

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Exprese a lokalizace proteinu CD151 v oocytu prasete

Diplomová práce

**Bc. Helena Kavalcová
Reprodukční biotechnologie**

doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci: „Expresse a lokalizace CD151 v oocytu prasete“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. 4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé práce doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D. za odborné vedení, vždy vstřícný přístup a veškerý čas věnovaný této diplomové práci. Speciální poděkování patří Ing. Kateřině Havlíkové, která mě doprovázela během práce v laboratoři a ochotně pomáhala, kdykoliv jsem pomoc potřebovala. V neposlední řadě děkuji své rodině a partnerovi za podporu a vytvoření podmínek pro vznik této práce.

Expresa a lokalizace proteinu CD151 v oocytu prasete

Souhrn

Membrány všech buněk, s výjimkou erytrocytů, obsahují tzv. tetraspaninovou síť – funkční oblasti v membráně složené z proteinů. Stejně tak tomu je i v případě oocytů. Mezi tetraspaniny významné pro proces oplození patří zejména molekuly CD9, CD81 a CD151. Pro CD molekuly je typický výskyt v povrchové oblasti oocytu. Cílem předložené diplomové práce bylo detekovat tetraspanin CD151 v oocytu prasete během jeho meiotického zrání. Využita byla metoda Western blot a imunocytochemická detekce.

Prasečí kumulo-oocytární komplexy (COCs) byly *in vitro* kultivovány po dobu 0, 24 a 48 hodin, do stadia zárodečného váčku (GV), první (MI) a druhé meiotické metafáze (MII). Ve vzorcích obsahujících vždy 100 oocytů v daném stadiu meiotického zrání nebo jejich kumulárních buněk byla provedena precipitace proteinů. Pomocí SDS elektroforézy byly proteiny separovány a přetištěny na PVDF membránu. Následovala inkubace s primární a sekundární protilátkou. CD151 protein byl kromě metody Western blot v oocytech ve stadiu GV, MI a MII stanovován rovněž imunocytochemickou metodou za využití laserového konfokálního mikroskopu a jeho množství bylo hodnoceno na základě intenzity signálu reakce protilátky s proteinem.

Imunodetekční i imunocytochemická metoda prokázaly přítomnost tetraspaninu CD151 v prasečích oocytech ve všech sledovaných stadiích meiotického zrání – GV, MI i MII, imunodetekcí byl protein detekován také v jejich kumulárních buňkách. Imunocytochemická analýza prokázala, že množství proteinu CD151 je v oocytech ve stadiu zárodečného váčku a první meiotické metafáze srovnatelné, ve druhé meiotické metafázi dochází oproti fázi MI ke statisticky významnému úbytku v množství proteinu. Je známo, že protein CD151 hraje významnou roli během procesu oplození a následné fúze gamet, kterou reguluje prostřednictvím integrinu $\alpha 6\beta 1$. Je možné, že s poklesem množství CD151 v oocytech v MII fázi naopak stoupá množství integrinu $\alpha 6\beta 1$.

Tato studie jako první detekovala protein CD151 v prasečím oocytu, pro ověření funkce tohoto proteinu a významu interakce s integrinem pro proces oplození a fúze jsou nezbytné další studie.

Klíčová slova: Prase, oocyt, protein CD151, exprese, lokalizace

Expression and localization of CD151 protein in porcine oocyte

Summary

Membranes of all cells, with the exception of erythrocytes, contain the so-called tetraspanin network - functional regions in the membrane composed of proteins. The same is true for oocytes. Tetraspanins important for the fertilization process include, in particular, the CD9, CD81 and CD151 molecules. CD molecules are typically found in the surface region of the oocyte. The aim of the presented diploma thesis was to detect tetraspanin CD151 in a porcine oocyte during its meiotic maturation. Western blot and immunocytochemical detection were used.

Porcine cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured *in vitro* for 0, 24 and 48 hours, to the germinal vesicle stage (GV), the metaphase I (MI) and the metaphase II (MII) of meiosis. Protein precipitation was performed in samples each containing 100 oocytes at a given stage of meiotic maturation or their cumular cells. Using SDS electrophoresis, proteins were separated and reprinted on a PVDF membrane. Incubation with primary and secondary antibody followed. In addition to Western blotting in GV, MI and MII oocytes, CD151 protein was also determined by immunocytochemistry using a laser confocal microscope and its amount was evaluated based on the signal strength of the antibody-protein reaction.

Immunodetection and immunocytochemical method proved the presence of tetraspanin CD151 in porcine oocytes in all monitored stages of meiotic maturation - GV, MI and MII, by immunodetection the protein was also detected in their cumular cells. Immunocytochemical analysis showed that the amount of CD151 protein in oocytes in the germinal vesicle stage and the metaphase I stage is comparable, in the metaphase II stage there is a statistically significant decrease in the amount of protein compared to the MI stage. The CD151 protein is known to play an important role during the fertilization and subsequent gamete fusion process, which is regulated by the $\alpha 6\beta 1$ integrin. It is possible that, as the amount of CD151 in oocytes in the MII phase decreases, the amount of $\alpha 6\beta 1$ integrin increases.

This study was the first to detect the CD151 protein in a porcine oocyte, and further studies are needed to verify the function of this protein and the importance of the integrin interaction for the fertilization and fusion process.

Keywords: Pig, oocyte, CD151 protein, expression, localization

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Oogeneze	10
3.1.1 Fáze množení	10
3.1.2 Fáze růstu.....	11
3.1.3 Fáze zrání.....	12
3.1.4 Faktory regulující meiotické zrání.....	15
3.1.4.1 MPF (M-phase Promoting Factor; metafázi podporující faktor).....	15
3.1.4.2 MAP kinázy (MAPK; Mitogen Activated Protein Kinases; mitogeny-aktivované proteinkinázy)	16
3.1.4.3 CSF (Cytostatic Factor; cytostatický faktor)	17
3.1.4.4 Cyklické nukleotidy cAMP a cGMP	18
3.1.4.5 Vápník/Vápníkové ionty (Ca ²⁺)	19
3.1.4.6 Gasotransmitery	20
3.1.4.7 Protein fosfatázy	23
3.2 Fúze plazmatických membrán	23
3.2.1 Molekuly v procesu fúze gamet.....	25
3.2.1.1 Molekuly ve spermii	25
3.2.1.2 Molekuly ve spermii nezbytné pro fúzi	25
3.2.1.3 Molekuly v oocytu nezbytné pro fúzi	26
3.3 Tetraspaninová síť v gametách	31
3.3.1 Tetraspaninová síť ve spermii.....	31
3.3.2 Tetraspaninová síť v oocytu	32
4 Metodika	36
4.1 Získávání vaječníků	36
4.2 Získávání oocytů s ukončeným růstem	36
4.3 Kultivace oocytů s ukončeným růstem	37
4.4 Příprava vzorků pro stanovení CD151 metodou Western blot	37
4.5 Stanovení CD151 metodou Western blot	38
4.5.1 Elektroforéza.....	38
4.5.2 Přenos proteinů na blotovací membránu	41
4.5.3 Blokování membrány s proteiny.....	42
4.5.4 Imunodetekce.....	43
4.6 Imunocytochemická detekce CD151	43
4.7 Statistika	44

5	Výsledky.....	45
5.1	Detekce proteinu CD151 v oocytu prasete během meiotického zrání prostřednictvím metody Western blot	45
5.2	Detekce proteinu CD151 v oocytu prasete prostřednictvím imunocytochemie.....	45
6	Diskuze	47
7	Závěr	49
8	Literatura.....	50

1 Úvod

Neplodnost je stále závažnějším problémem zejména v oblasti reprodukce lidí. Znalost molekul a mechanismů zapojených do tohoto procesu umožní lepší pochopení událostí, které jsou zásadní pro interakci spermií a oocyty savců, a tedy i lepší pochopení příčin problémů s plodností způsobených defekty právě při oplození. Vedle toho umožní také vývoj nových metod pro regulaci a diagnostiku plodnosti a klinickou léčbu neplodnosti lidí a zvířat (Cánovas & Coy 2008; Georgadaki et al. 2016).

Principem oplození savců je úspěšná vazba a následná fúze spermií a plazmatické membrány oocyty. Proces fúze je umožněn řadou molekulárních interakcí, během nichž mají významnou roli fertilin, integriny v plazmatické membráně oocyty a proteiny z rodiny tetraspaninů (Wassarman et al. 2001; Primakoff & Myles 2002).

Tetraspaniny jsou malé multifunkční proteiny specificky lokalizované v plazmatické membráně. Na základě jejich schopnosti vytvářet sítě s dalšími proteiny se účastní mnoha buněčných procesů. Tetraspaniny jsou součástí sítě gamet, nicméně jejich přesná funkce při oplození stále není úplně jasná (Jankovičová et al. 2019). Dle Jankovičové et al. (2020b) působí tetraspaniny v reprodukčním traktu primárně za účelem organizace membránových komplexů obsahujících proteiny, které jsou významné pro interakce membrán spermií a oocyty.

Z rodiny tetraspaninů mají během oplození savců významnou funkci CD molekuly, zejména CD9, CD81 a CD151. Všechny tyto molekuly mají nepostradatelnou funkci v oblasti kvality gamet, během jejich interakce a fúze při oplození a časně embryogeneze (Jankovičová et al. 2020b).

Molekula CD151 má význam mimo jiné pro adhezi gamet, kterou prostřednictvím integrinu $\alpha 6\beta 1$ reguluje (Lammerding et al. 2003). Expresi proteinu CD151 byla popsána zejména v oocytech lidí (Ziyyat et al. 2006). O expresi tohoto proteinu v oocytech prasete během jeho meiotického zrání a procesu fúze prasečích gamet u prasete je známo velmi málo.

Do současnosti se výrazná většina studií na poli výzkumu detekce tetraspaninů v gametách věnovala tetraspaninu CD9, který je v rámci nejvýznamnějších CD molekul v oocytech prozkoumán a popsán nejpodrobněji (Kaji et al. 2000; Miyado et al. 2000; Ziyyat et al. 2006; Ohnami et al. 2012; Sabetian et al. 2014). Studie věnované výskytu i námi zkoumaného proteinu CD151 byly zřejmě provedeny pouze na oocytech lidí (Ziyyat et al. 2006). Detekce CD151 v oocytech prasat zatím studována nebyla. Jankovičové et al. (2020a) se v nedávné době podařilo jako prvním prokázat přítomnost CD151 také ve spermiích, a to u myši. Obecně je tetraspanin CD151 častěji studován v souvislosti s tumory a jinými chorobami (Nankivell et al. 2013; Zeng et al. 2017).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce bylo popsat expresi a lokalizaci proteinu CD151 během meiotického zrání oocyту prasete.

3 Literární rešerše

3.1 Oogeneze

Oogeneze je označení pro soubor vývojových procesů u samic savců, které vedou ke vzniku oocyty, tedy samičí pohlavní buňky. Oocyty mají původ v primordiálních zárodečných buňkách (PGCs; Primordial Germ Cells), které se během procesu oogeneze vyvíjí až ve zralé oocyty, jež jsou oplození schopné (Coticchio et al. 2013). Pro úspěšné dozrávání oocytů je ovšem nezbytné, aby zárodečná buňka během svého vývoje zredukovala svoji genetickou informaci na polovinu. K tomu dochází v průběhu redukčního dělení neboli meiózy (Holt et al. 2013).

Proces oogeneze je komplexní proces regulovaný velkým množstvím intra a extraovariálních faktorů. Oogonie, které vznikají z primordiálních zárodečných buněk, se množí mitózou, čímž vznikají primární oocyty, které jsou zastaveny v profázi prvního meiotického dělení, dokud nejsou plně dorostlé. Meiotická kompetence a kompetence oocyty vyvíjet se je postupně získávána během folikulogeneze, kdy významnou roli sehrává skutečnost, že oocyt roste v interakci s doprovodnými buňkami, které ho obklopují. Komunikace skrze gap junctions mezi oocytem a granulózními buňkami obklopujícími oocyt je zásadní jak pro vývoj oocyty, tak pro diferenciaci granulózních buněk. Oocyty jsou přímo závislé na diferenciovaných kumulárních buňkách, které jim dodávají živiny a zprostředkovávají regulační signály podporující jaderné a cytoplazmatické zrání, a posléze získání meiotické kompetence (Sánchez & Smitz 2012).

Oogeneze je zahájena již během embryonálního vývoje samice a je ukončena až s útlumem její pohlavní aktivity (Coticchio et al. 2013). Zahrnuje tři klíčové fáze: fázi množení, fázi růstu a fázi zrání, během kterých se primordiální zárodečné buňky vyvíjí v primární, později sekundární, a nakonec ve zralé oocyty (Shibuya & Watanabe 2014).

3.1.1 Fáze množení

PGCs, které jsou zakládány již během embryonálního vývoje a vyvíjejí se i postnatálně (Johnson et al. 2004), během fáze množení migrují ze zadního střeva přes dorsální mesenterium do míst budoucích gonád. Migraci a množení PGCs řídí proteiny kostní dřene (BMPs; Bone Marrow Proteins) a aktivin, oba z rodiny transformujících růstových faktorů β (TGF- β ; Transforming Growth Factor β) a řada transkripčních faktorů odvozených od zárodečných buněk (Sánchez & Smitz 2012; de Souza et al. 2017). BMP2 a BMP4 zvyšuje a BMP7 snižuje počet PGCs v myších ováriích, zatímco u lidí zvyšuje počet PGCs aktivin (Zhai et al. 2019). V gonádách samice PGCs diferencují v diploidní oogonie a malé diploidní buňky (Pepling 2006; Bowles & Koopman 2010), přičemž oogonie jsou pak množeny opakovaným mitotickým dělením, které je principem této fáze (Elkouby 2017).

Mitóza tedy nastává během migrace PGCs do gonád a jejich diferenciaci v oogonie. Mitóza zahrnuje dělení jádra, čímž vznikají dvě geneticky zcela shodné dceřinné buňky a je zakončena rozdělením samotné buňky neboli cytokinezí. Před samotným dělením buňky dochází mimo jiné k replikaci DNA (Pepling 2006). Během mitózy se také formuje ovariální folikul (Baltus et al. 2006).

Co se týče embryí prasat, již 24.–26. den po oplození jsou poprvé patrné základy gonád. Primordiální zárodečné buňky se objevují v oblasti zárodečné brázdy nejdříve po 18 dnech po oplození. Mitotické dělení PGCs probíhá od 13. dne embryonálního vývoje a trvá téměř až do narození, konkrétně do 7. dne před ním. Okolo 30. dne po oplození pak dochází k migraci zárodečných buněk do vaječníků (Eppig et al. 2004). Poté zárodečné buňky v místech, kde se vyvíjí vaječníky, ztratí pohyblivost a nastává u nich mitóza. V této fázi se ze zárodečných buněk stávají oogonie (Gosden & Bownes 1995).

