

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Lokalizace vybraných sacharidových struktur během
meiotického zrání prasečích oocytů kultivovaných *in vitro*.**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Karolína Litošová

Biotechnologie a šlechtění zvířat

Vedoucí práce: Ing. Mgr. Tereza Krejčová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Lokalizace vybraných sacharidových struktur během meiotického zrání prasečích oocytů kultivovaných *in vitro*." 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 14.04. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou nastotísíckrát poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Ing. Tereze Krejčové, Ph.D. za čas, trpělivost, obrovskou ochotu, vstřícnost, přátelský přístup, věcné připomínky, a především za pomoc, kterou mi věnovala při zpracování této diplomové práce. Dále také pracovníkům Katedry veterinárních disciplín, jmenovitě Ing. Kateřině Havlíkové a Ing. Kristýně Melounové, za jejich čas a pomoc s experimenty. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům a rodině za jejich podporu a trpělivost během studia.

Lokalizace vybraných sacharidových struktur během meiotického zrání prasečích oocytů kultivovaných *in vitro*.

Souhrn

Zona pellucida je extracelulární glykoproteinový obal oocytů, který v průběhu oplození hraje důležitou roli při rozpoznání gamet a zabraňuje vzniku polyspermie. U prasat je ZP tvořena třemi druhy glykoproteinů – ZP2, ZP3 a ZP4. Během meiotického zrání dochází u glykoproteinů ke glykosylaci, sulfataci a sializaci, které jsou klíčové pro interakci spermie-zona pellucida. Právě rozdíly a přítomnost sacharidových zbytků ve strukturách zona pellucida a povrchových bílkovinách spermií mají významnou roli pro druhově specifickou vazbu spermií a indukci akrozomální reakce. Při primární vazbě se kapacitovaná spermie váže na neutrální N-glykany, poté dochází k akrozomální reakci a následuje sekundární vazba spermie na zona pellucida. Sacharidové složky glykoproteinů ZP lze detekovat pomocí lektinů. Lektiny jsou proteiny, které jsou schopné s vysokou specifitou nekovalentně vázat sacharidy a vytvářet s nimi glykokonjugované komplexy.

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, že během meiotického zrání dochází ke změnám lokalizace vybraných sacharidových struktur glykoproteinů zona pellucida prasečích oocytů. K ověření stanovené hypotézy byly realizovány experimenty založené na imunofluorescenční detekci vybraných sacharidových struktur pomocí specificky se vážajících lektinů RCA (*Ricinus communis agglutinin*) a ConA (*Canavalia ensiformis agglutinin*) u prasečích oocytů v různé fázi meiotického zrání (GV, MI a MII). ConA se specificky váže na struktury D-manózy a RCA rozpoznává řetězec galaktózy vázané na N-acetylglukosamin. Obě tyto sacharidové struktury tvoří významnou sacharidovou složku glykoproteinů zona pellucida.

Z výsledků experimentů zaměřených na imunofluorescenční detekci struktur D-manózy prostřednictvím lektinu ConA je patrné, že dochází k signifikantnímu nárůstu relativní intenzity signálu ConA mezi prasečími oocyty ve fázi GV a MI. Při hodnocení výsledků experimentů zaměřených na detekci řetězce galaktózy vázané na N-acetylglukosamin pomocí lektinu RCA byl opět pozorován signifikantní nárůst relativní intenzity signálu RCA mezi prasečími oocyty ve fázi GV a MI. Hypotézu této diplomové práce se tedy podařilo potvrdit. Je možné, že zmíněné sacharidové struktury a jejich epitopy mohou hrát roli v kontaktu spermie se zónou pellucidou, také je možné, že tato změna sacharidové struktury glykoproteinů zona pellucida je nezbytná pro odkrytí klíčových vazebných epitopů rozpoznávaných spermií.

Klíčová slova: Glykoproteiny, *in vitro* maturace, lektiny, oocyty, zona pellucida

Localization of selected carbohydrate structures during meiotic maturation of porcine oocytes cultured *in vitro*.

Summary

Zona pellucida is the extracellular glycoprotein membrane of oocytes, which plays an important role in gamete recognition during fertilization and prevents polyspermy. In pigs, the ZP is composed of three types of glycoproteins - ZP2, ZP3 and ZP4. During meiotic maturation, glycoproteins undergo glycosylation, sulfation and sialation, which are crucial for sperm-*zona pellucida* interaction. It is the differences and the presence of carbohydrate residues in *zona pellucida* structures and sperm surface proteins that play an important role in species-specific sperm binding and induction of the acrosomal response. In primary binding, the capacitated sperm binds to neutral N-glycans, followed by the acrosomal reaction and then secondary binding of the sperm to the *zona pellucida*. The carbohydrate components of ZP glycoproteins can be detected by lectins. Lectins are proteins that are able to bind carbohydrates non-covalently and form glycoconjugated complexes with high specificity.

The aim of this thesis was to test the hypothesis that during meiotic maturation, changes in the localization of selected carbohydrate structures of *zona pellucida* glycoproteins in porcine oocytes occur. To verify the hypothesis, experiments based on immunofluorescence detection of selected carbohydrate structures using specifically binding lectins RCA (*Ricinus communis agglutinin*) and ConA (*Canavalia ensiformis agglutinin*) were performed in porcine oocytes at different stages of meiotic maturation (GV, MI and MII). ConA specifically binds to D-mannose structures and RCA recognizes the galactose chain bound to N-acetylglucosamine. Both of these carbohydrate structures constitute an important carbohydrate component of *zona pellucida* glycoproteins.

The results of experiments focused on the immunofluorescence detection of D-mannose structures by the lectin ConA show that there is a significant increase in the relative intensity of the ConA signal between porcine oocytes in the GV and MI phase. When evaluating the results of experiments aimed at detecting the N-acetylglucosamine-linked galactose chain via the RCA lectin, a significant increase in the relative intensity of the RCA signal was again observed between porcine oocytes in the GV and MI phase. Thus, the hypothesis of this thesis was confirmed. It is possible that the aforementioned carbohydrate structures and their epitopes may play a role in sperm contact with the *zona pellucida*, it is also possible that this change in the carbohydrate structure of *zona pellucida* glycoproteins is necessary to uncover key binding epitopes recognized by sperm.

Keywords: Glycoproteins, *in vitro* maturation, lectins, oocytes, *zona pellucida*

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3 Literární rešerše.....	3
3.1 Oogeneze	3
3.1.1 Vývoj zárodečných buněk	3
3.1.2 Folikulogeneze a fáze růstu oocytů	4
3.1.3 Fáze zrání oocytů.....	6
3.1.3.1 Cytoplazmatické zrání.....	8
3.1.3.2 Faktory regulující meiotické zrání	9
3.2 Zona pellucida	13
3.2.1 Vznik <i>zona pellucida</i> , změny během fertilizace.....	14
3.2.2 <i>Zona pellucida</i> prasete.....	16
3.2.3 Glykoproteiny <i>zona pellucida</i> , jejich funkce a struktura.....	18
3.3 Lektiny	20
3.3.1 Struktura lektinů	21
3.3.2 Druhy lektinů	21
3.3.3 Vlastnosti a funkce lektinů	25
3.3.4 Stručný popis vybraných lektinů	26
4 Materiál a metodika.....	28
5 Výsledky.....	30
5.1 Imunofluorescenční detekce vybraných sacharidových struktur glykoproteinů <i>zona pellucida</i> pomocí lektinu RCA.....	30
5.2 Imunofluorescenční detekce vybraných sacharidových struktur glykoproteinů <i>zona pellucida</i> pomocí lektinu ConA	31
6 Diskuze	33
7 Závěr	36
8 Literatura.....	37
9 Seznam použitých zkratk.....	53

1 Úvod

Zona pellucida je glykoproteinový obal oocytů, který má významnou roli v procesu fertilizace a je zodpovědný za druhově specifické rozpoznání a vazbu gamet. Druhová specifita je podle všeho zajištěna přítomností sacharidových struktur na jejím povrchu. *Zona pellucida* se podílí i na dalších biologických dějích, např. na ochraně oocytu nebo bloku polyspermie. U prasat se *zona pellucida* skládá ze tří glykoproteinů: ZP2, ZP3 a ZP4, které na sebe váží velké množství N- a O-glykanů (Wassarman 1988). Glykoproteiny vykazují velkou heterogenitu molekulové hmotnosti a náboje, což je způsobeno posttranslačními modifikacemi, jako jsou glykosylace, sulfatace a sializace. K těmto modifikacím prasečích ZP glykoproteinů dochází i během meiotického zrání oocytů a jsou pravděpodobně klíčové pro interakci spermie-*zona pellucida*. Glykoproteiny mají různý počet potencionálních N-glykosylačních míst - ZP2 má šest, ZP3 má tři a ZP4 jich má pět. Sacharidové zbytky glykoproteinů mají klíčovou roli pro druhově specifickou vazbu spermií, avšak jejich přesná role není úplně přesně známa a definována.

K detekci sacharidových struktur glykoproteinů lze využít speciálních bílkovin zvaných lektiny, které se vyskytují u většiny druhů organismů, od virů až po rostliny a živočichy. Jedná se o proteiny, které jsou schopné rozpoznat a s vysokou specifitou nekovalentně vázat i sacharidové zbytky glykoproteinů *zona pellucida* a vytvářet s nimi glykokonjugované komplexy. Např. lektin RCA (*Ricinus communis agglutinin*), který je rostlinného původu, se specificky váže na řetězec galaktózy vázané na N-acetylglukosamin nebo lektin ConA (*Canavalia ensiformis agglutinin*) se specifitou na struktury D-manózy. Lektiny jsou vhodnými biochemickými nástroji pro výzkum interakcí bílkovina-sacharid a mohou tedy sloužit i k detailnímu popisu sacharidových struktur glykoproteinů *zona pellucida*, včetně studia jejich možné redistribuce během meiotického zrání prasečích oocytů.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotézou diplomové práce je, že během meiotického zrání dochází ke změnám lokalizace vybraných sacharidových struktur glykoproteinů *zona pellucida* prasečích oocytů.

Cílem této diplomové práce je ověření hypotézy vhodnými experimenty zaměřenými na imunofluorescenční detekci vybraných sacharidových struktur pomocí specificky se vážících lektinů.

3 Literární rešerše

3.1 Oogeneze

Oogeneze je děj, při kterém dochází k vývoji zralé samičí zárodečné buňky – vajíčka. Začíná již v embryonálním vývoji samice, pokračuje v pubertě a končí v období klimakteria (Limback 2013). Jedná se o dlouhý proces, během kterého se z primordiálních zárodečných buněk (primordial germ cells – PGC) diferencuje oocyt, který následně roste a maturuje (Wassarman 1999). Oogeneze končí vznikem vajíčka, které je schopno oplození (Barresi 2020).

3.1.1 Vývoj zárodečných buněk

Diferenciace a vývoj primordiálních zárodečných buněk (PGC) je ranou událostí embryogeneze savců, která je klíčová pro zajištění plodnosti jedince a správného přenosu genetické informace na další generaci (De Felici 2013).

K diferenciaci PGC dochází v entodermu žlutkového vřívku embrya. Během časně gastrulace embrya dochází k pasivní migraci primordiálních zárodečných buněk z kaudální strany žlutkového vřívku do epitelu prvostřeva, a poté se améboidním pohybem přemístí do zakládající se pohlavní lišty – místa vývoje gonád (Wassarman & Albertini 1994). U prasečího embrya byly PGC pozorovány již 18. den vývoje (Black 1968). Jakmile se PGC usídlí v epitelu budoucího vaječníku, dochází k jejich zanoření do korové vrstvy a jejich diferenciaci na oogonie (Wassarman 1988).

Oogonie jsou buňky oválného tvaru (Wassarman 1988), ve kterých se nachází vezikulární jádra s 1-3 jádérky, cytoplazma, mitochondrie a mohou se zde již vyskytovat cisterny a tubuly drsného endoplazmatického retikula (Sathanathan 2000). Pro oogonie je také charakteristické intenzivní mitotické dělení, během kterého mají tendenci vytvářet shluky – syncytia, která jsou spojena za pomoci spojení gap junctions (Wassarman 1988; Sathanathan 2000). Jakmile jsou oogonie obklopeny buňkami z mezonefros, dochází k replikaci DNA a zahájení meiózy. Po vstupu do meiózy jsou narušeny spoje gap junction a oogonie se již nazývají oocyty (Wassarman 1988).

Meióza označuje proces dvou po sobě následujících dělení, při kterých dochází k redukci počtu chromozomů. Výsledkem je tedy buňka s haploidním počtem chromozomů. Tento proces je zahájen již během prenatálního vývoje (Sathanathan 2006). První fází meiotického dělení je profáze I, která je rozdělena do pěti stádií: leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze (Hillers 2017). Ve stádiu leptotene dochází v jádře ke kondenzaci a spiralizaci chromozomů. Ve stádiu zygotene kondenzace chromozomů pokračuje, chromozomy se zkracují a vytváří se bivalenty. Během pachytene chromozomy dokončují spiralizaci, párové chromozomy se zkracují a dochází ke crossing-overu a rekombinaci genů (Sathanathan 2000). Ve fázi diplotene (dictyate) se chromatidy postupně oddálí, spojeny jsou pouze v místě chiazmat, která jsou terminalizovaná. Meióza se zastavuje a nastává první meiotický blok. Buňky se označují jako primární oocyty (Wassarman 1988). U prasnic začíná meióza 40. až 50. den prenatálního vývoje a pokračuje do 5. až 20. dne po narození (Black 1968). Meiotické dělení je znovuzahájeno po tzv. fázi růstu oocytu, kterého se účastní jen plně dorostlé oocyty (Wassarman 1988). S iniciací meiózy dochází ke ztrátě mezibuněčných spojů a oocyty

se začínají obklopotvat jednou vrstvou pregranulózních buněk, které tvoří základ granulózních buněk pozdějšího tzv. primordiálního folikulu (Homa 1996).

3.1.2 Folikulogeneze a fáze růstu oocytů

Savčí oocyty se vyvíjejí a dosahují ovulační zralosti uvnitř folikulů, kde jsou nejprve tvořeny pre-granulózními a poté granulózními buňkami. V průběhu procesu vývoje folikulu dochází k proliferaci granulózních buněk a vzniku vrstvy *theca folliculi*, která folikulu zajišťuje krevní zásobení (Van den Hurk 2005). Podle velikosti a úrovně diferenciací folikulárních buněk se ovariální folikuly dělí na primordiální, primární, sekundární a terciární (označovaný také jako zralý nebo Graafův) folikul (Motta 2002) (viz obr. 1). V průběhu růstu folikulu dochází i k významným změnám vnitřní struktury oocytu (Sathanathan 2006) a k mnohonásobnému (300x) zvětšení objemu folikulu (Gosden 2002). U prasete se z přibližně 420 tisíc primárních folikulů dále vyvíjí pouze 84 tisíc folikulů (Miyano 2005). Současně s vývojem a růstem folikulu dochází také k růstu oocytu (Wassarman 1994). Během první fáze růstu a diferenciací folikulu se granulózní buňky mění z dlaždicových buněk na buňky kubické (Braw-Tal 2002).

Primordiálním folikulem se rozumí oocyt prvního řádu (primární oocyt), který je obklopen jednou vrstvou plochých pre-granulózních buněk a intaktní bazální laminou (Wassarman 1994). V oocytu probíhají kvalitativní i kvantitativní změny molekul klíčových pro metabolismus a dochází také k nárůstu počtu cytoplazmatických organel. V cytoplazmě primárních oocytů se nachází jádro s kondenzovaným chromatinem a jadérky, která jsou uspořádaná do sítí. V oocytu probíhá intenzivní transkripce a translace (Wassarman 1994). Období, ve kterém primordiální folikul přechází do fáze folikulu primárního, je dlouhé a během této etapy mohou folikuly obsahovat současně buňky granulózní, kubické, ale i buňky dlaždicové (Fortune 2003). Předpokládá se, že oocyt řídí jak proliferaci, tak diferenciaci granulózních buněk v buňky schopné sekrece steroidů a různých proteinů. Fyziologické děje v oocytu, jako je růst, diferenciací, meióza nebo cytoplazmatické zrání, jsou naopak závislé na přítomnosti a kontaktu s granulózními buňkami (Van den Hurk 2005).

Když se z granulózních buněk vytvoří dvě nebo více vrstev, vzniknou sekundární folikuly (nazývané také jako preantrální nebo multilaminární folikuly – MUF). V této fázi vývoje folikulu vstupuje oocyt do fáze intenzivního růstu, který je nezbytný pro pokračování jaderného zrání a budoucí oplození, okolní granulózní buňky více proliferují a kolem granulózy se z intersticiálních buněk stromatu vytváří vrstva *theca folliculi* (Van den Hurk 2005). V této fázi mohou folikuly dosahovat v průměru až 300 μm (Araújo 2014). Během zvětšování objemu se oocyty také diferencují (Picton 1998). Probíhá intenzivní syntéza RNA a proteinů, zvyšuje se počet ribozomů, mitochondrií a dalších buněčných organel. Mnohé organely se vzhledově mění a přesouvají se směrem k periférii oocytu (Méduri 2002). Jedna z nejmarkantnějších změn během růstové fáze oocytu je sekrece glykoproteinové membrány, *zona pellucida* (ZP), která se skládá se ze tří typů glykoproteinů: ZP1, ZP2 a ZP3. Tyto glykoproteiny se postupně začínají ukládat do matrix *zona pellucida* a v cytoplazmě oocytu se vytvářejí kortikální granula. Folikul v tomto období začíná reagovat na gonadotropiny (Fair 2003). Výsledkem fáze růstu oocytu je plně dorostlý oocyt ve stádiu zárodečného váčku (germinal vesicle – GV), který

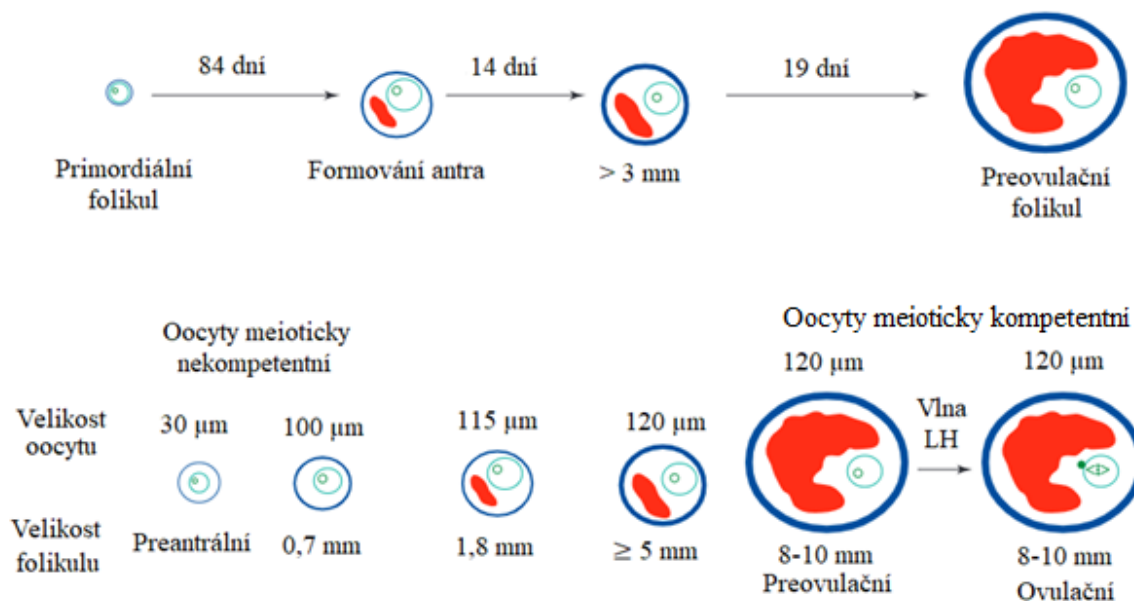
je součástí sekundárního folikulu (Wassarman 1994). Tento oocyt také dosáhl plné meiotické kompetence, tedy schopnosti znovu zahájit a dokončit meiotické zrání (Wassarman 1994).

