

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Změna sacharidových struktur glykoproteinů zona
pellucida během maturace prasečích oocytů**

Diplomová práce

Bc. Tereza Hrubcová

Reprodukční biotechnologie

prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Změna sacharidových struktur glykoproteinů zona pellucida během maturace prasečích oocytů" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. 4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za cenné rady a odborné vedení diplomové práce.

Změna sacharidových struktur glykoproteinů zona pellucida během maturace prasečích oocytů

Souhrn

Zona pellucida je jedinečný glykoproteinový obal oocytů, který hraje důležitou roli v procesu fertilizace, kdy je zodpovědný za druhově specifické rozpoznání gamet, brání polyspermii a poskytuje ochranu oocytu. Rozdíly v sacharidových strukturách ZP a povrchových proteinech spermií jsou považovány za hlavní faktor druhové specifity rozpoznávání a vazby spermií. Primární vazbou se kapacitovaná spermie naváže na neutrální N-glykany, následuje akrozomální reakce a poté se spermie váže na polysulfatované glykany ZP, čímž nastává sekundární vazba spermie a ZP. Sacharidové složky glykoproteinů zona pellucida je možné detekovat pomocí bílkovin zvaných lektiny. Lektiny jsou proteiny s vysokým stupněm stereospecifity, rozeznávají různé struktury cukrů a vytvářejí reverzibilní vazbu s glyko-konjugovanými komplexy.

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda se sacharidové složky zona pellucida během maturace prasečích oocytů mění. Jiné studie se tímto tématem příliš nezabývaly, proto jsme se rozhodli toto téma alespoň trochu přiblížit. Byla provedena imunodetekce pomocí vybraných lektinů aplikovaná na jednotlivá stadia meiotického zrání. Sacharidové složky vyskytující se na zona pellucida byly detekovány fluorescenční analýzou na konfokálním mikroskopu, kde hodnota signálu byla nasnímaná. Podle výsledných snímků byla změřena denzita signálu v programu NIS Elements. Denzitometrické hodnocení bylo statisticky vyhodnoceno.

Podle statistického vyhodnocení se u dvou použitých lektinů (WGA a MAA) změna sacharidových struktur během maturace nepotvrdila. Hodnota denzity se mezi jednotlivými stadii neměnila a v porovnání lektinů mezi sebou byla také srovnatelná. Pouze jeden lektin (PSA) vykazoval statisticky významný rozdíl v denzitě mezi stadiem oocytů v zárodečném vajíčku a oocyty ve fázi MI a MII.

Klíčová slova: prase, zona pellucida, sacharidy, lektin

Change of carbohydrate structures of zona pellucida glycoproteins during maturation of porcine oocytes

Summary

Zona pellucida is a unique glycoprotein envelope of oocytes, which is important in the fertilization process, where it is responsible for the specific recognition of gametes, prevents polyspermy and provides protection of the oocyte. The differences in ZP carbohydrate structures and sperm surface proteins are considered the main factor in the species specificity of sperm-ZP recognition and binding. By primary binding, the capacitated sperm binds to neutral N-glycans, then the sperm becomes acrosome reacted, and the sperm binds to the polysulfated glycans of ZP, which results in secondary binding of sperm to ZP. The carbohydrate components of zona pellucida glycoproteins can be detected using proteins called lectins. Lectins are proteins with a high degree of stereospecificity, recognizing different sugar structures and forming a reversible bond with glyco-conjugated complexes.

The aim of the diploma thesis was to find out whether the carbohydrate components of the zona pellucida change during the maturation of pig oocytes. So far, not many published studies focused on this topic, which is why we decided to investigate closer. Immunodetection was performed using selected lectins applied to individual stages of meiotic maturation. The carbohydrate components present on the zona pellucida were detected by fluorescence analysis on a confocal microscope, where the signal value was recorded. According to the resulting images, the signal density was measured in the NIS Elements program. Densitometric evaluation was statistically evaluated.

According to statistical evaluation, the change of carbohydrate structures during maturation was not confirmed for the two lectins used (WGA and MAA). The density value did not change between stages and was also comparable when comparing lectins. Only one lectin (PSA) showed a statistically significant difference in density between the stage of germinal vesicle oocytes and oocytes in phase MI and MII.

Keywords: pig, zona pellucida, carbohydrates, lectin, maturation

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Oogeneze	11
3.1.1 Množení zárodečných buněk.....	11
3.1.2 Růst a vývoj folikulů.....	12
3.1.3 Růst a vývoj oocyty.....	12
3.1.4 Meiotická kompetence	13
3.1.5 Meiotické zrání	14
3.1.5.1 Jaderné zrání.....	14
3.1.5.2 Cytoplazmatické zrání.....	15
3.2 Zona pellucida	16
3.2.1 Vznik a vývoj zona pellucida, změny během fertilizace	16
3.2.2 Zona pellucida a mezidruhové rozdíly	18
3.2.3 Zona pellucida prasete.....	19
3.2.3.1 ZP2 protein.....	20
3.2.3.2 ZP3 protein.....	20
3.2.3.3 ZP4 protein.....	21
3.2.4 Významnost glykosylace ZP glykoproteinů	21
3.2.5 Vazba spermie na zona pellucida.....	21
3.2.6 Polyspermický blok	22
3.3 Lektiny	23
3.3.1 Druhy lektinů	23
3.3.2 Vlastnosti lektinů	24
3.3.3 Biologická role	25
4 Metodika	27
4.1 Odběr vaječníků	27
4.2 Získ meioticky kompetentních oocytů	27
4.3 Kultivace oocytů <i>in vitro</i>	27
4.3.1 Hodnocení kvality oocytů a jejich meiotického zrání	28
4.4 Iminofluorescenční mikroskopie	30
4.4.1 Vyhodnocení experimentu	31
5 Výsledky	32
5.1 Imunofluorescenční mikroskopie sacharidových struktur	32

5.1.1	Detekce sacharidů ZP pomocí lektinu WGA	32
5.1.2	Detekce sacharidů ZP pomocí lektinu MAA.....	33
5.1.3	Detekce sacharidů ZP pomocí lektinu PSA	34
6	Diskuze	36
7	Závěr.....	38
8	Literatura	39

1 Úvod

V současné době je prase jedno z nejvýznamnějších hospodářských zvířat. Má mnohostranný způsob využití, nejen z hlediska produkce, ale i z hlediska biomedicínského výzkumu. Díky značné podobnosti s člověkem a to v oblasti genetické, anatomické a fyziologické je dnes prase ideální model pro výzkumné účely zabývající se problematickou humánních nemocí a technik asistované reprodukce. Z těchto důvodů je zájem o zralé prasečí oocyty a prasečí embrya značný. Nicméně ve srovnání s jinými druhy hospodářských zvířat jsou biotechnické postupy při in vitro produkci prasat málo účinná. Proto se výzkumy zaměřují především na detekci struktur na molekulární úrovni. Jednou ze struktur, které se na oocytu mohou zkoumat jsou sacharidové složky glykoproteinů zona pellucida. K jejich detekci je možné využít interakci s bílkovinami zvaných lektiny.

Lektiny jsou proteiny, které rozpoznávají specifické strukturální epitopy sacharidů a váží se na ně. Mohou být považovány za bílkovinné tlumočníky „cukerného kódu“ a představují vhodné biochemické nástroje pro zkoumání interakcí bílkoviny a sacharidy. Podstata interakce bílkovina-sacharid poskytuje důležitý pohled na přenos biologických informací. I když byly lektiny poprvé objeveny a charakterizovány v rostlinách, jsou také exprimovány mikroorganismy, houbami a živočichy.

Obsah sacharidů v zona pellucida se odhaduje na 15–54%. Glykosylační místa jednotlivých oligosacharidů a příbuzných proteinů vázajících sacharidy se podílejí na vazbě spermií a oocyty u mnoha druhů, druhově specifickým způsobem.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Pro tuto práci byla stanovena hypotéza, že sacharidové struktury glykoproteinů zona pellucida se budou během zrání oocyty měnit.

Cílem práce bylo sledování změn v sacharidových strukturách glykoproteinů zona pellucida pomocí vybraných lektinů.

3 Literární rešerše

3.1 Oogeneze

Vajíčko nebo vejce savců můžeme označit jako spojnicí mezi generacemi. Oplozené vejce se dělí na buňky, které tvoří jedince. Aby se na samém počátku oocyt vyvinul, probíhá proces zvaný oogeneze. Oogeneze savců začíná relativně brzy ve vývoji plodu a končí u sexuálně dospělého jedince, jedná se o měsíce, až roky. Oogeneze zahrnuje řadu buněčných transformací, od tvorby primordiálních zárodečných buněk (PGC, Primordial Germ Cells) po oogonie, od oogonií po oocyty (Wassarman et al., 1988).

3.1.1 Množení zárodečných buněk

Oocyty pocházejí z malého počtu kmenových buněk, primordiálních zárodečných buněk, které mají extra gonální původ. PGC vznikají v endodermu žloutkového vaku, odtud následně migrují do pohlavní lišty (Wassarman et al., 1988). U prasete byly PGC zaznamenány 18. den po kopulaci v oblasti zárodečné lišty. Během fetálního vývoje se jejich počet dramaticky zvyšuje. Poté jejich mitotická aktivita klesá a zvyšuje se nekróza (Black et al., 1968).

Jakmile se PGC usídlí k epitelu budoucích vaječníků, zanořují se do jejich korové vrstvy a přeměňují se tak na oogonie. U prasete k tomu dochází kolem 40. dne fetálního vývoje (Picton et al. 1998; Wassarman et al., 1988).

Oogonie jsou buňky kulovitěho tvaru a obsahují sférické jádro s jedním nebo dvěma jádérky. Obsahují hyaloplazmu s volnými polyribosomy a mitochondriemi, koncentrované v blízkosti jádra. Oogonie se stále mitoticky dělí a jejich propojení se sousedními oogoniemi je zajištěno pomocí spojení gap junction. Jakmile jsou oogonie obklopeny buňkami pocházejících z mezonefros, zahajují replikaci DNA a vstupují do meiózy. Během vstupu do meiózy dojde ke zničení spojů a oogonie se dále označují jako oocyty (Wassarman et al., 1988; Bielanska-Osuchowska, 2006).

Meióza je proces, při kterém dochází ke zredukování počtu chromozomů a je zahájena již během prenatalního vývoje (Wassarman et al., 1988). Oocyty během počáteční fáze meiózy procházejí několika fázemi, které se nazývají *leptotene*, *zygotene*, *pachytene* a *diplotene*, při které je jejich meióza zastavena (Picton et al. 1998). V první fázi (*leptotene*) se chromozomy spiralizují a kondenzují v jádře, dochází k rozpadu jaderných pórů. Ve fázi *zygotene* kondenzace pokračuje, dochází ke zkrácení chromozomů a tvorbě bivalentů. Během stadia *pachytene* se párové chromozomy zkracují, dělí se na dvě chromatidy a probíhá crossing-over a rekombinace genů. U většiny savců se fáze *diplotene* odehrává v období kolem porodu, nastává zde oddělení chromatid a jejich spojení je už jen v chiazmatech. Krátce po porodu se chromozomy úplně rozdělí a přichází první meiotický blok, tato fáze se nazývá *dictyate* (Wassarman et al., 1988).

Ve dření ovarií dochází u oocytů současně s iniciací meiózy ke ztrátě mezibuněčných spojů a začínají se obklopotvat jednou vrstvou pregranulózních buněk. Shluky těchto buněk se označují jako primordiální folikuly (Gosden a Bownes, 1995). Chromatin oocytu v tomto stádiu nazýváme jako tzv. zárodečný váček (GV - germinal vesicle) (Wassarman a Albertini, 1994).

3.1.2 Růst a vývoj folikulů

Primordiální folikuly společně s oocyty podstupují dlouhotrvající fázi růstu a vývoje, při čemž dochází k znásobení objemu oocyty až 300x (Gosden, 2002, Wassarman, 1988). Do růstové fáze nevstupují však všechny oocyty, od puberty až do zániku pohlavní aktivity je vyselektován malý počet oocytů, který vstupuje do růstové fáze. Vstupem oocyty do růstové fáze můžeme pozorovat morfologické změny granulóznic buněk, které se mění na kubické. Folikul se v této fázi nazývá jako primární (Miyano, 2005). Jakmile je folikul s oocytem vybrán k růstu, zahajuje se v oocyty transkripce a translace do doby, kdy oocyt dosáhne své konečné velikosti (Gosden, 2002). Jeho růst není jednoduchým procesem, dochází zde ke zvyšování hmotnosti, rovněž zahrnuje kvalitativní a kvantitativní změny klíčových molekul pro metabolismus. Zvyšuje se nárůst cytoplazmatických organel (Gosden, 2002).

Z celkových cca 420 tisíc primordiálních folikulů se u prasete vyvíjí přibližně 84 tisíc folikulů (Miyano, 2005) a období od začátku růstu primordiálních folikulů do předovulační velikosti trvá cca 3 měsíce (Miyano, 2003).

Růstová fáze folikulu se skládá ze dvou po sobě jdoucích kroků. V první fázi se granulózní buňky mění z dlaždicových na kubické a probíhá exprese follistatinu, a ve fázi druhé se zvyšuje počet granulóznic buněk a růst folikulu, zároveň s růstem oocyty (Braw-Tal, 2002). Doba, kdy primordiální stadium folikulu přechází k primárnímu může být zdlouhavá a folikuly v této fázi mohou obsahovat granulózní buňky dlaždicové i kubické zároveň (Fortune, 2003). Vznik druhé vrstvy granulóznic buněk charakterizuje sekundární folikul. Do matrix *zona pellucida* se začínají ukládat proteiny a v cytoplazmě oocyty se vytvářejí kortikální granula (Fair, 2003). Folikul v tomto období začíná reagovat na gonadotropiny a spolu s oocytem roste (van den Hurk et Zhao, 2005). Následuje přeměna na terciální folikul, kde pokračuje proliferace a diferenciací buněk, utváří se bazální lamina, *theca interna* a *theca externa*, a kumulární buňky. Vzniklou antrální dutinu začíná vyplňovat tekutina (Fair, 2003), která může být důležitým zdrojem regulačních či modulačních látek (např. růstové faktory, steroidy, gonadotropiny) a její produkce se postupně zintenzivňuje (van den Hurk et Zhao, 2005). Na buňkách *theca interna* se vytvářejí receptory pro LH (luteinizační hormon) a receptory na granulóznic buněk jsou tvořeny pro FSH (folikulostimulační hormon) a estrogen. Estogeny podporují proliferaci granulóznic buněk a společně s FSH podporují jejich sekreci, tím započnou vytváření antrální dutiny (Wassarman et al., 1988).

