Gabius 1997). Významné jsou pro umožnění kontaktu s buňkami i rozpoznání patogenu. Lektiny typu X (interlektiny) mohou fungovat i v rámci vrozeného imunitního systému. Umí vázat mikrobiální glykany a eliminovat patogeny u mnoha obratlovců včetně ryb (Arasu et al. 2013). Živočišné lektiny mají identickou sekvenci aminokyselinových zbytků, u kterých se pohybuje velikost od 115-130 bází. Obsahují také vlastní CRD doménu, a proto jsou schopné vázat složité sacharidové struktury (Kilpatrick 2002). Podle požadavků na kationty a podle motivů sekvence CRD můžeme tyto lektiny dělit na galektiny (lektiny typu S), lektiny typu C (CTL), lektiny typu F, P-lektiny, pentraxiny a další podskupiny znázorněné v Tabulce 1 (Kumar et al. 2012; Mishra et al. 2019).

Galektiny jsou charakteristické vysoce homologní doménou typu S. U této domény je aktivita závislá na SH skupinách. Zároveň tato skupina lektinů má velkou afinitu k navázání  $\beta$ -galaktosidových zbytků. Uplatňují se při adhezi, regulaci apoptózy a migraci buněk. Mohou reagovat i s protilátkami a ovlivňovat také tvorbu metastáz (Krejsek & Kopecký 2004; Liu & Rabinovich 2005).

Lektiny typu C se nacházejí v membránách, séru a extracelulární matrix. Doména rozpoznávající sacharidy (CRD – carbohydrate recognition domain) váže sacharidové struktury. Vazba závisí na koncentraci vápníkových iontů, které se přímo zapojují do vazeb ligandu. Dále se mohou lektiny typu C dělit na selektiny, kolektiny a endocytární lektiny (Hatta et al. 1999; Krejsek & Kopecký 2004).

Lektiny typu P patří mezi transmembránové proteiny, které specificky vážou manózu-6-fosfát. Pentraxiny se podílejí na přirozené imunitní odpovědi a při akutní fázi zánětu. Patří mezi ně C-reaktivní protein (CRP) a sérový amyloidový protein (Mishra et al. 2019).

Lektiny typu I obsahují doménu Ig-like podobnou imunoglobulinům, která umožňuje rozpoznávání glykanů. Do této skupiny patří siglec lektiny (sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins). Lektiny imunoglobulinového typu vázající sialovou kyselinu jsou typické svou schopností regulovat signalizaci imunitních buněk. Mezi siglec lektiny patří například CD22, který zabraňuje nadměrné aktivaci imunitního systému a možnému rozvoji autoimunitních nemocí. Funguje totiž jako inhibitor pro receptor B-lymfocytů (Hatta et al. 1999; O'Reilly & Paulson 2009).

Tabulka 1. Rozdělení lektinů na podskupiny s příslušnými sacharidovými ligandy, jejich lokalizací a funkcí (převzato a upraveno podle Kumar et al. 2012).

Podskupina lektinů	Sacharidové ligandy	Lokalizace	Funkce
Calnexin	Glc <sub>1</sub> Man <sub>9</sub>	Endoplazmatické retikulum	Třídění proteinů v ER
M-typ	Man <sub>8</sub>	Endoplazmatické retikulum	Degradace glykoproteinů asociovaná s ER
L-typ	Různé	Endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát	Třídění proteinů
P-typ	Man-6-fosfát a další	Sekreční dráha (ER, GA, sekreční granula, lysosomy)	Třídění proteinů z GA, degradace glykoproteinů v ER
F-box lektiny	(GlcNAc) <sub>2</sub>	Cytoplazma	Degradace špatně sbalených proteinů
Fikoliny	GlcNAc, GalNAc	Plazmatická membrána, extracelulární prostor	Vrozená imunita
F-typ	Oligosacharidy zakončené fukózou	Extracelulární prostor	Vrozená imunita
Chitináze podobné lektiny	Chito-oligosacharidy	Extracelulární prostor	Metabolismus kolagenu
I-typ (siglec)	Sialové kyseliny	Plazmatická membrána	Buněčná adheze
C-typ	Různé	Plazmatická membrána, extracelulární prostor	Buněčná adheze, vrozená imunita
R-typ	Různé	Golgiho aparát, plazmatická membrána	Třídění enzymů, regulace glykoproteinových hormonů
S-typ (galektiny)	β-D-Gal	Extracelulární prostor, cytoplazma	Regulace cytoplazmatických dějů (apoptóza), prokřížení extracelulárních glykoproteinů
Interlektiny	Gal, galaktofuranóza, pentózy	Plazmatická membrána, extracelulární prostor	Vrozená imunita, oplodnění, embryogeneze

### 3.4.4.6 Rozdělení lektinů podle specifity k monosacharidům

Lektiny se mohou rozlišovat i podle afinity k jednotlivým sacharidům. Podle toho, které monosacharidy tyto lektiny rozpoznávají se dělí do pěti skupin. Preferovat mohou vazbu na fukózu (Fuc), manózu (Man), N-acetylglukosamin (GlcNAc), galaktózu/N-acetylgalaktosamin nebo N-acetylneuraminovou kyselinu (sialovou kyselinu). Sacharidy mohou být vázány v glykoproteinech, glykolipidech nebo na povrchu buněk na oligosacharidových zbytcích. Také se mohou vyskytovat volně (De Mejía & Prisecaru 2007). Specifita lektinů k jednotlivým sacharidům nemusí být absolutní. Na úrovni oligosacharidů není vazba tolik specifická. Vazebné vlastnosti a jejich specifita je zjišťována pomocí testů s inhibičními monosacharidy. Lektiny jako jsou *Lens culinaris* agglutinin (LCA) a konkavalin A (ConA) jsou specifické pro D-manózu/D-glukózu. Zároveň LCA na úrovni oligosacharidů vykazuje vyšší afinitu k mannosylovým glykanům s fukosylací než konkavalin A (Lis & Sharon 1998).

Tabulka 2. Znázornění vybraných lektinů podle jejich specifity vůči monosacharidům (převzato a upraveno podle Sharon & Lis 2013).

Sacharidy	Lektiny podle specifity
Fukóza (Fuc)	AAL, UEA-I, PSA, AOL, EEL, LABA
Manóza (Man)	ConA, AAA, GNA, HHL, LCA, NPA
N-acetylglukosamin (GlcNAc)	RCA, ABA, BDA, GSL-II, PVL, WFA, WGA, sWGA
galaktóza/N-acetylgalaktosamin (GalNAc)	CCL, DBA, VVA, WFA, MPA, SBA, RCA, PNA
N-acetylneuraminová (sialová) kyselina (Sia)	LFA, MAL, MAH, PSL, SNA, SSA, WGA



### 3.4.5 WGA a sWGA

WGA (Wheat Germ Agglutinin) je lektin, který se nachází v pšenici a dalších obilovinách. Je charakteristický svou schopností vázat se na oligosacharidy. Jedná se především o N-acetylglukosamin a N-acetylneuraminovou (sialovou) kyselinu. Tyto sacharidy jsou často přítomné na povrchu buněk či u hmyzu ve formě chitinu (Shewry et al. 2009). Mají společnou N-acetamidovou i sousední hydroxylovou skupinu. Tyto obě skupiny jsou umístěné v ekvatoriální poloze (Monsigny et al. 1980). WGA můžeme využít pro studium buněčných membrán (Kolay et al. 2023), detekci rakovinných buněk (Tsai et al. 2021), tak i pro výzkum zony *pellucida* (Wassarman & Litscher 2022). Nedávno byla zjištěna i schopnost vázat se na varianty alfa a beta SARS-CoV-2. Tím může dojít až k účinné inhibici infekce SARS-CoV-2 (Auth et al. 2021).

sWGA (Succinylated Wheat Germ Agglutinin) je modifikovaná forma Wheat Germ Agglutininu. Konkrétně došlo k přidání sukcinátové skupiny, která může měnit vlastnosti tohoto lektinu. Vazba WGA lektinu na glykokonjugáty obsahující N-acetylneuraminovou kyselinu může být ovlivněna i nábojem. Sukcinylovaný WGA je při fyziologickém pH nabitý záporně, zatímco WGA je nabitý kladně. sWGA tedy neváže glykokonjugáty obsahující sialovou kyselinu. Naopak je schopen selektivně vázat N-acetylglukosamin (Monsigny et al. 1980).

## **4 Metodika**

### **4.1 Odběr vaječníků a oocytů**

Oocyty byly aspirovány z vaječníků získaných na jatkách z prepubertálních prasnic. Vaječníky byly přepravovány v termolahvi ve vyhřátém (38 °C) fyziologickém roztoku (0,9 % chloridu sodného). V laboratoři byly vaječníky opláchnuty čistým fyziologickým roztokem a zpracovány do tří hodin po odběru. Oocyty byly z vaječníků získány pomocí aspirace. K aspiraci folikulární tekutiny s oocyty byla používána injekční stříkačka o objemu 20 ml s jehlou 20G.

### **4.2 Výběr oocytů**

Pomocí skleněné pipety byly vybrány pouze kvalitní oocyty s nepoškozenou cytoplazmou a s kompaktní vrstvou kumulárních buněk. Tyto oocyty byly následně přeneseny do modifikovaného média M199.

### **4.3 Kultivace *in vitro***

Oocyty byly třikrát promyty v kultivačním médiu a následně kultivovány v kultivačních miskách (NUNC, USA). Kultivace *in vitro* probíhala v modifikovaném médiu M199 (1 ml) do požadovaného stádia. Kultivační médium M199 bylo s pyruvátem sodným (0,25 mg/ml), gentamycinem (0,025 mg/ml), laktátem vápenatým (0,06 mg/ml), HEPES (1,5 mg/ml) a 10 % BFS (bovinním fetálním sérem). Kultivace probíhala v termostatu s 5 % CO<sub>2</sub> při teplotě 39 °C po dobu 24 h (stádium metafáze 1. meiotického dělení) nebo 46 hodin (stádium metafáze 2. meiotického dělení). Pro následné experimenty byly použity skupiny oocytů ve stádiu zárodečného váčku (GV) – bez kultivace, ve stádiu metafáze 1. meiotického dělení a ve stádiu metafáze 2. meiotického dělení.

