

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Detekce vybraných CD molekul v savčích spermiích

Diplomová práce

**Autor práce: Bc. Daniela Spěváková
Obor studia: Reprodukční biotechnologie**

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

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Detekce vybraných CD molekul v savčích spermích" 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 14.4.2022

Poděkování

Mé poděkování patří především RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D za odborné vedení této diplomové práce a také za ochotu, trpělivost a cenné rady, které mi věnovala. Děkuji také mé rodině za neutuchající podporu během celého studia.

Detekce vybraných CD molekul v savčích spermích

Souhrn

CD molekuly jsou antigeny přítomné v buněčných membránách imunitního systému, nicméně byly detekovány i na tkáních a buňkách reprodukčního traktu, a to včetně gamet, kde se mohou účastnit událostí vedoucích k jejich fúzi. Předkládaná práce je zaměřena na dvě CD molekuly patřící do rodiny proteinů regulujících komplement – CD46 a CD52. U proteinu CD46 se předpokládá jeho role při fúzi gamet, případně by mohl mít důležitou funkci při stabilizaci akrozomu. Protein CD52 je označován jako antigen asociovaný s maturací spermie.

Prvním cílem této diplomové práce byla lokalizace proteinů CD46 a CD52 v kančích a býčích spermích a detekce těchto proteinů v reprodukčních orgánech kance a ve spermích obou druhů pomocí imunofluorescenčních a imunodetekčních metod. Dalším cílem bylo sledování exprese genů pro uvedené proteiny v testikulární a epididymální tkáni kance. Data byla statisticky vyhodnocena metodou ANOVA.

Protein CD46 jsme pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie lokalizovali na vnější akrozomální membráně býčí i kančí spermie. Na spermii po akrozomální reakci byl signál negativní. Dále byla přítomnost CD46 potvrzena imunodetekcí v proteinovém extraktu (47 kDa) z ejakulovaných a kapacitovaných spermích, přičemž signifikantně vyšší množství proteinu jsme detekovali v kapacitovaných spermích. Exprese genu pro protein CD46 v kančích reprodukčních orgánech byla pozitivní v *testes*, *corpus* a *cauda epididymis*, kdy signifikantně nejvyšší relativní expresi genu *CD46* jsme pozorovali v *testes*.

Protein CD52 jsme lokalizovali na celé hlavičce kančí spermie se silnějším signálem v akrozomu a v ekvatoriálním segmentu. Ve spermii býka jsme protein lokalizovali v oblasti akrozomu. V proteinovém extraktu z kančích ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných spermích jsme imunodetkovali čtyři izoformy s molekulovou hmotností 17, 19, 21, 24 kDa. Imunodetekce byla provedena i pro extrakty proteinů získaných metodou frakcionace membrán kančích spermích. Detekovali jsme 19, 21 a 24kDa izoformu proteinu ve frakci plazmatické membrány, ale i ve frakci vnější a vnitřní akrozomální membrány, kde byl signál slabší. Imunodetekce proteinu CD52 v kančích reprodukčních orgánech byla pozitivní pouze pro *cauda epididymis*, kde jsme detekovali pět izoform o molekulové hmotnosti 17, 19, 21, 24 a 26 kDa. Expresi genu *CD52* jsme detekovali ve všech částech *epididymis* a *testes* kance, přičemž signifikantně nejvyšší relativní genová exprese byla nalezena v *cauda epididymis*.

Z dosažených výsledků vyplývá, že protein CD46 je ve spermii kance i býka pravděpodobně lokalizován na vnější akrozomální membráně. Expresi tohoto proteinu jsme nedetkovali ve spermích po akrozomální reakci. Naše výsledky studia proteinu CD52 naznačují, že tento protein by mohl být transferován na plazmatickou membránu kančí spermie během epididymální maturace. Nicméně pro detailnější analýzu fyziologické funkce vybraných CD molekul je třeba práci doplnit o další experimenty.

Klíčová slova: CD46, CD52, epididymis, testes, genová exprese, kanec, býk, akrozomální reakce

Detection of selected CD molecules in mammalian spermatozoa

Summary

CD molecules are antigens in the cell membranes of the immune system. However, they have also been detected on tissues and cells of the reproductive tract, including gametes, where they may participate in events leading to their fusion. The thesis presented is focused on two CD molecules belonging to the family of complement regulating proteins - CD46 and CD52. The CD46 is thought to play a role in gamete fusion or it might play an important role in the stabilization of acrosome. The CD52 is also known as maturation-associated sperm antigen.

The first aim of this diploma thesis was the localization of CD46 and CD52 proteins in boar and bull sperm and the detection of these proteins in the boar reproductive organs and the sperm of both species using immunofluorescence and immunodetection methods. Another aim was to observe the gene expression of these proteins in the testicular and epididymal tissue of the boar. The data were statistically evaluated by ANOVA.

We localized the CD46 on the outer acrosomal membrane of bovine and boar sperm using indirect immunofluorescence microscopy. The signal was negative for sperm after the acrosomal reaction. Furthermore, the presence of CD46 was confirmed by immunodetection in a protein extract (47 kDa) from ejaculated and capacitated sperm with significantly higher amounts of protein in capacitated sperm. In boar reproductive organs expression of the CD46 gene was positive in testes, corpus, and cauda epididymis with significantly highest relative gene expression in testes.

We localized the CD52 on the entire boar sperm head with a stronger signal in the acrosome region and the equatorial segment. In bull sperm, we localized the protein in the acrosome region. In a protein extract from ejaculated, capacitated, and acrosome-reacted sperm of boar, we immunodetected four isoforms with a molecular weight of 17, 19, 21, 24 kDa. Immunodetection was also performed for protein extracts obtained by isolation of sperm plasma and acrosomal membranes. We detected the 19, 21, and 24 kDa isoforms in the plasma membrane fraction and also in the outer and inner acrosomal membrane fractions, where the signal was weaker. Immunodetection of CD52 in boar reproductive organs was positive only for cauda epididymis, where we found five isoforms with molecular weights of 17, 19, 21, 24, and 26 kDa. CD52 gene expression was found in all segments of the boar epididymis and testes. Significantly highest relative gene expression was detected in the cauda epididymis.

The results show that the CD46 protein is probably localized on the outer acrosomal membrane in boar sperm. We did not detect the expression of this protein in sperm after the acrosome reaction. Our results of the CD52 study suggest that this protein could be transferred to the plasma membrane of boar sperm during epididymal maturation. However,

for a more detailed analysis of the physiological function of selected CD molecules, it is necessary to supplement the work with further experiments.

Keywords: CD46, CD52, epididymis, testes, gene expression, boar, bull, acrosome reaction

Obsah

1	Úvod	10
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	11
3	Literární rešerše	12
3.1	CD molekuly v reprodukci	12
3.2	Události vedoucí k fúzi gamet	12
3.2.1	Kapacitace	13
3.2.2	Akrozomální reakce.....	13
3.2.3	Molekuly účastníci se vazby na ZP	13
3.2.4	Fúze gamet	14
3.3	Tetraspaniny	15
3.3.1	Molekula CD63	18
3.3.2	Molekula CD9	19
3.3.3	Molekula CD81	21
3.3.4	Molekula CD151	22
3.4	Integriny	22
3.4.1	Molekula CD29	23
3.4.2	Molekula CD44	24
3.5	Proteiny regulující komplement	25
3.5.1	Molekula CD55	26
3.5.2	Molekula CD59	27
3.5.3	Molekula CD46	27
3.5.4	Molekula CD52	30
4	Metodika	32
4.1	Zpracování biologického materiálu	32
4.1.1	Rozmražení spermií.....	32
4.1.2	Ejakulované spermie	32
4.1.3	<i>In vitro</i> kapacitace spermií	33
4.1.4	Akrozomální reakce spermií.....	33
4.1.5	Fracionace membrán spermií.....	33
4.1.6	Příprava tkání.....	35
4.1.7	Izolace RNA z tkáně.....	36
4.2	Použité protilátky pro imunodetekční metody (imunodetekce, nepřímá imunofluorescenční mikroskopie)	37
4.3	Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie	37
4.3.1	Lokalizace proteinů ve spermiích fixovaných na mikroskopickém sklíčku....	37
4.3.2	Lokalizace proteinů ve spermiích v suspenzi s následnou fixací na sklíčko ...	38
4.4	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)	39
4.4.1	Příprava vzorků pro SDS-PAGE	39
4.4.2	SDS-PAGE.....	39
4.5	Western blot (elektropřenos)	40
4.6	Imunodetekce proteinů	41
4.7	Kvantitativní PCR	41
4.7.1	Reverzní transkripce	41
4.7.2	Kvantitativní PCR (qPCR)	42
4.7.3	Statistické vyhodnocení dat	44
5	Výsledky	45
5.1	Protein CD46	45
5.1.1	Lokalizace proteinu CD46 ve spermiích	45
5.1.2	Detekce proteinu CD46 v extraktech spermií.....	50
5.1.3	Detekce proteinu CD46 v <i>testes</i> a <i>epididymis</i>	53
5.1.4	Expresce genu pro protein CD46 v <i>testes</i> a <i>epididymis</i>	54
5.2	Protein CD52	56

5.2.1	Lokalizace proteinu CD52 ve spermích.....	56
5.2.2	Detekce proteinu CD52 v extraktech spermii.....	59
5.2.3	Detekce proteinu CD52 v <i>testes</i> a <i>epididymis</i>	61
5.2.4	Exprese genu pro protein CD52 v <i>testes</i> a <i>epididymis</i>	62
6	Diskuze.....	63
7	Závěr.....	70
8	Literatura.....	71
9	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	85

1 Úvod

Fertilizace je složitý proces, kterého se účastní mnoho molekul, jejichž přesná úloha nebyla zatím vždy zcela vysvětlena. CD molekuly jsou antigeny, které se vyskytují v buněčné membráně během určité fáze vývoje buněk. Třebaže se CD molekuly vyskytují převážně na buňkách imunitního systému, některé jsou exprimovány i na tkáních a buňkách reprodukčního systému (Jankovičová et al. 2008; Fábryová & Simon 2009). Jedná se především o molekuly řadící se do skupin tetraspaninů, integrinů a komplement regulujících proteinů. Funkce těchto molekul bývá spojována s fúzí gamet, ale u většiny nebyla jejich přesná role dosud specifikována. Vyřazení myšího genu pro daný protein často vede k subfertilitě či úplné infertilitě u tohoto modelu. Příkladem mohou být tetraspaniny CD9 (Kaji et al. 2000) a CD81 (Rubinstein et al. 2006) a také protein regulující komplement CD59 (Qin et al. 2003).

Komplement je součástí vnitřního imunitního systému jedince a hraje důležitou roli v obraně organismu před cizími mikroorganismy. Působení komplementu je regulováno komplement regulujícími proteiny, mezi které patří i molekuly CD46 a CD52, které jsou předmětem studia této diplomové práce. Protein CD46, kterému byla věnována poměrně velká pozornost i v rámci reprodukce, je lokalizován na vnitřní akrozomální membráně spermie (Riley et al. 2002). Několik studií popisuje jeho funkci ve stabilitě akrozomu (Inoue et al. 2003, Frolíková et al. 2016). Protein CD52 má odlišnou lokalizaci, ve spermii je detekovatelný na plazmatické membráně, na kterou je transferován během epididymální maturace, proto je považován za antigen asociovaný s maturací spermie (Kirchhoff 1996).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Na základě odborné literatury byly pro tuto diplomovou práci stanoveny dvě hypotézy:

H1: Protein CD46 je lokalizován na vnitřní akrozomální membráně spermie;

H2: Protein CD52 je transferován na plazmatickou membránu spermie během epididymální maturace.

Cíle práce:

- 1) Lokalizace proteinů CD46 a CD52 v kančích a býčích spermích a detekce těchto proteinů v reprodukčních orgánech kance a ve spermích kance a býka.
- 2) Stanovení exprese genů pro proteiny CD46 a CD52 v testikulární a epididymální tkáni kance.

3 Literární rešerše

3.1 CD molekuly v reprodukci

Zkratka CD označuje „cluster of differentiation“. Tento názvoslovný systém vznikl za účelem nastolení pořádku v chaosu, který panoval na počátku osmdesátých let minulého století. Imunologové vytvořili spoustu monoklonálních protilátek reagujících s povrchovými molekulami leukocytů, ale s různou nomenklaturou. Vzhledem k absenci komparativních studií bylo často nemožné říct, zda je určitá molekula rozpoznávána více než jednou protilátkou (Zola et al. 2007). Proto byla většina CD molekul definována na základě skupin monoklonálních protilátek, které s nimi reagují a vzájemně je od sebe odlišují. CD nomenklatura tak poskytuje názvoslovný systém pro monoklonální protilátky a povrchové molekuly buněk, které rozpoznávají. Umožňuje tak nepostradatelnou klasifikaci pro diagnostické a terapeutické účely. Pořadová čísla přiřazená k molekulám ale neposkytují informace o jejich struktuře či funkci. Toto názvosloví, které původně sloužilo pouze pro pojmenování lidských povrchových molekul buněk, bylo vytvořeno organizací International Union of Immunological Societies (IUIS), ale využívá se i pro pojmenování molekul dalších organismů. (Hořejší et al. 2017; Engel et al. 2015).

CD molekuly jsou označovány jako „diferenční antigeny“. Důvodem je jejich distribuce, která je často omezená na určitou buňku nebo tkáň. Tyto antigeny jsou v buněčné membráně po dobu specifické vývojové periody nebo se zde vyskytují až do narušení buněčné membrány (Buc 2001). Mezi jednotlivými CD antigeny je velká heterogenita ve struktuře i funkci. Většina je součástí imunitních funkcí organismu. Jedná se o receptory pro antigeny, glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu, adhezivní molekuly, receptory pro imunoglobuliny, receptory pro komplement, receptory pro lymphokiny a další růstové diferenční faktory. V neposlední řadě enzymy membrán, transportní molekuly a další molekuly, jejichž struktura a exprese byla charakterizována, ale funkce je stále neznámá (Barclay et al. 1997; Hořejší et al. 2017).

Některé CD molekuly jsou také exprimovány na tkáních a buňkách reprodukčního traktu. Jejich role většinou není zcela objasněna, ale předpokládá se podíl na imunitě reprodukčního systému. Novější studie ukázaly, že některé CD molekuly by se mohly účastnit samotného procesu fertilizace (Fábryová & Simon 2009). Fertilizace savců je složitý proces, který začíná vývojem a transportem gamet v reprodukčním traktu samce i samice. Po přiblížení spermie k oocytu v samičím reprodukčním traktu následuje interakce mezi nimi. Poté dochází k fúzi gamet a vzniku zygoty (Talbot et al. 2003).

Nejdůležitějšími CD molekulami v procesu fertilizace jsou molekuly patřící do superrodin tetraspaninů, integrinů a proteinů regulující komplement (Fábryová & Simon 2009).

3.2 Události vedoucí k fúzi gamet

Fertilizace je esenciálním biologickým procesem a zahrnuje řadu molekulárních interakcí mezi oocytem a spermií (Wassarman et al. 2001; Evans 2012). Samotná fúze haploidní spermie a oocytu je vrcholnou událostí v procesu savčí fertilizace a umožňuje vznik nového, geneticky odlišného diploidního organismu (Sutovsky 2009; Klinovská et al. 2014).

V následujících podkapitolách jsou stručně popsány biochemické procesy, kterými spermie prochází a dále molekuly, které se účastní interakce gamet.

3.2.1 Kapacitace

Spermie nejsou po vstupu do samičího reprodukčního ústrojí schopny oplodnit oocyt, proto je nutné, aby podstoupily několik biochemických a fyziologických změn, které jsou označovány jako kapacitace a vedou k získání schopnosti fertilizace (Visconti et al. 1998). Během kapacitace jsou z plazmatické membrány odstraněny takzvané dekapacitační faktory (Bedford & Chang 1962). Odstranění těchto faktorů zvyšuje fluiditu plazmatické membrány a umožňuje zvýšení permeability pro vápník, chlorid a bikarbonátové ionty (Gangwar & Atreja 2015). Nejdůležitějším iontem pro kapacitaci je Ca^{2+} , který slouží jako aktivátor signálních drah, které regulují motilitu spermie (Finkelstein et al. 2020). Aktivace rozpustných adenylátcykláz vede k tvorbě cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který aktivuje serin/threonin protein kinázu A (PAK). PAK spouští kaskádu proteinové fosforylace, což zahajuje indukci motility spermie (Chen et al. 2000). Důsledkem kapacitace je hyperaktivace motility spermie a iniciace akrozomální reakce (Saling et al. 1979; Florman & First 1988).

3.2.2 Akrozomální reakce

K iniciaci akrozomální reakce spermie dochází po vazbě na zona pellucida (ZP; extracelulární glykoproteinový obal oocytu). Jedná se o klíčovou událost procesu fertilizace, bez které není spermie schopná proniknout skrz ZP a navázat se na plazmatickou membránu oocytu. Během akrozomální reakce dochází k fúzi vnější akrozomální membrány s plazmatickou membránou spermie a poté k vylití obsahu akrozomu. Důsledkem této reakce je odhalení vnitřní akrozomální membrány pro sekundární vazbu gamet (Florman et al. 2008). Nejdůležitější funkcí akrozomální reakce jsou právě změny ve spermatické membráně, díky nimž dochází k zpřístupnění proteinů důležitých pro vazbu a fúzi gamet (Okabe 2016).

3.2.3 Molekuly účastnící se vazby na ZP

Počátkem oplození je vazba spermie na oocyt, respektive na ZP oocytu. První kontakt mezi spermii a ZP je nepevné spojení, jedná se o nescifickou vazbu mezi gametami. Teprve poté následuje druhově specifická vazba, akrozomální reakce a sekundární vazebný mechanismus. Aby mohla být uskutečněna vazba gamet, musí spermie nejprve proniknout skrz *cumulus oophorus* – vrstvou kumulárních buněk, které obklopují oocyt (Van Soom et al. 2002). Touto vrstvou jsou schopny penetrovat pouze kapacitované spermie s intaktním akrozomem. Pro penetraci je důležitá aktivita enzymu hyaluronidázy, který je lokalizován na plazmatické membráně hlavičky spermie (Lin et al. 1994).

U prasat byly popsány takzvané spermadhesiny, nízkomolekulární proteiny spermie účastnící se primární dočasné vazby spermie se ZP – takzvaného „attachmentu“ (Rodriguez-Martinez et al. 1998). Mezi další popsané receptory prasete pro vazbu ZP na spermii patří i akrosin (Töpfer-Petersen & Henschen 1987), zonadhesin (Hardy & Garbers 1995) a lactadherin p47 (Zigo et al. 2015).

Glykoprotein ZP2 je důležitý pro sekundární vazbu gamet u lidí (Gupta et al. 2009) a myši (Bleil et al. 1988), ale u prasat zatím nebylo prokázáno, který glykoprotein zona pellucida je zodpovědný za tuto vazbu (Tanphaichitr et al. 2007).

3.2.4 Fúze gamet

Po sekundární vazbě na ZP následuje samotná fúze pohlavních buněk. Studie, které zahrnovaly laboratorní zvířata s knock-outovaným genem odhalily, že faktory, o kterých se dříve předpokládalo, že jsou důležité pro fertilizaci, nejsou nezbytné (Okabe 2015; Okabe 2018). Aktuální přehled molekul, které jsou přítomné na oocytu nebo spermii a účastní se interakce gamet a následné fúze jsou uvedeny v tabulce 1 níže. Tabulka byla převzata a upravena z review Siu et al. 2021.

Tabulka 1 Přehled molekul účastnících se interakce nebo fúze gamet (převzato a upraveno Siu et al. 2021)

Název proteinu	Rok objevu	Role v procesu fertilizace
CD9	1999	<ul style="list-style-type: none"> - Exprimován na povrchu oocytu (myši, prasat, krav) a během vazby gamet dochází k jeho akumulaci (u myši) - Mohl by modulovat integritu oocytární membrány - Přesná role ve fúzi gamet zůstává neobjasněna
IZUMO1	2005	<ul style="list-style-type: none"> - Po akrozomální reakci dochází k relokaci do ekvatoriálního segmentu spermie (u myši) - Vazba s JUNO je zodpovědná za počáteční vazbu gamet na úrovni PM
JUNO	2014	<ul style="list-style-type: none"> - Exprimován na povrchu membrány oocytu a slouží jako receptor pro IZUMO1 spermie
SPACA6	2014	<ul style="list-style-type: none"> - Exprimován spermii a po akrozomální reakci je lokalizován v ekvatoriálním segmentu myši spermie - Specifická role ve fúzi gamet není objasněna
TMEM95	2014	<ul style="list-style-type: none"> - Lokalizován v ekvatoriálním segmentu spermie myši a býka - U myši je esenciální pro fúzi gamet a samčí fertilitu - Přesná role ve fúzi gamet zatím není objasněna
SOF1	2020	<ul style="list-style-type: none"> - Předpokládá se, že je sekretovaným faktorem, který je esenciální pro fúzi gamet - Jeho přesná role je předmětem dalších studií
FIMP	2020	<ul style="list-style-type: none"> - Účastní se fúze myších gamet - Pouze transmembránová forma je důležitá pro fertilizaci - Role této molekuly stále není zcela vysvětlena
DCST1/DCST2	2021	<ul style="list-style-type: none"> - Účastní se fúze gamet (u myši) - Regulují stabilitu SPACA6

Úspěšnou fertilizaci prasat a krav pravděpodobně zajišťují i tetraspaniny CD9 a CD81, které jsou lokalizovány plazmatické membráně a veziklech perivitellinního prostoru oocytu (Jankovičová et al. 2019). S těmito tetraspaniny interaguje receptor JUNO, jehož ligand IZUMO1 na spermii je zpřístupněn díky akrozomální reakci. Protein IZUMO1 je zodpovědný za fúzi plazmatických membrán spermie a oocytu u savců (Inoue et al. 2005; Bianchi et al.

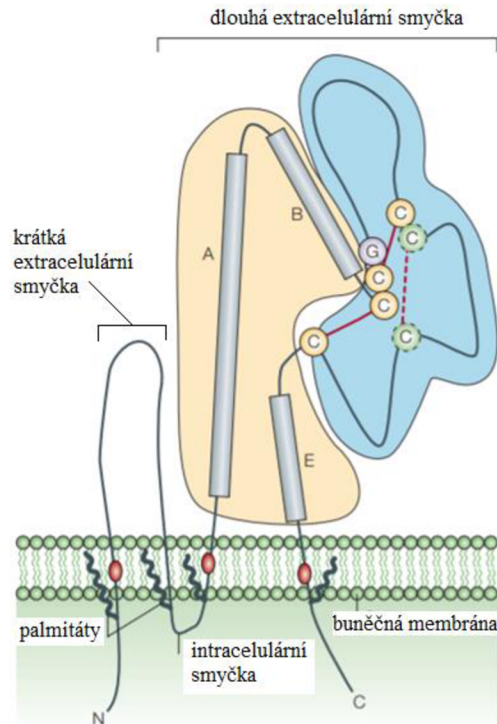
2014). Tanihara et al. (2014) předpokládá, že odhalení proteinu IZUMO po akrozomální reakci vede ke zvýšené penetraci spermie ooplasmou i u prasat. Zmiňované proteiny ale nejsou jediné, které se účastní fúze gamet prasat a krav. Například protein TMEM95, který je lokalizovaný v ekvatoriálním segmentu spermie myši a býka (Paush et al. 2014; Noda et al. 2020) a je považován za esenciální pro fúzi gamet u myši (Noda et al. 2020), se pravděpodobně účastní fúze gamet i u býků. Studie Paush et al. (2014) totiž ukázala, že mutace v genu pro tento protein vede k subfertilitě u býků.

3.3 Tetraspaniny

Tetraspaninové proteiny jsou součástí mnoha buněčných mechanismů. Jsou hlavními organizátory membránových proteinů a jsou proto zapojeny do fyziologických i patofyziologických procesů (Kummer et al. 2020). Společně s asociovanými proteiny moduluji interakce mezibuněčné imunity, včetně adheze, migrace a synapse a také pomáhají při intercelulárních interakcích jako organizátory komplexů membránové signalizace. Jsou zapojené do intracelulárního transportu proteinů, endocytózy a exocytózy a také fungují jako chaperony (Levy & Shoham 2005).

Tyto transmembránové proteiny 4x procházejí membránou. Díky jejich tendenci spojovat se se sebou navzájem a s různými třídami proteinů (např. povrchovými proteiny membrán, imunoglobuliny, signálními molekulami, molekuly adheze a proteázami) vytvářejí rozšířené subdomény (Kummer et al. 2020). Nejen interakcí mezi samotnými tetraspaniny, ale i interakcí s dalšími proteiny vytváří rozsáhlou síť, které se říká tetraspaninová síť. (Hemler 2001; Frolíková et al. 2018). Přestože členové tetraspaninové superrodiny mají společnou funkci v rámci tetraspaninové sítě, jednotlivé tetraspaniny mají svou specifickou funkci, která nemůže být zastoupena jiným tetraspaninovým proteinem (Levy & Shoham 2005).

Struktura tetraspaninů je vyobrazena na obrázku 1. Jedna molekula tetraspaninu se skládá ze 4 transmembránových (TM) domén, krátké extracelulární smyčky (EC1), velmi krátké intracelulární smyčky a delší extracelulární smyčky (EC2). N-terminální a C-terminální cytoplazmatické konce jsou, kromě několika výjimek, tvořeny z 8-21 aminokyselin (Hemler 2005).

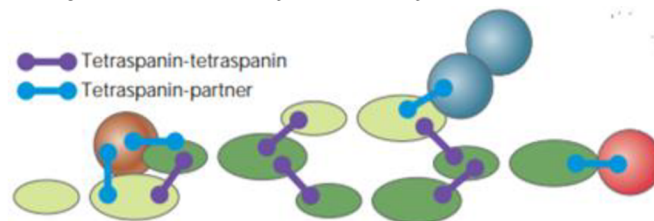


Obrázek 1 Struktura tetraspaninu (převzato a upraveno z Hemler 2005)

TM oblasti, které jsou propojené dvěma uvedenými extracelulárními smyčkami a jednou intracelulární, jsou významně konzervované (Seigneuret et al. 2001). EC1 se skládá ze 13-51 aminokyselin, intracelulární smyčka pouze ze 4 aminokyselin. EC2 se rozděluje na dvě části – konstantní a variabilní část. Konstantní část obsahuje α -helix A, B a E, (Hemler 2005), viz obrázek 1. Variabilní část se vyznačuje heterogenitou a extrémní variabilitou ve velikosti, sekundární struktuře a složení (Seigneuret et al. 2001). Zatímco struktura a funkce EC2 je dobře zmapovaná pomocí protein-protein interakcí a monoklonálních protilátek, o struktuře a funkci EC1 nejsou podrobné informace. U všech proteinů tetraspaninové rodiny na B-helix v EC2 navazuje CCG a další dva cysteiny, které tak vytváří dvě intramolekulární disulfidické vazby. Mnoho tetraspaninů obsahuje dva aditivní cysteiny, které formují další intramolekulární disulfidický můstek. V některých případech se může vyskytovat až 8 cysteinů (Hemler 2005). Počet disulfidických můstků odpovídá odlišným podtypům tetraspaninů (Seigneuret et al. 2001). Transmembránové domény 1,3 a 4 obsahují polární aminokyseliny (Asn, Glu, Gln) neznámé funkce – na obrázku 1 jsou vyznačeny červenými ovály. Téměř u všech tetraspaninů se v intracelulární části, která je označena na obrázku 1 jako intracelulární smyčka, nacházejí aminokyselinové zbytky cysteinu, které podléhají palmitoylaci (Hemler 2005). Palmitoylace aminokyselinových zbytků cysteinu je u proteinu CD9 (a pravděpodobně i u dalších tetraspaninů) potřebná pro vazbu s cholesterolem (Charrin et al. 2003). Studie Yang et al. (2002) ukázala, že u tetraspaninu CD151 je palmitoylace pravděpodobně potřebná pro tvorbu tetraspaninových sítí.

Obecně extracelulární části zprostředkovávají specifické protein-protein interakce, zatímco cytoplazmatická oblast poskytuje vazbu s cytoskeletálními a signálními molekulami (Levy & Shoham 2005).

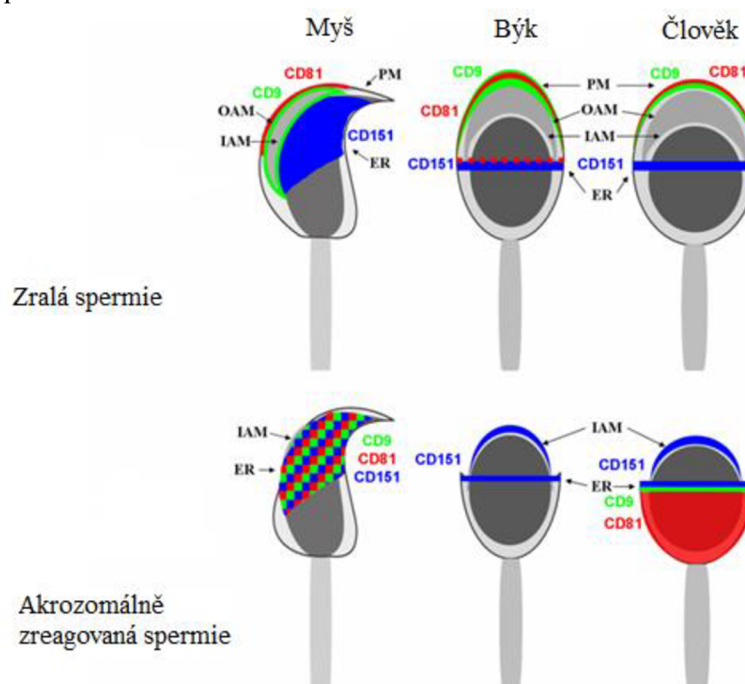
Tetraspaninové sítě představují nový koncept molekulárních interakcí imunitního systému. Na rozdíl od většiny povrchových imunomodulačních proteinů, tetraspaniny netvoří interakce receptor-ligand, ale sdružují se s partnerskými proteiny a umožňují jejich laterální umístění v membráně. Stejná molekula tetraspaninu se může asociovat s různými proteiny v závislosti na typu buňky. Členové tetraspaninové rodiny mají sklon se asociovat jeden s druhým (spolu s proteiny) v membránových mikrodoménách, které tak vytváří „lešení“ pro transmissi vnějších signálů na komponenty intracelulární signalizace (Levy & Shoham 2005). Interakce tetraspaninů jsou schematicky zobrazeny na obrázku 2.



Obrázek 2 Schéma tetraspanin-partner a tetraspanin-tetraspanin interakcí (Levy a Shoham 2005b)

Pro interakci tetraspanin-tetraspanin je důležitá, již výše zmíněná, palmitoylace intracelulárních zbytků cysteinu. Nahrazení cysteinů jinými aminokyselinami, a tak zabránění palmitoylace u molekul CD9 (Charrin et al. 2002) a CD151 (Yang et al. 2002) negativně ovlivnilo jejich vazbu s dalšími tetraspaniny.

Tetraspaniny CD9, CD81 a CD151 jsou důležité pro interakci gamet (Rubinstein et al. 2006b), zatímco CD63 je součástí extracelulárních vezikulů, ale potencionální role této molekuly v reprodukci nebyla zcela vysvětlena a potvrzena (Machtinger 2015; Jankovičová et al. 2020). Molekuly CD9 a CD81 společně vytváří tetraspaninovou síť v membránách spermie (Frolíková et al. 2018). Na obrázku 3 je znázorněna lokalizace CD9, CD81 a CD151 na spermii člověka, myši a býka. Podrobnější informace o těchto molekulách jsou uvedeny v následujících podkapitolách.