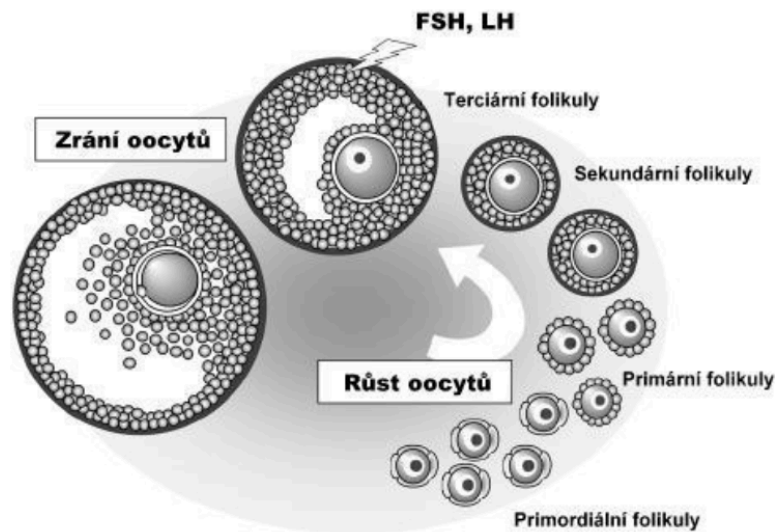
3.1.3 Růst a vývoj oocyty

Oocyty nejprve musí projít fází růstu a poté mohou pokračovat v jaderném zrání a následně podstoupit proces oplození a buněčné dělení (van den Hurk et Zhao, 2005). Fáze růstu oocyty zahrnuje řadu modifikací nezbytných k dosažení meiotické a vývojové kompetence – změny ve struktuře, množství a rozložení organel, také se zvyšuje intenzita transkripce (Luciano et al., 2012). Pojem meiotická kompetence označujeme schopnost oocyty znovu zahájit a dokončit meiotické zrání. Závisí na velikosti oocyty a jeho folikulu. Na začátku svého růstu nejsou oocyty schopny zahájit zrání, nejsou zcela meioticky kompetentní.

Později, v dalších fázích růstu jsou oocyty schopny zrání zahájit, ne však zcela dokončit (Motlík et al., 1984).

Jednou z nejvýraznějších změn v růstové fázi je vytvoření glykoproteinové vrstvy na povrchu oocyty, zvané *zona pellucida* (ZP). Již na počátku růstu můžeme pozorovat oblasti jemných filament mezi oocytem a kumulárními buňkami, vytvářejí se zde základy vrstvy *zona pellucida*. Tato membrána se skládá ze tří druhů glykoproteinů ZP1, ZP2, ZP3 a vytváří ochranou vrstvu oocyty. Glykoprotein ZP3 působí jako primární vazebný pro navázání spermie a spuštění akrozomální reakce. Glykoprotein ZP2 funguje jako sekundární receptor spermie a ZP1 tvoří spojení mezi proteiny ZP2 a ZP3 (Picton et al. 1998). Proteiny ZP jsou také nezbytné pro normální vývoj folikulů a pro jejich expresi je potřebný faktor FIG- α (van den Hurk et Zhao, 2005).

Po celou dobu oogeneze je exprimována jen část mRNA, zbytek mRNA „čeká“ až do doby meiotického zrání nebo do doby po něm (Gosden, 2002). V důsledku růstu, oocyty násobí svůj průměr, dochází k přeskupování cytoplazmatických organel a začíná se objevovat periviteliní prostor (Fair, 2003). Ve fázi, kdy se růst oocytů zastaví, syntéza mRNA ustává a neobnoví se dříve, než 1-3 dny po oplození vajíčka (Gosden, 2002). Pouze plně vyvinutý folikul obsahující plně vzrostlý oocyt reaguje na cyklický nárůst gonadotropinů FSH a LH, oocyt tak může znovu zahájit meiózu. Malé oocyty v primordiálních folikulech schopnost znovu zahájit meiózu nemají (Miyano, 2005).



Obrázek č. 1 Znárodnění folikulogeneze a oogeneze (Převzato z Miyano, 2005)

3.1.4 Meiotická kompetence

Schopnost oocyty znovu obnovit a dokončit meiotické zrání, které je závislé na velikosti oocyty a jeho folikulu. Před samotným získáním meiotické kompetence dochází v oocyty k transkripci, translaci a syntéze organel. Vytváří se tak zásoba pro následující meiotické zrání a pro vývoj embrya před implantací (Motlík et al., 1984). Teprve kompetentní oocyty s ukončeným růstem mohou projít G2 fází a vstoupit do druhé metafáze meiózy (Wassarman a

Albertini, 1994). Oocyt, který má ve folikulu utvořené antrum a dosáhl požadované velikosti se může označit za kompetentní oocyt. Prasečí oocyt o velikosti 120 μm rostoucí ve folikulu větším než 3 mm je již zcela meioticky kompetentní (Montlík et al., 1984).

V průběhu obnovení meiózy dojde ke kondenzaci chromatinu, rozpadnu zárodečného váčku (GVBD) a plně dorostlý oocyt prochází metafází I (Mitra a Schultz, 1996). Následně oocyt prochází anafází I a telofází I až dosáhne metafáze II a vyčlení první pólové tělíčko (Wassarman et al., 1988; Ellederova et al., 2004).

Oocyt, který označujeme za kompetentní, se cytoplazmě a v jádře liší jak po biochemické stránce, tak i v oblasti struktur. Mitochondrie se morfologicky mění a jejich množství se zvyšuje. Stejně tak struktura Golgiho aparátu mění svou strukturu. V cytoplazmě oocytu dochází ke shlukování ribozomů (Fulka et al., 1998). Mikrotubuly jsou kratší, obsahují mikrotubulární organizační centra (MTOC) a jsou umístěny perinukleárně (Thibault et al., 1987).

3.1.5 Meiotické zrání

Oocyt se v metafází II zastavuje v druhém meiotickém bloku, ve kterém zůstává až do oplození (Sun a Nagai, 2003). V podmínkách *in vivo* nastává fáze zrání během puberty samice, u prasat se jedná o cca 48 hodin před ovulací. V reakci na zvýšenou hladinu luteinizačního hormonu dochází k znovu zahájení meiózy. Jelikož oocyt sám o sobě postrádá receptory pro gonadotropní hormony, zprostředkování hormonálního signálu působí přes granulózní buňky, které tyto receptory na svém povrchu obsahují. Komunikace oocytu s okolními buňkami hraje důležitou roli pro znovu zahájení meiózy (Lawrence et al., 1980). Jejich kontakt je zajišťován mezibuněčnými spoji gap junctions, skrz které mohou procházet signální molekuly menší velikosti (Wassarman et al., 1988). Po zvýšení hladiny LH dochází k přerušení spojů gap junctions mezi oocytem a kumulárními buňkami, nastává expanze kumulu (McGee a Hsueh, 2000).

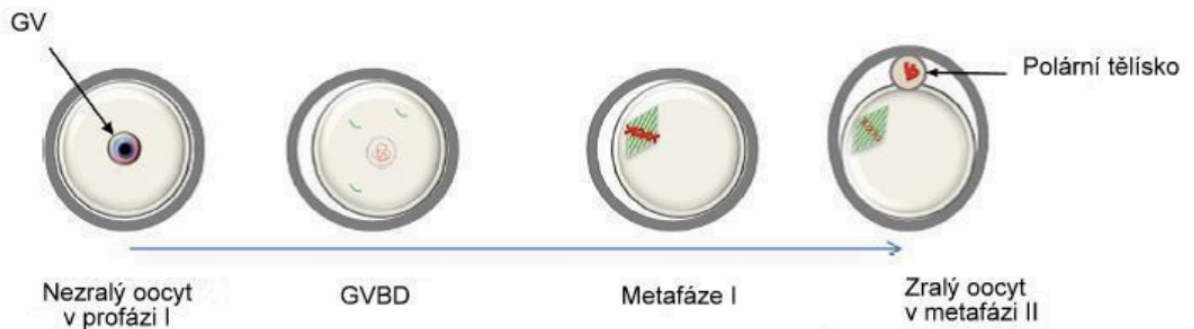
V době mezi LH vlnou a ovulací nastává znovuzahájení meiózy. K ovulaci dochází po prasknutí Graafova folikulu. Meióza je opět přerušena ve fázi MII ovulovaného oocytu. (Van der Hurk et al., 2000). Ve stádiu metafáze dva jsou oocyty u většiny savců ovulovány a jejich cesta pokračuje vejcovodem. Během sestupu vejcovodem nastává druhý meiotický blok a meióza je opět zastavena. K opětovnému spuštění a dokončení meiózy je nutný aktivační stimul. Ten zajistí spermie svým průnikem do oocytu při oplození (Hunter, 2000).

3.1.5.1 Jaderné zrání

Jádro oocytu se před znovu zahájením meiózy nachází ve stádiu zárodečného váčku. V tomto stádiu je jadérko obklopeno rozptýleným chromatinem a jaderná membrána je kompaktní (Motlík a Fulka, 1976). Zárodečný váček se na počátku zrání oocytu rozpadá (GVBD). Proces GVBD z počátku začne jemným vlněním jaderné membrány, které postupně zesiluje. Jaderná membrána je ke konci GVBD zcela rozptýlena a postupně mizí také jadérko (Wassarman et al., 1988).

U prasete můžeme proces GVBD popsat ve fázích GV1 – GV4. Ve stadiu GV1 jsou chromozomy uspořádané ve tvaru koňské podkovy. Ve stadiu GV2 se na jaderné membráně objevují shluky chromatinu. GV3 již obsahuje chromatin kondenzovaný. Během stadia GV4 je jaderná membrána zcela rozptýlena a jádérko se již nedá rozeznat (Lucas et al., 2002). Stadium GVBD u prasete trvá přibližně 24 hodin. Poté oocyt vstupuje do metafáze I, ve které probíhá tvorba bivalentů (Wehrend a Mainecke, 2001). Chromozomy jsou seřazeny do ekvatoriální roviny dělicího vřeténka (Kubišta, 1998). Následuje stadium anafáze I, které je charakteristické prodlužováním a dělením párových chromozómů k opačným pólům oocytu (Kanagawa et al., 1991). Oocytu prochází prvním reprodukčním dělením a obsahuje tak haploidní počet chromozómů (Eppig, 2001).

V průběhu první telofáze se v okolí zredukovaných chromozómů utváří jaderná membrána. Vše se odehrává v protilehlých pólech oocytu, kde se chromozomy shromažďují (Alberts et al., 1998). Vyděluje se první pólové tělísko s obsahem genetické informace a organel (Wassarman a Fujiwara, 1978). Oocyt vstupuje do druhé meiózy s haploidním počtem chromozómů. Chromozomy se opětovně řadí do ekvatoriální roviny a dochází tak k druhému meiotickému bloku v metafázi II, který bude přerušen až po oplození oocytu spermií (Alberts et al., 1988; Wassarman et al., 1988).



Obrázek č. 2 Stadia zrání oocytů (Převzato z Adhikari et Liu, 2014)

3.1.5.2 Cytoplazmatické zrání

Cytoplazmatické zrání je nezbytné pro následující oplození oocytu a jeho embryonální a fetální vývoj (Krisher, 2004). Jedním z klíčových faktorů zrání je přestavba buněčných organel (Brevini et al., 2007). Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, mitochondrie a ribozomy se přemísťují pomocí mikrofilament a mikrotubulů (Ferreira et al., 2009). Redistribuce je důležitá zejména u cytoskeletu a mitochondrií (Stojkovic et al., 1999). Při rozpadu zárodečného váčku a v metafázi II jsou mitochondrie nashromážděné v blízkosti jádra, v čase vyloučení prvního pólového tělíska jsou rozptýlené (Van Blerkom a Bell, 1986). Mitochondrie jsou nezbytné pro oocyt, jako producenti energie ve formě ATP (Brevini et al., 2007). Golgiho aparát vytváří kolem zárodečného váčku kruh. Také je lokalizován v blízkosti výběžků kumulárních buněk a poblíž Golgiho aparátu jsou lokalizována kortikální granula.

Během zrání kortikální granula migrují k plazmatické membráně. Kortikální granula jsou specifické orgány oocyty, jejichž exocytóza zabraňuje polyspermii (Moricard, 1975).

Některé molekuly, produkované kumulárními buňkami, kontrolují jaderné i cytoplazmatické zrání (Cha a Chian, 1998). Mezi markery cytoplazmatického zrání patří ATP a glutathionin, jejichž hladina v průběhu meiotického zrání stoupá (Luciano et al., 2005). Mezi další markery cytoplazmatického zrání řadíme glutathion, katalázu, superoxid dismutázu a peroxidázu (Cetica et al., 2001)

3.2 Zona pellucida

Zona pellucida (ZP) je jedinečný glykoproteinový obal oocytů, který se během oogeneze vytváří mezi oocytem a granulárními buňkami, které ho obklopují. ZP hraje důležitou roli v procesu fertilizace, kdy jejím úkolem je propustit pouze jednu nepoškozenou spermii a zároveň zabránit proniknutí dalších spermií (tzv. polyspermie) (Dunbar et al., 2001).

ZP nadále obklopuje oplodněný oocyt během vývoje před implantací, poskytuje tak ochranu časnému embryu během jeho průchodu vejcovodem samice. Pokud jsou zóny odstraněny před čtyřbuněčným stadiem, embrya jsou přenesena zpět do vejcovodu, kde přilnou ke stěně a vstřebají se (Rankin, T., 2000). ZP zabraňuje tvorbě chimér mezi embryi a tvoří mechanickou bariéru. Až do stádia expandující blastocysty je ZP zachována (Bedford, 2008, Coy et al., 2008a).