### **4.4 Fixace oocytů**

Po příslušné době kultivace byly oocyty zbaveny kumulárních buněk pomocí skleněné pipety a promyty v PBS/1 % PVA. Následovala fixace oocytů ve 3,7 % paraformaldehydu po dobu 40 minut. Po fixaci byly oocyty opět opláchnuty v PBS/PVA a takto uchovávány.

### **4.5 Barvení a inkubace oocytů**

Pro experimenty byly použity dva vybrané lektiny. Konkrétně se jednalo o lektiny konjugované s biotinem sWGA (Succinylated Wheat Germ Agglutinin) a WGA (Wheat Germ Agglutinin). Každý experiment byl vždy 3x opakován a v každé skupině daného experimentu

bylo hodnoceno vždy 10 oocytů. Jednotlivé skupiny oocytů (GV, MI, MII) byly třikrát promyty v PBS (Phosphate-buffered saline) s 1% PVA (polyvinylalkoholem). Následně byly oocyty inkubovány s lektinem konjugovaný s biotinem v ředění 1:50 po dobu 45 minut. Po inkubaci byly oocyty třikrát promyty v PBS+ 1% PVA. Poté byly inkubovány se Streptavidinem konjugovaným s Fluoresceinem v ředění 1:1000. Inkubace probíhala 45 minut ve tmě při pokojové teplotě. Poté byly oocyty třikrát promyty v PBS+ 1% PVA a zamotovány na podložní sklíčko do Vectashieldu s DAPI. Ke každému experimentu byla vždy provedena negativní kontrola, kde byly oocyty inkubovány pouze se Streptavidinem konjugovaným s Fluoresceinem v ředění 1:1000.

## 4.6 Vyhodnocení

Nabarvené oocyty byly nasnímány pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 800 pod 400x zvětšením a vlnovou délkou 488nm pro všechny analyzované preparáty. Snímky z konfokálního mikroskopu byly analyzovány v programu pro analýzu obrazu NIS Elements. Měřena byla relativní intenzita signálu FITC v oblasti *zony pellucidy*. Výsledky byly dále zpracovány pomocí programu STATISTICA 12. Proběhla statistická analýza metodou jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVY). Hodnota  $P < 0,05$  byla považována za statisticky významnou.

## 4.7 Experimentální schéma

### 4.7.1 Imunofluorescenční detekce N-acetylglukosaminových struktur zony *pellucidy* pomocí lektinu WGA během meiotického zrání prasečích oocytů

Tento experiment byl zaměřen na detekci N-acetylglukosaminu a N-acetylneuraminové (sialové) kyseliny na *zoně pellucidě* u prasečích oocytů. Použity byly skupiny oocytů ve stádiu zárodečného váčku (GV), metafáze prvního meiotického dělení (MI) a metafáze druhého meiotického dělení (MII). Oocyty byly kultivovány *in vitro* v modifikovaném médiu M199. Vybrané sacharidové struktury byly rozpoznány pomocí imunofluorescenční detekce. Hodnocena byla relativní intenzita signálu jednotlivých skupin oocytů (GV, MI a MII) vztažená ke skupině oocytů v MII (100 %). Každý experiment byl 3x opakován a v každé skupině bylo hodnoceno vždy 10 oocytů.

### 4.7.2 Imunofluorescenční detekce N-acetylglukosaminových struktur zony *pellucidy* pomocí lektinu sWGA během meiotického zrání prasečích oocytů

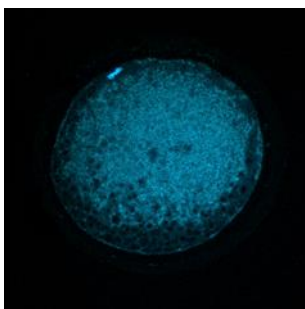
Tento experiment byl zaměřen na detekci N-acetylglukosaminu na *zoně pellucidě* během meiotického zrání prasečích oocytů pomocí lektinu sWGA. Použity byly oocyty ve stádiu zárodečného váčku (GV), metafáze prvního meiotického dělení (MI) a metafáze druhého meiotického dělení (MII). Oocyty byly kultivovány *in vitro* v modifikovaném médiu M199. Vybrané sacharidové struktury byly rozpoznány pomocí imunofluorescenční detekce. Hodnocena byla relativní intenzita signálu jednotlivých skupin oocytů (GV, MI a MII) vztažená ke skupině oocytů v MII (100 %). Každý experiment byl 3x opakován a v každé skupině bylo hodnoceno vždy 10 oocytů.

## 5 Výsledky

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, že u prasat během meiotického zrání oocytů dochází na *zoně pellucidě* k redistribuci N-acetylglukosaminových struktur. Pro rozpoznání těchto vybraných sacharidových struktur byly použity lektiny WGA, sWGA.

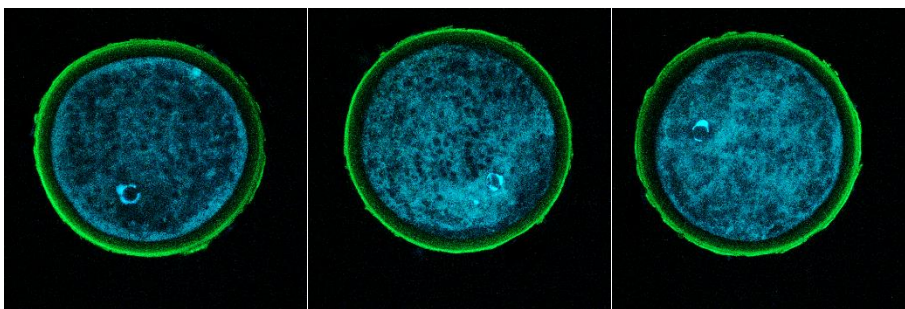
### 5.1 Imunofluorescenční detekce N-acetylglukosaminových struktur *zony pellucidy* pomocí lektinu WGA během meiotického zrání prasečích oocytů

Ke každému experimentu byla realizována negativní kontrola, kdy byly oocyty inkubovány se Streptavidinem konjugovaným s Fluoresceinem pro vyloučení nespecifické vazby Streptavidinu na struktury oocytu. Negativní kontrolou bylo potvrzeno, že u experimentu nedošlo k nespecifickým vazbám.

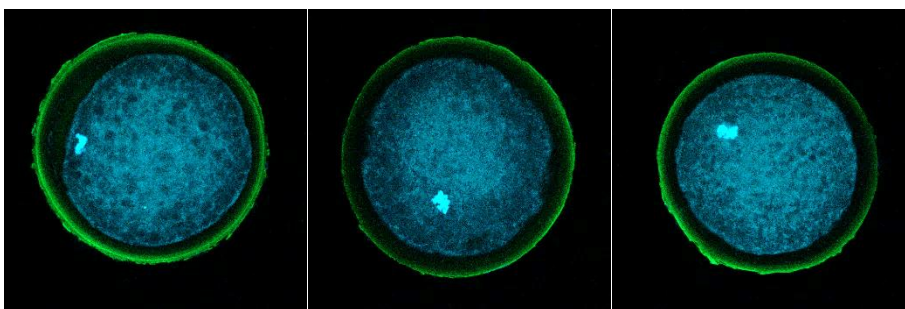


*Obrázek 7.* Negativní kontrola. Inkubace oocytů pouze se Streptavidinem konjugovaným s Fluoresceinem (FITC – značen zeleně; chromatin značen modře – DAPI). Oocyty byly snímány konfokálním mikroskopem se zvětšením 400x.

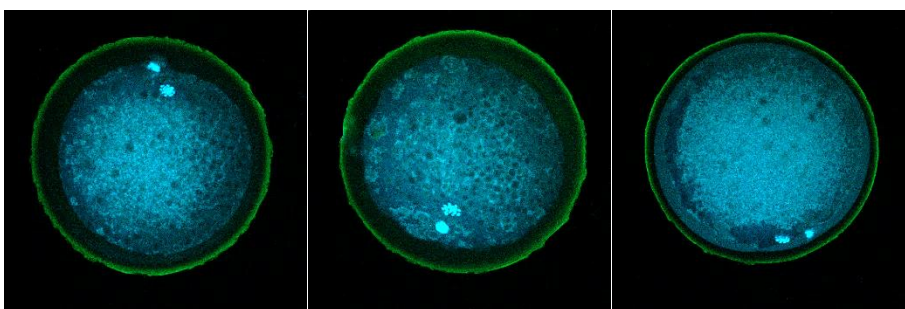
Při použití lektinů WGA byl v oblasti *zony pellucidy* patrný fluorescenční signál WGA lektinu, a to u všech třech pozorovaných stádií (GV, MI, MII). Statistické vyhodnocení ukázalo, že existuje alespoň jeden rozdíl v relativní průměrné intenzitě signálu mezi těmito skupinami. Po podrobném statistickém vyhodnocení pomocí Scheffého testu byl prokázán statisticky významný rozdíl v intenzitě signálu mezi oocyty ve stádiu MI a MII ( $p < 0,05$ ), kdy docházelo ke statisticky významnému poklesu relativní intenzity signálu lektinu WGA mezi skupinami oocytů ve stádiu MI a MII. Mezi skupinami oocytů ve stádiích GV a MI ani GV a MII nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl ( $p > 0,05$ ) (Obrázek 8, Obrázek 9, Obrázek 10).



*Obrázek 8.* Lokalizace vybraných sacharidových struktur na *zoně pellucidě* u oocytů ve stádiu GV pomocí lektinu WGA. Biotinem značený WGA lektin se specificky váže na N-acetylglukosamin a N-acetylneuraminové kyseliny. WGA je na snímcích označen zeleně. Modrou barvou je označen chromatin pomocí barviva DAPI. Oocyty byly snímány konfokálním mikroskopem se zvětšením 400x.