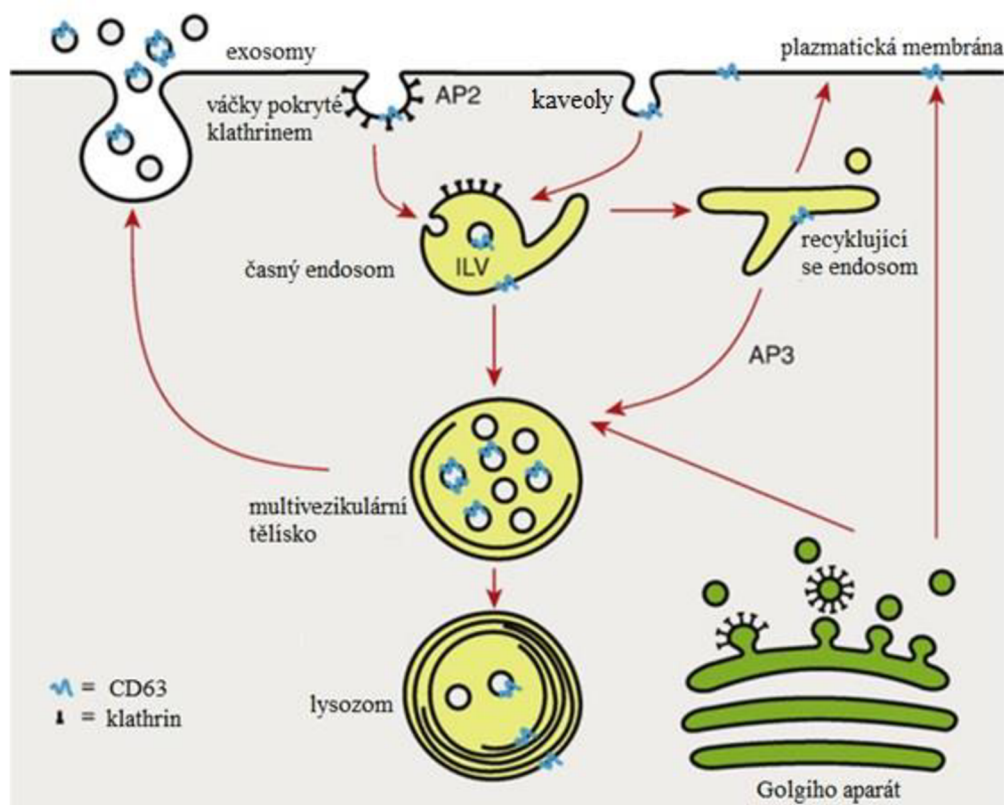


Obrázek 3 Lokalizace tetraspaninů na spermii (převzato a upraveno Jankovičová 2020)

3.3.1 Molekula CD63

Molekula CD63 byla objevena jako protein na povrchu aktivovaných krevních destiček, známý jako glykoprotein 40 (Modderman 1989), a v buňkách raného stádia melanomu u člověka – melanoma antigen 491 (Atkinson et al. 1984; Hotta et al. 1988). Jedná se o první charakterizovanou molekulu řadící se mezi tetraspaniny (Modderman 1989).

Hlavním místem výskytu této molekuly jsou multivezikulární tělíska (pozdější stádia endozomů) a lysozomy, proto je často nazývána lysozomálním membránovým proteinem. Na obrázku 4 je vyobrazeno schéma transportu CD63 v buňce. Z Golgiho aparátu je CD63 transportován exocytózou na buněčný povrch nebo je přímou intracelulární cestou transportován do endozomů. Z plazmatické membrány může prostřednictvím adaptorového proteinu-2 (AP2) nebo váček pokrytých klathrinem či endocytózou regulovanou kaveoly putovat zpět do buňky, kde se dostává do intraluminálních váček (ILV). Z těchto váček se recykluje na povrch buňky nebo pokračuje endosomálním systémem přes multivezikulární tělíska do lysozomů. Z multivezikulárních tělísek může být uvolněn do extracelulárního prostoru v extracelulárních vezikulech. Jak již bylo zmíněno, z recyklujícího se endozomu se protein dostává na povrch buňky, ale taktéž může být prostřednictvím adaptorového proteinu-3 (AP3) transportován do multivezikulárních tělísek (Bonifacio & Traub 2003; Pols & Klumperman 2008).



Obrázek 4 Schéma transportu CD63 v buňce (převzato a upraveno Pols & Klumperman 2008)

Extracelulární vezikuly disponují parakrinní funkcí, a proto jsou důležité pro mezibuněčnou komunikaci. Odklízejí nepotřebné buněčné proteiny, transportují proteiny a lipidy z jedné buňky do druhé (Pols & Klumperman 2008), přenášejí i mRNA a miRNA (Valadadi et al. 2007). Mezi jejich další funkce patří potlačení funkcí imunitního systému,

podpora angiogeneze v nádorovém útvaru a aktivace T lymfocytů (Pols & Klumperman 2008). V reprodukčním traktu taktéž zajišťují mezibuněčnou komunikaci. Některé studie dokonce popisují účast těchto vezikulů při procesech souvisejících s implantací embrya (Ng et al. 2013), maturací gamet, fertilizací a zabránění polyspermie (Sullivan & Saez 2013; Machtinger et al. 2016).

Extracelulární vezikuly obsahující CD63 molekulu byly detekovány v semenné plazmě kance (Barranco et al. 2019) a býka (Pagano et al. 2020), ve folikulární tekutině u klisny (da Silveira et al. 2012), kozy (Sohel et al. 2013) a člověka (Santonocito et al. 2014). Dále byly vezikuly s tímto tetraspaninem objeveny v děložní lumenální tekutině u člověka (Ng et al. 2013) a ovce (Burns et al. 2014).

Během ejakulace seminální plazma obsahuje nejen spermie a rozpustné signální molekuly, ale také extracelulární vezikuly z celého samčího reprodukčního traktu (Sullivan & Saez 2013). Extracelulární vezikuly můžeme rozlišit dle velikosti na dvě subpopulace. Exosomy jsou menší váčky o velikosti 40-120 nm, zatímco velikost mikrovezikulů je 120-1000 nm (Barranco et al. 2019). Liší se i mechanismem uvolňování z buňky. Mikrovezikuly se uvolňují přímo z plazmatické membrány, ale exosomy nejprve vytvářejí multivezikulární tělíska a až poté jsou z buňky uvolněny v podobě exosomů (Machtinger et al. 2016). Molekula CD63 není z tetraspaninové rodiny jediná, která se vyskytuje v extracelulárních vezikulech. V exosomech byl detekován hojnější výskyt molekuly CD81, zatímco molekuly CD63 a CD9 dominovaly v mikrovezikulech (Barranco et al. 2019).

Co se týče lokalizace proteinu CD63 přímo ve spermii, přítomnost proteinu byla na ejakulovaných spermiiích skotu imunohistochemicky detekována v ekvatoriálním segmentu, který je spojován s interakcí a fúzí gamet. Po kapacitaci nebyl žádný signál detekován, ale u akrozomálně zreagovaných spermii se objevil slabý nebo opět žádný signál. Tato dynamická změna profilu diskutovaného tetraspaninu může indikovat jeho zatím nepopsanou roli v savčí fertilizaci (Jankovičová et al. 2019).

Molekula CD63 byla také nalezená inkorporovaná do mikrodomén, které typicky obsahují tetraspaniny a další molekuly jako cholesterol, integriny ($\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, LFA-1) a další molekuly formující aktivní tetraspaninovou síť (Pols & Klumperman 2008). Obecně CD63 interaguje s velkým množstvím různých proteinů, ať už přímo nebo nepřímo. Mimo zmiňovaných integrinů může interagovat s tetraspaniny (CD81, CD82, CD9, CD151), receptory na povrchu buněk (MHCII, CD3, CXCR4, Fc ϵ RI), kinázami, adaptorovými proteiny (AP-2, AP-3, AP-4) a další řadou proteinů (Pols & Klumperman 2008).

Cd63 knockout myši byly životaschopné a fertillní, netrpěly žádnými morfologickými abnormalitami ve většině tkání. Nicméně, to úplně nevyklučuje tento tetraspanin z role ve fertilizačním procesu. Ztráta proteinu CD63 by mohla být kompenzována například jiným tetraspaninem (Schröder et al. 2009). Yoshida et al. (2014) se domnívá, že zajištění reprodukčního cyklu u myši je založeno na existenci více než jedné dráhy vedoucí k fúzi spermie a oocyty. To může mít za důsledek kompenzaci absence určitého genu a tím minimalizaci závažnosti poruchy (Yoshida et al. 2014).

3.3.2 Molekula CD9

Molekula CD9 má obdobnou molekulovou hmotnost (24-25 kDa) ve všech tkáních a buňkách myši (Ito et al. 2010), prasat (Kaewmala et al. 2011) a skotu (Martin-Alonso et al.

1992). Vysoká koncentrace tohoto proteinu byla popsána na povrchu trombocytů a endoteliálních buněk (Cook et al. 1999). Vyskytuje se i na T-lymfocytech a dalších buňkách imunitního systému (Tai et al. 1996). Nelze však opomenout významnou roli této molekuly v reprodukčním procesu.

Jedná se o nejstudovanější tetraspaninový protein v souvislosti s procesem fertilizace. Důležitá role této molekuly byla prokázána studii již před 20 lety, a to pomocí knockoutu *Cd9* genu u myších samic. Samice s neaktivním *Cd9* genem byly převážně infertilní. Ačkoliv zrání oocyty do fáze metafáze II se jeví normálně a spermie byly schopné adherovat k plazmatické membráně CD9 inaktivních oocytů, spermie jen velmi zřídka fúzovaly s plazmatickou membránou oocyty. Tyto studie poukázaly na klíčovou roli této molekuly při fúzi gamet (Kaji et al. 2000; Le Naour et al. 2000; Miyado et al. 2000). Podle Higginbotton et al. (2003) je pro fúzi gamet důležitá variabilní část EC2 tohoto proteinu.

Na prasečích oocytech molekulu CD9 poprvé detekovali Li et al. (2004). Molekulu pozorovali na zárodečných buňkách membrány a na plazmatické membráně oocyty v preantrálním folikulu, stejně tak v plně vyvinutých folikulech. Navíc, hustota proteinu se během maturace oocyty zvyšovala (Li et al. 2004). Později byla tato molekula detekována na prasečích a býčích oocytech Jankovičovou et al. (2019). Studie popisuje lokalizaci CD9 v plazmatické membráně, zona pellucida a perivitellinním prostoru oocyty. (Jankovičová et al. 2019).

CD9 molekula vykazuje interakce s ostatními molekulami oolemy oocyty během fúze gamet, ale také může fungovat jako receptor pro spermie vzhledem k její asociaci s integriny (Stein et al. 2004). Byla popsána interakce s integriny $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ a $\alpha IIb\beta 3$, kde CD9 zprostředkovává migraci, signalizaci a adhezi k extracelulárním matrixovým substrátům (Shaw et al. 1995; Jones et al. 1996; Hemler 1998). Přestože $\beta 1$ integriny jsou hlavními molekulami tetraspaninových makromolekulárních komplexů, jejich interakce s CD9 molekulou je nepřímá, respektive prostřednictvím jiného tetraspaninu (Berditchevski et al. 2002; Ziyat et al. 2006).

Většina studií se soustředí na oocytární CD9, zatímco výzkum tohoto proteinu na spermii není tak obsáhlý. Nicméně, molekula CD9 byla detekována v myších a potkaních spermatogoniích (Kanatsu-Shinohara et al. 2004; Kierszenbaum et al. 2006). O pár let později byla detekována i u samčích gamet prasat (Kaewmala et al. 2011) a skotu (Cupperová et al. 2014).

U prasat byla vypracována zajímavá a zatím jediná studie, kde gen *CD9* byl studován jako možný kandidátní gen pro hodnocení kvality kančího spermatu. Během vývoje spermie byl tento protein detekován ve spermatogoniích, spermatocytech a spermatidách. Dále byl detekován v Leydigových a Sertoliho buňkách, v zárodečných buňkách varlete, v epiteliálních buňkách nadvarlete, chámovodu a předstojné žlázy. Imunofluorescenční signál značeného proteinu byl detekován v akrozomální oblasti a akrozomální membráně spermie (Kaewmala et al. 2011).

Některé studie ukázaly, že exprese ve spermii může být zapříčiněná transferem z oocyty. Procesem podobným trogocytóze, při které je přenos membránových fragmentů závislý na kontaktu mezi buňkami, dochází v perivitellinním prostoru k transferu CD9 z oocyty na spermii (Rubinstein et al. 2006b). Dokonce podle Barraud-Lange et al. (2007) je před fúzi gamet nezbytná reorganizace spermatické membrány, která zahrnuje právě transfer fragmentů

membrány oocyty včetně CD9 molekuly na spermii. Později Barraud-Lange et al. (2012) potvrdil přenos materiálu membrány nejen mechanismem trogocytózy, ale i pomocí exosomů.

Největší studie tetraspaninu CD9 na samčí gametě byla provedena u myši. Molekulová váha tohoto tetraspaninu ve spermii se nelišila od ostatních buněk výskytu. Dokonce se nemění během spermatogeneze či po akrozomální reakci. Tetraspanin je lokalizován hlavně na vnitřní akrozomální membráně s dominantním výskytem okolo perforatoria (hrot akrozomu). Na povrchu spermie je vystaven až po akrozomální reakci (Ito et al. 2010).

Důležitost role molekuly CD9 během procesu fertilizace byla diskutována v souvislosti s akrozomální reakcí, vazbou spermie, penetrací spermie, fúzí oocyty se spermii a aktivací oocyty (Jankovičová et al. 2015). Během interakce gamet se lokalizace CD9 molekuly samozřejmě mění. Během akrozomální reakce je protein ze spermie uvolněn a asociuje s membránovými komplexy sestávajícími z plazmatické membrány a vnější akrozomální membrány. Většina molekul zůstává na vnitřní akrozomální membráně, ale některé se relokalizují na povrch ekvatoriálního segmentu spermie. V periviteliním prostoru zůstávají molekuly na vnitřní akrozomální membráně a na povrchu ekvatoriálního segmentu. Možná interakce oocytárního CD9 se spermatickým CD9 není prokázána (Ito et al. 2010).

Při kontaktu membrán gamet molekula CD9 vytváří na membráně oocyty silné adhezní místo, které je nezbytné pro úspěšnou fúzi (Jégou et al. 2011). Akumulace tohoto tetraspaninu na membráně oocyty je regulována adhezí Juno což je esenciální oocytární molekula, která interaguje s důležitým proteinem spermie Izumo (Inoue et al. 2005; Chalbi et al. 2014). Po akrozomální reakci a kontaktu s oocytární membránou je spermie svou oscilací dokonce schopná rekrutovat oocytární CD9 na místo rozhraní gamet. Bezprostředně po jejich fúzi tetraspanin CD9 s asociovanými proteiny opouští plazmatickou membránu a pravděpodobně se účastní zablokování polyspermie (Ravaux et al. 2018).

3.3.3 Molekula CD81

CD81 je tetraspaninovým proteinem, který se považuje za kandidátní molekulu účastnící se savčí fertilizace, a to prostřednictvím spolupráce s CD9 (Ohnami et al. 2012). Jeho velikost je 26 kDa (Oren et al. 1990). Oproti ostatním tetraspaninům se jedná o neglykosylovaný protein. Po translaci prodělává acylaci, stejně jako CD9 (Seehafer et al. 1988). Lidský a myši CD81 sdílí přibližně 43 % sekvence aminových kyselin s CD9 (Jankovičová et al. 2020).

Detekce a lokalizace tohoto tetraspaninu na oocyty je obdobná již zmíněné molekule CD9. Prve byla molekula CD81 detekována na povrchu myších oocytů bez ZP (Takahashi et al. 2001), ale později ji Ohnami et al. (2012) detekoval pouze ve vnitřní oblasti ZP. U intaktních oocytů krav byla přítomnost proteinu prokázána na plazmatické membráně a po oplodnění v periviteliním prostoru zygot a embryí (Jankovičová et al. 2016). U prasat byl kromě plazmatické membrány oocyty výskyt pozorován i ve vnitřní části zony pellucidy a dále také ve vezikulech lokalizovaných v periviteliním prostoru zygot a embryí (Jankovičová et al. 2019).

Bylo popsáno, že myši s knockoutovaným genem pro CD9 a CD81 nebyly fertilní. Navíc při aplikování mikroinjekce CD81 mRNA došlo k částečné kompenzaci proteinu CD9

u CD9 deeficientních oocytů. Proto se předpokládá, že CD81 ve funkci doplňuje protein CD9 (Rubinstein et al. 2006).

Přítomnost tohoto tetraspaninu byla studována i u samčích gamet. U myších epididymálních spermii byla molekula CD81 detekována na plazmatické membráně, kde pokrývá horní část akrozomu. Během akrozomální reakce dochází k relokaci přes ekvatoriální segment a celou hlavičku spermie. V epididymální a ejakulované spermii býka byla molekula detekována v apikální části a částečně v ekvatoriálním segmentu. U akrozomálně zreagovaných byčích spermii nebyla popsána. (Jankovičová et al. 2016).

3.3.4 Molekula CD151

Tetraspaninová molekula CD151 byla původně identifikována jako antigen buněk akutní myeloidní leukemie u člověka (Ashman et al. 1991). Je exprimována různými buněčnými typy – především epiteliálními buňkami, svalovými buňkami, Schwannovými buňkami, megakaryocyty a trombocyty (Sincock et al. 1997). Nedávno byla přítomnost tohoto proteinu detekována i ve spermii (Jankovičová et al. 2020b).

Myši s delecí genu pro CD151 jsou fertilní (Wright et al. 2004). Účast této molekuly při interakci gamet u člověka taktéž není esenciální. Nicméně, až 50% inhibice fúze gamet prostřednictvím protilátky anti-CD151 určitou roli při interakci gamet potvrdila (Ziyyat et al. 2006). Účast molekuly při fertilizačním procesu byla také demonstrována ve studii Sabetian et al. (2014). Pomocí různých databází byla vytvořena modulace interakce lidských membránových a povrchových proteinů oocytu a spermie. Modulace odhalila několik kandidátních proteinů účastníci se interakce oocytu se spermii a mezi nimi i interakci CD49 na spermii s CD151 na oocytu (Sabetian et al. 2014).

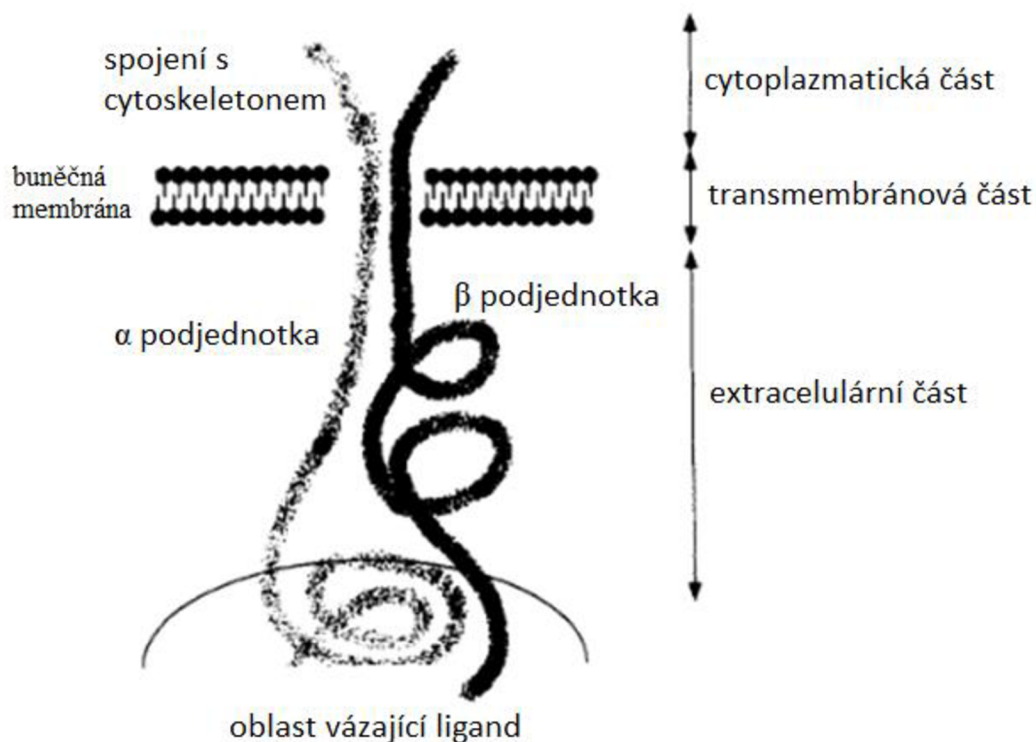
Molekula CD151 byla detekována v plazmatické membráně lidských oocytů s intaktní ZP. Na oocytech bez ZP je molekula CD151 asociována s integrinem $\alpha_6\beta_1$ (Ziyyat et al. 2006). Obecně se tetraspanin CD151 asociuje s různými tetraspaniny, integriny a dalšími molekulami (Berdichevski et al. 2001).

Protein CD151 je exprimován v zárodečných buňkách spermie a zůstává přítomný ve spermii během epididymálního transportu i ejakulace. Přítomnost této molekuly byla studována v býčích, myších a lidských spermii. U těchto druhů byl protein lokalizován v ekvatoriálním segmentu a po akrozomální reakci ve vnitřní akrozomální membráně (Jankovičová et al. 2020). Vzhledem ke stejné lokalizaci integrinu $\alpha_6\beta_4$ a detekované interakci CD151 s podjednotkou α_6 , Jankovičová et al. (2020) předpokládají existenci transmembránového proteinového systému, který stabilizuje uspořádání multimolekulárních komplexů. Tyto komplexy jsou v ekvatoriálním segmentu spermie a zajišťují jeho schopnost interakce s oocytem (Jankovičová et al. 2020).

3.4 Integriny

Integriny se řadí mezi adhezivní receptory buněčného povrchu. Účastní se interakcí mezi buňkou a matrixem a taktéž mezibuněčných interakcí, například trombocytů, lymfocytů, fibroblastů nebo keratinocytů. Jedná se o transmembránové glykoproteinové heterodimery (Fenichel & Durand-Clément 1999).

Strukturu integrinových proteinů tvoří dvě podjednotky, α a β (Hynes 1992). Tyto podjednotky jsou spojené nekovalentní vazbou (Hynes 2002). Každá podjednotka se skládá z velké extracelulární části, transmembránové sekce a krátké cytoplazmatické části. V extracelulární části se nachází ligandové vazebné místo, které je přítomno u obou subjednotek. Jedná se o poměrně malý úsek, jehož prostřednictvím integriny interagují s proteiny cytoskeletu (Otey et al. 1990). Schematická struktura integrinů je vyobrazena na obrázku 5. Obratlovci disponují integrinovou rodinou, která se skládá celkem z 18 α a 8 β podjednotek tvořící celkem 24 rozdílných heterodimerů (Takada et al. 2007).



Obrázek 5 Struktura integrinu (převzato a upraveno Vinatier 1994)

Integriny by mohly zprostředkovávat adhezi mezi spermií a oocytem, stejně jako zprostředkovávají adhezi somatických buněk (Evans 2002). V následujících podkapitolách se zaměřují pouze na vybrané integriny – tj. CD29 a CD44.

3.4.1 Molekula CD29

„CD29“ je jiný název pro $\beta 1$ podjednotku integrinu. Linfor a Berger (2000) studovali podjednotku $\beta 1$ jako potencionálně adhezivní molekulu oocytu během fertilizace u prasat. Zjistili, že podjednotka $\beta 1$ je přítomna v plazmatické membráně oocytu a exprimuje se přímo na jeho povrchu. Dále detekovali vazbu studované podjednotky s dvěma proteiny (137 kDa a 93 kDa) plazmatické membrány spermie. Protilátka vázající se na extracelulární část $\beta 1$ podjednotky inhibovala vazbu plazmatických membrán gamet, což poukazuje na možnou esenciální roli této molekuly v interakci gamet prasete (Linfor & Berger 2000).

V tabulce 2 níže je uvedený přehled α podjednotek, které se vážou na CD29 a tvoří integrinový heterodimer (Vinatier 1994).

Tabulka 2 *a podjednotky vázající CD29*

Podjednotka α	Jiný název	Heterodimer $\alpha\beta$
$\alpha 1$	CD49a	VLA-1
$\alpha 2$	CD49b	VLA-2
$\alpha 3$	CD49c	VLA-3
$\alpha 4$	CD49d	VLA-4
$\alpha 5$	CD49e	VLA-5
$\alpha 6$	CD49f	VLA-6
$\alpha 7$		
$\alpha 8$		
αv	CD51	$\beta 1\alpha v$

CD49f je α podjednotka, která může s CD29 tvořit integrin VLA-6, který je také označován jako $\alpha 6\beta 1$ či CD49f/CD29. Tento integrin je exprimován na T lymfocytech, thymocytech, na epitelech nelymfoidních tkání a také na povrchu myšního a lidského oocytu (Barclay et al. 1997). VLA-6 byl studován jako možný receptor pro spermii vázající se na oocyt. U myši se ukázalo, že tento integrin není pro fúzi gamet esenciální, ale je možné, že jeho funkce je nahrazována jiným integrinem (Miller et al. 2000). Nicméně, fúze lidských gamet je na VLA-6 daleko více závislá. Byla zaznamenána až 96% inhibice vazby gamet po předchozí inkubaci s monoklonální protilátkou proti $\alpha 6\beta 1$. To ukazuje na zásadní roli tohoto integrinu při fúzi gamet u člověka (Ziyyat et al. 2006).

Frolíková et al. (2016) studovala dynamiku proteinu CD46 a $\beta 1$ integrinu s podjednotkou $\alpha 3$ během akrozomální reakce spermie. CD46 a $\beta 1$ integriny s podjednotkou $\alpha 3$ jsou lokalizovány v oblasti apikálního akrozomu. Předpokládá se, že jsou zapojeny do signálních transdukčních drah, které řídí stabilitu akrozomu a také se zapojují do přeskupování proteinových sítí, což předchází fúzi gamet (Frolíková et al. 2016). O pár let později byla publikována studie zabývající se heterodimerem $\alpha 6\beta 1$. Tento heterodimer byl lokalizován v plazmatické membráně myšší spermie v apikální části akrozomu (Frolíková et al. 2019). Frolíková et al. (2019) předpokládají, že během akrozomální reakce dochází k výměně $\alpha 3$ a $\alpha 6$ podjednotky přes $\beta 1$, což může regulovat funkci cytoskeletu během fúze gamet.

3.4.2 Molekula CD44

CD44 je membránový glykoprotein, který je považován za hlavní hyaluronový receptor buněčného povrchu (Ponta et al. 1998). Řadí se mezi hyaladheriny, skupinu proteinů vázajících hyaluronan (Toole 1990). Interakce mezi tímto receptorem a hyaluronanem zprostředkovává řadu buněčných funkcí, včetně migrace buněk (Thomas et al. 1992), adhezi mezi buňkou a matrixem (Carter & Wayner 1988), a mezibuněčnou adhezi (St John et al. 1990). Hyaluronan je nesulfátový glykosaminoglykan, který se nachází v extracelulárním matrix, na buněčném povrchu a uvnitř buněk (Toole 2001). Ve velkém množství je přítomen ve vrstvě kumulárních buněk *in vitro* maturovaných oocytů hlodavců (Salustri et al. 1992), dále ve folikulární (Saito et al. 2000) a v ovidukální tekutině prasete (Tienthai et al. 2000).

CD44 existuje v několika izoformách, které se velikostně pohybují od 80 do 250 kDa. Nejčastější izoforma má velikost 85-90 kDa a je označována jako standardní CD44 neboli CD44s (Lesley & Hyman 1998).

Přítomnost tohoto membránového receptoru byla detekována v exosomech izolovaných ze semenné plazmy kance (Alvarez-Rodriguez et al. 2019). Dále je exprimován v jedno až osmibuněčném embryu člověka (Campbell et al. 1995) a během postimplantační embryogeneze u myši (Wheatley et al. 1993).

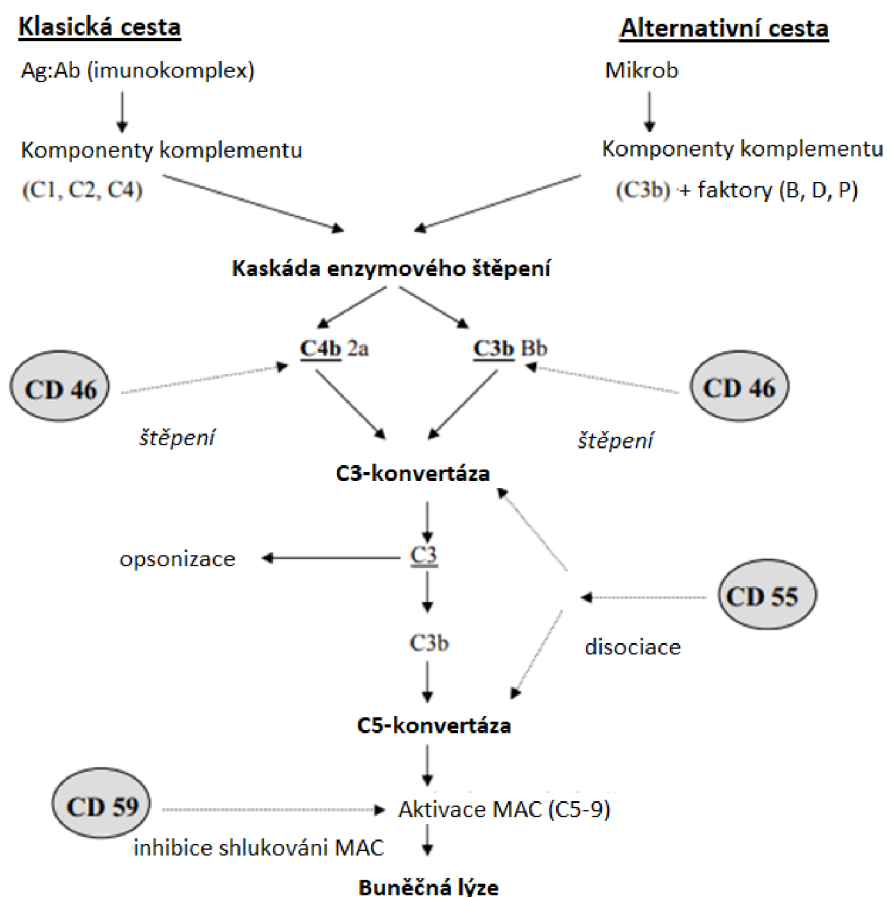
3.5 Proteiny regulující komplement

Proteiny regulující komplement usměřují funkci komplementu štěpením komplementové kaskády. Komplement je součástí mechanismů přirozené humorální imunity a skládá se z více než 30 glykoproteinů. Tyto glykoproteiny jsou přítomny v krevním séru a na povrchu některých buněk. Jejich primární funkcí je produkce zánětu, opsonizace cizích částic pro fagocytózu a zprostředkování přímé cytotoxicity proti různým buňkám a mikroorganismům. K regulaci komplementu pomocí těchto proteinů dochází u klasické i alternativní cesty aktivace komplementu (Valentičová et al. 2005).

Klasická cesta aktivace komplementu je iniciována na povrchu buněk s navázanými protilátkami (IgM, IgG). První protein komplementové kaskády C1 se váže na Fc fragment imunoglobulinu. To vede k aktivaci sérinových proteáz, které jsou schopny štěpit C4 a C2 proteiny. Vzniká tak C4b2a neboli C3 konvertáza. Tato konvertáza štěpí C3 na proteiny C3a a C3b. Dále se vytváří komplex C4bC3bC2a (C5 konvertáza), který štěpí C5 na C5a a C5b. Fragment C5b tvoří komplex s dalšími proteiny komplementu – C6, C7, C8 a C9. Tento komplex, jehož účinkem dochází k lýze mikrobiální buňky, se nazývá MAC – „membrane attack complex“ (Hořejší et al. 2017).

Alternativní cesta aktivace komplementu je založena na samovolném štěpení C3 na fragmenty C3a a C3b. Aktivace se účastní sérový proteinový faktor B, který je štěpen sérovou proteázou (faktor D). Vzniká komplex C3bBb, který je stabilizován faktorem P a působí jako alternativní C3 konvertáza (Hořejší et al. 2017).

Komplementová kaskáda může být narušena molekulami CD46, CD55, CD59. Každý z těchto proteinů regulujících komplement zamezuje průběhu kaskády odlišným způsobem. Protein CD46 štěpí fragmenty C4b a C3b. CD55 působí přímo na konvertázu C3 a konvertázu C5 tak, že způsobuje jejich disociaci. CD59 zabraňuje shlukování MAC a zabraňuje tak buněčné lýzi (Valentičová et al. 2005). Na obrázku 6 je schematicky znázorněno působení těchto proteinů regulujících komplement.



Obrázek 6 Působení proteinů regulujících komplement (převzato a upraveno Valentičová et al. 2005)

3.5.1 Molekula CD55

Molekula CD55 je označován zkratkou „DAF“ z anglického decay-accelerating factor. Inhibuje shlukování C3 konvertázy (Fujita et al. 1987) a disociačně působí i na C5 konvertázu (Valentičová et al. 2005). Původně byl tento protein izolován z povrchu lidských erytrocytů (Hoffmann 1969).

U člověka se tento protein vyskytuje pouze jako GPI vázaná molekula (GPI-CD55). Naopak u myši se navíc vyskytuje i transmembránová izoforma (TM-CD55). Tyto izoformy jsou produkty dvou různých, ale vysoce homologních genů (Spicer et al. 1995). Myši GPI-CD55 protein je exprimován ve většině tkání, zatímco TM-CD55 je přítomen hlavně v testis a dendritických buňkách sleziny (Lin et al. 2001). Potkaní CD55 se vyskytuje v obou formách TM-CD55 i GPI-CD55 s tím rozdílem, že se jedná o alternativně sestříhané produkty jednoho genu (Hinchliffe et al. 1998; Miwa et al. 2000).