3.2.1 Vznik a vývoj zona pellucida, změny během fertilizace

Zona pellucida je acelulární průsvitná sulfátová glykoproteinová matrice, která je syntetizována a vylučována oocyty během vývoje folikulů. Její tloušťka (1-27 nm), obsah bílkovin (1-30 ng) a tuhost se u jednotlivých živočišných druhů liší. Studie provedené metodou skenovací elektronové mikroskopie u myších i lidských oocytů ukazují, že ZP se jeví jako jemná síťovina složená z tenkých vzájemně propojených vláken, které se pravidelně střídají ve vzoru širokých a těsných sítí s póry (Familiari et al., 2006, Gupta et al., 2012). Tyto póry se na vnějším povrchu zdají být větší ZP než na vnitřním. Amorfni houbovitý vnější povrch ZP s většími póry může usnadnit pronikání spermií. Ukázalo se, že lidská ZP s kompaktnějším a hladším vnějším povrchem je méně propustná (Gupta et al., 2012).

Zona pellucida oocytů savců, která může představovat více než 10% celkového obsahu proteinu oocyty, se skládá pouze z několika druhů glykoproteinů (Wasserman et al., 2005). Struktura ZP je tvořena třemi nebo čtyřmi glykoproteiny. U myši se skládá ze 3 glykoproteinů, označovaných jako ZP1, ZP2 a ZP3. *Zona pellucida* prasete, skotu a psa obsahuje stejně jako u myši tři glykoproteiny, ale glykoprotein ZP1 je nahrazen glykoproteinem označovaným jako ZP4 (Gupta et al., 2012).

Během růstové fáze oocytů jsou glykoproteiny ZP exprimovány z endoplazmatického retikula a přechází do Golgiho aparátu, kde jsou zabaleny do sekrečních vezikul. Vezikuly poté migrují k plazmatické membráně oocyty, kde fúzíjí a splynou s membránou. Tím jsou glykoproteiny uloženy do extracelulárního prostoru (Wassarman et al., 2005).

Bylo identifikováno několik oblastí s polypeptidy, které regulují sekreci, přenos a začlenění těchto glykoproteinů. Každý polypeptid obsahuje N-koncovou signální sekvenci, consensus furin cleavage site (CFCS), ZP doménu a transmembránovou doménu (TMD), která se nachází v blízkosti C-konce peptidu. Signální sekvence se zaměřuje na vznikající glykoproteiny, směřující do sekreční dráhy. TMD napomáhá k ukotvení glykoproteinů v sekrečních váčcích k plazmatické membráně oocyty. Úlohou CFCS je ukotvení glykoproteinů do extracelulárního prostoru. ZP doména (protein z 260 aminokyselin) společná pro širokou škálu proteinů a organismů, umožňuje polymeraci glykoproteinů na dlouhá vlákna. Delece ZP domény brání začlenění rodících se ZP glykoproteinů do *zona pellucida* (Wassarman et al., 2005).

Na myším modelu byla studována sekrece ZP glykoproteinů a jejich sestavení do matice. Nejdříve dochází k nerovnoměrné sekreci glykoproteinů do lokalizovaných váčků, které se nacházejí mezi povrchem oocytů a obklopujícími folikulárními buňkami. Během raných fází růstu oocytů se ZP glykoproteiny jeví jako vlákna uspořádaná do šestihranné matice s jednotnou velikostí pórů. S rostoucím oocytem póry splývají a vytvářejí kolem oocytů jednotný plášť, současně se zvyšuje počet mikroklyků. Tyto mikroklyky přicházejí do kontaktu s kumulárními buňkami a podílí se na vzniku gap junction (Gupta et al., 2012).

Původ savčích ZP glykoproteinů není zcela objasněn. Existují tři teorie o tom, kde jsou glykoproteiny syntetizovány, v místě samotného oocyty, folikulárními buňkami nebo obojím. V poslední době existují důkazy o tom, že folikulární buňky přispívají k produkci složek zóny specificky, podle druhu. Například u myši, které mají tenkou zonu pellucidu jsou glykoproteiny ZP a jejich transkripty syntetizovány výhradně oocytem. Studie *in vitro* potvrdily, že myši oocyty jsou schopné syntetizovat všechny proteiny ZP. Oproti tomu u jiných druhů, jako jsou lidé, opice, králík, pes, prase a kráva výzkumy prokázaly, že jak oocyt, tak folikuly buňky přispívají k syntéze glykoproteinů ZP. Zona pellucidu těchto druhů je dobře vyvinuta, a jelikož rychlost syntézy proteinů oocytem je příliš nízká na to, aby zohledňovala hmotnost oocyty a dostatečnou kvalitu *zona pellucida*, musí se do syntézy proteinů zapojit i folikulární buňky (Gupta et al., 2012; Sinowatz et al., 2001).

Během folikulárního vývoje prasečích ovarii je protein ZP3 a jeho transkripty lokalizován především v cytoplazmě oocytů primordiálních a primárních folikulů. Ve stadiu sekundárních folikulů se na syntéze ZP3 a jeho mRNA podílí, jak oocyt, tak jeho folikulární buňky. Ve stadiu terciálních folikulů se ZP3 a jeho transkripty převážně nacházejí v cytoplazmě buněk *corona radiata*, zároveň v tomto stadiu se syntéza proteinu ZP3 zastavuje (Sinowatz et al., 2001).

Fyzikálně-chemické vlastnosti *zona pellucida* se po proniknutí spermie do oocyty mění. Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu byly případné změny morfologie ZP zkoumány (Michelmann et al., 2007). *Zona pellucida* nezralých oocytů získaných z antrálních folikulů vykazuje houbovitý vzhled s početnými malými póry pravidelně uspořádanými. Zatímco většina zralých oocytů vykazují povrch hladší (Töpfer – Petersen et al., 2008). Z důvodu k značné heterogenitě ZP nelze stanovit žádnou korelaci mezi stadii zrání a jednotlivými typy ZP. Ale jelikož povrch zralých oocytů byl více kompaktní než u nezralých oocytů, dochází tedy k biochemickým změnám ZP v konečném zrání oocytů, ještě před oplozením (Rath et al., 2005).

Zona pellucida je po fertilizaci změněna v důsledku exocytózy kortikálních granul, jejichž obsah se uvolňuje do perivitellinního prostoru a tím dochází k hlavnímu bloku

polyspermie, tzv. ZP hardeningu (Rankin et Dean, 2000). Největší glykoprotein ZP2 se bloku polyspermie aktivně účastní, neboli indukuje změny vedoucí k tomuto bloku (Töpfer – Petersen et al., 2008) – v blízkosti N-konce ZP2 dochází k proteolytickému štěpení (Rankin et Dean, 2000). Také probíhá tvorba disulfidických vazeb, které jsou pravděpodobně tvořeny pro změněné konformace proteinů (Töpfer – Petersen et al., 2008).

3.2.2 Zona pellucida a mezidruhové rozdíly

Savčí *zona pellucida* je složena ze tří až čtyř hlavních glykoproteinů označovaných jako ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4, které se liší podle živočišného druhu. (Shimizu et al., 1983; Lefievre et al. 2004). Tyto hlavní glykoproteinové rodiny byly takto klasifikovány díky jejich podobnosti aminokyselinových sekvencí. Bylo prokázáno, že každá z těchto proteinových rodin u různých druhů savců má 50-98% homologii na úrovni nukleových kyselin (Prasad et al., 2000). Ačkoli ZP glykoproteiny vykazují extrémní heterogenitu jak v náboji, tak v molekulové hmotnosti, je zde značné množství zachovaných pozic cysteinových zbytků a potenciálních N-vázaných glykosylačních míst v každé rodině (Dunbar et al, 2001, Prasad et al., 2000). Rozdíly zjištěné mezi druhy, pokud jde o velikosti homologních proteinů zóny jsou připisovány rozdílům v glykosylaci. Jako výsledek se zdá, že lidské glykoproteiny *zona pellucida* mají nižší molekulovou hmotnost než myši. Kromě toho je u myši syntetizován pouze jediný polypeptid ZP3, oproti tomu alespoň dvě izoformy ZP3 jsou exprimovány prasečími a lidskými oocyty (Benoff, 1997).

V několika histochemických studiích byly proteiny vázající cukr, nazývané lektiny, použity jako nástroje pro charakterizaci oligosacharidových řetězců proteinů ZP. Široký výběr komerčně dostupných lektinů s vysoce specifickou rychlostí umožňuje identifikaci různých sacharidových struktur a zejména jejich lokalizaci (Sinowatz et al., 2001). Srovnávací cytochemické studie ukazují druhově závislé variace v expresi a distribuci sacharidových skupin ZP. Zdá se tedy, že organizace ZP v různých vrstvách, která byla prokázána mikroskopickými studiemi u různých druhů, je doprovázena prostorovým rozložením definovaných sacharidových struktur po celé šířce ZP (Shalgi et al., 1991).

Vazba lektinů je u různých druhů vysoce specifická. U hlodavců se tato vazba liší pouze v expresi ligandových míst pro lektiny rozpoznávající α -galaktosu nebo β -N-acetylgluktosamin. Zároveň je ale zajímavé, že vazba těchto lektinů není detekovatelná u ZP člověka, psa, kočky a prasete (Shalgi a Raz, 1997). U všech zkoumaných druhů se vyskytují některé uhlohydrátové struktury. Jedná se přednostně o zbytky cukrů, jako je manóza a N-acetylgluktosamin, které jsou obvykle součástí oblasti jádra N-vázaných oligosacharidů (Geyer a Geyer, 1998). Studie dále také poukazují na to, že většina variací pravděpodobně působí na terminální neredukující oblast sacharidových řetězců ZP, což vede k poznatku, že i malé strukturální rozdíly mohou přispět k vytvoření druhově specifické interakci gamet. Všechny dosud studované glykoproteiny ZP obsahují jak N-vázané, tak O-vázané oligosacharidy.

Na myším modelu byl nalezen α -Galaktosyl na O-vázaném oligosacharidovém řetězci myšního ZP3, stejně jako na N-acetylgluktosaminylových zbytcích (Sinowatz et al., 2001). Kromě toho jsou N-vázané oligosacharidy myšního ZP2 a ZP3 převážně fukosylovány řetězci

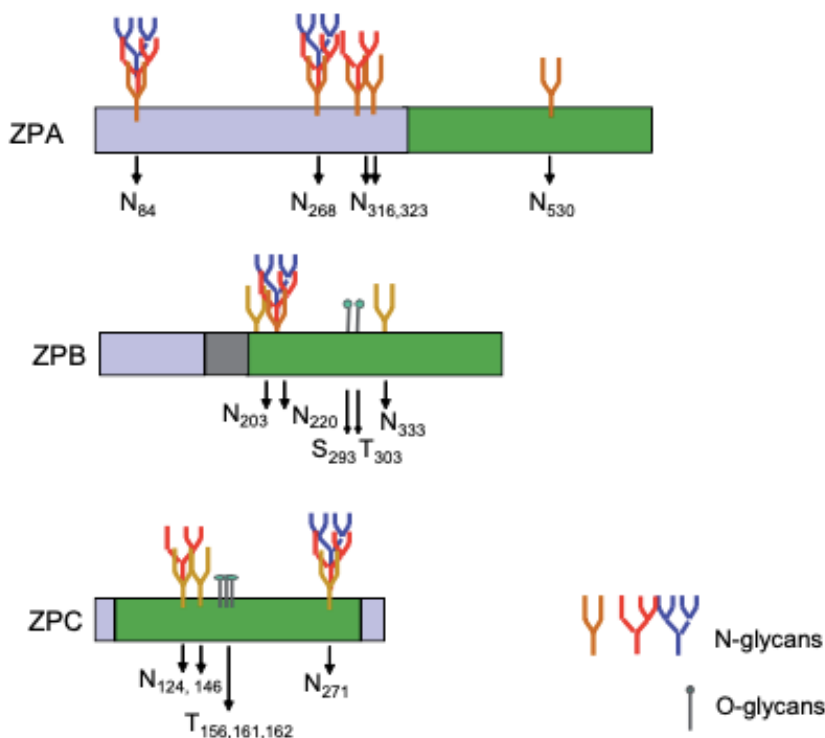
komplexního typu tri- a tetra-větvící se, které jsou svou strukturou velmi podobní (Noguchi et al., 1992).

V důsledku vývoje metod v izolaci ZP z vaječníků prasat byla u těchto druhů důkladně zkoumána struktura oligosacharidů ZP. Glykoproteiny prasečího ZP lze elektroforeticky rozdělit na dvě složky s molekulovou hmotností přibližně 55 000 a 90 000 (Hedrick a Wardrip, 1987). Složka s molekulovou hmotností 55 000, představující asi 80% celkového obsahu bílkovin v prasečí ZP, sestává ze dvou odlišných polypepidů, označovaných jako pZPB a pZPC. Oba proteiny lze separovat pouze po částečné deglykosylaci pomocí endo- β -galaktosidázy (Sacco et al., 1989). Podle odvozené aminokyselinové sekvence kódované prostřednictvím cDNA může každý z proteinů obsahovat až pět potenciálních N-glykosylačních míst (Harris et al., 1994). Analýza sacharidů však naznačuje, že proteiny pZPB a pZPC obsahují tři nebo čtyři N-vázané oligosacharidové řetězce a k tomu ještě tři (pZPB) a šest (pZPC) O-vázaných glykanových řetězců (Yurewicz et al., 1992). N-vázané oligosacharidy uvolňované hydrazinolýzou z rodiny ZP glykoproteinů prasat o molekulové hmotnosti 55 000 MW byly rozděleny na neutrální (28%) a kyselé (72%) uhlovodíkové řetězce pomocí kapalinové chromatografie. Konkurenční test ukázal, že směs neutrálních řetězců působí jako spermatický receptor, zatímco kyselé řetězce nemají žádnou aktivitu (Sinowitz et al., 2001).

3.2.3 Zona pellucida prasete

Prasečí zona pellucida má šířku 16 μm a obsahuje 30-33ng glykoproteinů (Nakano et al., 2000). Je složena ze tří vysoce specifických glykoproteinů s velkým množstvím vázajících glykanů. Tyto glykoproteiny jsou modifikovány v důsledku posttranslačních uprav, jako jsou glykosylaci a sulfatace (Rath et al., 2005). Přítomnost sacharidových zbytků hraje důležitou roli pro vazbu mezi oocytem a spermií (Pastor et al., 2008). Prasečí ZP glykoproteiny jsou vysoce glykosylovány neutrálními a kyselými N- a O-vázanými oligosacharidy, nesoucí tandemově uspořádané N-acetylaktosaminové repetice. Vysoká heterogenita je způsobena různými stupni sialylace a sulfatace. Sulfátová skupina je navázaná pouze na C-6 zbytku GlcNAc (SO-6GlcNAc) na N-acetylaktosamin opakujících se jednotkách, ojedinele i na neopakujících se jednotkách N-glykanů (Töpfer – Petersen et al., 2008). N-glykany jsou součástí komplexu a obsahují dvou, tří až čtyř anténní prodloužení, která jsou rozšířená o N-acetylaktosaminové jednotky. Přibližně 75% glykanů tvoří sialylované jednotky a/nebo laktosaminové, nesoucí SO₃-6GlcNAc (N-acetyl-6-O-sulfo-D-glucosamine), tím přispívají ke kyselosti glykoproteinů. Také O-glykany se prodlužují o sulfátové, lactosaminové jednotky (Rath et al., 2005). Glykoproteiny ZP nesou různý počet potenciálních N-glykosylačních míst (obr. 3) (Töpfer – Petersen et al., 2008).