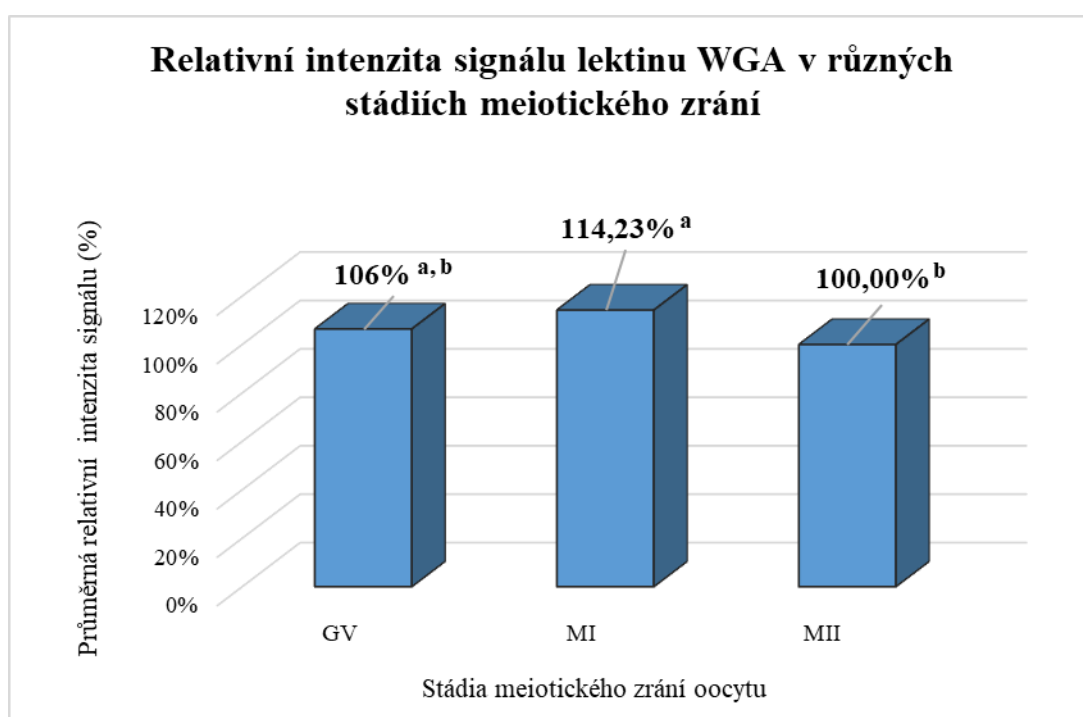
*Obrázek 9.* Lokalizace vybraných sacharidových struktur na *zoně pellucidě* u oocytů ve stádiu MI pomocí lektinu WGA. Biotinem značený WGA lektin se specificky váže na N-acetylglukosamin a N-acetylneuraminové kyseliny. WGA je na snímcích označen zeleně. Barvivo DAPI je modrou barvou a označuje chromatin. Oocyty byly snímány konfokálním mikroskopem se zvětšením 400x.



*Obrázek 10.* Lokalizace vybraných sacharidových struktur na *zoně pellucidě* u oocytů ve stádiu MII pomocí lektinu WGA. Biotinem značený WGA lektin se specificky váže na N-acetylglukosamin a N-acetylneuraminové kyseliny. WGA je na snímcích označen zeleně. Barvivo DAPI značí modrou barvou chromatin. Oocyty byly snímány konfokálním mikroskopem se zvětšením 400x.

*Tabulka 3.* Relativní intenzita signálu lektinu WGA během meiotického zrání prasečích oocytů. Intenzita signálu je zaznamenána jako průměrná relativní intenzita signálu vztažená ke skupině oocytů ve stádiu MII (100 %). N – počet hodnocených oocytů, GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku, MI – oocyty v metafázi prvního meiotického dělení, MII – oocyty v metafázi druhého meiotického dělení.

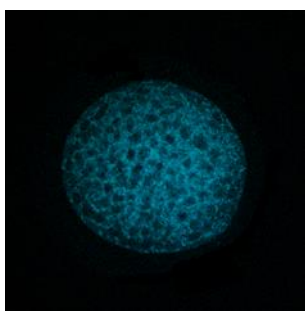
WGA	GV	MI	MII
N	30	30	30
Relativní intenzita signálu (%)	106	114,23	100



*Graf 1.* Relativní intenzita signálu lektinu WGA během meiotického zrání prasečích oocytů. Intenzita signálu je zaznamenána jako průměrná relativní intenzita signálu vztažená ke skupině oocytů ve stádiu MII (100 %). Odlišnými <sup>a, b</sup> superskripty je znázorněn statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými stádii oocytů ( $p < 0,05$ ).

## 5.2 Imunofluorescenční detekce N-acetylglukosaminových struktur *zony pellucidy* pomocí lektinu sWGA během meiotického zrání prasečích oocytů

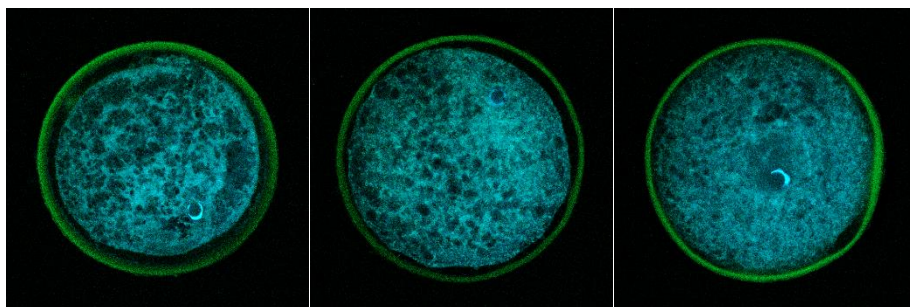
Negativní kontrola byla provedena ke každému experimentu. Oocyty byly inkubovány pouze se Streptavidinem konjugovaným s Fluoresceinem. Cílem bylo vyloučit nespecifickou vazbu streptavidinu na struktury oocytu. Negativní kontrola prokázala, že u tohoto experimentu nedošlo k nespecifickým vazbám.



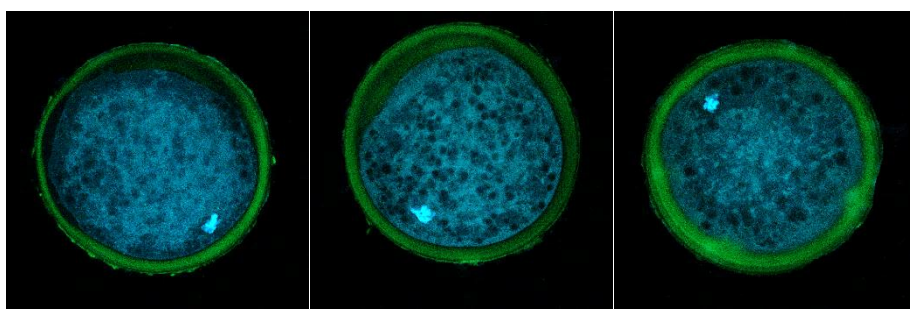
*Obrázek 11.* Negativní kontrola. Inkubace oocytů byla pouze se Streptavidinem konjugovaným s Fluoresceinem. Modrou barvou je pomocí barviva DAPI označen chromatin. FITC je značen zeleně. Oocyty byly nasnímány konfokálním mikroskopem se zvětšením 400x.

Po použití lektinu sWGA byl fluorescenční signál sWGA přítomný v oblasti *zony pellucidy* u všech třech sledovaných skupin oocytů (GV, MI, MII). Statistické vyhodnocení prokázalo, že existoval alespoň jeden rozdíl v relativní průměrné intenzitě signálu mezi těmito skupinami. Po detailním vyhodnocení Scheffého testem byl prokázán statisticky významný rozdíl v relativní intenzitě signálu mezi oocyty ve stádiu MI a MII. U oocytů ve stádiu GV a MII byl také pozorován statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ). Mezi těmito skupinami docházelo ke statisticky významnému poklesu relativní intenzity signálu sWGA lektinu. Naopak statisticky významný rozdíl nebyl prokázán mezi oocyty ve stádiu GV a MI ( $p > 0,05$ ). Jednotlivá stádia oocytů (GV, MI, MII) jsou zaznamenána na Obrázcích 12, 13, 14.

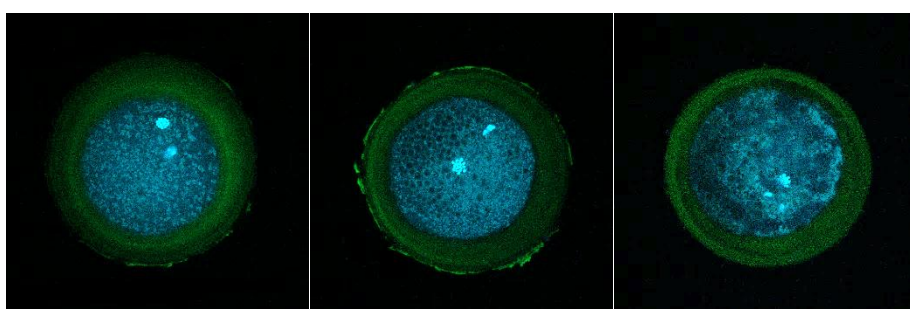




*Obrázek 12.* Lokalizace vybraných sacharidových struktur (N-acetylglukosaminu) na *zoně pellucidě* u tří oocytů v GV stádiu zobrazující fluorescenční signál sWGA. Biotinem značený sWGA lektin, který se specificky váže na N-acetylglukosamin je na snímcích označen zeleně. Modrou barvou je označen chromatin barvený pomocí barviva DAPI. Oocyty byly snímány konfokálním mikroskopem se zvětšením 400x.