Pozvolna také dochází k tvorbě jedné vrstvy granulóznic buněk okolo vyvíjející se pohlavní buňky (Hunter 2000).

3.1.2 Fáze růstu

Fáze růstu se vyznačuje dlouhou délkou trvání a je přerušena až s koncem pohlavní aktivity. Velikost oocytů savců je na začátku fáze růstu 12 až 15 μm a během ní dochází ke zvětšení objemu oocytů až 300x (Wassarman 1988). Objem oocytu prasete se během růstové fáze zvětší z 30 na 120 μm (Motlík & Fulka 1986). Po dosažení pohlavní dospělosti samice se do této fáze v rámci pravidelného ovariálního cyklu dostává vždy hned několik primárních oocytů (Marvan et al. 2017).

Fáze růstu začíná ve chvíli, kdy se oogonie přestanou dělit, zvětší se, vytvoří primární oocyty a zahájí meiózu. Oocyt je následně zastaven ve stadiu *diplojene* během profáze I prvního meiotického dělení a nastává klidové stadium (Baltus 2006).

Se zahájením meiózy vzniká kolem primárního oocytu jedna vrstva buněk zvaná primordiální folikul (Zhai et al. 2019). Původ buněk tvořících primordiální folikul je buď v buňkách tvořících epitel ovárií či pochází z mezonefros (Sawyer et al. 2002). Vznik primordiálního folikulu je ovlivněn mimo jiné estrogenem a rodinou TGF- β . Během vzniku primordiálních folikulů mnoho oocytů zaniká apoptózou (Zhai et al. 2019). V ováriích embryí prasat jsou primordiální folikuly pozorovatelné 56. den po oplození (Bielanska-Osuchowska 2006).

Primární oocyty obklopené primordiálními folikuly zůstávají v klidovém stadiu až do pubertálního věku, kdy jsou aktivovány. Primordiální folikuly se přeměňují na folikuly primární, ve kterých dochází ke zvětšování oocytů a zploštělé granulózní buňky se vyvíjí v kubické folikulární buňky. Přeměna primordiálních folikulů na primární je dynamický proces vyžadující rozsáhlou regulaci (Li et al. 2010).

Současně se zrání folikulů vytváří primární oocyty *zona pellucida* (ZP) a vznikají další vrstvy kubických buněk, čímž vzniká sekundární, a posléze antrální folikul (Zhai et al. 2019).

V raném stadiu vývoje jsou ovariální folikuly nezávislé na folikulostimulačním hormonu (FSH). Od stadia antrálního folikulu je ovšem jejich další vývoj na FSH závislý (MacLennan et al. 2015). Primární oocyt dokončuje první meiotické dělení před ovulací, čímž vzniká haploidní sekundární oocyt a je vyděleno první pólóvé tělísko. Se začátkem ovulace je pak zahájeno druhé meiotické dělení, které je dokončeno pouze v případě, že dojde k oplození, po němž následuje vydělení druhého pólóvého tělíska (MacLennan et al. 2015).

Oocyty rostou ve dvou fázích. Během první fáze dochází k růstu oocytu souběžně s růstem folikulu. Během druhé fáze se velikost oocytu nemění, přestože velikost folikulu narůstá (Motlík & Fulka 1986).

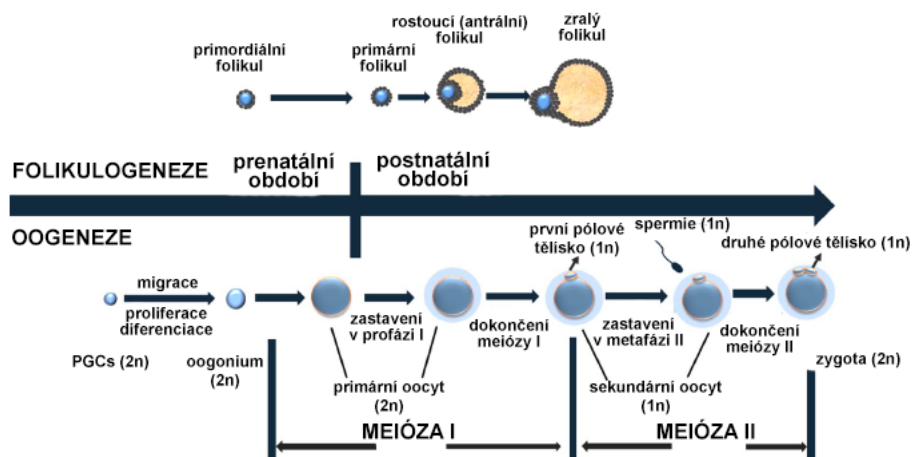
V důsledku řízené proliferace buněk folikulu vzniká obal oocyty, který má několik vrstev a označuje se jako *membrana granulosa* (Hyttel et al. 1999; Eppig 2001). Okolo granulózy dochází k tvorbě obalu vzniklého z intersticiálních buněk. Vzniká tak *theca folliculi interna* a *externa* (Wassarman 1988). Objevuje se také *corona radiata* – vrstva cylindrických granulózních buněk, která těsně obklopuje oocyt. Další významnou událostí růstové fáze je vznik ochranného glykoproteinového obalu okolo oocyty, kterým je *zona pellucida*. Ta vzniká mezi *corona radiata* a oocytem (Lundy et al. 1999; Eppig 2001). Významnou funkci má ZP mimo jiné i během oplození, jelikož se účastní akrozomální reakce, navázání spermie na oocyt a v neposlední řadě chrání oocyt před polyspermií (Yurewicz et al. 1987).

V rostoucích oocytech je možné pozorovat také rozlehlé sférické jádro neboli zárodečný váček (GV) spolu s jedním nebo dvěma menšími jádřky. Jádro zvětšuje svou velikost spolu s rostoucí velikostí oocyty (Hyttel et al. 1999).

Během fáze růstu v oocyty dochází také k syntéze a hromadění proteinů a mRNA, probíhá intenzivní transkripce, translace a syntéza nových organel (Guraya 2000).

3.1.3 Fáze zrání

Meiotické zrání je proces přeměny zcela dorostlého a meioticky kompetentního oocyty v oocyt, který je schopný oplození (Zhai et al. 2019). Tento vývoj oocyty koreluje s folikulogenezí (viz Obrázek 3.1) a důležitá je i komunikace s okolními buňkami. Pro zrání oocyty jsou důležitými regulačními faktory například proteiny Notch (Li et al. 2017) a členové rodiny TGF- β (Su et al. 2008).



Obrázek 3.1 Vztah mezi procesem folikulogeneze a oogeneze u člověka (Zhai et al. 2019)

Tato fáze je zahájena již během prenatálního vývoje. Motlík a Fulka (1986) upřesňují rozdílnost, která je mezi zráním a meiózou. Zdůrazňují, že zrání je pouze část meiózy.

Přeměna primárního oocyty na sekundární oocyt je základním předpokladem fáze zrání. Pro tuto část je charakteristický zánik jaderné membrány a tvorba dělicího vřeténka. Během fáze zrání typicky dochází k rozpadu zárodečného váčku (GVBD; Germinal Vesicle Breakdown) a ke kondenzaci chromatinu. V této fázi se dále formuje dělicí vřeténko a vzniká první pólóvé tělísko. Probíhá také přechod mezi meiózou I a II a je utlumena S-fáze. Posléze dochází i k nástupu druhého meiotického bloku (Schmitt & Nebreda 2002).

Meióza ovulovaných oocytů, které mají separované chromozomy a vydělené druhé pólóvé tělísko, je dokončena po oplození (MacLennan et al. 2015).

Opětovné zahájení meiózy *in vivo* nastává v důsledku LH vlny. Pomocí LH signálu je eliminován jeden či více činitelů, příkladem je eliminace inhibitoru zrání oocytů (OMI; Oocyte Maturation Inhibitor). Důsledkem eliminace je aktivace cyklinů, fosfatáz a kináz, jež mají významnou funkci pro úspěšné dokončení jaderného zrání (Hunter 2000). Pro opětovného zahájení meiózy *in vitro* je postačující uvolnění oocytu z intrafolikulárního prostředí (Stojkovic et al. 1999; Fan et al. 2002).

Během fáze zrání oocyt vstoupí do metafáze prvního zracího dělení. Zárodečný váček oocytu se rozpadá, dochází ke kondenzaci chromozomů a k vydělení prvního pólóvého tělísko (Sharma & Chowdhury 1998). Meióza je na konci této fáze přerušena v metafázi druhého meiotického dělení. Tento proces přerušování meiózy je nazýván jako druhý meiotický blok (Motlík & Kubelka 1990; Swann 1993; Lawrence et al. 1997). Součástí fáze zrání jsou dva procesy, jaderné zrání a cytoplazmatické zrání (Wolf & Zelinski-Wooten 2001).

Zárodečný váček (GV; Germinal Vesicle) je zpočátku ohraničen souvislou jadernou membránou, která se zvlní po jeho rozpadnutí následkem zahájení zrání. Nakonec membrána vytváří dublety spojené s endoplazmatickým retikulem, které jsou později využívány ke znovu utvoření prvojaderné a jaderné membrány (Wassarman 1988). Ke kondenzaci chromozomů při vnitřním okraji jaderné membrány a k přestupu chiazmat na konce chromozomů dochází během stadia diktyotene. Ve chvíli, kdy je téměř dokončená kondenzace, mají telocentrické bivalenty tvar písmene V. Často dochází k jejich spojování s pozůstatky jaderné membrány. Při kondenzaci se chromozomy seskupují, přichází o svá spojení s fragmenty jaderného obalu a řadí se do ekvatoriální roviny (Coticchio et al. 2013).

Změny vnější stavby zárodečného váčku během jeho rozpadu lze v případě prasete klasifikovat do pěti stadií (Sun et al. 2004). Během stadia GV0 je chromatin rozptýlen po celé oblasti jádra, počátek kondenzace a vznik prstencovitého nebo podkovovitého útvaru okolo jádra je zřejmý ve stadiu GV1 (Motlík & Fulka 1976; Guthrie & Garrett 2000; Sun et al. 2004). Během GV2 stadia je pozorovatelné shromažďování chromatinu blízko jádra. Rozpad podkovovité struktury je charakteristický pro stadium GV3, stejně jako vznik základu filamentární sítě. Během GV4 dochází k zániku jaderné membrány a již není pozorovatelné jádérko (Motlík & Fulka 1976; Tan et al. 2009).

Zároveň s rozpadem zárodečného váčku a kondenzací chromozomů se začíná objevovat spojení centromer s mikrotubuly. Vznikají také další organizační centra mikrotubulů (MTOCs; Mikrotubule-organizing Centers). Mikrotubuly, které z nich vystupují, dosahují až do nukleoplazmy (Thibault et al. 1987). Následně se za pomoci kinetochoru napojují na každou z chromatid homologních chromozomů. Spolu s mikrotubuly zde vzniká první meiotické dělicí vřetenko (Calarco 1972; Alberts et al. 1998; Miao et al. 2012). Na vrcholech dělicích vřetének nejsou přítomné centrioly (Wassarman 1988). V blízkosti dělicích vřetének se vyskytuje velký počet mitochondrií, granul a vakuolů (Motlík & Fulka 1976; Hafez & Hafez 2000).

Při prvním meiotickém dělení dochází k výměně genetického materiálu a zároveň i k meiotickému crossing-overu. Páry homologních chromozomů si vyměňují homologní segmenty DNA mezi nesesterskými chromatidami. Tento mechanismus zabraňuje tvorbě identických gamet (Alberts et al. 1998).

První meiotické dělení

Profázi I, která je zahájena již ve fázi množení, lze rozdělit do pěti stadií: *leptotene*, *zygotene*, *pachytene*, *diplotene* a *diakineze* (Sánchez & Smitz 2012).

V první fázi, *leptotene*, nastává spiralizace chromozomů a jejich kondenzace v jádře. Chromatin obsahuje denzní granula a je heterochromatický. V neposlední řadě nastává rozpad jaderných pórů. I během následné fáze *zygotene* dále probíhá kondenzace. Zároveň v této fázi dochází ke zkrácení chromozomů, které se následně homologicky párují a vytváří bivalenty. V průběhu *pachytene* pokračuje zkracování již zpárovaných chromozomů, vznikají dvě sesterské chromatidy a probíhá crossing-over, kdy se vymění úseky nesesterských chromatid homologních chromozomů. Chromatidy se oddělují v následné fázi *diplotene*, kdy jsou vzájemně spojené už pouze za pomoci chiazmat. K definitivnímu rozdělení chromozomů dochází během *diplotene*. V tento okamžik nastupuje první meiotický blok (Wassarman 1988; Hunt & Hassold 2008).

Pro další fázi meiotického zrání, metafázi I, je charakteristické seřazení spárovaných homologních chromozomů do ekvatoriální roviny. Zároveň se v této fázi centromery orientují k opačným pólům vřeténka. Chromozomy jsou uspořádané do bivalentů, k jejich posunu dochází za pomoci depolymerovaných kinetochorových mikrotubulů u kinetochoru (Alberts et al. 1998; McGinnis et al. 2012).

Během následné anafáze I dochází k procesu zvanému disjunkce. U obou z homologních chromozomů každého bivalentu dochází k samostatnému pohybu a jejich sesterské chromatidy a centromery se přesouvají k opačným pólům buňky. Počet chromozomů je zredukován na polovinu. Tento haploidní počet chromozomů je u každého produktu vzniklého prvním meiotickým dělením. Bivalenty se rozdělují nezávisle na sobě a vznikají náhodné kombinace z původní otcovské a mateřské sady chromozomů. Následkem crossing-overu a rekombinací roste variabilita genetického materiálu, který je přenášen na potomka (Coticchio et al. 2013).

Následuje telofáze I, během níž u obou haploidních sad chromozomů nacházejících se na protilehlých pólech buňky dojde ke shluknutí. To je následováno vydělením prvního pólového tělíska obsahujícího polovinu genetického materiálu. V prvním pólovém tělísku se mimo jiné buněčné organely nachází i mitochondrie, ribozómy a kortikální granula (Coticchio et al. 2013).

Druhé meiotické dělení

Druhému meiotickému dělení nepředchází replikace DNA (Zhai et al. 2019), proto buňka, která vstupuje do meiózy II, obsahuje haploidní počet chromozomů. Během metafáze II se u většiny savců buněčný cyklus podruhé zastavuje. K úspěšnému dokončení meiózy dochází pouze za předpokladu oplození či aktivace partenogeneze (Sun & Nagai 2003).

Pro cytoplazmatické zrání je bezpodmínečně nutná syntéza a skladování rozsáhlého molekulového spektra. Neméně důležitá je i modifikace molekul s jejich následným správným využitím během dokončování zrání a oplození (Lodish et al. 2008). Zpočátku embryogeneze dochází k přeskupení organel, skladování mRNA a proteinů působících během procesů ve fázi

zrání (Brevini-Gandolfi & Gandolfi 2001; Sirard et al. 2006). Když buňka prochází přeměnou z fáze GV do metafáze II, dochází k přeskupení Golgiho aparátu, endoplazmatického retikula, ribozómů a mitochondrií. Tyto organely jsou schopné pohybu pomocí cytoskeletárních mikrofilament a mikrotubulů (Ferreira et al. 2009).