Funkce sacharidových struktur dosud nebyla zcela objasněna (Rath et al., 2005). Ve své vědecké práci Sacco a kolektiv popsali O-glykany, které se nacházejí na ZPB (ZP4) jako ligandy pro receptory spermií (Facco et al., 1986), oproti tomu Nakano a Yonezawa mapovali biologickou funkci na určité N-glykany ZPB (Nakano et al., 2000).



Obrázek č. 3 Zona pellucida prasete, znázornění glykosylačních míst (Töpfer – Petersen et al., 2008).

3.2.3.1 ZP2 protein

Nezralý ZP2 protein je složen z řetězce zahrnující 716 aminokyselin (AA), má jednu ZP doménu a bývá považován za sekundární spermatický receptor. Velikost čistého proteinu, bez sacharidových struktur je 80 kDa. Zralý protein (603 AA) vzniká odštěpením signálního polypeptidu (1-33 AA) z N-konce a odstěpením propeptidu z C-Konce (sekvence 639-716 AA). ZP2 protein je během kortikální reakce proteolycky štěpen v blízkosti N-Konce na dva fragmenty, spojené disulfidovou vazbou (UniProt, 2014a).

3.2.3.2 ZP3 protein

V nezralém stadiu je ZP3 protein tvořen z řetězce 421 AA, obsahuje jednu ZP doménu a považuje se za primární spermatický receptor. U prasete ZP3 vykazuje vazebnou aktivitu až ve spojení komplexu s ZP4 proteinem, sám o sobě aktivitu nevykazuje. Čistý protein je o velikosti 46 kDa. Po odštěpení signálního polypeptidu z N-konce (1-22 AA) a propeptidu z C-konce (333-421 AA) vznikne zralý protein o velikosti 310 AA (UniProt, 2014b).

3.2.3.3 ZP4 protein

Nezralý ZP4 protein je tvořen sekvencí 636 AA, obsahuje jednu doménu a v interakci se ZP3 proteinem je u prasete pravděpodobně primární spermatický receptor. Velikost čistého ZP4 proteinu činí 60 kDa. Signální peptid na N-konci proteinu je tvořen sekvencí 1-21 AA. Po odštěpení propeptidu (463-536 AA) a signálního peptidu vzniká zralý protein o velikosti 441 AA (UniProt, 2014c).

3.2.4 Významnost glykosylace ZP glykoproteinů

Relevance glykosylace ZP glykoproteinů byla podrobně zkoumána na myším modelu. Působením endo- β -N-acetyl-D-glukosaminu byly z myšního ZP3 proteinu odstraněny N-vazané glykany, to však nemělo žádný účinek na indukci akrosomové reakce. Zatímco odstraněním O-vázaných glykanů alkalickou hydrolyzou odstranilo schopnost glykoproteinu vyvolat akrosomovou reakci. Následné analýzy implikovaly galaktózu v α nebo β vazbě na neredukující konec O-vázaných oligosacharidů a N-acetylglykosamin (GlcNAc) v β vazbě jako cukerné skupiny na myši ZP3 protein zodpovědného za vazbu spermií na *zona pellucida*. Myši s deficitem glykosyltransferázy, která přeměňuje koncovou galaktózu v α vazbě, však plodné byly, což naznačuje, že galaktóza v β vazbě, GlcNAc nebo obojí nehrají důležitou roli. Také bylo prokázáno, že manóza hraje důležitou roli v aktivitě receptoru pro spermie.

Hmotnostní spektrální analýza odhalila, že O-glykany přítomné na ZP3 jsou sekvence zakončené kyselinou sialovou, lacNAc (N-AcetylLactosamine), lacdiNAc (N'-DiacetylLactosamine), Gal alpha 1-3 Gal a Neu Acalpa 2-3.

U lidí bylo prokázáno, že na vazbě spermie s oocytom se podílí několik oligosacharidových skupin, jako je manóza, N-acetylglukosamin, komplexní glykokonjugáty nesoucí selektin a další podobné ligandy (Gupta et al., 2012).

3.2.5 Vazba spermie na zona pellucida

Proces oplození u savců začíná mezi ZP a spermií (Raz a Shalgi, 1998). Spermie se naváže na oligosacharidové řetězce ZP glykoproteinů, proběhne rozpoznávání gamet a spuštění signalizační kaskády, vedoucí k akrozomální reakci, která spermií umožňuje penetrovat skrz ZP (Töpfer – Petersen et al., 2008). Spermie skrz ZP pronikne do perivitellinního prostoru a odtud se dostává až k oolemě. Zde po navázání spermie s membránou dochází k jejich splynutí a následně k oplození oocytu (Raz a Shalgi, 1998, While et al., 2010).

Zona pellucida myši je složena ze tří glykoproteinů, které označujeme jako ZP1, ZP2 a ZP3. Ve vzájemné interakci tvoří ZP2 a ZP3 dlouhá vlákna, zatímco ZP1 spojuje jednotlivá vlákna navzájem (Wasserman et al., 2005). Na myším modelu bylo prokázáno, že se myši spermie nejdříve váže na glykoprotein ZP3, ten indukuje akrozomální reakci (Hasegawa et al., 2006). Přítomnost O-vázaných glykanových řetězců na proteinu ZP3 je také nezbytná pro navázání spermie a podle nedávných studií řetězce N-glykanů pravděpodobně slouží k rozpoznávání gamet (Yonezawa et al., 2012).

U prasete tvoří dlouhá vlákna glykoproteiny ZP3 a ZP4, jako „crosslinker“ je zde ZP2 (Michelmann et al., 2007). Vysokou afinitu ke glykoproteinovému heterokomplexu ZP3-ZP4 vykazují ZP-vazebné proteiny kančích spermií. K volným glykoproteinovým podjednotkám ZP3 a ZP4 však afinitu nevykazují (Yurewicz et al., 1998). O-vázané sacharidové řetězce tohoto komplexu inhibují vazbu mezi oocytem a spermií, zatímco neutrální N-vázané glykany se na vazbě oocyty a spermie podílejí. Yonezawa et al. (2012) se ve svém experimentu zabývali otázkou, který z glykoproteinů z komplexu ZP3-ZP4 je zodpovědný za vazebnou aktivitu. Autoři došli k závěru, že na rozdíl od myši (ZP3) je za vazebnou aktivitu mezi oocytem a spermií zodpovědný glykoprotein ZP4. Z jakého důvodu se vazebná činnost ZP4 projeví až v heterokomplexu s glykoproteinem ZP3 zatím není objasněno.

Primární vazbou se kapacitovaná spermie naváže na neutrální N-glykany, následuje akrozomální reakce a spermie se přes proacrosin/acrosin, p38 a další vazebné ZP proteiny spermií váže na polysulfatované glykany ZP, čímž nastává sekundární vazba spermií a ZP (Töpfer – Petersen et al., 2008).

3.2.6 Polyspermický blok

Pro fyziologický průběh oplodnění oocyty je důležité, aby nedocházelo k polyspermii. Penetrace spermií vyvolává exocytózu kortikálních granul, vedoucí ke vzniku polyspermického bloku. Polyspermický blok v závislosti na živočišném druhu je tvořen ZP nebo plazmatickou membránou oocyty a v některých případech obojím (Sun, 2003).

Kortikální granula (CG) je skupina sekrečních vezikul vznikající v Golgiho aparátu, obsahující glykoproteiny a specifické enzymy (Jeřeta et al., 2012; Wang et al., 1997). U prasečích nezralých oocytů jsou kortikální granula rozptýlené v cytoplazmě oocyty (Tsai et al., 2011). Během jaderného zrání migrují ke kůře oocyty a pod plazmatickou membránou vytvářejí souvislou vrstvu (Wang et al., 1997). Schopnost uvolnit obsah kortikálních granul do perivitellinního prostoru nemají GV oocytů, ale od stadia GVBD se tato schopnost vyvíjí až do MII fáze a do doby blízké ovulaci. Uvolnění CG závisí na zvýšeném obsahu intracelulárního Ca^{2+} (Sun, 2003).

Aktivačním stimulem zvyšující hladinu Ca^{2+} je splynutí spermie s plazmatickou membránou oocyty, což vede k aktivaci signálních drah (Tsai et al., 2011).

Spermie vnáší do oocyty fosfolipázu C, specifickou pro spermie zvanou PLC ζ (White et al., 2010). PLC ζ se vyskytuje v perinukleárním prostoru spermie a katalyzuje přeměnu PIP2 na IP3, který se váže na receptory endoplazmatického retikula a spouští uvolňování intracelulárního Ca^{2+} do cytoplazmy oocyty a indukuje Ca^{2+} oscilace (Heytens et al., 2008 ; Tsai et al., 2011). Po navázání spermie na oocyt dochází k fúzi CG s oolemou a jejich enzymatický obsah je uvolněn do perivitellinního prostoru. Specifické glykosidázy a proteázy mění glykoproteiny ZP a tím vytváří blok zabraňující polyspermii (Raz a Shalgi, 1998). Dosud nebyly plně popsány změny ZP, vyvolané kortikální reakcí (Romar et al., 2012).

3.3 Lektiny

Lektiny jsou proteiny s vysokým stupněm stereospecificity, rozeznávající různé struktury cukrů. Vytvářejí reverzibilní vazbu s glyko-konjugovanými komplexy, které se hojně vyskytují v rostlinách, živočišných buňkách a mnoha dalších druzích. Lektiny také dokáží aglutinovat erythrocyty v závislosti na krevní skupině a druhu lektinu.

Jedinečné vlastnosti rozpoznávání sacharidů vedou k rozsáhlému používání lektinů v mnoha biologických oborech, mezi ně patří např. detekce, izolace a charakterizace glykokonjugátů, histochemie buněk a tkání, rozpoznávání nádorových buněk a mnoho dalších (Mishra et al., 2019).

3.3.1 Druhy lektinů

Jelikož jsou lektiny produkovány širokou škálou živých organismů, lze je rozdělit do skupin podle druhu a původu – živočišné, rostlinné, houbovité, řasové a bakteriální lektiny (Mishra et al., 2019).

Živočišné lektiny

Jedná se o proteiny vázající sacharidy s vysoce variabilními sekvencemi aminokyselin, které jsou schopné vázat složité struktury sacharidů prostřednictvím CRD (carbohydrate recognition domains). Každý živočišný lektin má vlastní CRD a stejný motiv sekvence o 115-130 aminokyselinových zbytků (Kilpatrick, 2002). Na základě CRD sekvencních motivů a kationtových požadavků jsou tyto lektiny rozděleny do několika rodin – galektiny (lektiny typu S), rhamnóza vazebné lektiny (RBL), lektiny typu C (CTL), lektiny typu X (XTL), P-lektiny, lektiny typu F a pentraxiny. Podílejí se na vývoji, imunitní odpovědi, opsonizaci, fagocytóze a aktivaci dráhy komplementu (Mishra et al., 2019).

Rostlinné lektiny

Díky snadné izolaci a distribuci byly rostlinné lektiny studovány jako první. Izolováno a charakterizováno bylo 500 různých rostlinných lektinů. Vlastní alespoň jednu nekatolickou doménu, která se reverzibilně váže na konkrétní mono- nebo oligosacharid. Tyto lektiny se vyskytují v semenech, v kořenech nebo v listech. Mají velký význam v interakci mezi hostitelem a patogenem, podílejí se na vývoji a napomáhají v buněčné signalizaci a komunikaci mezi buňkami. Dále poskytují ochranu rostlin před škodlivými fytopatogenními mikroorganismy, hmyzem a zvířaty (Mishra et al., 2019).

Houbovité lektiny

Vykazují vysokou specificitu vůči mucinům a zbytkům N-acetyl galaktosaminu (GalNAc). Původ těchto lektinů je z 82% z hub, 15% z plísní a 3% z kvasinek (Mishra et al., 2019). Jejich přítomnost je především v plodnicích a jen několik výjimek se nachází v myceliích (Khan a Khan, 2011). Mají zásadní roli v růstu, rozvoji a morfogenezi. Podílejí se také na rané fázi infekce prostřednictvím interakce s hostitelským glykokonjugátem (Mishra et al., 2019).

Řasové lektiny

Známé také jako fylektiny, vlastní specifitu pro glykoproteiny složitější než monosacharidy. Vykazují vysoký obsah kyselých aminokyselin a pro svou biologickou aktivitu nevyžadují ionty kovů. Řasové lektiny můžeme rozdělit do tří hlavních kategorií na základě vazebných vlastností sacharidů – lektiny vázající komplex N-glykanu, lektiny specifické pro N-glykany s vysokým obsahem manózy a lektiny vlastnící obě uvedené specifikace (Mishra et al., 2019). Využití těchto lektinů najdeme v biomedicinském výzkumu, který využívá jejich protizánětlivé, antivirové a protinádorové vlastnosti (Singh et al., 2015).

Bakteriální lektiny

Nazývané také jako adheziny, jelikož během infekce usnadňují spojení bakterií s hostitelskou buňkou (Hooper a Gordon, 2001). Většina bakterií obsahuje více adhezínů s různou specifičností k sacharidovým strukturám. Některé adheziny se váží na koncové zbytky cukru prostřednictvím CRD, jiné svou vazbu vykazují na vnitřní sekvence lineárních nebo rozvětvených oligosacharidových řetězců (Nizet et al., 2017). Tyto lektiny plní především svou funkci při adhezi a symbióze (Mishra et al., 2019).