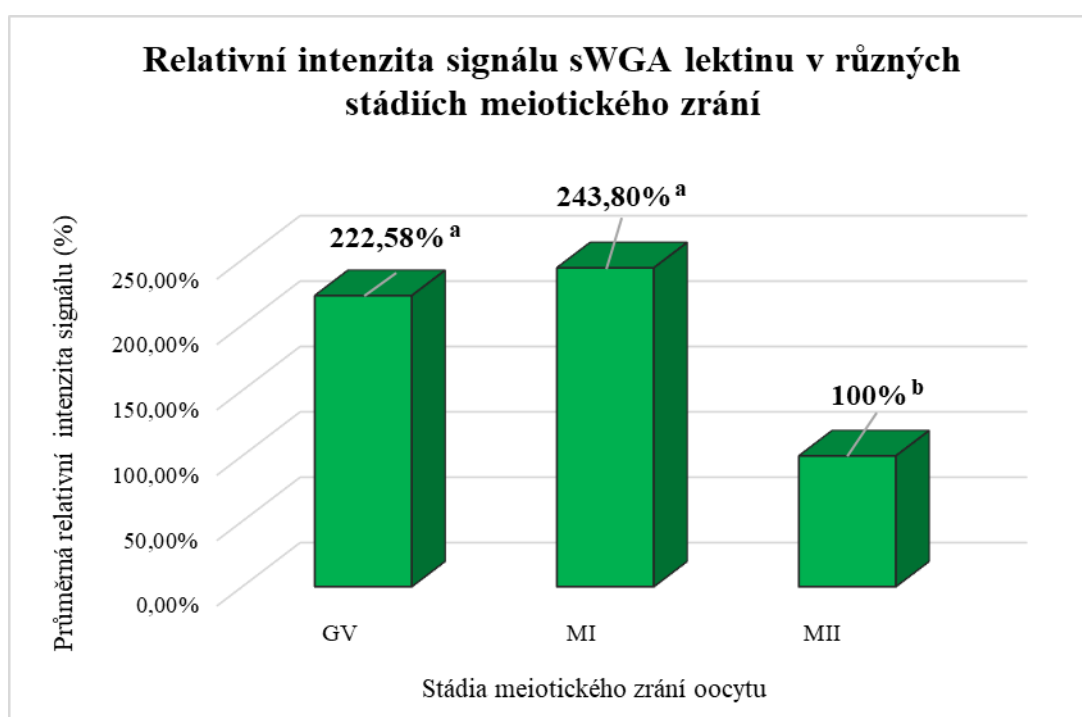
*Obrázek 13.* Lokalizace vybraných sacharidových struktur (N-acetylglukosaminu) na *zoně pellucidě* u tří oocytů v MI stádiu zobrazující fluorescenční signál sWGA. Biotinem značený sWGA lektin, který se specificky váže na N-acetylglukosamin je na snímcích označen zeleně. Modrou barvou je označen chromatin barvený pomocí barviva DAPI. Oocyty byly snímány konfokálním mikroskopem se zvětšením 400x.



*Obrázek 14.* Lokalizace vybraných sacharidových struktur (N-acetylglukosaminu) na *zoně pellucidě* u tří oocytů v MII stádiu zobrazující fluorescenční signál sWGA. Biotinem značený sWGA lektin, který se specificky váže na N-acetylglukosamin je na snímcích označen zeleně. Modrou barvou je označen chromatin barvený pomocí barviva DAPI. Oocyty byly snímány konfokálním mikroskopem se zvětšením 400x.

*Tabulka 4.* Relativní intenzita signálu sWGA v jednotlivých fázích meiotického zrání. Intenzita signálu je zaznamenána jako průměrná relativní intenzita signálu vztažená ke skupině oocytů ve stádiu MII (100 %). N – počet hodnocených oocytů, GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku, MI – oocyty v metafázi prvního meiotického dělení, MII – oocyty v metafázi druhého meiotického dělení.

sWGA	GV	MI	MII
N	30	30	30
Relativní intenzita signálu (%)	222,58	243,80	100



*Graf 2.* Relativní intenzita signálu sWGA během meiotického zrání prasečích oocytů. Intenzita signálu sWGA je zaznamenána jako průměrná relativní intenzita signálu vztažená ke skupině oocytů ve stádiu MII (100 %). Různé <sup>a,b</sup> superskripty znázorňují statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými stádii oocytů ( $p < 0,05$ ).

## 6 Diskuze

V procesu oplození hraje *zona pellucida* klíčovou roli. Tato matrice má totiž zásadní vliv na interakci spermie s vajíčkem. U prasete je složena ze třech glykoproteinů (ZP2, ZP3, ZP4) (Tumova et al. 2021). Výzkum funkce a struktury těchto glykoproteinů je důležitý pro bližší pochopení mechanismů probíhajících během oplození. Variabilita sacharidových struktur glykoproteinů *zony pellucidy* u jednotlivých živočišných druhů může souviset s druhově specifickou vazbou gamet. Tato diplomová práce se zabývala detekcí N-acetylglukosaminových struktur *zony pellucidy* oocytů prasete. Cílem bylo ověřit hypotézu, že během meiotického zrání *in vitro* podmínkách dochází k redistribuci N-acetylglukosaminu. N-acetylglukosamin (GlcNAc, NAG) je popsán jako derivát hroznového cukru (glukózy) s acetamidovou skupinou, která se naváže na 2' uhlík glukopyranózového cyklu (Smith et al. 2000). Pro rozpoznání těchto sacharidových struktur byly vybrány dva lektiny – WGA a sWGA. Lektin WGA se specificky váže na N-acetylglukosamin ( $\beta$ -D-GlcNAc) a N-acetylneuraminovou kyselinu (Neu5Ac). Lektin sWGA je specificky upraven (sukcinylován), a díky tomu rozpoznává jen N-acetylglukosaminové struktury ( $\beta$ -D-GlcNAc). Pomocí imunofluorescenční detekce byly sledovány vybrané sacharidové struktury oocytů ve stádiu zárodečného vajíčku (GV), v metafázi prvního meiotického dělení (MI) a metafázi druhého meiotického dělení (MII).

V našich experimentech se hodnotila relativní intenzita signálu fluorescenčně značených WGA a sWGA lektinů. V relativní intenzitě signálu WGA mezi oocyty ve stádiu MI a MII byl prokázán statisticky významný rozdíl. Mezi ostatními stádii u WGA nebyl statisticky významný rozdíl pozorován. Během meiotického zrání je patrná vyšší relativní intenzita WGA u oocytů ve fázi GV a MI. Z toho vyplývá, že zastoupení N-acetylglukosaminu a N-acetylneuraminové kyseliny na začátku meiotického zrání je poměrně bohaté. Naopak s přechodem do MII fáze dochází k významnému poklesu relativní intenzity signálu lektinu WGA a je tedy pravděpodobné, že dochází k odštěpení N-acetylglukosaminu a N-acetylneuraminové kyseliny ze *zony pellucidy* prasečího oocytu. Podobné výsledky nejsou ve vědecké literatuře doposud popsány. V dřívějších studiích byl již lektin WGA použit pro detekci sacharidových struktur, ale výsledky nebyly zaměřené na hodnocení rozdílů v intenzitě signálu daného lektinu. Ve studii, která se zaměřovala na oocyty divokých prasat byla pouze detekována přítomnost trisacharidů kyseliny neuraminové ( $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3,6)  $\beta$ -Gal-(1-4)-GlcNAc (sialidáza/RCA-I) a disacharidů C4 acetylované kyseliny neuraminové ( $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3,6)- $\alpha$ -Gal (KOH/sialidáza/GSA-IB4). Ta byla potvrzena v oocytech jak v preantrálních, tak i v antrálních folikulech. Detekovány byly také N-glukosaminové jednotky, a to jak v terminální pozici, tak i uvnitř řetězce daného glykanu (Parillo et al. 2001).

Sukcinylovaný Wheat Germ Agglutinin je modifikovaná forma Wheat Germ Agglutininu. Tento lektin se izoluje z pšeničných klíčků. sWGA je chemicky upraven přidáním sukcinylové skupiny na aminoskupinu proteinu WGA. Tato změna struktury umožní sukcinylovanému WGA specifickou vazbu pouze k N-acetylglukosaminu (GlcNAc). Toho jsme využili pro confirmaci výsledků získaných pomocí lektinu WGA.

V relativní intenzitě signálu sWGA byl zaznamenán statisticky významný rozdíl nejenom mezi oocyty ve stádiu MI a MII, ale i mezi oocyty ve stádiu GV a MII. Statisticky významný rozdíl nebyl prokázán mezi oocyty ve stadiu GV a MI.

Z toho můžeme vyvodit, že N-acetylglukosaminové struktury jsou na *zoně pellucidě* prasečích oocytů bohatě zastoupeny v počátečních fázích meiotického zrání a s přechodem do stádia metafáze druhého meiotického dělení dochází k jejich specifickému odštěpení. Odštěpení N-acetylglukosaminových struktur může být klíčové pro odhalení specifických vazebných míst rozpoznávaných spermií, ovšem tuto hypotézu by bylo potřeba vhodně ověřit.

Při porovnání relativních intenzit signálu obou lektinů mezi sebou byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi relativní intenzitou signálu WGA a sWGA, a to u všech popisovaných stádií (GV, MI, MII). U lektinu WGA byla detekována vždy vyšší relativní intenzita signálu, než u sWGA. To je pravděpodobně kvůli tomu, že WGA detekuje N-acetylglukosaminové struktury i N-acetylneuraminovou kyselinu a rozdíl těchto intenzit může být právě připisován vazbě WGA na tuto kyselinu. Největší statisticky významný rozdíl v relativní intenzitě signálu mezi WGA a sWGA byl zaznamenán v MII stádiu. Z toho vyplývá, že v MII fázi je na *zoně pellucidě* pravděpodobně přítomno více N-acetylneuraminové kyseliny než N-acetylglukosaminu. To by však bylo potřeba opět potvrdit vhodnými experimenty.