Přesná role CD55 v reprodukci je stále nejasná. U myši se tento protein nachází v plazmatické membráně v akrozomu, krčku a v regionech bičíku (Clift et al. 2009). Přítomnost proteinu v těchto hlavních doménách plazmatické membrány spermií hlodavců poukazuje na možnou klíčovou roli v ochraně spermie v samičím reprodukčním traktu před mechanismy imunitního systému samice, respektive před účinkem komplementu. (Frolíková et al. 2012). V lidské spermii byla molekula CD55 detekována i na vnitřní akrozomální membráně (Cumerson et al. 2006), proto by funkce této molekuly v reprodukci mohla být daleko komplexnější (Frolíková et al. 2012). Dokonce u lidí anti-CD55

monoklonální protilátka inhibovala akrozomální reakci, což napovídá, že by se tento protein regulující komplement mohl účastnit akrozomální reakce (D’Cruz 1996). U myši knockout GPI-CD55 genu neohrozil fertilitu, což znamená, že tento protein není nezbytný pro reprodukci myši. Avšak je nutné poznamenat, že TM-CD55 byl u knockoutovaných myši stále přítomen (Sun et al. 1999).

3.5.2 Molekula CD59

CD9 molekula je dalším proteinem regulujícím komplement, který je lokalizován na plazmatické membráně savčí spermie. Jedná se o GPI vázaný protein, který chrání buňky před účinkem komplementu a potenciálně může být součástí fertilizačního procesu (Frolíková et al. 2012).

Zatímco u potkanů byla nalezena pouze jedna izoforma (Hughes et al. 1992; Rushmere et al. 1994), u myši existují dvě izoformy tohoto proteinu – CD59a a CD59b. Každá je kódována odlišným genem (Qian et al. 2000). Izoforma CD59a je distribuována ve většině tkání, ale CD59b pouze na spermii a jejím prekurzoru spermatidě (Baalasubramanian et al. 2004; Donev et al. 2008). Protein CD59a se nenachází na hlavičce myši spermie, zatímco CD59b se v těchto místech nachází ve velkém množství (Baalasubramanian et al. 2004).

Myši a potkaní protein CD59 inhibuje působení MAC (van den Berg et al. 1993; Qian et al. 2000). Studie s CD59a knockout myšmi ukázaly, že primárním regulátorem MAC je CD59a (Holt et al. 2001).

Omezená exprese CD59b u myši napovídá o možné účasti tohoto proteinu ve fertilizaci. Myši s knockoutovaným genem pro CD59b vykazovaly reprodukční abnormality, jako je abnormální morfologie spermie. Nicméně spermie mladých myši byly schopné prodělat akrozomální reakci a docházelo k úspěšné reprodukci. Fertilita a životaschopnost spermií byla výrazně snížena u starších jedinců. Tento fakt poukazuje na souvislost mezi CD59 a životaschopností a motilitou spermií (Qin et al. 2003). Myši s knockoutovaným genem pro CD59a nevykazovaly žádné defekty související s fertilitou (Holt et al. 2001). Tudíž u myši je pro motilitu a životaschopnost samčích gamet důležitá izoforma CD59b, ne CD59a (Baalasubramanian et al. 2004).

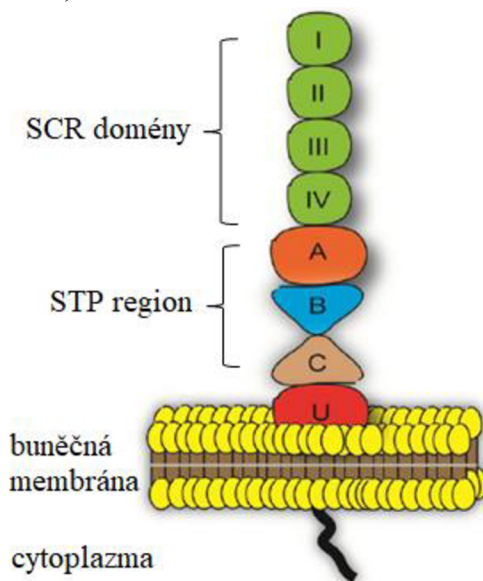
3.5.3 Molekula CD46

Molekula CD46 bývá označována jako MCP - Membrane Cofactor Protein. Jedná se o transmembránový glykoprotein. Původně byl identifikován jako C3b a CD4b vázající protein lidských periferních krevních buněk. Vyskytuje se v lidských buňkách včetně spermií, ale i v buňkách ostatních savců. V somatických buňkách tento kofaktor usnadňuje degradaci C3b konvertázy, čímž je chrání před účinkem komplementu (Seya a Atkinson 1989; Liszewski et al. 1991; Liszewski et al. 1996).

Funkce proteinu CD46 v regulaci komplementu již byla naznačena, ale ne úplně vysvětlena. CD46 je vnitřním kofaktorem pro štěpení proteinů C3b a C4b, které je zprostředkované faktorem I (Liszewski et al. 1996). CD46 musí být přítomen ve stejné buňce jako je fragment C3b či C4b, proto je nazýván „vnitřním“ kofaktorem (Oglesby et al. 1992). Předpokládá se, že CD46 „skenuje“ buněčnou membránu a brání uloženému fragmentu C3b

inicializovat aktivaci komplementu skrz alternativní cestu aktivace komplementu (Riley-Vargas et al. 2004).

Schéma struktury proteinu CD46 je na obrázku 7. Myší gen *Cd46* obsahuje pouze 11 exonů v porovnání s lidským, který má exonů 14. Exony myšího genu kódují čtyři „sushi“ domény, neboli „short concensus repeats“ (SCR) - na obrázku 7 jsou tyto domény vyznačeny římskými číslicemi. Dále kódují oblast bohatou na serin, threonin a prolin neboli „STP“, transmembránovou doménu, intracytoplazmatickou kotvu a cytoplazmatický konec (Miwa et al. 1998; Tsujimura et al. 1998). Na obrázku 7 je vyznačena pod písmenem „U“ doposud neznámá oblast (Delpout et al. 2014).



Obrázek 7 Struktura proteinu CD46 (převzato a upraveno Delpout et al. 2014)

Lidský MCP se vyskytuje v několika izomerech a je široce distribuovaný, s výjimkou erytrocytů je exprimován u všech typů buněk (Post et al. 1991). U prasat a primátů byl tento protein detekovaný na většině typů buněk, a to včetně erytrocytů (Hsu et al. 1997). Naopak u myši, potkanů a morčat není tak široce distribuován. Exprese mRNA byla u těchto zvířat detekovaná především či pouze v testis (Hosokawa et al. 1996; Tsujimara et al. 1998, Mead et al. 1998).

Různé izoformy proteinu vznikají alternativním sestřihem STP a cytoplazmatických částí u somatických buněk. Na spermii žádné polymorfismy nalezeny nebyly (Valentovičová et al. 2005). V lidské populaci jsou popsány tři fenotypy tohoto proteinu:

- 65kDa forma, která je vysoce O-glykosylovaná s 65% výskytem v populaci
- 55kDa forma, která je méně O-glykosylovaná s 6% výskytem v populaci
- 65kDa a 55kDa forma exprimovaná přibližně ve stejném poměru u jednoho jedince najednou, s 29% výskytem v populaci (Seya et al. 1999).

Daná fenotypová forma je identická pro všechny buňky konkrétního jedince, ale je zde několik výjimek. V mozku a spermatocytech je exprimována 55kDa forma, zatímco v ledvinách je dominantní 65kDa forma (Johnstone et al. 1993).

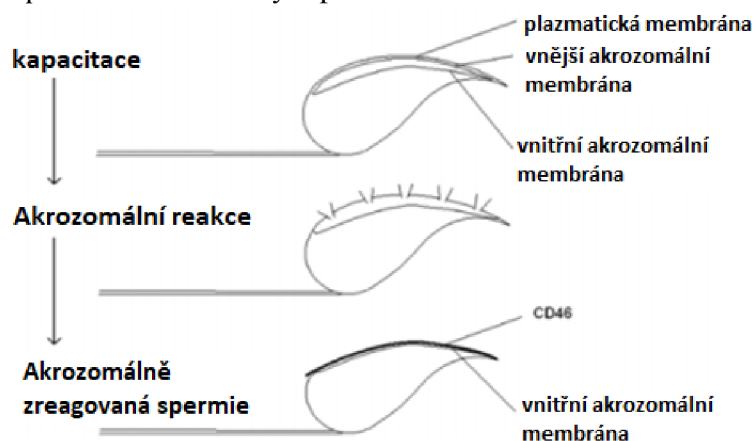
Prasečí protein CD46 byl poprvé identifikován v roce 1997 van der Bergem et al. Pomocí panelu monoklonálních protilátek identifikovali prasečí protein, který je analogem k lidskému MCP. Prasečí protein CD46 o velikosti 50-60 kDa je exprimován na velkém

množství buněk včetně cirkulujících a endoteliálních buněk. Oproti lidskému MCP se hojně vyskytuje i na erytrocytech. Pro potvrzení identity tohoto proteinu studovali i funkční aktivitu – schopnost proteinu štěpit C3b (van den Berg et al. 1997).

Co se týče reprodukčního traktu samice, MCP není exprimován na neoplozených oocytech, ale objevuje se na 6-8 buněčném embryu. Dále je detekovatelný v tkáni vejcovodu, v placentě a v děložním endometriu (Liszewski et al. 1991).

Ve spermiích je CD46 přítomen na akrozomálních membránách (Inoue et al. 2003). Vzhledem k jeho lokalizaci je po akrozomální reakci detekovatelný na vnitřní akrozomální membráně (Riley et al. 2002). Studie Frolíková et al. (2016) ukázala, že během akrozomální reakce dochází k relokaci MCP z akrozomu do ekvatoriálního segmentu a přes celou hlavičku spermie.

U hlodavců se dle Mizuno et al. (2004) exprimuje výhradně na akrozomální membráně zralé spermie a na jejím přímém prekurzoru, spermatidě. Lokalizace CD46 ve spermii myši je vyobrazena na obrázku 8. Na lidských spermiích je lokalizován na vnitřní akrozomální membráně (Anderson et al. 1989; Okabe et al. 1990). Později byl protein CD46 detekován na spermiích u skotu (Jankovičová et al. 2008). Studie přítomnosti diskutovaného proteinu na prasečích spermiích zatím nebyla publikována.



Obrázek 8 Lokalizace CD46 na spermii (převzato a upraveno Frolíková et al. 2012)

Další studie se zabývala fertilitou myších samců s vyřazeným genem pro protein CD46. CD46 *-/-* deficiční samci, netrpěli abnormálními varlaty a jejich spermie byly fertily, ale vykazovali větší míru spontánní akrozomální reakce, což poukazuje na možnou roli CD46 ve stabilizaci akrozomální membrány (Inoue et al. 2003). Jedna z možností, jak by tento protein mohl stabilizovat akrozomální membránu, je interakce s β 1-integriny (Liu et al. 2000).

Zajímavostí je že u myšic (*Apodemus*), spadajících do čeledi myšovití, nedochází během spermatogeneze k translaci CD46 proteinu. To znamená, že na spermii myšic není tento protein přítomný (Johnson et al. 2007). Ztráta spermatického CD46 proteinu může být výhodou u těchto myší, které jsou vystaveny velkému množství genitálních patogenů. Některé patogeny se totiž vážou na CD46 a využívají tento protein jako receptor, skrz který vstupují do buňky (Frolíková et al. 2012). Jedná se například o lidský herpes virus-6 (Santoro et al. 1999), některé adenoviry (Gaggar et al. 2003; Wu et al. 2004), některé streptokoky, (Okada et al. 1995), vir spalniček (Dorig et al. 1993; Naniche et al. 1993) nebo bakterie *Neisseria*. (Kallstrom et al. 1997).

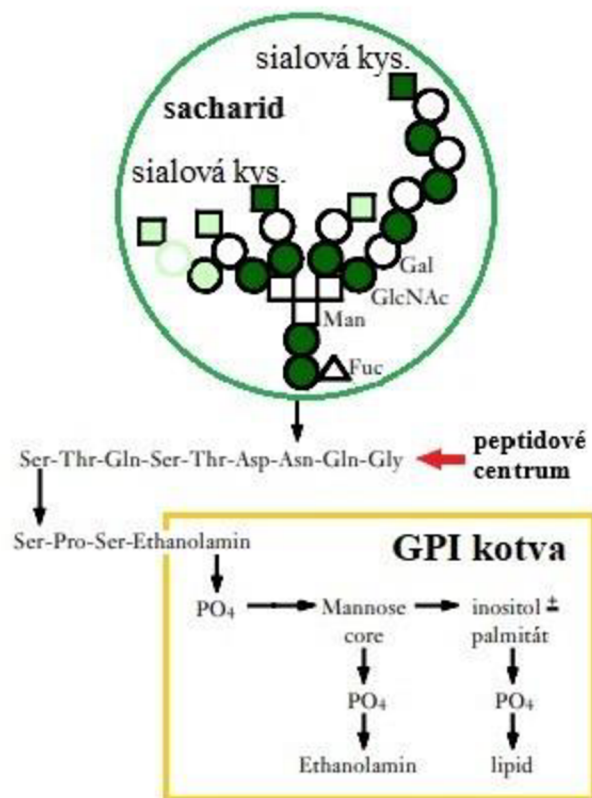
Diskutuje se o tom, že by CD46 mohl být fúzním proteinem spermie a tvořit tak vazbu s komplementárním proteinem na povrchu oocyty. Poukazuje na to absence SCR1 ektodomény, která má důležitou roli ve fertilizaci, ve všech typech buněk kromě spermií u opic Nového Světa (Riley et al. 2002b). Potvrzuje to i fakt, že monoklonální protilátka proti této ektodoméně blokuje vazbu lidských spermií na zona-free oocytů *in vitro* (Okabe et al. 1990; Taylor et al. 1994). Nedávno byl objeven nový ligand pro CD46 – Jagged-1 (Le Fric et al. 2012), který je hojně exprimován oocyty (Johnson et al. 2001). Prostřednictvím vazby CD46 s Jagged-1 by CD46 mohl působit jako mediátor počátečních kroků interakce spermie s vaječnou oolemou (Frolíková et al. 2016). Vzhledem k přítomnosti CD46 i v ekvatoriálním segmentu spermie, se kterým jako prvním přichází do kontaktu oocyt, interakce mezi CD46 na spermii a komplementárním proteinem na oocyty by vysvětlovala idiopatickou infertilitu pozorovanou u lidí při snížené expresi CD46 (Nomura et al. 2001; Frolíková et al. 2016).

V reprodukčním traktu samice se nachází spousta komponent komplementu, které chrání její buňky před patogeny. Předpokládá se, že spermie by měla disponovat nějakým druhem ochrany proti účinku komplementu (Frolíková et al. 2012). Vzhledem k lokalizaci na akrozomální membráně může CD46 molekula chránit spermii před účinkem komplementu pouze po akrozomální reakci. Plazmatická membrána spermie a další proteiny regulující komplement asociované s plazmatickou membránou zanikají a vnitřní akrozomální membrána je vystavena prostředí samičího pohlavního traktu. Nicméně, vnitřní akrozomální membrána s CD46 je prostředí vystavena po velmi krátkou dobu – pouze než dojde k samotné fúzi gamet. Ovšem diskutovaný protein je stále exprimovaný, jelikož většina spermií k oocyty nepronikne. CD46 se tak může účastnit odstranění nadbytečných spermií fagocytózou. Hlavní funkcí této molekuly tedy pravděpodobně nebude ochrana spermie proti účinku komplementu (Clift et al. 2009).

3.5.4 Molekula CD52

Molekula CD52 je označována jako hlavní komponenta glykokalyxu spermie. Jedná se o glykoprotein, jehož velikost je u potkanů přibližně 26 kDa (Olson & Hamilton 1978). Obecně je však uváděno rozmezí 25-29 kDa (Hale 2001). Tento protein je vázaný na membránu přes glykofosfatidylinositol, neboli přes GPI kotvu (Yeung et al. 2001). Protein není detekovatelný v testis, ale je hlavním povrchovým glykopeptidem na spermii z *cauda epididymis*. Právě kvůli jeho posttestikulárnímu výskytu na spermii je také označován jako hlavní povrchový antigen spermie asociovaný s maturací (Zeheb a Orr 1984; Moore et al. 1989).

Struktura proteinu je zobrazena na obrázku 9. Samotné peptidové centrum proteinu CD52 je velmi malé. Na Asn-3 je navázán sacharidový komplex, který je na obrázku 9 vyznačen zeleným oválem. Tento velký komplex je dvakrát až třikrát větší než samotné peptidové centrum a obsahuje zbytky sialové kyseliny, které mají negativní náboj. GPI kotva, vyobrazená v oranžovém čtverci na obrázku 9, drží protein ve vnější vrstvě buněčné membrány (Xia et al. 1993; Treumann et al. 1995). Byla identifikována i rozpustná forma proteinu CD52 bez GPI kotvy, která má nižší negativní náboj než forma s GPI kotvou. (Della Giovampaola et al. 2001).



Obrázek 9 Struktura proteinu CD52 (převzato a upraveno Hale 2001)

Lidský CD52 antigen je sekretovaný epididymálními buňkami a transferován do plazmatické membrány spermie během jejich průchodu epididymem (Kirchhoff 1996). U člověka je na konci kapacitace detekován v ekvatoriálním segmentu hlavičky spermie (Yeung et al. 2001). Rozpustná forma proteinu byla detekována v ejakulované spermii a semenné plazmě. (Della Giovampaola et al. 2001).

Michalková et al. (2010) potvrdila podobný výskyt CD52-like molekuly i u skotu, respektive u býka. Býčí CD52 je sekretován epididymálním epitelem a poté integrován do membrány spermie během transportu epididymem. Ve spermiiích z *testes* molekula detekována nebyla, zatímco největší výskyt byl v *cauda epididymis* (Michalková et al. 2010).

Funkce CD52 vázaného na membránu spermie není plně vysvětlena. Obecně molekula v samčí reprodukční tkáni potlačuje hemolýzu závislou na komplementu skrz klasickou cestu aktivace komplementu (Koyama et al. 2009). Studie Flori et al. (2008) ukázala, že CD52 na povrchu spermie je receptorem pro semenogelin I během utváření sraženin. Odštěpení GPI kotvy z některých CD52 molekul je součástí procesu zkapalnění lidského ejakulátu, při kterém jsou spermie uvolněny ze sraženin (Flori et al. 2008).

4 Metodika

V následujících podkapitolách je popsána metodika praktické části této diplomové práce.

4.1 Zpracování biologického materiálu

V této kapitole je uvedeno zpracování biologického materiálu – rozmražení spermií, zpracování spermií z inseminační dávky, *in vitro* kapacity a akrozomální reakce spermií. Dále je zde popsána frakcionace membrán kančích spermií, příprava vzorků tkání pro SDS elektroforézu v polyakrylamidovém gelu a izolace ribonukleové kyseliny (RNA) z reprodukčních orgánů kance.

4.1.1 Rozmražení spermií

Dodavatelem býčích spermií byla Inseminační stanice býků Zásmuky (CRV Czech republic, s.r.o.). Kančí spermie pocházely z inseminačního centra Liprapork Inc. (Skršín, Česká republika). Ejakuláty od oubou savců byly zamrazeny dle standardního protokolu. Spermie byly kryokonzervovány v pejetách a uloženy v kontejneru s tekutým dusíkem. Z tekutého dusíku byl příslušný vzorek spermií opatrně vyndán a umístěn do vodní lázně, která byla předem vyhřáta na 37 °C. Inkubace pejet v lázni probíhala 1 minutu. Suspenze spermií byly poté přeneseny do 1,5ml zkumavek. Následně bylo třeba spermie odmyt od kryokonzervačního roztoku. Vzorky byly vloženy do centrifugy (MiniSpin Plus; Ependorf, Německo) a stočeny při 300 x g 5 minut. Po stočení byl odstraněn supernatant a k peletě spermií byl napipetován 1 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; Sigma-Aldrich, USA). Vzorek byl opatrně resuspendován a znovu stočen při stejných podmínkách. Po centrifugaci byl odpipetován supernatant a peleta byla resuspendována v 500 µl DPBS.

4.1.2 Ejakulované spermie

Kančí spermie použité pro praktickou část této diplomové práce pocházely z inseminačních dávek kanců z inseminačního centra Liprapork Inc. (Skršín, Česká republika). Spermie byly převáženy v chladícím boxu při 17 °C. Inseminační dávky byly zpracovány do dvou dnů od dodání, respektive od odběru ejakulátu. V prostorách laboratoře Katedry veterinárních disciplín ČZU byly inseminační dávky uloženy v inkubátoru při 17 °C. Pro frakcionaci membrán kančích spermií (kap. 4.1.5 Frakcionace membrán spermií) byl použit nativní ejakulát, který byl dodán taktéž z inseminační stanice Skršín.

Do 15ml falkon bylo odměřeno po 5 ml inseminační dávky. Pro odstranění ředidla byly spermie stočeny v centrifuze (LC-8 5000, Benchmark Scientific Inc., USA) při 300 x g po dobu 10 min při laboratorní teplotě. Byl odpipetován supernatant (ředící roztok inseminační dávky) a k peletě spermií byl přidán promývací roztok PBS (0,01M Phosphate-buffered saline, 0,138M NaCl, 0,0027M KCl, pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA). Spermie byly opatrně resuspendovány a opět proběhla centrifugace při 300 x g po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Po centrifugaci byl supernatant opět odpipetován. Tento promývací

krok byl zopakován celkem dvakrát. Došlo tak k důkladnému promytí spermií od ředícího roztoku, který je v inseminačních dávkách obsažen.

Po promytí spermií byla peleta resuspendována v 5 ml PBS. Poté byla tato suspenze rozpipetována do zkumavek po 1 ml. Pro přípravu mikroskopických preparátů byly takto připravené suspenze spermií ještě zředěné v PBS v poměru 1:5 a následně použity pro nepřímou imunofluorescenci na sklíčku. Pro získání vhodných vzorků k SDS elektroforéze byly zkumavky s 1 ml suspenze centrifugovány při 300 x g po dobu 10 min v centrifuze (Mikro 22R Hettich Zentrifugen, DJB Labcare, UK) vychlazené na 17 °C. Po centrifugaci byl ze zkumavek odstraněn supernatant tak, aby získané pelety spermií byly co nejsušší. Zkumavky s peletami spermií byly uloženy do -20°C pro další využití.

4.1.3 *In vitro* kapacity spermií

Do falkony k promyté peletě ejakulovaných kančích spermií bylo přidáno 10 ml kapacitačního média (viz níže). Směs byla resuspendována a následně přepipetována po 1 ml do 1,5 ml zkumavek. Zkumavky s otevřenými víčky byly uloženy na 1,5 h do termostatu, který byl nastaven na 38 °C a 5% CO₂.

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

Po kapacitaci byla část zkumavek ponechána pro akrozomální reakci (kap. 4.1.4 Akrozomální reakce spermií). Pelety spermií ve zbylých zkumavkách byly 3x promyty v PBS a následně připraveny pro nepřímou imunofluorescenční mikroskopii (kap. 4.3 Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie) a SDS elektroforézu (kapitola 4.4.1 Příprava vzorků pro SDS-PAGE).

4.1.4 Akrozomální reakce spermií

Pro indukci akrozomální reakce byl k suspenzi kapacitovaných kančích spermií v přidán calcium ionofor (A23187; Sigma-Aldrich, USA) do finální koncentrace 10 μM. Zkumavky byly vloženy zpět do inkubátoru nastaveného na 38 °C a 5% CO₂. Inkubace probíhala s otevřenými víčky zkumavek po dobu 1 h.

Po inkubaci byly vzorky stočeny na centrifuze při laboratorní teplotě, 300 x g po dobu 10 minut. Následně byly pelety spermií 3x promyty v PBS a připraveny pro nepřímou imunofluorescenční mikroskopii (kap. 4.3 Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie) a SDS elektroforézu (kap. 4.4.1 Příprava vzorků pro SDS-PAGE).

4.1.5 Frakcionace membrán spermií

Byla provedena frakcionace membrán kančích spermií z nativního ejakulátu. Pro tuto metodu bylo nutné předem připravit a vychladit tyto roztoky:

- Krebs-Ringer pufr (pH 7,0-7,6) – v 90 ml destilované vody bylo rozpuštěno 12,5 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 34 mg KCl, 1,198mM NaCl, 18 mg NaH_2PO_4 , 49 mg fruktózy, 126 mg NaHCO_3 a následně doplněno destilovanou vodou do 100 ml.
- roztok 0,15M NaCl a 5mM Hepes (pH 7)
- roztok 1,3M sacharózy v 0,9% NaCl
- roztok 1,75M sacharózy v 0,9% NaCl
- 1M benzamidin
- 1% Triton-X100 v TBS (tris-buffered saline; 0,05M tris, 0,15M NaCl) pH 7,5.

Ejakulát byl přenesen do 50ml sterilních falkon a stočen na centrifuze (centrifuge 5804 R; Eppendorf, Německo) při 400 x g 4°C po dobu 20 min. Poté byl odpipetován supernatant tak, aby nedošlo ke zviření pelety spermii. Peleta byla promyta ve sterilním PBS opětovným stočením za stejných podmínek. K peletě spermii byl přidán vychlazený Krebs-Ringer pufr (na 1 díl spermii 2 díly pufru) a směs byla resuspendována. Suspenze byla nanesena na roztok 1,3M sacharózy s 0,9% NaCl do 50ml falkon a centrifugována 30 min při 2000 x g a 4 °C.

Po stočení byl supernatant odsán a peleta resuspendována v roztoku 0,15M NaCl a 5mM Hepes (pH 7). Suspenze byla nanesena na roztok 1,3M sacharózy s 0,9% NaCl do 14ml ultracentrifugačních zkumavek (Ultra-Clear centrifuge tubes 14 x 95 mm; Beckman Clouter Inc, USA). Zkumavky v kyvetách byly vloženy do vychlazené ultracentrifugy (Optima XPN-90; Beckman Coulter Inc., USA) a centrifugovány při 4°C a 340000 x g po dobu 20 min.

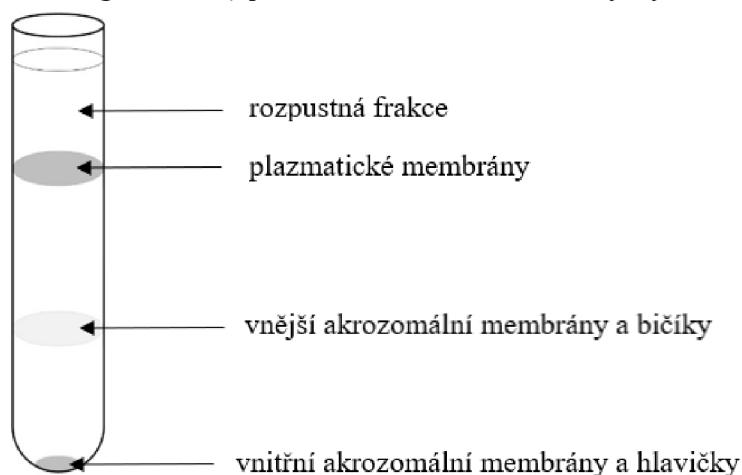
Po centrifugaci byl odsán supernatant a peleta byla resuspendována v roztoku 0,15 NaCl a 5 mM Hepes pufru. K této směsi byla přidána 1 tableta koktejlu proteázových inhibitorů (cOmpete Mini, Mini Protease Inhibitor Cocktail; Hoffmann-La Roche, Švýcarsko) na 10 ml roztoku 0,15 NaCl a 5mM Hepes pufru.

Následně byla suspenze sonikována (ultrasonikátor UP50H; Hielscher Ultrasound Technology, Německo) v kádince při plné amplitudě sonikátoru. Po každém 20s sonikačním intervalu byla kádinka na 1 min umístěna na led, aby se zabránilo přehřátí. Průběžně bylo pomocí mikroskopu kontrolováno, zda se oddělily bičíky od hlaviček spermii. V případě, že cca 80 % spermii mělo oddělný bičík od hlaviček, byla sonikace ukončena.

Suspenze byla navrstvena na sacharózový gradient do 14ml ultracentrifugačních zkumavek. Gradient se skládal roztoku 1,75M sacharózy s 0,9% NaCl, na který byl opatrně navrstven roztok 1,3M sacharózy s 0,9% NaCl. Zkumavky v kyvetách byly centrifugovány ve vychlazené ultracentrifuze (Optima XPN-90) ve výkyvném rotoru SW40Ti při 4°C a 95000 x g po dobu 3 hodin.

Po centrifugaci byly ve zkumavkách dobře pozorovatelné prstence – viz obrázek 10. První rozpustná frakce byla odebrána do sterilní falkony a zamrazena. Prstence byly pomocí pipety odebrány do 14ml ultracentrifugačních zkumavek. Zbytek supernatantu byl odsán a peleta promyta od sacharózy přidáním vychlazeného PBS a centrifugací 3500 x g po dobu 5 min (Centrifuge 5804 R). Promývací krok byl proveden 2x. Peleta byla resuspendována v lyzačním roztoku obsahující 1% Triton X-100 v TBS (pH 7,5), ke kterému byl přidán koktejl proteázových inhibitorů (cOmpete Mini, Mini Protease Inhibitor Cocktail)

a inkubována při 4 °C po dobu 1 h. Poté byla provedena centrifugace při 4 °C 21 500 x g (Centrifuge 5804 R) po dobu 20 min. Následně byl lyzát zamrazen.



Obrázek 10 *Frakce membrán*

Zkumavky s prstenci byly doplněny vychlazeným PBS a centrifugovány v ultracentrifuze (Optima XPN-90) s výkyvným rotorem SW40Ti při 4 °C 30 min na 120000 g. Následně byl supernatant odsán a pelet resuspendován v lyzačním roztoku obsahující 1% Triton-X-100 v TBS pH 7,5, ke kterému byl přidán koktejl proteázových inhibitorů (cOmplete Mini, Mini Protease Inhibitor Cocktail). Tato směs byla inkubována při 4°C po dobu 1 h. Poté byla směs centrifugována při 4 °C 21500 x g (Centrifuge 5804 R) po dobu 20 min. Následně byl lyzát zamrazen.

Pro získání vhodných vzorků pro SDS elektroforézu byly lyzáty nejprve precipitovány pomocí vymraženého acetonu. Ke 100 µl lyzátu bylo přidáno 600 µl vymraženého acetonu. Tato směs byla 1 hodinu inkubována při -20 °C. Po inkubaci byly zkumavky vloženy do vychlazené centrifugy (Centrifuge 5804 R) na 4 °C a stočeny při 5000 x g 5 minut. Poté byl supernatant odstraněn a k peletě byl napipetován vzorkový pufr (0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8; glycerol; 2% SDS; 0,05% bromfenolová modř; Sigma-Aldrich) dle velikosti pelety. Vzorky byly voretexovány, 5 minut povařeny a ihned použity pro SDS elektroforézu či byly uloženy při -20 °C.

4.1.6 Příprava tkání

Pro experimenty byly připraveny extrakty proteinů z reprodukčních orgánů kance (*testes, caput epididymis, corpus epididymis a cauda epididymis*) lyzačními roztoky.

a) Lyzace tritonem

Testikulární a epididymální tkáň o hmotnosti 100 mg byla homogenizována v 500 µl 1% Tritonu X-100 Tris-HCl (pH 7,8) s 50mM NaCl pomocí homogenizátoru IKA T10 basic (IKA Werke, Německo). Po homogenizaci byla tkáň centrifugována při 10 000 x g a 4 °C po dobu 5 min (Centrifuge 5804 R). Pro precipitaci vzorku bylo odebráno 100 µl supernatantu, ke kterému bylo přidáno 600 µl vymraženého acetonu. Vzorek byl 1 hodinu inkubován při -20 °C. Po inkubaci byl vzorek stočen na centrifuze při 5000 x g, 5 min při 4 °C. Supernatant byl odstraněn a k peletě přidán neredukující vzorkový pufr (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; glycerol; 2% SDS; 0,05% bromfenolová modř; Bio-rad). Pro redukující podmínky byl do vzorkového pufru

přidán merkaptoetanol v takovém množství, aby jeho koncentrace byla 5%. Poté byl vzorek 5 min povařen a následně použit pro SDS elektroforézu.

b) Lyzace SDS vzorkovým pufrem

Testikulární a epididymální tkáň o hmotnosti 100 mg byla vložena do homogenizační zkumavky s 500 μ l vzorkového pufru (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; glycerol; 2% SDS; 0,05% bromfenolová modř; Bio-rad) a homogenizována pomocí tkáňového homogenizátoru (Precellys 24 Tissue homogenizer; Bertin Instruments, Francie) při rychlosti 5000 otáček za minutu po dobu 20 vteřin. Homogenizace byla celkem pětkrát opakována a mezi jednotlivými cykly byla zkumavka se vzorkem chlazená na ledu. Zhomogenizované tkáně byly 2 minuty centrifugovány v centrifuze (Centrifuge 5804 R) při 4°C a 10000 x g. Supernatant byl přenesen do čisté 1,5ml zkumavky. Takto připravený vzorek byl následně použit pro SDS elektroforézu.