3.3.2 Vlastnosti lektinů

Existuje řada studií, které chtějí poukázat na účinnost lektinů v in vivo a in vitro podmínkách. Bylo prokázáno, že v podmínkách in vitro ovlivňují mitogenezi lymfocytů, a to jak stimulační, tak inhibiční, při čemž nejcitlivěji reagují lymfocyty gastrointestinálního traktu. Mají schopnost agregovat imunoglobuliny, spouštět alternativní cestu aktivace komplementu, inhibovat růst plísni a také indukovat uvolňování histaminu z bazofilních a žírných buněk. Lektiny jsou poměrně odolné vůči vyšším teplotám, odolají 70°C více než 30 minut. Vykazují odolnost i vůči trávení, některé z lektinů jsou vysoce odolné vůči žaludeční kyselině a proteolytickým enzymům (Rocca, 2004). Zatímco některé lektiny jsou odbourávány, jiné procházejí střevem a asi 1-5% se u zvířat znovu vstřebává do krevního oběhu, což je dostatečné množství k vyvolání imunitní odpovědi (Kumar et al., 2012).

Vazba lektinů je reverzibilní a nekovalentní s jednoduchými nebo komplexními sacharidovými konjugáty, ať už jsou na povrchu buněk nebo volně v roztoku. Všechny molekuly lektinu mají dvě nebo více vazebných míst pro sacharidy, což je vlastnost nezbytná pro jejich schopnost aglutinovat buňky nebo reagovat s komplexními sacharidy. Kombinované velikosti lektinů jsou schopny pojmout až pět nebo více sacharidových zbytků. Lektiny reagují silnější vazbou s rozvětvenými oligosacharidy než s lineárními. Některé lektiny mají dvojí nebo vícenásobnou afinitu k různým disacharidům. Vazba mezi těmito molekulami je hydrofobní, ale elektrostatické síly se účastní jen zřídka (Kumar et al., 2012).

3.3.3 Biologická role

Biologická role lektinů může být spekulativní. Lektiny mohou být zapojeny do transportu nebo ukládání sacharidů. Vzhledem k jejich roli v procesu adheze a aglutinace se jsou považovány za důležité jak v symbiotické, tak v patogenní interakci mezi některými mikroorganismy a hostiteli. Mikrobiální lektiny hrají důležitou roli v adhezi k povrchu kolonizovaným mikroorganismy (Kumar et al., 2012). Na základě několika studií byly lektiny využívány k aglutinaci erytrocytů, specifické pro určení krevní skupiny (Pecka, 2005).

Díky svým mnohostranným biologickým vlastnostem byly lektiny vyvinuty jako buněčné sondy pro zkoumání struktur a funkcí buněčného povrchu. Jsou používány k frakcionaci živočišných buněk (např. T a B lymfocytů), k prokázání změn buněčného povrchu po virové nebo parazitární infekci. Fungují jako nosiče pro transport chemoterapeutických látek. Jsou významnými činidly pro zkoumání povrchových receptorů bakterií, prvků a vyšších organismů. Dále jsou užitečné pro charakterizaci složek bakteriálních buněk a pro detekci bakteriofágových receptorů. Jsou používány v zemědělství a to v ochraně rostlin před insekticidy. V medicíně napomáhají v diagnostice nemocí, jako je rakovina, kdy specificky rozeznávají povrch sacharidu, vyskytující se na rakovinových buňkách (histologická vyšetření). V lidské imunodeficienci dokáží být užitečným ukazatelem kvalitativního a kvantitativního nedostatku CD4+ T – lymfocytů. V afinitní chromatografii fungují jako nástroj pro purifikaci proteinů, kde slouží k analýze sacharidových struktur. Inhibují stimulované T – lymfocyty, mají vlastnosti imunomodulační a imunosupresivní. Mohou působit jako mitogeny, význam mají i při transplantacích. Využití lektinů je a příkladů jejich funkcí je nespočetně mnoho (viz. Tabulka) (Chandra a Kumar 2006; Kumar et al., 2012).

Tabulka č. 1 Příklady funkcí lektinu (Převzato z Kumar et al., 2012)

podskupina	příklady funkcí
Calnexiny	třídění glykoproteinů v endoplazmatickém retikulu (ER)
M-typ	degradace glykoproteinů asociovaná s ER
L-typ	třídění proteinů
P-typ	třídění proteinů z GA, degradace glykoproteinů v ER,
C-typ	buněčná adheze (selektiny), vrozená imunita (collectiny), (vazebná aktivita závislá na Ca ²⁺)

S-typ (galektiny)	regulace cytoplasmatických dějů, prokřížení extracel. glykoproteinů (aktivita závislá na přítomnosti thiolových skupin – SH)
I-typ (siglekty)	buněčná adheze
R-typ	třídění enzymů, regulace glykoproteinových hormonů
F-box lektiny	degradace špatně sbalených proteinů
fikoliny	vrozená imunita
Chitináze podobné lektiny	metabolismus kolagenu
F-typ	vrozená imunita
intelektiny	vrozená imunita, oplodnění, embryogeneze

4 Metodika

4.1 Odběr vaječníků

Vaječnky byly získány od prasnic, poražených na jatkách v neznámém stadiu pohlavního cyklu. Po porážce byly do jedné hodiny vaječnky transportovány do laboratoře ve fyziologickém roztoku (0,9 % chlorid sodný). Pomocí vytemperované termoláhve je teplota vaječnky udržována při 38°C. V laboratoři byly pak vaječnky opláchnuty v čistém fyziologickém roztoku.

4.2 Zisk meioticky kompetentních oocytů

Meioticky kompetentní oocyty o velikosti vnitřního průměru 120-125 μm byly získány aspirací folikulární tekutiny z vybraných folikulů o velikosti 2-5 mm. Na aspiraci byla použita injekční stříkačka 20ml s jehlou 20 G. Následně pod stereomikroskopem byly vybrány pouze oocyty s kompaktním obalem kumulárních buněk a nepoškozenou cytoplazmou. Pomocí skleněné kapiláry byly oocyty přeneseny do modifikovaného média M199. Zrácí medium M199 bylo doplněné o laktát vápenatý (0,06 mg/ml), gentamicin (0,025 mg/ml) pyruvát sodný (0,25 mg/ml), HEPES (1,5 mg/ml) a 10% BFS (bovinní fetální sérum).

Tabulka č. 2 Složení modifikovaného média M199

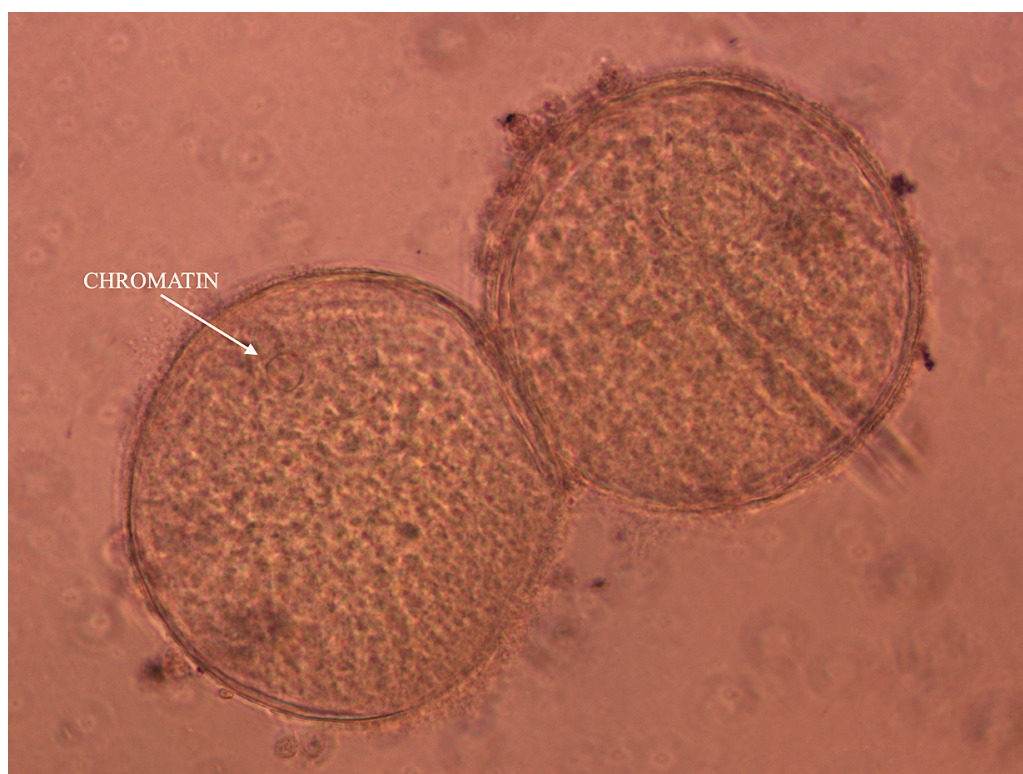
Chemikálie	Množství ve 100 ml média M199
Gentamicin	25 mg
Laktát	60 mg
Pyruvát	25 mg
HEPES	150 mg
Bovinní růstový protein	100 mg

4.3 Kultivace oocytů *in vitro*

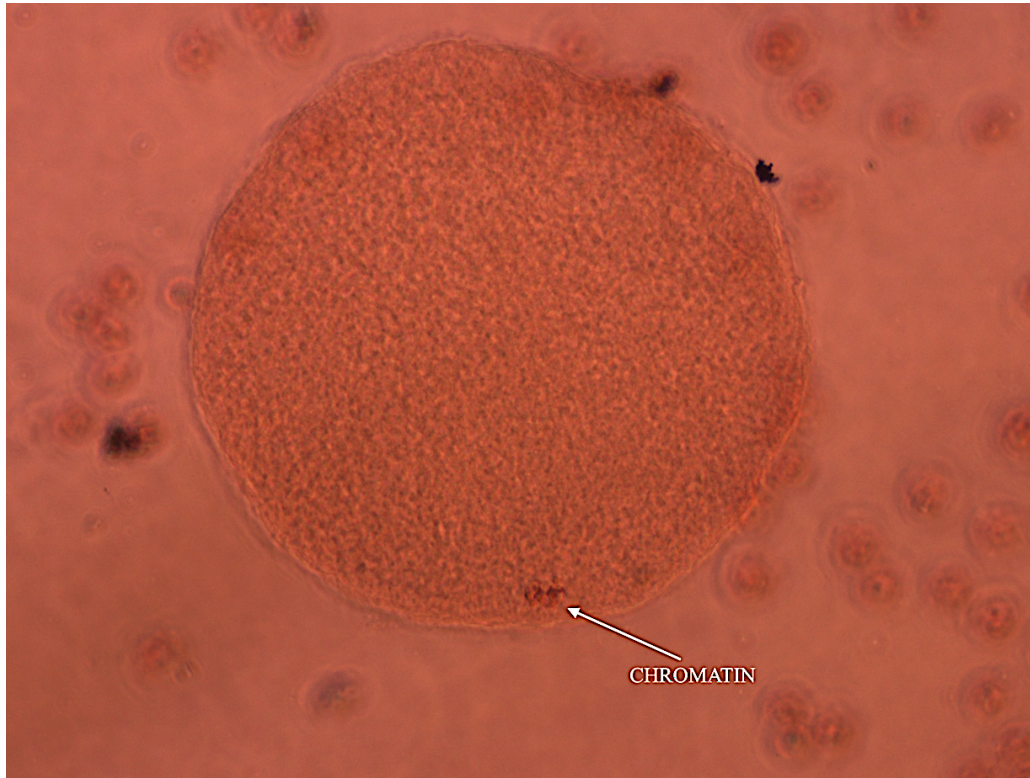
Před kultivací byly oocyty nejprve třikrát promyty v kultivačním mediu M 199 a následně byly kultivovány ve čtyř-důlkových miskách s obsahem 1 ml modifikovaného media M199 s přísávkem gonadotropinu P.G. 600 při teplotě 39°C a 5% CO₂. Pro získání oocytů v růstové fázi MI byly oocyty kultivovány po dobu 24h. Do stadia metafáze druhého meiotického dělení (MII) oocyty dozrály po kultivaci 46h. Oocyty, které byly potřeba pro další metody ve stadiu GV (zárodečný váček) kultivovány nebyly.

4.3.1 Hodnocení kvality oocytů a jejich meiotického zrání

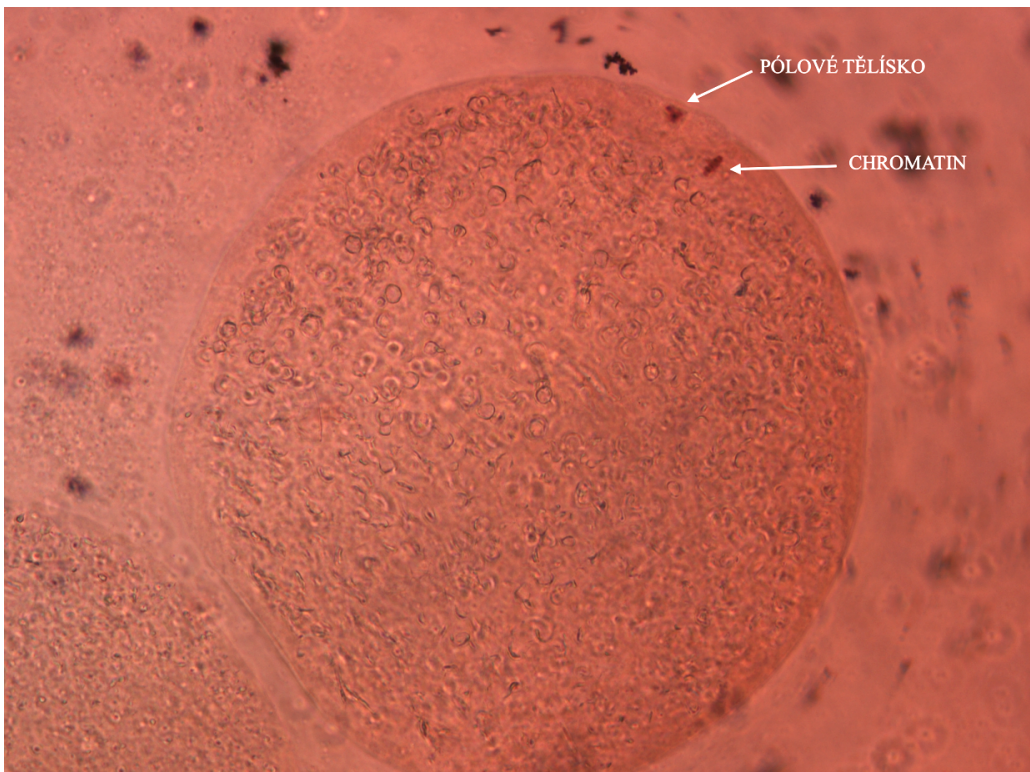
Opakovaným pipetováním tenkostěnnou skleněnou pipetou byly oocyty zbaveny kumulárních buněk. Na podložním sklíčku byly oocyty fixovány kyselinou octovou a ethanolem v poměru 1:3 po dobu 24h. Následně byly oocyty obarveny 1% orceinem a pod mikroskopem s fázovým kontrastem hodnoceny. Oocyty stadia GV obsahovaly kompaktní jadernou membránu. Oocyty s přítomností metafázního vřeténka byly označeny jako oocyty MI. Do stadia MII byly zařazeny oocyty s přítomností metafázního vřeténka a pólového tělíska. Oocyty byly do experimentu zařazeny pouze v případě, kdy alespoň 85% z kontrolní skupiny zrání dosáhlo požadované fáze.