V glykoproteinech *zony pellucidy* byla prokázána přítomnost N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminových jednotek už i v dřívějších studiích. Parillo et al. (2005) prokázali přítomnost N-acetylglukosaminových jednotek na *zoně pellucidě* oocytů různých domácích i divokých přežvýkavců. Patrné však byly i rozdíly v množství a distribuci těchto sacharidových struktur na povrchu *zony pellucidy* (Parillo et al. 2005). Mendes et al. (2019) také detekovali N-acetylglukosamin v *zoně pellucidě* ve všech stádiích meiotického zrání oocytů odebraných z prepubertálních i dospělých prasnic. Podobně i Habibi et al. (2008) detekovali GlcNAc během meiotického zrání také ve všech fázích vývoje. Poukázali také na to, že N-acetylglukosaminové struktury mohou být významné pro interakci *zony pellucidy* se spermií. U lidských kapacitovaných spermií je pravděpodobné, že může N-acetylglukosamin redukovat vazbu na *zonu pellucidu* (Miranda et al. 1997). Výsledky některých studií naznačují, že se jednotky  $\beta$ -D-N-acetylglukosaminu mohou podílet také na zamezení oplodnění vajíčka více než jednou spermií. Naopak zbytky  $\beta$ -D-galaktózy a  $\alpha$ -D-manózy v *zoně pellucidě* u prasat mohou působit jako primární receptory spermií a případně i jako induktory akrozómové reakce (Song et al. 1999).

Provedenými experimenty bylo prokázáno, že lektin WGA má ke glykoproteinům *zony pellucidy* silnou afinitu. Tento lektin totiž účinně barví všechna stádia meiotického zrání oocytů (GV, MI, MII). Z toho vyplývá, že je na *zoně pellucidě* pravděpodobně významná přítomnost sialové kyseliny a N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminových zbytků (Habibi et al. 2008; Mendes et al. 2019). Signál u WGA lektinu se nevyskytoval pouze na povrchu *zony pellucidy*, ale dokonce ve všech vrstvách *zony pellucidy*. Z toho můžeme usuzovat, že struktury značené pomocí WGA nejsou jen v povrchové části, ale pravděpodobně i v celé vrstvě *zony pellucidy*. K podobným výsledkům došli i Parillo et al. (2005). Naopak menší afinitu vykazoval lektin WGA, což bylo již popsáno ve studii Pastor et al. (2008).

Studie Avilés et al. (1997) prokázala, že N-acetylglukosamin je přítomný na *zoně pellucidě* a je rozptýlený po celé matrix *zony pellucidy*. Na ZP3 byly zaznamenány O-vázané oligosacharidy jako trisacharidy s terminálním N-acetylglukosaminem (Avilés et al. 1997). V dalších studiích byl zaznamenán relativně malý výskyt N-acetylglukosaminu (Parillo et al. 2000; Parillo et al. 2001).

U *zony pellucidy* prasečích oocytů bylo prokázáno mnoho subterminálních  $\beta$ -N-acetylgalaktosaminových,  $\alpha$ -a  $\beta$ -galaktózových jednotek maskovaných neuraminovou kyselinou. Kromě toho  $\beta$ -N-acetylgalaktosamin,  $\beta$ -galaktosa-(1-3)-N-acetylgalaktosamin a  $\beta$ -galaktosa(1-4)-N-acetylglukosamin byly detekovány v sulfatované formě v terminálních pozicích glykanů (Parillo et al. 2001). N-acetylglukosamin se v glykoproteinech *zony pellucidy* nachází spíše uvnitř řetězce glykanu, než v terminální poloze (Parillo et al. 2000).

Některé studie popisují, že u oocytů v MI fázi dochází na *zoně pellucidě* k významným změnám ve složení glykanů (Pastor et al. 2008). Parillo et al. (2001) uvádějí, že na *zoně pellucidě* během meiotického zrání oocytů dochází také k prostorové redistribuci sacharidových zbytků S04Gal- $\beta$ -1,3GalNAc a N-acetylglukosaminu. Změna lokalizace jednotlivých sacharidových struktur je pravděpodobně způsobena biochemickými procesy probíhajícími na *zoně pellucidě* během meiotického zrání (Takahashi et al. 2013).

Výsledky našich experimentů potvrzují přítomnost a redistribuci N-acetylglukosaminu v *zoně pellucidě* u prasat ve všech sledovaných stádiích oocytu. Výskyt GlcNAc v glykoproteinech *zony pellucidy* u prasnic potvrzuje i studie Takahashi et al. (2013). Tato studie byla zaměřena na lokalizaci neredukujících konců u sacharidových řetězců glykoproteinů *zony pellucidy*. Detekovány byly  $\beta$ -Gal,  $\alpha$ -Man,  $\beta$ -GlcNAc a  $\alpha$ -sialová kyselina. N-acetylglukosamin byl přítomen u nezralých i zralých oocytů. Předpokládá se, že tyto koncové neutrální N-řetězce se podílejí u skotu a prasat na vazbě spermie se *zonou pellucidou* (Takahashi et al. 2013).

WGA i sWGA lektiny se v našich experimentech úspěšně specificky navázaly na prasečí *zonu pellucidu* ve všech stádiích meiotického zrání oocytu. sWGA byl zaznamenán i u jiných druhů, například byla prokázána u tohoto lektinu specifická vazba na *zonu pellucidu* u lidských oocytů (Maymon et al. 1994). U *zony pellucidy* lidských oocytů prostupoval signál WGA celou *zonou pellucidou*. Naopak signál sukcinylovaného WGA se vyskytoval především v centrální vrstvě *zony pellucidy* (Maymon et al. 1994). Výsledky našich experimentů u prasečích oocytů však prokázaly přítomnost a lokalizaci signálu lektinu, jak sWGA, tak i WGA v celém průměru *zony pellucidy*.

Pro porozumění přesného mechanismu redistribuce N-acetylglukosaminových i jiných sacharidových struktur glykoproteinů *zony pellucidy* během meiotického zrání je nezbytný další výzkum, a to nejenom u prasat.

## 7 Závěr

Studium redistribuce N-acetylglukosaminových struktur na *zoně pellucidě* napomáhá pochopení strukturních a funkčních změn probíhajících na *zoně pellucidě* během meiotického zrání prasečích oocytů. Tato diplomová práce byla zaměřena na ověření hypotézy, že během meiotického zrání dochází k redistribuci N-acetylglukosaminu na *zoně pellucidě* prasečích oocytů.

Realizovanými experimenty byl prokázán statisticky významný pokles v relativní intenzitě signálu lektinu WGA mezi oocyty ve stádiu MI a MII. U ostatních skupin nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl. Z dosažených výsledků je možné předpokládat, že N-acetylglukosamin a N-acetylneuraminová kyselina jsou nejvíce zastoupené u oocytů ve stádiu MI a s přechodem do stádia MII dochází pravděpodobně k jejich částečnému odštěpení, či zamaskování možné vazby s lektinem. Vzhledem k tomu, že lektin WGA se neváže pouze k N-acetylglukosaminovým strukturám, byl pro confirmaci výsledků použit lektin sWGA, který díky sukcinylaci dokáže specificky rozpoznávat pouze struktury N-acetylglukosaminu.

Při použití lektinu sWGA byl opět zaznamenán statisticky významný rozdíl v relativní intenzitě signálu mezi oocyty ve stádiu MI a MII, ale i mezi skupinami oocytů ve stádiu GV a MII. Naopak statisticky významný rozdíl nebyl prokázán mezi oocyty ve stadiu GV a MI. Zdá se tedy, že N-acetylglukosaminové struktury jsou nejvíce přítomné v GV a MI a s přechodem do metafáze druhého meiotického dělení opravdu dochází k odštěpování N-acetylglukosaminových struktur. Důležitost tohoto děje pro specifitu vazby spermie na vajíčko ovšem zůstává nejasná a lze jen navrhnout hypotézu, že odštěpení N-glukosaminových struktur může být klíčové pro odkrytí specifických vazebných míst na *zoně pellucidě* pro spermie. Pro potvrzení této hypotézy by bylo nezbytné realizovat sérii dalších experimentů i s využitím jiných lektinů, a také specifické vazebné testy.

Výsledky experimentů detekci a redistribuci N-acetylglukosaminových struktur pomocí lektinů WGA a sWGA potvrdily. Během meiotického zrání oocytů prasat dochází na *zoně pellucidě* k redistribuci N-acetylglukosaminových struktur. Hypotéza této diplomové práce byla tedy potvrzena.

## 8 Literatura

- André S, Kaltner H, Manning JC, Murphy PV, Gabius HJ. 2015. Lectins: Getting Familiar with Translators of the Sugar Code. *Molecules* **20**:1788–1823.
- Arasu A, Kumaresan V, Sathyamoorthi A, Palanisamy R, Prabha N, Bhatt P, Roy A, Thirumalai MK, Gnanam AJ, Pasupuleti M, Marimuthu K, Arockiaraj J. 2013. Fish lily type lectin-1 contains  $\beta$ -prism architecture: Immunological characterization. *Molecular Immunology* **56**(4):497–506.
- Auth J, Fröba M, Große M, Rauch P, Ruetalo N, Schindler M, Morokutti-kurz M, Graf P, Dolischka A, Prieschl-grassauer E, Setz C, Schubert U. 2021. Lectin from *Triticum vulgare* (WGA) Inhibits Infection with SARS-CoV-2 and Its Variants of Concern Alpha and Beta. *International Journal of Molecular Sciences* **22**:10205.
- Avilés M, Jaber L, Castells MT, Ballesta J, Kan FWK. 1997. Modifications of Carbohydrate Residues and ZP2 and ZP3 Glycoproteins in the Mouse Zona Pellucida after Fertilization. *Biology of Reproduction* **57**(5):1155–63.
- Baker TG. 1963. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* **158**:417–433.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Forti G. 2002. Signal transduction pathways in human spermatozoa. *Journal of Reproductive Immunology* **53**:121–131.
- Bansal P, Chakrabarti K, Gupta SK. 2009. Functional Activity of Human ZP3 Primary Sperm Receptor Resides Toward Its C-Terminus. *Biology of Reproduction* **81**:7–15.
- Barbeito C, Ortega H, Matiller V, Gimeno E, Salvetti N. 2013. Lectin-Binding Pattern in Ovarian Structures of Rats with Experimental Polycystic Ovaries. *Reproduction in Domestic Animals* **48**:850–857.
- Bercegeay S, Jean M, Lucas H, Barriere P. 1995. Composition of human zona pellucida as revealed by SDS-PAGE after silver staining. *Molecular Reproduction and Development* **41**:355–359.
- Black JL, Erickson BH. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record* **161**:45–55.
- Bleil JD, Beall CF, Wassarman PM. 1981. Mammalian sperm-egg interaction: Fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Developmental Biology* **86**:189–197.
- Bleil JD, Greve JM, 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**:376–385.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1980. Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* **20**:873–882.
- Bohlool BB, Schmidt EL. 1974. Lectins: A Possible Basis for Specificity in the Rhizobium—Legume Root Nodule Symbiosis. *Science* **185**:269–271.
- Bork P, Sander C. 1992. A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF- $\beta$  type III receptor. *FEBS Letters* **300**:237–240.