4.1.7 Izolace RNA z tkáně

RNA byla izolována z reprodukčních orgánů kance – z *testes*, *caput epididymis*, *corpus epididymis* a *cauda epididymis*.

Do homogenizační zkumavky bylo vloženo 100 mg tkáně a přidáno 1 ml roztoku TRI reagent (Molecular Research Center, Inc., USA). Zkumavka byla vložena do tkáňového homogenizátoru (Precellys 24 Tissue homogenizer) a homogenizována při rychlosti 5000 otáček za minutu po dobu 20 vteřin. Následně byla zkumavka chlazená ledem 2 minuty. Homogenizace a chlazení bylo opakováno celkem pětkrát. Poté byla směs inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Směs byla přepipetována do čisté zkumavky, do které bylo následně napipetováno 0,1 ml 1-brom-3-chlor propanu. Směs byla inkubována 10 minut při pokojové teplotě a průběžně vortexována. Následně byla zkumavka stočena v centrifuze (Centrifuge 5804 R) na 12000 x g při 4 °C po dobu 15 minut. Během centrifugace se směs ve zkumavce rozdělila na 3 fáze – RNA, DNA a proteiny.

Následovala samotná izolace RNA, která probíhala v boxu určeného pro práci s RNA (UVT-B-AR, DNA/RNA UV-cleaner box; Biosan, Lotyšsko). K horní fázi obsahující RNA, která byla přepipetována do čisté 1,5ml zkumavky, bylo přidáno 0,5 ml isopropanolu. Směs byla vortexována a inkubována 10 min při pokojové teplotě. Následně byla zkumavka vložena do centrifugy (Centrifuge 5804 R;) a směs byla stočena při 12000 x g při 4 °C po dobu 10 minut. Po centrifugaci byla na dně a stěně zkumavky patrná peleta RNA. Supernatant byl odpipetován a peleta promyta v 1ml 75% ethanolu, následovalo vortexování a centrifugace při 7500 g a 4°C po dobu 5 min (Centrifuge 5804 R). Poté byla peleta resuspendována v 50 μ l tkáňové H₂O.

Koncentrace RNA a čistota vzorku byla měřena spektrofotometrem NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Čistota RNA byla zjištěna poměrem absorbance při 260 a 280 nm. Očekávaný poměr absorbance 260/280 pro čistou RNA je 2,0. Dále byl vypočítán poměr absorbance 260/230 sloužící jako dodatečný ukazatel čistoty RNA. Ideální hodnota poměru absorbance 260/230 je v rozmezí 2,0 – 2,2. Vzorek RNA byl následně uložen při 80 °C.

4.2 Použité protilátky pro imunodetekční metody (imunodetekce, nepřímá imunofluorescenční mikroskopie)

Primární protilátky

Monoklonální myší IgG protilátka proti lidské CD46 – klon M177 (Thermo Fisher Scientific)

Monoklonální krysí IgG protilátka proti myší CD46 – klon MM10 (Abcam, Velká Británie)

Monoklonální myší IgG protilátka proti CD46 – klon 13G10 (Cyt-2): proti aminokyselinové sekvenci C-konce cytoplazmatického konce lidského proteinu (Sigma-Aldrich)

Monoklonální myší IgG protilátka (klon MEM258) proti epitopu na SCR4 doméne lidského proteinu CD46, konjugovaná s FITC (EXBIO Praha, a.s., Česká republika)

Monoklonální myší IgG protilátka proti prasečí CD52 (11/305/44) (Invitrogen, USA)

Monoklonální myší protilátka proti α -tubulinu - klon DM1A (Sigma-Aldrich)

Sekundární protilátky

Kozí protilátka proti myším IgG (H+L) konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP) (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

Kozí protilátka proti krysím IgG (H+L) konjugovaná s HRP (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Velká británie)

Kozí protilátka proti myším IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (Invitrogen)

4.3 Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie

Pro nepřímou imunofluorescenční mikroskopii byly připraveny vzorky spermií ejakulovaných, kapacitovaných a spermií po indukci akrozomální reakce. Vzorky byly připraveny buď metodou vlhké fixace buněk na mikroskopické sklíčko s následnou inkubací s protilátkou na sklíčku, nebo inkubací s protilátkou přímo v suspenzi buněk.

4.3.1 Lokalizace proteinů ve spermiích fixovaných na mikroskopickém sklíčku

Pro přípravu preparátu se spermii ejakulovanými, kapacitovanými a se spermii po indukci akrozomální reakce byla použita hydrofobní fixa (PAN Pen liquid blocker; Sigma-Aldrich). Fixou byla na podložní sklíčko nakreslena dvě kolečka. Do každého kolečka bylo napipetováno 20 μ l suspenze spermií a 50 μ l vymraženého roztoku acetonu s metanolem v poměru 1:1. Po 5 minutách byl fixační roztok odstraněn oplachem sklíčka pomocí PBS. Sklíčko bylo osušeno a připraveno pro detekci proteinů pomocí protilátky metodou nepřímé imunofluorescence.

Do každého kolečka bylo pipetováno 150 μ l blokovacího roztoku SuperBlock (Blocking Buffer in PBS; Thermo Fisher Scientific). Inkubace blokovacím roztokem probíhala na vlhké buničině v temnu po dobu 30 minut. Následně byla sklíčka opláchnuta v PBS a osušena. Do koleček určených pro detekci proteinů bylo pipetováno 100 μ l roztoku primární protilátky. Ředění primárních protilátek je uvedeno v tabulce 3. Do koleček určených pro negativní kontrolu bylo napipetováno 100 μ l PBS. Inkubace preparátů s primární protilátkou probíhala ve vlhké komůrce přes noc nebo 2 hodiny v lednici. Druhý

den byla sklíčka opláchnuta v PBS a osušena. Dále bylo do koleček napipetováno 100 μ l roztoku sekundární protilátky proti myším IgG konjugované s Alexa Fluor 488 naředěná 1:300 v PBS. Inkubace se sekundární protilátkou probíhala ve vlhké komůrce v lednici 1 hodinu. Poté byla sklíčka opláchnuta v PBS a osušena. Pro vizualizaci integrity akrozomu byly preparáty inkubovány se 100 μ l PNA lektinu konjugovaného s rhodaminem (Rhodamin Peanut agglutinin, Vector Laboratories, USA) v PBS v poměru 1:700. Vzorky byly opět umístěny do vlhké komůrky a inkubovány 30 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byla sklíčka opláchnuta v PBS a destilované vodě. Po důkladném osušení bylo do každého kolečka pipetováno 5 μ l montovacího média s DAPI (Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories) pro zamontování preparátu a k vizualizaci jádra buňky. Následovala závěrečná 10minutová inkubace a poté byly vzorky vyhodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu (E400; Nikon, Japonsko). Fotografie snímané pomocí kamery byly zpracovány pomocí programu NIS.

Tabulka 3 Ředění primárních protilátek - nepřímá imunofluorescence

Protilátka	Ředění v PBS
Protilátka proti lidské CD46 (klon M177)	1:100, 1:50, 1:10, 1:5
Protilátka proti lidské CD46 (klon MM10)	1:100, 1:50
Protilátka proti lidské CD46 (klon MEM258) konjugovaná s FITC	1:20, 1:10
Protilátka proti lidské CD46 (klon 13G10) - Cyt-2	1:200, 1:100, 1:50
Protilátka proti prasečí CD52 (11/305/44)	1:200, 1:100, 1:50

4.3.2 Lokalizace proteinů ve spermiiích v suspenzi s následnou fixací na sklíčko

Pro detekci studovaných proteinů pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie byly připraveny vzorky pro inkubaci protilátky se spermii v suspenzi. V tomto případě probíhá navázání protilátky na spermii přímo v suspenzi buněk. Oproti předchozí metodě (4.6.1 Lokalizace proteinů ve spermiiích fixovaných na mikroskopickém sklíčku) jsou spermie na sklíčko fixovány až po inkubaci s primární a sekundární protilátkou.

Po promytí buněk v DPBS (Sigma-Aldrich) byly vzorky stočeny v centrifuze (MiniSpin Plus) při 300 x g 5 minut. Poté byl supernatant odpipetován. K peletě obsahující 10-15 miliónů spermii bylo přidáno 100 μ l roztoku primární protilátky, ve kterém byly spermie po resuspendování inkubovány 30 minut při pokojové teplotě. Ředění použitých primárních protilátek v PBS je uvedeno v tabulce 4 níže. Pro negativní kontrolu byly spermie inkubovány pouze s DPBS. Následně byly vzorky centrifugovány při 300 x g 5 minut a poté byl supernatant odpipetován. Pro odstranění nenavázané protilátky bylo k peletám spermii napipetováno 500 μ l DPBS, pelety byly resuspendovány, vzorky stočeny při 300 x g 5 minut a následně byl supernatant odpipetován. Tento promývací krok byl ještě jednou zopakován. Následovala 30minutová inkubace spermii v roztoku se sekundární protilátkou proti myším IgG Alexa Fluor 488, která byla naředěna 1:300 v DPBS. Inkubace probíhala ve tmě při pokojové teplotě. Poté, stejně jako po inkubaci s primární protilátkou, následovala centrifugace a promytí nenavázané protilátky. Po promytí buněk od sekundární protilátky bylo třeba spermie zafixovat na mikroskopické sklíčko. Na sklíčko bylo hydrofobní fixou

nakresleno kolečko, do kterého bylo napipetováno 20 μ l suspenze spermií a 50 μ l vymraženého roztoku acetonu s methanolem v poměru 1:1. Po 5 minutách byla sklíčka opláchnuta fyziologickým roztokem (0,9% NaCl; Lachner, Česká republika). Po osušení sklíček bylo do koleček napipetováno 150 μ l blokovacího roztoku SuperBlock. Sklíčka byla umístěna do temna na vlhkou buničinu, kde probíhala inkubace po dobu 30 minut. Dále byla provedena 30minutová inkubace ve tmě na vlhké buničině s roztokem PNA lektinu konjugovaného s rhodaminem (Rhodamin Peanut agglutinin) v DPBS v poměru 1:700. Takto připravené vzorky byly taktéž vyhodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon (E400, Japonsko).

Tabulka 4 Ředění primární protilátek v suspenzi

Protilátka	Ředění v DPBS
Protilátka proti lidské CD46 (M177)	1:5
Protilátka proti prasečí CD52	1:20

4.4 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) slouží k separaci proteinů na základě jejich elektroforetické pohyblivosti. V následujících podkapitolách je popsána příprava vzorků pro tuto metodu a samotná elektroforéza.

4.4.1 Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Vzorky pro elektroforézu byly připraveny v neredukujících či v redukujících podmínkách. Pro neredukující podmínky byla extrakce proteinů provedena lyzáci pelet spermií ve vzorkovém pufru (0,5M TRIS-HCl, pH 6,8; glycerol; 2% SDS; 0,05% bromfenolová modř; Bio-rad). K 50 μ l peletě spermií bylo přidáno 150 μ l vzorkového pufru. Vzorek byl resuspendován a inkubován 30 minut na ledu. Během inkubace byl vzorek vortexován každých 5 minut. Následně byl 5 minut povařen a centrifugován 2 minuty při 10000 x g a 4 °C (Centrifuge 5804 R). Supernatant byl ihned použit pro SDS-PAGE nebo uložen při -20 °C. Pro dosažení redukujících podmínek byl ke vzorkovému pufru přidán 2-merkptoethanol do výsledné koncentrace v pufru 5%.

4.4.2 SDS-PAGE

Pro vertikální elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS byla sestavena aparatura Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad) se skly a vložena do stojanu. Poté byl připraven separační gel – 12% nebo 7,5% (viz tabulka 5). K roztoku připraveného dle tabulky 2 bylo těsně před aplikací přidáno 4,5 μ l TEMED (Pharmacia Biotech, Švédsko) a 70 μ l 10% roztoku APS (persíran amonný; Sigma-Aldrich). Roztok separačního gelu byl nalit mezi připravená skla a poté byl převrstven destilovanou vodou. Polymerace gelu probíhala 30 minut.

Tabulka 5 Separční gel pro SDS-PAGE

Hustota gelů	Destilovaná H ₂ O	Akrylamid (30 % Acrylamide/bis-acrylamide solution 37.5:1; Bio-Rad)	Resolving gel buffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; Bio-Rad)	10% roztok SDS (Bio-Rad)
7,5%	5 ml	2,5 ml	2,5 ml	100 µl
12%	3,5 ml	4 ml	2,5 ml	100 µl

Po polymeraci gelu byla destilovaná voda slita a na ztuhlý separční gel byl nanesen 4% zaostřovací gel, který byl připraven z 1,52 ml destilované vody, 625 µl Stacking gel buffer (0,5M Tris HCl pH 6,8; Bio-Rad), 325 µl 30% akrylamidu (30% Acrylamide/Bis Solution 37.5:1 Bio-Rad) a 25 µl 10% SDS (Bio-Rad). Před aplikací bylo k roztoku přidáno 3,8 µl TEMED (Pharmacia Biotech) a 50 µl 10% roztoku APS (Sigma-Aldrich). Do nalitého separčního gelu byl ihned umístěn 10 či 15 jamkový hřebínek. Separční gel tuhnul 10-15 minut.

Skla s připraveným gelem byla přenesena do aparatury pro elektroforézu a zalita elektrodovým pufrům (15 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu (tris); Sigma-Aldrich), 72 g glycin (Sigma-Aldrich), 5 g SDS (Bio-Rad) v 1 l destilované H₂O; ředěno destilovanou H₂O v poměru 1:4). Do vzniklých jamek byly pipetovány vzorky a 4 µl proteinových molekulárních standardů (Precision Plus Protein Standards Dual Color; Bio-Rad) na 1 jamku. Vzorky byly pipetovány v objemu 12 µl pro 15jamkový gel a v objemu 15 µl pro 10jamkový gel. Aparatura byla uzavřena a zapojena do zdroje elektrického proudu. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 80 V 30 minut a následně 60 minut při konstantním napětí 150 V.

4.5 Western blot (elektropřenos)

Na SDS elektroforézu v polyakrylamidovém gelu navazuje Western blot. Jedná se o elektropřenos proteinů z gelu na membránu. Byl použit systém Mini-Trans blot (Bio-Rad).

Nejprve byl připraven transferový pufr. V 200 ml destilované H₂O bylo rozpuštěno 3,03 g Tris (Sigma-Aldrich) a 14,4 glycinu (Sigma-Aldrich). K roztoku bylo přidáno 200 ml methanolu a následně doplněno destilovanou H₂O do 1 litru. V takto připraveném pufru byly na 15 minut namočeny komponenty pro elektropřenos – 4 výstřižky chromatografického papíru Whatman, 2 houbičky a membrána. PVDF (polyvinylidenfluorid) membránu bylo nutné předem aktivovat 1 minutu v methanolu, zatímco nitrocelulósová (NC) membrána byla rovnou namočena do transferového pufru.

Gel s membránou byl vložen mezi chromatografické papíry a houbičky do kazety tak, aby došlo k přenosu záporně nabitých proteinů z gelu na membránu. Kazeta byla vložena do aparatury pro Western blot. Elektropřenos probíhal po dobu 70 minut při konstantním elektrickém proudu 0,5 A. Aparatura byla během celého procesu chlazena ledem.

Po dokončení elektropřenosu byla membrána z aparatury vyjmuta a opláchnuta v destilované vodě. Pro vizualizaci přenesených proteinů byla membrána inkubována

s roztokem Ponceau (Ponceau S Solution; Sigma-Aldrich) po dobu 60 vteřin. Obarvená membrána byla vyfocena a následně byla barva odmyta roztokem PBS s 0,1% Tweenem 20 (Sigma-Aldrich). Membrána byla dále použita pro imunodetekci proteinů.

4.6 Imunodetekce proteinů

Blokace volných míst na membráně byla provedena hodinovou inkubací membrány na třepačce s 5% roztokem sušeném mléka (Blotto, non-fat dry milk, Santa Cruz Biotechnology) v PBS. Po inkubaci byla membrána promyta v PBS s 0,1% Tweenem. Dalším krokem byla inkubace membrány v roztoku s primární protilátkou. Inkubace probíhala ve sterilních falkonách, do kterých byl napipetován roztok s primární protilátkou a pinzetou byla opatrně vložena membrána. Falkony byly přes noc uloženy na rotační třepačku do chladové místnosti. Ředění primárních protilátek je uvedeno v tabulce 6. Protilátka proti α -tubulinu byla použita pro kontrolu proteinové koncentrace v jednotlivých vzorcích.

Tabulka 6 Ředění primární protilátek pro imunodetekci proteinů

Protilátka	Ředění v PBS
Protilátka proti α -tubulinu (DM1A)	1:5000
Protilátka proti lidské CD46 (klon M177)	1:500
Protilátka proti lidské (klon MM10)	1:500
Protilátka proti prasečí CD52 (11/305/44)	1:500

Následující den byla membrána promyta 3x po 10 minutách v PBS s 0,1% Tweenem. V dalším kroku byla provedena inkubace membrány se sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům konjugovanou s křenovou peroxidázou. V případě primární protilátky MM10 byla použita sekundární protilátka proti krysím IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou. Sekundární protilátka byla ředěna v PBS v poměru 1:3000 a napipetována do falkon k membránám. Inkubace probíhala 1 hodinu na rotační třepačce. Po inkubaci následoval promývací krok, při kterém byla membrána promyta 4x po 5 minutách v PBS s 0,1% Tweenem a 2x v PBS.

Vizualizace specifické detekce proteinu protilátkou byla provedena pomocí chemiluminiscenčního substrátu (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate; Thermo Fisher Scientific) na přístroji Azure c300 Gel Imaging System (Azure Biosystems, USA).

4.7 Kvantitativní PCR

Pro zjištění exprese studovaných proteinů v reprodukčních orgánech kance byly využity vzorky izolované RNA, jejichž příprava byla popsána v kapitole 4.1.7 Izolace RNA z tkáně. Nejprve bylo třeba získat cDNA (komplementární DNA), která vzniká reverzní transkripcí RNA do DNA, a následně byla provedena samotná kvantitativní PCR (qPCR).

4.7.1 Reverzní transkripce

Před samotnou reverzní transkripcí byla provedena inkubace vzorků s enzymem DNasa I. Tento krok slouží k odstranění kontaminující DNA. Do 0,2ml PCR zkumavek byl napipetován 1 μ l DNasa I (Thermo Fisher Scientific), 1 μ l 10x koncentrovaný reakční pufr

pro DNAasu I (10x Reaction Buffer with MgCl₂ for DNasa I; Thermo Fisher Scientific), 2 µg vzorku RNA a potřebné množství tkáňové vody do celkového objemu 10 µl. Vzorky byly vloženy do thermocykleru (Touchgene cycler; Techne, Velká Británie), na kterém byl nastaven program pro inkubaci 30 minut při 37 °C. V dalším kroku byl ke každému vzorku přidán 1 µl 50mM EDTA (Thermo Fisher Scientific) pro odstranění Mg iontů, bez kterých je DNasa I nefunkční. Vzorek byl opět vložen do thermocykleru, na kterém byl nastaven program pro inkubaci 10 minut při 65 °C. Během inkubace byl připraven master mix pro vlastní reverzní transkripci. Pro 1 vzorek bylo pipetováno 4 µl 5x koncentrovaného reakčního pufru pro M-MuLV reverzní transkriptázu (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µl inhibitoru RNáz (RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor; Thermo Fisher Scientific), 2 µl RNA spiku (TATAA Universal Spike II template; TATAA Biocenter, Švédsko), 2 µl 10mM dNTP mix (Thermo Fisher Scientific), 1 µl mixu Oligo (dT)₁₈ primerů (Thermo Fisher Scientific) a náhodných primerů (Random Hexamer Primers, Thermo Fisher Scientific) v poměru 1:1 a 1 µl M-MuLV reverzní transkriptázy (RevertAid Reverse Transcriptase; Thermo Fisher Scientific). Do zkumavek bylo pipetováno po 10 µl připraveného master mixu. Každý vzorek byl zvortexován a stočen na stolní minicentrifuze (Combi-Spin; Biosan, Lotyšsko). Následně byly vzorky umístěny do thermocykleru, kde byl nastaven program, při němž probíhala inkubace vzorků 60 minut při 42 °C a následně 10 minut při 70 °C.

Ke každému experimentálnímu vzorku byla připravena negativní kontrola reverzní transkripce za účelem detekce případné kontaminace genomickou DNA. Příprava vzorků a průběh reakce byl stejný, lišil se pouze poslední krok, kdy místo 1 µl reverzní transkriptázy byla pipetována voda. Navíc byl připraven 1 vzorek pro kontrolu inhibice reakce, tzv. spike kontrola. Místo izolované RNA byla v prvním kroku do zkumavky napipetována tkáňová voda, jinak se příprava a průběh reakce tohoto vzorku od experimentálních vzorků nelišila.

Výsledná cDNA byla pro použití v kvantitativní PCR 10x naředěna – finální koncentrace cDNA ve vzorku byla tedy 10 ng/µl. Vzorky byly následně použity pro kvantitativní PCR nebo uchovávány při -20 °C.

4.7.2 Kvantitativní PCR (qPCR)

Pro qPCR byly navrženy primery vhodné pro detekci exprese proteinů CD46 a CD52 v kančích reprodukčních orgánech. Primery byly navrženy pomocí programu Primer-BLAST (dostupný online - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Navíc byly navrženy primery pro referenční gen *GAPDH* (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza). Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v tabulce 7. Uvedené primery byly objednány u Generi Biotech s.r.o. Dle instrukcí výrobce byly lyofilizované primery rozpuštěny, čímž byly získány 0,1mM roztoky primerů, které byly uchovávány při -80 °C. Dále byly připraveny pracovní roztoky primerů, kdy k 80 µl tkáňové H₂O bylo pipetováno 10 µl „forward“ primeru a 10 µl „reverse“ primeru. Takto připravené pracovní roztoky primerů (tzv. primer mixy) byly uchovávány při -20 °C.

Tabulka 7 *Sekvence primerů pro qPCR*

Název genu	Sekvence primerů (5'→3')	
	Forward primer	Reverse primer
CD46	ACCACCTGGCGAAATTCCAA	GGCTGCTCTCTCCAACAAGT
CD52	GTGGATTCCCTGCGTTCATC	TTGGTGGTGGTTCGGTTTCC
GAPDH	TGAACGGATTTGGCCGCA	CTTGCCGTGGGTGGAATCAT

Pro 1 experimentální vzorek bylo do jamky 96jamkové PCR destičky (Bio-rad) pipetováno: 2 µl tkáňové H₂O, 5 µl barvičky Syber Green (Maxima Syber Green qPCR master mix no Rox; Thermofisher Scientific) a 1 µl primer mixu. Pro kontrolu inhibice byly pipetovány stejné reagenty a byl pro ně použit komerční primer mix Universal Spike I primermix (TATAA Biocenter). Následně byly do destičky pipetovány 2 µl 10x naředěné cDNA. Pro každý gen byla připravena i negativní kontrola, tzv. NTC („no template control“), do které místo cDNA byla pipetována voda. S komerčními spike primery byly testovány všechny experimentální vzorky a spiková kontrola. Všechny vzorky byly připraveny v triplicátech pro eliminaci pipetovací chyby.

PCR destička byla vložena do thermocycleru pro kvantitativní PCR (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System; Bio-Rad). V softwaru přístroje byl nastaven reakční profil, který je uveden níže v tabulce 8.

Tabulka 8 *Reakční profil qPCR*

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10 min	1
Denaturace	95	15 s	35
Hybridizace	60	30 s	
Prodlužování	70	1 min	

Po skončení reakce byla data vyexportována do programu MS Excel pro následné vyhodnocení. Zároveň byl v softwaru přístroje zkontrolován průběh reakce:

1. Křivka tání (tzn. melting curve) – 2 a více vrcholů křivky ukazuje na tvorbu nescifických produktů a/nebo primer-dimerů. Žádoucí je pouze 1 vrchol křivky a identická teplota tání ($\pm 0,5$ °C) pro PCR produkty, které byly testované se stejnými primery.
2. Kontrola inhibice reverzní transkripce a vlastní qPCR – Případná inhibice reverzní transkripce byla zjištěna porovnáním C_q hodnot (kvantifikačních cyklů, respektive prahových hodnot) u vzorků se spike primery. C_q hodnota experimentálního vzorku by se měla shodovat s C_q hodnotou spikové kontroly ($\pm 0,5$). Vyšší C_q hodnota u experimentálního vzorku v porovnání s C_q hodnotou spikové kontroly ukazuje na inhibici reverzní transkripce. Nižší účinnost reakce (křivka spikové kontroly dosahuje nižšího maxima než křivka experimentálního vzorku) ukazuje na inhibici qPCR.

4.7.3 Statistické vyhodnocení dat

Získané hodnoty Cq v triplicátu byly zprůměrovány a následně byla vypočítána relativní hodnota exprese genu dle Livak & Schmittgen (2001). Výsledná relativní hodnota exprese genu pro protein CD46 byla vypočítána podle vzorce: $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak & Schmittgen 2001), kdy $\Delta\Delta Cq = [(Cq \text{ genu } CD46(CD52) - Cq \text{ referenčního genu } (GADPH) \text{ u experimentálního vzorku} - (Cq \text{ genu } CD46(CD52) - Cq \text{ referenčního genu } (GADPH) \text{ u svalu})]$. Statisticky významné rozdíly v genové expresi mezi jednotlivými orgány byly testovány jednocestnou ANOVA analýzou v programu GraphPad Prism 9.

5 Výsledky

Tato kapitola, která obsahuje výsledky práce, je rozdělena na dvě podkapitoly dle studovaných proteinů – protein CD46 a protein CD52.

5.1 Protein CD46

Protein CD46 byl lokalizován v kančích a býčích spermích. Dále byla provedena detekce tohoto proteinu nejen v extraktech kančích a býčích spermích, ale i v testikulární a epididymální tkáni kance. V těchto tkáních byla navíc sledována exprese genu pro protein CD46.

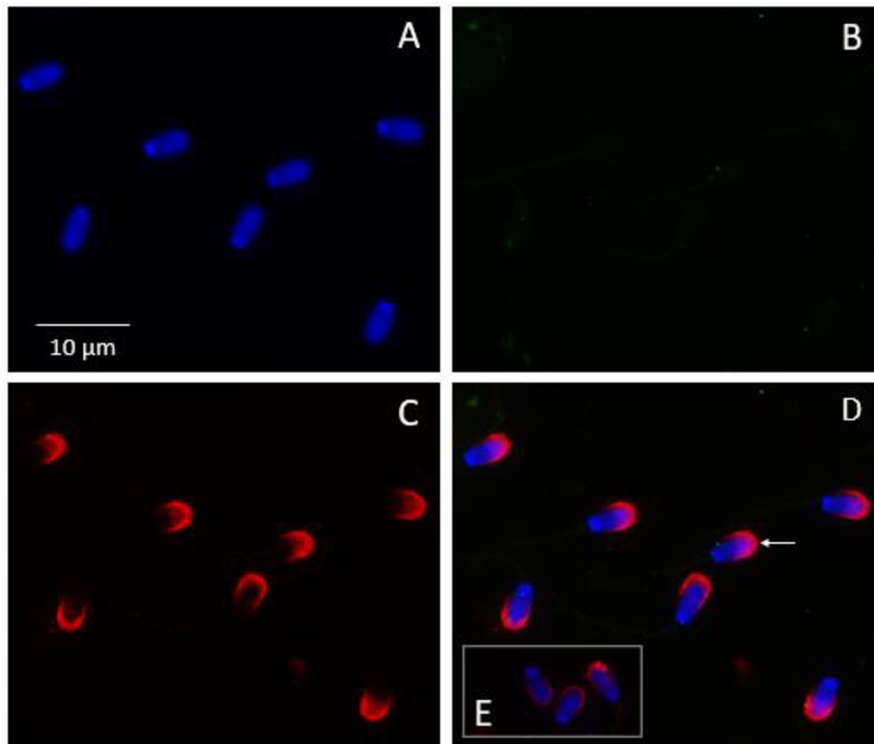
5.1.1 Lokalizace proteinu CD46 ve spermích

Pro lokalizaci proteinu CD46 v kančích a býčích spermích byla provedena nepřímá imunofluorescenční mikroskopie (kapitola 4.3). Lokalizace proteinu CD46 byla provedena ve spermích ejakulovaných a ve spermích po *in vitro* indukované akrozomální reakci.

Nejprve byla lokalizace proteinu CD46 detekována ve spermích fixovaných na sklíčko (kapitola 4.3.1). Byla vyzkoušena řada protilátek proti CD46 a různá ředění. Lokalizace proteinu CD46 ve spermích fixovaných na sklíčko nebyla úspěšná, respektive nebyl detekován pozitivní signál pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie.

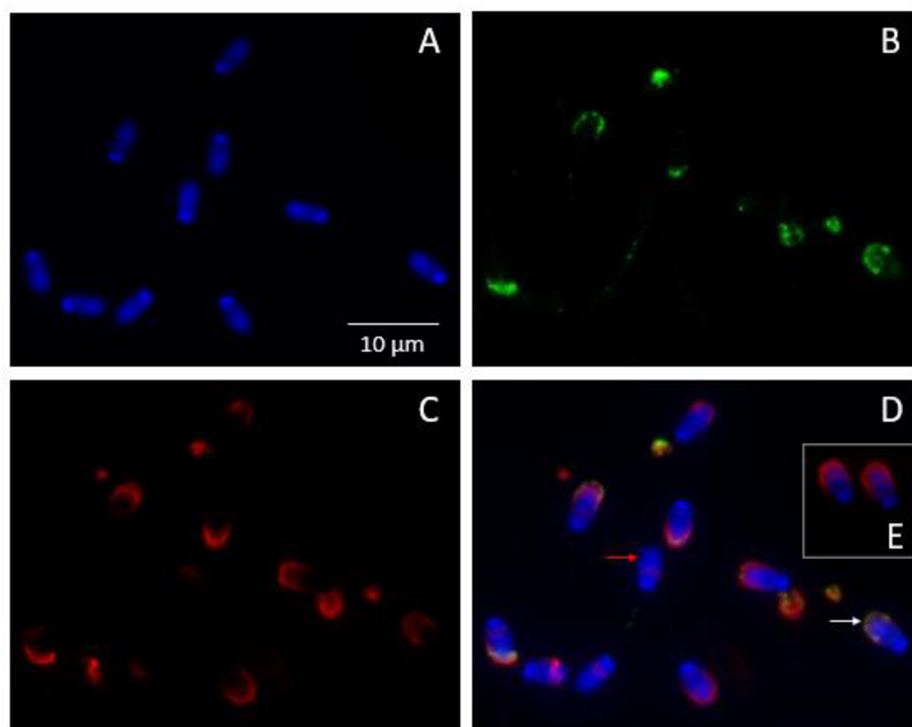
Dále byla provedena lokalizace proteinu CD46 ve spermích v suspenzi s protilátkou (klon M177) (kapitola 4.3.2).

Na obrázku 11 je zobrazena lokalizace proteinu CD46 v kančích ejakulovaných spermích z inseminační dávky (ID). Pomocí protilátky M177 proti proteinu CD46 nebyl detekován žádný pozitivní signál. Značení akrozomů lektinem PNA detekovalo intaktní akrozomy spermíí. Bílá šipka ukazuje spermii s intaktním akrozomem.



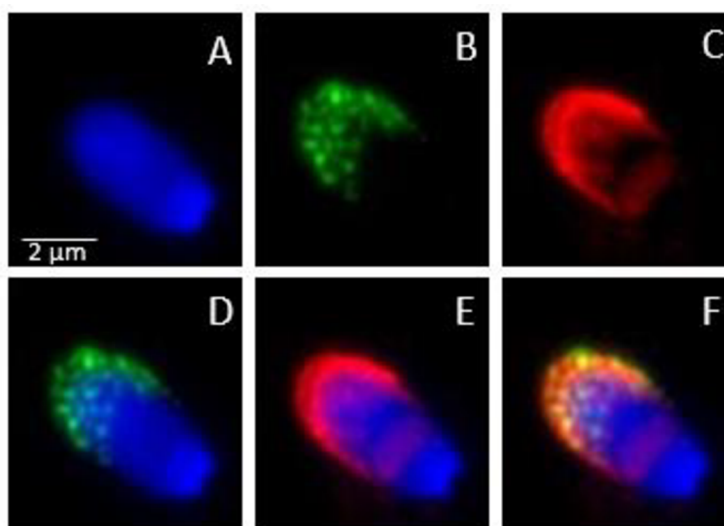
Obrázek 11 Lokalizace proteinu CD46 v ejakulovaných spermiích kance (ID) v suspenzi: A – jádro značené Dapi (modrá), B – reakce s protilátkou M177 proti CD46 (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (Dapi, M177, PNA), E – negativní kontrola; bílá šipka ukazuje spermii s intaktním akrozomem, zvětšení 400x

Lokalizace proteinu CD46 byla provedena taktéž v suspenzi ejakulovaných kančích spermií, které byly kryokonzervovány a následně rozmrazeny (kapitola 4.1.1). Obrázek 12 zobrazuje pozitivní reakci s protilátkou M177 (zelený signál) v oblasti akrozomu. Červená šipka ukazuje spermii bez akrozomu a bez detekce studovaného proteinu. Bílá šipka ukazuje spermii s narušeným akrozomem a úspěšnou detekcí proteinu CD46.