Obrázek č. 4. Prasečí oocyty ve stadiu GV. Použito barvení Orcein, zvětšení 40x (Tereza Hrubcová, 2020)



Obrázek č. 6 Prasečí oocyt ve stadiu MI. Použito barvení Orcein, zvětšení 40x (Tereza Hrubcová, 2020)



Obrázek č. 5. Prasečí oocyt ve stadiu MII. Použito barvení Orcein, zvětšení 40x (Tereza Hrubcová, 2020)

4.4 Iminofluorescenční mikroskopie

Oocyty byly tenkostěnnou kapilárou vnášeny do 100 μ l kapky 0,5% BSA/PBS obsahující lektin konjugovaný s biotinem, vždy bylo použito 10 oocytů na 100 μ l. Pro experiment byly použity tři druhy lektinu – PSA, MAA a WGA. BSA/PBS s lektinem PSA byl naředěn v poměru 4 μ l PSA na 96 μ l BSA/PBS. Lektin MAA v poměru 2 μ l na 98 μ l BSA/PBS. 1 μ l WGA bylo naředěno s 99 μ l BSA/PBS. Oocyty byly inkubovány v roztoku po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Následně byly třikrát promyty v 0,5% BSA/PBS. Promyté oocyty byly přeneseny do 100 μ l kapky Ultra Avidin – Fluorescein (1 μ l/ 99 μ l BSA/PBS), kde byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 15 min. Po inkubaci byly 5x promyty v 0,5 % BSA/PBS a přeneseny na podložní sklíčko s 30 μ l DAPI. Kontrolní skupina pěti oocytů byla ošetřena stejně, pouze s rozdílem první inkubace, kdy nebyl přidán žádný lektin.

Tabulka č. 3 Schéma experimentálních skupin

Lektin	PSA	MAA	WGA
Koncentrace	4 μ l PSA/96 μ l BSA/PBS	2 μ l MAA/ 98 μ l BSA/PBS	1 μ l WGA/ 99 μ l BSA/PBS
Stadia zrání oocytů	GV MI MII	GV MI MII	GV MI MII

Tabulka č. 4 Lektiny - původ a specifita (Gaspar et al., 1999; Ravidá et al., 2016)

Lektin	Původ	Specifita
PSA	<i>Pisum sativum</i>	LacNAc, Man, GlcNAc
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	Neu5Ac α 2,3Gal
WGA	<i>Triticum vulgare</i>	GlcNAc, Neu5Ac

4.4.1 Vyhodnocení experimentu

Oocyty byly snímány pomocí laserového konfokálního mikroskopu (Zeiss LSM 800) pod zvětšením 400x. Pro všechny analyzované vzorky byla fluorescence FITC nastavena při vlnové délce 488 nm.

Pořízené snímky z konfokálního mikroskopu byly dále vyhodnoceny v programu pro analýzu obrazu (NIS Elements 2003). Na snímcích byla měřena denzita signálu FITC v oblasti zona pellucida oocyty. Výsledné hodnoty byly pomocí statistické metody jednofaktorová ANOVA zhodnoceny a uvedeny do tabulek.

5 Výsledky

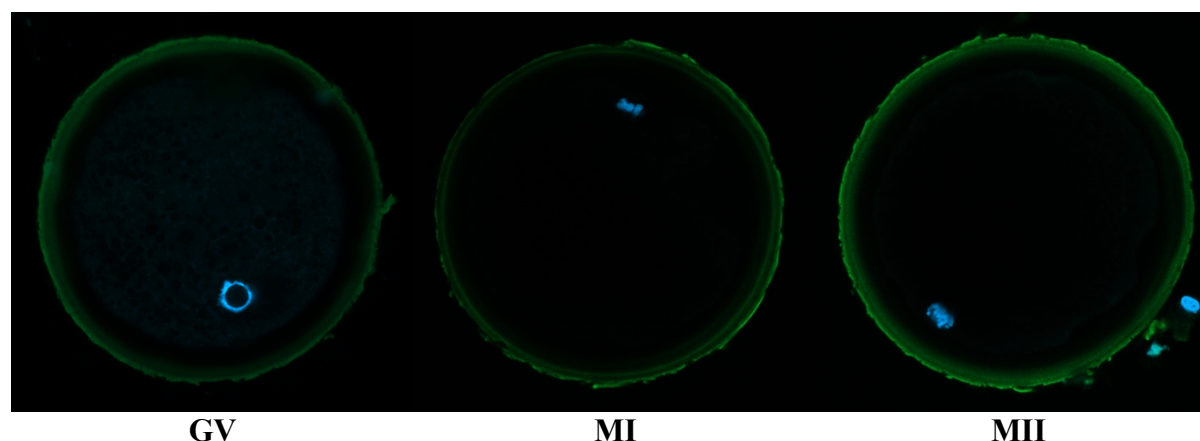
Cílem diplomové práce bylo sledování změn sacharidových struktur glykoproteinů *zona pellucida* pomocí biotinem konjugovaných lektinů (WGA, MAA, PSA). Oocyty byly sledovány ve třech vývojových stádiích – GV, MI a MII.

5.1 Imunofluorescenční mikroskopie sacharidových struktur

5.1.1 Detekce sacharidů ZP pomocí lektinu WGA

Fluorescenční signál byl zaznamenán u všech sledovaných stadií meiotického zrání v oblasti *zona pellucida*. Denzitometrickým měřením bylo zjištěno, že denzita signálu sacharidových struktur ZP se u jednotlivých stádií nemění (tabulka č. 3). Ve vztahu k oocytu ve stadiu zárodečného vajíčku (GV) nebyl mezi vývojovými stadii oocytů zaznamenán statisticky významný rozdíl v denzitě fluorescence ($P > 0,05$).

Obrázek č. 7 Lokalizace sacharidových struktur *zona pellucida* - Lektin WGA



Sacharidové struktury *zona pellucida* byly lokalizovány pomocí vazby biotinem značeným lektinem WGA na prasečích oocytech ve stadiu zárodečného vajíčku (GV), ve fázi MI a v metafázi druhého meiotického dělení (MII). Zeleně je označena *zona pellucida* lektinem WGA, modře je označen chromatin pomocí barviva DAPI. Oocyty byly snímány ve středové rovině při zvětšení 400x.

Tabulka č. 5 Relativní denzita fluorescence v různých stádiích meiotického zrání - WGA

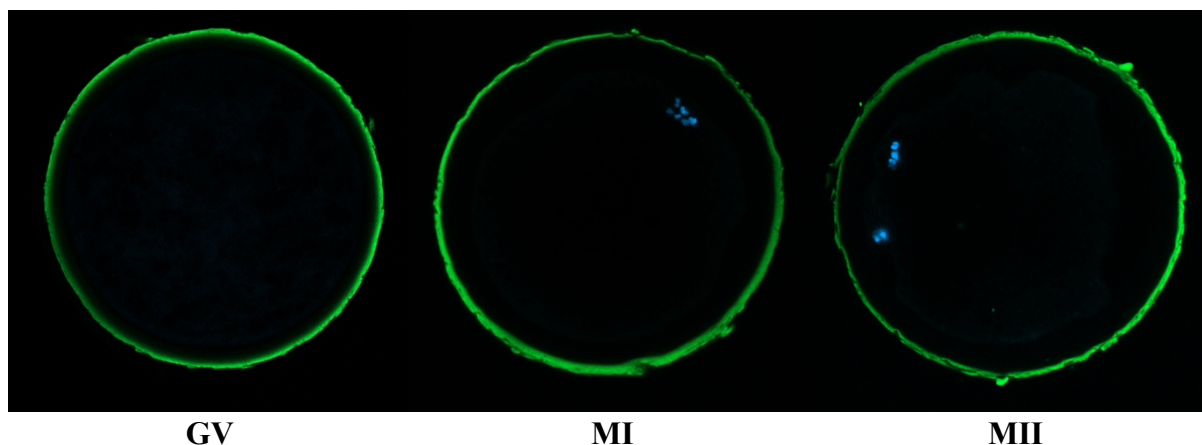
Lektin WGA	GV	MI	MII
Intenzita signálu FITC	$4,13 \pm 0,079$	$4,12 \pm 0,089$	$4,14 \pm 0,077$
N	8	15	9

GV = oocyty ve stadiu zárodečného vajíčku; MI = oocyty ve stadiu MI; MII = oocyty v metafázi druhého meiotického dělení. N = počet hodnocených oocytů. Data jsou znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka. Mezi jednotlivými skupinami oocytů nejsou statisticky významné rozdíly ($P > 0,05$).

5.1.2 Detekce sacharidů ZP pomocí lektinu MAA

U všech sledovaných stadií meiotického zrání byl zaznamenán fluorescenční signál v oblasti zona pellucida. Denzitometrickým měřením bylo zjištěno, že oocyty vykazují míru denzity signálu sacharidových struktur ZP bez rozdílu mezi stadii. Ve vztahu k oocytu GV nebyl mezi vývojovými stadii oocytů zaznamenán statisticky významný rozdíl v denzitě fluorescence ($P > 0,05$).

Obrázek č. 8 Lokalizace sacharidových struktur zona pellucida - Lektin MAA



Sacharidové struktury zona pellucida byly lokalizovány pomocí vazby biotinem značeným lektinem MAA na prasečích oocytech ve stadiu zárodečného váčku (GV), ve fázi MI a v metafázi druhého meiotického dělení (MII). Zeleně je označena zona pellucida lektinem MAA, modře je označen chromatin pomocí barviva DAPI. Oocyty byly snímány ve středové rovině při zvětšení 400x.

Tabulka č. 6 Relativní denzita fluorescence v různých stadiích meiotického zrání - MAA

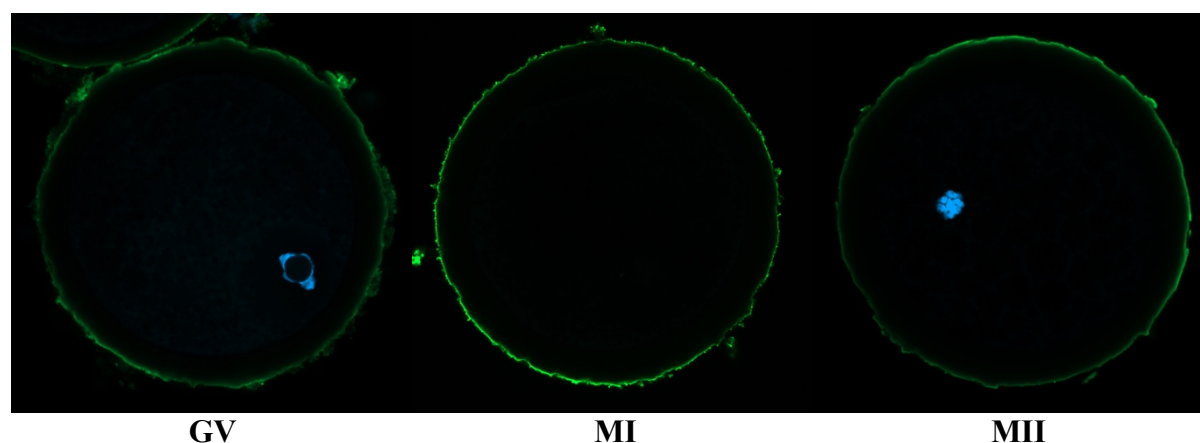
Lektin MAA	GV	MI	MII
Intenzita signálu FITC	$3,90 \pm 0,059$	$3,91 \pm 0,078$	$3,89 \pm 0,079$
N	8	15	9

GV = oocyty ve stadiu zárodečného váčku; MI = oocyty ve stadiu MI; MII = oocyty v metafázi druhého meiotického dělení. N = počet hodnocených oocytů. Data jsou znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka. Mezi jednotlivými skupinami oocytů nejsou statisticky významné rozdíly ($P > 0,05$).

5.1.3 Detekce sacharidů ZP pomocí lektinu PSA

Fluorescenční signál byl zaznamenán u všech sledovaných stadií meiotického zrání v oblasti zona pellucida. Denzitometrickým měřením bylo zjištěno, že oocyty ve stadiu zárodečného váčku (GV) vykazují nižší míru denzity, než oocyty ve stadiu MI a MII. Hodnota denzity se ve stadiu MI výrazně zvýšila a přetrvávala až do stadia MII, kde se nepatrně snížila. Ve vztahu k oocytu GV byl mezi vývojovými stadii oocytů zaznamenán statisticky významný rozdíl v denzitě fluorescence ($P < 0,05$).