V případě prasečích oocytů, které jsou kultivované *in vitro*, může nastat deficit cytoplazmatických organel. Ten má za následek absenci vývojové kompetence. Důležitá je koordinace procesů cytoplazmatického a jaderného zrání tak, aby k jejich dokončení došlo zároveň (Hunter 2000).

3.1.4 Faktory regulující meiotické zrání

Meiotické zrání je během svého průběhu regulováno řadou faktorů. Tyto faktory jsou zásadní k úspěšnému dokončení celého procesu. Vedle nutnosti odstranit inhibitory potlačující meiózu je také nezbytné zajistit pozitivní signály za účelem opětovného zahájení meiózy (Tosti & Boni 2004).

Regulace meiotického zrání oocytů savců je zajištěna různými molekulami, kterými jsou například cykliny, na cyklinech závislé kinázy, fosfatázy a signální molekuly, které často tvoří složité signální kaskády (Cho et al. 1974).

3.1.4.1 MPF (M-phase Promoting Factor; metafázi podporující faktor)

MPF je regulační faktor univerzální jak pro mitózu, tak pro meiózu (Nurse 1990). Řadí se do skupiny tzv. proteinkináz, jež fosforylují cílové proteiny (Murray et al. 2003). Historicky je MPF považován za heterodimer složený ze dvou podjednotek – katalytické a regulační (Murray et al. 1989; Nurse 1990).

Serin/threonin proteinkináza p34cdc2, která se řadí do rodiny tyrosinových cyklin dependentních kináz, vytváří katalytickou podjednotku. Podjednotka regulační je tvořena cyklinem B (Dunphy et al. 1988; Gautier & Maller 1988; Gautier et al. 1989). Nicméně nedávno bylo objasněno, že MPF obsahuje nejméně 2 samostatné kinázy – komplex cyklinu B s cyklin-dependentní kinázou 1 (Cdk1) a Greatwall kinázu (Kishimoto 2015).

Spojení obou výše zmiňovaných podjednotek je základním principem aktivace MPF (Gautier et al. 1991; de Vantéry et al. 1997). Následkem je vznik neaktivního komplexu zvaného pre-MPF. Ten se vyskytuje během fáze růstu oocytů. Základní kontrolní bod k vytvoření komplexu pre-MPF je syntéza a degradace cyklinu B (Murray & Kirschner 1989). Na vytvoření pre-MPF mají vliv měnící se hladiny cyklinu B, které, když je dokončena aktivace komplexu MPF, mají funkci regulace buněčného cyklu při meióze (Brunet & Maro 2005), konkrétně je regulace hladiny cyklinu B1 jedním z mechanismů pro udržení meiotického bloku (Holt et al. 2013). Oocyty ve stadiu zárodečného váčku již obsahují významné množství cyklinu B. Je nicméně také zapotřebí, aby byl cyklin B konstantně degradován anafázi podporujícím komplexem (APC). Pokud dojde během stadia zárodečného váčku k akumulaci cyklinu B v oocytu, vlivem jeho zvýšené hladiny dochází k aktivaci MPF vedoucí ke spontánnímu obnovení meiózy (Reis et al. 2006).

Trvale zvýšenou koncentrací stabilizovaného MPF v oocytech je udržován meiotický blok (Pandey et al. 2010). Aktivita MPF je také nezbytnou součástí korektního průběhu fáze zrání. Má kontrolu nad ději vedoucími k tvorbě funkčního dělicího vřeténka (Hunter 2000)

a zároveň má klíčový význam během iniciace segregace chromozomů také při anafázi (King et al. 1996). Kromě toho i kondenzace chromozomů, změna uspořádání mikrofilament a reorganizace intermediálních filament je úzce spjata s aktivitou MPF (Stojkovic et al. 1999).

Úroveň aktivity MPF má souvislost s mírou fosforylace a aktivní syntézou proteinů uvnitř buňky (Procházka et al. 1989; Chen et al. 2000). Fosforylace reguluje MPF nejen pozitivně, ale i negativně. Inhibiční fosforylace p34cdc2 udržuje pre-MPF ve stavu bez aktivity (Marlovits et al. 1998) a k jejímu průběhu dochází na tyrosinu 15 a threoninu 14. V případě tyrosinu 15 dochází k fosforylaci vlivem Myt 1 kinázy a v případě threoninu 14 za pomoci Wee 1 kinázy (Touny & Banerjee 2006). Threonin 161 je místem fosforylace za účelem aktivovat komplex p34cdc2 prostřednictvím kinázy CAK (cdc-aktivační kináza) (Clarke 1995).

V průběhu meiotického zrání oocytů klesá aktivita MPF (Mattiloli et al. 1991). Během metafáze prvního meiotického dělení tedy zprvu dochází k nárůstu aktivity MPF, poté ale nastává pokles jeho aktivity, který je nezbytný pro přechod z metafáze do anafáze (Motlík & Kubelka 1990). Tento charakteristický pokles aktivity MPF způsobuje komplex podporující anafázi (Anaphase Promoting Complex, APC) (King et al. 1996). APC umožňuje vazbu ubiquitinu na cyklin B, který je posléze identifikován a degradován prostřednictvím proteazómu (Glotzer et al. 1991).

Během metafáze druhého meiotického zrání se aktivita MPF opět zvyšuje. Děje se tak vlivem níže charakterizovaného cytostatického faktoru (CSF) zodpovědného za vysokou úroveň aktivity MPF během celého zastavení meiotického dělení v metafázi II (Murray & Kirschner 1989).

3.1.4.2 MAP kinázy (MAPK; Mitogen Activated Protein Kinases; mitogeny-aktivované proteinkinázy)

MAP kinázy se zásadně podílejí na přenosu extracelulárního signálu v buňce. Proto se také nazývají extracelulárně regulovanými kinázami (ERK). Řadí se mezi serin/threonin proteinkinázy. Meiotické zrání regulují fosforylací proteinů právě na serinových či threoninových zbytcích (Stojkovic et al. 1999). Příkladem je fosforylace proteinů udržujících chromatin v kondenzovaném stavu, čímž je znemožněn přechod oocyty do interfáze (Chen et al. 2020).

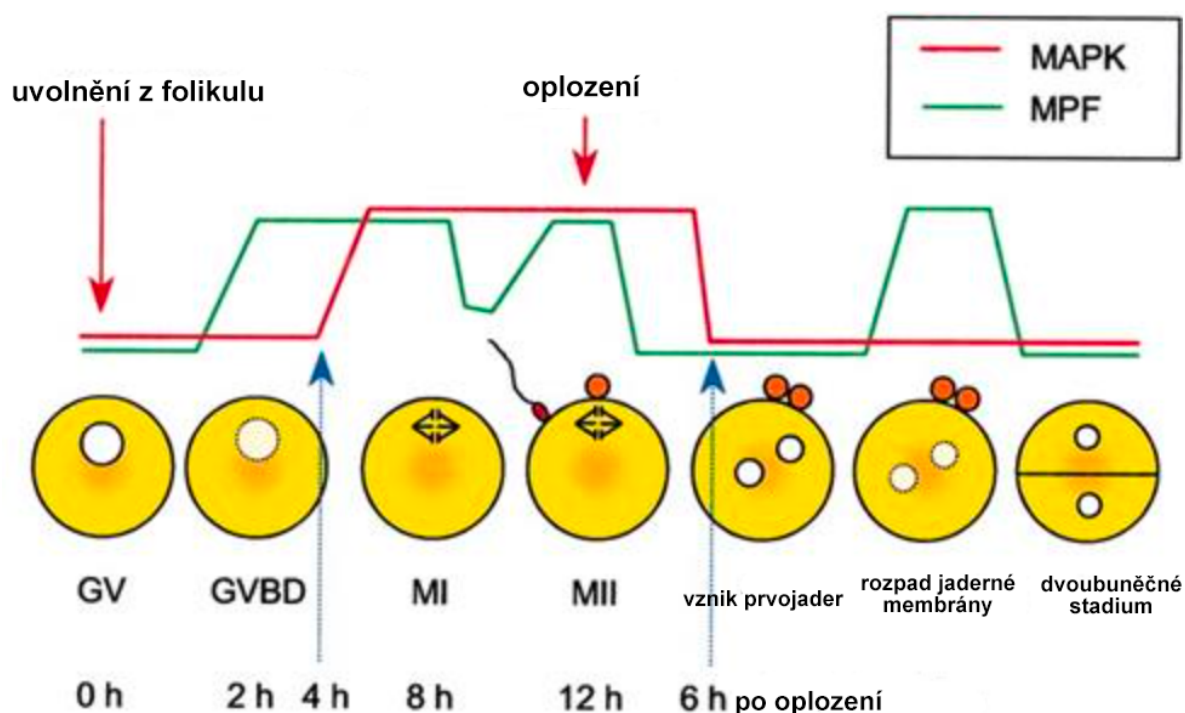
Rodina MAP kináz je dělena na tři podrodiny, a to na ERK, JNK a p38 MAP kinázy (Schaeffer & Weber 1999; Davis 2000).

MAP kinázy se podílejí na tvorbě a dynamice mikrotubulů (Stojkovic et al. 1999). Vysoká aktivita MAP kináz je zaznamenána v průběhu zrání oocytů savců (Cheng-Guang et al. 2007). U prasat jsou MAP kinázy významné během bloku meiózy II (Stojkovic et al. 1999). Lokalizace MAP kináz během růstu oocytů je výhradně v cytoplazmě. V počátcích fáze zrání se pak MAP kinázy přesouvají do zárodečného váčku (Meinecke & Krischek 2003). MAP kinázy tedy mají podíl na přenosu signálu z cytoplazmy do jádra, který indikuje začátek zrání (Inoue et al. 1998; Stojkovic et al. 1999).

V případě spontánního zrání oocytů myši dochází k aktivaci MAP kináz 2 hodiny po stadiu GVBD (Lu et al. 2001). Oproti tomu například u prasečích oocytů dochází k aktivaci MAP kináz ještě, než GVBD nastane. Je prokázáno, že zahájení meiózy u oocytů prasete není ovlivněno ani v případě, kdy je aktivita MAP kináz narušena (Josefsberg et al. 2003).

Výsledky pokusů dokazují, že i v případě, že je aktivita MAP kináz blokována vlivem inhibitoru MEK, dojde u prasečích oocytů k rozpadu zárodečného váčku (Tong et al. 2003).

K aktivaci MAP kináz dochází vlivem faktoru Mos, tedy aktivním katalytickým komponentem cytotatického faktoru CSF a Plk1 neboli polo-like kinázou 1. Oba tyto spouštěče meiotického zrání jsou v případě nezralého oocytu neaktivní (Sun & Nagai 2003). MAP kináza je aktivovaná během obnovy meiózy I (Chen et al. 2020). MAP kinázy se oproti MPF vyznačují vysokou aktivitou během celé fáze zrání (Zhang et al. 2012), jak znázorňuje Obrázek 3.2. K poklesu úrovně aktivity dojde až po oplození nebo po aktivaci partenogeneze (Tripathi et al. 2010).



Obrázek 3.2 Schéma aktivity regulačních faktorů MAPK a MPF v průběhu meiotického zrání oocytů savců (upraveno podle Fan & Sun 2004)

3.1.4.3 CSF (Cytostatic Factor; cytotatický faktor)

Během metafáze II jsou oocyty zastaveny v druhém meiotickém bloku skupinou molekul označovaných jako cytotatický faktor (CSF) (Stojkovic et al. 1999). Udržení druhého meiotického bloku je tedy hlavní funkcí CSF (Schmidt et al. 2006). Jakmile dojde k oplození, aktivita CSF se vytrácí (Clarke et al. 1988). To je umožněno inhibicí činnosti mikrotubulárních motorů prostřednictvím CSF, čímž zůstává neporušené dělicí vřetenko. Tímto zůstává oocyt zadržen v metafázi II (Shiina et al. 1992).

CSF se nachází v cytoplazmě ovulovaných oocytů, kde je jeho funkcí zabránit degradaci cyklinu B nutného k zachování aktivity MPF. Jedním z důležitých cytotatických faktorů je Mos protein. Je nezbytný ke stimulaci aktivity MAP kinázy (Dupré et al. 2011) a slouží k regulaci hladiny MPF (Tunquist & Maller 2003). Mos kináza je nepostradatelná pro aktivaci MPF během meiózy I i II a také pro zastavení oocytů v MII (Dupré et al. 2011).

Dohromady Mos protein a MAP kináza tvoří systém, který s největší pravděpodobností aktivuje a stabilizuje MPF (Tiwari et al. 2018). Mos protein fosforylací MEK1 kinázy způsobuje zvýšení aktivity MAPK (Dupré et al. 2011). Do skupiny molekul CSF se dále řadí například SAC (Spindle Assembly Checkpoint) proteiny. Tyto proteiny se uplatňují při přerušení buněčného cyklu v metafázi prostřednictvím inhibice anafázi podporujícího komplexu (APC) (Brunet & Maro 2005).

3.1.4.4 Cyklické nukleotidy cAMP a cGMP

Meiotické zrání oocytů je z velké části řízeno cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP) a guanosinmonofosfátem (cGMP), které jsou klíčové pro udržení meiotického bloku (Zhang et al. 2010). Tyto nukleotidy jsou u savců tvořeny buď z buněk obklopujících oocyt nebo samotným oocytem (Gilchrist et al. 2016; Tiwari & Chaube 2017a; Tiwari & Chaube 2017b; Pan & Li 2019). Syntéza cAMP a cGMP je řízena adenylát cyklázou (AC) a guanylát cyklázou (GC). K jejich degradaci pak dochází prostřednictvím fosfodiesteráz (PDE) (Gupta et al. 2017; Tiwari & Chaube 2017c; Pan & Li 2019). Změny v koncentracích cAMP i cGMP ovlivňují meiotické zrání, a to buď změnou aktivity MPF či regulací její stabilizace, respektive destabilizace (Chaube 2001; Bernal-Ulloa et al. 2016). Snížení hladiny cAMP, stejně jako cGMP, iniciuje fosforylací cyklin-dependentní kinázy 1 a syntézu, respektive degradaci cyklinu B. Tyto změny Cdk1 a cyklinu B mají za následek destabilizaci MPF v oocytech, která pak vede k znovu zahájení meiózy (Gupta et al. 2017; Tiwari & Chaube 2017a; Tiwari & Chaube 2017b; Tiwari & Chaube 2017c; Pan & Li 2019). Tím je potvrzeno, že vysoké hladiny cAMP a cGMP skutečně zachovávají stabilitu MPF, a tím i meiotický blok (Tiwari & Chaube 2017a; Tiwari & Chaube 2017c).