Meiotická kompetence je schopnost oocyty znovu obnovit a dokončit meiotické zrání, a je závislá na velikosti oocyty a folikulu. U prasat je meioticky kompetentní oocyt veliký 120 μm a rostoucí folikul je větší než 3 mm (Wassarman 1994).

Kortikální granula jsou malé útvary, které se nacházejí v neoplozených oocytech (Wassarman 1994). Po oplození dochází ke kortikální reakci, při které se uvolní obsah kortikálních granul do perivitelinního prostoru mezi *zona pellucida* a plazmatickou membránou oocyty. Obsah granul zahrnuje především proteolytické enzymy, které mění strukturu *zona pellucida*. Díky této reakci zabraňují kortikální granula penetraci dalších spermií do oocyty a tím vzniku polyspermie (jev, při kterém je vajíčko oplozeno více spermiemi) (Wang 1997).

Pro antrální folikuly je charakteristická tvorba dutiny, antrum, uvnitř vícevrstevné granulózy. Antrum je vyplněno tekutinou, která slouží jako důležitý zdroj regulačních a modulačních látek pocházejících z krve nebo sekretu folikulárních buněk, např. gonadotropinů, enzymů, růstových faktorů, proteoglykanů nebo lipoproteinů (Hyttel 2001). V důsledku přibývajících folikulárních tekutin se folikul zvětšuje, pokračuje proliferace a diferenciací buněk, formuje se bazální lamina, *theca folliculi interna* a *theca folliculi externa* (Van den Hurk 2005). V buňkách *theca folliculi interna* se vytváří receptory pro luteinizační hormon (LH) a v granulózních buňkách se tvoří receptory pro folikulostimulační hormon (FSH) a estrogen (Wassarman 1988). Po všech těchto krocích nastává konečné stádium folikulogeneze – je vytvořen terciární folikul, označovaný též jako Graafův folikul (Eppig 2001).

Vývoj antrálního folikulu, na rozdíl od předchozích stádií, je plně závislý na hormonální regulaci, zejména na gonadotropinech – luteinizačním hormonu (LH) a folikulostimulačním hormonu (FSH) (Zhang 2012). Tyto gonadotropiny jsou uvolňovány z adenohipofýzy a regulovány jsou pomocí GnRH – gonadotropin releasing hormonu, který se uvolňuje z hypothalamu (Zhang 2012). Dalšími hormonálními faktory, které ovlivňují růst a vývoj folikulu a oocyty, je například tyrokinázový receptor Kit (c-Kit) a izofomy jeho ligandu (kit ligand, KL), aktivin, růstový diferenciační faktor – 9 (GDF-9) a anti-Mülleriánský hormon (AMH) (Zhang 2012).



Obr. 1. Růst prasečích folikulů a oocytů a získání meiotické kompetence (Převzato a upraveno z Morbeck et al. 1992)

3.1.3 Fáze zrání oocytů

V rostoucích a dominantních folikulech zůstávají oocyty ve fázi diplotene meiotické profáze I. V *in vivo* podmínkách je obnovení meiózy iniciováno preovulační vlnou LH a dochází k němu pouze u plně zralých, meioticky kompetentních oocytů. Před a v době vysoké hladiny LH je oocyt obklopen kompaktní vrstvou kumulárních buněk. Z vnitřních kumulárních buněk pronikají do ZP četné výběžky, které jsou k oolemmě připojené spoji gap junctions (Van den Hurk 2000; Carabatsos 2000). Krátce po přílivu LH dochází k narušení těchto spojů. V období mezi nárůstem hladiny LH a ovulací prochází oocyt řadou výrazných změn nejen ve svém jádře, ale také v cytoplazmě, tento proces se nazývá jako zrání oocytu (Picton 1998). Základní molekulární mechanismus, který řídí proces zrání oocytů v reakci na výšce hladiny LH, způsobuje hned několik regulačních cest, jako je změna fosforylace proteinů, cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a hladiny vápníku (Gordo 2001).

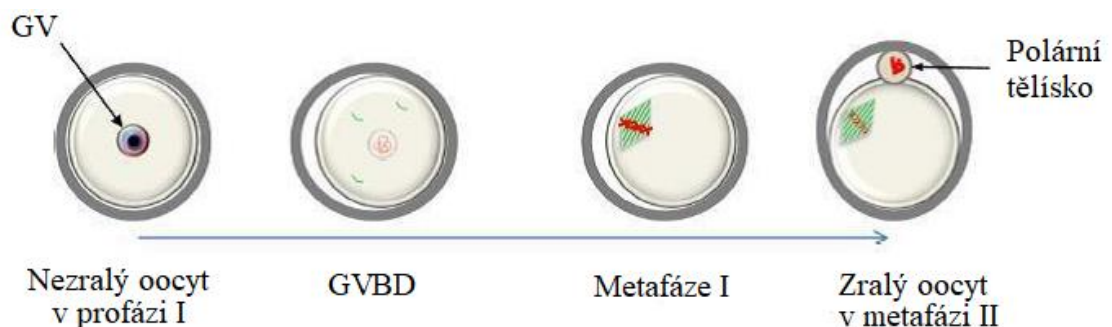
Zrání oocytů začíná uvolněním oocytu z prvního meiotického bloku, který začíná během puberty vlivem hormonálních změn a stimulů. Znovuzahájení meiózy iniciuje preovulační vlna luteinizačního hormonu, na kterou reaguje pouze plně dorostlý a meioticky kompetentní oocyt z Graafova folikulu (Alberts 2006). Inhibice sekrece LH nebo inaktivace LH receptorů zabráňuje dozrávání a ovulaci oocytů. V oocytech se nenachází žádné LH receptory. Signály, které spouštějí zrání oocytů, tedy pravděpodobně pochází z okolních folikulárních buněk (Carabatsos 2000). Vlna LH, na kterou reagují folikulární buňky, spouští u oocytu signální kaskádu, která má za následek znovuzahájení meiotického dělení a rozpad zárodečného váčku (GVBD – germinal vesicle breakdown). Při GVBD dochází k rozpadu jaderné membrány tvořené jadernými laminy. Fáze GVBD začíná jemným vlněním jaderné membrány, které postupně zesiluje a ke konci této fáze je membrána zcela rozptýlena (Wassarman 1988).

Díky rozpadu zárodečného váčku je oocyt schopen pokračovat v meiotickém dělení (Van den Hurk 2005). V podmínkách *in vivo* je proces GVBD regulován sekrecí LH, v podmínkách *in vitro* nastává GVBD spontánně po uvolnění oocytu z folikulu a po přerušení komunikace s kumulárními buňkami (Wassarman 1988). V jádru oocytu dochází ke kondenzaci chromatinu, a plně dorostlý oocyt následně přechází do metafáze I (Ellederova 2004).

V metafázi I se páry homologních chromozomů řadí do ekvatoriální roviny napojené na dělicí vřeténko. Během anafáze I a telofáze I se rozchází celé homologní chromozomy (Page 2003). V metafázi II je meiotické dělení zastaveno druhým meiotickým blokem. V této fázi jsou chromozomy seřazeny v ekvatoriální rovině a je vyděleno první pólové tělísko (Wassarman 1994). Fáze zrání u prasete v *in vitro* podmínkách trvá přibližně 44–48 hodin (Van den Hurk 2005). Až po aktivaci oocytu spermií dochází k úplnému dokončení meiózy oocytu. Následuje anafáze II, telofáze II a vydělení druhého pólového tělíska (Mary 2016).

Jaderné zrání se skládá z několika kroků, které zahrnují dvě po sobě jdoucí dělení (M-fáze) při absenci replikace DNA (S-fáze). Oocyty jsou poté zastaveny v MII fázi až do oplození, kdy aktivací podnět, způsobený průnikem spermie, spustí dokončení meiotického dělení a zahájí embryonální vývoj. U prasnice trvá jaderné zrání oocytu přibližně 44 hodin (Wassarman 1988).

Proces GVBD u prasnice trvá 24 hodin a můžeme ho popsat v 5 fázích GV0-GV4 (Lucas 2002). Ve fázi GV0 je jadérko neporušené a chromatin se nachází v celé jaderné oblasti. Při GV1 se chromatin kolem jadérka formuje do tvaru prstence nebo koňské podkovy. Při GV2 fázi chromatin utváří shluky v blízkosti jaderné membrány (Murin 2019). Ve fázi GV3 se shluky rozptylují po celé nukleoplazmě a dochází ke kondenzaci chromatinu. Během GV4 fáze už nelze rozeznat jadérko a jaderná membrána je zcela rozptýlena. Po této fázi nastává samotný rozpad zárodečného váčku, tedy GVBD, kde se již nenachází jaderná membrána a chromozomy jsou uspořádány do tzv. metafázní roviny (oblast, která je přibližně stejně vzdálená od obou pólů dělicího vřeténka) (Murin 2019). Oocyt je tedy ve fázi metafáze I, kde dochází k tvorbě bivalentů. Následně se přesouvá do stadia anafáze I, kde se prodlužují párové chromozomy, které putují k opačným pólům buňky. V telofázi I se vytváří jaderná membrána v okolí zredukovaných chromozomů a vyděluje se první pólové tělísko. Oocyt prochází prvním heterotypickým (redukčním) dělením a obsahuje haploidní počet chromozomů (Eppig 2001), následně vstupuje do homeotypického (ekvačního) dělení. Chromozomy se opět řadí do ekvatoriální roviny a dochází k druhému meiotickému bloku v metafázi II, který je přerušen až po oplození oocytu spermií (Wassarman 1988).



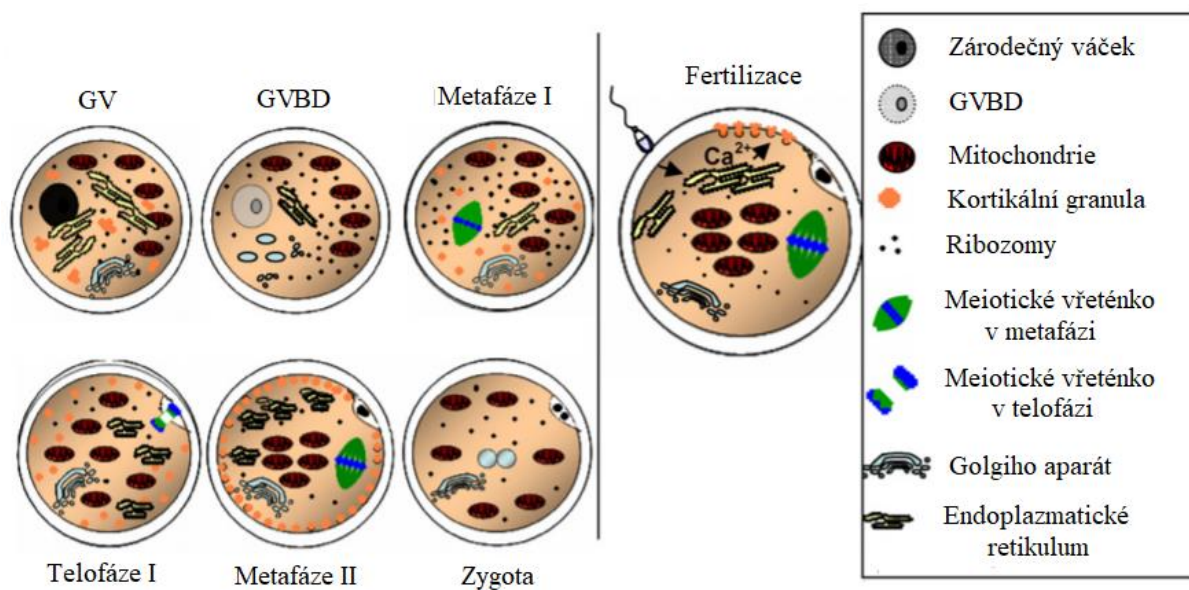
Obr. 2. Stádia zrání oocytů (Převzato a upraveno z Adhikari & Liu 2014)

3.1.3.1 Cytoplazmatické zrání

Cytoplazmatické/ooplazmatické zrání zahrnuje redistribuci buněčných organel, přesun cytoskeletu, migraci mitochondrií do perinukleární pozice a nahromadění kortikálních granul podél oolemy (Rahman 2008). K reorganizaci buněčných organel dochází pomocí mikrofilament a mikrotubulů.

Mitochondrie fungují v buňce jako „buněčná elektrárna“ – jsou producenty energie ve formě ATP (adenosintrifosfát) a jsou pro oocyt tedy naprosto nezbytné. Během rozpadu zárodečného váčku jsou mitochondrie nahromaděny v blízkosti jádra a při redistribuci dochází k jejich rozptýlení. Primární oocyty obsahují přibližně 6000 mitochondrií, během zrání oocytu se jejich počet zvyšuje na více než 100 000 (Shoubridge 2007).

Kortikální granula jsou u oocytu ve stádiu zárodečného váčku rozmístěna ve shlucích po celém prostoru GV. Na konci období zrání oocytu se granula přemísťují do blízkosti plazmatické membrány (oolemy). Přemístění kortikálních granul k oolemmě není náhodné. Při průniku spermie do vajíčka dochází k exocytóze granul (kortikální reakce) – granula uvolní svůj obsah do perivitelliního prostoru. Tento děj způsobí při oplodnění změny ve funkčních vlastnostech ZP, a slouží tak jako prevence proti polyspermii (Hosoe 1997; Ferreira 2009).



Obr. 3. Rozložení organel v cytoplazmě během zrání, oplození a tvorby zygoty (Převzato a upraveno z Ferreira 2009)

3.1.3.2 Faktory regulující meiotické zrání

Cyklický adenosin monofosfát (cAMP)

Cyklický adenosin-3',5'-monofosfát (cAMP) má nezastupitelnou roli během meiotického zrání, protože zapříčiňuje jeho inhibici. Hladinu cAMP lze ovlivnit dvěma způsoby. Prvním způsobem je regulace vzniku cAMP pomocí aktivace adenylátcyklázy, druhou možností je degradace vzniklého cAMP prostřednictvím fosfodiesterázy 3A, která mění cAMP na fyziologicky neaktivní 5' AMP (Ganong 2005).

Vysoká koncentrace cAMP udržuje oocyt v bloku v diktyotenním stádiu pomocí aktivní cAMP-dependentní proteinkinázy (cAMP-dependent protein kinase – PKA), která potlačuje aktivaci faktorů podporujících meiotické zrání. PKA inhibičně fosforyluje fosfatázu Cdc25, která je nutná pro aktivaci MPF (Conti 2012).

Jakmile dojde ke stimulaci LH, dochází mezi oocytem a kumulárními buňkami k přerušení spojů gap junction, tím je znemožněn prostup cAMP z kumulárních buněk do oocytu a jeho hladina v oocytu klesá. Nízká koncentrace cAMP má za následek pokles aktivity PKA a umožňuje aktivaci MPF (maturation promoting factor – zrání podporující faktor) a následně rozpad zárodečného váčku (Liang 2005; Conti 2012).

Cyklický guanosin monofosfát (cGMP)

Cyklický guanosin-3',5'-monofosfát (cGMP) patří společně s cAMP mezi druhé buněčné posly. Vznik cGMP je podobný jako u cAMP, vzniká z guanosintrifosfátu (GTP) účinkem guanylátcyklázy (Ganong 2005). Cyklický GMP zabraňuje meiotickému zrání oocytu a udržuje meiotický blok (Sun 2014).

Podstatou inhibičního efektu cGMP je inhibice cAMP-fosfodiesterázy 3A, při které dochází ke snížení degradace cAMP (Sun 2014).

Vápenaté ionty (Ca^{2+})

Vápenaté ionty (Ca^{2+}) patří mezi signální molekuly. Plní úlohu intracelulárního posla a jejich intracelulární koncentrace má velký fyziologický význam. V savčím oocytu vápník ovlivňuje spontánní i hormonálně indukované meiotické zrání (Homa 1995). Jakmile hladina vápníku převýší hladinu cyklického AMP, který udržuje oocyt v meiotickém bloku, dochází k obnově meiózy. Intracelulárními zásobárnami vápenatých iontů je hlavně endoplazmatické retikulum (ER) a mitochondrie. K nárůstu hladiny vápníku v buňce dochází dvěma hlavními mechanismy: uvolňováním z intracelulárních zásob ligandem řízenými kanály na membránách organel, kterému předchází GVBD, anebo vstupem z extracelulárního prostoru pomocí iontových kanálů v plazmatické membráně. Většina dějů je spojena se dvěma rodinami iontových kanálů – s ryanodinovými receptory (Ryr) a inositol 1,4,5-trisfosfátovými receptory (IP3r) (Tosti 2006).

Ionty vápníku se vážou na specifické intracelulární proteiny, nejčastější je vazba na kalmodulin (CaM). Vzniklý CaM aktivuje kalmodulin-dependentní proteinkinázu II (CaMKII), která fosforyluje další proteiny, např. CREB (cAMP response element-binding

protein) (Fan 2003). Při vazbě vápníku na protein dochází ke změně konformace proteinu, a to umožňuje modulovat efektorové molekuly (např. enzymy) (Wu 2000).

Vyšší koncentrace Ca^{2+} spouští v oocyty signalizační kaskády, které mají za následek přerušování druhého meiotického bloku a znovuzahájení meiotického zrání. Tyto kaskády primárně cílí na regulátory meiotického zrání, tedy adenylát cyklázu (AC) a MPF (maturation-promoting factor, faktor podporující zrání) (Fan 2003). Jak MPF, tak i AC jsou regulovány vápník/kalmodulin dependentní proteinkinázou II (CaMKII). Aktivní CaMKII plní současně dvě úlohy – způsobuje inaktivaci adenylát cyklázy a zároveň se podílí na funkci MPF (inaktivace MPF skrze degradaci cyklinu B) (Chen 2013). Fan (2003) zjistil, že prasečí oocyty, které neměly aktivní CaMKII, nebyly schopny akumulovat cyklin B – regulační podjednotku buněčného cyklu, která ovlivňuje přechod z G2 fáze do M fáze. Oocyty nejsou schopny kvůli inaktivaci CaMKII plně fosforylovat mitogeny aktivovanou protein kinázu (mitogen activated protein kinases – MAPK). Výsledkem tedy je, že oocyty nebyly schopny znovuzahájit meiózu (Fan 2003).

Koncentraci vápenatých iontů také ovlivňuje i hladina luteinizačního hormonu (LH), který má dvojitý účinek a stimuluje dva oddělené systémy. Na jedné straně LH aktivuje adenylát cyklázu, která ovlivňuje rychlý nárůst cAMP. Na druhé straně stimuluje prostřednictvím fosfolipázy C fosfoinositolový metabolismus, který mobilizuje intracelulární vápník (Homa 1995).

Hladinu intracelulárních Ca^{2+} rovněž ovlivňuje folikulostimulační hormon (FSH), který zvyšuje jeho koncentraci (Jayes 2000). Vstup Ca^{2+} do buňky je naopak inhibován verapamilem (blokátor Ca^{2+} kanálů typu L) (Flores 1990). Kromě toho je Ca^{2+} nutný k aktivaci promotorového reportéru SCC (side-chain cleavage, štěpení postranních řetězců) u prasečích granulózních buněk (Jayes 2000).

M-fázi podporující faktor (MPF)

Dalším faktorem buněčného cyklu důležitým pro průběh meiózy a mitózy je M-fázi podporující faktor (maturation/M-phase promoting factor; MPF). Jedná se o komplot, který indukuje přechod do M fáze somatických buněk a meiózu oocytů. Je zodpovědný za začátek maturace oocyty a rozpad zárodečného vaku (Deng 2000; Masui 2001). MPF je komplex složený ze dvou podjednotek – katalytické a regulační. Nejvyšší aktivity dosahuje během meiózy v metafázi I a II (Abrieu 2001).