Obrázek 111 Lokalizace proteinu CD46 v ejakulovaných spermích kance v suspenzi: A – jádro značené Dapi (modrá), B – reakce s protilátkou M177 proti CD46 (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (Dapi, M177, PNA), E – negativní kontrola; bílá šipka ukazuje pozitivní signál, červená šipka ukazuje spermii bez akrozomu, zvětšení 400x

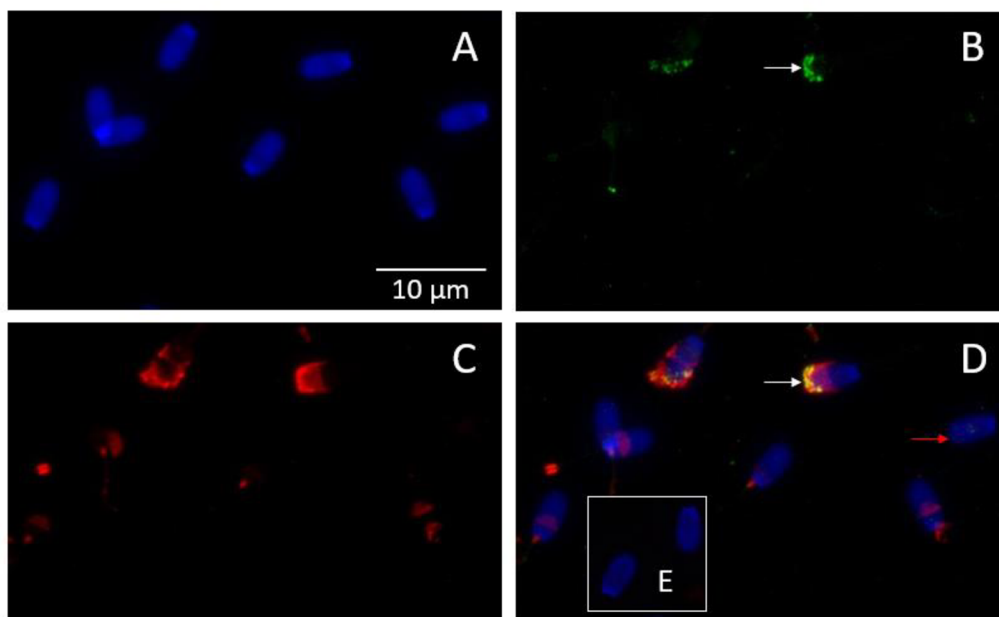
Na obrázku 13 je zobrazen detail lokalizace proteinu CD46 v ejakulované spermii kance po kryokonzervaci. Z obrázku je patrná lokalizace proteinu CD46 v oblasti akrozomu.



Obrázek 13 Detail lokalizace proteinu CD46 v ejakulované spermii kance: A – jádro značené Dapi (modrá), B – reakce s protilátkou M177 proti proteinu CD46 (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (Dapi, M177) E – složený obrázek (Dapi, PNA), F – složený obrázek (Dapi, M177, PNA), zvětšení 400x

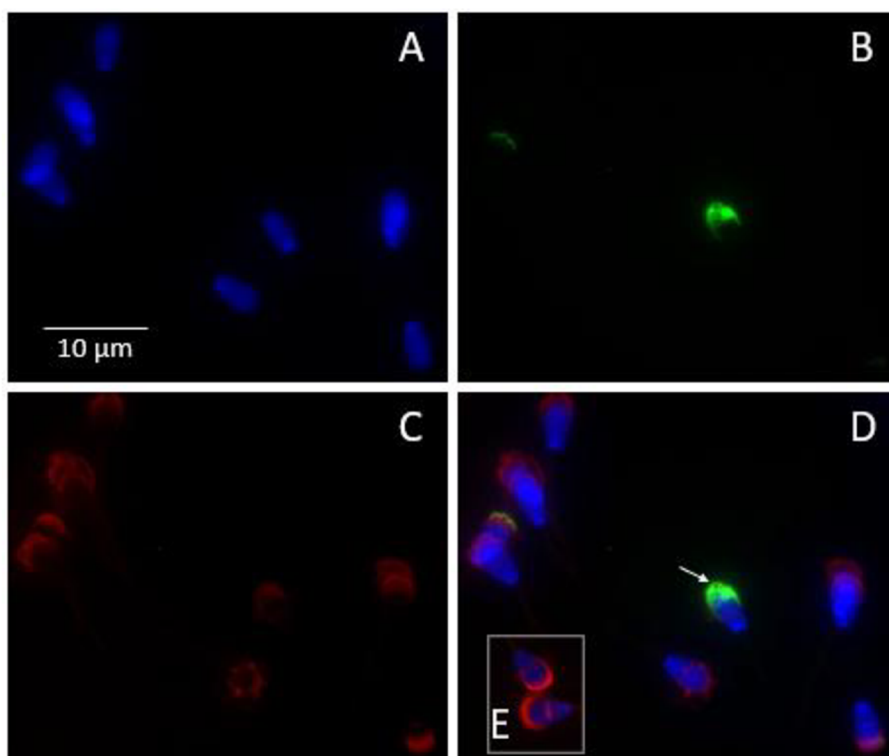
U kančích spermii po kryokonzervaci byla indukována akrozomální reakce *in vitro* pomocí calcium ionophoru (kapitola 4.1.4). Obrázek 14 ukazuje detekci proteinu CD46 pomocí protilátky M177 u kančích ejakulovaných spermii po kryokonzervaci. Protein CD46

nebyl detekován u spermií bez akrozomu, nicméně u spermií, které měly akrozom pouze narušený, byl detekován pozitivní signál pomocí protilátky M177. Zatímco červená šipka ukazuje spermii bez akrozomu a bez detekce CD46, bílá šipka ukazuje spermii s akrozomem a pozitivní detekcí CD46.



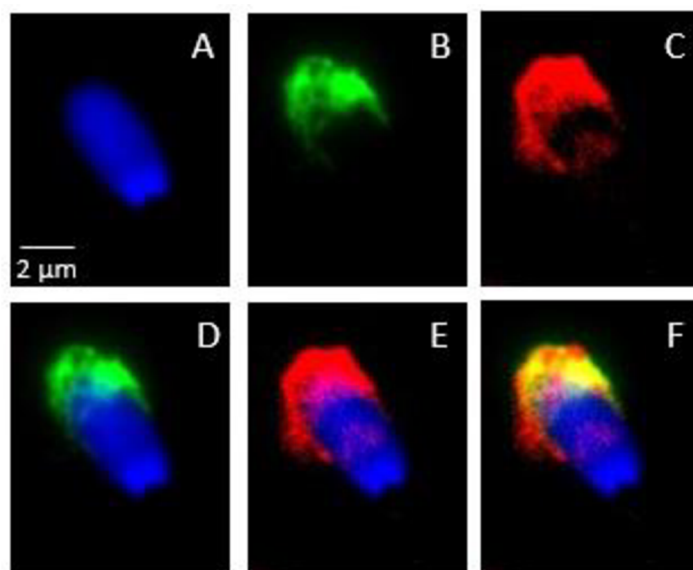
Obrázek 14 Lokalizace proteinu CD46 v kančích spermiích po *in vitro* indukované akrozomální reakci v suspenzi: A – jádro značené Dapi (modrá), B – reakce s protilátkou M177 proti CD46 (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (Dapi, M177, PNA), E – negativní kontrola; bílá šipka ukazuje pozitivní signál, červená šipka ukazuje spermii bez akrozomu, zvětšení 400x

Lokalizace tohoto proteinu byla provedena i v býčích spermiích, které byly po kryokonzervaci rozmrazeny (kapitola 4.1.1) a inkubovány s protilátkou M177 v suspenzi (kapitola 4.6.2). Obrázek 15 ukazuje detekci proteinu CD46 v ejakulovaných spermiích býka. Téměř všechny spermie měly alespoň částečně poškozený akrozom. Nicméně detekce proteinu CD46 pomocí protilátky M177 byla úspěšná a protein byl lokalizován opět v oblasti akrozomu, což naznačuje podobnou lokalizaci tohoto proteinu jako v kančích spermiích.



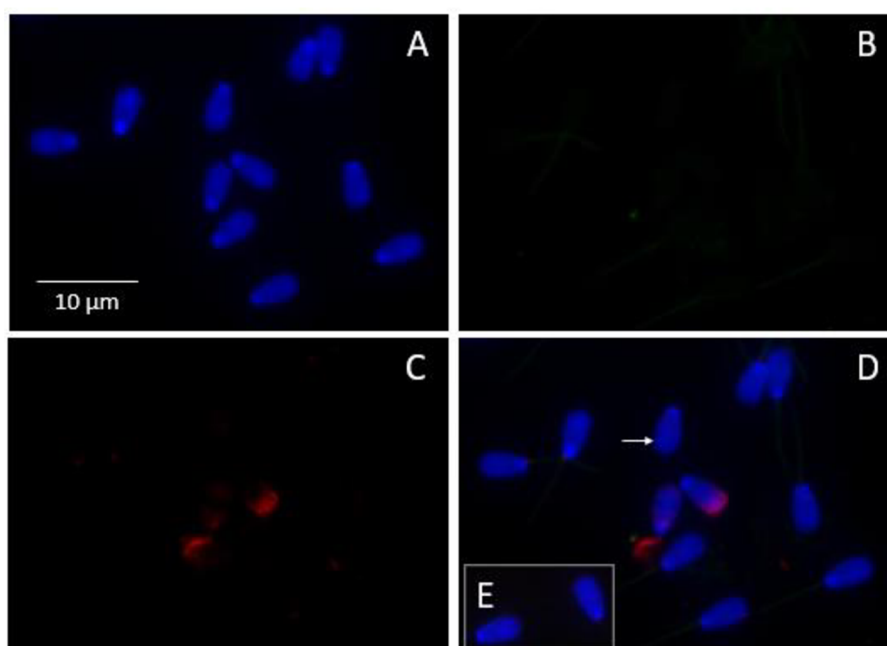
Obrázek 15 Lokalizace proteinu CD46 v ejakulovaných spermích býka v suspenzi: A – jádro značené Dapi (modrá), B – reakce s protilátkou M177 proti CD46 (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (Dapi, M177, PNA), E – negativní kontrola; bílá šipka ukazuje pozitivní signál, zvětšení 400x

Na obrázku 16 je uveden detail lokalizace proteinu CD46 ve spermii býka. Obrázek ukazuje narušený akrozom, což je patrné z červeného signálu (akrozom značený PNA) a taktéž ze zeleného signálu (vazba s protilátkou M177), jehož intenzita v rámci akrozomu není jednotná.



Obrázek 16 Detail lokalizace proteinu CD46 v ejakulované spermii býka: A – jádro značené Dapi (modrá), B – reakce s protilátkou M177 proti proteinu CD46 (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (Dapi, M177) E – složený obrázek (Dapi, PNA), F – složený obrázek (Dapi, M177, PNA), zvětšení 400x

Obrázek 17 ukazuje býčí spermie po *in vitro* indukované akrozomální reakci pomocí calcium ionoforu. Z obrázku je patrné, že u spermii bez akrozomu nebyla detekce proteinu CD46 pomocí protilátky M177 úspěšná.

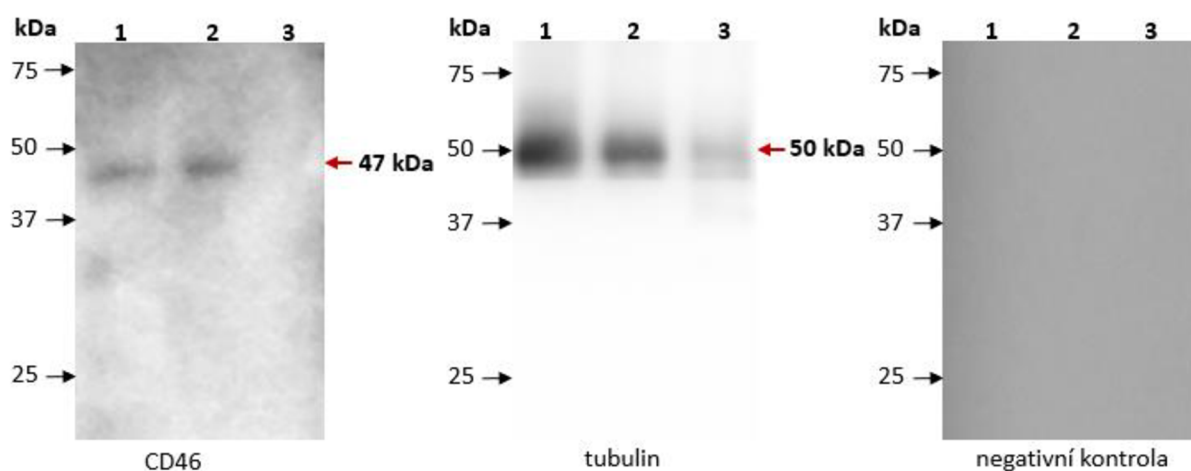


Obrázek 17 Lokalizace proteinu CD46 v býčích spermích po *in vitro* indukované akrozomální reakci v suspenzi: A – jádro značené Dapi (modrá), B – reakce s protilátkou M177 proti CD46 (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (Dapi, M177, PNA), E – negativní kontrola; bílá šipka ukazuje spermii bez akrozomu; zvětšení 400x

5.1.2 Detekce proteinu CD46 v extraktech spermii

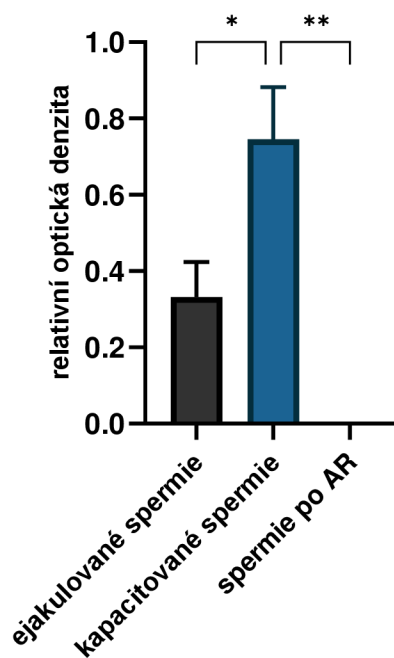
Pro detekci proteinu CD46 v extraktech spermii byla nejprve provedena lyzace spermii pomocí SDS vzorkového pufru (kapitola 4.4.1) a poté separace proteinů dle jejich velikosti (kapitola 4.4.2). Pokud není uvedeno jinak, vzorky byly připraveny v neredukujících podmínkách. Rozdělené proteiny byly přeneseny na membránu pomocí Western blotu (kapitola 4.5). Membrána s přenesenými proteiny byla inkubována s protilátkou proti proteinu CD46. Dále byla inkubována s protilátkou proti α -tubulinu pro kontrolu nanášky proteinů. Následně byla provedena imunodetekce (kapitola 4.6). V případě negativní kontroly byla membrána inkubována v PBS a poté v sekundární protilátce.

Protein CD46 byl detekován v kančích ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermích a ve spermích po *in vitro* indukované akrozomální reakci. Pro imunodetekci byla použita protilátka proti lidskému proteinu CD46 – klon M177. Tato detekce je zobrazena na obrázku 18. Protein CD46 byl detekován o velikosti 47 kDa v ejakulovaných a kapacitovaných spermích, ale ve spermích po akrozomální reakci nebyla detekce úspěšná.



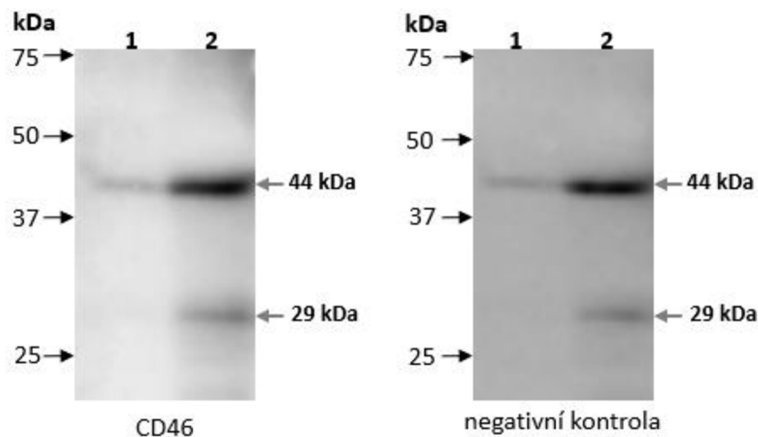
Obrázek 18 Imunodetekce proteinu CD46 v extraktech kančích spermii pomocí protilátky M177: CD46 – imunodetekce proteinu CD46 pomocí protilátky M177, tubulin – kontrola nanášky proteinů imunodetekcí α -tubulinu, 1 – ejakulované spermie, 2 – *in vitro* kapacitované spermie, 3 – spermie po *in vitro* indukované AR

Celkem ze tří opakování byla provedena denzitometrická analýza pomocí softwaru ImageJ. Signál protilátky M177 proti proteinu CD46 byl vztažen k signálu protilátky proti α -tubulinu a následně byla data ze tří měření zprůměrována. V grafu na obrázku 19 jsou data prezentována jako průměr, chybové úsečky představují střední chybu průměru (SEM). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami spermii byly testovány jednocestnou ANOVA analýzou v programu GraphPad Prism 9. Statisticky významný rozdíl v množství CD46 proteinu byl zjištěn mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermii ($p < 0,05$) a mezi kapacitovanými spermii a spermii po akrozomální reakci ($p < 0,01$).



Obrázek 19 Průměrná intenzita signálu protilátky M177 proti proteinu CD46 vztažená k detekci α -tubulinu v lyzátu kančích ejakulovaných, *in vitro* kapacitovaných spermii a spermii po *in vitro* indukované akrozomální reakci (AR). Data jsou prezentována jako průměr \pm SEM. Statisticky významné rozdíly mezi daty byly testovány jednocestnou ANOVA analýzou (GraphPad Prism 9), (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

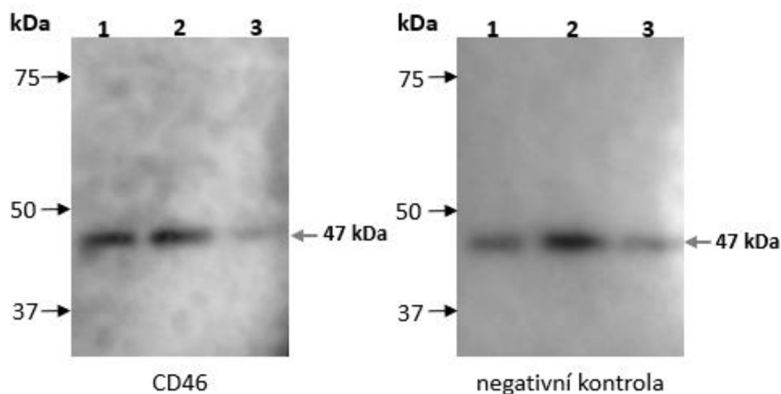
Imunodetekce proteinu CD46 pomocí protilátky M177 byla provedena i ve spermích býka, a to v ejakulovaných spermích a spermích po *in vitro* indukované akrozomální reakci – obrázek 20. Byl detekován protein o velikosti 44 kDa a u spermíí po AR navíc protein o velikosti 29 kDa. Nicméně, jak je patrné z obrázku 10, tyto proteiny byly přítomné i v negativní kontrole, proto je lze považovat za nespecifickou reakci se sekundární protilátkou.



Obrázek 20 Imunodetekce proteinu CD46 v extraktech býčích spermíí pomocí protilátky M177: 1 – ejakulované spermie, 2 – spermie po *in vitro* indukované AR.

Kančí nativní ejakulát byl zpracován pro metodu frakcionace membrán spermíí (kapitola 4.1.5). Pomocí této metody byly membrány spermíí separovány na frakce obsahující plazmatickou membránu, vnější akrozomální membránu s bičíky a vnitřní akrozomální membránu s hlavičkami spermíí. Získané lyzáty proteinů jednotlivých frakcí byly precipitovány a dále byla provedena SDS elektroforéza, po které následoval Western blot a vlastní imunodetekce proteinu CD46.

Imunodetekce proteinu CD46 ve frakcích membrán kančích spermíí je zobrazena na obrázku 21. Ze snímku je patrné, že byl detekován protein o velikosti 47 kDa. Nicméně k jeho detekci došlo i v negativní kontrole, proto se pravděpodobně jedná o nespecifickou reakci se sekundární protilátkou. Detekce proteinu CD46 ve frakcích membrán kančích spermíí tedy nebyla úspěšná.

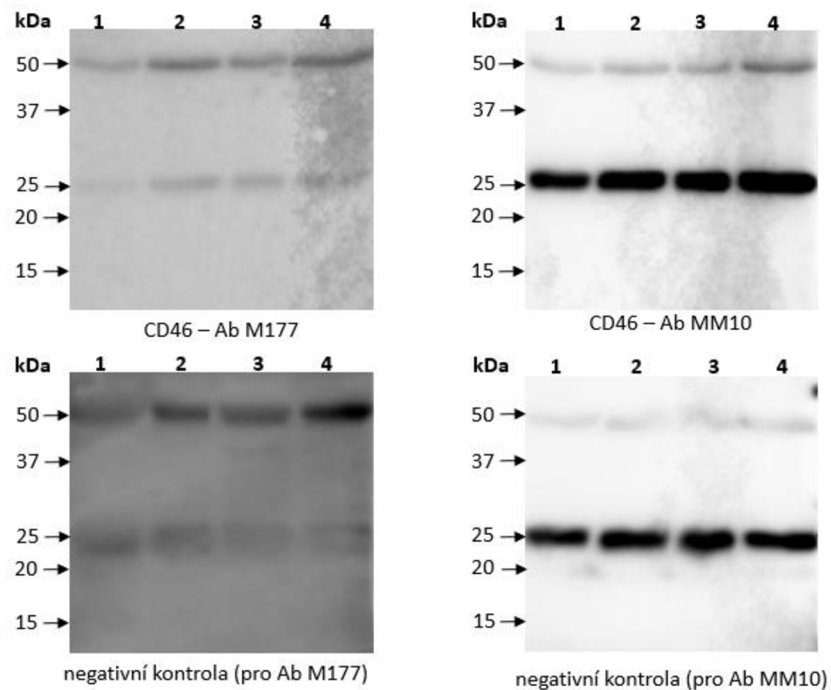


Obrázek 21 Imunodetekce proteinu CD46 ve frakcích membrán kančích spermíí pomocí protilátky M177: 1 – plazmatické membrány, 2 – vnější akrozomální membrány a bičíky, 3 – vnitřní akrozomální membrány a hlavičky

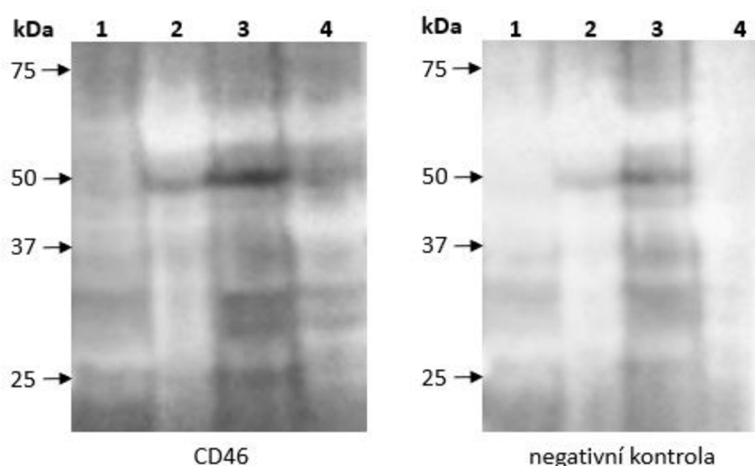
5.1.3 Detekce proteinu CD46 v testēs a epididymis

Byla provedena detekce proteinu CD46 taktě v reprodukčních orgánech kance – v *testes*, *caput epididymis*, *corpus epididymis* a *cauda epididymis*. Tkáně byly lyzovány 1% Tritonem X-100 s 50mM NaCl nebo vzorkovým SDS puforem (kapitola 4.1.6). Proteiny extraktů byly rozděleny dle velikosti pomocí SDS elektroforézy, přeneseny na membránu metodou Western blot a nakonec byla provedena imunodetekce proteinu CD46.

Na obrázku 22 je imunodetekce proteinu CD46 ve tkáních lyzovaných 1% Tritonem X-100 s 50mM NaCl. Detekce CD46 byla vyzkoušena pomocí myší protilátky M177 a kryší protilátky MM10. Jak je patrné z obrázku, detekce nebyla úspěšná, byly detekovány pouze nescifické reakce v oblasti 25 a 50 kDa. Obrázek 13 ukazuje detekci proteinu CD46 v tkáních lyzovaných SDS vzorkovým puforem pomocí protilátky M177. Opět se podařilo zaznamenat pouze několik nescifických reakcí.



Obrázek 22 Imunodetekce proteinu CD46 v proteinových extraktech z reprodukčních orgánů kance lyzovaných 1% Tritonem X-100 Tris-HCl (pH 7,8) s 50mM NaCl: 1 – testes, 2 – caput epididymis, 3 – corpus epididymis, 4 – cauda epididymis



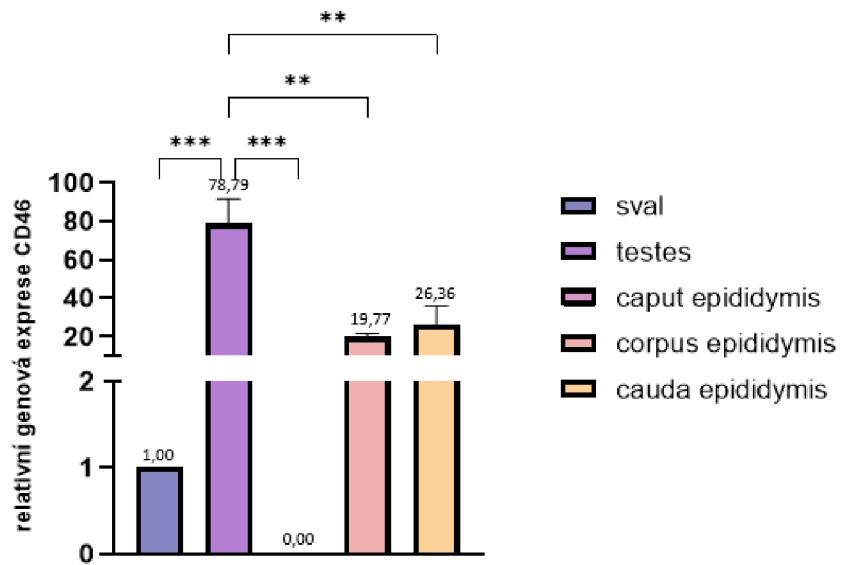
Obrázek 23 Imunodetekce proteinu CD46 v proteinových extraktech z reprodukčních orgánů kance lyzovaných SDS vzorkovým pufrem: 1 – testes, 2 – caput epididymis, 3 – corpus epididymis, 4 – cauda epididymis

5.1.4 Exprese genu pro protein CD46 v testes a epididymis

Pro stanovení exprese genu pro protein CD46 v reprodukčních orgánech kance byla nejprve provedena izolace RNA (kapitola 4.1.7), a to z *testes*, *caput epididymis*, *corpus epididymis* a *cauda epididymis*. Navíc byla provedena izolace RNA ze svalu, ke kterému byly výsledky exprese studovaného proteinu vztaženy. Poté byla provedena reverzní transkripce (kapitola 4.7.1), pomocí které byla získána stabilnější cDNA. Nakonec byla s navrženými primery provedena qPCR (kapitola 4.7.2) v triplicátech pro eliminaci pipetovacích chyb. Stanovení exprese genu pro protein CD46 bylo provedeno u tří vzorků z každé uvedené tkáně. Navíc byla qPCR provedena s primery pro referenční gen (*GAPDH*), kdy se jednalo o takzvanou vnitřní kontrolu množství testované DNA.

Výsledná relativní hodnota exprese genu pro protein CD46 byla vypočítána podle vzorce: $2^{-\Delta\Delta Cq}$, kdy $\Delta\Delta Cq = [(Cq \text{ genu } CD46 - Cq \text{ referenčního genu } (GAPDH) \text{ u experimentálního vzorku} - (Cq \text{ genu } CD46 - Cq \text{ referenčního genu } (GAPDH) \text{ u svalu})]$.

Graf na obrázku 24 ukazuje relativní genovou expresi proteinu CD46 v *testes*, *caput epididymis*, *corpus epididymis* a *cauda epididymis*. Data jsou v grafu prezentována jako aritmetický průměr z vypočítaných hodnot. Chybové úsečky představují střední chybu průměru (SEM). Statisticky významné rozdíly v expresi genu *CD46* mezi jednotlivými orgány byly testovány jednocestnou ANOVA analýzou v programu GraphPad Prism 9. Z grafu na obrázku 14 vyplývá, že statisticky významný rozdíl v expresi proteinu CD46 je mezi svalem a *testes* ($p < 0,001$), *testes* a *caput epididymis* ($p < 0,001$) *testes* a *corpus epididymis* ($p < 0,01$) a mezi *testes* a *cauda epididymis* ($p < 0,01$). Zatímco exprese studovaného proteinu byla nejvyšší v *testes* -78,79x vyšší než ve svalu, v *caput epididymis* nebyla žádná exprese detekována.



Obrázek 24 Průměrná exprese genu pro protein CD46 v reprodukčních orgánech kance. Data jsou prezentována jako průměr \pm SEM. Statisticky významné rozdíly mezi orgány byly testovány jednocestnou ANOVA analýzou – GraphPad Prism 9 (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

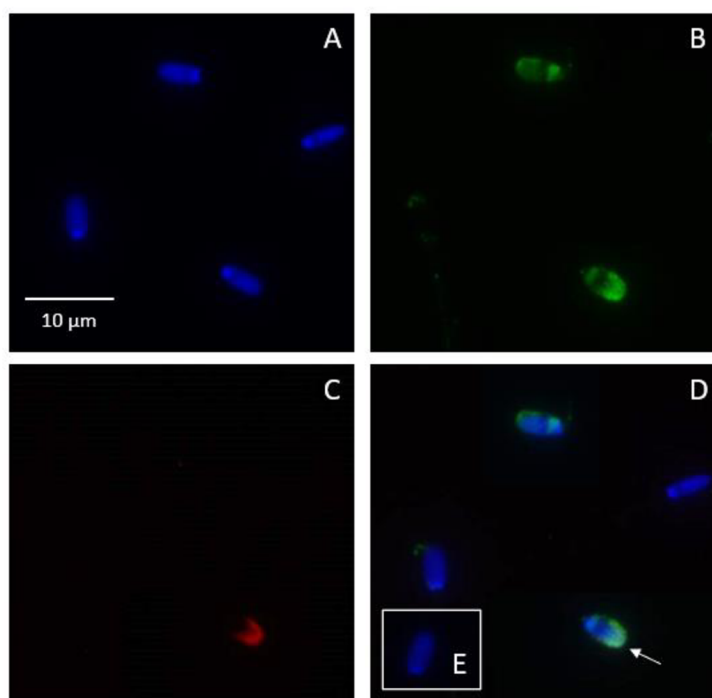
5.2 Protein CD52

Tato kapitola obsahuje výsledky experimentů lokalizace proteinu CD52 ve spermích býka. Dále byla provedena detekce tohoto proteinu v extraktech býčích a kančích spermích a v reprodukčních orgánech kance. Navíc byla sledována exprese genu proto protein CD52 v kančích reprodukčních orgánech.