- Caballero-Campo P, Chirinos M, Xue JF, González-González M, Galicia-Chavarría M, Larrea F, Gerton GL. 2006. Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function. *Biology of Reproduction* **74**:760-768.
- Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT. 2001. Antioxidant Enzyme Activity and Oxidative Stress in Bovine Oocyte In Vitro Maturation. *IUBMB Life* **51**:57-64.
- Cha KY, Chian RC. 1998. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Human Reproduction Update* **4**:103-120.
- Chakravarty S, Kadunganattil S, Bansal P, Sharma RK, Gupta SK. 2008. Relevance of glycosylation of human zona pellucida glycoproteins for their binding to capacitated human spermatozoa and subsequent induction of acrosomal exocytosis. *Molecular Reproduction and Development* **75**:75-88.
- Chakravarty S, Suraj K, Gupta S. 2005. Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida. *Molecular Human Reproduction* **11**:365-372.
- Chan CKF, Ransom RC, Longaker MT. 2016. Lectins bring benefits to bones. *ELife* **5** (e18782) DOI: 10.7554/eLife.18782.
- Chiu PCN, Wong BST, Chung MK, Lam KKW, Pang RTK, Lee KF, Sumitro SB, Gupta SK, Yeung WSB. 2008. Effects of Native Human Zona Pellucida Glycoproteins 3 and 4 on Acrosome Reaction and Zona Pellucida Binding of Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction* **79**:869-877.
- Christou-Kent M, Dhellemmes M, Lambert E, Ray PF, Arnoult C. 2020. Diversity of RNA-Binding Proteins Modulating Post-Transcriptional Regulation of Protein Expression in the Maturing Mammalian Oocyte. *Cells* **9**(3):662.
- Clark GF, Zimmerman S, Lafrenz DE, Yi YJ, Sutovsky P. 2010. Carbohydrate-Mediated Binding and Induction of Acrosomal Exocytosis in a Boar Sperm-Somatic Cell Adhesion Model. *Biology of Reproduction* **83**:623-634.
- De Mejía EG, Prisecaru VI. 2007. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **45**:425-445.
- Díaz CL, Melchers LS, Hooykaas PJJ, Lugtenberg BJJ, Kijne JW. 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature* **338**: 579-581.
- Doherty CM, Tarchala SM, Radwanska E, de Jonge CJ. 1995. Characterization of Two Second Messenger Pathways and Their Interactions in Eliciting the Human Sperm Acrosome Reaction. *Journal of Andrology* **16**:36-46.
- Dun MD, Mitchell LA, Aitken RJ, Nixon B. 2010. Sperm-zona pellucida interaction: Molecular mechanisms and the potential for contraceptive intervention. *Handbook of Experimental Pharmacology* **198**:139-178.
- Dunbar BS, Avery S, Lee V, Prasad S, Schwahn D, Schwoebel E, Skinner S, Wilkins B. 1994. The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reproduction, Fertility, and Development* **6**:331-337.
- Etzler ME. 1985. Plant Lectins: Molecular and Biological Aspects. *Annual Review of Plant Physiology* **36**:209-234.
- Fahrenkamp E, Algarra B, Jovine L. 2020. Mammalian egg coat modifications and the block to polyspermy. *Molecular Reproduction and Development* **87**:326-340.



- Familiari G, Nottola SA, Micara G, Aragona C, Motta PM. 1988. Is the sperm-binding capability of the zona pellucida linked to its surface structure? A scanning electron microscopic study of human in vitro fertilization. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer* **5**:134–143.
- Familiari G, Relucenti M, Heyn R, Micara G, Correr S. 2006. Three-dimensional structure of the zona pellucida at ovulation. *Microscopy Research and Technique* **69**:415–426.
- Feng JM, Tian HF, Hu QM, Meng Y, Xiao HB. 2018. Evolution and multiple origins of zona pellucida genes in vertebrates. *Biology Open* **7**:11.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* **71**:836–848.
- Gabius HJ. 1997. Animal Lectins. *European Journal of Biochemistry* **243**:543–576.
- Gabius HJ. 2013. The history of lectinology. Pages 13–20 in Fang EF, Bun Ng T, editors. *Antitumor Potential and Other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB. 2011. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica* **113**:236–247.
- Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. 1980. What should be called a lectin? *Nature* **285**:66–66.
- Goudet G, Mugnier S, Callebaut I, Monget P. 2008. Phylogenetic Analysis and Identification of Pseudogenes Reveal a Progressive Loss of Zona Pellucida Genes During Evolution of Vertebrates. *Biology of Reproduction* **78**:796–806.
- Govind C, Gahlay G, Choudhury S, Gupta SK. 2001. Purified and Refolded Recombinant Bonnet Monkey (*Macaca radiata*) Zona Pellucida Glycoprotein-B Expressed in *Escherichia coli* Binds to Spermatozoa. *Biology of Reproduction* **64**:1147-52.
- Gupta SK, Yurewicz EC, Afzalpurkar A, Rao KVS, Gage DA, Wu H, Sacco AG. 1995. Localization of epitopes for monoclonal antibodies at the N-terminus of the porcine zona pellucida glycoprotein pZPC. *Molecular Reproduction and Development* **42**:220–225.
- Gupta SK. 2018. The Human Egg's Zona Pellucida. *Current Topics in Developmental Biology* **130**:379–411.
- Gupta SK, Bhandari B, Shrestha A, Biswal BK, Palaniappan C, Malhotra SS, Gupta N. 2012. Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell and Tissue Research* **349**:665–678.
- Gupta SK, Chakravarty S, Suraj K, Bansal P, Ganguly A, Jain MK, Bhandari B. 2007. Structural and functional attributes of zona pellucida glycoproteins. *Society of Reproduction and Fertility Supplement* **63**:203–216.
- Guthrie HD, Garrett WM. 1993. Apoptosis during folliculogenesis in pigs. *Reproduction Supplement* **58**:17- 29.
- Habibi RM, Hosseini Panah S, Fazael A. 2008. Lectin binding characteristic of murine zona pellucida during folliculogenesis; The importance of N-acetyl sugar derivates. *Journal of science* **33**(4):25-31.

- Han L, Monné M, Okumura H, Schwend T, Cherry AL, Flot D, Matsuda T, Jovine L. 2010. Insights into egg coat assembly and egg-sperm interaction from the X-ray structure of full-length ZP3. *Cell* **143**:404–415.
- Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG. 2009. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: The ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Sequence* **4**:361–393.
- Hart GW. 1992. Glycosylation. *Current Opinion in Cell Biology* **4**:1017–1023.
- 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**:245–255.
- Hatta Y, Tsuchiya N, Matsushita M, Shiota M, Hagiwara K, Tokunaga K. 1999. Identification of the gene variations in human CD22. *Immunogenetics* **49**:280–286.
- Haukedal H, Freude KK. 2021. Implications of Glycosylation in Alzheimer’s Disease. *Frontiers in Neuroscience* **14**:625348.
- Hedrick JL, Wardrip NJ. 1986. Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. *Analytical Biochemistry* **157**:63–70.
- Hedrick JL. 2007. A comparative analysis of molecular mechanisms for blocking polyspermy: identification of a lectin-ligand binding reaction in mammalian eggs. *Society of Reproduction and Fertility Supplement* **63**:409–419.
- Hedrick JL, Wardrip NJ. 1987. On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Developmental Biology* **121**:478–488.
- Helliwell TR. 1997. Lectin methods and protocol. *Methods Mol Med* **9**:73–94.
- Hokke CH, Damm JBL, Penninkhof B, Aitken RJ, Kamerling JP, Vliegenthart JFG. 1994. Structure of the O-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins. *European Journal of Biochemistry* **221**:491–512.
- Hoodbhoy T, Dean J. 2004. Insights into the molecular basis of sperm–egg recognition in mammals. *Reproduction* **127**:417–422.
- Hoodbhoy T, Joshi S, Boja ES, Williams SA, Stanley P, Dean J. 2005. Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **280**:12721–12731.
- Hooper LV, Gordon JI. 2001. Glycans as legislators of host–microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology* **11**:1–10.
- Hori K, Miyazawa K, Ito K. 1990. Some common properties of lectins from marine algae. *Hydrobiologia* **204**:561–566.
- Hou S, Liu Z, Shen H, Wu D. 2019. Damage-associated molecular pattern-triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science* **10**:453679.
- Hunt PA, Hassold TJ. 2008. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends in Genetics* **24**:86–93.
- Hunter M. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction* **5**:122–130.