MPF je heterodimer složený ze dvou podjednotek. Regulační podjednotku tvoří cyklin B, který má tři typy – B1, B2 a B3. U savců je za aktivitu MPF zodpovědný především cyklin B1. Katalytickou podjednotkou je cyklin dependentní serin/threonin kináza (serine/threonine kinase – p34^{cdc2}) (Jones 2004).

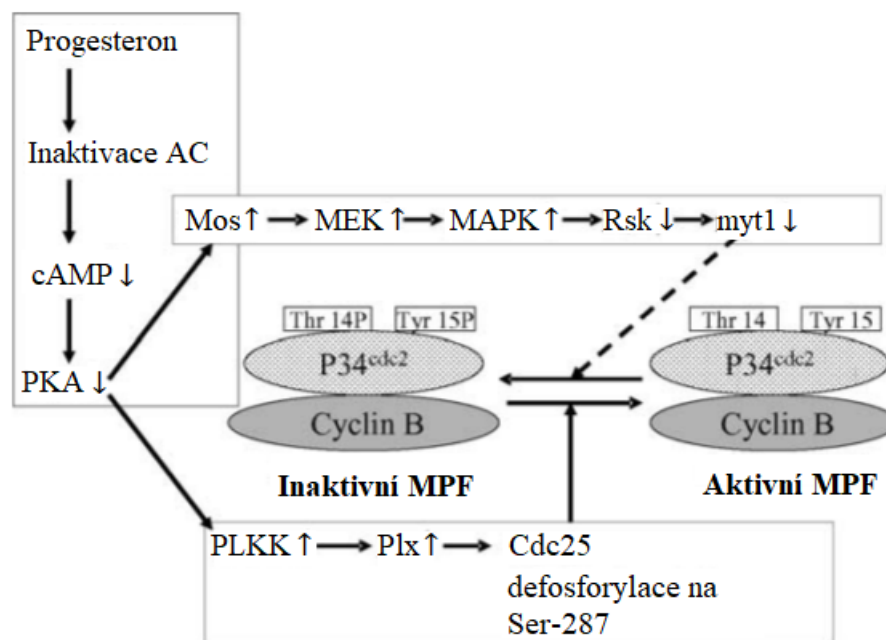
Obecně jsou při regulaci buněčného cyklu uplatňovány komplexy cyklin-dependentní kinázy (cdk) a cyklinu. Cdk jsou v buňce přítomny po celou dobu průběhu cyklu. Aktivaci těchto kináz zajišťují regulační proteiny, které nemají katalytickou aktivitu – cykliny (Alberts 1998). Cyklin se syntetizuje hned po rozdělení buňky, jeho syntéza pokračuje po celý průběh interfáze. Poté se hromadí, jeho koncentrace v buňce stoupá a navozuje začátek dalšího buněčného dělení (Glotzer 1991).

Aktivita MPF ve všech buňkách je řízena kinázami Wee1 a Myt1 a Cdc25 fosfatázy. Wee1 a Myt1 kinázy zajišťují inhibiční fosforylaci cyklin dependentní kinázy (Cdc1) na 14-threoninu (Thr14) a 15-tyrosinu (Tyr15) (Lénárt 2003). Udržují tak heterodimer v neaktivním stavu, tzv. pre-MPF. Fosfatáza Cdc25 naopak navozuje aktivační defosforylaci Cdk1 a z pre-MPF vzniká aktivní forma MPF. Vysoká aktivita Cdc25 a nízká aktivita Wee1/Myt1 jsou nutné pro aktivování Cdk1 složky MPF (Jones 2004).

Aktivní MPF disponuje kinázovou aktivitou. Fosforylací určitých proteinů dochází k rozpadu zárodečného váčku (GVBD) a kondenzaci chromozomů. MPF také napomáhá při reorganizaci mikrotubulů a cytoskeletu při tvorbě dělicího vřeténka (Hurk 2005). GVBD je způsoben aktivitou MPF, který fosforyluje proteiny laminy jaderné membrány. Dochází tak k rozkladu laminových filament submembránové vrstvy a následnému rozpadu jaderné membrány. Analogicky pak MPF fosforyluje proteiny asociované s mikrotubuly, které jsou pak schopny vytvořit dělicí vřeténko (Lorca 1993; Hurk 2005).

Nárůst MPF je klíčový pro znovuzahájení meiózy oocyty. Nejvyšší aktivity M-fázi podporující faktor dosahuje do anafáze I, kdy dochází k vydělení prvního pólového tělíska (Hurk 2005). Jakmile oocyt vstoupí do meiózy II, MPF aktivita znovu prudce vzroste a zůstává vysoká po celou dobu meiotického bloku v metafázi II, až do aktivace oocyty spermií (Abrieu 2001).

K poklesu aktivity MPF během přechodu z meiózy I do meiózy II dochází degradací cyklinu B, která je realizována ubiquitin-dependentní proteolýzou. Deaktivace MPF je regulována komplexem APC/C – Anaphase promoting complex/Cyclosome (Jones 2004; Jones 2005).



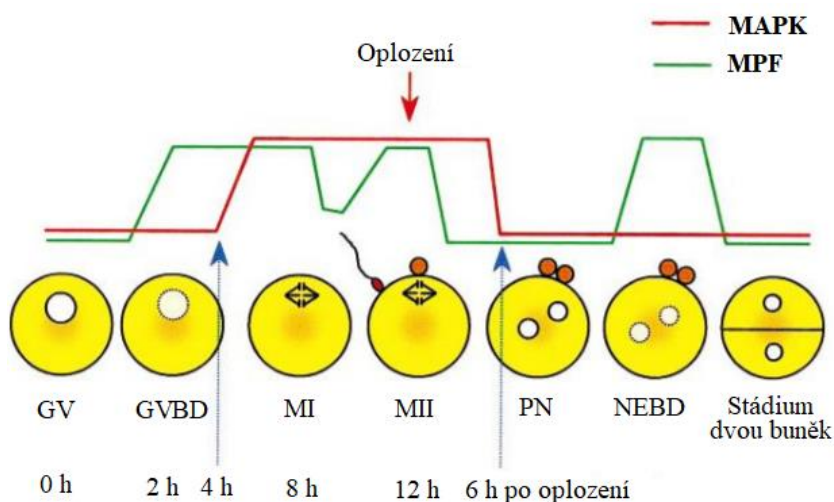
Obr. 4. Aktivace MPF pomocí drah aktivovaných progesteronem (Převzato a upraveno z Van den Hurk 2005)

Mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAPK)

Mitogenem aktivovaná proteinkináza (mitogen activated protein kinase – MAPK), známá také jako kináza regulovaná extracelulárním signálem (extracellular signal-regulated kinase – ERK), je další z kináz, o které je známo, že se podílí na zrání oocytů. V savčích oocytech je přítomno pět izoform MAPK – ERK1 (p44), ERK2 (p42), ERK3, ERK4 a ERK5 (Trousseau 2001). MAPK je aktivována současně s nebo po GVBD (Tiwari 2018). MAPK má mnoho cílů, které se nacházejí buď v jádře, nebo v cytoplasmě, včetně cytoskeletárních proteinů. Během zrání oocytů je aktivita MAPK nezbytná pro udržení aktivity MPF, tvorbu vřeténka a udržení oocytu v bloku (Colledge 1994; Hurk 2005).

Signální dráha MOS/MEK/MAPK reguluje buněčný cyklus prostřednictvím kaskády proteinkinázové fosforylace (Nunes 2015). Předřazený faktor MOS (MAPKKK) je produktem proto-onkogenu *c-mos* a je to serin/threonin kináza specifická pro zárodečné buňky. MOS indukuje fosforylaci MEK (MAPKK), a tím i její aktivitu. Aktivní MEK (známá také jako MAPK3/1-ERK kináza 1) aktivuje MAPK fosforylací serinových a threoninových zbytků (Tiwari 2018). Celá MOS/MEK/MAPK kaskáda je regulována pomocí G-proteinů a membránových tyrosin-kináz (Roux 2004). Mezi G-proteiny patří Ras protein, první aktivovaný protein, který dále aktivuje Mos protein (Ganong 2005). MAP-kinázové kaskády mohou být aktivovány širokou škálou různých podnětů. Nezbytná je však vazba extracelulárního signálu na receptor (Roux 2004).

Během meiotického zrání se mění vnitrobuněčná distribuce MAPK. Neaktivní forma MAPK byla zjištěna v nezralých prasečích oocytech už ve fázi růstu a byla lokalizována výhradně v cytosolu oocytů. Během znovuzahájení meiózy a těsně před procesem GVBD se část již aktivní MAPK přesouvá do zárodečného váčku (Inoue 1998). Exogenní zdroj MAPK indukuje rozpad zárodečného váčku, to tedy naznačuje, že MAPK zprostředkovává zrání indukující signály z cytoplazmy do jádra, a tak iniciuje znovuzahájení meiózy (Inoue 1998).



Obr. 5. Aktivita MPF a MAPK během meiotického zrání oocytu (Převzato a upraveno z Fan & Sun 2004)

cAMP-dependentní proteinkináza (PKA) a protein kotvící A-kinázu (AKAP)

Protein kotvící A-kinázu (A-kinase anchoring protein – AKAP) se připojuje na regulační podjednotku cAMP-dependentní proteinkinázy (PKA), kterou AKAP orientuje na konkrétní intracelulární místa (Angelo 1998). Relativně vysoké intraocytární koncentrace cAMP zabraňují aktivaci MPF a MAP kináz, čímž inhibují obnovení meiózy. Funkční studie zaměřené na narušení komplexů AKAP-PKA prokázaly roli PKA v různých buněčných procesech, např. genové transkripce nebo modulace iontových kanálů. Vazbou na další signální molekuly mohou AKAP fungovat jako koordinátor více složek signálně-transdukčních drah (Colledge 1999) zahrnující i druhého buněčného posla cAMP (Angelo 1998).

Cyklický adenosinmonofosfát vzniká aktivací receptorů pomocí různých hormonů a neurotransmiterů, což následně vede k aktivaci PKA. Mezi složky tohoto signálního řetězce patří různé druhy receptorů, heterotrimerní G proteiny, adenylátcyklázy a podjednotky kináz (Burton 1997). Holoenzym PKA se skládá ze dvou katalytických podjednotek (C) a dvou regulačních podjednotek (R) (Colledge 1999). V nepřítomnosti cAMP existuje PKA jako neaktivní tetramer složený z dimeru regulačních podjednotek (R) vázaných na dvě katalytické podjednotky (C). Vazba cAMP na R vede k uvolnění dvou aktivních monomerů C, které fosforylují substrátové proteiny na serinových a threoninových zbytcích (Spaulding 1993). Existují tři izoformy C podjednotky: α , β a γ , které mají prakticky identické kinetické a fyzikálně-chemické vlastnosti. Podjednotky R–RI a RII vykazují odlišnou vazebnou afinitu k cAMP a jsou v buňkách lokalizovány různě. Holoenzym PKA typu I (RI α a RI β) je převážně cytoplazmatický, zatímco většina podjednotek PKA typu II (RII α a RII β) je asociována s buněčnými strukturami a organelami (Pawson 1997). To je zřejmě z velké části způsobeno ukotvením podjednotek RII pomocí AKAP. Podjednotky RII se vážou na AKAP s nižší afinitou než podjednotky RI (Pawson 1997; Colledge 1999).

Studie naznačují, že AKAP jsou důležité při vývoji signalizačních událostí zprostředkovaných cAMP, kde kotvící (anchoring) protein plní přinejmenším dvě funkce. Zaprvé umísťuje holoenzym PKA do míst, kde může rychle reagovat na zvyšující a snižující hladinu produkovaného cAMP, a zadruhé podporuje určité fosforylační děje PKA tím, že enzym umístí do blízkosti určité skupiny substrátů, např. iontové kanály mají vlastní AKAP (AKAP15/18), které ovlivňují vlastnosti membrány (Felicello 1996).

3.2 *Zona pellucida*

Zona pellucida (ZP) je extracelulární glykoproteinový obal savčího oocyty tvořený třemi (myš, prase, skot, pes) nebo čtyřmi glykoproteiny (člověk, potkan, křeček). ZP se nachází mezi plazmatickou membránou oocyty a kumulárními buňkami (Wassarman 1988). Má pórovitou strukturu, která umožňuje průnik relativně velkých molekul (např. imunoglobuliny). Mezi hlavní funkce ZP patří ochrana vyvíjejícího se oocyty, v průběhu oplození hraje důležitou roli při rozpoznání a vazbě gamet, zabraňuje polyspermnímu oplození a chrání preimplantační embryo před poškozením (Wassarman 1988).

3.2.1 Vznik *zona pellucida*, změny během fertilizace

Zona pellucida je nebuněčná glykoproteinová vrstva, která je syntetizována a vylučována především oocyty během folikulárního vývoje. Tloušťka *zona pellucida* je velice proměnlivá u jednotlivých druhů savců a pohybuje se od 1 do 25 μm . U člověka a prasete je tloušťka 13-16 μm , u myši se velikost udává mezi 1-5 μm (Gupta 1986; Wassarman 1991). Liší se i obsah bílkovin (1-30 ng) u jednotlivých živočišných druhů. Při studiu *zona pellucida* lidských a myších oocytů pomocí elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že ZP se jeví jako jemná síťovina tenkých a vzájemně propojených vláken, kde dochází k pravidelnému střídání širokých a malých ok a pórů (Dunbar 1980; Gupta 2012). Póry na vnějším povrchu matrice ZP jsou větší než póry na povrchu vnitřním. Díky větším pórům je usnadněna průchodnost spermií – bylo prokázáno, že lidská ZP s kompaktnějším a hladším vnějším povrchem je méně průchodná. Porézní povaha také umožňuje průnik velkých molekul, jako jsou např. imunoglobuliny a feritin, ale je údajně nepropustná pro menší molekuly, jako je heparin. Je tedy zřejmé, že schopnost molekul procházet touto extracelulární matrix nezávisí primárně na velikosti molekul, ale také na dalších biochemických nebo fyzikálních vlastnostech, jako je například povrchový náboj. Vnitřní povrch *zona pellucida* je více amorfni a matrix má odlišné vrstvy, které lze definovat pomocí odlišných lektinů a protilátek (Shivers 1977).

ZP většiny dosud studovaných druhů savců se skládá ze tří nebo čtyř hlavních glykoproteinů. U myši se tyto glykoproteiny označují jako *zona pellucida glykoprotein-1* (ZP1), -2 (ZP2) a -3 (ZP3) (Wassarman 1980). Matrix ZP prasečích, kravských a psích oocytů je také tvořena ze tří typů glykoproteinů jako u myši, ale glykoprotein ZP1 je nahrazen glykoproteinem označovaným jako *zona pellucida glykoprotein-4* (ZP4). Extrémní heterogenitu molekulové hmotnosti a náboje vykazují glykoproteiny v důsledku posttranslačních modifikací, jako je glykosylace a sulfatace (Dunbar 1980). Nicméně bylo prokázáno, že každá ze tří proteinových rodin má 50-98% homologii na úrovni nukleových kyselin (Dunbar 1994).

Původ glykoproteinů *zona pellucida* byl dříve nejasný. Byly vypracovány tři teorie jejich vzniku, které navrhují, že glykoproteiny jsou syntetizovány samotným oocytem, samotnými folikulárními buňkami nebo oocytem i folikulárními buňkami. Kimura (1994) zveřejnil výsledky studie, ve které uvádí, že podíl folikulárních buněk na produkci složek zóny je druhově specifický. Např. u myši, které mají tenkou ZP, jsou glykoproteiny a jejich transkripty syntetizovány výhradně oocytem. Oproti tomu výzkumy u jiných živočišných druhů, jako je člověk, králík, opice, kráva, pes a prase ukázaly, že na syntéze glykoproteinů ZP se podílejí jak oocyt, tak folikulární buňky. Pro poslední zmiňované živočišné druhy je charakteristická dobře vyvinutá *zona pellucida* (Dunbar 1994; Grootenhuis 1996), a jelikož rychlost syntézy proteinů samotným oocytem je příliš nízká na to, aby odpovídala hmotnosti oocytu, a ještě hmotnosti jeho zóny, musí se tedy na syntéze proteinů podílet i folikulární buňky (Grootenhuis 1996).

Na myších oocytech byla provedena studie, kde se zkoumala sekrece glykoproteinů *zona pellucida* a jejich uspořádání do síťoviny. Nejprve dochází k nerovnoměrné sekreci glykoproteinů do lokalizovaných váček mezi povrchem oocytu a okolními folikulárními buňkami. Během rané fáze růstu oocytu se glykoproteiny ZP jeví jako vlákna uspořádaná do hexagonálních struktur s jednotnou velikostí pórů. Jak oocyt roste a zvětšuje se, filamenta

se spojují a vytvářejí kolem oocyty rovnoměrný plášť. Současně dochází ke zvýšení počtu mikrovil, které se dostávají do kontaktu s buněčnými výběžky kumulárních buněk. Tím se zvětšuje kontaktní plocha a vytvářejí se kanály skrz *zona pellucida*, které poskytují výživu rostoucímu oocyty a podílí se na vzniku gap junction (Wassarman 1991; Gupta 2012).

Při růstové fázi oocyty jsou glykoproteiny exprimovány z endoplazmatického retikula a přechází do Golgiho aparátu. V Golgiho aparátu jsou proteiny zabaleny do sekrečních vezikul, které se pak přemisťují k plazmatické membráně oocyty, kde následně fúzíjí a splynou s membránou. Tímto způsobem jsou glykoproteiny uloženy v extracelulárním prostoru (Wassarman 2005).

Vznikající glykoproteiny ZP jsou včleněny do zesilující se matrix na nejvnitřnějším povrchu ZP, což znamená, že se *zona pellucida* zesiluje zevnitř ven (Qi 2002). Všechny glykoproteiny obsahují N-koncovou hydrofobní signální sekvenci, místo konsenzuálního furinového štěpení (CFCS – consensus furin cleavage site), ZP doménu a transmembráně podobnou doménu (TMD – transmembrane-like domain), která se nachází poblíž C-konce peptidu (Bork & Sander 1992). Signální sekvence mají různé délky (viz Tabulka č. 1), které směřují vznikající glykoproteiny do sekreční dráhy. Signální peptid je následně odštěpen od zralého proteinu. ZP doména je protein, který se skládá z různého počtu aminokyselin, včetně 8 zachovaných Cys zbytků a je charakterizován vysokým obsahem β řetězců. ZP doména umožňuje polymeraci glykoproteinů na dlouhá vlákna a má důležitou roli při sestavování matrix ZP. Pokud dojde k delecii ZP domény, nově vznikající glykoproteiny nebudou schopny se začlenit do *zona pellucida*. Úlohou TMD je napomáhání ukotvení glykoproteinů v sekrečních váčcích k plazmatické membráně oocyty, CFCS zajišťuje ukotvení glykoproteinů do extracelulárního prostoru (Litscher 1999; Wassarman 2001).

Tab. 1. Charakteristika velikosti glykoproteinů ZP (uváděny počty aminokyselin) (Převzato a upraveno z Gupta 2012)

	ZP1	ZP2	ZP3	ZP4
Signální peptid	1-25	1-38	1-22	1-18
ZP doména	279-551	372-637	45-303	188-460
CFCS	552-555	639-642	349-352	463-466
TMD	602-622	717-736	388-408	506-526

Během folikulárního vývoje prasečího a bovinního vaječníku je protein ZP3 a jeho transkript lokalizován především v oocytech primordiálních a primárních folikulů (Sinowatz 1995). V sekundárních folikulech se na syntéze ZP3 a jeho mRNA podílí jak oocyt, tak folikulární buňky. V terciárních a preovulačních folikulech se ZP3 a jeho transkripty nacházejí především v cytoplazmě buněk *corona radiata*. Zatímco kravský oocyt se podílí na syntéze ZP3 ve všech fázích folikulárního vývoje, prasečí oocyty terciárních folikulů přestávají ZP3 syntetizovat. Tento výsledek naznačuje druhově specifickou expresi těchto proteinů ZP v dospělém vaječníku (Kölle 1996). Výzkumy na fetálních vaječnicích navíc ukázaly, že proteiny *zony pellucida* jsou syntetizovány folikulárními buňkami již během

prenatálního vývoje. U plodu je ZP3 lokalizován v oocytech primordiálních a primárních folikulů (Totzauer et al. 1998).