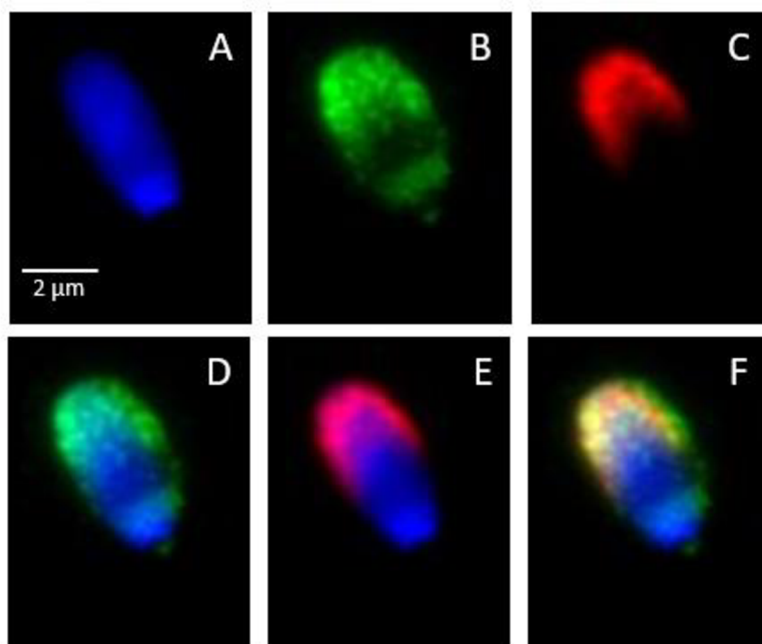
5.2.1 Lokalizace proteinu CD52 ve spermích

Lokalizace proteinu CD52 byla provedena v kančích spermích z ID a býčích spermích, které byly rozmrazeny. Inkubace s protilátkou proti proteinu CD52 probíhala v suspenzi buněk, stejně tak inkubace se sekundární protilátkou a s lektinem PNA. Při inkubaci spermíí s lektinem PNA dojde k jeho navázání na akrozom pouze u spermíí, které mají narušenou plazmatickou membránu. Pokud jsou spermie intaktní nebo nemají akrozom, tak červený signál v mikroskopu není detekován. Spermie nebyly fixovány na mikroskopické sklíčko.

Lokalizace proteinu CD52 v kančích ejakulovaných spermích pocházejících z ID v suspenzi je uvedena na obrázku 25. Bílá šipka ukazuje pozitivní detekci proteinu CD52 u spermie, která má dle červeného signálu (PNA) narušenou plazmatickou membránu. Obrázek 26 ukazuje detail lokalizace tohoto proteinu ve spermii kance.

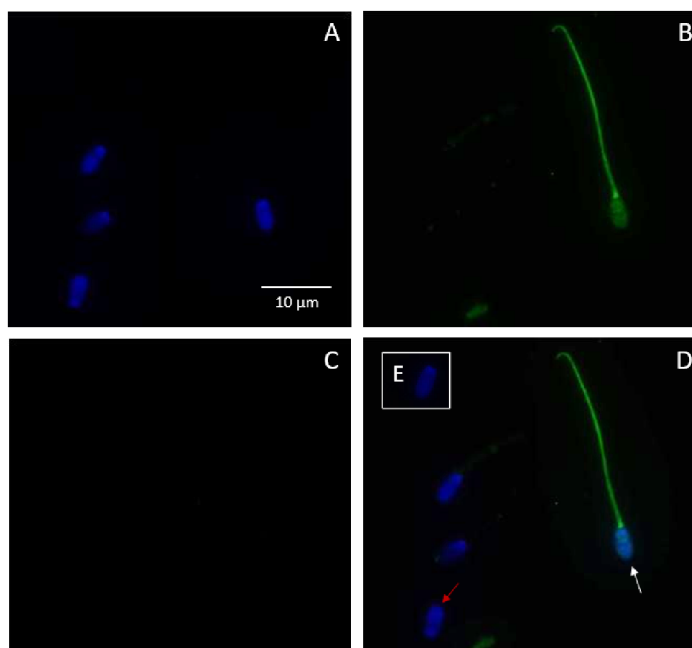


Obrázek 25 Lokalizace proteinu CD52 v ejakulovaných spermích kance v suspenzi: A – jádro značené Dapi (modrá), B – reakce s protilátkou CD52 11/305/44 proti proteinu CD52 (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (Dapi, CD52, PNA), E – negativní kontrola, bílá šipka ukazuje pozitivní signál, zvětšení 400x



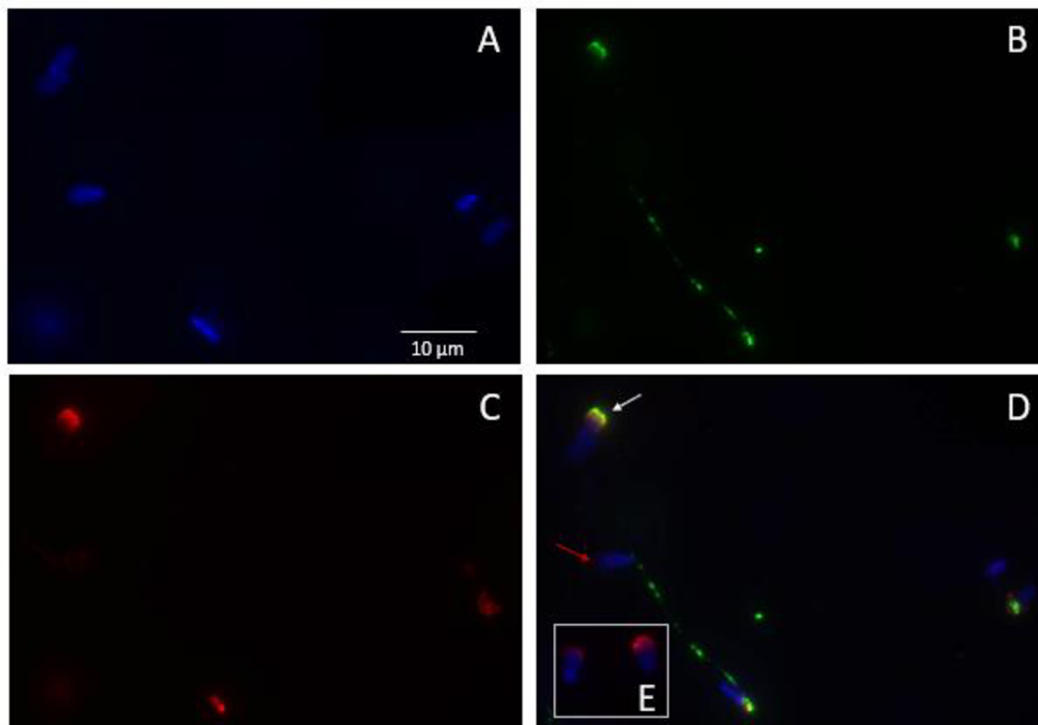
Obrázek 26 Detail lokalizace proteinu CD52 ve spermii kance: A – jádro značené Dapi (modrá), B – reakce s protilátkou CD52 11/305/44 proti CD52 (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (Dapi, CD52) E – složený obrázek (Dapi, PNA), F – složený obrázek (Dapi, CD52, PNA), zvětšení 400x

Dále byla provedena lokalizace proteinu CD52 v kančích spermích po *in vitro* indukované akrozomální reakci pomocí calcium ionoforu. Tato lokalizace je uvedena na obrázku 27. Zatímco bílá šipka ukazuje pozitivní detekci proteinu CD52 u spermie, která nemá akrozom nebo je akrozom intaktní, červená šipka ukazuje spermii, ve které nebyl protein CD52 detekován.

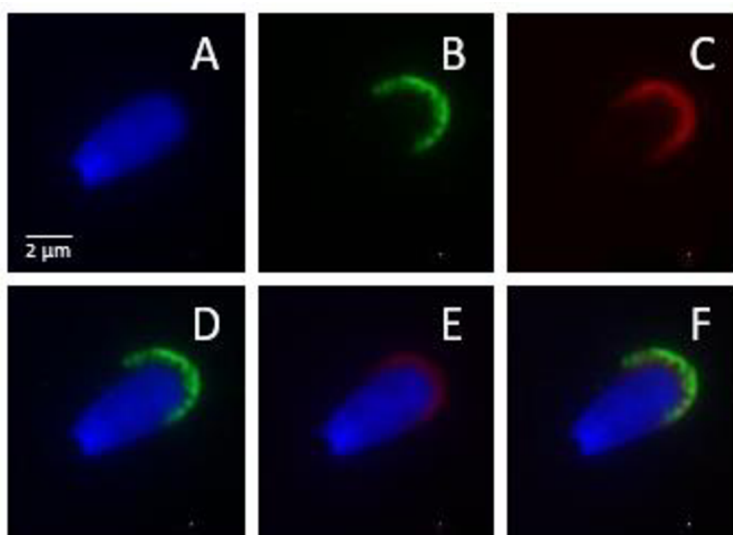


Obrázek 27 Lokalizace proteinu CD52 v ejakulovaných spermích kance po *in vitro* indukované akrozomální reakci suspenzi: A – jádro značené Dapi (modrá), B – reakce s protilátkou CD52 11/305/44 proti proteinu CD52 (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (Dapi, CD52, PNA), E – negativní kontrola, bílá šipka ukazuje pozitivní signál, zvětšení 400x

Na obrázku 28 je uvedena lokalizace proteinu CD52 (zelený signál) v ejakulovaných spermích býka. Bílá šipka ukazuje pozitivní detekci proteinu u spermie s narušenou plazmatickou membránou. Červená šipka ukazuje spermii, která je intaktní nebo nemá akrozom a u které nebyl protein CD52 detekován. Detail lokalizace proteinu CD52 je uveden na obrázku 29.

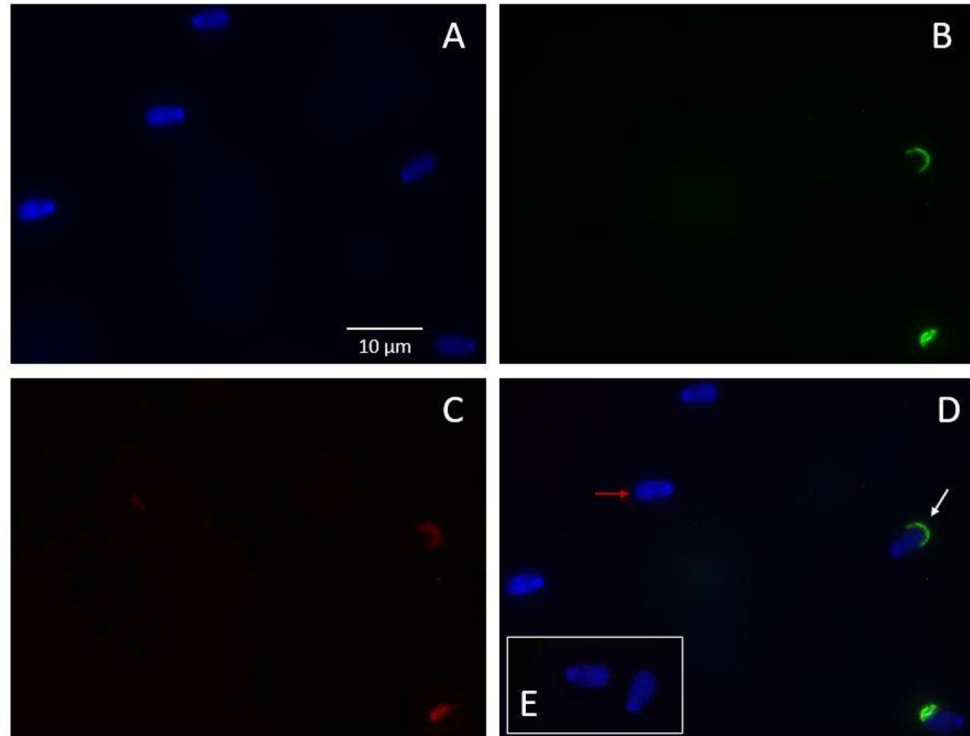


Obrázek 28 Lokalizace proteinu CD52 v ejakulovaných spermích býka v suspenzi: A – jádro značené Dapi (modrá), B – reakce s protilátkou CD52 11/305/44 proti proteinu CD52 (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (Dapi, CD52, PNA), E – negativní kontrola, bílá šipka ukazuje pozitivní signál, červená šipka ukazuje spermii bez signálu, zvětšení 400x



Obrázek 29 Detail lokalizace proteinu CD52 ve spermii býka: A – jádro značené Dapi (modrá), B – reakce s protilátkou CD52 11/305/44 proti CD52 (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (Dapi, CD52) E – složený obrázek (Dapi, PNA), F – složený obrázek (Dapi, CD52, PNA), zvětšení 400x

Lokalizace proteinu CD52 byla provedena v suspenzi v býčích spermích po *in vitro* indukované akrozomální reakci pomocí calcium ionoforu (obrázek 30). Bílá šipka ukazuje spermii, která měla dle slabého červeného signálu (PNA) mírně poškozený akrozom a zároveň byla u ní pozitivní detekce proteinu CD52 v oblasti akrozomu. Červená šipka ukazuje spermii intaktní nebo spermii, která nemá akrozom.

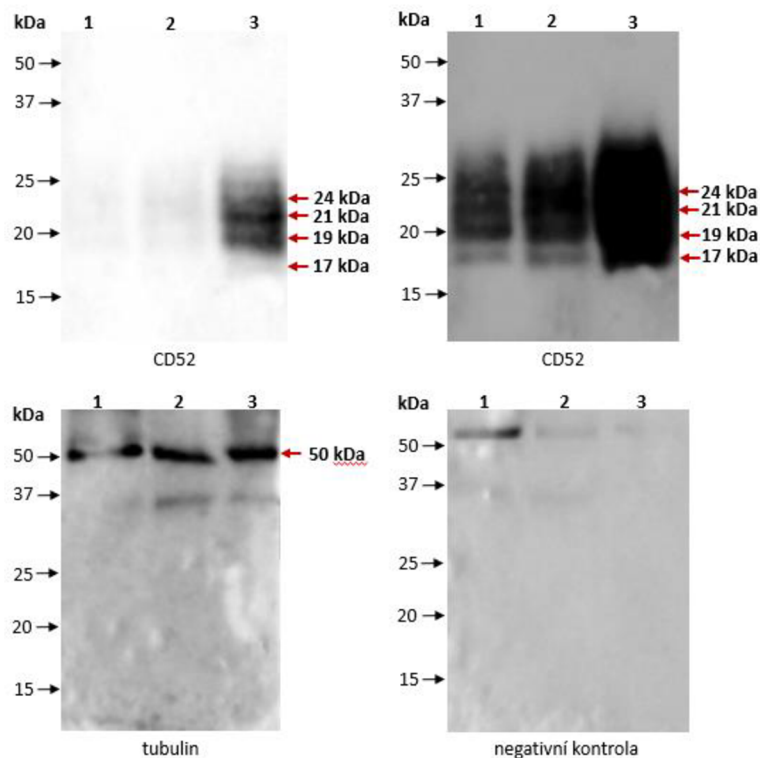


Obrázek 30 Lokalizace proteinu CD52 ve spermích býka po *in vitro* indukované AR v suspenzi: A – jádro značené Dapi (modrá), B – reakce s protilátkou CD52 11/305/44 proti CD52 (zelená), C – akrozom značený lektinem PNA (červená), D – složený obrázek (Dapi, CD52, PNA), E – negativní kontrola, bílá šipka ukazuje pozitivní signál, červená šipka ukazuje spermii bez signálu, zvětšení 400x

5.2.2 Detekce proteinu CD52 v extraktech spermíí

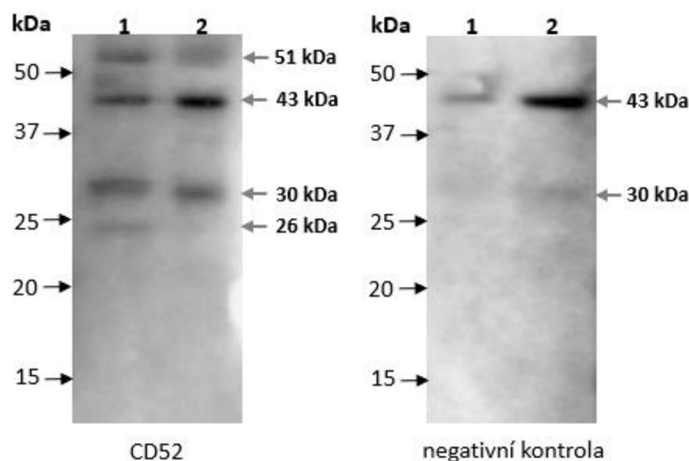
Protein CD52 byl detekován ve spermích, které byly lyzovány SDS vzorkovým puřem. Získané proteiny byly rozděleny dle velikosti pomocí SDS elektroforézy a poté přeneseny na membránu metodou Western blot. Membrána byla inkubována s protilátkou proti proteinu CD52 a s protilátkou proti α -tubulinu pro kontrolu nanášky proteinů. Negativní kontrola byla připravena z membrány inkubované pouze v sekundární protilátce.

Obrázek 31 ukazuje imunodetekci proteinu CD52 v kančích spermích, a to v ejakulovaných a *in vitro* kapacitovaných spermích a spermích po *in vitro* indukované akrozomální reakci. Protein CD52 byl detekován ve 4 izoformách o velikostech 24, 21, 19 a 17 kDa ve všech skupinách spermíí. Na obrázku 31 jsou uvedeny dva snímky identické membrány lišící se délkou expozice při snímání detekce.



Obrázek 31 Imunodetekce proteinu CD52 v extraktech spermií kance: CD52 - imunodetekce proteinu CD52 v pomoci protilátky CD52 11/305/44, tubulin – kontrola nanášky proteinů imunodetekcí α -tubulinu, 1 – ejakulované spermie, 2 – *in vitro* kapacitované spermie, 3 – spermie po *in vitro* indukované akrozomální reakci

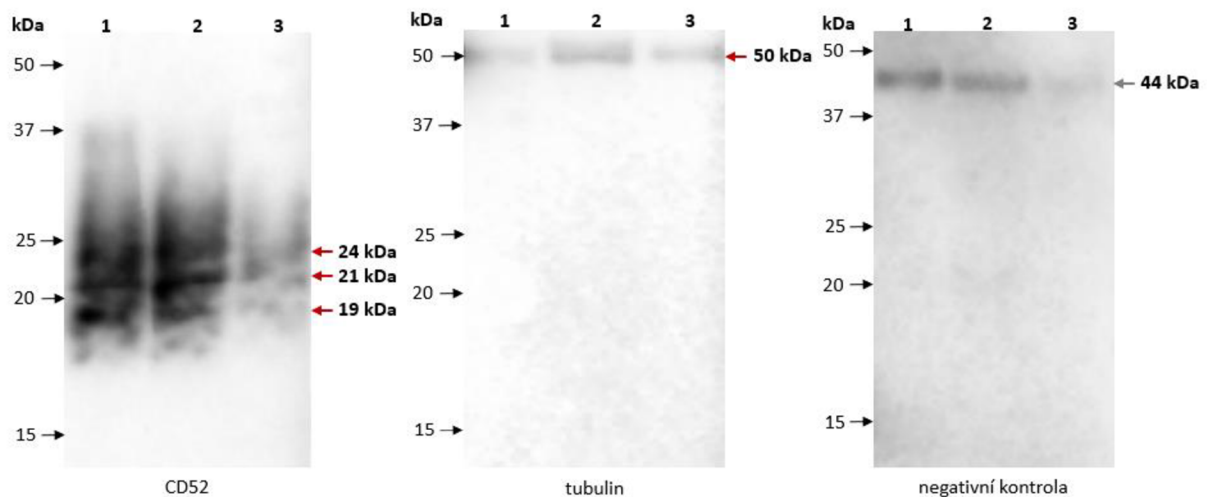
Detekce proteinu CD52 byla provedena i v ejakulovaných spermiích býka a spermiích po akrozomální reakci. Molekulová hmotnost proteinu CD52 je v rozmezí 17-24 kDa – viz detekce v kančích spermiích na obrázku 18. Nicméně, jak je patrné z obrázku 32, detekce protilátkou (11/305/44) specifickou pro prasečí CD52 nebyla úspěšná, byly detekovány pouze nespecifické reakce.



Obrázek 32 Imunodetekce proteinu CD52 v extraktech spermií býka: CD52 – imunodetekce proteinu CD52 pomoci protilátky CD52 11/305/44, 1 – ejakulované spermie, 2 – spermie po *in vitro* indukované AR

Pomocí metody frakcionace membrán spermií (kapitola 4.1.5) byly membrány spermie (pocházející z nativního kančího ejakulátu) separovány na frakce obsahující plazmatickou membránu, vnější akrozomální membránu s bičíky a vnitřní akrozomální membránu s hlavičkami spermií. Získané lyzáty proteinů jednotlivých frakcí byly

precipitovány a dále byla provedena SDS elektroforéza, po které následoval Western blot a vlastní imunodetekce proteinu CD52. Tato imunodetekce je zobrazena na obrázku 33. Pomocí protilátky CD52 11/305/44 byly detekovány tři izoformy proteinu o velikostech 24, 21 a 19 kDa. Z obrázku je patrné, že největší množství proteinu je ve frakci plazmatických membrán spermie.

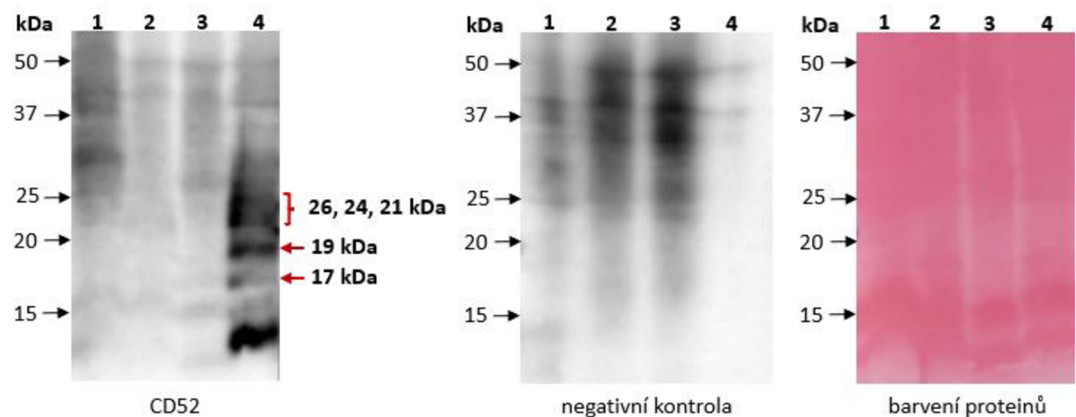


Obrázek 33 Imunodetekce proteinu CD52 ve frakcích membrán kančích spermií: CD52 – detekce proteinu CD52 pomocí protilátky CD52 11/305/44, tubulin - kontrola nanášky imunodetekcí α -tubulinu, 1 – plazmatické membrány, 2 – vnější akrozomální membrány a bičíky, 3 – vnitřní akrozomální membrány a hlavičky

5.2.3 Detekce proteinu CD52 v testes a epididymis

Dále byla provedena detekce proteinu CD52 v lyzátech z kančích reprodukčních orgánů. Tkáně (*testes*, *caput epididymis*, *corpus epididymis* a *cauda epididymis*) byly lyzovány SDS vzorkovým pufrém. Protokol pro imunodetekci se shodoval s ostatními uvedenými imunodetekcemi proteinů (SDS elektroforéza, Western blot, vlastní imunodetekce). Nanáška proteinů byla vizualizována pomocí barvení membrány roztokem Ponceau.

Obrázek 34 ukazuje imunodetekci proteinu CD52 pomocí protilátky CD52 11/305/44 v uvedených reprodukčních orgánech kance. Studovaný protein byl detekován pouze v *cauda epididymis* v 5 izoformách o velikostech 26, 24, 21, 19 a 17 kDa.



Obrázek 34 Imunodetekce proteinu CD52 v proteinových extraktech z reprodukčních orgánů kance lyzovaných SDS vzorkovým pufrém: CD52 – imunodetekce proteinu CD52 protilátkou CD52 11/305/44, barvení proteinů – nanáška proteinů, 1 – testes, 2 – caput epididymis, 3 – corpus epididymis, 4 – cauda epididymis

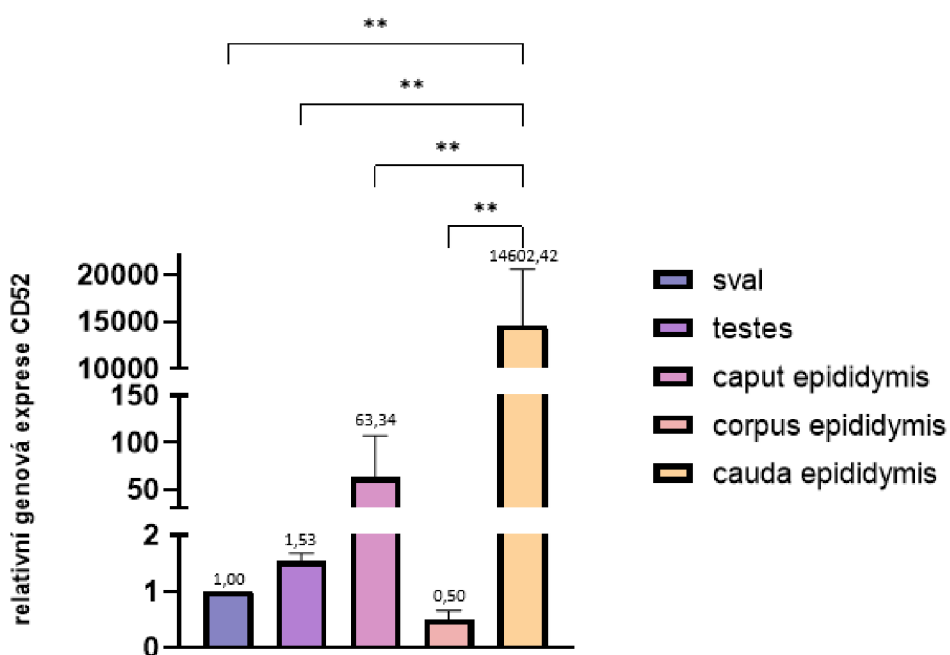
5.2.4 Expresa genu pro protein CD52 v testes a epididymis

Pro stanovení exprese genu pro protein CD52 v reprodukčních orgánech kance byla nejprve provedena izolace RNA (kapitola 4.1.7), následně reverzní transkripce (kapitola 4.7.1) a nakonec byla s navrženými primery provedena qPCR (kapitola 4.7.2) v triplikátech pro eliminaci pipetovacích chyb. Stanovení exprese genu pro protein CD52 bylo provedeno u tří vzorků pro každou z uvedených tkání. V každém experimentálním vzorku byla také stanovena exprese referenčního genu *GAPDH*. Expresa genu *CD52* a genu *GAPDH* byla stanovena ve svalu, k jehož hodnotám byly výsledky vztaženy.

Výsledná relativní hodnota exprese genu pro protein CD46 byla vypočítána podle vzorce: $2^{-\Delta\Delta Cq}$, kdy $\Delta\Delta Cq = [(Cq \text{ genu } CD46 - Cq \text{ referenčního genu (GAPDH) u experimentálního vzorku} - (Cq \text{ genu } CD46 - Cq \text{ referenčního genu (GAPDH) u svalu})]$.

Graf na obrázku 35 ukazuje relativní genovou expresi proteinu CD52 v *testes*, *caput epididymis*, *corpus epididymis* a *cauda epididymis*. Data jsou v grafu prezentována jako aritmetické průměry relativních hodnot exprese genu ze tří vzorků. Chybové úsečky zobrazují SEM. Statisticky významné rozdíly v expresi genu *CD52* mezi jednotlivými orgány byly testovány jednocestnou ANOVA analýzou v programu GraphPad Prism 9.

Z grafu vyplývá, že statisticky významný rozdíl v expresi genu pro protein CD52 je mezi svalem a *cauda epididymis*, *testes* a *cauda epididymis*, *caput epididymis* a *cauda epididymis* a mezi *corpus epididymis* a *cauda epididymis* ($p < 0,01$). Zatímco v *corpus epididymis* byla exprese genu *CD52* oproti svalu poloviční, v *cauda epididymis* byla tato exprese oproti svalu 14 602x vyšší.



Obrázek 35 Průměrná exprese genu pro protein CD52 v reprodukčních orgánech kance. Data jsou prezentována jako průměr \pm SEM. Statisticky významné rozdíly mezi orgány byly testovány jednocestnou ANOVA analýzou – GraphPad Prism 9 (** $p < 0,01$).

6 Diskuze

Proteiny CD46 a CD52, kterými se zabývá tato diplomová práce, patří mezi proteiny regulující komplement. Jejich funkce spočívá ve štěpení komplementové kaskády, čímž regulují funkci komplementu, který je součástí humorální imunity jedince (Valentičová et al. 2005). Náplní této diplomové práce byla lokalizace a detekce CD46 a CD52 v kančích a býčích spermiiích, dále detekce těchto proteinů v kančích reprodukčních orgánech a sledování exprese genu pro uvedené proteiny taktéž v reprodukčních orgánech kance.

Protein CD46 byl objeven v osmdesátých letech minulého století jako jeden z esenciálních regulátorů komplementu (Liszewski et al. 1991). Jeho deficience či defekt genu pro CD46 způsobuje nekontrolovatelnou aktivaci komplementu na povrchu somatických buněk (Richards et al. 2003). Později byl tento protein studován i v kontextu reprodukce a zjistilo se, že nedostatek či významně snížená exprese CD46 na spermii má spojitost s idiopatickou neplodností mužů (Kitamura et al. 1997; Nomura et al. 2001) Nicméně jeho případná funkce během interakce gamet zatím nebyla experimentálně potvrzena. Studium proteinu CD46 považujeme za aktuální téma, kterému je třeba věnovat větší pozornost i u hospodářských zvířat, jelikož většina studií se zaměřuje na lidské buňky, případně na myší model. Studie molekuly CD46 v samčích pohlavních buňkách prasete zatím nebyla publikována.

Lokalizaci proteinu CD46 ve spermii jsme nejprve provedli pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie, kdy byly spermie po fixaci aceton-methanolem na mikroskopické sklíčko inkubovány s primární protilátkou a následně se sekundární protilátkou. Lokalizace nebyla úspěšná, třebaže jsme vyzkoušeli řadu komerčně dostupných protilátek (M177, MM10, MEM258, 13G10) v různých ředěních. Všechny použité protilátky kromě MM10, která je proti myšimu CD46, jsou specifické pro lidský protein CD46. Zatímco protilátka 13G10 je proti aminokyselinové sekvenci C-konce cytoplazmatické části lidského proteinu, protilátka MEM258 má specifitu proti epitopu na SCR4 extracelulární doměně lidského proteinu CD46. U ostatních protilátek výrobci nespécifikují epitop proteinu, pro který je daná protilátka specifická. Jedním z důvodů nefunkčnosti těchto protilátek může být právě odlišnost kančího a lidského proteinu CD46. Při porovnání sekvencí lidského a kančího proteinu softwarem Protein BLAST (dostupné online: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) jsme zjistili pouze 46,25% homologii mezi proteiny. Neúspěšnost lokalizace by také mohla být vysvětlena narušením epitopu proteinu fixačním činidlem, což znemožnilo vazbu protilátky.

Pro získání pozitivního výsledku jsme lokalizaci provedli jiným způsobem, při kterém byly spermie s primární (M177) a sekundární protilátkou inkubovány v suspenzi a až poté byly spermie fixovány na mikroskopické sklíčko. Pokud není plazmatická membrána (PM) narušená například procesem kryokonzervace, tak se v suspenzi primární protilátka váže na antigeny na povrchu spermie. Protilátka může proniknout do intracelulárních částí v případě, že spermie není intaktní. Během experimentů s kančími ejakulovanými spermii pocházejícími z inseminační dávky (ID) nebyla detekována žádná pozitivní reakce s protilátkou M177. Akrozomy spermii byly vizualizovány pomocí lektinu PNA, který se váže na sacharid (β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc-Ser/Thr) přítomný v akrozomální membráně (Mortimer et al. 1987). Lektin PNA se v kančích spermiiích váže na vnější akrozomální

membránu (Flesch et al. 1998), proto byly spermie před vlastní inkubací s PNA fixovány pomocí aceton-methanolu, což vedlo k permeabilizaci PM a zpřístupnění vnější akrozomální membrány spermie. Vizualizace akrozomů u kančích ejakulovaných spermií z ID tak ukazuje na intaktnost akrozomů. Absence zeleného fluorescenčního signálu představujícího reakci s protilátkou M177 proti proteinu CD46 je tedy pravděpodobně důsledkem intaktnosti spermie, respektive neporušenosti PM. Zároveň absence signálu poukazuje na nepřítomnost proteinu na povrchu akrozomu, respektive na povrchu celé spermie. Protein CD46 v kančích spermiích je tedy pravděpodobně přítomen, podobně jako ve spermiích člověka a myši, na akrozomálních membránách (Riley et al. 2002; Frolíková et al. 2016).

V experimentu, při kterém byly použity kryokonzervované kančí spermie jsme detekovali pozitivní signál v oblasti akrozomu. Vzhledem k faktu, že během zamrazování a rozmrazování spermií dochází ke změnám v lipidoproteinových komplexech (Mazur et al. 1972), což vede k ireverzibilnímu poškození PM spermie (Loomis a Graham 2008), tak předpokládáme, že se protilátka mohla navázat na epitop proteinu CD46 právě „díky“ poškození plazmatické membrány a přístupnosti vnitřních struktur buňky, jako jsou například i membrány akrozomu. Identická lokalizace proteinu byla pozorována i u ejakulovaných spermiích býka, u kterých byla detekce CD46 prováděna rovněž po rozmražení.