- Izquierdo-Rico MJ, Jiménez-Movilla M, Llop E, Pérez-Oliva AB, Ballesta J, Gutiérrez-Gallego R, Jiménez-Cervantes C, Avilés M. 2009. Hamster zona pellucida is formed by four glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4. *Journal of Proteome Research* **8**:926–941.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* **428**:145–150.
- José O, Hernández-Hernández O, Chirinos M, González-González ME, Larrea F, Almanza A, Felix R, Darszon A, Treviño CL. 2010. Recombinant human ZP3-induced sperm acrosome reaction: Evidence for the involvement of T- and L-type voltage-gated calcium channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **395**:530–534.
- Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E, Wassarman PM. 2002. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nature Cell Biology* **4**:457–461.
- Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher ES, Wassarman PM. 2004. A duplicated motif controls assembly of zona pellucida domain proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:5922–5927.
- Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher ES, Wassarman PM. 2007. Features that affect secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins during mammalian oogenesis. *Society of Reproduction and Fertility Supplement* **63**:187–201.
- Katsumata T, Noguchi S, Yonezawa ZN, Tanokura M, Nakano M. 1996. Structural Characterization of the N-Linked Carbohydrate Chains of the Zona Pellucida Glycoproteins from Bovine Ovarian and Fertilized Eggs. *European Journal of Biochemistry* **240**:448–453.
- Kaur S, Kurokawa M. 2023. Regulation of Oocyte Apoptosis: A View from Gene Knockout Mice. *International Journal of Molecular Sciences* **24**:1345.
- Khan F, Khan MI. 2011. Fungal Lectins: Current Molecular and Biochemical Perspectives. *International Journal of Biological Chemistry* **5**:1-20.
- Kilpatrick DC. 2002. Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1572**:187–197.
- Kobayashi Y, Kawagishi H. 2014. Fungal lectins: A growing family. *Methods in Molecular Biology* **1200**:15–38.
- Krejsek J, Kopecký O. 2004. *Klinická imunologie. Nukleus HK, Hradec Králové.*
- Kudo K, Yonezawa N, Katsumata T, Aoki H, Nakano M. 1998. Localization of carbohydrate chains of pig sperm ligand in the glycoprotein ZPB of egg zona pellucida. *European Journal of Biochemistry* **252**:492–499.
- Kumar KK, Reddy GS, Reddy B, Shekar PC, Sumanthi J, Chandra KI. P. 2012. Biological role of lectins: A review. *Journal of Orofacial Sciences* **4**:20.
- Lakhtin V, Lakhtin M, Alyoshkin V. 2011. Lectins of living organisms. The overview. *Anaerobe* **17**:452–455.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **26**:283–291.
- Lay KM, Nakada T, Tatemoto H. 2012. The involvement of N-glycosylation of zona glycoproteins during meiotic maturation in sperm-zona pellucida interactions of porcine denuded oocytes. *Animal Science Journal* **84**:8-14.

- Lima M, Baynes JW. 2013. Glycation. Pages 405–411 in Lennarz WJ, Lane DM, editors. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*. Elsevier Inc, Amsterdam.
- Limback DS, Albertini DF. 2013. Imaging strategies for studying mammalian oogenesis. Pages 3–16 in Coticchio G, Albertini DF, De Santis L, editors. *Oogenesis*. Springer-Verlag, London.
- Lindsay LAL, Wallace MA, Hedrick JL. 2001. A hatching enzyme substrate in the *Xenopus laevis* egg envelope is a high molecular weight ZPA homolog. *Development, Growth & Differentiation* **43**:305–313.
- Lis H, Sharon N. 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews* **98**:637–674.
- Litscher ES, Wassarman PM. 2020. Zona Pellucida Proteins, Fibrils, and Matrix. *Annual Review of Biochemistry* **89**:695–715.
- Liu FT, Rabinovich GA. 2005. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews Cancer* **5**:29–41.
- Kolay J, Zhang P, Zhou X, Wan Z, Chieng A, Wang S. 2023. Ligand Binding-Induced Cellular Membrane Deformation is Correlated with the Changes in Membrane Stiffness. *Journal of Physical Chemistry B* **127**:9943–9953.
- Lucas X, Martínez EA, Roca J, Vázquez JM, Gil MA, Pastor LM, Alabart JL. 2002. Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology* **58**:871–885.
- Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A, Modina S. 2005. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a Co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: Role of cumulus cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. *Molecular Reproduction and Development* **71**:389–397.
- Maymon BS, Maymon R, Ben-Nun I, Ghetler Y, Shalgi R, Skutelsky E. 1994. Distribution of carbohydrates in the zona pellucida of human oocytes. *Reproduction* **102**:81–86.
- Mendes MHAF, Pinto MHB, Gimeno EJ, Barbeito CG, de Sant'Ana FJF. 2019. Lectin histochemical pattern on the normal and cystic ovaries of sows. *Reproduction in Domestic Animals* **54**(10):1366–1374.
- Miranda PV, Gonzalez-Echeverría F, Marin-Briggiler CI, Brandelli A, Blaquier JA, Tezón JG. 1997. Glycosidic residues involved in human sperm-zona pellucida binding in vitro. *Molecular Human Reproduction* **3**:399–404.
- Mishra A, Behura A, Mawatwal S, Kumar A, Naik L, Mohanty SS, Manna D, Dokania P, Mishra A, Patra SK, Dhiman R. 2019. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food and Chemical Toxicology* **134**:110827.
- Monsigny M, Roche AC, Sene C, Maget-Dana R, Delmotte F. 1980. Sugar-Lectin Interactions: How Does Wheat-Germ Agglutinin Bind Sialoglycoconjugates? *European Journal of Biochemistry* **104**:147–153.
- Moricard R, Moricard F. 1975. Espace périvitellin et réactions microvillositaires au cours de l'achèvement de la méiose et de la fécondation chez les Mammifères; orientation de recherches humaines. Pages 37–48 in Thibault C, editor. *La fécondation*. Collage Sociale Naturelle Etude Sterilite, Paris.

- Moros-Nicolás C, Chevret P, Jiménez-Movilla M, Algarra B, Cots-Rodríguez P, González-Brusi L, Avilés M, Izquierdo-Rico M.J. 2021. New Insights into the Mammalian Egg Zona Pellucida. *International Journal of Molecular Sciences* **22**:3276.
- Motlík J, Fulka J. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology* **198**:155–162.
- Nakano M, Yonezawa N, Hatanaka Y, Noguchi S. 1996. Structure and function of the N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida glycoproteins. *Journal of Reproduction and Fertility* **50**:25–34.
- Nakano M, Yonezawa N. 2001. Localization of Sperm Ligand Carbohydrate Chains in Pig Zona pellucida Glycoproteins. *Cells Tissues Organs* **168**:65–75.
- Nishio S, Okumura H, Matsuda T. 2018. Egg-Coat and Zona Pellucida Proteins of Chicken as a Typical Species of Aves. *Current Topics in Developmental Biology* **130**:307–329.
- Nizet V, Varki A, Aebi M. 2017. Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins. Chapter 37 in Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH, editors. *Essentials of Glycobiology* 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Noguchi S, Nakano M. 1992. Structure of the acidic N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (PZP3) from porcine zona pellucida. *European Journal of Biochemistry* **209**:883–894.
- Noguchi S, Yonezawa N, Katsumata T, Hashizume K, Kuwayama M, Hamano S, Watanabe S, Nakano M. 1994. Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1201**:7–14.
- O'Reilly MK, Paulson JC. 2009. Siglecs as targets for therapy in immune-cell-mediated disease. *Trends in Pharmacological Sciences* **30**:240–248.
- Ocampo MB, Ocampo LTC, Kanagawa H. 1991. Timing of sequential changes in chromosome configurations during the 1st meiotic division of pig oocytes cultured in vitro. *The Japanese journal of veterinary research* **38**:127–137.
- Okumura H, Kohno Y, Iwata Y, Mori H, Aoki N, Sato C, Kitajima K, Nadano D, Matsuda T. 2004. A newly identified zona pellucida glycoprotein, ZPD, and dimeric ZP1 of chicken egg envelope are involved in sperm activation on sperm–egg interaction. *Biochemical Journal* **384**:191–199.
- Olsnes S. 2004. The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon* **44**:361–370.
- Parillo F, Fagioli O, Dall'Aglio C, Verini-Supplizi A. 2000. Lectin histochemical detection of sulfoglycans in the zona pellucida of mammalian antral oocytes. *Acta Histochemica* **102**:193–202.
- Parillo F, Zelli R, Verini Supplizi A, Fagioli O, Gargiulo AM. 2005. Topographical localisation of glucidic residues and their variations in the canine zona pellucida during folliculogenesis. *Journal of Molecular Histology* **36**:131–137.
- Parillo F, Diverio S, Todini L, Fagioli O. 2001. Histochemical detection of the lectin-binding carbohydrates in the zona pellucida during oocyte growth in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Veterinary Research* **32**:581–590.

- Pastor LM, Lucas X, Pallares J, Bernal-Mañas CM, Martinez EA, Roca J, Vazquez JM, Morales E, Beltran E, Zuasti A, Ferrer C. 2008. Characterization of glycoside residues of porcine zona pellucida and ooplasm during follicular development and atresia. *Molecular Reproduction and Development* **75**:1473–1483.
- Patrat C, Serres C, Jouannet P. 2000. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the Cell* **92**:255–266.
- Pepling ME, Spradling AC. 2001. Mouse Ovarian Germ Cell Cysts Undergo Programmed Breakdown to Form Primordial Follicles. *Developmental Biology* **234**:339–351.
- Peumans WJ, Van Damme EJM, Barre A, Rougé P. 2001. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **491**:27–54.
- Peumans Willy J, Van Damme EJM. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* **109**:347.
- Pinkerton JH, McKay DG, Adams EC, Hertig A. 1961. Development of the Human Ovary—A Study Using Histochemical Technics. *Obstetrics & Gynecology* **18**:152–181.
- Pollard T, Earnshaw W, Lippincott-Schwartz JJG. 2016. *Cell biology*. Elsevier Philadelphia, Philadelphia.
- Prasad S, Wilkins B, Skinner SM, Dunbar BS. 1996. Evaluating zona pellucida structure and function using antibodies to rabbit 55 kDa ZP protein expressed in baculovirus expression system. *Molecular reproduction and development* **43**:519–529.
- Qi H, Williams Z, Wassarman PM. 2002. Secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins by growing mouse oocytes microinjected with epitope-tagged cDNAs for mZP2 and mZP3. *Molecular Biology of the Cell* **13**:530–541.
- Rahman ANMA, Abdullah RB, Wan-Khadijah WE. 2008. Gametogenesis, fertilization and early embryogenesis in mammals with special reference to goat: a review. *Journal of Biological Sciences* **8**:1115–1128.
- Rankin T, Dean J. 2000. The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Reviews of Reproduction* **5**:114–121.
- Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. 2019. Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews Nephrology* **15**:346–366.
- Rogers DJ, Hori K. 1993. Marine algal lectins: new developments. *Hydrobiologia* **260**:589–593.
- Rosano G, Caille AM, Gallardo-Ríos M, Munuce MJ. 2007. D-Mannose-binding sites are putative sperm determinants of human oocyte recognition and fertilization. *Reproductive BioMedicine Online* **15**:182–190.
- Sasanami T, Murata T, Ohtsuki M, Matsushima K, Hiyama G, Kansaku N, Mori M. 2007. Induction of sperm acrosome reaction by perivitelline membrane glycoprotein ZP1 in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction* **133**:41–49.
- Sharon N. 2009. *Lectins*. John Wiley & Sons. Chichester.
- Sharon N, Halina L. 1986. Applications of Lectins. Pages 293–370 in Liener IE, Sharon N, Goldstein IJ, editors. *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. Academic Press, Orlando.