Při fertilizaci oocyty nastává exocytóza kortikálních granul a jejich obsah je uvolněn do perivitellinního prostoru. Struktura ZP se změní a dochází k tzv. *zona pellucida* hardeningu – hlavní blok polyspermie (Rankin 2000). Při fertilizaci také dochází k tvorbě disulfidických vazeb, které jsou pravděpodobně vytvořeny pro stabilizaci proteinů, jejichž konformace byla pozměněna. To přispívá ke zpevnění *zona pellucida* a prevenci polyspermie (Töpfer-Petersen 2008).

3.2.2 *Zona pellucida* prasete

Prasečí *zona pellucida* má šířku 16 μm a je složena ze tří vysoce specifických glykoproteinů, jejich obsah v ZP je 30-33 ng. Glykoproteiny ZP prasete jsou biochemicky a imunologicky rozdílné a jsou kódované třemi různými geny. Dříve bylo diskutováno, že prasečí ZP je složena ze čtyř, nikoli ze tří glykoproteinů. Nejasnosti kolem identifikace proteinů ZP prasete byly způsobeny různým názvoslovím. Nomenklatura se v minulosti mnohokrát měnila a různě sjednocovala, proto pro glykoproteiny ZP prasete můžeme ve studiích nalézt odlišné značení. Ve starších studiích jsou glykoproteiny popisovány: ZP1 (ZPB/ZP3 α), ZP2 (ZP1/ZP2/ZPA) a ZP3 (ZP3 β /ZPC) (Hedrick & Wardrip 1986; Harris et al. 1994, Prasad 2000). Podle novější nomenklatury se glykoproteiny prasečí *zona pellucida* značí pZP2 (ZPA/PZPL; 90kDa), který můžeme rozdělit na dvě podjednotky o velikostech 65 kDa a 25 kDa, pZP3 (ZPC/ZP3- β ; 55 kDa) a pZP4 (ZPB/ZP3- α ; 55 kDa). Dále pak bylo zjištěno, že 80 % celkového počtu glykoproteinů ZP prasete tvoří glykoproteiny ZP3 (ZPC/ZP3- β) a ZP4 (ZPB/ZP3- α), které dohromady tvoří důležité strukturní a funkční jednotky (Tumova et al. 2021).

ZP2 protein

Proteiny ZP2 se podílejí procesů hlavně při závěrečné fázi fertilizace, kdy zpevňují *zona pellucida* a chrání oocyt před polyspermickým oplozením. ZP2 vzniká odštěpením signálního polypeptidu (1-35 AA) z N-konce a odštěpením propeptidu z C-konce (639-716 AA). Velikost proteinu bez sacharidových struktur je 80 kDa (Töpfer-Petersen 2008; UniProt 2014). Nezralý protein se skládá z 716 aminokyselin (amino acid; AA) dlouhého řetězce, má jen jednu ZP doménu. Zralý ZP2 protein je největším glykoproteinem *zona pellucida* a je N-terminálně prodloužen od ZP domény polypeptidem o délce 603 aminokyselin. Během kortikální reakce je ZP2 protein štěpen poblíž N-konce na dva fragmenty (30 kDa fragment u N-konce), které jsou spojeny disulfidickou vazbou (Töpfer-Petersen 2008).

ZP3 protein

U prasete vykazuje ZP3 vazebnou aktivitu až ve spojení do komplexu se ZP4 proteinem, jinak sám o sobě aktivní není (Töpfer-Petersen 2008). Nezralý ZP3 protein je tvořen řetězcem o délce 421 AA a obsahuje jednu ZP doménu. Po odštěpení signálního peptidu z N-konce

(1-22 AA) a propeptidu z C-konce (333-421 AA) vzniká zralý protein o délce 310 AA. Čistý protein bez sacharidových struktur má velikost 46 kDa (UniProt 2014).

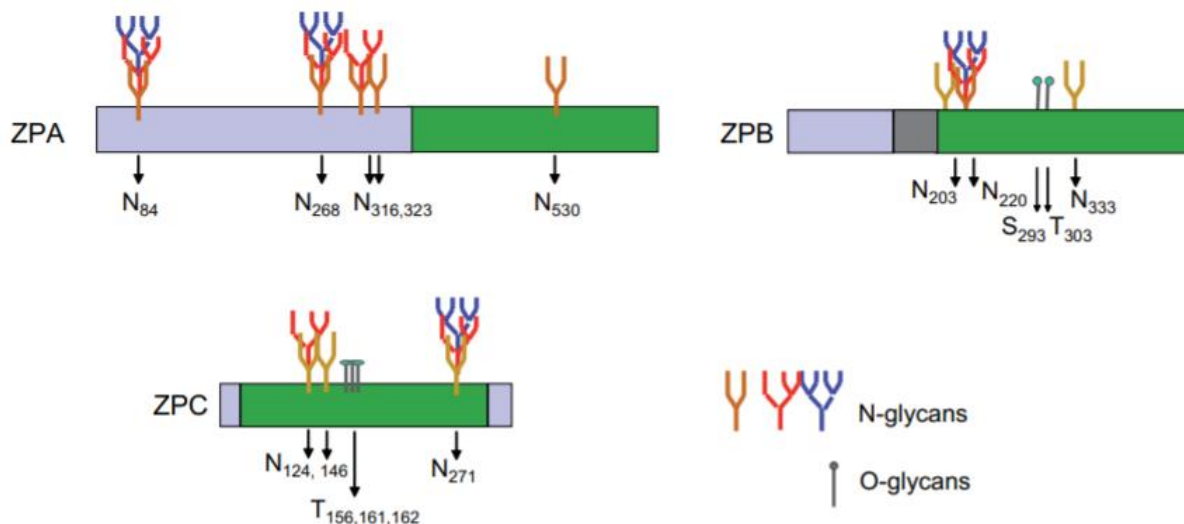
ZP4 protein

Nezralý ZP4 protein je složen z 636 AA, velikost čistého proteinu je 60 kDa a taktéž zahrnuje jednu ZP doménu. Navíc obsahuje další trefoildoménu, která může zvyšovat odolnost vůči proteolytické degradaci (Bork 1993). Signální peptid na N-konci ZP4 proteinu tvoří sekvence 1-21 AA. Zralý ZP4 protein vzniká po odštěpení propeptidu (463-536 AA) a signálního peptidu, jeho velikost je 441 AA (UniProt 2014).

Glykoprotein ZP4 byl identifikován jako receptor spermií, protože obsahuje biologicky aktivní sacharidové řetězce. Maximální vazby na spermie je však dosaženo, až když ZP4 vytvoří heteromultimerní komplex se ZP3. Spojení ZP4 a ZP3 proteinu v jeden komplex může vyvolat konformační změny molekul ZP4 za účelem co největšího odhalení vazebných míst pro spermie (Kudo 1998).

Glykoproteiny ZP na sebe vážou velké množství N- a O-glykanů a vykazují značnou heterogenitu molekulové hmotnosti a náboje v důsledku posttranslačních modifikací, jako jsou glykosylace a sulfatace (Pastor 2008). Vysoká heterogenita je způsobena díky různému množství sialovaného a sulfatovaného poly-N-acetyllaktosaminu. N-řetězce jsou složeny z neutrálních a kyselých řetězců, které tvoří di-, tri- a tetraantenární N-glykany v komplexu s α -fukosylovým zbytkem (Yonezawa 1997). Neutrální N-glykany prasečích ZP glykoproteinů se řadí mezi diantenární fukosylované glykany obsahující N-acetyllaktosaminové řetězce a podílejí se na rozpoznávání spermií a oocytů (Töpfer-Petersen 1999). Kyselé N-glykany, které jsou vysoce sulfatované, se skládají z poly-N-acetyllaktosaminových řetězců různé délky, sulfatovaných v poloze C-6 GlcNAc ($\text{SO}_3\text{-6GlcNAc}$) (Noguchi 1992). N-glykany obsahují fukózové zbytky, ale žádné dlouhé manózoové řetězce (Parillo 1996). Přítomnost sacharidových zbytků v ZP hraje významnou roli pro druhově specifickou vazbu mezi oocytem a spermií (Dunbar et al. 1980).

Glykosylace prasečích ZP glykoproteinů, ke které dochází během meiotického zrání, je klíčová pro interakci spermie-*zona pellucida*, včetně vazby spermie na ZP a indukce akrozomální reakce (AR) u spermie vázané na ZP (Clarck 2010). Největší glykoprotein *zona pellucida* prasete, pZP2, má celkem šest potencionálních N-glykosylačních míst, pZP3 má tři místa a pZP4 má pět N-glykosylačních míst. Kromě toho obsahuje pZP3 šest a pZP4 tři O-glykosylační místa (Yurewicz 1991). Mapování zralého pZP4 glykoproteinu odhalilo, že tři potenciální N-glykosylační místa Asn203, Asn220 a Asn333 nesou neutrální dvouanténové N-glykany. Výjimkou je Asn220, toto místo je glykosylováno také neutrálními tří- a čtyřanténovými N-glykanovými řetězci. V N-koncové části pZP4 byla také lokalizována alespoň jedna disulfidická vazba mezi sousedními cysteinovými zbytky Cys224 a Cys243 (Töpfer-Petersen 1999; Nakano 2001; Tumova et al. 2021). O-glykany zahrnují 9 neutrálních a 26 kyselých nevětvených řetězců typu core-1 O-N-acetylglaktosamin. Podobně jako N-glykany jsou O-glykany sulfatované a/nebo sialované v poloze C-6 GlcNAc (Hokke et al. 1994).



Obr. 6. Znázornění glykosylačních míst na *zona pellucida* prasete (Převzato a upraveno z Töpfer-Petersen 2008)

3.2.3 Glykoproteiny *zona pellucida*, jejich funkce a struktura

Jak již bylo zmíněno, *zona pellucida* se úzce podílí na několika kritických fázích oplození. Poskytuje receptory pro druhově specifické uchycení a vazbu kapacitovaných spermií, a také se podílí na následné indukci akrozomové reakce spermií (Berger et al. 1989).

Srovnávací cytochemické studie prokázaly druhově závislé rozdíly v expresi a distribuci cukerných částí v celé ZP. Uspořádání ZP v odlišných vrstvách je doprovázeno prostorovým rozmístěním jasně definovaných cukerných struktur v celé šířce ZP (Shalgi et al. 1991). Například u hlodavců se liší pouze expresí ligandových míst pro lektiny rozpoznávající α -galaktózu a/nebo β -N-acetylglaktozamin. U člověka, psa, kočky a prasete vazba těchto lektinů není detekovatelná. Naopak některé sacharidové struktury se vyskytují u všech zkoumaných druhů, jedná se převážně o cukerné zbytky manózy a N-acetylglukosaminu, které jsou obvykle součástí v oblasti jádra N-vázaných oligosacharidů (Geyer & Geyer 1998). Histochemické studie lektinů ukázaly, že většinu rozdílů ovlivňuje terminální neredukující oblast cukerných řetězců ZP. To má za následek, že i malé strukturální rozdíly v cukerných řetězcích mohou přispívat k vytvoření druhově specifické povahy interakce gamet (Sinowatz et al. 2001).

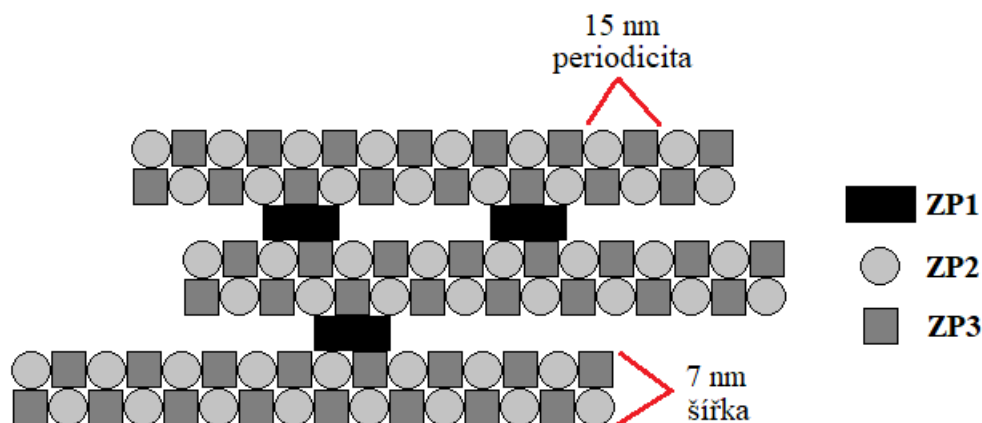
Za pomoci elektroforézy lze glykoproteiny ZP prasat rozdělit na dvě skupiny podle rozdílné molekulové hmotnosti (Hedrick & Wardrip 1986). První skupina má molekulovou hmotnost 90 kDa. Druhá skupina má molekulovou hmotnost 55 kDa a představuje přibližně 80 % celkového obsahu bílkovin v prasečí ZP. Druhá skupina se skládá ze dvou polypeptidů označovaných jako pZPB (ZP4) a pZPC (ZP3) (Sacco et al. 1989). Bylo zjištěno, že každý z polypeptidů pZPB a pZPC může mít až pět potencionálních N-glykosylačních míst. Ve skutečnosti však na sebe vážou tři nebo čtyři N-vázané oligosacharidové řetězce, a ještě navíc tři (u pZPB) a šest (u pZPC) O-vázaných glykanových řetězců, jak bylo zjištěno z aminokyselinové sekvence kódované cDNA (Yurewitz et al. 1992).

Ve skupině 55 kDa oligosacharidů s N-vazbou dělíme na neutrální (28 %) a kyselé (72 %). Neutrální řetězce působí jako receptory pro spermie, kyselé řetězce nemají žádnou aktivitu (Noguchi & Nakano 1992; Nakano & Yonezawa 2001). Do neutrální frakce se řadí více než 30 různých struktur N-vázaných oligosacharidů. Některé struktury postrádají terminální neredukující galaktózový zbytek na α -1,3- nebo man α -1,6- ramenech trimannosylového jádra, některé naopak navíc obsahují ve svých vnějších řetězcích lineární N-acetyllaktosaminové repetice (Mori et al. 1989). Kyselé N-vázané sacharidové řetězce se vyskytují jako di-, tri- a tetraantenární struktury. Ve většině případů jsou biantennární a 4,2- rozvětvené triantenární řetězce sialovány. Sulfatace probíhá na poly-N-acetyllaktosaminových repeticích a na 1,6- N-acetylglukosaminových zbytcích (Noguchi & Nakano 1992). Zajímavé je, že delší řetězce jsou převážně zakončeny zbytky Neu5Gc/Ac (kyselina N-glykolyneuraminová), které jsou α -2,3- vázané na galaktózový zbytek nejvzdálenější laktosaminové jednotky. Kratší řetězce, bez N-acetyllaktosaminové jednotky nebo pouze s jednou touto jednotkou, jsou sialovány na proximálním (nejbližším) N-acetylglaktosaminovém zbytku (Hirano et al. 1993). Množství sulfátovaných N-acetyllaktosaminových repetic a stupeň sializace přispívají k obrovské heterogenitě sacharidové struktury matrice ZP (Hokke et al. 1993).

Proces fertilizace oocyty u savců začíná mezi *zona pellucida* a spermii, kdy se kapacitovaná (oplozeníschopná) spermie naváže primární vazbou na neutrální N-glykany. Následuje rozpoznání gamet a spuštění signální kaskády, která vede k akrozomové reakci spermie. Akrozomální reakce umožňuje penetraci spermie skrz ZP. Sekundární vazba spermii na *zona pellucida* je zprostředkována vazbou na sulfátované glykany ZP přes proacrosin/acrosin, p38 a jiné ZP-vazebné proteiny spermii (Töpfer-Petersen 2008). Spermie proniká do perivitelinního prostoru a putuje až k oolomě. Splynutím spermie a membrány dochází k oplození oocyty (Raz & Shalgi 1998).

Myší *zona pellucida* se skládá ze tří glykoproteinů – ZP1, ZP2 a ZP3 (Wassarman 1980). Hasegawa (2006) zjistil, že myší spermie se napřed váží na ZP3 glykoprotein, který indukuje akrozomální reakci, a při penetraci spermie do oocyty udržuje spermie vazbu s oocytem díky ZP2. Glykoproteiny ZP2 a ZP3 se mohou propojit do dlouhých vláken a glykoprotein ZP1 slouží jako tzv. crosslinker – spojuje navzájem tato jednotlivá dlouhá vlákna (Wassarman et al. 2005). Nezbytná je přítomnost O-glykanových řetězců pro navázání spermie na ZP3, nepostradatelné jsou i N-glykany, které slouží k rozpoznání gamet (Yonezawa 2012).

U prasete jsou dlouhá vlákna tvořena glykoproteiny ZP3 a ZP4, crosslinker je glykoprotein ZP2. Odhaduje se, že molární poměr ZP2 : ZP3 : ZP4 je 1 : 6 : 6 (Kanai 2008).



Obr. 7. Organizace ZP filament myší *zona pellucida* (Převzato a upraveno z Wassarman et al. 2005)

3.3 Lektiny

V přírodě se vyskytují určité skupiny látek, které jsou schopné nekovalentně vázat sacharidy. Patří sem i samostatná skupina proteinů, přesněji glykoproteinů, které se nazývají lektiny. Lektiny vážou sacharidy reverzibilně, s vysokou specifitou a vytváří glykokonjugované komplexy (Mishra et al. 2019). Vyskytují se u většiny druhů organismů, od virů a bakterií až po rostliny a živočichy, a uplatňují se v mnoha biologických procesech, jako je obranyschopnost organismu, buněčný vývoj, symbióza mezi rostlinami a mikroorganismy, cílená migrace buněk, fagocytóza, endocytóza nebo proces fertilizace (Lis & Sharon 1990). Používají se také k popisu změn na povrchu buněk během fyziologických nebo patologických procesů, jako je diferenciací buněk nebo adheze infekčních agens na hostitelskou buňku (Lis 1998). Lektiny mají schopnost aglutinovat erythrocyty v závislosti na krevní skupině a druhu lektinu (Mishra et al. 2019). Ačkoli se některé lektiny podílejí na procesech imunitního systému, neřadí se mezi protilátky, jelikož nejsou produktem primární imunitní odpovědi. Také nevykazují katalytickou aktivitu, takže je nelze zařadit ani mezi enzymy (Sharon 1998; André 2015).

Výskyt proteinů schopných aglutinovat červené krvinky (vázat se na jejich sacharidové struktury na povrchu) je známý již od konce 19. století, přesněji od roku 1888, kdy doktor Peter Hermann Stillmark (22. června 1860 – 23. červen 1923) pozoroval hemaglutinaci s extraktem ze semen skočce obecného (*Ricinus communis*) (Sharon 2004). Proteinovou frakci, která hemaglutinaci způsobila, pojmenoval ricin (RCA – *Ricinus communis* aglutinin). Vzhledem ke své schopnosti aglutinovat erythrocyty a díky tomu, že lektiny byly ze začátku nejvíce izolovány z rostlin, byly tyto proteiny označovány až do roku 1954 jako fytohemaglutininy (Sharon 1998; De Mejía 2005). V roce 1954 americký imunochemik William Clouser Boyd (4. březen 1903 – 19. únor 1983) zavedl a ustanovil pojem „lektiny“ (z latinského *legere* – sbírat/volit/vybrat) (Gabiús 2013).