U kančích i býčích spermií jsme *in vitro* indukovali akrozomální reakci pomocí calcium ionoforu (CaI). U těchto spermií byla také provedena lokalizace proteinu CD46 pomocí protilátky M177, ale pozitivní signál jsme detekovali pouze u spermií, u kterých zcela neproběhla akrozomální reakce a akrozom měly jen viditelně narušený. U spermií bez akrozomu nebyl detekován žádný pozitivní signál, a to u obou savčích druhů. Akrozomální reakce vede k odhalení vnitřní akrozomální membrány, proto výsledky experimentu se spermiemi po *in vitro* indukované akrozomální reakci ukazují na absenci proteinu CD46 na vnitřní akrozomální membráně ve spermiích býka i kance.

Naše výsledky podporuje studie Jankovičové et al. 2011, ve které byla sledována lokalizace proteinu CD46 ve spermiích býka pomocí protilátky IVA-520. Nicméně přesná specifita této protilátky nebyla zcela potvrzena. Protilátka IVA-520 detekovala CD46-like protein na vnější akrozomální membráně a pravděpodobně i na PM, ale ne na vnitřní membráně býčích spermiích (Jankovičová et al. 2011). Ze snímků imunofluorescenční mikroskopie není možné rozlišit, zda je protilátka navázána na plazmatické membráně či na vnější akrozomální membráně. Nicméně naše výsledky lokalizace proteinu v ejakulovaných kančích spermiích z ID poukazují na nepřítomnost molekuly CD46 na PM. V lidských spermiích je protein CD46 lokalizován pouze na vnitřní akrozomální membráně (Anderson et al. 1989; Riley et al. 2002). Na vnitřní akrozomální membráně byl detekován také u myši (Inoue et al. 2003) a potkanů (Mizuno et al. 2004). Frolíková et al. 2016 detekovala protein CD46 na vnitřní i vnější akrozomální membráně spermie myši. Zároveň představila relokizaci tohoto proteinu během akrozomální reakce myši spermie – protein se z akrozomu přesouvá do ekvatoriálního segmentu a přes celou hlavičku spermie (Frolíková et al. 2016).

Důležitým faktem zůstává, že přítomnost proteinu CD46 na vnitřní akrozomální membráně spermie býka a kance nemůžeme úplně vyvrátit, jelikož signál v této části spermie nemusel být detekovatelný pomocí imunofluorescenčního mikroskopu. Bylo by vhodné využít citlivější zobrazovací metody nebo metody s vysokým rozlišením, jako například

konfokální mikroskopie, super-rezoluční mikroskopie nebo elektronové mikroskopie. Také by stálo za zvážení indukovat akrozomální reakci progesteronem, který je, na rozdíl od CaI, jedním z přirozených induktorů akrozomální reakce (Harper et al. 2006). Ionophor A23187 (CaI), který byl použit pro indukci akrozomální reakce, zvyšuje hladinu Ca^{2+} iontů ve spermii a indukuje tak akrozomální reakci, přičemž nedochází k aktivaci cAMP/PAK signálních drah (Tateno et al. 2013). AR indukovaná pomocí CaI probíhá poměrně rychle, proto předpokládáme, že nemusí dojít k relokizaci proteinů tak jako při AR *in vivo*.

Přítomnost a množství proteinu CD46 v kančích spermiiích během post-testikulárního vývoje jsme také studovali pomocí imunodetekce protilátkou M177. Imunodetekce byla provedena v lyzátu ejakulovaných, *in vitro* kapacitovaných spermiiích a v lyzátu spermii po *in vitro* indukované akrozomální reakci (AR). Zatímco v ejakulovaných a kapacitovaných spermiiích jsme detekovali protein o velikosti 47 kDa, ve spermii po AR byla detekce negativní. V lidských spermiiích byla detekována hypoglykosylovaná izoforma proteinu CD46. Tato hypoglykosylace je výsledkem sestřihu komplexu N-vázaného sacharidu během maturace spermii a je příčinou menší molekulové hmotnosti (Riley et al. 2002). Riley et al. (2002) v lidských spermiiích detekovali izoformu o velikosti 46-50 kDa, což odpovídá i našim výsledkům, kdy jsme v kančích spermiiích detekovali 47kDa protein. Imunodetekce proteinu CD46 v býčích spermiiích nebyla úspěšná. Pro úspěšnou detekci by bylo třeba vyzkoušet více protilátek, jelikož použitá protilátka M177 je proti lidskému proteinu CD46, se kterým má býčí protein poměrně nízkou homologii (46,25%; software Protein BLAST), proto by bylo třeba vyzkoušet experiment s vhodnější protilátkou.

Zastoupení proteinu CD46 v kančích ejakulovaných, kapacitovaných a AR spermiiích bylo vyhodnoceno pomocí denzitometrické analýzy. Studovaný protein jsme u kance lokalizovali především na vnější akrozomální, případně na PM, které během akrozomální reakce odcházejí, proto jsme předpokládali úbytek proteinu ve spermiiích po *in vitro* indukované AR. Dle výsledku ANOVA analýzy bylo množství proteinu signifikantně vyšší v kapacitovaných spermiiích v porovnání s ejakulovanými a AR spermiiemi, kdy detekce ve spermiiích po AR byla negativní. Tato negativní detekce koresponduje s našimi výsledky lokalizace proteinu CD46 v kančích AR spermiiích, kdy jsme na spermii nedetekovali žádný signál.

Pro zjištění přesné lokalizace proteinu CD46 v membránách kančích spermii jsme metodou frakcionace spermii získali frakce obsahující PM, vnější akrozomální membránu s bičíky a vnitřní akrozomální membránu s hlavičkami spermii. Předpokládali jsme, že protein CD46 detekujeme ve vnější a případně vnitřní akrozomální membráně, ale imunodetekce pomocí protilátky M177 bohužel nebyla úspěšná. Detekovali jsme pouze nespecifické reakce se sekundární protilátkou. Navíc předpokládáme, že ve frakci vnější akrozomální membrány pravděpodobně nebyl dostatek izolovaných proteinů, který je nutný pro úspěšnou detekci. Bylo by třeba změnit ředění sekundární protilátky, případně vyzkoušet sekundární protilátku od jiného výrobce a pracovat s větší nanáškou proteinů.

V lidské tkáni je protein CD46 detekovatelný ve dvou izoformách o molekulové hmotnosti 55 a 66 kDa (Johnstone et al. 1993). U prasete byla přítomnost proteinu CD46 v tkáních studována v rámci problematiky xenotransplantací (Pérez de la Lastra et al. 1999), ale studie nebyla zaměřena na reprodukční orgány. Pérez de la Lastra et al. (1999) detekovali v tkáni plic dvě izoformy o molekulové hmotnosti 60-65 kDa a 75 kDa, v játrech izoformu

o velikosti 65 kDa, v ledvinách dvě izoformy o velikosti 65 kDa a 70 kDa, ve slezině izoformu s molekulovou hmotností 60-65 kDa a v mozku izoformu o 55-60 kDa. Inoue et al. 2003 u myši detekovali 46,4kDa formu proteinu CD46 v *testes*, ale jejich studie nezahrnovala *epididymis*. Naše imunodetekce proteinu CD46 v reprodukčních orgánech kance (*testes*, *caput epididymis*, *corpus epididymis*, *cauda epididymis*) nebyla úspěšná, třebaže byly vyzkoušeny dvě různé protilátky (MM10 a M177) a tkáň byla lyzována v pufru obsahujícím 1% Triton-X100 anebo vzorkovým pufrem s přídavkem 2% SDS. Byly detekovány proteiny o molekulové hmotnosti 25 kDa a 50 kDa, ale vzhledem k jejich přítomnosti i v negativní kontrole je lze považovat za nespecifickou reakci se sekundární protilátkou. Bylo by opět vhodné vyzkoušet inkubaci se sekundární protilátkou v menší koncentraci, případně použít jinou sekundární protilátku.

I přes neúspěšnou imunodetekci jsme se pokusili o zjištění přítomnosti CD46 v reprodukčních orgánech kance na úrovni exprese genu. Pomocí metody kvantitativní PCR jsme sledovali expresi genu pro protein CD46 v *testes*, *caput epididymis*, *corpus epididymis* a v *cauda epididymis* kance. Expese mRNA myšního genu *CD46* byla nalezena nejvyšší v *testes* (Mead et al. 1999; Frolíková et al. 2012), proto jsme předpokládali nejvyšší hodnotu v *testes* i u kance. Zatímco nejvyšší expresi genu jsme opravdu detekovali v *testes* (78,79x vyšší než ve svalu), v *caput epididymis* jsme žádnou expresi nedetekovali. V dalších částech *epididymis* jsme expresi genu *CD46* opět detekovali, třebaže nižší než v *testes*. V *corpus epididymis* byla expese 19,77x vyšší než ve svalu a v *cauda epididymis* byla 26,36x vyšší než ve svalu. ANOVA analýzou byl detekován statisticky významný rozdíl mezi expresí genu v *testes* a ostatními sledovanými tkáněmi. Na základě těchto výsledků předpokládáme, že k nejvyšší expresi genu dochází v *testes*, zatímco v *caput epididymis* pravděpodobně nedochází ke genové expresi *CD46*. Pro ověření specifity primerů by bylo vhodné doplnit tento experiment o sekvenaci PCR produktu.

Vzhledem k lokalizaci v akrozomálních membránách spermie může protein CD46 sloužit jako marker poškození spermie, jelikož k jeho „odhalení“ dochází pouze při poškození akrozomu nebo u některých druhů savců po akrozomální reakci. V několika studiích byla detekce tohoto proteinu použita jako marker akrozomální reakce (Carver-Ward 1994; Bronson et al. 1999). Navíc byla u lidí objevena souvislost mezi sníženou expresí CD46 a idiopatickou infertilitou (Kitamura et al. 1997; Nomura et al. 2001), třebaže přesná role v reprodukci stále není zcela odhalena. Některé studie poukazují na možnou roli molekuly ve fúzi gamet (Okabe et al. 1990; Riley et al. 2002). Inoue et al. (2003) u CD46 deficientních myši pozoroval větší míru spontánní akrozomální reakce, proto by mohl tento protein souviset se stabilitou akrozomu. Nedávná studie (Frolíková et al. 2016) opravdu ukázala, že CD46 se společně s $\alpha 3\beta 1$ integrinem na stabilitě akrozomu spermie podílí. Během akrozomální reakce se z akrozomálních membrán relokalizuje do ekvatoriálního segmentu a přes celou hlavičku myši spermie, proto by mohl hrát roli i v samotné fúzi gamet (Frolíková et al. 2016).

Předmětem dalších experimentů v rámci této diplomové práce byl protein CD52. Byly popsány dva hlavní epitopy lidského proteinu CD52. Zatímco epitop CAMPATH-1 je exprimován na leukocytech a spermích, epitop SAGA-1 (z anglického sperm agglutination antigen-1) je přítomný na epididymálních a ejakulovaných spermích, ale na krevních buňkách nikoliv (Schröter et al. 1999). Přestože přesná funkce této molekuly nebyla v reprodukci zatím objasněna, inhibice vazby spermie na ZP oocyty pomocí monoklonální

protilátky S19 proti epitopu SAGA-1, ukazuje na účast této molekuly v primární vazbě na oocyt (Mahony et al. 1991). V našich experimentech jsme použili komerční protilátku CD52 11/305/44 rozpoznávající prasečí homolog lidského proteinu CD52, který je exprimován lymfocyty, monocyty a dendritickými buňkami.

Lokalizaci proteinu CD52 jsme provedli v kančích a býčích spermii pomocí protilátky CD52 v suspenzi. Protein CD52 je součástí glykokalyxu spermie (Olson a Hamilton 1987), kde je na membránu vázaný přes GPI kotvu (Yeung et al. 2001), proto jsme předpokládali jeho lokalizaci na PM. V kančích ejakulovaných spermii pocházejících z ID jsme protein lokalizovali na celé hlavičce spermie se silnějším signálem v akrozomu a v ekvatoriálním segmentu. Navíc jsme u některých spermii detekovali slabý signál na bičíku. Pozitivní signál jsme detekovali i u spermie s narušeným akrozomem. Při lokalizaci proteinu CD52 jsme taktéž použili PNA lektin ke značení akrozomu, ale spermie byly s PNA inkubovány v suspenzi, proto k navázání lektinu na sacharid došlo pouze u spermii, které měly narušenou PM. Z tohoto důvodu nelze vyhodnotit úspěšnost AR, kterou jsme *in vitro* indukovali pomocí CaI. U spermii po indukci AR jsme protein detekovali na celé hlavičce a na bičíku kančích spermii. V býčích spermii jsme lokalizovali protein CD52 v oblasti akrozomu, a to v ejakulovaných spermii (po kryokonzervaci) i ve spermii po indukci AR. Pozitivní signál jsme detekovali pouze ve spermii, které měly poškozenou PM. Rozdíl ve značení protilátky mohl být způsoben samotnou protilátkou CD52 11/305/44, která má specifitu proti prasečímu proteinu CD52 nikoliv proti býčímu proteinu CD52. Kančí a býčí protein CD52 není identický, třebaže jejich homologie dle softwaru Protein BLAST je poměrně vysoká, a to 75,38%. Nicméně předpokládáme, že lokalizace proteinu CD52 ve spermii býka je identická s lokalizací ve spermii kance.

Protein CD52 byl detekován na lidských ejakulovaných spermii (Hale et al 1993, Kirchhoff 1996, Yeung et al. 1997) a na povrchu spermii izolovaných z *cauda epididymis* potkanů (Derr et al. 2001). Studie Michálkové et al. (2010) popisuje lokalizaci proteinu CD52 v býčích ejakulovaných spermii, ale i spermii po kryokonzervaci. Protilátka IVA-543, kterou ve své studii použili, nemá ověřenou specifitu, a proto je popisován antigen jako CD52-like molekula. Protilátka značila celý povrch spermie s intenzivním imunofluorescenčním signálem na hlavičce spermie v akrozomálním regionu a nerovnoměrným signálem na bičíku (Michálková et al. 2010), což koresponduje s našimi výsledky lokalizace studovaného proteinu v kančích spermii. Bylo by ale vhodné naše experimenty zopakovat a provést značení pomocí PNA lektinu po fixaci spermii acetonmetanolem, abychom mohli identifikovat spermie, u kterých proběhla AR. S ohledem na dlouhou dodací lhůtu protilátky nebylo možné experimenty zopakovat a lokalizovat tak protein CD52 na spermii po AR.

Přítomnost proteinu CD52 v kančích spermii během post-testikulárního vývoje jsme studovali pomocí imunodetekce se stejnou protilátkou CD52 11/305/44 s jakou byla provedena jeho lokalizace pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Studovaný protein byl detekován v proteinovém extraktu z ejakulovaných spermii, v extraktu ze spermii po *in vitro* indukované kapacitaci a AR. Ve všech uvedených extraktech jsme detekovali čtyři izoformy proteinu s molekulovou hmotností 17, 19, 21 a 24 kDa. V býčích spermii Michálková et al. (2010) detekovala protein o velikosti 18-24 kDa. Naše imunodetekce proteinu CD52 v býčích spermii úspěšná nebyla, zatímco detekce proteinu CD52 v kančích spermii přibližně

odpovídá výsledkům na býčích spermích ve zmíněné studii (Michálková et al. 2010). U potkanů byla detekována pouze 26kDa forma proteinu ve spermích izolovaných z *cauda epididymis* (Derr et al. 2001) a v lidských ejakulovaných spermích byly pomocí protilátky CAMPATH-1G detekovány dva nebo více proteinů v rozmezí 20-24 kDa (Yeung et al. 1998).

Pro ověření přítomnosti proteinu CD52 v PM spermie jsme provedli imunodetekci ve frakcích membrán kančích spermí. Protilátkou CD52 11/305/44 jsme detekovali tři izoformy proteinu s molekulovou hmotností 19, 21 a 24 kDa. Všechny tři izoformy jsme detekovali v proteinové frakci PM spermie, ve frakci vnější akrozomální membrány s bičíky, ale i ve frakci vnitřní akrozomální membrány s hlavičkami spermí. Nejsilnější signál jsme pozorovali ve frakci obsahující proteiny PM spermí a nejslabší signál byl v proteinových extraktech z vnitřní akrozomální membrány. Předpokládáme, že získané frakce membrán spermí metodou frakcionace byly nabožacené, respektive ve frakci vnější akrozomální membrány i vnitřní akrozomální membrány mohl být i podíl proteinů PM. Na rozdíl od extraktů celkových proteinů kančích spermí jsme nedetekovali 17kDa formu CD52 proteinu. V potkaních spermích Derr et al. (2001) taktéž detekoval 17kDa protein, ale ukázalo se, že se jednalo o nespecifickou křížovou reaktivitu s TLBP (testis lipid-binding protein) a cytochrom c oxidázou. Z tohoto důvodu by bylo vhodné potvrdit naše výsledky imunoprecipitací a následnou identifikací proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie. V budoucích experimentech by bylo třeba provést imunodetekci proteinu CD52 ve frakcích membrán spermie ve více opakování a udělat denzitometrickou analýzu pro potvrzení většinového zastoupení proteinu v plazmatické membráně spermie.

Dále jsme provedli imunodetekci proteinu CD52 v kančích reprodukčních orgánech. Studovaný protein není detekovatelný v *testes* býka (Michálková et al. 2010) a člověka (Hale et al. 1993), ale na spermii se dostává až během epididymálního transportu v *cauda epididymis* (Zeheb a Orr 1984; Hale et al. 1993; Michálková et al. 2010), proto jsme předpokládali přítomnost proteinu pouze v *cauda epididymis*, ale ne v dalších částech *epididymis* a v *testes*. Protein jsme skutečně detekovali pouze v *cauda epididymis*, a to několik izoform s molekulovou hmotností 17, 19, 21, 24 a 26 kDa. Naše výsledky sice potvrzují post-testikulární výskyt proteinu v *cauda epididymis*, ale i tento experiment by bylo třeba provést ve více opakování. Také by bylo vhodné rozšířit experimenty o lokalizaci CD52 na spermích izolovaných z jednotlivých částí *epididymis*, díky které bychom mohli detekovat část *epididymis*, ve které dochází k transferu proteinu do plazmatické membrány spermie.

V dalším experimentu jsme sledovali expresi genu pro protein CD52 v kančích reprodukčních orgánech. RNA kódující tento protein jsme detekovali ve všech částech *epididymis* a dokonce i v *testes*. Expresi genu pro protein CD52 v reprodukčních orgánech kance jsme porovnávali s jeho expresí ve svalu. Detekovali jsme expresi 1,53x vyšší v *testes*, 63,34x vyšší v *caput epididymis* a dokonce 14602,42x vyšší v *cauda epididymis* v porovnání s jeho expresí ve svalu. Expresi genu v *corpus epididymis* byla nejnižší, a to poloviční oproti expresi genu CD52 ve svalu. Jednocestná ANOVA analýza ukázala statisticky významný rozdíl v expresi tohoto genu mezi *cauda epididymis* a ostatními tkáněmi.

Zatímco mRNA proteinu CD52 jsme detekovali v *testes* i ve všech částech *epididymis*, protein jsme detekovali pouze v *cauda epididymis*. Na základě našich výsledků předpokládáme, že k regulaci exprese proteinu dochází až po transkripci a translaci je iniciována v *cauda epididymis*. U potkana (Pera et al. 1997; Derr et al. 2001) a člověka

(Kirchhoff et al. 1993) byla exprese genu pro protein CD52 detekována v *epididymis*, ale ne v *testes*. Studie Derr et al 2001 ukázala přítomnost mRNA studovaného proteinu ve všech částech *epididymis* potkana, což je v souladu s našimi výsledky detekce mRNA v *epididymis* kance. Pera et al. (1997) popisují variaci v délce poly(A) konce mRNA *CD52*. Zatímco v *cauda epididymis* a chámovodu detekovali „dlouhou“ mRNA, v *caput* a *corpus epididymis* detekovali „krátkou“ mRNA. Předpokládají, že efektivní translace probíhá pouze u „dlouhé“ formy mRNA z *cauda epididymis* (Pera et al. 1997). Tuto informaci nemůžeme potvrdit ani vyvrátit, ale bylo by to zajímavým rozšířením našich experimentů. Nicméně, pro ověření našich výsledků by bylo vhodné osekvenovat produkt PCR reakce a potvrdit tak specifitu použitých primerů.

7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývá studiem proteinů regulujících komplement CD46 a CD52 v kontextu reprodukce savců. Vycházeli jsme z hypotéz, že protein CD46 je lokalizován na vnitřní akrozomální membráně spermie a protein CD52 je transferován na plazmatickou membránu spermie během epididymální maturace. Cílem práce bylo lokalizovat studované proteiny v kančích a býčích spermích a detekovat je v reprodukčních orgánech kance a ve spermích kance a býka. Dalším cílem bylo stanovení exprese genů pro proteiny CD46 a CD52 v testikulární a epididymální tkáni kance.

Protein CD46 jsme lokalizovali na vnější akrozomální membráně kančí i býčí spermie, ale ne na vnitřní akrozomální membráně. Tento protein jsme dále detekovali v proteinovém extraktu z ejakulovaných a kapacitovaných spermích kance, a to o molekulové hmotnosti 47 kDa. Detekce v extraktu proteinů z akrozomálně zreagovaných kančích spermích byla negativní, což koresponduje s našimi výsledky lokalizace proteinu. Denzitometrické vyhodnocení a následná ANOVA analýza ukázala signifikantně vyšší množství proteinu v kapacitovaných spermích v porovnání se spermii ejakulovanými. Imunodetekce studovaného proteinu nebyla úspěšná v proteinovém extraktu z býčích spermích. U kance se nám nepodařilo imunodetektovat protein v jeho reprodukčních orgánech a ve frakcích membrán spermii. Expresi mRNA kančího genu pro protein CD46 jsme detekovali v *testes*, *corpus epididymis* a *cauda epididymis*. Exprese byla signifikantně vyšší v *testes* v porovnání s ostatními sledovanými tkáněmi.

Protein CD52 jsme lokalizovali na celé hlavičce kančí spermie se silnějším signálem v akrozomu a ekvatoriálním segmentu. V býčích spermích jsme protein pomocí protilátky proti prasečí CD52 lokalizovali v oblasti akrozomu. Dále jsme detekovali 4 izoformy této molekuly v proteinovém extraktu z ejakulovaných, kapacitovaných a AR spermích kance. Velikost izoform byla 17, 19, 21 a 24 kDa. Ve frakcích membrán kančích spermích jsme detekovali 19, 21 a 24kDa izoformu proteinu, a to nejen ve frakci PM, ale i ve frakci vnější a vnitřní akrozomální membrány, kde byl signál slabší. Imunodetekce studovaného proteinu v proteinových extraktech býčích spermii nebyla úspěšná. V *cauda epididymis* kance jsme našli pět izoform proteinu CD52 o molekulové hmotnosti 17, 19, 21, 24 a 26 kDa. Expresi mRNA jsme detekovali v *testes* i ve všech částech *epididymis*, přičemž signifikantně nejvyšší exprese genu byla v *cauda epididymis*.

Z výsledků našich experimentů vyplývá, že hypotéza o lokalizaci proteinu CD46 na vnitřní akrozomální membráně v býčích a kančích spermích nebyla zcela potvrzena. Nicméně naše výsledky naznačují, že protein CD52 je transferován na plazmatickou membránu spermie během epididymální maturace, třebaže by bylo třeba dalších experimentů pro potvrzení této hypotézy. Zatímco cíl stanovení exprese studovaných proteinů v testikulární a epididymální tkáni kance se nám podařilo úspěšně splnit, druhý cíl o detekci a lokalizaci proteinů se nám podařilo splnit pouze částečně. Tato práce představuje prvotní studii molekul CD46 a CD52 v reprodukci kance a býka a přináší zatím nepublikované výsledky. Pro získání plnohodnotných závěrů by bylo třeba práci rozšířit o další experimenty a některé již provedené experimenty zopakovat, abychom získali větší množství dat, ze kterých by bylo možné stanovit jasné závěry.

8 Literatura

Alvarez-Rodriguez M, Ljunggren SA, Karlsson H, Rodriguez-Martinez H. 2019. Exosomes in specific fractions of the boar ejaculate contain CD44: A marker for epididymosomes? *Theriogenology* **140**: 143-152.

Anderson DJ, Michaelson JS, Johnson PM. 1989. Trophoblast/leukocyte-common antigen is expressed by human testicular germ cells and appears on the surface of acrosome-reacted sperm. *Biol Reprod* **41**(2): 285-93.

Ashman LK, Aylett GW, Mehrabani PA, Bendall LJ, Niutta S, Cambareri AC, Cole SR, Berndt MC. 1991. The murine monoclonal antibody, 14A2.H1, identifies a novel platelet surface antigen. *Br J Haematol.* **79**(2): 263-70.

Atkinson B, Ernst CS, Ghrist BF, Herlyn M, Blaszczyk M, Ross AH, Herlyn D, Stepkowski Z, Koprowski H. 1984. Identification of melanoma-associated antigens using fixed tissue screening of antibodies. *Cancer Res* **44**(6): 2577-81.

Baalasubramanian S, Harris CL, Donev RM, Mizuno M, Omidvar N, Song WC, Morgan BP. 2004. CD59a is the primary regulator of membrane attack complex assembly in the mouse. *J Immunol* **173**(6): 3684-92.

Barclay AN, Law SKA, Brown MH, McKnight AJ, Tomlinson MG, van der Merwe PA. 1997. *The Leucocyte Antigen Factsbook*. Oxford: Academic Press.

Barranco I, Padilla L, Parrilla I, Alvarez-Barrientos A, PerezPatino C, Pena FJ, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H, Jordi Rocaet J. 2019. Extracellular vesicles isolated from porcine seminal plasma exhibit different tetraspanin expression profiles. *Sci Rep* **9**(1): 11584.

Barraud-Lange V, Chalas Boissonnas C, Serres C, Auer J, Schmitt A, Lefèvre B, Wolf JP, Ziyat A. 2012. Membrane transfer from oocyte to sperm occurs in two CD9-independent ways that do not supply the fertilising ability of Cd9-deleted oocytes. *Reproduction.* **144**(1): 53-66.

Barraud-Lange V, Naud-Barriant N, Bomsel M, Wolf JP, Ziyat A. 2007. Transfer of oocyte membrane fragments to fertilizing spermatozoa. *FASEB J.* **21**(13): 3446-9.

Bedford JM, Chang MC. 1962. Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high-speed centrifugation. *Am J Physiol* **202**: 179-81.

Berditchevski F, Gilbert E, Griffiths MR, Fitter S, Ashman L, Jenner SJ. 2001. Analysis of the CD151 $\alpha 3\beta 1$ integrin and CD151 tetraspanin interactions by mutagenesis. *J Biol Chem* **276**: 41165–41174.

Berditchevski F, Odintsova E, Sawada S, Gilbert E. 2002. Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *J Biol Chem* **277**(40): 36991-7000.

Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* **508**(7497): 483–487.

Bonifacino JS, Traub LM. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**: 395-447.

Bronson RA, Peresleni T, Golightly M. Progesterone promotes the acrosome reaction in capacitated human spermatozoa as judged by flow cytometry and CD46 staining. 1999. *Mol Hum Reprod* **5**(6): 507-12.

Buc M. 2001. *Imunológia. Veda. Bratislava.*

Burns G, Brooks K, Wildung M, Navakanitworakul R, Christenson LK, Spencer TE. 2014. Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. *PLoS One* **9** (e90913) DOI: 10.1371/journal.pone.0090913.

Campbell S, Swam HR, Aplin JD, Seif MW, Kimber SJ, Elstein M. 1995. CD44 is expressed throughout preimplantation human embryo development. *Hum Reprod* **10**: 425–30.

Carter WG, Wayner EA. 1988. Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J Biol Chem* **263**(9): 4193-201.

Carver-Ward JA, Jaroudi KA, Einspenner M, Parhar RS, al-Sedairy ST, Sheth KV. 1994. Pentoxifylline potentiates ionophore (A23187) mediated acrosome reaction in human sperm: flow cytometric analysis using CD46 antibody. *Hum Reprod* **9**(1): 71-6.

Clift LE, Dvorakova-Hortova K, Frolikova M, Andrlíkova P, Salman S, Stopka P, Flanagan BF, Johnson PM. 2009b. CD55 and CD59 protein expression by Apodemus (field mice) sperm in the absence of CD46. *J Reprod Immunol.* **81**(1): 62-73.

Cook GA, Wilkinson DA, Crossno JT Jr, Raghov R, Jennings LK. 1999. The tetraspanin CD9 influences the adhesion, spreading, and pericellular fibronectin matrix assembly of Chinese hamster ovary cells on human plasma fibronectin. *Exp Cell Res* **251**(2): 356-71.

Cummerson JA, Flanagan BF, Spiller DG, Johnson PM. 2006. The complement regulatory proteins CD55 (decay accelerating factor) and CD59 are expressed on the inner acrosomal membrane of human spermatozoa as well as CD46 (membrane cofactor protein). *Immunology* **118**(3): 333-42.

Cupperova P, Simon M, Antalíkova J, Michalkova K, Horovska L, Hluchy S. 2014. Distribution of tetraspanin family protein CD9 in bull reproductive system. *Czech J Anim Sci* **59**: 134–139.

da Silveira JC, Veeramachaneni DN, Winger QA, Carnevale EM, Bouma GJ. 2012. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biol Reprod* **86**(3): 71.

D'Cruz OJ, Lambert H, Haas GG Jr. 1997. Expression of CD15 (Lewisx) antigen on human sperm and its role in sperm-egg interaction. *Am J Reprod Immunol* **37**(2): 172-83.

Della Giovampaola C, Flori F, Sabatini L, Incerti L, La Sala GB, Rosati F, Focarelli R. 2001. Surface of human sperm bears three differently charged CD52 forms, two of which remain stably bound to sperm after capacitation. *Mol Reprod Dev* **60**: 89–96.

Delpout S, Noyce RS, Richardson CD. 2014. The tumor-associated marker, PVRL4 (nectin-4), is the epithelial receptor for morbilliviruses. *Viruses.* **6**(6): 2268-86.

Derr P, Yeung C, Cooper T, Kirchoff C. 2001. Synthesis and glycosylation of CD52, the major “maturation-associated antigen of rat spermatozoa, in the cauda epididymidis. *Reproduction* **121**(3): 435–446.

- Donev RM, Sivasankar B, Mizuno M, Morgan BP. 2008. The mouse complement regulator CD59b is significantly expressed only in testis and plays roles in sperm acrosome activation and motility. *Mol Immunol* **45**(2): 534-42.
- Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell*. **75**(2): 295-305.
- Engel P, Boumsell L, Balderas R, Bensussan A, Gattei V, Horejsi V, Jin BQ, Malavasi F, Mortari F, Schwartz-Albiez R, Stockinger H, Van Zelm MC, Zola H, Clark G. 2015. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *The Journal of Immunology* **195**(10): 4555–4563.
- Evans JP. 2002. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Hum Reprod Update* **8**: 297–311.
- Evans JP. 2012. Sperm-egg interaction. *Annu Revn Physiol* **74**: 477–502.
- Fabryova K, Simon M. 2009. Function of cell surface molecules (CD molecules) in the reproduction processes. *General Physiology and Biophysics* **28**(1): 1–7.
- Fenichel P, Durand-Clément M. 1999. Role of integrins during fertilization in mammals. *Human Reproduction* **13**(4): 31-46.
- Finkelstein M, Etkovitz N, Breitbart H. 2020. Ca²⁺ signaling in mammalian spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* **516**: 110953.
- Flesch FM, Voorhout WF, Colenbrander B, van Golde LM, Gadella BM. 1998. Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biol Reprod* **59**(6): 1530-9.
- Flori F, Ermini L, La Sala GB, Nicoli A, Capone A, Focarelli R, Rosati F, Giovampola CD. 2008. The GPI-anchored CD52 antigen of the sperm surface interacts with semenogelin and participates in clot formation and liquefaction of human semen. *Mol Reprod Dev* **75**(2): 326-35.
- Florman HM, First NL. 1988. The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. *Dev Biol* **128**: 453–463.
- Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. 2008. Regulating the acrosome reaction. *The International Journal of Developmental Biology* **52**(5–6): 503.
- Frolikova M, Manaskova-Postlerova P, Cerny J, Jankovicova J, Simonik O, Pohlova A, Secova P, Antalikova J, Dvorakova-Hortova K. 2018. CD9 and CD81 interactios and their structural modelling in sperm prior to fertilization. *International Journal of molecular Sciences* **19**: 1236.
- Frolikova M, Sebkova N, Ded L, Dvorakova-Hortova K. 2016. Characterization of CD46 and B1 integrin dynamics durin sperm acrosome reaction. *Scientific reports* **6**: 33714.
- Frolikova M, Stopkova R, Antalikova J, Stopka P, Komrskova K. 2012. Role of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 in reproduction. *Folia Zoologica* **61**: 84-94.
- Frolikova M, Valaskova E, Cerny J, Lumeau A, Sebkova N, Palenikova V, Sanches-Hernandez N, Pohlova A, Manaskova-Postlerova P, Dvorakova-Hortova K. 2019. Addressing the Compartmentalization of Specific Integrin Heterodimers in Mouse Sperm. *Int J Mol Sci* **20**(5): 1004.