Obrázek č. 9 Lokalizace sacharidových struktur zona pellucida - Lektin PSA



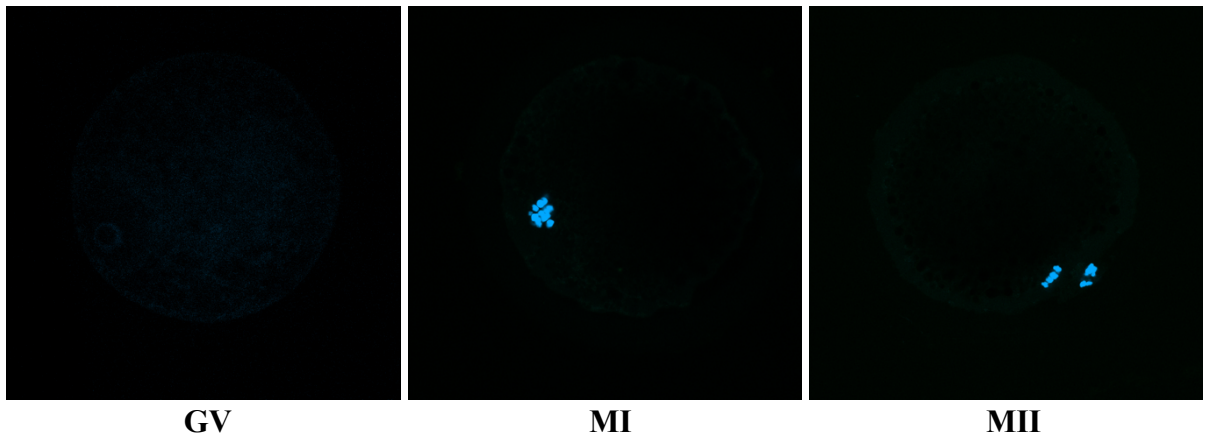
Sacharidové struktury zona pellucida byly lokalizovány pomocí vazby biotinem značeným lektinem PSA na prasečích oocytech ve stadiu zárodečného váčku (GV), ve fázi MI a v metafázi druhého meiotického dělení (MII). Zeleně je označena zona pellucida lektinem PSA, modře je označen chromatin pomocí barviva DAPI. Oocyty byly snímány ve středové rovině při zvětšení 400x.

Tabulka č. 7 Relativní denzita fluorescence v různých stadiích meiotického zrání - PSA

Lektin PSA	GV	MI	MII
Intenzita signálu FITC	$1,39 \pm 0,15$	$4,1 \pm 0,18$	$3,99 \pm 0,071$
N	14	8	9

GV = oocyty ve stadiu zárodečného váčku; MI = oocyty ve stadiu MI; MII = oocyty v metafázi druhého meiotického dělení. N = počet hodnocených oocytů. Data jsou znázorněna jako průměr \pm směrodatná odchylka. Ve vztahu oocytů GV se stadii MII a MII byly vyhodnoceny statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

Obrázek č. 8 Kontrola přítomnosti sacharidových struktur



Oocyty v kontrolní vzorku nebyly na rozdíl od oocytů v experimentálních skupinách inkubovány s konjugovaným lektinem, ale proběhla u nich pouze inkubace s Ultra Avidinem. GV = oocyt v zárodečném váčku, MI = oocyt ve stadiu MI, MII = oocyt ve stadiu druhého meiotického dělení. Modře je označen chromatin pomocí barviva DAPI. Oocyty byly snímány v rovině chromatinu při zvětšení 400x.

6 Diskuze

Sacharidové struktury glykoproteinů jsou významnou částí *zona pellucida*, a proto se tato práce zaměřuje na jejich změny během maturace prasečích oocytů. V našich experimentech byly pro imunodetekci sacharidových složek vybrány tři lektiny (WGA, MAA, PSA), které byly aplikovány na jednotlivá stadia meiotického zrání – oocyty ve fázi zárodečného váčku (GV), oocyty v MI fázi a v metafázi druhého meiotického dělení. Aby se docílilo stejných podmínek v detekci pro všechny dané lektiny, byly lektiny vždy aplikovány ve stejné koncentraci a počet oocytů v jednom vzorku se také neměnil.

Denzita signálu v porovnání mezi jednotlivými lektiny nebyla rozdílná, ale v intenzitě signálu lektinů patrné rozdíly byly. Nejvyšší intenzita signálu byla detekována po aplikaci lektinu WGA. Zjistili jsme, že signál FITC u lektinu WGA prostupuje i skrz povrch *zona pellucida* a nevyskytuje se pouze na jejím povrchu, dá se tedy předpokládat, že struktury značené WGA jsou v celé vrstvě *zona pellucida*, nejen v povrchové oblasti. Lektin WGA je specifický vůči strukturám obsahující N-acetylglukosamin a Neu5Ac. Přítomnost N – acetylglukosaminu v glykoproteinech ZP prasete byla prokázána v několika studiích. N – acetylglukosamin s fukosylovým zbytkem vytváří komplex s di- tri- a tetra-anténními N – glykany. Přibližně 75% glykanů tvoří sialylované jednotky a/nebo laktosaminové, nesoucí SO₃-6GlcNAc (N-acetyl-6-O-sulfo-D-glucosamine), tím přispívají ke kyselosti glykoproteinů (Rath et al., 2005). Sulfátová skupina je vždy navázaná pouze na C-6 zbytku GlcNAc (Töpfer – Petersen et al., 2008). Neu5Ac, který je také detekován lektinem WGA byl u skotu prokázán v sekvenci Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4) GlcNAc s účastí kyseliny sialové, ve vazbě spermie na ZP (Velasquez et al., 2007).

V experimentu oocyty označené lektinem MAA vykazovaly fluorescenční signál. Specifita lektinu MAA je zaměřená na sekvenci Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc. Denzita tohoto signálu byla na stejné úrovni jako u lektinu WGA, můžeme tedy dle našeho experimentu potvrdit, že sekvence Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4) GlcNAc se v *zona pellucida* prasete stejně jako u skotu nachází, nebo alespoň část z tohoto oligosacharidu.

Poslední lektin, který byl v experimentu používán, byl lektin PSA. V porovnání s výše uvedenými lektiny byl signál PSA nejslabší. Slabší signál by mohl být způsoben špatnou funkcí lektinu nebo se neprokázaný důsledek objevuje na straně značených struktur. Ve studii oocytů psa se detekovala vazba lektinů na struktury vyvíjejícího folikulu. Lektin PSA v tomto případě slabě označil granulózní buňky primárních folikulů, ale silně označil okolí granulózních buněk a zona pellucida sekundárních folikulů (Blackmore et al., 2004). Lidské oocyty také vykazovaly vazbu lektinu PSA v zona pellucida, kde byla detekována struktura manózy (Talevi et al., 1997). Dá se tedy předpokládat, že slabší signál není způsoben špatnou funkcí lektinu. Lektin PSA značí struktury obsahující N – Acetyllactosamin, manózu nebo N – acetylglukosamin, které se podle předchozích studií vyskytují ve velké míře ZP prase, nemůže být tedy signál slabý z důvodu malého množství těchto struktur. Heterogenita sacharidových struktur by mohla být důvodem slabého značení sacharidů. Prasečí ZP glykoproteiny jsou díky přítomnosti sialylovaného a/nebo sulfatovaného poly-N-acetyllaktosaminu vysoce heterogenní (Yonezawa et al., 1997).

Signál lektinu PSA jsme detekovali především na vnější části *zona pellucida*, tedy na jejím povrchu. Mezi hlavní neutrální N – glykany prasečích ZP glykoproteinů patří di-anténní

fukosylované glykany obsahující N – acetylaktosaminové řetězce, které se podílejí na rozpoznávání gamet (Tomova et al., 2021). N – vázané glykany obsahují zbytky fukózy, ale žádné řetězce manózy (Katsumata et al., 1996).

U vybraných lektinů jsme prokázali jejich vazbu na sacharidové struktury, a to u všech vývojových stadií, které jsme pozorovali. Denzita signálu se během zrání signifikantně neměnila, tedy struktury značené lektinem WGA se během meiotického zrání nemění. Rovněž lektin MAA jsme u oocytů prokázali. Intenzita signálu se u jednotlivých stadií meiotického zrání signifikantně neměnila, můžeme ale potvrdit, že sekvence Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc, kterou tento lektin specifikuje se na ZP prasete nachází. Lektin PSA jediný vykazoval rozdílnou denzitu mezi stadiem GV ke stadiu MI a MII. Denzita ve stadiu zárodečného vajíčka (GV) byla slabá a poté se signifikantně zvýšila u oocytů ve stadiu MI a zůstala konstantní až do stadia MII, což by mohlo znamenat, že některé struktury značené tímto lektinem se během zrání mění. Otázkou zůstává o jakou strukturu se jedná. Řetězce s vysokým obsahem manózy se vyskytují pouze na ZP2 prasat, Takahashi et al. (2013) zkoumali, zda se distribuce ZP2 po zrání změnila a ukázalo se, že po maturaci se nezměnila ani intenzita fluorescence, ani distribuce ZP2. Můžeme tedy předpokládat, že struktura, která v našem experimentu mění denzitu signálu PSA není manóza. Mohlo by se jednat o sekvence obsahující N – acetylglukosamin, jelikož jeho výskyt v ZP prasete je vysoký a mohl by denzitu signálu svými změnami ovlivnit.

Podobně se Takahashi se svým týmem (2013) věnovali studii zabývající se stejným problémem jako v našem experimentu. Zkoumali lokalizaci sacharidových řetězců na glykoproteinech ZP nezralých a zralých oocytů prasete, pomocí biotinem konjugovaných lektinů. Pro detekci sacharidových struktur zvolili odlišný výběr lektinů – WGA, RCA a AAL.

V případě lektinu WGA, který byl součástí i našeho experimentu, prokázali stejný výsledek, u nezralých oocytů detekovali stejný signál jako u maturovaných oocytů, struktury značené lektinem WGA se tedy nemění. Po označení prasečí ZP lektiny RCA a ALL došlo k pozitivnímu zbarvení u nezralých i zralých oocytů, bez progresu signálu. Slabé zbarvení nastalo po kombinaci lektinů SSA/MAM u nezralých oocytů. Signál po zrání zesílil, což poukazuje na zvýšení sialylace během zrání. Předchozí studie potvrdily, že zrání zahrnuje zvýšení kyselosti ZP glykoproteinů. Výsledky experimentu Takahashi et al. (2013) ukazují, že β – Gal; α – Man; β – GlcNAc a kyselina sialová jsou přítomny na neredukujících koncích prasečích glykoproteinů ZP. Jejich výskyt byl prokázán jak u nezralých, tak u zralých oocytů, bez rozdílu během zrání.

Z výše uvedených výsledků lze dospět k závěru, že vazba mezi lektiny a sacharidovými strukturami byla prokázána. Povaha lektinů dokazuje, že pro detekci struktur využívaných ve výzkumu je velice vhodná.

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda sacharidové struktury glykoproteinů zona pellucida se budou během zrání oocyty měnit. Sledování změn bylo zkoumáno pomocí vybraných lektinů. Experiment byl vyhodnocen pomocí laserového konfokálního mikroskopu na základě denzity fluorescence jednotlivých stadií zrání oocytů. Získané snímky byly následně hodnoceny pomocí programu analýzy obrazu NIS Elements.

Detekce sacharidových složek zona pellucida byla pomocí konfokálního mikroskopu potvrzena. Rozdíly mezi jednotlivými lektiny v denzitě signálu potvrzené nebyly. U lektinů WGA a MAA se změna sacharidových struktur během maturace nepotvrdila. Hodnota denzity se mezi jednotlivými stadii meiotického zrání neměnila a v porovnání lektinů mezi sebou byla také srovnatelná. Pouze lektin PSA vykazoval rozdíl v denzitě mezi stadiem oocytů v zárodečném vajíčku a oocyty ve fázi MI a MII.

Na základě výsledků se zdá, že sacharidové struktury se během maturace nemění.

8 Literatura

- Alberio, R., Zakhartchenko, V., Motlik, J., Wolf, E. 2001. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *The International Journal of Developmental Biology*. 45. 797-809.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1998. *Základy Buněčné Biologie*. Espero Publishing. Ústí Nad Labem.
- Bedford JM. Puzzles of mammalian fertilization--and beyond. *Int J Dev Biol*. 2008;52(5-6):415-26.
- Benoff, S. (1997). Carbohydrates and fertilization: an overview. *Molecular Human Reproduction*, 3(7), 599–637.
- Bielanska-Osuchowska Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology*. 6. 161 – 193.
- Black, J. L., & Erickson, B. H. (1968). Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record*, 161(1), 45–55.
- Blackmore, D. G., Baillie, L. R., Holt, J. E., Dierkx, L., Aitken, R. J., & McLaughlin, E. A. (2004). Biosynthesis of the Canine Zona Pellucida Requires the Integrated Participation of Both Oocytes and Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*, 71(2), 661–668.
- Braw-Tal R., 2002: The initiation of follicle growth: The oocyte or the somatic cells? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187 (1–2): 11–18.
- Brevini T.A.L., Cillo F., Antonini S. & Gandolfi F., 2007: Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Animal Reproduction Science*, 98 (1–2): 23–38.
- Cetica P. D., Pintos L. N., Dalvit G. C., Beconi M. T. 2001. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress on bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life*. 51. 57–64.
- Coy P., Grullon L., Canovas S., Romar R., Matas C. & Aviles M., 2008a: Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction*, 135 (1): 19–27.
- Development. *Molecular And Cellular Endocrinology* 145: 27–37.
- Dunbar, B. S., Timmons, T. M., Skinner, S. M., & Prasad, S. V. (2001). Molecular Analysis of a Carbohydrate Antigen Involved in the Structure and Function of Zona Pellucida Glycoproteins. *Biology of Reproduction*, 65(3), 951–960.
- Ellederova Z, Halada P, Man P, Kubelka M, Motlik J, Kovarova H. 2004. Protein Patterns Of Pig Oocytes During In Vitro Maturation. *Biology Of Reproduction*. 71: 1533-39.
- Eppig Jj. 2001. Oocyte Control Of Ovarian Follicular Development And Function In Mammals. *Reproduction* 122: 829–838.

Fair T., 2003: Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, 78 (3–4): 203–216

Familiari G, Relucenti M, Heyn R, Micara G, Correr S (2006) Three- dimensional structure of the zona pellucida at ovulation. *Microsc Res Tech* 69:415–426

Ferreira Em, Vireque Aa, Adona Pr, Meirelles Fv, Ferriani Ra, Navarro Pa. 2009. Cytoplasmic Maturation Of Bovine Oocytes: Structural And Biochemical Modifications And Acquisition Of Developmental Competence. *Theriogenolog* 71 (5): 836–48.

Fortune, J. E. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 78 (3-4). 135-163.

Fulka J Jr, First Nl, Moor Rm. 1998. Nuclear And Cytoplasmic Determinants Involved. In *The Regulation Of Mammalian Oocyte Maturation*. *Molecular Human Reproduction* 4: 41-49.

Gaspar, Ignacio & Blázquez, Maria & Fraile, Benito & Paniagua, Ricardo & Arenas, MI. (1999). The hatching gland cells of trout embryos: characterisation of N- and O-linked oligosaccharides. *Journal of Anatomy*. 194. 109-118.