Lektiny jsou využívány v mnoha biologických oborech, např. buněčné biologii, biochemii a imunologii. Používají se na detekci, izolaci a charakterizaci glykokonjugátů,

rozpoznávání rakovinných buněk, při histochemii buněk a tkání a jsou také neocenitelné k pochopení molekulárních mechanismů různých buněčných procesů (Sharon 2008). Lektinová histochemie je účinným nástrojem při identifikaci různých sacharidových zbytků v *zona pellucida* prasečích oocytů, jak již dříve bylo prokázáno i u jiných druhů zvířat, např. potkanů (Barbeito et al. 2013), králíků a psů (Parillo & Verini-Supplizi 2000).

3.3.1 Struktura lektinů

Lektiny jsou heterogenní skupinou oligomerních proteinů lišící se svou velikostí, uspořádáním, počtem podjednotek a celkovou trojrozměrnou strukturou. Jsou tvořeny převážně proteiny vázajícími sacharidy nebo glykoproteiny neimunitního původu, které vážou buňky nebo glykokonjugáty (Goldstein et al. 1980). Obsahují vazebné místo CRD (carbohydrate recognition/binding domain), které jim umožňuje specificky rozpoznávat sacharidy (Weiss 1996). Při vazbě lektin-sacharid se uplatňuje pestré spektrum vazeb – vodíkové můstky, iontové vazby, Van der Waalsovy síly, hydrofobní interakce a tzv. π - π interakce (π - π stacking, pi stacking) mezi monomery sacharidů a jádry aromatických aminokyselin v CRD doménách. Některé třídy lektinů potřebují ke své funkci bivalentní kationty, které stabilizují vazbové místo – dochází k fixaci polohy aminokyselin, které interagují se sacharidy (Weis 1996). Vazba lektinů s jednoduchými nebo komplexními sacharidovými konjugáty je reverzibilní a nekovalentní, přičemž glykokonjugáty mohou být volné v prostředí nebo vázané na povrchu buněk. Vícenásobně rozvětvené oligosacharidy mají silnější vazebnou afinitu na lektiny než lineární, a to z důvodu kooperace vazebných mechanismů komplexů lektinů a sacharidů (Helliwell 1997).

Každá molekula lektinu obsahuje dvě nebo více vazebných míst pro sacharid, můžeme je tedy rozdělit na bivalentní nebo polyvalentní. Polyvalentní lektiny, které mají více CRD domén, jsou schopné aglutinovat buňky, protože se váží na exprimované glykoproteiny (glykolipidy) na povrchu buněk. Některé polyvalentní lektiny jsou schopné díky vazbě na sacharidové receptory na povrchu buňky pozměnit jejich chování a podnítit jejich signalizaci nebo internalizaci do buňky (Sharon 2006).

Specifická schopnost lektinů vázat se na povrch buněk závisí především na monosacharidech nebo jednoduchých oligosacharidech. Zvláštním případem jsou sacharidy spojené s enzymy. Pokud vázaný enzym má více vazebných míst, a aglutinují nebo srážejí glykokonjugáty, lze tyto komplexy sacharid-enzym považovat také za lektiny (Vakri 2009).

3.3.2 Druhy lektinů

Při rozdělování lektinů do skupin se zohledňuje kromě jejich taxonomického původu také jejich lokalizace v buňkách a organismech, jejich specifita vůči sacharidům a glykokonjugátům, uspořádání jejich domén a epitopů, ... Proto se může zařazení do tříd jednotlivých lektinů překrývat (Lakhtin 2011).

Lektiny dle specifity k monosacharidům

Lektiny dokáží s vysokou mírou specifity rozpoznávat a vázat se na sacharidy. Sacharidy mohou být buď volné nebo vázané v glykolipidech, glykoproteinech či oligosacharidových zbytcích na povrchu buněk. Podle rozpoznávaných monosacharidů jsou lektiny rozděleny do pěti základních skupin, které preferují vazbu na: manózu (Man), fukózu (Fuc), N-acetylglukosamin (GlcNAc), galaktózu/N-acetylgalaktosamin (GalNAc), N-acetylneuraminovou (sialovou) kyselinu (Sia) (De Mejía 2005). Těchto pět zmíněných monosacharidů se obvykle nachází na povrchu eukaryotických buněk, což hraje důležitou roli v biologické aktivitě lektinů, a proto je možné je využít ke zkoumání interakcí s glykany na povrchu buněk (Sharon 2004).

Specifita lektinů nemusí být absolutní, ale relativní. Na základě studie aglutininu u *Helix pomatia* (hlemýžď zahradní) se zjistilo, že aglutinin se specificky váže na N-acetyl-D-galaktosamin, ale je schopný se vázat i na N-acetyl-D-glukosamin s několikanásobně nižší afinitou (Hammarström 1977). Klasifikace na základě specifity k monosacharidům představuje až přílišné zjednodušení jejich vazebných vlastností a specifita na úrovni oligosacharidů může být odlišná, protože je založena na výsledcích získaných z testů s použitím inhibičních monosacharidů. Příkladem je konkanavalin A (ConA) a LCA (*Lens culinaris* agglutinin). Oba lektiny jsou specifické pro D-manózu/D-glukózu, ale LCA preferuje mannosylované glykany s fukosylací jádrovou (fukóza je přítomná ve vazbě α -1,6) na úrovni oligosacharidů a vykazuje tak užší specifitu než ConA (Lis 1998).

Tab. 2. Rozdělení vybraných lektinů dle jejich specifit (Převzato a upraveno dle Sharon & Lis 2013)

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
galaktóza/N-acetylgalaktosamin (GalNAc)	CCL, DBA, VVA, WFA, MPA, SBA
N-acetylneuraminová (sialová) kyselina (Sia)	LFA, MAL, MAH, PSL, SNA, SSA, WGA

Živočišné lektiny

Všechny živočišné lektiny mají vlastní CRD a stejnou sekvenci aminokyselinových zbytků o velikosti 115-130 bází (Kilpatrick 2002). Mezi hlavní role živočišných lektinů patří zprostředkování kontaktu s buňkami, rozpoznání patogenů, modulace imunitní odpovědi a adheze buněk na povrch epitelu. Jsou důležitou součástí nespecifické odpovědi imunitního systému živočichů, např. lektin MBL (mannan binding lectin; lektin vázající manózu), který se váže na povrch patogenu a aktivuje komplement. Na základě sekvenční homologie se živočišné lektiny dělí na galektiny, pentraxiny, lektiny typu C, P a I (Kilpatrick 2002).

Galektiny patří mezi lektiny s vysoce homologní doménou typu S (aktivita závislá na SH skupinách) a s vysokou afinitou se specificky váží β -galaktosidové zbytky.

Podílejí se na regulaci apoptózy, mají funkci při adhezi a migraci buněk, čímž ovlivňují metastázování buněk nádorů a reagují s protilátkami třídy IgE a receptorem pro FcεR 1 (vysokoafinitní receptor) (Krejsek & Kopecký 2004; Liu 2005).

Mezi pentraxiny se řadí sérový amyloid P a C-reaktivní proteiny, které patří mezi reaktanty akutní fáze zánětu, a podílejí se na přirozené imunitní odpovědi (Mishra et al. 2019).

C-lectiny obsahují prototypický lektinový záhyb, který se skládá ze dvou antiparalelních β-řetězců, dvou α-helixů a tzv. domény rozpoznávající sacharidy CRD (carbohydrate recognition domains), která váže sacharidové struktury v závislosti na koncentraci vápníkových iontů. Vápník se přímo zapojuje do vazeb ligandu. Do kategorie lektinů typu C patří tři rodiny lektinů – endocytární lektiny, kolektiny a selektiny. C-lectiny se nacházejí v extracelulární matrix, séru a membránách (Hatta 1999; Krejsek & Kopecký 2004).

Lektiny typu P jsou transmembránové glykoproteiny schopné vázat manóza-6-fosfát. Lektiny typu I mají doménu podobnou imunoglobulinu (Ig-like), která zprostředkovává rozpoznávání glykanů. Mezi tyto I-lectiny patří např. siglec lektiny (sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins; lektiny imunoglobulinového typu vázající kyselinu sialovou), které jsou známé jako regulátory signalizace imunitních buněk. Zástupce siglec lektinů je lektin CD22, který funguje jako inhibiční molekula pro receptor B-lymfocytů (BCR) a brání nadměrné aktivaci imunitního systému a následnému rozvoji autoimunitních onemocnění (Hatta 1999; O'Reilly & Paulson 2009).

Rostlinné lektiny

Tato skupina lektinů se objevuje téměř ve všech taxonomických jednotkách nahosemenných, krytosemenných a nižších rostlinách. Vyskytují se v listech, kůře, stoncích, hlízách, oddencích nebo cibulkách. V největší koncentraci se nacházejí v semenech. Mezi nejvíce prozkoumané rostlinné lektiny patří WGA (wheat germ agglutinin) z *Triticum vulgare* (pšenice setá) a RCA (*Ricinus communis agglutinin*) ze skočce obecného. Díky jednoduché izolaci a distribuci, byly studovány jako první (Etzler 1985).

Velký význam mají při buněčné signalizaci a komunikaci mezi jednotlivými buňkami, podílejí se na vývoji, poskytují rostlinám ochranu před škodlivými patogenními mikroorganismy, hmyzem a zvířaty. Zajímavé je, že ačkoli lektiny vážou jednoduché sacharidy, mají vyšší afinitu k oligosacharidům, které se v rostlinách vůbec nevyskytují, ale jsou běžné u hub, hmyzu a živočichů (Peumans 1995).

Na základě strukturního uspořádání se dělí na merolektiny, hololektiny, superlektiny a chimerolektiny. U merolektinů je zajímavé, že se skládají výhradně jen z jediné CRD domény, a proto nejsou schopné aglutinovat buňky, a nemají katalytickou funkci. Příkladem merolektinu je lektin hevein z *Hevea brasiliensis* (kaučukovník brazilský) (Peumans et al. 2001). Nejvíce rostlinných lektinů se řadí do podskupiny hololektinů, které obsahují nejméně dvě identické nebo velice podobné domény, postrádají katalytickou funkci a jsou schopné buňky aglutinovat a precipitovat glykokonjugáty. Do této skupiny lektinů patří např. konkanavalin (ConA) z *Canavalia ensiformis*, UDA (*Urtica dioica* affludin) z kopřivy dvoudomé, PHA (phytohaemagglutinin) z *Phaseolus vulgaris* (fazol obecný) nebo PSA (*Pisum sativum* agglutinin) z hrachu setého (Fokunang & Rastall 2003). Superlektiny také obsahují více CRD domén, jako hololektiny, ale rozdíl je v tom, že jsou tyto CRD domény odlišné

a rozpoznávají různé typy sacharidů. Například lektin TxLC-I (*Tulipa gesneriana* agglutinin), který byl izolován z tulipánu, je tvořen dvěma tandemově uspořádanými doménami, jedna z nich rozpoznává N-acetyl-D-galaktosamin a druhá rozpoznává D-manózu (Van Damme 1996). Chimerolektiny jsou fúzní proteiny složené z tandemově uspořádaných CRD domén vázajících sacharidy a jedné nebo více funkčně odlišných domén, které mají přesně definovanou enzymatickou nebo jinou biologickou aktivitu a musí působit nezávisle na doméně vázající sacharidy. Patří sem například ricin (RCA), který patří do rodiny proteinů inaktivujících ribozomy (RIP) (Peumans 1998). Zatímco lektinová doména rozpoznává sacharid na povrchu buňky, doména s katalytickou aktivitou obsahuje RNA N-glykosidázu, která je zodpovědná za odstranění vysoce konzervovaného adeninového zbytku z 28S ribozomální RNA. Výsledkem je, že ribozom není schopen vázat elongační faktor 2 a syntéza proteinů je tak zablokována (Lannoo 2014).

Lektiny virů a bakterií

Lektiny na povrchu virů a bakterií, které jsou nazývané také jako adheziny, jsou zodpovědné za přichycení organismu na povrch hostitelské buňky, což je klíčové pro vypuknutí infekce (Hooper & Gordon 2001). To bylo poprvé demonstrováno pomocí hemaglutininu viru chřipky – lektinu specifického pro kyselinu N-acetylneuraminovou. Hemaglutinin se skládá ze dvou glykoproteinů, HA1 a HA2, spojených disulfidickou vazbou. Pokud se tento protein odstraní z membrány pomocí sialidázy (neuraminidázy), zabrání se tak navázání viru na hostitelskou buňku (Lis 1998, Sharon 2004).

Pro bakteriální lektiny je typické, že se v bakteriích nachází v podobě podlouhlých mikroskopických multipodjednotkách, které se nazývají fimbrie nebo pili a hrají podstatnou roli při buněčných interakcích a patogenitě mikroorganismů (Sharon 1987). U gramnegativních bakterií se fimbrie nachází často vedle bičků, protože jsou adhezivní a vedou ke spojování buněk (Šilhanová 2004).

Lektiny z mořských řas a hub

Fykolektiny (lektiny získané z mořských řas) vykazují specifitu spíše pro glykoproteiny než pro monosacharidy. Mají vysoký obsah kyselých aminokyselin a pro svou biologickou aktivitu nevyžadují ionty kovů. Na základě vazebných vlastností se sacharidy fykolektiny dělíme na tři hlavní kategorie: specifické komplexní lektiny vázající N-glykan, lektiny se specifitou pro N-glykan s vysokým obsahem manózy a lektiny mající obě zmíněné vlastnosti (Rogers & Hori 1993). Tyto lektiny jsou využívány v biomedicíně výzkumu pro své protizánětlivé, protivirové a protinádorové vlastnosti (Singh 2015).

Pro lektiny z hub je typická vysoká specifita vůči mucinům a N-acetylgalaktosaminu (GalNAc). Zdrojem dosud známých lektinů jsou z 82 % houby, 15 % pochází z plísní a 3 % mají původ v kvasinkách (Singh 2010). Většinou jsou přítomny v plodnicích, ale několik výjimek se nachází v myceliu. Hrají zásadní roli v růstu, vývoji a morfogenezi při mykorhize. Podílejí se také na časných fázích infekce prostřednictvím interakce s glykokonjugátem hostitele (Khan & Khan 2010).

3.3.3 Vlastnosti a funkce lektinů

Byla provedena řada studií, které se pokusily demonstrovat účinky lektinů v *in vivo* a *in vitro* podmínkách. *In vitro* bylo zjištěno, že lektiny mají jak stimulační, tak inhibiční účinky na mitogenezi lymfocytů, nejvíce citlivé jsou lymfocyty gastrointestinálního traktu (GIT) (Rini 1995). Lektiny dokáží agregovat imunoglobuliny, spouštět alternativní cestu aktivace komplementu, potlačovat růst plísňů a rovněž indukovat uvolňování histaminu z žírných a bazofilních buněk (Rini 1995). Rostlinné a živočišné lektiny jsou vysoce stabilní vůči vysokým teplotám (při 70 °C vydrží déle než 30 minut). Lektiny jsou také relativně odolné vůči trávení, mají silnou rezistenci proti působení žaludečních kyselin a proteolytickým enzymům (Rocca 2004). Některé z nich jsou degradovány a jiné procházejí střevem. Přibližně 1-5 % lektinů se u zvířat znovu vstřebává do krevního oběhu, což je považováno za významné množství, které je dostatečné k vyvolání imunitní reakce (Rini 1995).

Funkcí a biologických rolí lektinů je mnoho. Některé lektiny se mohou podílet na ukládání a transportu cukrů, jiné zase mohou být asociovány s vazbou symbiotických bakterií rodu *Rhizobium* při tvorbě kořenových hlíz, některé byly použity jako nosiče pro podání chemoterapeutických látek. Pro svou důležitou roli při adhezi a aglutinaci jsou považovány za významné jak v symbiotických, tak v patogenních interakcích mezi mikroorganismy a hostiteli (Kilpatrick 1984; Kumar 2012). Interakce rostlinných lektinů s mikroorganismy byly použity při identifikaci bakterií, hub a prvoků. Lektiny jsou užitečné pro popis jednotlivých komponent bakteriálních buněk a detekci receptorů bakteriofágů. Jednou z hlavních výhod používání lektinů v mikrobiologii je, že lze částečně analyzovat místa buněčných nebo povrchových receptorů pomocí inhibice haptenu (malé molekuly, které vyvolávají imunitní odpověď) (Damjanov 1987). Mezi další vlastnosti a výhody lektinů patří vysoká stabilita, aktivita i v malé koncentraci, jejich komerční dostupnost a možnost zkoumat jemné strukturní rozdíly na povrchu buněk mezi různými izoláty (Slifkin & Doyle 1990).

Existuje několik studií, které využily lektiny pro aglutinaci červených krvinek, a tím určily specifické krevní skupiny erytrocytů. Vzhledem k jejich rozmanitým biologickým vlastnostem byly lektiny použity jako sondy ke zkoumání povrchových buněčných struktur a funkcí. Jsou také významnými reagenty pro zkoumání povrchových buněčných receptorů u bakterií, prvoků a vyšších organismů. Některé lektiny se využívají k frakcionaci živočišných buněk, jako jsou např. B a T lymfocyty nebo k prokázání změn ve struktuře buněčného povrchu po parazitární či virové infekci (Nicolson 1974).

Tab. 3. Vybrané podskupiny lektinů, jejich lokalizace a funkce (Převzato a upraveno z Kumar 2012)

Podskupina lektinů	Lokalizace	Funkce
Calnexin	Endoplazmatické retikulum	Třídění proteinů v ER
C-typ	Plazmatická membrána, extracelulární prostor	Buněčná adheze, vrozená imunita
F-box lektiny	Cytoplazma	Degradace špatně sbalených proteinů
Fikoliny	Plazmatická membrána, extracelulární prostor	Vrozená imunita
F-typ	Extracelulární prostor	Vrozená imunita
Chinináze podobné lektiny	Extracelulární prostor	Metabolismus kolagenu
I-typ	Plazmatická membrána	Buněčná adheze
L-typ	Endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát	Třídění proteinů
M-typ	Endoplazmatické retikulum	Degradace glykoproteinů asociovaná s ER
P-typ	Sekreční dráha (ER, GA, sekreční granula, lysosomy)	Třídění proteinů z GA, degradace glykoproteinů v ER
R-typ	Golgiho aparát, plazmatická membrána	Třídění enzymů, regulace glykoproteinových hormonů
S-typ (galektiny)	Extracelulární prostor, cytoplazma	Regulace cytoplazmatických dějů (např. apoptóza), prokřížení extracelulárních glykoproteinů

3.3.4 Stručný popis vybraných lektinů

RCA

Ricin (RCA – *Ricinus communis* agglutinin) je protein izolovaný z *Ricinus communis* (skočec obecný). Tento lektin má úzkou specifitu na galaktózu a laktózu. RCA má N-glykosidázovou aktivitu a 28S rRNA. Je toxický, jeho účinkem jsou především ovlivňovány ledviny, plíce, játra a lymfatické uzliny (De Mejía 2005; Manning et al. 2017). Je složen ze dvou řetězců A a B, které jsou propojené disulfidickými můstky a každý řetězec má jinou funkci. Jeho podjednotka B na β -galaktosidáze se vyznačuje poměrně vysokou reaktivitou. Ta způsobuje, že lektinová část ricinu může dopravit druhý toxický řetězec A do buněk a být tak příčinou nechtěných i zamýšlených intoxikací (Barbieri et al. 2003).

Konkanavalin A (ConA)

Konkanavalin A je luštěninový lektin izolovaný z fazolí kanaválie (*Canavalia ensiformis*) a purifikován afinitní chromatografií. Jeho molekulová hmotnost je 104 kDa. Poprvé byl objeven v roce 1975, a od té doby bylo nalezeno 22 dalších ConA podobných lektinů. Má širokou použitelnost a je nejvyužívanějším lektinem v molekulárně biologickém výzkumu (Krauss et al. 1999); Cavada 2019).