Fujita T, Inoue T, Ogawa K, Iida K, Tamura N. 1987. The mechanism of action of decay-accelerating factor (DAF). DAF inhibits the assembly of C3 convertases by dissociating C2a and Bb. *J Exp Med* **166**(5): 1221-8.

Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. 2003. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat. Med* **9**: 1408–1412.

Gangwar DK, chen Atreja SK. 2015. Signalling Events and Associated Pathways Related to the Mammalian Sperm Capacitation. *Reprod Domest Anim* **50**: 705–711.

Hale G, Rye PD, Warford A, Lauder I, Brito-Babapulle A. 1993. The glycosylphosphatidylinositol-anchored lymphocyte antigen CD52 is associated with the epididymal maturation of human spermatozoa. *J Reprod Immunol* **23**(2): 189-205.

Hale G. 2001. CD52 (CAMPATH-1). *J Biol Regul Homeost Agents* **15**: 386–91.

Hardy DM, Garbers DL. 1995. A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. *The Journal of Biological Chemistry* **270**(44): 26025–26028.

Harper CV, Barratt CLR, Publicover SJ, Kirkman-Brown JC. 2006. Kinetics of the progesterone-induced acrosome reaction and its relation to intracellular calcium responses in individual human spermatozoa. *Biology of reproduction* **75**: 933-39.

Hemler ME. 2001. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* **55**(7):1103-7.

Hemler ME. 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(10): 801-11.

Higginbottom A, Takahashi Y, Bolling L, Coonrod SA, White JM, Partridge LJ, Monk PN. 2003. Structural requirements for the inhibitory action of the CD9 large extracellular domain in sperm/oocyte binding and fusion. *Biochem Biophys Res Commun.* **311**(1): 208-14.

Hinchliffe SJ, Spiller OB, Rushmere NK, Morgan BP. 1998. Molecular cloning and functional characterization of the rat analogue of human decay-accelerating factor (CD55). *J Immunol* **161**(10): 5695-703.

Hoffmann EM. 1969. Inhibition of complement by a substance isolated from human erythrocytes. II. Studies on the site and mechanism of action. *Immunochemistry* **6**(3): 405-19.

Holt DS, Botto M, Bygrave AE, Hanna SM, Walport MJ, Morgan BP. 2001. Targeted deletion of the CD59 gene causes spontaneous intravascular hemolysis and hemoglobinuria. *Blood* **98**(2): 442-9.

HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTUŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK, 2017. *Základy imunologie. 6., aktualizované vydání.* Triton, Praha.

Hosokawa M, Nonaka M, Okada N, Nonaka M, Okada H. 1996. Molecular cloning of guinea pig membrane cofactor protein: preferential expression in testis. *J Immunol* **157**: 4946–4952.

Hotta H, Ross AH, Huebner K, Isobe M, Wendeborn S, Chao MV, Ricciardi RP, Tsujimoto Y, Croce CM, Koprowski H. 1988. Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res* **48**(11): 2955-62.

Hsu EC, Dorig RE, Sarangi F, Marciel A, Iorio C, Richardson CD. 1997. Artificial mutations and natural variations in the CD46 molecules from human and monkey cells define regions important for measles virus binding. *J Virol* **71**: 6144–6154.

- Hughes TR, Piddlesden SJ, Williams JD, Harrison RA, Morgan BP. 1992. Isolation and characterization of a membrane protein from rat erythrocytes which inhibits lysis by the membrane attack complex of rat complement. *Biochem J* **284**(1): 169-76.
- Hynes RO. 1992. Integrins: versability, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25.
- Hynes RO. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-687.
- Chalbi M, Barraud-Lange V, Ravaux B, Howan K, Rodriguez N, Soule P, Ndzoudi A, Boucheix C, Rubinstein E, Wolf JP, Ziyyat A, Perez E, Pincet F, Gourier Ch. 2014. Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives CD9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. *Development* **141**: 3732-3739.
- Charrin S, Manie S, Oualid M, Billard M, Boucheix C, and Rubinstein E. 2002. Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Lett* **516**: 139-144.
- Charrin S, Manié S, Thiele C, Billard M, Gerlier D, Boucheix C, Rubinstein E. 2003. A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins. *Eur J Immunol* **33**(9): 2479-89.
- Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J. 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* **289**: 625-628.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* **434**: 234-238.
- Inoue N, Ikawa M, Nakanishi T, Matsumoto M, Nomura M, Seya T, Okabe M. 2003. Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Mol Cell Biol* **23**(7): 2614-22.
- Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Maekawa M, Miyado K, Toshimori K. 2010. Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell Tissue Res*. **340**(3): 583-94.
- Jankovicova J, Bartokova M, Horovska L et al. 2019. Poster: detection of cluster of differentiation molecule 63 in bull sperm. *Reprod Dom Anim* **54**:110-111.
- Jankovicova J, Frolikova M, Palenikova V, Valaskova E, Cerny J, Secova P, Bartokova M, Horovska L, Manaskova-Postlerova P, Antalikova J, Komrskova K. 2020. Expression and distribution of CD151 as a partner of alpha6 integrin in male germ cells. *Scientific reports*. **10**: 4374.
- Jankovicova J, Frolikova M, Sebkova N, Simon M, Cupperova P, Lipcseyova D, Michalkova K, Horovska L, Sedlacek R, Stopka P, Dvorakova-Hortova AJK. 2016. Characterization of tetraspanin protein CD81 in mouse spermatozoa and bovine gametes. *Reproduction* **152**: 785-793.
- Jankovicova J, Neuerova Z, Secová P, Bartoková M, Bubenickova F, Komrskova K, Postlerova P, Antaliková J. 2020b. Tetraspanins in mammalian reproduction: spermatozoa, oocytes and embryos. *Med Microbiol Immunol* **209**(4): 407-425.
- Jankovicova J, Secova P, Manaskova-Postlerova P, Simonik O, Frolikova M, Chmelikova E, Horovska L, Michalkova K, Dvorakova-Hortova K, Antalikova J. 2019.

Detection of CD9 and CD81 tetraspanins in bovine and porcine oocytes and embryos. *Int J Biol Macromol* **123**: 931–938.

Jankovicova J, Simon M, Antalikova J, Cupperova P, Michalkova K. 2015. Role of Tetraspanin CD9 Molecule in Fertilization of Mammals. *Physiol Res* **64**: 279-293.

Jankovicova J, Simon M, Antaliková J, Horovska L, Fybryova K. 2008. Potential role of bovine cd46 in the reproduction process. *Journal of Agrobiology*. **25**: 35-37.

Jankovicova, J, Antalikova J, Simon M, Michalkova K, Horovska L. 2011. Comparative fluorescence analysis of the bovine sperm using IVA-520 (anti-CD46 antibody) and lectins: probable localisation of CD46 on bovine sperm membrane. *General Physiology and Biophysics* **30**(5): 70–76.

Jegou A, Ziyat A, Barraud-Lange V, Perez E, Wolf JP, Pincet F, Gourier Ch. 2011. CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 10946–10951.

Johnson J, Espinoza T, McGaughey RW, Rawls A, Wilson-Rawls J. 2001. Notch pathway genes are expressed in mammalian ovarian follicles. *Mech Dev* **109**(2): 355-61.

Johnson PM, Clift LE, Andrlíkova P, Jursova M, Flanagan BF, Cummerson JA, Stopka P, Dvorakova-Hortova K. 2007. Rapid sperm acrosome reaction in the absence of acrosomal CD46 expression in promiscuous field mice (*Apodemus*). *Reproduction* **134**(6): 739-47.

Johnstone RW, Loveland BE, McKenzie IF. 1993. Identification and quantification of complement regulator CD46 on normal human tissues. *Immunology* **79**(3): 341-7.

Kaewmala K, Uddin MJ, Cinar MU, Grosse-Brinkhaus C, Jonas E, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K. 2011. Association study and expression analysis of CD9 as candidate gene for boar sperm quality and fertility traits. *Anim Reprod Sci* **125**(1-4): 170-9.

Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S, Kudo A. 2000. The gamete fusion process is defective in eggs of CD9-deficient mice. *Nat Genet* **24**: 279–282.

Kallstrom H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB. 1997. Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **25**: 639–647.

Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. 2004. CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol. Reprod.* **70**: 70–75.

Kierszenbaum AL, Rosselot C, Rivkin E, Tres LL. 2006. Role of integrins, tetraspanins and ADAM proteins during the developing of apoptotic bodies by spermatogenic cells. *Mol Reprod Dev* **73**: 906–917.

Kirchhoff C, Krull N, Pera I, Ivell R. 1993. A major mRNA of the human epididymal principal cells, HE5, encodes the leucocyte differentiation CDw52 antigen peptide backbone. *Mol Reprod Dev* **34**(1): 8-15.

Kirchhoff C. 1996. CD52 is the ‘major maturation-associated’ sperm membrane antigen. *Mol Hum Reprod* **2**: 9–17.

Kitamura M, Matsumiya K, Yamanaka M, Takahara S, Hara T, Matsumoto M, Namiki M, Okuyama A, Seya T. 1997. Possible association of infertility with sperm-specific abnormality of CD46. *J Reprod Immunol* **33**(1): 83-8.

- Klinovska K, Sebkova N, Dvorakova-Hortova K. 2014. Sperm-egg fusion: a molecular enigma of mammalian reproduction. *Int J Mol Sci* **15**(6): 10652-68.
- Koyama K, Hasegawa A, Komori S. 2009. Functional aspects of CD52 in reproduction. *Journal of Reproductive Immunology* **83**: 56-59.
- Kummer D, Steinbacher T, Schwietzer MF, Thölmann S, Ebnet K. 2020. Tetraspanins: integrating cell surface receptors to functional microdomains in homeostasis and disease. *Med Microbiol Immunol* **209**(4):397-405.
- Le Fric G, Sheppard D, Whiteman P, Karsten CM, Shamoun SA, Laing A, Bugeon L, Dallman MJ, Melchionna T, Chillakuri C, Smith RA, Drouet C, Couzi L, Fremeaux-Bacchi V, Köhl J, Waddington SN, McDonnell JM, Baker A, Handford PA, Lea SM, Kemper C. 2012. The CD46-Jagged1 interaction is critical for human TH1 immunity. *Nat Immunol* **13**(12): 1213-21.
- Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C. 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* **287**: 319–321.
- Lesley J, Hyman R. 1998. CD44 structure and function. *Front Biosci* **3**: 616-30.
- Levy S, Shoham T. 2005. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* **5**(2): 136-48.
- Levy S, Shoham T. 2005b. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda)* **20**: 218-24.
- Li YH, Hou Y, Ma W, Yuan JX, Zhang D, Sun QY, Wang WH. 2004. Localization of CD9 in pig oocytes and its effects on sperm–egg interaction. *Reproduction* **127**: 151–157.
- Lin F, Fukuoka Y, Spicer A, Ohta R, Okada N, Harris CL, Emancipator SN, Medof ME. 2001. Tissue distribution of products of the mouse decay-accelerating factor (DAF) genes. Exploitation of a Daf1 knock-out mouse and site-specific monoclonal antibodies. *Immunology* **104**(2): 215-25.
- Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P. 1994. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *Journal of Cell Biology* **125**(5): 1157–1163.
- Linfor J, Berger T. 2000. Potential role of αv and $\beta 1$ integrins as oocyte adhesion molecules during fertilization in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility* **120**: 65-72.
- Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, Rooney IA, Atkinson JP. 1996. Control of the complement system. *Adv. Immunol* **61**: 201–283.
- Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP. 1991. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* **9**: 431-55.
- Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. 2000. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* **113** (20): 3563-71.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* **25**(4): 402-8.
- Loomis PR, Graham JK. 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci* **105**(1-2): 119-28.

Mahony MC, Fulgham DL, Blackmore PF, Alexander NJ. 1991. Evaluation of human sperm–zona pellucida tight binding by presence of monoclonal antibodies to sperm antigens. *J Reprod Immunol* **19**: 269–285.

Machtinger R, Laurent LC, Baccarelli AA. 2016. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Hum Reprod Update* **22**: 182–193.

Martin-Alonso JM, Hernando N, Ghosh S, Coca-Prados M. 1992. Molecular cloning of the bovine CD9 antigen from ocular ciliary epithelial cells. *J Biochem* **112**(1): 63-7.

Mazur P, Leibo SP, Chu EH. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res* **71**(2): 345-55.

Mead R, Hinchliffe SJ, Morgan BP. 1999. Molecular cloning, expression and characterization of the rat analogue of human membrane cofactor protein (MCP/CD46). *Immunology* **98**(1): 137-43.

Michalkova K, Simon M, Antalikova J, Klima J, Horovska L, Jankovicova J, Hluchy S. 2010. Identification of bovine CD52-like molecule by monoclonal antibody IVA-543: distribution of CD52-like molecule in the bull genital tract. *Theriogenology* **74**: 1066-1074.

Miller BJ, Georges-Labouesse E, Primakoff P, Myles DG. 2000. Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin $\alpha 6\beta 1$ and is CD9-dependent. *J Cell Biol* **6**: 1289-96.

Miwa T, Nonaka M, Okada N, Wakana S, Shiroishi T, Okada H. 1998. Molecular cloning of rat and mouse membrane cofactor protein (MCP, CD46): preferential expression in testis and close linkage between the mouse *Mcp* and *Cr2* genes on distal chromosome 1. *Immunogenetics* **48**(6): 363-71.

Miwa T, Okada N, Okada H. 2000. Alternative exon usage in the 3' region of a single gene generates glycosylphosphatidylinositol-anchored and transmembrane forms of rat decay-accelerating factor. *Immunogenetics* **51**(2): 129-37.

Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M, Mekada E. 2000. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* **287**: 321–324.

Mizuno M, Harris CL, Johnson PM, Morgan BP. 2004. Rat membrane cofactor protein (MCP; CD46) is expressed only in the acrosome of developing and mature spermatozoa and mediates binding to immobilized activated C3. *Biol Reprod* **71**(4): 1374-83.

Modderman PW. 1989. Cluster report: CD63, Leukocyte typing IV. Oxford University press, UK.

Moore A, White TW, Ensrud KM, Hamilton DW. 1989. The major maturation glycoprotein found on rat cauda epididymal sperm surface is linked to the membrane via phosphatidylinositol. *Biochem Biophys Res Commun* **160**(2): 460-8.

Mortimer D, Curtis EF, Miller RG. 1987. Specific labelling by peanut 436 agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J Reprod Fertil* **81**: 127–135.

Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Roubourdin-Combe C, Gerlier D. 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* **67**(10): 6025-32.

Noda T, Lu Y, Fujihara Y, Oura S, Koyano T, Kobayashi S, Matzuk MM, Ikawa M. 2020. Sperm proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 are required for sperm-oocyte fusion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**(21): 11493-11502.

- Nomura M, Kitamura M, Matsumiya K, Tsujimura A, Okuyama A, Matsumoto M, Toyoshima K, Seya T. 2001. Genomic analysis of idiopathic infertile patients with sperm-specific depletion of CD46. *Exp Clin Immunogenet* **18**(1):42-50.
- Oglesby TJ, Allen CJ, Liszewski MK, White DJ, Atkinson JP. 1992. Membrane cofactor protein (CD46) protects cells from complement-mediated attack by an intrinsic mechanism. *J Exp Med* **175**(6): 1547-51.
- Ohnami N, Nakamura A, Miyado M, Sato M, Kawano N, Yoshida K, Harada Y, Takezawa Y, Kanai S, Ono C, Takahashi Y, Kimura K, Shida T, Miyado K, Umezawa A. 2012. CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biol Open* **1**(7): 640-7.
- Okabe M, Nagira M, Kawai Y, Matzno S, Mimura T, Mayumi T. 1990. A human sperm antigen possibly involved in binding and/or fusion with zona-free hamster eggs. *Fertil Steril* **54**(6): 1121-6.
- Okabe M. 2015. Mechanisms of fertilization elucidated by gene-manipulated animals. *Asian J Androl* **17**: 646–652.
- Okabe M. 2016. The Acrosome Reaction: A Historical Perspective. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **220**: 1–13.
- Okabe M. 2018. Beware of memes in the interpretation of your results - lessons from gene-disrupted mice in fertilization research. *FEBS Lett* **592**: 2673–2679.
- Okada N, Liszewski MK, Atkinson JP, Caparon M. 1995. Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**(7): 2489-93.
- Olson GE, Hamilton DW. 1978. Characterization of the surface glycoproteins of rat spermatozoa. *Biol Reprod* **19**: 26–35.
- Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S. 1990. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol* **10**: 4007–15.
- Otey CAF, Pavalko FM, Burridge K. 1990. An interaction between alpha-actinin and the 31 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol* **11**: 721-729.
- Pagano N, Kosior MA, Gasparrini B, Longobardi V, De Canditiis C, Albero G, Deregibus MC, Bosi G, Idda A, Consiglioet AL. 2020. 148 Bull spermatozoa uptake of extracellular vesicles from bovine seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* **32**:200–200.
- Pausch H, Kölle S, Wurmser C, Schwarzenbacher H, Emmerling R, Jansen S, Trottmann M, Fuerst C, Götz KU, Fries R. 2014. A nonsense mutation in TMEM95 encoding a nondescript transmembrane protein causes idiopathic male subfertility in cattle. *PLoS Genet* **10**(1): 1004044.
- Pera I, Derr P, Yeung CH, Cooper TG, Kirchhoff C. 1997. Regionalized expression of CD52 in rat epididymis is related to mRNA poly(A) tail length. *Mol Reprod Dev* **48**(4): 433-41.
- Perez de la Lastra JM, Hanna SM, Morgan BP. 1999. Distribution of membrane cofactor protein (MCP/CD46) on pig tissues. Relevance To xenotransplantation. *Immunology*. **98**(1): 144-51.
- Pols MS, Klumperman J. 2008. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental cell research* **315**: 1584-1592.

Ponta H, Wainwright D and Herrlich P. 1998. The CD44 protein family. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **30**: 299–305.

Post TW, Liszewski MK, Adams EM, Tedja I, Miller EA, Atkinson JP. 1991. Membrane cofactor protein of the complement system: alternative splicing of serine/threonine/proline-rich exons and cytoplasmic tails produces multiple isoforms that correlate with protein phenotype. *J Exp Med* **174**: 93–102.

Qian YM, Qin X, Miwa T, Sun X, Halperin JA, Song WC. 2000. Identification and functional characterization of a new gene encoding the mouse terminal complement inhibitor CD59. *J Immunol* **165**(5): 2528-34.

Qin X, Krumrei N, Grubissich L, Dobarro M, Aktas H, Perez G, Halperin JA. 2003. Deficiency of the mouse complement regulatory protein mCd59b results in spontaneous hemolytic anemia with platelet activation and progressive male infertility. *Immunity* **18**(2): 217-27.

Ravaux B, Favier S, Perez E, Gourier C. 2018. Egg CD9 protein tides correlated with sperm oscillations tune the gamete fusion ability in mammal. *J Mol Cell Biol* **10**: 494–502.

Richards A, Kemp EJ, Liszewski MK, Goodship JA, Lampe AK, Decorte R, Müslümanoğlu MH, Kavukcu S, Filler G, Pirson Y, Wen LS, Atkinson JP, Goodship TH. 2003. Mutations in human complement regulator, membrane cofactor protein (CD46), predispose to development of familial hemolytic uremic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(22): 12966-71.

Riley RC, Kemper C, Leung M, Atkinson JP. 2002. Characterization of human membrane cofactor protein (MCP; CD46) on spermatozoa. *Mol. Reprod Dev* **62**: 534–546.

Riley RC, Tannenbaum P.L, Abbott DH, Atkinson JP. 2002b: Inhibiting measles virus infection but promoting reproduction: an explanation for splicing and tissue-specific expression of CD46. *J Immunol* **169**: 5405–5409.

Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, Liszewski MK, Atkinson JP. 2004. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends in Immunology* **25**(9): 496-502.

Robertson SA, Sharkey DJ. 2016. Seminal fluid and fertility in women. *Fertil Steril* **106**: 511–519.

Rodríguez-Martínez H, Iborra A, Martínez P, Calvete JJ. 1998. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. *Reproduction, Fertility and Development* **10**: 491–497.

Rubinstein E, Ziyat A, Prenant M, Wrobel E, Wolf JP, Levy S, Le Naour F, Boucheix C. 2006. Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Dev Biol.* **290**(2): 351-8.

Rubinstein E, Ziyat A, Wolf JP, Le Naour F, Boucheix C. 2006b. The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Semin Cell Dev Biol* **17**(2): 254-63.

Rushmere NK, Harrison RA, van den Berg CW, Morgan BP. 1994. Molecular cloning of the rat analogue of human CD59: structural comparison with human CD59 and identification of a putative active site. *Biochem J* **304**(2): 595-601.

Sabetian S, Shamsir MS, Naser MA. 2014. Functional features and protein network of human sperm-egg interaction. *Syst Biol Reprod Med* **60**: 329–337.

Saito H, Kaneko T, Takahashi T, Kawachiya S, Saito T, Hiroi M. 2000. Hyaluronan in follicular fluids and fertilization of oocytes. *Fertil Steril.* **74**(6): 1148-52.

Saling PM, Sowinski J, Storey BT. 1979. An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction. *J Exp Zool* **209**: 229–238.

Salustri A, Yanagishita M, Underhill CB, Laurent TC, Hascall VC. 1992. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev Biol* **151**(2): 541-51.

Santonocito M, Vento M, Guglielmino MR, Battaglia R, Wahlgren J, Ragusa M, Barbagallo D, Borzi P, Rizzari S, Maugeri M, Scollo P, Tatone C, Valadi H, Purrello M, Di Pietro C. 2014. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. *Fertil Steril* **102**:1751–1761.

Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. 1999. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* **99**(7): 817-27.

Satouh Y, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. 2012. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J Cell Sci* **125**(21): 4985-90.

Seehafer JG, Slupsky JR, Tang SC, Shaw AR. 1988. The functional cell surface glycoprotein CD9 is distinguished by being the major fatty acid acylated and a major iodinated cell-surface component of the human platelet. *Biochim Biophys Acta* **952**: 92–100.

Seigneuret M, Delaguillaumie A, Lagaudrière-Gesbert C, Conjeaud H. 2001. Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *J Biol Chem* **276**: 40055–64.

Seya T, Atkinson JP. 1989: Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem J* **264**: 581–588.

Seya T, Hirano A, Matsumoto M, Nomura M, Ueda S. 1999. Human membrane cofactor protein (MCP, CD46): multiple isoforms and functions. *Int J Biochem Cell Biol* **31**(11): 1255-60.

Schröder J, Lüllmann-Rauch R, Himmerkus N, Pleines I, Nieswandt B, Orinska Z, Koch-Nolte F, Schröder B, Bleich M, Saftig P. 2009. Deficiency of the tetraspanin CD63 associated with kidney pathology but normal lysosomal function. *Mol Cell Biol* **29**: 1083–1094.

Schröter S, Derr P, Conradt HS, Nimitz M, Hale G, Kirchhoff C. 1999. Male-specific modification of human CD52. *J Biol Chem* **274**: 29862–73.

Sincock PM, Mayrhofer G, Ashman LK. 1997. Localization of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63, and alpha5beta1 integrin. *J Histochem Cytochem* **4**: 515-25.

Siu KK, Serrão VHB, Ziyat A, Lee JE. 2021. The cell biology of fertilization: Gamete attachment and fusion. *J Cell Biol* **220**(10): e202102146. doi: 10.1083/jcb.202102146.

Sohel MH, Hoelker M, Noferesti SS, Salilew-Wondim D, Tholen E, Looft Ch, Rings F, Uddin MJ, Spencere TE, Schellander K, Tesfaye D. 2013. Exosomal and non-exosomal transport of extracellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. *PLoS ONE* **8**(e78505) DOI: 10.1371/journal.pone.0078505.

Sosnik J, Miranda PV, Spiridonov NA, Yoon SY, Fissore RA, Johnson GR, Visconti PE. 2009. Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *J Cell Sci* **122**(15): 2741-9.

Spicer AP, Seldin MF, Gendler SJ. 1995. Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse decay-accelerating factor genes. Duplicated genes encode glycosylphosphatidylinositol-anchored and transmembrane forms. *J Immunol* **155**(6): 3079-91.

St John T, Meyer J, Idzerda R, Gallatin WM. 1990. Expression of CD44 confers a new adhesive phenotype on transfected cells. *Cell* **60**(1): 45-52.

Stein KK, Primakoff P, Myles D. 2004. Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *J Cell Sci* **117**(26): 6269-74.

Sullivan R, Saez F. 2013. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction* **146**: 21–35.

Sun X, Funk CD, Deng C, Sahu A, Lambris JD, Song WC. 1999. Role of decay-accelerating factor in regulating complement activation on the erythrocyte surface as revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(2): 628-33.

Sutovsky P. 2009. Sperm-egg adhesion and fusion in mammals. *Expert Rev. Mol. Med.* **11**: 11.

Tai XG, Yashiro Y, Abe R, Toyooka K, Wood CR, Morris J, Long A, Ono S, Kobayashi M, Hamaoka T, Neben S, Fujiwara H. 1996. A role for CD9 molecules in T cell activation. *J Exp Med* **184**(2): 753-8.

Takada Y, Ye X, Simon S. 2007. The integrins. *Genome Biol* **8**: 215.

Takahashi Y, Bigler D, Ito Y, White JM. 2001. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. *Mol Biol Cell* **12**: 809–820.

Talbot P, Shur BD, Myles DG. 2003. Cell adhesion and fertilization: Steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biology of Reproduction* **68**(1): 1–9.

Tanihara F, Nakai M, Men NT, Kato N, Kaneko H, Noguchi J, Otoi T, Kikuchi K. 21014. Roles of the zona pellucida and functional exposure of the sperm-egg fusion factor 'IZUMO' during in vitro fertilization in pigs. *Anim Sci J* **85**(4): 395-404.

Tanphaichitr N, Carmona E, Bou Khalil M, Xu H, Berger T, Gerton GL. 2007. New insights into sperm-zona pellucida interaction: involvement of sperm lipid rafts. *Frontiers in Bioscience* **12**: 1748–1766.

Tateno H, Krapf D, Hino T, Sánchez-Cárdenas C, Darszon A, Yanagimachi R, Visconti PE. 2013. Ca²⁺ ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**(46): 18543-8.

Taylor CT, Biljan MM, Kingsland CR, Johnson PM. 1994. Inhibition of human spermatozoon-oocyte interaction in vitro by monoclonal antibodies to CD46 (membrane cofactor protein). *Hum Reprod* **9**: 907–911.

Thomas L, Byers HR, Vink J, Stamenkovic I. 1992. CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J Cell Biol.* **118**(4): 971-7.

- Tienthai P, Kjellén L, Pertoft H, Suzuki K, Rodriguez-Martinez H. 2000. Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. *Reprod Fertil Dev* **12**(3-4): 173-82.
- Toole BP. 1990. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Current Opinion in Cell Biology* **2**: 839–844.
- Toole, B.P. 2001. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin. Cell Dev Biol* **12**: 79–87.
- Töpfer-Petersen E, Henschen A. 1987. Acrosin shows zona and fucose binding, novel properties for a serine proteinase. *FEBS Letters* **226**(1): 38–42.
- Treumann A, Lively MR, Schneider P, Ferguson MA. 1995. Primary structure of CD52. *J Biol Chem* **270**(11): 6088-99.
- Tsujimura A, Shida K, Kitamura M, Nomura M, Takeda J, Tanaka H, Matsumoto M, Matsumiya K, Okuyama A, Nishimune Y, Okabe M, Seya T. 1998. Molecular cloning of a murine homologue of membrane cofactor protein (CD46): preferential expression in testicular germ cells. *Biochem J* **330**: 163–168.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**: 654–659.
- Valenticova J, Simon M, Antalikova J. 2005. Function of complement regulatory proteins in immunity of reproduction: a review. *Czech J. Anim. Sci.* **50**(4): 135-141.
- van den Berg CW, Harrison RA, Morgan BP. 1993. The sheep analogue of human CD59: purification and characterization of its complement inhibitory activity. *Immunology* **78**(3): 349-57.
- Van den Berg CW, Pérez de la Lastra JM, Llanes D, Morgan BP. 1997. Purification and characterization of the pig analogue of human membrane cofactor protein (CD46/MCP). *J Immunol* **158**: 1703-1709.
- Van Soom A, Tanghe S, De Pauw I, Maes D, De Kruif A. 2002. Function of the Cumulus Oophorus Before and During Mammalian Fertilization. *Reproduction in Domestic Animals* **37**(3): 144–151.
- Vinatier D. 1995. Integrins and reproduction. *European Journal of Obstetrics a Gynecology and Reproductive Biology* **59**: 71-81.
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning X, Fornes M, Kopf GS. 1998. The molecular basis of sperm capacitation. *Journal of Andrology* **19**(2): 242–248.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol.* **3**(2): 59-64.
- Wheatley SC, Isacke CM, Crossley PH. 1993. Restricted expression of the hyaluronan receptor, CD44, during post-implantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning. *Development* **19**: 295–306.
- Wright MD, Geary SM, Fitter S, Moseley GW, Lau LM, Sheng KCh, Apostolopoulos V, Stanley EG, Jackson DE, Ashman LK. 2004. Characterization of mice lacking the tetraspanin superfamily member CD151. *Mol Cell Biol* **24**: 5978–5988.
- Wu E, Trauger SA, Pache L, Mullen TM, von Seggern DJ, Siuzdak G, Nemerow GR. 2004. Membrane cofactor protein is a receptor for adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. *J Virol* **78**(8): 3897-905.

Xia MQ, Hale G, Lively MR, Ferguson MA, Campbell D, Packman L, Waldmann H. 1993. Structure of the CAMPATH-1 antigen, a glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein which is an exceptionally good target for complement lysis. *Biochem J* **293**(3): 633-40.

Yang X, Claas C, Kraeft SK, Chen LB, Wang Z, Kreidberg JA, Hemler ME. 2002. Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol Biol Cell* **13**(3): 767-81.

Yeung CH, Cooper TG, Nieschlag E. 1997. Human epididymal secreted protein CD52 on ejaculated spermatozoa: correlations with semen characteristics and the effect of its antibody. *Mol Hum Reprod* **12**: 1045-51.

Yeung CH, Pérez-Sánchez F, Schröter S, Kirchhoff C, Cooper TG. 2001. Changes of the major sperm maturation-associated epididymal protein HE5 (CD52) on human ejaculated spermatozoa during incubation. *Mol Hum Reprod* **7**(7): 617-24.

Yeung CH, Schroter S, Kirchhoff C, Nieschlag E. 1998. Epididymal secretion of CD52 as measured in human seminal plasma by a fluorescence immunoassay. *Molecular human reproduction* **4**(5): 447-451.

Yoshida K, Kawano N, Harada Y, Miyado K. 2014. Role of CD9 in sperm-egg fusion and virus-induced cell fusion in mammals. Pages 383-391 in: Sawada H, Inoue N, Iwano M (eds) *Sexual reproduction in animals and plants*. Springer, Tokyo.

Zeheb R, Orr GA. 1984. Characterization of a maturation-associated glycoprotein on the plasma membrane of rat caudal epididymal sperm. *J Biol Chem* **259**(2): 839-48.

Zigo M, Dorosh A, Pohlova A, Jonakova V, Sulc M, Manaskova-Postlerova P. 2015. Panel of monoclonal antibodies to sperm surface proteins as a tool for monitoring localization and identification of sperm-zona pellucida receptors. *Cell and Tissue Research* **359**(3): 895-908.

Ziyyat A, Rubinstein E, Monier-Gavelle F, Barraud V, Kulski O, Prenant M, Boucheix C, Bomsel M, Wolf JP. 2006. CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *J Cell Sci* **119**(3): 416-24.

Zola H, Swart B, Banham A, Barry S, Beare A, Bensussan A, Boumsell L, Buckley CHD, Buhning HJ, Clark G, Engel P, Fox D, Jin BQ, Macardle PJ, Malavasi F, Mason D, Stockinger H, Yang X. 2007. CD molecules 2006 - Human cell differentiation molecules. *Journal of Immunological Methods* **319**: 1-2.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

AP	adaptorový protein
AR	akrozomální reakce
CaI	calcium ionophor
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementární DNA
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
EC	extracelulární smyčka
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GPI	glykofosfatidylinositol
ID	inseminační dávka
ILV	intraluminální vāčky
MAC	membrane attack complex
NC	nitrocelulóza
NTC	no template control
PAK	protein kináza PAK
PBS	phosphate buffered saline
PM	plazmatická membrána
PVDF	polyvinylidenfluorid
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
SCR	short concensus repeats („sushi“ doména)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
TBS	tris-buffered saline
TM	transmembránový
ZP	zona pellucida