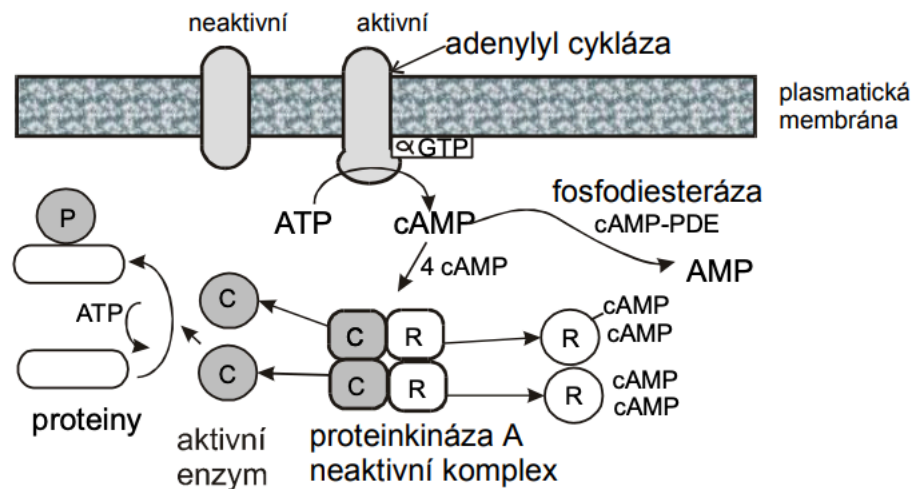
cAMP

Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) má zásadní význam pro udržení meiotického bloku v oocytech savců (Conti et al. 2012). Je tvořen adenylát cyklázou (AC), kterou řídí G-proteiny skrze receptory GPR3 a GPR12 (Mehlmann et al. 2004; Hinckley et al. 2005; Holt et al. 2013). AC je v oocytech savců odpovědná za přeměnu adenosintrifosfátu (ATP) na cAMP (Gilchrist et al. 2016; Pan & Li 2019). Kontinuálně je tvořen v granulózních buňkách obklopujících oocyt a do oocytu přechází skrze gap junctions za účelem udržení meiotického bloku (Chaube 2001; Coticchio et al. 2015; Gupta et al. 2017). Samotný oocyt také tvoří značné množství cAMP (Mehlmann et al. 2005; Gilchrist et al. 2016; Pan & Li 2019).

Trvale vysoká koncentrace cAMP udržuje meiotický blok, její snížení má za následek znovu zahájení meiózy (Azevedo et al. 2014; Petersen et al. 2015). Koncentrace cAMP v oocytech je regulována rovnováhou mezi enzymy adenylát cyklázou (AC) a fosfodiesterázou (PDE), které cAMP syntetizují, respektive degradují (Conti et al. 2002). V granulózních buňkách preovulačních folikulů dochází ke zvýšení koncentrace cAMP i vlivem gonadotropinu (Wang et al. 2015).

Pro udržení zvýšené hladiny cAMP je nezbytná inhibice aktivity PDE3A (Richard et al. 2001) a zabránění degradace cAMP inaktivací cAMP-fosfodiesterázy (cAMP-PDE) (Pan & Li 2019). Aktivitu PDE3A, tedy hydrolýzu cAMP, inhibuje cGMP, čímž je zachován meiotický

blok (Norris et al. 2009; Vaccari et al. 2009). Inhibice PDE3 zvyšuje koncentraci cAMP aktivujícího proteinkinázu A (PKA). PKA zase přímo reguluje aktivitu Cdc25 a Wee1B kinázy (Zhang et al. 2008; Pirino et al. 2009). Wee1B katalyzuje fosforylaci, která reguluje MPF (Lew & Kornbluth 1996; Bilodeau-Goeseels 2012), a naopak fosforylace Wee1B podporuje inhibici MPF (Ladim-Alvarenga & Maziero 2014). Prostřednictvím tohoto mechanismu závislého na PKA vysoká hladina cAMP v oocyty tedy potlačuje aktivitu MPF (Maller 1980; Bornslaeger et al. 1986). Naopak snížením cAMP dochází ke snížení aktivity PKA a Cdc25 fosfatáza je přemístěna do jádra (Oh et al. 2010). Akumulace Cdc25 v jádře mimo jiné podporuje aktivaci MPF. S obnovením meiózy je Cdc25 aktivována pomocí zvýšení aktivity CDK1 (Conti et al. 2012). Schématické zobrazení působení cAMP viz Obrázek 3.3.



Obrázek 3.3 Modelové zobrazení působení cAMP (převzato od Tichovská 2010)

cGMP

Další důležitou signální molekulou při meiotickém bloku je cGMP produkovaný receptorem pro natriuretické peptidy (NPR2) v buňkách granulózy folikulárních oocytů (Zhang et al. 2010; Egbert et al. 2016; Shuhaibar et al. 2016). Na rozdíl od cAMP se cGMP tvoří pouze v granulózních buňkách. Do oocyty přechází za účelem regulace meiózy pomocí gap junctions (Egbert et al. 2016).

cGMP v oocytech inhibuje aktivitu PDE3 (Zhang et al. 2010) a je hydrolyzován specifickými PDE (Wang et al. 2008; Egbert et al. 2016; Shuhaibar et al. 2016). Pokles cGMP v oocyty tedy zvyšuje aktivitu PDE3, která zase vede ke snížení hladiny cAMP (Gershon et al. 2019). V konečném důsledku vedou všechny tyto události k výstupu oocyty z meiotického bloku (Norris et al. 2009; Zhang et al. 2010; Holt et al. 2013).

3.1.4.5 Vápník/Vápníkové ionty (Ca^{2+})

Vápník (Ca^{2+}) je jednou z fyziologicky nejvýznamnějších signálních molekul v buňce. Vysoká koncentrace vápníku se nachází v lumen endoplazmatického retikula (ER) (Corbett & Michalak 2000). V oocyty je hlavní úložiště intracelulárního Ca^{2+} endoplazmatické retikulum (Wakai & Fissore 2013). V oocytech prasete je dle Rozinka et al. (2006) vápník uložen

ve velkém množství v jádře, cytoplazmě a mitochondriích. Mnoho studií potvrzuje, že koncentrace intracelulárního Ca^{2+} je významná pro regulaci meiotického zrání oocytů a raného embryonálního vývoje (Sousa et al. 1997; Berridge et al. 2000; Webb & Miller 2003; Whitaker 2006). Dle Stricker (1999) jsou ionty vápníků zcela nezbytné pro aktivaci oocytu, tedy zahájení embryonálního vývoje. Vápník má význam i pro další procesy a morfologické změny během oplození (Kaneuchi et al. 2015).

V důsledku oscilace vápníku v ooplazmě vyvolané fúzí spermie s oocylem nastává uvolnění z 2. meiotického bloku a iniciace embryonálního vývoje (Swann et al. 2004; Hachem et al. 2017; Parrington et al. 2018), přičemž ionty vápníku jsou uvolňovány ze zásob v endoplazmatickém retikulu (Hojnik & Kovačič 2019). Oscilace je vyvolaná pravděpodobně fosfolipázou C, což je protein přenášený spermií (Swann et al. 2004).

Vápník dále reguluje například výstup z metafáze II, vydělení druhého pólového tělíska, dokončení druhého meiotického zrání a exocytózu kortikálních granul (Jones 2005). Exocytózu kortikálních granul vápník ovlivňuje pomocí stimulace kalcmodulin dependentní proteinkinázy II (CaMKII) a kinázy lehkých řetězců myosinu (MLCK; Myosin Light Chain Kinase). Předpokládá se, že oscilací vápníku jsou kortikální granule posouvány blíže k membráně oocytu za účelem exocytózy (Ducivella et al. 2006).

Oscilací vápníku dochází k aktivaci CaMKII a anafázi podporujícího komplexu (APC) vedoucí k degradaci cyklinu B nutného pro progresi meiotického zrání (Ducivella et al. 2006). Souvislost má Ca^{2+} také s expanzí kumulu (Zhang et al. 2010).

Vápník má mimo jiné význam i v průběhu celé spermatogeneze, kdy má významnou funkci například membránový protein Ca^{2+} ATPáza 4 (PMCA4), který má u samců vliv na plodnost (Okunade et al. 2004; Schuh et al. 2004).

3.1.4.6 Gasotransmitery

Gasotransmitery jsou považovány za pro buňku významné signální molekuly. K syntéze těchto nevelkých plynných molekul dochází v buňkách prostřednictvím enzymů, přičemž jejich syntéza je striktně regulována. Mohou snadno přestupovat skrze plazmatickou membránu a zároveň mohou disponovat mnohými autokrinními, endokrinními i parakrinními efekty (Wang 2004). Jsou charakteristické rychlou degradací a velkou specifitou cílových molekul. Jejich produkce je endogenní a vzájemně mezi sebou významně spolupracují (Pae et al. 2009). Do skupiny gasotransmiterů se řadí vedle oxidu dusnatého také sirovodík a oxid uhelnatý (Wang 2002).

3.1.4.6.1 Oxid dusnatý

Dle řady autorů má oxid dusnatý významnou funkci v reprodukci samic (Jablonka-Shariff & Olson 1997; Sengoku et al. 2001; Bu et al. 2003). Oxid dusnatý vzniká v buňkách savců účinkem enzymu NO-syntázy (NOS) (Nathan & Xie 1994). Vlivem NOS dochází ke katalýze přeměny L-argininu na L-citrulin, kdy se zároveň tvoří i molekula oxidu dusnatého a spotřebovává se kyslík (Stuehr et al. 1999). Pro NO je charakteristický velmi krátký poločas rozpadu. Je pro něj typická difúze skrze buněčné membrány a regulace buněčných funkcí při fyziologických a patologických procesech (Dixit & Parvizi 2001; Bu et al. 2003). NOS

je v buňkách přítomna ve třech základních izoformách: nervová NOS, indukovatelná NOS a endoteliální NOS (Lamas et al. 1992; Lowenstein et al. 1992).

Nervová NO-syntáza (nNOS; typ I; NOS-I; NOS1) je lokalizována zejména v nervové tkáni (Bredt et al. 1990). Místem jejího výskytu je ale také kosterní svalovina, beta buňky Langerhansových ostrůvků ve slinivce břišní, hypofýza, dřev nadledvin a ledvinové nefrony, samčí pohlavní orgány a další tkáně (Dixit & Parvizi 2001). K její aktivaci dochází následkem zvýšení hladiny intracelulárního vápníku (Janssens et al. 1992). Výskyt nNOS byl u prasete prokázán v oocytech obklopených jednou vrstvou kumulárních buněk (Kim et al. 2005). Chmelíková et al. (2010) potvrdili přítomnost nNOS v oocytech prasete a okolních kumulárních buňkách v průběhu meiotického zrání *in vitro*.

Indukovatelná NO-syntáza (iNOS; typ II; NOS-II; NOS2) je exprimována velkým množstvím buněk, například hepatocyty a buňkami hladké svaloviny (Nathan & Xie 1994). Funkcí iNOS je zajištění dlouhodobé stálé produkce oxidu dusnatého. Je přítomna také ve vaječnicích savců, konkrétně pak v jejich folikulech (Jablonka-Shariff & Olson 1997). Přítomnost izoformy iNOS byla v případě prasete prokázána také v buňkách granulózy (Grasselli et al. 2001). Nejvíce koncentrovaná eNOS byla evidována v oocytech prasete na začátku meiotického zrání, ve stadiu zárodečného vajíčku (Chmelíková et al. 2010).

Oproti nNOS a eNOS zpravidla obsahuje kalmomodulin, který je pevně navázán. Aktivita iNOS je proto známá jako Ca^{2+} independentní (Rosselli et al. 1998; Alderton 2001).

Endoteliální NO-syntáza (eNOS; typ III; NOS-III; NOS3) byla poprvé evidována v rámci endotelových buněk cév (Bredt et al. 1990; Alderton 2001). Kromě dalších tkání, kde je možné eNOS detekovat, se vyskytuje podobně jako iNOS také ve folikulech oocytů savců (Jablonka-Shariff & Olson 1997). U samců savců lze její výskyt evidovat ve spermatidách a Leydigových, Sertoliho a endoteliálních buňkách (Ambrosino et al. 2003). V případě prasečích oocytů byla kromě samotných oocytů eNOS detekována také v endoteliálních, thékálních a kumulárních buňkách (Tao et al. 2004). Její výskyt je u prasete evidován také při folikulárním vývoji v granulózních buňkách a oocytech (Kim et al. 2005). Nejvyšší hladiny u prasete dosahuje eNOS v oocytech nacházejících se ve stadiu zárodečného vajíčku. Její koncentrace pak klesá během meiotického zrání (Chmelíková et al. 2010).

Stejně jako v případě nNOS, i eNOS je Ca^{2+} dependentní. eNOS se vyznačuje krátkodobou syntézou jen malého množství oxidu dusnatého (Janssens et al. 1992).

Funkce NO při řízení regulace reprodukce samic je nenahraditelná. Prostřednictvím NO je v hypothalamu regulováno uvolňování gonadotropin releasing hormonu (GnRH), čímž GnRH zahajuje uvolnění gonadotropinů přes aktivaci nNOS v hypofýze (Rosselli et al. 1994). Ve vaječniku se účastní navození ovulace, relaxace myometria (Mc Cann et al. 2003), indukce luteolýzy (Yang et al. 2003) a vyskytuje se také při apoptóze (Stefanelli et al. 1999). V oocytu dochází ke tvorbě NO po celou dobu procesu oogeneze, počínaje folikulogenezí až po raný embryonální vývoj (Jablonka-Shariff & Olson 1997). Má rovněž velký vliv při regulaci meiózy (Van Voorhis et al. 1995; Jablonka-Shariff & Olson 1997; Yamauchi et al. 1997; Olson et al. 2000) a účastní se procesu aktivace oocytů (Berridge et al. 2000; Petr et al. 2005b).

3.1.4.6.2 Sirovodík

Sirovodík neboli sulfan (H_2S) je bezbarvý plyn, jehož molekula je tvořena jedním atomem síry a dvěma atomy vodíku. Jeho původ je endogenní (Kamoun 2004). H_2S se jako signální molekula vyskytuje v mnoha tkáních včetně reprodukčního traktu (Nevoral et al. 2014) a je uvolňován z L-cysteinu pomocí enzymů cystathionin β -syntázy (CBS), cystathionin γ -lyázy (CSE) a 3-merkaptopyruvát sulfotransferázy (3-MPST) (Zhao et al. 2013). Tyto enzymy jsou mimo jiné exprimovány i v reprodukčním systému (Srilatha et al. 2009). Nevoral et al. (2015) zjistili u prasat přítomnost všech těchto enzymů v oocytech a kumulárních buňkách obklopujících oocyt. Domnívají se, že se tyto enzymy mohou vzájemně nahrazovat a pouze absence všech by vedla k významnému ovlivnění oocytu. 3-MPST je dle studie Nevorala et al. (2015) potřebný pro meiotickou kompetenci oocytu, CBS má zase význam během růstové fáze u oocytů zrajících *in vitro*.