ConA se specificky váže na struktury α -manózy a α -galaktózy, a pro svou aktivitu vyžaduje přítomnost Ca^{2+} a Mn^{2+} (Cavada 2019). Je složen ze čtyř podjednotek, které obsahují 237 aminokyselin. Pro monometry je typické β -skládání, které obsahuje antiparalelní β -listy spojené smyčkou. Přední list je tvořen šesti vlákny, zadní list sedmi vlákny. Celá struktura je stabilizována dvěma hydrofobními jádry a velkým množstvím nekovalentních interakcí (Cavada 2019).

4 Materiál a metodika

Zisk a výběr oocytů

Oocyty byly aspirovány z vaječníků od poražených prepubertálních prasniček. Vaječníky byly transportovány do laboratoře v termo lahvích s fyziologickým roztokem (0,9% chlorid sodný) při teplotě 39 °C a zpracovány byly do 2 hodin po odběru. Oocyty spolu s folikulární tekutinou byly získávány z folikulů o velikosti 2-5 mm aspirací za pomoci injekční stříkačky (20 ml) s jehlou 20G. Folikulární tekutina byla následně stereomikroskopicky prohlédnuta a za pomoci skleněné pipety byly vybírány oocyty, které následně byly přeneseny do modifikovaného média M199. Modifikované médium M199 bylo doplněno o gentamicin (0,025 mg/ml), HEPES (1,5 mg/ml), laktát vápenatý (0,06 mg/ml), pyruvát sodný (0,25 mg/ml) a 10% BFS (bovinní fetální sérum). Pro experimenty byly použity jen oocyty s nepoškozenou cytoplazmou a s kompaktní vrstvou kumulárních buněk.

Tab. 4. Složení modifikovaného média M199

Látka	Množství na 100 ml média M199
Gentamicin	25 mg
HEPES	150 mg
Laktát vápenatý	60 mg
Pyruvát sodný	25 mg
BFS	100 mg

In vitro kultivace oocytů

Před samotnou kultivací byly oocyty nejdříve třikrát promyty v modifikovaném médiu M199 a poté proběhla samotná kultivace ve čtyř-důlkových miskách s obsahem 1 ml modifikovaného média s přidaným gonadotropinem P.G. 600 při teplotě 39 °C a 5% CO₂. Oocyty ve fázi zárodečného vajíčku (GV fáze) nebyly kultivovány. Oocyty do první meiotické metafáze byly kultivovány 24 hodin a do druhé meiotické metafáze 46 hodin.

Fixace oocytů

Oocyty byly pomocí tenkostěnné skleněné pipety a opakovaným pipetováním zbaveny kumulárních buněk. Následoval třikrát oplach v PBS/PVA a byly inkubovány v lednici po dobu 10 minut. To vše bylo zopakováno třikrát. Poté byly oocyty přeneseny do paraformaldehydu a proběhla jejich fixace po dobu 40 minut. Následně byly oocyty opláchnuty v PBS/PVA a přeneseny do kapky PBS/NaN₃ (azid sodný).

Barvení oocytů

Oocyty byly nejprve opláchnuty v 0,5% BSA/PBS. Následně byly přeneseny do kapky o objemu 100 μ l, která obsahovala 0,5% BSA/PBS a lektin konjugovaný s biotinem. Pro experiment byly použity dva druhy lektinu – RCA a ConA. Oocyty byly inkubovány v kapce s lektinem RCA/ConA a BSA/PBS v poměru 1:50. Následovala inkubace oocytů v roztoku po dobu 30 minut. Po skončení inkubace byly oocyty třikrát opláchnuty v 0,5% BSA/PBS. Promyté oocyty byly přeneseny do 30 μ l kapky Ultra Avidinu – Fluorescein (1 μ l na 1 ml BSA/PBS), kde byly inkubovány 15 minut při pokojové teplotě za tmy. Po inkubaci byly oocyty pětkrát opláchnuty v kapce 0,5% BSA/PBS a dále přeneseny na podložní sklíčko s 30 μ l DAPI. Pro negativní kontrolu byly vybrány oocyty, které byly inkubovány v Ultra Avidinu a následně pětkrát opláchnuty v BSA/PVS.

Vyhodnocení experimentu

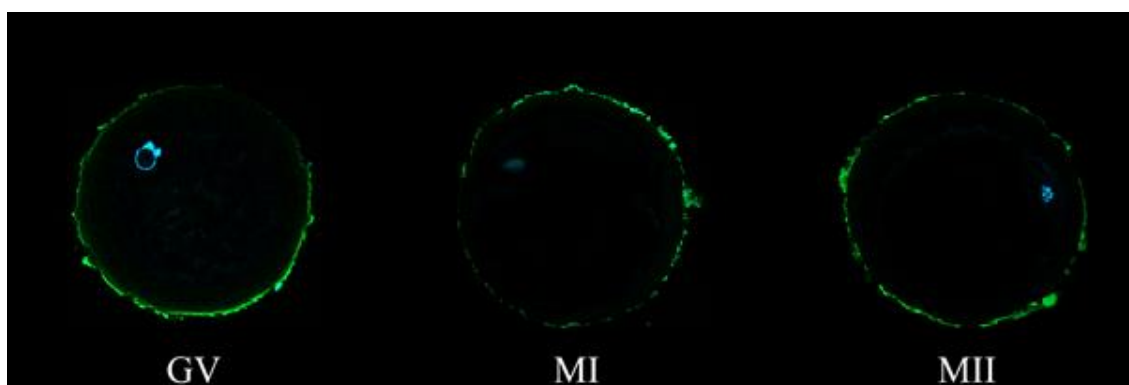
Za pomoci laserového konfokálního mikroskopu (Zeiss LSM 800) byly oocyty nasnímány při 400x zvětšení. Pořízené snímky byly následně vyhodnoceny v programu pro analýzu obrazu NIS Elements 2003. Na snímcích byla měřena relativní intenzita signálu FITC v oblasti *zona pellucida* oocytu. Výsledné hodnoty byly vyhodnoceny pomocí statistické metody jednofaktorová ANOVA v programu STATISTICA.

5 Výsledky

Cílem této diplomové práce bylo ověření hypotézy, že během meiotického zrání dochází ke změnám lokalizace vybraných sacharidových struktur glykoproteinů *zona pellucida* prasečích oocytů. Změny byly sledovány pomocí s biotinem konjugovaných lektinů RCA a ConA ve třech vývojových fázích oocytu – GV, MI a MII.

5.1 Imunofluorescenční detekce vybraných sacharidových struktur glykoproteinů *zona pellucida* pomocí lektinu RCA

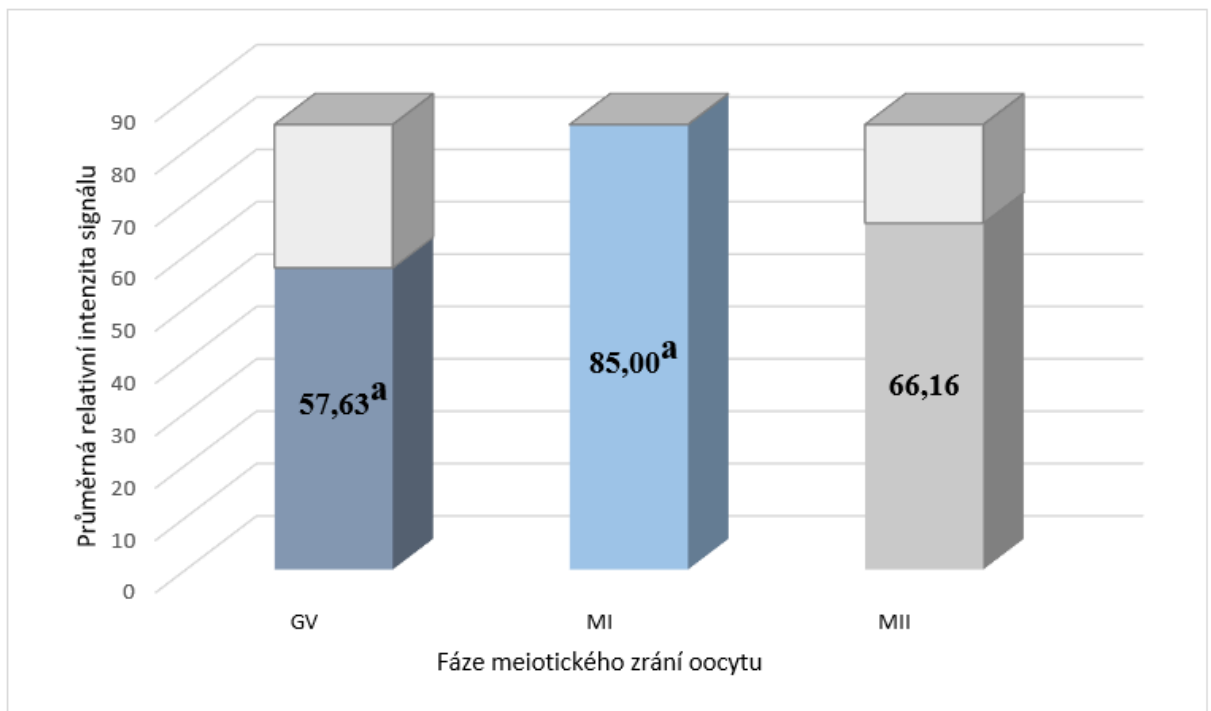
Fluorescenční signál lektinu byl zaznamenán v oblasti *zona pellucida* ve všech sledovaných fázích meiotického zrání (GV, MI a MII). Po podrobnějším hodnocení Scheffého metodou byl statisticky významný rozdíl pouze mezi skupinou oocytů ve stádiu GV a MI. Při porovnání oocytů ve stádiu GV a MII a MI s MII nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly.



Obr. 8. Lokalizace vybraných sacharidových struktur *zona pellucida* – lektin RCA. Sacharidové struktury *zona pellucida* prasečích oocytů byly lokalizovány za pomoci vazby biotinem značeným lektinem RCA, který se specificky váže na řetězce galaktózy vázané na N-acetylglukosamin, a to ve fázi zárodečného váčku (GV), ve fázi MI a MII. RCA je na snímku označen zeleně, modře je označen chromatin pomocí barviva DAPI. Oocyty byly nasnímány konfokálním mikroskopem ve středové rovině při zvětšení 400x.

Tab. 5. Relativní intenzita signálu lektinu v různých fázích meiotického zrání. GV = oocyty ve stádiu zárodečného váčku; MI = oocyty ve stádiu MI; MII = oocyty v metafázi druhého meiotického dělení. N = počet hodnocených oocytů. Intenzita signálu lektinu RCA je popsána jako průměr \pm jedna směrodatná odchylka. Intenzita signálu RCA se u jednotlivých stádií statisticky významně liší ($p < 0,05$).

Lektin RCA	GV	MI	MII
Intenzita signálu FITC	57,63 \pm 23,76	85,00 \pm 24,68	66,16 \pm 29,63
N	15	15	15



Graf 1. Relativní intenzita signálu lektinu v jednotlivých fázích meiotického zrání oocytů. Měřením bylo zjištěno, že oocyty ve stádiu zárodečného váčku (GV) vykazují nižší míru intenzity než oocyty ve stádiu MI a MII. Hodnota intenzity signálu lektinu se výrazně zvýšila ve stádiu MI a ve fázi MII se opět snížila. Rozdílným ^a superskriptem je znázorněn statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi jednotlivými skupinami.

5.2 Imunofluorescenční detekce vybraných sacharidových struktur glykoproteinů *zona pellucida* pomocí lektinu ConA

Fluorescenční signál byl zaznamenán v oblasti *zona pellucida* ve všech sledovaných fázích meiotického zrání (GV, MI a MII). Po podrobnějším hodnocení Scheffého metodou byl statisticky významný rozdíl mezi oocytami ve fázi GV a MI, a dokonce i mezi fázemi GV a MII. Bohužel mezi fázemi MI a MII nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl.

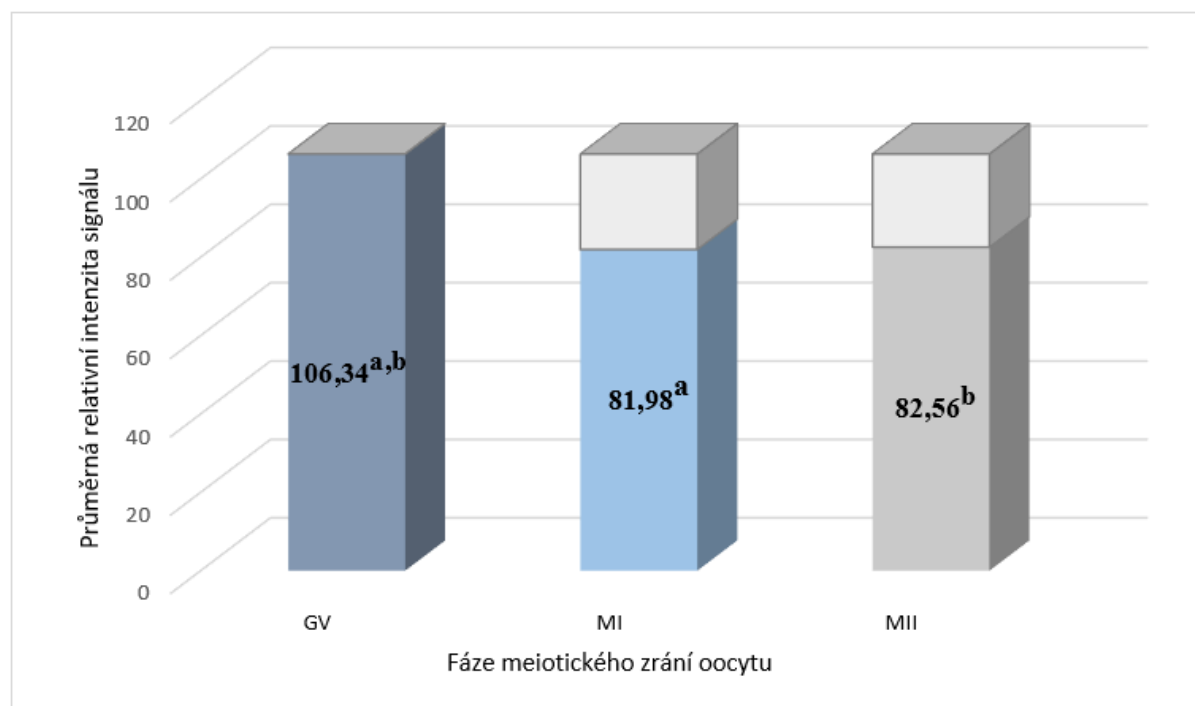


Obr. 9. Lokalizace vybraných sacharidových struktur *zona pellucida* – lektin ConA. Sacharidové struktury *zona pellucida* prasečích oocytů byly lokalizovány za pomoci vazby

biotinem značeným lektinem ConA, který se specificky váže na D-manózu, a to ve fázi zárodečného váčku (GV), ve fázi MI a MII. ConA je na snímku označen zeleně, modře je označen chromatin pomocí barviva DAPI. Oocyty byly nasnímány konfokálním mikroskopem ve středové rovině při zvětšení 400x.

Tab. 6. Relativní intenzita signálu lektinu v různých fázích meiotického zrání. GV = oocyty ve stádiu zárodečného váčku; MI = oocyty ve stádiu MI; MII = oocyty v metafázi druhého meiotického dělení. N = počet hodnocených oocytů. Intenzita signálu lektinu je popsána jako průměr \pm jedna směrodatná odchylka. Intenzita signálu ConA se u jednotlivých stádií statisticky významně liší ($p < 0,05$).

Lektin ConA	GV	MI	MII
Intenzita signálu FITC	106,34 \pm 12,95	81,98 \pm 28,87	82,56 \pm 14,79
N	26	26	26



Graf 2. Relativní intenzita signálu lektinu v jednotlivých fázích meiotického zrání oocytů. Měřením bylo zjištěno, že oocyty ve stádiu zárodečného váčku (GV) vykazují vyšší míru intenzity signálu lektinu než u oocytů ve fázi MI a MII. Během meiotického zrání intenzita značně klesá. Průměrná hodnota intenzity signálu ve fázi MI a MII je téměř totožná. Rozdílnými ^{a, b} superskripty jsou znázorněny statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi jednotlivými skupinami.

6 Diskuze

Významnou součástí *zona pellucida* jsou glykoproteiny, především jejich sacharidové struktury, díky kterým dochází k druhově specifickému rozpoznání a následně k vazbě gamet. Tato diplomová práce je zaměřena na změny lokalizace vybraných sacharidových struktur během zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách. K realizaci experimentů byly využity pro imunodetekci sacharidových struktur dva lektiny – RCA a ConA, které se specificky vážou na vzájemně odlišné sacharidové struktury. RCA rozpoznává galaktózu vázanou na N-acetylglukosamin a ConA se váže na D-manózu. Vazba na cílové sacharidové struktury těchto lektinů byla detekována u prasečích oocytů ve vybraných stádiích meiotického zrání (GV – stádium zárodečného vajíčka, MI – stádium metafáze prvního meiotického dělení a MII – stádium druhého meiotického dělení). Byla sledována relativní intenzita signálu fluorescenčně značených lektinů, specificky navázaných na struktury glykoproteinů *zona pellucida*. Při porovnání mezi jednotlivými lektiny byla intenzita signálu rozdílná. U lektinu RCA byla průměrná intenzita signálu nižší než u lektinu ConA, a také byly patrné rozdíly i mezi jednotlivými stádii oocytu, což naznačuje rozdílné zastoupení detekovaných sacharidových složek v glykoproteinech *zona pellucida*. Lektin RCA měl nejvyšší relativní intenzitu signálu detekovanou u oocytů ve stádiu MI, u lektinu ConA byla nejvyšší relativní intenzita signálu detekována u oocytů ve stádiu zárodečného vajíčka (GV).

RCA se specificky váže na β -D-Gal (β -D-galaktóza) na D-GlcNAc (N-acetyl-D-glukosamin), což potvrdili Parillo et al. již v roce 1996. Habibi et al. (2008) ve svém experimentu potvrdili významnou přítomnost N-acetyl- β -D-glukosaminových zbytků v glykoproteinech *zóny pellucida* ve všech vývojových stádiích oocytu, tedy od rostoucího až po plně dorostlý oocyt. Toto pozorování podporuje možnou účast N-acetylglukosaminových zbytků v interakcích spermie-*zona pellucida*. I Mendes et al. (2019) provedli studii, ve které potvrzují přítomnost GlcNAc a β -D-galaktózy v ZP oocytů prepubertálních a dospělých prasat ve všech fázích meiotického zrání oocytů. Parillo et al. (1996) také zjistili, že RCA však vykazuje slabší reakci, a tedy i intenzitu signálu lektinu ve vnitřní části ZP oproti vnější části. Po štěpení sialidázou se však intenzita signálu výrazně zvýšila po celé tloušťce ZP. Námí naměřená intenzita signálu lektinu u oocytů ve fázi zárodečného vajíčka byla v průměru 57,63, nejvyšší hodnota byla 105,52 a nejnižší 27,43. Podobné hodnoty naměřil ve své studii i Parillo et al. (2003). K významným změnám ve složení glykanů *zona pellucida* prasečích oocytů dochází především ve fázi MI, jak uvádí Pastor et al. (2008). Ve fázi MI se intenzita signálu zvýšila, v průměru dosahovala hodnoty 85,00, a v porovnání s fázemi GV a MII byla míra intenzity signálu nejvyšší. Během fáze MII došlo k mírnému poklesu, v průměru dosahovala intenzita signálu lektinu hodnoty 66,16. Desantis et al. (2009) se ve své studii věnovali koňským a prasečím oocytům. Zjistili, že lektin RCA má silnou reakci se *zona pellucida*, i s kumulárními buňkami. Další imunochemické studie Aviles et al. (1997) potvrdily, že jednotky GlcNAc jsou rozptýleny po celé matrix *zona pellucida* a jedna třída O-vázaných oligosacharidů na ZP3 byla charakterizována jako malý trisacharid s terminálním GlcNAc. Tyto údaje naznačují, že pravděpodobně i GlcNAc se nějakým způsobem může podílet na vazbě spermií na vajíčko (Aviles *et al.* 1997; Habibi et al. 2008).