Geyer, H., and R. Geyer, 1998: Strategies for glycoconjugate analysis. *Acta Anat*. 161, 135±148.

Gosden R.G., 2002: Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 186 (2): 149–15

Gosden Rg, Bownes M. 1995. *Cellular And Molecular Aspects Of Oocyte Development, Gametes-The Oocyte*. Cambridge University Press. Cambridge.

Gupta, S. K., Bhandari, B., Shrestha, A., Biswal, B. K., Palaniappan, C., Malhotra, S. S., & Gupta, N. (2012). Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell and Tissue Research*, 349(3), 665–678.

Harris, J. D., D. W. Hibler, G. K. Fonteno, K. T. Hsu, E. C. Yurewicz, and A. G. Sacco, 1994: Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq*. 4, 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.

Hendrickson, O. D., & Zherdev, A. V. (2018). Analytical Application of Lectins. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 48(4), 279–292.

Heytens, E., Soleimani, R., De Sutter, P. 2008. Oocyte activation: The impact of calcium signals on fertilization. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 6 (4). 171-174

Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2001). Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology*, 11(2), 1R–10R.

- Hunter M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5 (2). 122 – 130.
- Cha K. Y., Chian R. C. 1998. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Human Reproduction Update*. 4.103-20.
- Chandra, N. R., Kumar, N., Jeyakani, J., Singh, D. D., Gowda, S. B., & Prathima, M. N. (2006). Lectindb: a plant lectin database. *Glycobiology*, 16(10), 938–946.
- Itakura, Y., Nakamura-Tsuruta, S., Kominami, J., Tateno, H., & Hirabayashi, J. (2017). Sugar-Binding Profiles of Chitin-Binding Lectins from the Hevein Family: A Comprehensive Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1160. doi:10.3390/ijms18061160
- Jeřeta M., Knitlová D. & Machatková M., 2012: Polyspermický blok během in vitro fertilizace prasat. *Veterinářství*, 62 (9): 575–577.
- Kanagawa H., Ocampo M. B., Ocampo L. T. C. 1991. Timing of sequential changes in chromosome configurations during the 1st meiotic division of pig oocytes cultured in vitro. *Japanese Journal of Veterinary research*.127 – 137.
- Khan, F., Khan, M.I., 2011. Fungal lectins: current molecular and biochemical perspectives. *Int. J. Biol. Chem.* 5 (1), 20.
- Kilpatrick, D. (2002). Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1572(2-3), 187–197.
- Kubiřta V. 1998. *Buněčné Základy Životních Dějů*, Scientia, Spol S R. O., Pedagogické Nakladatelství.
- Kumar, Kk., Reddy, Gs., Reddy, B., Shekar, Pc., Sumanthi, J., & Chandra, Kl. P. (2012). Biological role of lectins: A review. *Journal of Orofacial Sciences*, 4(1), 20.
- Lawrence T. S., Dekel N., Beers W.H. 1980. Binding of human chorionic gonadotropin by rat cumuli oophori and granulosa cells: A comparative study. *Endocrinology*. 106. 1114-1118.
- Lefievre, L., Conner, S. J., Salpekar, A., Olufowobi, O., Ashton, P., Pavlovic, B., Lenton, W., Afnan, M., Brewis, I. A., Monk, M., Hughes, D. C., and Barratt, C. L. R. (2004) *Human Reprod.* 19, 1580 –1586
- Lucas X., Martínez E. A., Roca J., Vázquez J. M., Gil M. A., Pastor L. M., Alabart J. L.: Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology* 58, 871 – 885, 2002
- Luciano A.M., Lodde V., Franciosi F., Tessaro I., Corbani D. & Modina S., 2012: Large-scale chromatin morpho-functional changes during mammalian oocyte growth and differentiation. *European Journal of Histochemistry*, 56 (3): e37.
- Manning, J. C., Romero, A., Habermann, F. A., García Caballero, G., Kaltner, H., & Gabius, H.-J. (2016). Lectins: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochemistry and Cell Biology*, 147(2), 199–222.

McGee Ea, Hsueh Ajw. 2000. Initial And Cyclic Recruitment Of Ovarian Follicles. *Endocrine Reviews* 21: 200–214.

Michelmann H.W., Rath D., Töpfer-Petersen E. & Schwartz P., 2007: Structural and functional events on the porcine zona pellucida during maturation, fertilization and embryonic development: A scanning electron microscopy analysis. *Reproduction in Domestic Animals*, 42 (6): 594–602.

Michelmann H.W., Rath D., Töpfer-Petersen E. & Schwartz P., 2007: Structural and functional events on the porcine zona pellucida during maturation, fertilization and embryonic development: A scanning electron microscopy analysis. *Reproduction in Domestic Animals*, 42 (6): 594–602.

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

Mitra J, Schultz Rm. 1996. Regulation Of The Acquisition Of Meiotic Competence In The Mouse: Changes In The Subcellular Localization Of Cdc2, Cyclin B1, Cdc25c And Wee1, And In The Concentration Of These Proteins And Their Transcripts. *Journal Of Cell Science* 109: 2407-15.

Miyano T., 2003: Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. *Theriogenology*, 59 (1): 61–72.

Miyano T., 2005: In vitro growth of mammalian oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 51 (2): 169–176

Moricard R. a Moricard F. 1975. Espace périvitellin et réactions microvillositaires au cours de l'achèvement de la méiose et de la fécondation chez les Mammifères; orientation de recherches humanies. In: *La fécondation*. Thibult C., Collage Sociale Naturelle Etude Sterilite. Paris. 37-48.

Motlík J, Fulka J. 1976. Breakdown Of Germinal Vesicle In Pig Oocytes In Vivo And In Vitro. *Journal Of Experimental Zoology* **198**: 155–162.

Motlík J., Crozet N., Fulka J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction & Fertility*. 72. 323 – 328

Nakano, M., & Yonezawa, N. (2000). Localization of Sperm Ligand Carbohydrate Chains in Pig Zona pellucida Glycoproteins. *Cells Tissues Organs*, 168(1-2), 65–75.

Nizet, V., Varki, A., Aebi, M., 2017. Microbial lectins: hemagglutinins, adhesins, and toxins. In: *Essentials of Glycobiology* [Internet], third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Noguchi, S., Y. Hatanaka, and T. Tobita, 1992: Structural analysis of the N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (pZP3) from porcine zona pellucida. *Eur. J. Biochem.* 209, 1089±1100.

- Pastor, L. M., Lucas, X., Pallares, J., Bernal-Mañas, C. M., A. Martinez, E., Roca, J., ... 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.
- Pecka Miroslav. *Základy imunohematologie a transfuziologie*. 1 vyd. Hradec Králové: Střední zdravotnická škola a Vyšší zdravotnická škola Hradec Králové, 2005. 139s. ISBN 80-903414-4-6
- Picton H, Briggs D, Gosden R. 1998. The Molecular Basis Of Oocyte Growth And Prasad, S. V., Skinner, S. M., Carino, C., Wang, N., Cartwright, J., & Dunbar, B. S. (2000). Structure and Function of the Proteins of the Mammalian Zona pellucida. *Cells Tissues Organs*, 166(2), 148–164.
- Rankin T. & Dean J., 2000: The zona pellucida: Using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Reviews of Reproduction*, 5 (2): 114–121.
- Rankin, T. (2000). The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Reviews of Reproduction*, 5(2), 114–121.
- Rath D., Töpfer-Petersen E., Michelmann H.W., Schwartz P. & Ebeling S., 2005: Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology*, 63 (2): 352–362.
- Rath, D., Töpfer-Petersen, E., Michelmann, H.-W., Schwartz, P., & Ebeling, S. (2005). Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology*, 63(2), 352–362.
- Ravidà, A., Cwiklinski, K., Aldridge, A. M., Clarke, P., Thompson, R., Gerlach, J. Q., ... O'Neill, S. M. (2016). Fasciola hepatica Surface Tegument: Glycoproteins at the Interface of Parasite and Host. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(10), 3139–3153.
- Raz, T., Shalgi, R. 1998. Early events in mammalian egg activation. *Human Reproduction*. 13 (4). 133-145
- Rocca JD. Lectins as Next Generation Mucoadhesives for specific targeting of the gastrointestinal tract. *Gastrointest Target Drug Develop* 2004;4:12-9.
- Romar R., Coy P. & Rath D., 2012: Maturation conditions and boar affect timing of cortical reaction in porcine oocytes. *Theriogenology*, 78 (5): 1 126–1 139.
- Sacco** AG, Yurewicz EC, Subramanian MG. Carbohydrate influences the immunogenic and antigenic characteristics of the ZP3 macromolecule (Mr 55000) of the pig zona pellucida. *J Reprod Fertil* 1986; 76:575–86.
- Sacco, A. G., E. C. Yurewicz, M. G. Subramanian, and P. D. Matzat, 1989: Porcine zona pellucida: association of sperm receptor activity with a glycoprotein component of the Mr 55,000 family. *Biol. Reprod.* 41, 523±532.

- Sánchez, F., & Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(12), 1896–1912.
- Sano, K., & Ogawa, H. (2014). Hemagglutination (inhibition) assay. *Methods Mol Biol*, 1200, 47-52.
- Shalgi, R., and T. Raz, 1997: The role of carbohydrate residues in mammalian fertilization. *Histol. Histopathol* 12, 813±822.
- Shalgi, R., R. Maymon, and B. Bar-Shira, 1991: Distribution of lectin receptor sites in the zona pellucida of follicular and ovulated oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 29, 365±372.
- Shimizu, S., Tsuji, M. and Dean, J. (1983) In vitro biosynthesis of three sulfated glycoproteins of murine zonae pellucidae by oocytes grown in follicle culture. *J. Biol. Chem.*, 258, 5858–5863.
- Singh, R. S., Thakur, S. R., & Bansal, P. (2013). Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(1), 77–88.
- Sinowatz, F., Topfer-Petersen, E., Kolle, S., & Palma, G. (2001). Functional Morphology of the Zona Pellucida. *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C*, 30(5), 257–263.
- Stojkovic M., Motlik J., Kölle S., Zakhartchenko V., Alberio R., Sinowatz F., Wolf E. 1999. Cell-cycle control and oocyte maturation: Review of literature. *Reproduction of Domestic Animal*. 34. 335 –342.
- Sun Q.Y., 2003: Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microscopy Research and Technique*, 61 (4): 342–348.
- Sun, Q. Y., Nagai, T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development*. 45 (5). 347-359.
- Takahashi, K., Kikuchi, K., Uchida, Y., Kanai-Kitayama, S., Suzuki, R., Sato, R., ... 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.
- Talevi, R., Gualtieri, R., Tartaglione, G., & Fortunato, A. (1997). Heterogeneity of the zona pellucida carbohydrate distribution in human oocytes failing to fertilize in vitro. *Human Reproduction*, 12(12), 2773–2780.
- Thibault C, Szollosi D, Gerard M. 1987. Mammalian Oocyte Maturation. *Reprod Nutr Dev* 27: 865–896.
- Töpfer-Petersen E., Ekhlesi-Hundrieser M. & Tsoleva M., 2008: Glycobiology of fertilization in the pig. *The International Journal of Developmental Biology*, 52 (5–6): 717–736.

- Tpfer-Petersen, E., Ekhlasi-Hundrieser, M., & Tsoleva, M. (2008). Glycobiology of fertilization in the pig. *The International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 717–736.
- Tsai P.S., Van Haeften T. & Gadella B.M., 2011: Preparation of the cortical reaction: Maturation-dependent migration of SNARE proteins, clathrin, and complexin to the porcine oocyte's surface blocks membrane traffic until fertilization. *Biology of Reproduction*, 84 (2): 327–335.
- Tumova L, Zigo M, Sutovsky P, Sedmikova M, Postlerova P. Ligands and Receptors Involved in the Sperm-Zona Pellucida Interactions in Mammals. *Cells*. 2021 Jan 12;10(1):133.
- Van Blerkom J, Bell H. 1986. Regulation Of Development In The Fully Grown Mouse Oocyte: Chromosome-Mediated Temporal And Spatial Differentiation Of The Cytoplasm And Plasma Membrane. *J Embryol Exp Morphol* **93**: 213-38.
- Van Den Hurk R. & Zhao J., 2005: Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63 (6): 1 717–1 751.
- Van den Hurk R., Abir R., Telfer E. E., Bevers M. M. 2000. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Human Reproduction* 6. 457–74.
- Velásquez J.G., Canovas S., Barajas P., Marcos J., Jiménez-Movilla M., Gallego R.G., Ballesta J., Avilés M., Coy P. Role of sialic acid in bovine sperm-zona pellucida binding. *Mol. Reprod. Dev.* 2007;74:617–628.
- Wang W.H., Sun Q.Y., Hosoe M., Shioya Y. & Day B.N., 1997: Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biology of Reproduction*, 56 (6): 1 376–1 382.
- 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. 79- 114.
- Wassarman Pm, Fujiwara K. 1978. Immunofluorescent Anti-Tubulin Staining Of Spindles During Meiotic Maturation Of Mouse Oocytes In Vitro. *Journal Of Cellular Science* **29**: 175–183.
- Wassarman Pm. 1988. The Mammalian Ovum In: *The Physiology Of Reproduction*. Eds. Knobil E. A Neill J., Raven Press Ltd., New York. 69–102
- Wassarman, P. M., Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Darie, C., & Litscher, E. S. (2005). Recent aspects of mammalian fertilization research. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 234(1-2), 95–103. doi:10.1016/j.mce.2004.08.017
- Wehrend A., Meinecke B. 2001. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. *Animal Reproduction Science*. 66. 175-184.

White, K., L., Pate, B., J., Sessions, B., R., 2010. Oolemma receptors and oocyte activation. *Systems Biology In Reproductive Medicine*. 56. 365-375.

Yeste M (2013b) Boar spermatozoa within the oviductal environment (II): sperm capacitation. In: Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M (eds) *Boar reproduction: fundamentals and new biotechnological trends*. Springer, Berlin, pp 281–342

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.

Yurewicz E.C., Sacco A.G., Gupta S.K., Xu N.X. & Gage D.A., 1998: Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (13): 7 488–7 494.

Yurewicz, E. C., B. A. Pack, B. A., and A. G. Sacco, 1992: Porcine oocyte zona pellucida Mr 55,000 glycoproteins: identification of O-glycosylated domains. *Mol. Reprod. Dev.* 33, 182±188.