Předpokládá se, že oocyty ve stadiu zárodečného vajíčku obsahují dostatečné množství H_2S , a proto není nutná jeho enzymatická produkce. Naopak zralé oocyty jsou plně závislé na činnosti enzymů uvolňujících H_2S (Nevoral et al. 2015).

H_2S je dle Nevorala et al. (2015) zapojen do regulace zrání oocytu a expanze kumulu. H_2S může ovlivňovat aktivitu faktorů regulujících meiotické zrání včetně kináz (Mustafa et al. 2009), čímž může nepřímo regulovat procesy meiotického zrání oocytu (Nevoral et al. 2014). Je také prokázáno, že H_2S urychluje meiotické zrání oocytu (Nevoral et al. 2014; Nevoral et al. 2015).

3.1.4.6.3 Oxid uhelnatý

Oxid uhelnatý (CO) je signální molekula produkovaná hem oxygenázou (HO), která katalyzuje degradaci hemu za současného vzniku plynné molekuly oxidu uhelnatého. Tato funkce HO je důležitá pro ochranu buňky, protože nadbytek molekuly hemu v buňce má za následek oxidativní stres (Chiabrando et al. 2014). U oocytu oxidativní stres negativně ovlivňuje jeho meiotické zrání (Combelles et al. 2009; Prasad et al. 2016). HO se vyskytuje ve dvou izoformách – HO-1 a HO-2, které se liší expresí (Maines 1997; Wu & Wang 2005; Ryter & Choi 2016). Exprese HO-1 je ovlivněna stresory (Wu & Wang 2005).

CO má význam při ochraně buňky, buněčném cyklu, metabolismu a buněčné homeostáze (Ryter et al. 2006; Kolluru et al. 2017). Je prokázáno, že CO je zapojen také do řízení reprodukce (Zenclussen et al. 2012; Němeček et al. 2017).

Němeček et al. (2021) se domnívají, že CO v oocytech reguluje oxidativní stav a podílí se na ochraně oocytu před oxidativním stresem během meiotického zrání. Zároveň tvrdí, že CO pravděpodobně ovlivňuje granulózní buňky a oocyty a jejich vzájemnou komunikaci během meiotického zrání a signální dráhy, které meiotické zrání oocytů regulují. Ve vysokých koncentracích CO naopak může způsobit zastavení meiotického zrání oocytu (Němeček et al. 2021). CO může ovlivňovat meiotické zrání také interakcemi s jinými gasotransmitery, například s NO či H_2S (Bu et al. 2003; Nevoral et al. 2014). CO může v oocytech ovlivňovat i aktivitu MPF, která je pro meiotické zrání klíčová (Němeček et al. 2021).

Ve své studii Němeček et al. (2021) uvádí, že HO-1 může souviset s iniciací meiotického zrání a kvalitou oocytu a embrya (Rizzo et al. 2010; Yu et al. 2019).

3.1.4.7 Protein fosfatázy

Jako protein fosfatázy se označují enzymy se schopností defosforylace rozsáhlého spektra substrátů. K tomu dochází hydrolýzou monoesteru kyseliny fosforečné za vzniku fosfátových iontů a molekul obsahující volnou hydroxylovou skupinu. Protein fosfatázy mají významnou funkci během regulace mitózy a meiózy (Wang et al. 2004; Mochida et al. 2010; Domingo-Sananes et al. 2011; Mochida & Hunt 2012). Za správným průběhem meiotického zrání oocytů stojí synchronizace spolupráce řady protein fosfatáz a proteinkináz (Smith et al. 1998; Swain et al. 2003; Wang et al. 2004; Adhikari et al. 2012).

Nejvýznamnější fosfatázy účastníci se meiotického zrání jsou protein fosfatáza 1 (PP1) a protein fosfatáza 2A (PP2A). Aktivita PP2A je inhibována pomocí proteinu Greatwall kinázou. Dle současných studií má Greatwall kináza nepostradatelnou funkci při meiotickém zrání a její pomocí lze udržet druhý meiotický blok v prasečích oocytech (Li et al. 2013).

Do skupiny významných regulátorů meiotického zrání oocytů savců a raného vývoje embrya se dále řadí již zmiňované cdc25 fosfatázy. Vyznačují se aktivací cyklin dependentních kináz. Znamé jsou tři izoformy cdc25: cdc25A, cdc25B a cdc25C. První z nich, cdc25A, participuje při přestupu z G1 do S fáze. Cdc25C částečně reguluje přechod z G2 fáze do M fáze a zároveň progresi S fáze. Přechod mezi G2 a M fází je podporován také cdc25C (Oh et al. 2010). Cdc25 je u oocytů prasat lokalizována zejména v oblasti jádra a významně ovlivňuje přechod pozdní diakinezi (Dai et al. 2000).

Fosfatázou regulující oogenezi je také fosfatáza 2B neboli kalcineurin. Označuje se také protein fosfatázou 3 (PP3) a je součástí serin/threonin protein fosfatáz 2. typu (Cohen 1989). Je jedinou identifikovanou fosfatázou, u níž je k aktivaci nutná přítomnost jak Ca^{2+} , tak kalmodulinu (Kingsbury & Cunningham 2000). Mnoho studií potvrdilo významnou roli kalcineurinu během řady fyziologických procesů. Má například podstatný vliv při procesech ovlivňujících odpověď buňky, a to Ca^{2+} dependentní signalizací, regulací iontových kanálů a změnami v transkripci genů (Rusnak & Mertz 2000).

Místem největší koncentrace kalcineurinu je mozek. Dále je detekován například v tukové tkáni, v srdci, v ledvinách, v sítnici, ve varlatech a spermích savců atd. (Li et al. 2011). Tůmová et al. (2016) lokalizovali kalcineurin u oocytů prasat v metafázi II, přičemž se nacházel zejména na jejich povrchu. Po *in vitro* fertilizaci bylo možné kalcineurin detekovat i v okolí prvojádra. Dle jejich výsledků kalcineurin u savců participuje při regulaci aktivace oocytu. Kromě toho se domnívají, že se účastní exocytózy kortikálních granul.

3.2 Fúze plazmatických membrán

Fúze membrán se řadí mezi jeden z nejzákladnějších procesů vyskytujících se u mnohobuněčných organismů, které umožňují celou řadu biologických událostí. Příkladem je pohlavní rozmnožování, imunitní reakce a neurotransmise. Obecně lze říct, že principem fúze buněk je získání kompetence k fúzi, rozpoznání a vazba membrán, aktivace fúzních mechanismů, apozice membrány a v závěru samotné splynutí lipidových dvojvrstev (Stein et al. 2004; Aguilar et al. 2013).

Fúze gamet, přesněji molekuly účastníci se fúze gamet, jsou předmětem této práce. Proběhlo a stále probíhá mnoho rozsáhlých studií zaměřených na tento významný biologický proces, přesto princip celého mechanismu stále není kompletně objasněn.

Fúze spermie a plazmatické membrány oocyty následující po jejich úspěšném navázání je principem oplození savců (Wassarman et al. 2001; Primakoff & Myles 2002). Fúze gamet se řadí mezi složité procesy, kdy vzájemně interagují multiproteinové komplexy nacházející se na spermiích a oocytech. Aby došlo k úspěšné fúzi spermie a oocyty, musí obě buňky obsahovat proteiny schopné vzájemné interakce. Tyto interakce ve výsledku umožní splynout membránám obou těchto gamet (Miyado 2000). Za místo iniciace fúze gamet je u spermií savců považován ekvatoriální segment (Nakanishi et al. 1999).

Pro úspěšnou fúzi gamet je mimo jiné také nezbytné, aby obě gamety, zejména spermie, prošly sérií událostí, během kterých dochází ke změně jejich morfologie, struktury a funkčnosti, a to za účelem vzájemného rozpoznání následované fúzí. Oocyty získávají schopnost fúze se spermií během oogeneze, po dosažení velikosti alespoň 20 μm v průměru (Zuccoti et al. 1994). Co se týče spermií, ty prochází rozsáhlou transformací, aby se staly oplození schopnými. Děje se tomu tak při jejich průchodu samičím reprodukčním traktem. Dochází ke kapacitaci a akrozomální reakci, které mění jejich motilitu, fyziologii a molekulární strukturu membrány. Bez těchto změn spermie není schopná předat svou genetickou informaci (Tash & Means 1983). Dlouho se věřilo, že první vzájemné rozpoznání a primární navázání spermie na *zona pellucida* oocyty indikuje akrozomální reakci spermie, která umožňuje následně interagovat mezi sebou (Yanagimachi 1994). Dle Jin et al. (2011) ale dochází u většiny spermií myši k zahájení akrozomální reakce ještě před kontaktem membrány spermie se *zona pellucida*. Spermie prochází akrozomální reakcí na konci procesu dozrávání – kapacitace, ke které dochází v samičím reprodukčním traktu (Austin 1951; Chang 1951; Chang & Suarez 2011) a představuje sled mnoha biochemických a biofyzikálních změn (Florman & Fissore 2015). Během akrozomální reakce dochází k fúzi plazmatické membrány spermie s vnější akrozomální membránou (OAM; outer acrosomal membrane). To vede k uvolnění obsahu akrozomu, kterým jsou hydrolytické enzymy a obnažení proteinů vnější akrozomální membrány (IAM; inner acrosomal membrane) na povrchu hlavičky spermie. Pouze spermie, které kompletně prošly akrozomální reakcí, jsou schopné penetrace *zona pellucida* a perivitelinního prostoru a následně fúze s plazmatickou membránou oocyty, oolemou (Yanagimachi 1994).

Během procesu fúze gamet mají významnou roli fertilin, integriny v plazmatické membráně oocyty a proteiny z rodiny tetraspaninů (Primakoff & Myles 2002; Wassarman et al. 2001). Fúze gamet byla podrobně studována u myši, naopak u lidí zatím není nijak blíže specifikována (Ziyyat et al. 2006). Klíčovými faktory v tomto procesu jsou tetraspaniny CD9 na oocyty a IZUMO1 na spermii (Inoue et al. 2011). V souvislosti s interakcemi gamet i další studie potvrdily zásadní význam IZUMO proteinu nacházejícího se na spermiích a dále jeho receptoru JUNO, který se naopak nachází na oocyty. Organizuje ho protein CD9 včetně jeho tetraspaninové sítě vytvořené na membráně oocyty (Miyado et al. 2000) a spermie (Ito et al. 2010).

3.2.1 Molekuly v procesu fúze gamet

3.2.1.1 Molekuly ve spermii

ADAM

Proteiny z rodiny ADAM mají význam při buněčné adhezi, migraci, proteolýze a v signalizačních drahách (Reiss & Saftig 2009). Je jim věnována velká pozornost také v rámci studia významných proteinů na povrchu spermie, které se účastní vazby a fúze spermie a vajíčka. Význam ADAM proteinů při obou těchto procesech je potvrzen mnoha autory (Inoue et al. 2005).

Fertilin ADAM1B a ADAM2 se u spermií odebraných z myších varlat nachází v plazmatické membráně okolo celé hlavičky spermie. Po průchodu nadvarlaty se ovšem přesouvají do zadní části hlavičky (Hunnicut et al. 1997).

Inoue et al. (2011) prokázali, že narušení genů pro ADAM1A, ADAM2 a ADAM3 způsobuje u samců neplodnost. Uvádí se, že narušení výše uvedených proteinů na spermii způsobuje problémy při vazbě na *zona pellucida* a při migraci vejcovody (Nishimura et al. 2004; Ueda et al. 2007). V různých studiích žádná z myší s narušenými proteiny ADAM1A, ADAM2 neboli fertilin β a ADAM3 sice nevykazovala problém při fúzi s oocytem (Cho et al. 1998; Nishimura et al. 2001; Nishimura et al. 2004), nicméně došlo ke zhoršení schopnosti vazby spermie na *zona pellucida*, stejně jako ve výše uvedených studiích. Podobně tomu je i v případě dalšího proteinu významného pro fúzi a vazbu gamet, CD46, kdy jeho narušení nemá za následek zhoršenou fúzní schopnost spermie (Inoue et al. 2003).

Předpokládá se, že fertilin ADAM1B se váže na integriny, v případě myší na integrin $\alpha 6\beta 1$, čímž napomáhá spermii udržet se na povrchu oocyta a umožňuje tím fúzi membrán (Almeida et al. 1995). Na integriny se váže i ADAM2 protein (Chen et Sampson 1998).

CD46

Dalším kandidátním proteinem v procesu fúze oocyta a spermie je CD46. Anderson et al. (1993) prokázali jeho význam při zahájení interakce mezi gametami vedoucí až k jejich fúzi.

U myší je CD46 exprimován pouze ve varlatech, samotný protein pak na vnitřní akrozomální membráně spermie (Inoue et al. 2003). Nicméně Inoue et al. (2003) prokázali, že i přes knock-out CD46 jsou myši oplození schopné, a to jak samci, tak samice.

CRISP

CRISP1 a CRISP4 se ve velkém množství nachází ve spermiích v nadvarlatech, CRISP2 je výhradně ve vyvíjejících se spermatidách ve varlatech a CRISP3 je exprimován více typy tkání než ostatní CRISP proteiny (Roberts et al. 2008; Cohen et al. 2008). Nicméně je prokázáno, že CRISP1 je pro fertilizaci postradatelný (Da Ros et al. 2008).

3.2.1.2 Molekuly ve spermii nezbytné pro fúzi

IZUMO1

IZUMO proteiny patří do superrodiny imunoglobulinů (IgSF) s extracelulární Ig doménou (Inoue et al. 2005). Superrodina je složená ze čtyř proteinů označenými čísly

(IZUMO1 – IZUMO4). Typy 2 a 3 jsou transmembránové proteiny exprimované pouze ve varlatech, zatímco typ 4 je exprimován ve varlatech i dalších tkáních (Ellerman et al. 2009).

IZUMO je prvním membránovým proteinem spermie, který se ukázal být nezbytný pro fúzi gamet (Inoue et al. 2005). Je možné ho detekovat na povrchu spermií myší i lidí až po akrozomální reakci. Pravděpodobně tomu je tak, protože protein IZUMO je nejdříve skrytý pod plazmatickou membránou a přístupným se stává právě až po akrozomální reakci, podobně jako CD46 (Inoue et al. 2003).

IZUMO1 se během akrozomální reakce přemisťuje z přední části hlavičky spermie do míst, kde dochází k fúzi, přičemž se předpokládá, že fúze s oocytem začíná od ekvatoriálního segmentu (Inoue et al. 2011).