Množství glykosidických jednotek *zona pellucida* je během vývoje prasečích oocytů obecně podobné těm, které byly pozorovány i u jiných druhů zvířat. Hlavní popsání rozdílů

se týkají prostorového rozložení cukerných zbytků $\text{SO}_4\text{Gal-}\beta\text{-1,3-GalNAc}$ a GlcNAc , které detekuje lektin RCA. Přítomnost glykoproteinů majících N- a O-glykosidické vazby v preantrálních a antrálních folikulech prasat byla podobná (Parillo et al. 2001). Trisacharid s koncovou kyselinou sialovou ($\alpha\text{2}\rightarrow\text{3,6-}\beta\text{-Gal-(1-4)-GlcNAc}$ (sialidáza/RCA-I) byl přítomen v oocytech v preantrálních a antrálních folikulů, stejně jako glukosaminové zbytky umístěné ve vnitřní a terminální poloze. Značení pomocí lektinu RCA naznačuje, že N-acetylglukosamin zaujímá spíše vnitřní než terminální polohu v sacharidové složce glykoproteinu (Parillo et al. 2000).

Rovněž Takahashi et al. (2013) se ve své studii věnovali lokalizaci neredukujících konců sacharidových řetězců na *zona pellucida* glykoproteinech (ZPG) u nezralých a zralých oocytů. Tyto neredukující konce neutrálních N-řetězců na ZPG se podílejí na vazbě spermií se ZP u prasat a skotu. Výsledky studie ukazují, že $\beta\text{-GlcNAc}$, který lze detekovat pomocí lektinu RCA, je přítomen na neredukujících koncích prasečích ZPG jak v nezralých, tak ve zralých oocytech. To se shoduje i s našimi výsledky, které potvrzují přítomnost sacharidových zbytků N-acetyl-D-glukosaminu v prasečí *zona pellucida* ve všech fázích meiotického zrání oocytu.

Lektin ConA má úzkou specifitu na $\alpha\text{-D-manózu}$. Provedenými experimenty byl lektin ConA detekován v ZP ve všech fázích meiotického zrání prasečího oocytu. Nejvyšší hodnoty relativní intenzity signálu navázaného lektinu byly pozorovány ve fázi zárodečného vaku, kdy průměrná hodnota byla 106,34. Ve fázi MI intenzita signálu klesla a průměrná hodnota během této fáze byla 81,98. Intenzita signálu se ve fázi MII nezvýšila a ani nesnížila, v průměru dosahovala hodnoty 82,56. Výsledky naší studie naznačují, že dochází ke změnám lokalizace vybrané sacharidové struktury ($\alpha\text{-D-manóza}$), a to především během přechodu z GV fáze do fáze MI. To potvrdila i analýza výsledků, kdy mezi fázemi GV a MI byl statisticky významný rozdíl. Podle Desantis et al. (2009) jsou N-vázané glykanové řetězce homogenně rozmístěné v celé ZP prasat. I Habibi et al. (2008) provedli podobný experiment, avšak s rozdílnými výsledky. Pro experimenty použili lektiny ConA, BS1, WGA, PNA a DBA, které byly konjugovány s HRP (horseradish peroxidase; avidin-peroxidáza). V průběhu meiotického zrání oocytů lektiny ConA a BS1 neznačily oocyty v žádném z vývojových stádií, což poukazuje na nevýznamnou přítomnost příslušných cukrů – koncové části D-manózy pro ConA a D-glukózu pro lektin BS1. Ačkoli existuje studie, která naznačuje nezbytnost galaktózových a manózových zbytků na neredukujícím konci O-vázaných oligosacharidů ze *zona pellucida* myšího oocytu pro vazebnou aktivitu spermie-ZP (Bleil & Wassarman 1988), pozorování Habibi et al. (2008) a Chiu et al. (2003) naznačují, že galaktóza pravděpodobně nesouvisí s rozpoznáváním spermie-ZP.

Takahashi et al. (2013) se ve své studii věnovali řetězcům s vysokým obsahem manózy, které lze detekovat za pomoci biotin konjugovaných lektinů ConA a GNA. Zjistili, že se lokalizace neredukujících terminálních zbytků $\alpha\text{-manózy}$ během meiotického zrání změnila. To se shoduje s našimi výsledky, ve kterých také bylo prokázáno, že dochází ke změnám lokalizace této sacharidové struktury. U prasat se zbytky $\alpha\text{-manózy}$ s neredukujícími konci vyskytují pouze na glykoproteinu ZP2, na glykoproteinech ZP3 a ZP4 nikoli, jak odhalily výsledky SDS-PAGE a Western blott analýzy. Tyto výsledky naznačují, že změna v distribuci neredukujících koncových zbytků $\alpha\text{-manózy}$ po dozrání oocytu nebyla způsobena redistribucí ZP2 na vnější povrch *zona pellucida* nebo modifikací sacharidů ZP3

a ZP4. Změna lokalizace je pravděpodobně způsobena biochemickými procesy *zona pellucida* během meiotického zrání (Takahashi et al. 2013).

7 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na ověření hypotézy, že během meiotického zrání dochází ke změnám lokalizace vybraných sacharidových struktur glykoproteinů *zona pellucida* prasečích oocytů.

Zona pellucida je extracelulární glykoproteinový obal oocytů, který v průběhu oplození hraje důležitou roli při druhově specifickém rozpoznání gamet a vazbě spermie na vajíčko. U prasat je ZP tvořena třemi druhy glykoproteinů – ZP2, ZP3 a ZP4, které jsou významně posttranslačně modifikovány, a to glykosylacemi, sulfatacemi a sializací, které jsou klíčové pro interakci spermie-*zona pellucida*.

Výsledky provedených experimentů zaměřených na imunofluorescenční detekci struktur D-manózy prostřednictvím lektinu ConA potvrdily, že dochází k signifikantnímu nárůstu relativní intenzity signálu ConA mezi prasečími oocyty ve fázi GV a MI. Při hodnocení výsledků experimentů zaměřených na detekci řetězce galaktózy vázané na N-acetylglukosamin pomocí lektinu RCA byl opět pozorován signifikantní nárůst relativní intenzity signálu RCA mezi prasečími oocyty ve fázi GV a MI. Hypotézu této diplomové práce se tedy podařilo potvrdit. Je možné, že zmíněné sacharidové struktury a jejich epitopy mohou hrát roli v kontaktu spermie se *zonou pellucidou*, také je možné, že tato změna sacharidové struktury glykoproteinů *zona pellucida* je nezbytná pro odkrytí klíčových vazebných epitopů rozpoznávaných spermii.

8 Literatura

- Abrieu A, Doree M, Fisher D. 2001. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *Journal of Cell Science*. **114**(2):257-267.
- Alberts B, Bray D, Johnson A. 2006. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Espero, Ústí nad Labem.
- André S, Kaltner H, Manning J, Murphy P, Gabius HJ. 2015. Lectins: Getting Familiar with Translators of the Sugar Code. *Molecules*. **20**(2):1788-1823.
- Angelo R, Rubin CS. 1998. Molecular Characterization of an Anchor Protein (AKAPCE) That Binds the RI Subunit (RCE) of Type I Protein Kinase A from *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*. **273**:14633-14643.
- Araújo VR, Gastal MO, Figueiredo JR, Gastal EL. 2014. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. **12**(1).
- Avilés M, Jaber L, Teresa Castells M, 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):1155-1163.
- Barbeito CG, Ortega HH, Matiller V, Gimeno EJ, Salvetti NR. 2013. Lectin-binding pattern in ovarian structures of rats with experimental polycystic ovaries. *Reproduction in Domestic Animals*, **48**(5):850–857.
- Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F. 1993. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. **1154**(3-4):237-282.
- Barresi MJF, Gilbert SF. 2020. *Developmental biology*. Twelfth edition. New York: Sinauer Associates.
- Berger T, Turner KO, Meizel S, Hedrick JL. 1989. Zona Pellucida-Induced Acrosome Reaction in Boar Sperm. *Biology of Reproduction*. **40**(3):525-530.
- Black JL, Erickson BH. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record*. **161**:45-55.
- Bork P, Beckmann G. 1993. The CUB Domain. *Journal of Molecular Biology*. **231**(2):539-545.
- Bork P, Sander C. 1992. A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF- β type III receptor. *FEBS Letters*. **300**(3):237-240.

Bornslaeger EA, Mattei PM, Schultz RM. 1988. Protein phosphorylation in meiotically competent and incompetent mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. **1**:19-25.

Braw-Tal R. 2002. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Molecular and Cellular Endocrinology*. **187**(1-2):11-18.

Burton KA, Johnson BD, Hausken ZE et al. 1997. Type II regulatory subunits are not required for the anchoring-dependent modulation of Ca² channel activity by cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **94**:11067-11072.

Carabatsos MJ, Sellitto C, Goodenough DA, Albertini DF. 2000. Oocyte–Granulosa Cell Heterologous Gap Junctions Are Required for the Coordination of Nuclear and Cytoplasmic Meiotic Competence. *Developmental Biology*. **226**(2):167-179.

Carr DW, Stofko-Hahn RE, Fraser ID, Cone RD, Scott JD. 1992. Localization of the cAMP-dependent protein kinase to the postsynaptic densities by A-kinase anchoring proteins. Characterization of AKAP 79. *Journal of Biological Chemistry*. **267**:16816-16823.

Cavada B, Pinto-Junior V, Osterne V, Nascimento K. 2019. ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. *International Journal of Molecular Sciences*. **20**(1):30

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**(4):623-634.

Colledge M, Scott JD. 1999. AKAPs: from structure to function. *Trends in Cell Biology*. **9**:216-221.

Colledge WH, Carlton MBL, Udy GB, Evans MJ. 1994. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*. **370**:65-68.

Conti M, Hsieh M, Musa Zamah A, Oh JS. 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **356**:65-73.

Damjanov I. 1987. Biological diseases. Lectin cytochemistry. *Lab Invest*. **57**:5-20.

De Felici M. 2009. Primordial germ cell biology at the beginning of the XXI Century. *The International Journal of Developmental Biology*. **53**:891-894.

De Felici M. 2013. Origin, Migration, and Proliferation of Human Primordial Germ Cells. *Oogenesis*. Springer London, London.

- De Mejía EG, Prisecaru VI. 2005. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. *Critical reviews in food science and nutrition*. **45**(6):425-445.
- Deng MQ, Shen SS. 2000. A Specific Inhibitor of p34cdc2/Cyclin B Suppresses Fertilization-Induced Calcium Oscillations in Mouse Eggs¹. *Biology of Reproduction*. **62**(4):873-878.
- Desantis S, Ventriglia G, Zizza S, De Santis T, Di Summa A, De Metrio G, Dell'Aquila ME. 2009. Lectin-binding sites in isolated equine cumulus-oocyte complexes: Differential expression of glycosidic residues in complexes recovered with compact or expanded cumulus. *Theriogenology*. **72**(3):300-309.
- Desantis S, Ventriglia G, Zizza S, De Santis T, Di Summa A, De Metrio G, Dell'Aquila ME. 2009. Lectin-binding sites in isolated equine cumulus-oocyte complexes: Differential expression of glycosidic residues in complexes recovered with compact or expanded cumulus. *Theriogenology*. **72**(3):300-309.
- 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**:3.
- Dunbar BS, Wardrip NJ, Hedrick JL. 1980. Isolation, physicochemical properties, and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes. *Biochemistry*. **19**:356-365.
- Ellederova Z, Halada P, Man P, Kubelka M, Motlik J, Kovarova H. 2004. Protein Patterns of Pig Oocytes During In Vitro Maturation¹. *Biology of Reproduction*. **71**(5):1533-1539.
- Eppig JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. **122**(6):829-838.
- Etzler ME. 1985. Plant lectins: molecular and biological aspects. *Annual review of plant physiology*. **36**(1):209-234.
- Fan HY, Huo LJ, Meng XQ, Zhong ZS, Hou Y, Chen DY, Sun QY. 2003. Involvement of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) in Meiotic Maturation and Activation of Pig Oocytes¹. *Biology of Reproduction*. **69**(5):1552-1564.
- Feliciello A, Giuliano P, Porcellini A, et al. 1996. The v-Ki-Ras Oncogene Alters cAMP Nuclear Signaling by Regulating the Location and the Expression of cAMP-dependent Protein Kinase II β . *Journal of Biological Chemistry*. **271**:25350-25359.
- 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**(5):836-848.

- Ferreire 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**(5):836-848.
- Flores JA, Veldhuis JD, Leong DA. 1990. Follicle-Stimulating Hormone Evokes an Increase in Intracellular Free Calcium Ion Concentrations in Single Ovarian (Granulosa) Cells*. *Endocrinology*. **127**(6):3172-3179.
- Fokunang CN, Rastall RA. 2003. Phytohaemagglutinins in Membrane Signalling, Biomedical and Genetic Engineering Research. *Biotechnology (Faisalabad)*. **2**(2):162-177.
- Fortune JE. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. **78**(3-4):135-163.
- Gabius HJ. 2013. The History of Lectinology. Antitumor Potential and other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds. 13-20.
- Ganong WF. 2005. *Přehled lékařské fyziologie: dvacáté vydání*. Galén, Praha.
- Geyer H, Geyer R. 1998. Strategies for Glycoconjugate Analysis. *Cells Tissues Organs*. **161**(1-4):18-35.
- Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. **349**:132-138.
- Goldstein I, Hughes R, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. 1980. What should be called a lectin?. *Nature*. **285**(5760):66-66.
- Gonzalez FA, Seth A, Raden DL, Bowman DS, Fay FS, Davis RJ. 1993. Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *Journal of Cell Biology*. **122**:1089-1101.
- Gordo AC, He CL, Smith S, Fissore RA. 2001. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. **59**(1):106-114.
- Gosden R. 2002. Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **186**(2):149-153.
- Gougoulidis T, Trounson A, Dowsing A. 1999. Inhibition of bovine sperm-oocyte fusion by the carbohydrate GalNAc. *Mol. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. **54**(2):179-185.

- Gupta SK, Bhatnagar P, Dunbar BS, Sehgal S. 1986. Immunohistological Studies During Immunization of Primates with Porcine Zona Pellucida: Preliminary Observations. *Immunological Approaches to Contraception and Promotion of Fertility*. Boston: Springer.
- Habibi Rezaei M, 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.
- Hammarström S, Murphy LA, Goldstein IJ, Etzler ME. 2002. Carbohydrate binding specificity of four N-acetyl-D-galactosamine-"specific" lectins: Helix pomatia A hemagglutinin, soy bean agglutinin, lima bean lectin, and Dolichos biflorus lectin. *Biochemistry*. **16**(12):2750-2755.
- Han JD, Baker NE, Rubin CS. 1997. Molecular Characterization of a Novel A Kinase Anchor Protein from *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*. **272**:26611-26619.
- Hanukoglu I. 1992. Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **43**:779-804.
- 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**(6):361-393.
- Hasegawa A, Kanazawa N, Sawai H, Komori S, Koyama K. 2006. Pig zona pellucida 2 (pZP2) protein does not participate in zona pellucida formation in transgenic mice. *Reproduction*. **132**(3):455-464.
- Hatta Y, Tsuchiya N, Matsushita M, Shiota M, Hagiwara K, Tokunaga K. 1999. Identification of the gene variations in human CD22. *Immunogenetics*. **49**(4):280-286.
- Hedrick JL, Wardrip NJ. 1986. Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. *Analytical Biochemistry*. **157**(1):63-70.
- Hedrick JL, Wardrip NJ. 1986. Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. *Analytical Biochemistry*. **157**(1):63-70.
- Helliwell TR. 1997. Lectin methods and protocols. *Methods Mol Med*. **9**:73-94.
- Hillers KJ, Jantsch V, Martinez-Perez E, Yanowitz JL. 2017. Meiosis. *WormBook*. **4**:1-43.
- Hirano T, Takasaki S, Hedrick JL, Wardrip NJ, Amano J, Kobata A. 1993. O-Linked neutral sugar chains of porcine zona pellucida glycoproteins. *European Journal of Biochemistry*. **214**(3):763-769.

- Hokke CH, Damm JBL, Kamerling JP, Vliegthart JFG. 1993. Structure of three acidic O-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins. *FEBS Letters*. **329**(1-2):29-34.
- Hokke CH, Damm JBL, Penninkhof B, Aitken JR, Kamerling JP, Vliegthart FG. 1994. Structure of the O-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins. *European Journal of Biochemistry*. **221**(1):491-512.
- Homa ST. 1995. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Molecular Reproduction and Development*. **40**:122-134.
- Homa ST. 1995. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Molecular Reproduction and Development*. **40**(1):122-134.
- Homa ST. 1996. Gametes - The Oocyte. *Experimental Physiology*. **81**:709-709.
- Hooper LV, Gordon JI. 2001. Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology*. **11**(2):1R-10R.
- Hosoe M, Shioya Y. 1997. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote*. **5**(4):371-376.
- Hyttel P, Viuff D, Fair T, et al. 2001. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction*. **122**(1):21-30.
- Chen H, Kui C, Chan HC. 2013. Ca² mobilization in cumulus cells: Role in oocyte maturation and acrosome reaction. *Cell Calcium*. **53**:68-75.
- Chetty R, Cooper K, Gown A. 2016. Ulex europaeus agglutinin 1 lectin (UEA-1). *Leong's Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistology*. 467-468.
- Chiu PCN, Koistinen R, Seppala M, Lee KF, Yeung WSB. 2003. Zona-Binding Inhibitory Factor-1 from Human Follicular Fluid Is an Isoform of Glycodelin1. *Biology of Reproduction*. **69**(1):365-372.
- Chrestensen CA, Sturgill TW. 2002. Characterization of the p90 Ribosomal S6 Kinase 2 Carboxyl-terminal Domain as a Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*. **277**:27733-27741.
- Inoue M, Naito K, Nakayma T, Sato E. 1998. Mitogen-Activated Protein Kinase Translocates into the Germinal Vesicle and Induces Germinal Vesicle Breakdown in Porcine Oocytes1. *Biology of Reproduction*. **58**:130-136.

- Jayes FCL, Day RN, Garmey JC, Urban RJ, Zhang G, Veldhuis JD. 2000. Calcium Ions Positively Modulate Follicle-Stimulating Hormone- and Exogenous Cyclic 3',5'-Adenosine Monophosphate-Driven Transcription of the P450_{scc} Gene in Porcine Granulosa Cells*. *Endocrinology*. **141**:2377-2384.
- Jones KT. 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. **10**:1-5.
- Jones KT. 2005. Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction*. **130**:813-823.
- Kanai S, Kitayama T, Yonezawa N, Sawano Y, Tanokura M, Nakano M. 2008. Disulfide linkage patterns of pig zona pellucida glycoproteins ZP3 and ZP4. *Molecular Reproduction and Development*. **75**(5):847-856.
- Khan F, Khan MI. 2010. Fungal Lectins: Current Molecular and Biochemical Perspectives. *International Journal of Biological Chemistry*. **5**(1):1-20.
- Kilpatrick D. 2002. Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **1572**(2-3):187–197.
- Kilpatrick DC, Graham C, Urbaniak SJ, Jeffree CE, Allen AK. 1984. A comparison of tomato (*Lycopersicon esculentum*) lectin with its deglycosylated derivative. *Biochemical Journal*. **220**(3):843-847.
- Kosako H, Gotoh Y, Nishida E. 1994. Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. *The EMBO Journal*. **13**:2131-2138.
- Kovo M, Schillace RV, Galiani D, Josefsberg LB, Carr DW, Dekel N. 2002. Expression and modification of PKA and AKAPs during meiosis in rat oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **192**:105-113.
- Kölle S, Sinowatz F, Boie G, Totzauer I, Amselgruber W, Plendl J. 1996. Localization of the mRNA encoding the zona protein ZP3 α in the porcine ovary, oocyte and embryo by non-radioactive in situ hybridization. *The Histochemical Journal*. **28**(6):441-447.
- Krauss S, Buttgereit F, Brand MD. 1999. Effects of the mitogen concanavalin A on pathways of thymocyte energy metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. **1412**(2):129-138.
- 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**(3):492-499.