- Sharon N, Lis H. 1972. Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. *Science* **177**:949–959.
- Sharon N, Lis H. 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American* **268**:82–89.
- Sharon N, Lis H. 2013. Lectins. Pages 701–705 in Lane DM, Lennarz WJ, editors. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Academic Press, Cambridge.
- Sharon N. 1987. Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. *FEBS Letters* **217**:145–157.
- Sharon N. 1998. Lectins: From obscurity into the limelight. *Protein Science* **7**:2042–2048.
- Sharon N. 2006. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1760**:527–537.
- Sharon N. 2008. Lectins: past, present and future. *Biochemical Society Transactions* **36**:1457–1460.
- Sharon N, Lis H. 1990. Legume lectins — a large family of homologous proteins. *The FASEB Journal* **4**:3198–3208.
- Sharon N, Lis H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **14**:53–62.
- Shewry PR, D'Ovidio R, Lafiandra D, Jenkins JA, Mills ENC, Békés F. 2009. Wheat Grain Proteins. *Wheat: Chemistry and Technology: Fourth Edition*. Pages 223–298 in Khan K, Shewry PR, editors. *Wheat*. Elsevier, Amsterdam.
- Shivers AC, Dunbar HS. 1977. Autoantibodies to zona pellucida: a possible cause for infertility in women. *Science* **197**:1082–1084.
- Shoubridge EA, Wai T. 2007. Mitochondrial DNA and the Mammalian Oocyte. *Current Topics in Developmental Biology* **77**:87–111.
- Singh RS, Bhari R, Kaur HP. 2010. Mushroom lectins: Current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology* **30**:99–126.
- Singh RS, Bhari R, Kaur HP. 2011. Current trends of lectins from microfungi. *Critical Reviews in Biotechnology* **31**:193–210.
- Singh RS, Thakur SR, Bansal P. 2015. Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research. *Critical Reviews in Microbiology* **41**:77–88.
- Sinowatz F, Kölle S, Töpfer-Petersen E. 2001. Biosynthesis and Expression of Zona pellucida Glycoproteins in Mammals. *Cells Tissues Organs* **168**:24–35.
- Sinowatz F, Töpfer-Petersen E, Kölle S, Palma G. 2001. Functional Morphology of the Zona Pellucida. *Anatomia, Histologia, Embryologia* **30**:257–263.
- Siracusa G. 1985. The proliferative and meiotic history of mammalian female germ cells. Pages 253–297 in Monroy A, Metz CB, editors. *The Biology of Fertilization*. Academic Press, New York.
- Slifkin M, Doyle RJ. 1990. Lectins and their application to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* **3**:197–218.
- Smith A, Datta S, Smith G, Campbell P, Bentley R. 2000. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Oxford University Press, New York.

- Song XX, Yang XZ, Iga K, Niwa K. 1999. Binding of Lectins to the Zona Pellucida of In Vitro Matured Pig Oocytes and Sperm-Oocyte Interaction In Vitro. *Journal of Mammalian Ova Research* **16**:23–30.
- Stockert RJ, Morell AG. 1983. Hepatic Binding Protein: The Galactose-Specific Receptor of Mammalian Hepatocytes. *Hepatology* **3**:750–757.
- Suzuki H, Yang X, Foote RH. 1994. Surface alterations of the bovine oocyte and its investments during and after maturation and fertilization in vitro. *Molecular Reproduction and Development* **38**:421–430.
- Takahashi K, Kikuchi K, Uchida Y, Kanai-Kitayama S, Suzuki R, Sato R, Toma K, Geshi M, Akagi S, Nakano M, Yonezawa N. 2013. Binding of sperm to the zona pellucida mediated by sperm carbohydrate-binding proteins is not species-specific in vitro between pigs and cattle. *Biomolecules* **3**:85–107.
- Takimoto T, Taylor GL, Connaris HC, Crennell SJ, Portner A. 2002. Role of the Hemagglutinin-Neuraminidase Protein in the Mechanism of Paramyxovirus-Cell Membrane Fusion. *Journal of Virology* **76**:13028–13033.
- 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**:790–799.
- Telfer EE, Anderson RA. 2019. The existence and potential of germline stem cells in the adult mammalian ovary. *Climacteric* **22**:22–26.
- Thim L. 1989. A new family of growth factor-like peptides 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmodic. *Elsevier* **250**:85-90.
- Töfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Tsoleva M. 2008. Glycobiology of fertilization in the pig. *The International Journal of Developmental Biology* **52**:717–736.
- Töpfer-Petersen E. 1999. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Human Reproduction Update* **5**:314–329.
- Töpfer-Petersen E, Mann K, Calvete JJ. 1993. Identification of Porcine Oocyte 55 kDa  $\alpha$  and  $\beta$  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 Hoppe-Seyler* **374**:411–418.
- Töpfer-Petersen E, Wagner A, Friedrich J, Petrunkina A, Ekhlasi-Hundrieser M, Waberski D, Drommer W. 2002. Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *Journal of Experimental Zoology* **292**:210–215.
- Tsai IJ, Su ECY, Tsai I L, Lin CY. 2021. Clinical assay for the early detection of colorectal cancer using mass spectrometric wheat germ agglutinin multiple reaction monitoring. *Cancers* **13**:2190.
- Tumova L, Zigo M, Sutovsky P, Sedmikova M, Postlerova P. 2021. Ligands and Receptors Involved in the Sperm-Zona Pellucida Interactions in Mammals. *Cells* **10**:133.
- Vakri A. 2009. *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Van Damme JM, Peumans JM, Pusztai WJ, Bardocz A, Bardocz S. 1998. *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications*. John Wiley & Sons, Hoboken.



- Van Damme ME. J. 2007. Carbohydrate-protein interactions: Plant lectins. *Comprehensive Glycoscience-From Chemistry to Systems Biology* **3**:563–599.
- Van Den Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* **63**:1717–1751.
- Van Duin M, Polman JEM, De Breet ITM, Van Ginneken K, Bunschoten H, Grootenhuis A, Brindle J, Aitken RJ, Organon NV. 1994. Recombinant Human Zona Pellucida Protein ZP3 Produced by Chinese Hamster Ovary Cells Induces the Human Sperm Acrosome Reaction and Promotes Sperm-Egg Fusion. *Biology of Reproduction* **51**:607–617.
- Vanderhyden B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience* **7**:22-2006.
- Walensky LD, Snyder SH. 1995. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *Journal of Cell Biology* **130**:857–869.
- Walker R. 1985. The use of lectins in histopathology. *Histopathology* **9**:1121–1124.
- Wassarman P. 1988. The Mammalian Ovum. Pages 69–102 in Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology Of Reproduction*. Raven Press, New York.
- Wassarman PM. 2003. Zona pellucida glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry* **57**:415–442.
- Wassarman PM. 2005. Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *Journal of Cellular Physiology* **204**:388–391.
- Wassarman PM. 2008. Zona pellucida glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* **283**:24285–24289.
- Wassarman PM, Litscher ES. 2018. The Mouse Egg's Zona Pellucida. *Current Topics in Developmental Biology* **130**:331–356.
- Wassarman PM, Litscher E. S. 2022. Mouse zona pellucida proteins as receptors for binding of sperm to eggs. *Trends in Developmental Biology* **15**:1-13.
- Wassarman PM, Mortillo S. 1991. Structure of the Mouse Egg Extracellular Coat, the Zona Pellucida. *International Review of Cytology* **130**:85–110.
- Wehrend A, Meinecke B. 2001. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. *Animal Reproduction Science* **66**:175–184.
- Weis WI, Drickamer K. 2003. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry* **65**:441–473.
- Witzendorff D, Maass K, Pich A, Ebeling S, Kölle S, Kochel C, Ekhlasi-Hundrieser M, Geyer H, Geyer R, Töpfer-Petersen E. 2009. Characterization of the acidic N-linked glycans of the zona pellucida of prepuberal pigs by a mass spectrometric approach. *Carbohydrate Research* **344**:1541–1549.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction* **1**:273–279.
- Yonezawa N. 2014. Posttranslational Modifications of Zona Pellucida Proteins. *Advances in experimental medicine and biology* **759**:111–140.

- Yonezawa N, Mitsui S, Kudo K, Nakano M. 1997. Identification of an N-Glycosylated Region of Pig Zona Pellucida Glycoprotein ZPB that is involved in Sperm Binding. *European Journal of Biochemistry* **248**:86–92.
- Yonezawa N, Nakano M. 2003. Identification of the carboxyl termini of porcine zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **307**:877–882.
- Yurewicz EC, Hibler D, Fontenot GK, Sacco AG, Harris J. 1993. Nucleotide sequence of cDNA encoding ZP3 $\alpha$ , a sperm-binding glycoprotein from zona pellucida of pig oocyte. *BBA - Gene Structure and Expression* **1174**:211–214.
- 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**:126–134.
- Yurewicz EC, Pack BA, Sacco AG. 1992. Porcine oocyte zona pellucida Mr 55,000 glycoproteins: Identification of O-glycosylated domains. *Molecular Reproduction and Development* **33**:182–188.
- 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**:7488–7494.
- Zhao M, Gold L, Ginsberg AM, Liang LF, Dean J. 2023. Conserved Furin Cleavage Site Not Essential for Secretion and Integration of ZP3 into the Extracellular Egg Coat of Transgenic Mice. *Molecular and Cellular Biology* **22**:3111–3120.