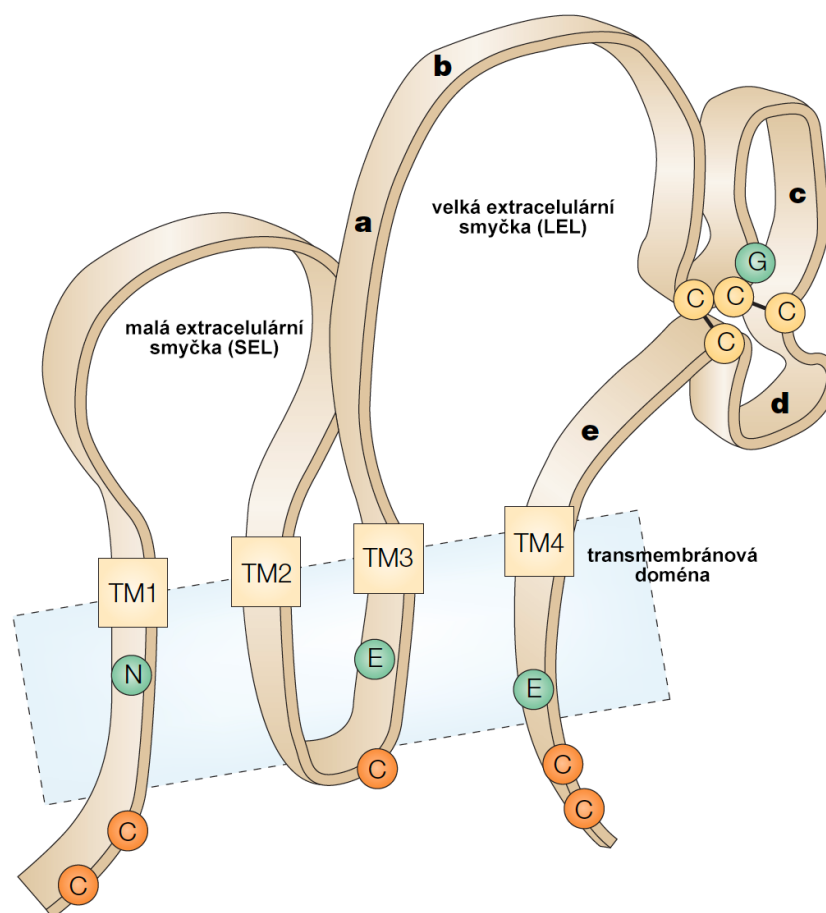
Zda IZUMO1 opravdu působí jako nezbytný faktor pro úspěšné oplození bylo zjištěno pomocí myší s nedostatkem IZUMO1 proteinu. Ve své studii Inoue et al. (2005) popisují, že tyto myši byly zdravé, bez jakýchkoliv vývojových abnormalit, ale podle očekávání byli samci i přes běžné reprodukční chování sterilní. Spermie bez problémů pronikla *zona pellucida*, ale nebyla schopná fúze s oocytem, čímž docházelo k akumulaci spermií v perivitelinním prostoru.

Jedinou funkční jednotkou IZUMO1 je jeho Ig doména. Zdá se, že IZUMO1 interaguje s přidruženými proteiny, které usnadňují proces fúze v rámci multiproteinového komplexu na membráně spermie. Zároveň vědci předpokládají, že IZUMO1 přímo interaguje také s nějakou z molekul na oolemě, nicméně tato molekula zatím nebyla identifikována (Inoue et al. 2011).

3.2.1.3 Molekuly v oocytu nezbytné pro fúzi

Tetraspaniny

Rodina tetraspaninů je početná skupina malých proteinů vyskytujících se na povrchu buňky i v intracelulárních membránách. Lze je detekovat i v endoplazmatickém retikulu, protože jím během své existence procházejí (Berditchevski & Odintsova 2007). Mají velikost 20 – 50 kDa a obsahují 4 hydrofobní transmembránové domény označované TM1 až TM4 se dvěma extracelulárními smyčkami – malou EC1 (SEL; Small Extracellular Loop) a velkou EC2 (LEL; Large Extracellular Loop) (Berditchevski 2004; Hemler 2005; Charrin et al. 2014; Hochheimer et al. 2019) viz Obrázek 3.4. Hydrofobní charakter je podstatou ukotvení tetraspaninů v membráně (Seigneuret et al. 2001). Tetraspaniny se běžně skládají z 204 – 393 aminokyselinových zbytků (Hemler 2005; Charrin et al. 2014; Hochheimer et al. 2019).



Obrázek 3.4 Schéma struktury tetraspaninu (upraveno podle Levy & Shoham 2005)

V membránách tetraspaniny vytvářejí struktury zvané tetraspaninové mikrodomény (TEMs) (Claas et al. 2001). V těchto doménách tvoří vazby, kterými je posléze ovlivněna adheze buněk, jejich migrace a vnitrobuněčná signalizace (Maecker et al. 1997). Tetraspaniny v TEMs interagují s velkým počtem transmembránových i vnitrobuněčných partnerů, mj. s jinými tetraspaniny, integriny, proteázami, imunoglobuliny či intracelulárními signálními proteiny, a to přímo či nepřímo prostřednictvím velké extracelulární smyčky (Berditchevski 2004; Rubinstein et al. 2013). Tetraspaniny komunikují s cytoskeletárními a signálními molekulami také prostřednictvím intracelulárních částí transmembránových domén (Zoller 2009).

Tetraspaniny jsou součástí velkého množství buněčných procesů, jako je adheze, buněčná migrace a intracelulární signalizace. Mají neopomenutelnou funkci také v řadě imunologických procesů a v procesu oplození savců, konkrétně při fúzi gamet (Uhlen et al. 2015).

Tetraspaniny jsou přítomny u skotu, prasat, myší, lidí a dalších druhů savců. Podle dosavadních studií se ale v rámci druhů může lišit jejich exprese (Jankovičová et al. 2020b).

Výskyt tetraspaninů ve tkáních je velmi rozmanitý. Část je exprimována téměř ve všech tkáních, naopak exprese jiných tetraspaninů je vysoce specifickou pro konkrétní typy buněk. Například CD9, CD81 a CD151 se vyskytují v celé řadě tkání, oproti jiným, jejichž exprese je omezena pouze na určitý typ tkání a buněk, jak znázorňuje Tabulka 3.1 (Uhlen et al. 2015;

Boucheix et Rubinstein 2001). Exprese určitých tetraspaninů je zřejmá i v průběhu embryonálního vývoje. U embryí myši v 2. týdnu vývoje byl prokázán výskyt tetraspaninů CD9 a CD151, a to ve všech částech embryí (Richardson et al. 2014).

PŘEHLED VÝZNAMNÝCH TETRASPANINŮ U SAVCŮ		
Tetraspanin	Výskyt	Hlavní funkce
CD9	Široké tkáňové zastoupení	Organizace tetraspaninových sítí na vajíčku důležitých pro fúzi se spermií (Glazar et Evans 2009), častá vazba s CD81 – fúze gamet, makrofágů, buněk hladké svaloviny, supresor metastáz (Nakazawa et al. 2016)
CD37	Buňky imunitního systému (lymfoidní T a B buňky)	Spolu s CD81 a CD151 regulují adhezi integrinu k B buňkám (Escola et al. 1998)
CD53, 63	Leukocyty, lymfoidní buňky	CD63 má roli v intracelulárním proteinovém transportu (Pols et Klumperman 2008), CD53 reguluje apoptózu (Yunta et Lazo 2003)
CD81	Široké tkáňové zastoupení	Spoluúčast na procesu oplození, přítomen na vajíčku, kde se páruje s CD9 i na spermii, kde interaguje s CD151 a CD46, jež asociuje s aktinem (Frolíková 2012), důležité interakce v imunitním systému (Secrist et al. 1996)
CD151	Široké tkáňové zastoupení	Součást tetraspaninové sítě na vajíčku (Ziyyat et al. 2006), podpora tumorové angiogeneze spolu s Tspan8 (Zöller et al. 2009), asociace s integrinem, podobně jako CD81 souvisí s vlivem na buněčnou adhezi a signalizaci (Serru et al. 1999)

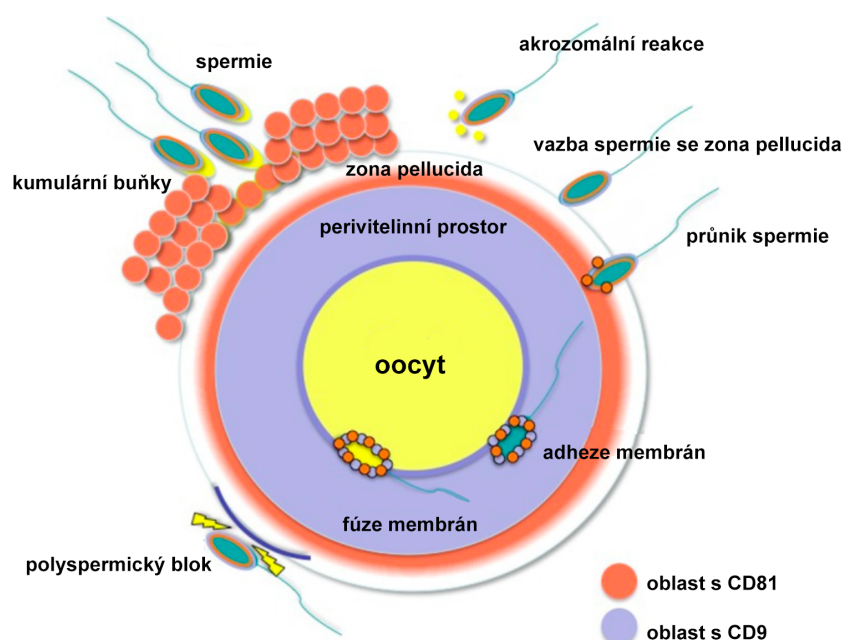
Tabulka 3.1 Přehled významných tetraspaninů u savců

V lidském organismu bylo do současnosti detekováno a blíže popsáno 33 tetraspaninů (Romanska & Berditchevsi 2011). Je pravděpodobné, že s výjimkou erytrocytů v organismu člověka neexistuje žádná jiná buňka, která by ve své povrchové vrstvě neobsahovala nějaký z tetraspaninů (Boucheix & Rubinstein 2001).

Nejen mezi sebou, ale i s dalšími membránovými proteiny důležitými pro buněčnou adhezi aj. vytváří komplexy uvnitř rozsáhlého systému, ve kterém se odehrávají nejrůznější molekulární interakce. Tento systém se nazývá tetraspaninová síť (Boucheix & Rubinstein 2001; Berditchevski 2001; Hemler 2003). Zjednodušeně se jedná o funkční oblasti v membráně složené z proteinů. Tato síť byla popsána jak u oocytů, tak nedávno i u spermií. Nedílnou součástí tetraspaninové sítě jsou i integriny (Jankovičová et al. 2020a). Tetraspaniny jsou součástí uspořádávání multimolekulárních komplexů nacházejících se na buněčném povrchu, proto je možné, že regulují funkce molekul, se kterými asociují. Tím se pravděpodobně částečně vysvětluje, jak tetraspaniny souvisí s buněčnou adhezí a migrací – skrze asociace s jinými molekulami v tetraspaninové síti. V tomto případě s $\beta 1$ integriny (Ziyyat et al. 2006).

Superrodina tetraspaninů je evolučně rozdělena na několik menších rodin – CD, CD63, uroplakinová a RDS. Nejpočetnější je rodina CD, která je složená z tetraspaninů kódovaných geny s CD nomenklaturou molekul (Garcia-España et al. 2008).

Co se týče reprodukce, tetraspaniny působí v reprodukčním traktu primárně za účelem organizace membránových komplexů, ve kterých se nachází proteiny významné pro interakce membrán spermie a oocyty. Při oplození savců mají významnou funkci CD molekuly patřící do superrodiny tetraspaninů, zejména pak CD9, CD81, CD151 a také CD63, který je většinou součástí extracelulárních váčků, ale jeho význam a potenciál při reprodukci ještě není plně prozkoumán (Jankovičová et al. 2020b). Lokalizaci CD9 a CD81 během oplození zobrazuje Obrázek 3.5.



Obrázek 3.5 Schéma lokalizace CD9 a CD81 v oocyty během oplození (upraveno podle Ohnami et al. 2012)

Tetraspaniny CD9, CD81 a CD151 mají nepostradatelnou funkci pro kvalitu gamet, při jejich interakci a fúzi během oplození a při časně embryogenezi. Uvádí se, že tetraspaniny také souvisí se závažnými chorobami reprodukčního traktu samců i samic (Jankovičová et al. 2020b).

Jankovičová et al. (2019) tvrdí, že CD9 a CD81 lokalizované v oocytech skotu a prasete nejspíš nejsou esenciální fúzní proteiny. Pravděpodobněji se účastní reorganizace membrány, čímž usnadňují vzájemnou komunikaci proteinů a jejich interakce, a to vede k úspěšné fertilizaci.

Dále se mezi významné členy procesu oplození řadí proteiny vázané GPI lipidickou kotvou vyskytující se na membráně oocyty (Alfieri et al. 2003). Do této skupiny proteinů patří CD55 a CD59, které byly identifikovány jak u oocyty (Taylor et al. 1994), tak u spermie (Clift et al. 2009). Je zde předpoklad, že tetraspaniny, které vytváří tetraspaninové sítě, zejména CD9, by mohly být schopné asociace s proteiny vázanými GPI a spolu se pak účastnit signálu indukujícího proces adheze a organizace membrány (Lefèvre et al. 2010).

Integriny

Integriny jsou transmembránové heterodimery složené z alfa a beta podjednotky zprostředkávající buněčnou adhezi. Podjednotka $\beta 1$ může asociovat s 12 různými α podjednotkami za vzniku největší subrodiny integrinů. Integriny jsou považovány za signální molekuly s obousměrným působením (Liddington & Ginsberg 2002). Tyto proteiny mohou skrze buněčnou adhezi ovlivňovat růst buňky, buněčnou smrt, migraci a diferenciaci.

Účinnost integrinů při procesu adheze nebo vazby ligandů je ovlivňována různými stimuly. Příkladem je zvýšení afinity integrinu a ligandu (Schwartz 1992; Sanchez-Mateos et al. 1996; Bazzoni & Hemler 1998).

Na oocyty jsou přítomny dva integriny – $\alpha 6\beta 1$ a $\alpha 3\beta 1$. V případě somatických buněk tyto dva integriny vytváří stabilní komplexy s tetraspaninem CD151 (Yauch et al. 1998; Fitter et al. 1999; Serru et al. 1999), proto se vědci domnívají, že tomu bude stejně i v případě oocyty.