- Kumar KK, Reddy GS, Reddy BVR, Shekar PC, Sumanthi J, Chandra KLP. 2012. Biological role of lectins: A review. *Journal of Orofacial Sciences*. **4**(1).
- Kyriakis JM, Avruch J.M. 2001. Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiological Reviews*. **81**:807-869.
- Lakhtin V, Lakhtin M, Alyoshkin V. 2011. Lectin of living organisms. The overview. *Anaerobe*. **17**(6): 452-455.
- Lannoo N, Van Damme EJM. 2014. Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Frontiers in plant science*. **5**:397.
- Lazar S, Galiani D, Dekel N. 2002. CAMP-Dependent PKA Negatively Regulates Polyadenylation of c- mos mRNA in Rat Oocytes. *Molecular Endocrinology*. **16**:331-341.
- Lénárt P, Ellenberg J. 2003. Nuclear envelope dynamics in oocytes: from germinal vesicle breakdown to mitosis. *Current Opinion in Cell Biology*. **15**:88-95.
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. 1998. *Signal Transduction through MAP Kinase Cascades*. Elsevier, Nizozemsko.
- Liang CG, Huo LJ, Zhong ZS, Chen DY, Schatten H, Sun QY. 2005. Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase in Cumulus Cells Is Essential for Germinal Vesicle Breakdown of Porcine Cumulus-Enclosed Oocytes. *Endocrinology*. **146**:4437-4444.
- Limback DS, Albertini DF. 2013. *Imaging Strategies for Studying Mammalian Oogenesis*. Oogenesis. Springer London, London.
- Lis H, Sharon N. 1998. Lectins: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*. **98**(2):637-674.
- Lis H, Sharon N. 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews*. **98**(2):637-674
- Liu FT, Rabinovich GA. 2005. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews Cancer*. **5**(1):29-41.
- Lorca T, Cruzalegui FH, Fesquet D, Cavadore JC, Méry J, Means A, Dorée M. 1993. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. **366**:270-273.
- Loris R, De Greve H, Dao-Thi M, Messens J, Imberty, A, Wyns L. 2000. Structural basis of carbohydrate recognition by lectin II from *Ulex europaeus* , a protein with a promiscuous

carbohydrate-binding site 1 Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*. **301**(4):987-1002.

Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns L. 1998. Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. **1383**(1):9-36.

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**(5):871-885.

Manning JC, Romero A, Habermann FA, García Caballero G, Kaltner H, Gabius HJ. 2017. Lectins: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochemistry and Cell Biology*. **147**(2):199-222.

Mary N, Barasc H, Ferchaud S, et al. 2016. Meiotic Recombination Analyses in Pigs Carrying Different Balanced Structural Chromosomal Rearrangements. *PLOS ONE*. **11**:4.

Masui Y. 2001. From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation*. **69**:1-17.

McLaren A. 1999. Signaling for germ cells. **13**:373-376.

Mendes MHAF, Pinto MHB, Gimeno EJ, Barbeito CG, Sant'Ana FJF. 2019. Lectin histochemical pattern on the normal and cystic ovaries of sows. *Reproduction in Domestic Animals*. **54**(10):1366-1374.

Méduri G, Charnaux N, Driancourt MA, Combettes L, Granet P, Vannier B, Loosfelt H, Milgrom E. 2002. Follicle-Stimulating Hormone Receptors in Oocytes?. **87**(5):2266-2276.

Mishra A, Behura A, Mawatwal S, Kumar A, Naik L, Mohanty SS, Dhiman R. 2019. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food and Chemical Toxicology*. **134**:110827.

Miyano T. 2005. In Vitro Growth of Mammalian Oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. **51**(2):169-176.

Mori K, Daitoh T, Irahara M, Kamada M, Aono T. 1989. Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **161**(1):207-211.

Motta PM, Nottola SA, Familiari G, Makabe S, Stallone T, Macchiarelli G. 2002. Morphodynamics of the follicular-luteal complex during early ovarian development and reproductive life. 177-288.

Murín M, Strejček F, Bartková A. 2019. Intranuclear characteristics of pig oocytes stained with brilliant cresyl blue and nucleologenesis of resulting embryos. *Zygote*. **27**(4):232-240.

Nakano M, Yonezawa N. 2001. Localization of Sperm Ligand Carbohydrate Chains in Pig Zona pellucida Glycoproteins. *Cells Tissues Organs*. **168**(1-2):65-75.

Nauert JB, Klauck TM, Langeberg LK, Scott JD. 1997. Gravin, an autoantigen recognized by serum from myasthenia gravis patients, is a kinase scaffold protein. *Current Biology*. **7**:52-62.
Nicolson GL, Blaustein J, Etzler ME. 1974. Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. *Biochemistry*. **13**(1):196-204.

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**(3):883-894.

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**(3):883-894.

Norton P, Comunale MA, Herrera H, Wang M, Houser J, Wimmerova M, Romano PR, Mehta A. 2016. Development and application of a novel recombinant *Aleuria aurantia* lectin with enhanced core fucose binding for identification of glycoprotein biomarkers of hepatocellular carcinoma. *PROTEOMICS*. **16**(24):3126-3136.

Nunes C, Silva JV, Silva V Torgal I, Fardilha M. 2015. Signalling pathways involved in oocyte growth, acquisition of competence and activation. *Human Fertility*. **18**:149-155.

O'Reilly MK, Paulson JC, 2009. Siglecs as targets for therapy in immune-cell-mediated disease. *Trends in pharmacological sciences*. **30**(5):240-248.

Okunomiya A, Horie A, Tani H, et al. 2021. Figla promotes secondary follicle growth in mature mice. *Scientific Reports*. **11**(1).

Page SL, Hawley RS. 2003. Chromosome Choreography: The Meiotic Ballet. *Science*. **301**(5634):785-789.

Parillo F, Dall'Aglio C, Verini Supplizi A, Ceccarelli P, Gargiulo AM. 2003. Immunogold study on lectin binding in the porcine zona pellucida and granulosa cells. *European Journal of Histochemistry*, **47**(4):353–358.

- 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**(6):581-590.
- 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**(2):193-202.
- Parillo F, Stradaoli G, Dall'aglio C, Verini-Supplizi A. 1996. Characterization of the complex carbohydrates in the zona pellucida of mammalian oocytes using lectin histochemistry. *Veterinary Research Communications*. **20**(3):225-236.
- Pastor LM, Lucas X, Pallares J, Bernal-Mañas CM, Martinez EA, Roca J, Vasquez 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**(9):1473-1483.
- Pawson T, Scott JD. 1997. Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins. *Science*. **278**:2075-2080.
- Peumans VJ, Van Damme EJM. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant physiology*. **109**(2):347.
- Peumans WJ, Van Damme EJM. 1998. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. **15**(1):199-228.
- Peumans WJ, Van Damme JM, Barre A, Rougé P. 2001. Classification of Plant Lectins in Families Of Structurally and Evolutionary Related Proteins. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates*. **2**:27-54.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **145**(1-2):27-37.
- Prasad SV, Skinner SM, Carino C, Wang N, Cartwright J, Dunbar BS. 2000. Structure and Function of the Proteins of the Mammalian Zona pellucida. *Cells Tissues Organs*. **166**:148-164.
- Rahman ANMA, Abdullah RB, Wan-Khadij WE. 2008. Gametogenesis, Fertilization and Early Embryogenesis in Mammals with Special Reference to Goat: A Review. *Journal of Biological Sciences*. **8**(7):1115-1128.
- Rankin T. 2000. The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Reviews of Reproduction*. **5**(2):114-121.

- Raz T, Shalgi R. 1998. Early events in mammalian egg activation. *Human Reproduction*. **13**(4):133-145.
- Rini JM. 1995. Lectin structure. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. **24**(1):551-577.
- Rocca JD. 2004. Lectins as Next Generation Mucoadhesives for specific targeting of the gastrointestinal tract. *Gastrointest Target Drug Develop*. **4**:12-9.
- Rogers D, Hori K. 1993. Marine algal lectins: new developments. *Hydrobiologia*. **260**(1):589–593.
- Roux PP, Blenis J. 2004. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **68**:320-344.
- Sacco AG, Yurewicz EC, Subramanian MG, Matzat PD. 1989. Porcine Zona Pellucida: Association of Sperm Receptor Activity with the α -Glycoprotein Component of the Mr = 55,000 Family 1. *Biology of Reproduction*. **41**(3):523-532.
- Sathananthan HA, Selvaraj K, Girijashankar LM, Ganesh V, Selvaraj P, Trounson AO. 2006. From oogonia to mature oocytes: Inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microscopy Research and Technique*. **69**:396-407.
- Sathananthan HA, Selvaraj K, Trounson A. 2000. Fine structure of human oogonia in the foetal ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **161**:3-8.
- Shalgi R, Maymon R, Maymon BS, Amihai D, Skutelsky E. 1991. Distribution of lectin receptors sites in the zona pellucida of follicular and ovulated rat oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. **29**(4):365-372.
- Sharon N, Lis H. 1990. Legume lectins—a large family of homologous proteins. *The FASEB journal*. **4**(14):3198-3208.
- Sharon N, Lis H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. **14**(11):53R-62R.
- Sharon N, Lis H. 2013. Lectins. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 701-705.
- Sharon N. 1987. Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. *FEBS Letters*. **217**(2):145-157.
- Sharon N. 1998. Lectins: from obscurity into the limelight. *Protein science*. **7**(9):2042-2048.

- Sharon N. 2006. Carbohydrates As Future Anti-Adhesion Drugs For Infectious Diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **1760**(4):527-37.
- Sharon N. 2008. Lectins: Past, Present And Future. *Biochemical society transactions*. **36**(6):1457-60.
- Shivers CA, Dunbar BS. 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. *The Mitochondrion in the Germline and Early Development*. 87-111
- Schmidt HP, Dransfield DT, Claudio JO, Hawley RG, Trotter KW, Milgram SL, Goldenring JR. 1999. AKAP350, a Multiply Spliced Protein Kinase A-anchoring Protein Associated with Centrosomes. *Journal of Biological Chemistry*. **274**:3055-3066.
- Singh RS, Bhari R, Kaur HP. 2010. Mushroom lectins: Current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*. **30**(2):99-126.
- Singh RS, Thakur SR, Bansal P. 2013. Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research. *Critical Reviews in Microbiology*. **41**(1):77-88.
- Sinowatz F, Amselgruber W, Töpfer-Petersen E, Totzauer I, Calvete J, Plendl J. 1995. Immunocytochemical characterization of porcine zona pellucida during follicular development. *Anatomy and Embryology*. **191**(1):41-46.
- Sinowatz F, Kölle S, Töpfer-Petersen E. 2001. Biosynthesis and Expression of Zona pellucida Glycoproteins in Mammals. *Cells Tissues Organs*. **168**(1-2):24-35.
- Sinowatz F, Töpfer-Petersen E, Kollé S, Palma G. 2001. Functional Morphology of the Zona Pellucida. *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C*. **30**(5):257-263.
- Slifkin M, Doyle RJ. 1990. Lectins and their application to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. **3**(3):197-218.
- Spaulding SW. 1993. The Ways in Which Hormones Change Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent Protein Kinase Subunits, and How Such Changes Affect Cell Behavior*. *Endocrine Reviews*. **14**:632-650.
- Sun QY, Miao YL, Schatten H. 2014. Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell Cycle*. **8**:2741-2747.
- Šilhánková L. 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Academia, Praha.

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**(4):85-107.

The UniProt Consortium. 2002. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*. Available from <https://www.uniprot.org/uniprot/P42099> (accessed January 2022).

The UniProt Consortium. 2002. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*. Available from <https://www.uniprot.org/uniprot/P42098> (accessed January 2022).

The UniProt Consortium. 2002. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*. Available from <https://www.uniprot.org/uniprot/Q07287> (accessed January 2022).

Tiwari M, Gupta A, Sharma A, et al. 2018. Role of Mitogen Activated Protein Kinase and Maturation Promoting Factor During the Achievement of Meiotic Competency in Mammalian Oocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*. **119**:123-129.

Töpfer-Petersen E. 1999. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Human Reproduction Update*. **5**(4):314-329.

Tosti E. 2006. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reproductive Biology and Endocrinology*. **4**(1):1-9.

Trounson A, Anderiesz C, Jones G. 2001. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction*. **121**(1):51-75.

Tsunoda S, Sierralta J, Sun Y, Bodner R, Suzuki E, Becker A, Socolich M, Zuker CS. 1997. A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature*. **388**:243-249.

Tumova L, Zigo M, Sutivsky P, Sedmikova M, Postlerova P. 2021. Ligands and Receptors Involved in the Sperm-Zona Pellucida Interactions in Mammals. *Cells*. **10**(1):133.

Vakri A. 2009. *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Van Damme EJM, Briké F, Winter HC, Van Leuven F, Goldstein IJ, Peumans WJ. 1996. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. *European Journal of Biochemistry*. **236**(2):419-427.

Van den Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. **63**(6):1717-1751.

- Van Den Hurk R. 2000. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Human Reproduction Update*. **6**(5):457-474.
- Wang WH, Sun QY, Hosoe M, Shioya Y, Day BN. 1997. Quantified Analysis of Cortical Granule Distribution and Exocytosis of Porcine Oocytes during Meiotic Maturation and Activation1. *Biology of Reproduction*. **56**(6):1376-1382.
- Wassarman PM, Albertini DF. 1994. The Mammalian Ovum, In: Knobil E, Neil J, et al. (Ed): *The Physiology Of Reproduction*, 2. Vydání. Raven Press, New York.
- Wassarman PM, Jovine L, Qi H, Williams Z, Darie C, Litscher ES. 2005. Recent aspects of mammalian fertilization research. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **234**(1-2):95-103.
- Wassarman PM, Jovine L, Qi H, Williams Z, Darie C, Litscher ES. 2005. Recent aspects of mammalian fertilization research. *Molecular and Cellular Endocrinology* **234**:95-103.
- Wassarman PM, Mortillo S. 1991. Structure of the Mouse Egg Extracellular Coat, the Zona Pellucida. Elsevier. **130**:85-110.
- Wassarman PM. 1988. The Mammalian Ovum, In: Knobil E, Neil J, et al. (Ed): *The Physiology Of Reproduction*, 2. Vydání, Raven Press, New York.
- Wassarman PM. 1999. Mammalian Fertilization. *Cell*. **96**:175-183.
- Weis WI, Drickamer K. 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual review of biochemistry*. **65**(1):441-473.
- Wimmerova M, Mitchell E, Sanchez JF, Gautier C, Imberty A. 2003. Crystal Structure of Fungal Lectin. *Journal of Biological Chemistry*. **278**(29):27059-27067.
- Wu JY, Gonzalez-Robayna IJ, Richards JS, Means AR. 2000. Female Fertility Is Reduced in Mice Lacking Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV**This work was supported by an NIH Medical Scientist Training Program award (to J.Y.W.) and NIH Grants HD-07503 (to A.R.M.) and HD-1272 (to J.S.R.). *Endocrinology*. **141**:4777-4783.
- Yonezawa N, Kanai-Kitayama S, Kitayama T, Hamano A, Nakano M. 2012. Porcine zona pellucida glycoprotein ZP4 is responsible for the sperm-binding activity of the ZP3/ZP4 complex. *Zygote*. **20**(4):389-397.
- 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**(1):86-92.

Yurewicz EC, Pack BA, Sacco AG. 1991. Isolation, composition, and biological activity of sugar chains of porcine oocyte zona pellucida 55K glycoproteins. *Molecular Reproduction and Development*. **30**(2):126-134.

Yurewicz EC, Pack BA, Sacco AG. 1992. Porcine oocyte zona pellucida Mr 55,000 glycoproteins: Identification of O-glycosylated domains. *Molecular Reproduction and Development*. **33**(2):182-188.

Zhang M, Xia G. 2012. Hormonal control of mammalian oocyte meiosis at diplotene stage. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **69**(8):1279-1288.

Zhao J, Hoye E, Boylan S, Walsh DA, Trewhella J. 1998. Quaternary Structures of a Catalytic Subunit-Regulatory Subunit Dimeric Complex and the Holoenzyme of the cAMP-dependent Protein Kinase by Neutron Contrast Variation. *Journal of Biological Chemistry*. **273**:30448-30459.

9 Seznam použitých zkratek

AA	amino acid; aminokyselina
AC	adenylát cykláza
AKAP	A-kinase anchoring protein; protein kotvící A-kinázu
AMH	anti-Mülleriánsky hormon
AMP	adenonosinmonofosfát
APC/C	anaphase promoting complex/Cyclosome; anafázi podporující komplex
ATP	adenosintrifosfát
BCR	receptor B-lymfocytů
BFS	bovinní fetální sérum
C	katalytická podjednotka
Ca ²⁺	vápenaté ionty
CaM	kalmodulin
CaMKII	kalmodulin–dependentní proteinkináza II
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
Cdc25	cell division cycle 25; cyklus buněčného dělení 25
cdk	cyklin-dependentní kináza
cDNA	complementary DNA; komplementární DNA
CFCS	consensus furin cleavage site; místo konsenzuálního furinového štěpení
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
c-Kit	tyrokinázový receptor
ConA	<i>Canavalia ensiformis agglutinin</i>
CRD	carbohydrate recognition/binding domain
CREB	cAMP response element-binding protein
Cys	cystein
DNA	deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplazmatické retikulum
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FCER1	vysokoafinitní IgE receptor
FSH	folikulostimulační hormon
Fuc	fukóza
GA	Golgiho aparát
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
GDF-9	growth/differentiation faktor
GIT	gastrointestinální trakt
GlcNAc	N-acetylglukossamin
GnRH	gonadotropin releasing hormon
GTP	guanosintrifosfát
GV	germinal vesicle; zárodečný váček
GVBD	germinal vesicle breakdown; rozpad zárodečného váčku
HA	hemaglutinin
IgE	imunoglobulin E

IP3r	inositol 1,4,5-trisfosfátový receptor
KL	kit ligand
LCA	<i>Lens culinaris</i> agglutinin
LH	luteinizační hormon
Man	manóza
MAP	mitogenem aktivovaný protein
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
MAPKK	mitogenem aktivovaná protein kináza kináza
MAPKKK	mitogenem aktivovaná protein kináza kináza kináza
MBL	mannan binding lectin; lektin vázající manózu
MEK	mitogenem aktivovaná protein kináza kináza
MI	stádium prvního meiotického dělení
MII	stádium druhého meiotického dělení
MOS	mitogenem aktivovaná protein kináza kináza kináza
MPF	maturation promoting factor; zrání podporující faktor
MPF	maturation-promoting factor
MUF	multilaminární folikuly
p34 ^{cdc2}	cyklin dependentní serin/threonin kináza
PGC	primordial germ cells; primordiální zárodečné buňky
PHA	phytohaemagglutinin
PKA	cyklická AMP-dependentní proteinkináza
PSA	<i>Pisum sativum</i> agglutinin
R	regulační podjednotka
RCA	<i>Ricinus communis</i> agglutinin
RIP	protein inaktivující ribozomy
RNA	ribonucleic acid; ribonukleová kyselina
Ryr	ryanodinový receptor
SCC	side-chain cleavage; štěpení postranních řetězců
Sia	kyselina sialová
Thr	threonin
TMD	transmembrane-like domain; transmembráně podobná doména
TxLC-I	<i>Tulipa gesneriana</i> agglutinin
Tyr	tyrosin
UDA	<i>Urtica dioica</i> agglutinin
WGA	wheat germ agglutinin
ZP	<i>zona pellucida</i>
ZP1-ZP4	zonální proteiny