U spermie byla prokázána přítomnost integrinů $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ a $\alpha 6\beta 4$ (Glander & Schaller 1993; Reddy et al. 2003; Barraud-Lange et al. 2007; Frolíková et al. 2019). Zdá se, že podjednotka $\alpha 6$ preferuje tvorbu heterodimeru $\alpha 6\beta 4$, pokud jsou přítomny všechny výše zmíněné beta podjednotky (Kajiji et al. 1989; Hemler et al. 1989; Simon-Assmann et al. 1994).

Na základě studií prováděných u myši se vědci domnívají, že integrin $\alpha 6\beta 1$ by mohl být receptorem pro vazbu spermie k oocyty (Almeida et al. 1995). Prostřednictvím $\alpha 6\beta 1$ nejspíš dochází k navázání dvou členů proteinové rodiny ADAM, fertilinu β (ADAM2) a ADAM3, které se nachází na spermii (Chen et al. 1999; Chen & Sampson 1999; Takahashi et al. 2001; Tomczuk et al. 2003).

3.3 Tetraspaninová síť v gametách

3.3.1 Tetraspaninová síť ve spermii

CD9, CD81 a další

Vzhledem k prokázané přítomnosti CD9 a CD81 v postakrozomálním regionu spermie se předpokládá, že se zde tvoří tetraspaninová síť obsahující významné fúzní proteiny (Ito et al. 2010).

Přítomnost CD9 a CD81 byla zjištěna i v samčích zárodečných buňkách. Podobně jako integriny obsazují charakteristické oblasti (Jankovičová et al. 2020a).

Uvádí se, že síť tvořená z CD81 a CD151 na spermii zprostředkovává nepřímé interakce integrinu s dalšími tetraspaniny (Serru et al. 1999; Stipp et al. 2003). Právě tyto interakce jsou důležité i v případě samičích gamet (Ziyyat et al. 2006; Ohnami et al. 2012; Jankovičová et al. 2016).

Vzájemnému rozpoznání spermie a oocytu a primární vazbě kapacitované spermie s kumulárními buňkami a *zona pellucida* napomáhá CD9, CD81 a CD63. Následným přemístěním CD9 a CD81 je usnadněna sekundární vazba spermie, ke které dochází za přítomnosti CD9 a CD81 u myši a lidí a CD151 u myši, lidí a dobytka. To má za následek průnik spermie skrz *zona pellucida* a adhezi k oolemě, přičemž svůj vliv uplatňuje CD9, CD81 i CD151. Za přítomnosti těchto tří CD molekul dochází k fúzi membrán obou gamet, fúzi prvojadér a formování zygoty. Krátce na to dochází za přítomnosti molekul CD9 a CD81 k zabránění polyspermie (Jankovičová et al. 2020b).

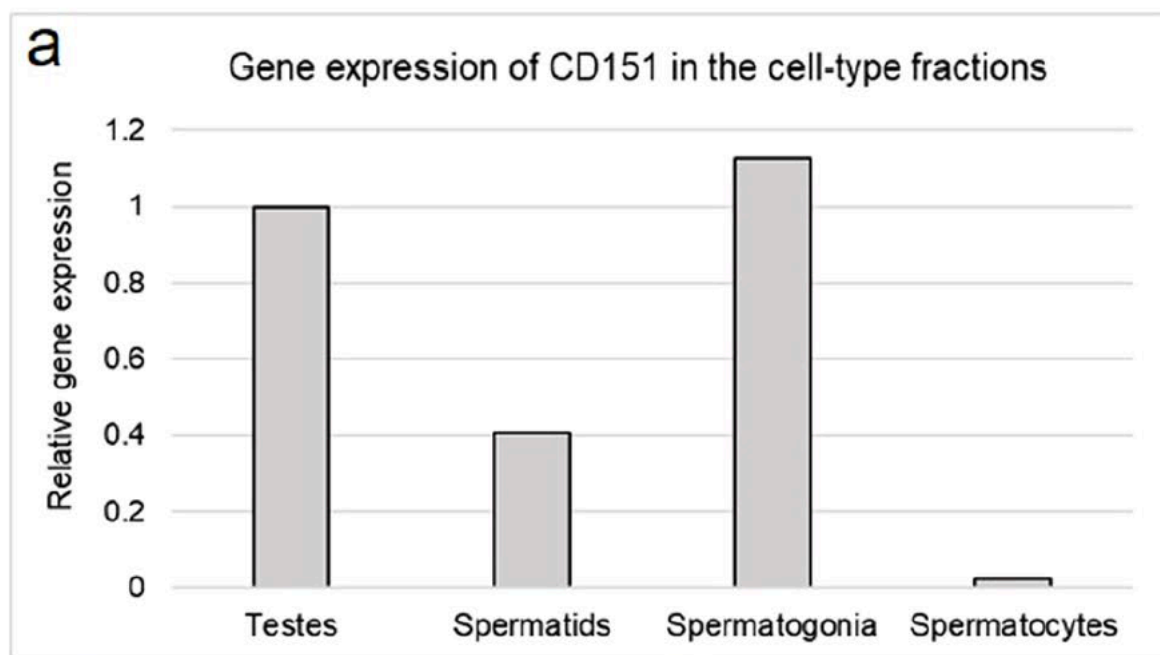
CD151

Jankovičová et al. (2020a) jako první prokázali přítomnost CD151 v tetraspaninové síti spermii. Kromě toho podložili důkazy, že CD151 v myších spermii interaguje s $\alpha 6$ integrinem, který pak tvoří dimer s $\beta 4$. Na základě toho autoři předpokládají existenci transmembránového systému složeného z proteinů, který je zodpovědný za stabilní uspořádání multimolekulárních komplexů. Tyto komplexy zasahují do ekvatoriálního segmentu a zajišťují schopnost interakce s oocytem. Dle Sabetian et al. (2014) existence tetraspaninové sítě CD151 v ekvatoriálním segmentu a její interakce s podjednotkou $\alpha 6$ integrinu $\alpha 6\beta 4/\beta 1$ naznačuje, že by během fúze membrán gamet mohlo docházet k trans-interakcím proteinových sítí spermie a oocytu.

Přítomnost molekuly CD151 ve spermii byla prokázána u tří druhů – u myši, býka a člověka (Jankovičová et al. 2020a).

CD151 je exprimován v zárodečných buňkách během spermatogeneze a je možné ho ve spermii detekovat i během transportu nadvarlaty a ejakulace. Ve významném množství se nachází ve spermatogoniích a spermatidách viz Obrázek 3.6. U testikulárních a epididymálních spermii je CD151 lokalizován v oblasti ekvatoriálního segmentu, stejně tak integriny $\alpha 6$ a $\beta 4$. Naopak integriny $\alpha 3$ a $\beta 1$ byly lokalizovány v odlišné části hlavičky spermie než CD151. Ve spermii myši, u kterých proběhla akrozomální reakce, přetrvává CD151 v ekvatoriálním segmentu, čímž je prokázána jeho specifická přítomnost v oblasti hlavičky, kde je zahájena fúze spermie s oocytem. Krátce po akrozomální reakci nicméně lze CD151 lokalizovat i ve vnitřní akrozomální membráně (Jankovičová et al. 2020a). U myši,

býka i lidí byl během fúze CD151 zjištěn i v apikální části hlavičky kryté vnitřní akrozomální membránou (Jankovičová et al. 2020a).



Obrázek 3.6 Expresse genu CD151 v různých vývojových stádiích spermie a ve varlatech myši (Jankovičová et al. 2020a)

Vzhledem k tomu, že se CD151 ve spermích myši váže k integrinové podjednotce $\alpha 6$ (Jankovičová et al. 2020a), je možné, že CD151 je prostřednictvím $\alpha 6\beta 4$ zapojený do regulace stability ekvatoriální oblasti během akrozomální reakce (Mainiero et al. 1995; Hynes 2002; Ramírez-Ramírez et al. 2019) či do řízení dynamiky cytoskeletonu spermie (Jankovičová et al. 2020a).

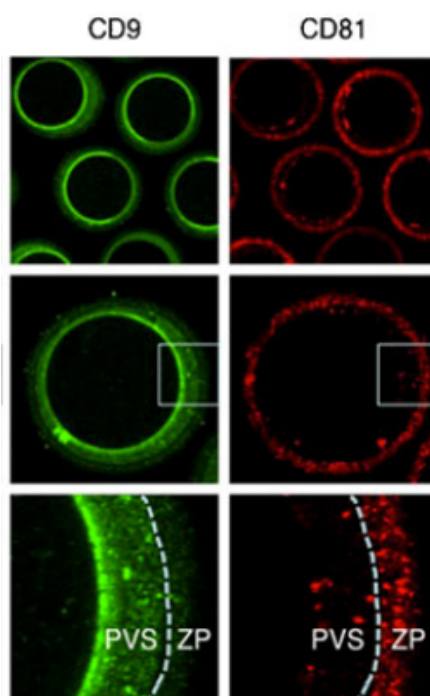
Zdá se, že CD151 by mohl být rovněž součástí multimolekulárního komplexu, který remodeluje membránu spermie prostřednictvím integrinů (Nielsen et al. 2001; Kitiyanant et al. 2002). Klíčovým remodelačním procesem u spermie je pak přeměna její hlavičky během akrozomální reakce, bez čehož by nemohlo dojít k následné fúzi (Satouh et al. 2012; Ito et al. 2014). Dochází také k významným přesunům membránových proteinů z akrozomu. Tento přesun byl již dříve popsán v souvislosti s klíčovými molekulami procesu fúze gamet, jako je Izumo1 (Satouh et al. 2012; Sebkova et al. 2014), CD46 a integriny (Frolíková et al. 2016) nebo tetraspaniny CD9, CD81 (Jankovičová et al. 2016; Frolíková et al. 2018) a nově i CD151 (Jankovičová et al. 2020a).

3.3.2 Tetraspaninová síť v oocytu

CD9

Jedním z nejvýznamnějších proteinů oocytu, který se účastní fúze, je CD9. Bez přítomnosti CD9 na membráně oocytu nemůže dojít k fúzi se spermíí. Oocyt zůstává neoplozený, zároveň ale mnoho dalších spermíí proniká *zona pellucida*, a tím dochází k jejich akumulaci v perivitellinním prostoru (Miyado et al. 2000).

V oocytu je místem exprese tetraspaninu CD9 plazmatická membrána – oolema. CD9 se pak váže na mikrovilli oocytu vybíhající do perivitelního prostoru (Kaji et al. 2000), jak je viditelné na Obrázku 3.7.



Obrázek 3.7 Lokalizace CD9 a CD81 v ovulovaných oocytech se zona pellucida Z Obrázku 3.7 je patrná vazba CD9 na cytoplazmatické výběžky, mikrovilli, které vystupují do perivitelního prostoru. CD81 se pak vyskytuje v prostoru *zona pellucida* (Ohnami et al. 2012). PVS – perivitelní prostor, ZP – *zona pellucida*.

Molekula CD9 byla lokalizována na membráně lidských oocytů v stadiích zárodečného vajíčku, metafáze I i metafáze II (Coskun et al. 2003; Ziyat et al. 2006). U prasat se CD9 vyskytuje na celé plazmatické membráně oocytů v různých vývojových stadiích. Bylo zjištěno, že CD9 je exprimován na oocytech prasat během raného růstu a meiotického zrání. Během jejich zrání se množství CD9 významně zvyšuje (Li et al. 2004). Mimo jiné je součástí epididymosomů býka (Caballero et al. 2013), exosomů semenné plazmy kance (Du et al. 2016) a vezikulů v perivitelním prostoru oocytů myši (Miyado et al. 2008).

Nejvýznamnější funkcí tetraspaninu CD9 je schopnost organizovat multiproteinové komplexy, ve kterých se vyskytují například integriny, protein Juno a další s nimi související molekuly a morfologii membrány, která je žádoucí pro úspěšnou fúzi (Ohnami et al. 2012).

Kromě toho CD9 organizuje také strukturu obsahující tetraspaniny CD151 a CD81 a $\alpha 6\beta 1$ integrin (Ziyat et al. 2006). Při fúzi vazbě napomáhá β fertilin neboli ADAM2 protein (Chen & Sampson 1998).

Dle studie Jégou et al. (2011) má CD9 významnou funkci spíše během vazby než samotné fúze spermie a oocytu. V této studii autoři totiž zjistili výrazně sníženou adhezní schopnost spermie po knock-outu CD9 z oocytu.

CD9 tvoří vazby s integriny, ale také s CD46, který zase interaguje s aktinem. Zdá se tedy, že právě prostřednictvím CD46 je tetraspanin CD9 schopný regulovat pohyb (Lozahic et al. 2000).

U CD9 v plazmatické membráně oocyty byla prokázána také interakce s integrinem $\alpha 3$ nacházejícím se v membráně spermie (Sabetian et al. 2014).

Miyado et al. (2008) ve své práci uvádí, že vajíčky s obsahem CD9 se vylučují z oocyty do jeho perivitelinního prostoru pomocí mikrovilli a následně dochází k jejich přesunu na hlavičku spermie. Tímto procesem je podporována vzájemná vazba gamet.

Runge et al. (2007) ve své práci zjistili, že oocyty bez CD9 mají změněnou délku, tloušťku a hustotu mikrovilli. To naznačuje, že by se i mikrovilli vajíčka mohly podílet na fúzi spermie a oocyty.

Partnerem CD9 je pravděpodobně tetraspanin CD81, jako tomu je i během dalších buněčných fúzí (Ohnami et al. 2012).

CD9 na oocyty je také považován za klíčového partnera proteinu Juno (Kaji et al. 2000).

CD46

CD46 přímo asociuje s integrinovou podjednotkou $\beta 1$, čímž může nepřímo interagovat s tetraspaninem CD151 skrze $\alpha 3$ či $\alpha 6$ podjednotky, které tvoří dimery s $\beta 1$ (Lozahic et al. 2000; Kazarov et al. 2002).

CD81

CD81 se nachází v tetraspaninových sítích oocyty, kde ho lze detekovat zejména v okolí kumulárních buněk a *zona pellucida* (Ohnami et al. 2012) a kromě toho se vyskytuje i ve spermii (Jankovičová et al. 2016).

Tento člen rodiny tetraspaninů se svými funkcemi podobá CD9. Význam má zřejmě při fúzi gamet, jelikož se vyskytuje na povrchu oocyty a interaguje s CD9 při jiných fúzních procesech buňky (Horváth et al. 1998). Delecí genu pro CD81 dochází k mírnému snížení fertility (Rubinstein et al. 2006). Přesná funkce CD81 je stále diskutovaná, ale předpokládá se, že jeho účast při fúzních procesech není tak významná, ale stále důležitá (Glazer & Evans 2009). Zdá se, že CD81 má pouze doplňkovou funkci k CD9 (Rubinstein et al. 2006; Ohnami et al. 2012).

CD81 byl zjištěn v oocytech myši (Takahashi et al. 2001), lidí (Coskun et al. 2003; Ziyat et al. 2006) a nedávno i u skotu (Jankovičová et al. 2016) a prasat (Jankovičová et al. 2019). Jankovičová et al. (2016) prokázali výskyt CD81 na plazmatické membráně ocytů skotu ve stadiích GV, MI i MII. Předpokládá se, že u oplozených ocytů se CD81 akumuluje v perivitelinním prostoru. Ve stejné studii autoři tento tetraspanin lokalizovali u myši a býka v apikální části akrozomu.

U CD81 v oocyty byla prokázána interakce s integrinem $\alpha 4$ ve spermii, čímž se potvrdila jeho účast při procesu oplození (Sabetian et al. 2014).

Frolíková et al. (2018) naznačují, že by CD81 mohl mít schopnost regulace změn v plazmatické membráně spermie.

CD151

Dalším zástupcem rodiny tetraspaninů je CD151, molekula významná během fertilizace. Zásadní fyziologický význam CD151 byl prokázán nejprve u somatických buněk (Jankovičová et al. 2020a). CD151 je významný pro adhezi, která je tímto proteinem regulována prostřednictvím integrinu $\alpha 6\beta 1$ (Lammerding et al. 2003). Mimo jiné je pro CD151 charakteristická obousměrná signalizace, a to opět prostřednictvím integrinů (Jankovičová et al. 2020a).

Ve studii Ziyat et al. (2006) byla molekula CD151 detekovaná u lidských oocytů se *zona pellucida*, kde byla rovnoměrně rozložena v plazmatické membráně. U oocytů bez *zona pellucida* vytvářela molekula CD151 vazby s $\alpha 6\beta 1$ integrinem.

Tetraspanin CD151 asociuje s různými jinými tetraspaniny, integriny nebo dalšími molekulami uvnitř plazmatické membrány (Yauch et al. 1998; Serru et al. 1999; Yauch et al. 2000; Stipp et al. 2003). Je možné, že CD151 se může vzájemně ovlivňovat jak s integriny uvnitř oocytu, tak s integriny ve spermii (Jankovičová et al. 2020b). Zdá se, že uvnitř tetraspaninových mikrodomén se CD151 přímo spojuje s integriny, které se vážou na laminin (Yauch et al. 1998; Serru et al. 1999; Yauch et al. 2000; Stipp et al. 2003).

U CD151 v plazmatické membráně oocytu byla prokázána také interakce s integrinem $\alpha 3$ nacházejícím se v membráně spermie (Sabetian et al. 2014).

CD151 byl již dříve spojen s fúzí lidských gamet (Ziyat et al. 2006). V tomto případě asociuje výhradně s $\alpha 3$, $\alpha 6$ a $\alpha 7$ integriny (Kajiji et al. 1989; Hemler 1998; Ramírez-Ramírez et al. 2019). Na povrchu buňky uvnitř tetraspaninové sítě molekula CD151 spojuje integriny $\alpha 3\beta 1$ a $\alpha 6\beta 1$ s dalšími tetraspaniny, včetně CD9 a CD81 (Serru et al. 1999; Lotus et al. 2000; Berditchevski et al. 2002; Charrin et al. 2003; Stipp et al. 2003; Evinger & Levin 2005).

CD151 se v interakci s $\alpha 6\beta 1$ integrinem účastní formování funkčního komplexu zapojeného do fúze gamet u lidí (Ziyat et al. 2006).

Bylo prokázáno, že CD151 může měnit funkci $\alpha 6\beta 1$ integrinu (Zhang et al. 2002; Lammerding et al. 2003).

Tetraspanin CD151 má kromě významu při fertilizaci také souvislost se závažným onemocněním prasat zvaným reprodukční a respirační syndrom prasat (PRRS) (Goyal 1993). Při reprodukci se toto onemocnění projevuje zvýšeným počtem abortů v pokročilém stadiu gravidity, zvýšeným počtem mrtvě narozených mláďat a předčasnými porody. U kanců se PRRS může projevovat dočasně zhoršenou kvalitou spermií, jejich sníženým počtem a změnou jejich motility (de Jong et al. 1993).

Funkce CD151 u prasečích oocytů zatím nebyla blíže popsána.

4 Metodika

4.1 Získávání vaječníků

Oocyty byly získávány z prasečích vaječníků (viz Obrázek 4.1) poražených prasnic na jatkách v Příbrami. Do laboratoře reprodukce KVD byly vaječnky prasnic transportovány z jatek při teplotě 39°C v termolahvích obsahujících fyziologický roztok s 0,9% chloridu sodného.



Obrázek 4.1 Vaječník poražené prasnice s folikuly

4.2 Získávání oocytů s ukončeným růstem

Z folikulární tekutiny vaječníků byly získávány oocyty s ukončeným růstem. Folikulární tekutina byla aspirována jehlou 20G (Sterican, Braun Melsungen, Německo) z folikulů o průměru od 2 do 5 mm. Vyaspirovaná folikulární tekutina byla stříkačkou umístěna do Petriho misky a pomocí skleněné tenkostěnné kapiláry s gumovou tlačkou byly pod stereomikroskopem (Nikon SMZ 645, Japonsko) nasávány z tekutiny oocyty. Odsáté oocyty byly přeneseny do připravených kapek modifikovaného média M199 (Sigma-Aldrich, Německo), jehož složení uvádí Tabulka 4.1. K následným experimentům byly využity výhradně oocyty s neporušenou cytoplazmou a s kompaktním obalem tvořeným kumulárními buňkami v několika vrstvách.

Tabulka 4.1 Složení modifikovaného média M199

CHEMIKÁLIE	MNOŽSTVÍ VE 100 ML MÉDIA M199
Gentamicin (Sigma-Aldrich, Německo)	25 mg
Laktát vápenatý (Sigma-Aldrich, Německo)	60 mg
Puryvát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)	25 mg
HEPES (Sigma-Aldrich, Německo)	150 mg
Bovinní růstový protein (GibcoBRL, Life Technologies, Německo)	100 mg

4.3 Kultivace oocytů s ukončeným růstem

Kultivace oocytů byla prováděna v médiu M199 v 4-jamkových Petriho miskách (Nunc, Roskilde, Dánsko) při teplotě 39 °C v prostředí tvořeném směsí vzduchu a 5 % CO₂, a to do tří stadií meiotického zrání:

1. stadium zárodečného vajíčka (0 hodin kultivace *in vitro*),
2. stadium meiotické metafáze I (24 hodin kultivace *in vitro*),
3. stadium meiotické metafáze II (48 hodin kultivace *in vitro*).

4.4 Příprava vzorků pro stanovení CD151 metodou Western blot

Opakovaným nasáváním oocytů pomocí tenkostěnné skleněné pipety byly z oocytů v dané fázi meiotického zrání (GV, MI či MII) odstraněny kumulární buňky. Jednotlivé vzorky obsahovaly vždy 100 oocytů. Z kumulárních buněk získaných ze všech 100 oocytů nacházejících se v daném stadiu meiotického zrání byly vytvořeny samostatné vzorky. Každý vzorek byl odděleně promyt pufrem PBS s obsahem soli kyseliny fosforečné, jehož složení shrnuje Tabulka 4.2. Následně byly oocyty i kumulární buňky umístěny do mikrozkuvek obsahujících 50 μ l lyzačního pufru (složení viz Tabulka 4.3) a přídavek inhibitorů proteáz (Roche, Applied Science, Francie). Pomocí pipety s průměrem menším, než průměr oocytů byla opětovným nasáváním mechanicky porušena *zona pellucida* a obsah oocytů vylit do mikrozkuvky. Po inkubaci na ledu po dobu 10 minut byla provedena precipitace proteinů vzorků použitím 5 μ l 100% kyseliny trichloroctové (TCA, 5 μ l na 50 μ l lyzačního pufru) a vzorky byly dalších 10 minut ponechány na ledu. Následovala centrifugace vzorků po dobu 5 minut při 10 000 g a teplotě 4 °C. Centrifugovaný vzorek byl odsátím zbaven supernatantu a sediment vzorků poté promyt v 50 μ l acetonu s HCl. Byla provedena další centrifugace a opět odsátí supernatantu a promytí sedimentu, tentokrát pouze v 50 μ l acetonu. Vzorky byly uchovávány při teplotě -20 °C až do stanovení exprese CD151 metodou Western blot.

Tabulka 4.2 Složení PBS pufru

CHEMIKÁLIE	MNOŽSTVÍ
Na ₂ HPO ₄	29 g
NaH ₂ PO ₄ . 2 H ₂ O	2,96 g
NaCl (100 mM)	5,84 g
H ₂ O	do 1000 ml

Tabulka 4.3 Složení lyzačního pufru (5 ml)

CHEMIKÁLIE	MNOŽSTVÍ
10% Triton X	0,15 ml
10% SDS	0,05 ml
PBS	4,3 ml
10% inhibitor proteáz v PBS	0,5 ml

4.5 Stanovení CD151 metodou Western blot

4.5.1 Elektroforéza

Elektroforéza je laboratorní metoda, během které dochází k dělení částic v elektrickém poli. Dělení probíhá na základě molekulové hmotnosti, kdy se menší proteiny pohybují rychleji a větší pomaleji.

Nejdříve byly proteiny oocytů a kumulárních buněk elektroforeticky separovány. K rozdělení proteinů došlo použitím zónové, mini vertikální elektroforézy (Hoefer Pharmacia Biotech, Německo) na 12% polyakrylamidovém gelu s SDS (dodecylsulfát sodný). SDS je anionaktivním detergentem s poměrně vysokým nábojem, čímž je ve vazbě na bílkovinu schopný vyrovnávat nábojové rozdíly bílkovin, které se pak v gelu pohybují pouze na základě velikosti. Každá bílkovina váže SDS v konstantním poměru, zhruba 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny, čímž dochází ke charakteristické změně konformace bílkoviny. Vytvořené komplexy SDS s bílkovinou mají sjednocenou hodnotu náboje na povrchu a dochází k unifikaci jejich konformace. Konformace se unifikuje na tolik, že relativní molekulová hmotnost bílkoviny je shodná s velikostí jejího komplexu s SDS.

Pro přípravě polyakrylamidového gelu byl potřebný gelový sendvič a spacersy s tloušťkou 1 mm. Nejdříve byl ve zkumavce namíchán pufr o pH 8,8, jehož složení uvádí Tabulka 4.4. Následovala příprava 12% separačního gelu, složení uvedeno v Tabulce 4.5. Pomocí pipety byly roztoky promíchány a ihned bylo provedeno jejich nanesení do sendviče podél spaceru, kdy byl kladen důraz na opatrnost k zamezení vzniku vzduchových bublin. Nanesen byl separační roztok do výšky 1,5 cm pod okraj skel. Následovalo protáhnutí 25G jehlou a opatrné přelití vrstvou destilované vody do výšky 0,5 až 1 cm za účelem udržení rovného povrchu gelu.

Po uplynutí 60 minut byla vylita destilovaná voda a na horní okraj zpolymerizovaného separačního gelu byl pipetou nanesen zaostřovací gel. Příprava tohoto gelu proběhla ve zkumavce, kde bylo smícháno 0,67 ml 30% akrylamidového roztoku, 1 ml pufru o pH 6,8, jehož složení uvádí Tabulka 4.6, 2,3 ml destilované H₂O, 30 μ l persulfátu amonného a 5 μ l TEMEDu. Následovalo nanesení gelu pipetou až k hornímu okraji skel a okamžité zasunutí hřebínku ke tvorbě jamek na vzorky. O 45 minut později byl hřebínek vyjmut a gel přemístěn do elektroforézové vany obsahující elektroforézový pufr složený z viz Tabulka 4.7.

Před separací bylo provedeno rozpuštění proteinů vzorků kultivovaných oocytů a kumulárních buněk ve 200 μ l vzorkového pufru (Laemmli, 1970), složení pufru zapsáno v tabulce 4.8. Za účelem neutralizace pH byl použit 0,1 NaOH o objemu 5 μ l. Postupně bylo do všech vzniklých elektroforézových jamek napipetováno 14 μ l vzorku ve vzorkovém pufru a 3 μ l standardu (Prestained SDS-PAGE Standard, Bio-Rad Lab., Kanada), aby bylo možné sledovat správnou separaci proteinů během elektroforézy a kontrolovat správné přenesení proteinů na membránu. Do jamek, ve kterých se nenacházel vzorek, bylo pipetou naneseno 14 μ l vzorkového pufru. Vzorkový pufr obsahuje bromfenolovou modř, pomocí které lze sledovat délku elektroforézy. Pro bromfenolovou modř je charakteristický výskyt v čele proteinů, které jsou děleny a po skončení elektroforézy by se měla nacházet zhruba 0,5 cm od spodního okraje gelu. Následovalo připojení komory ke zdroji elektrického proudu, přičemž nastavení parametrů bylo následující: 80 V na 20 minut a 120 V po dobu 1 hodiny a 30 minut.

Tabulka 4.4 Složení pufru do separačního gelu

CHEMIKÁLIE	MNOŽSTVÍ
2M Tris – HCl (pH 8,8)	7,5 ml
10% SDS	0,4 ml
H ₂ O	2,1 ml

Tabulka 4.5 Složení 12% separačního gelu (15 ml)

CHEMIKÁLIE	MNOŽSTVÍ
30% akrylamid	7,5 ml
Pufr (pH 8,8)	3,7 ml
Destilovaná H ₂ O	3,8 ml
Persulfát amonný	75 μ l
TEMED (N, N, N', N' - tetramethylen-ethylendiamin)	5 μ l

Tabulka 4.6 Složení pufru do 4% zaostřovacího gelu (10 ml)

CHEMIKÁLIE	MNOŽSTVÍ
1M Tris – HCl (pH 6,8)	5 ml
10% SDS	0,4 ml
H ₂ O	4,6 ml

Tabulka 4.7 Složení elektroforetického pufru

CHEMIKÁLIE	MNOŽSTVÍ
25 mM Tris	3 g
192 mM glycin	14,4 g
10% SDS	10 ml
H ₂ O	do 1000 ml

Tabulka 4.8 Složení vzorkového pufru

CHEMIKÁLIE	MNOŽSTVÍ
1 M Tris – HCl (pH 6,8)	0,6 ml
50% glycerol	5 ml
10% SDS	2 ml
1% bromfenolová modř	0,5 ml
H ₂ O	0,9 ml

4.5.2 Přenos proteinů na blotovací membránu

Působením elektrického proudu dochází prostřednictvím blotovacího zařízení k přenesení proteinů nacházejících se v gelu na povrch membrány.

Po skončení elektroforetické separace byla od sebe opatrně oddělena elfo skla a gel s rozdělenými proteiny vložen na 10 minut do vychlazeného blotovacího – Towbinova pufru. Složení blotovacího pufru je blíže specifikováno v Tabulce 4.9. PVDF membrána (Sigma-Aldrich, Německo) namočená ve vychlazené destilované vodě byla následně také namočena na 10 minut do vychlazeného blotovacího pufru. Postupně byly do připraveného blotovacího modulu umístěny dvě houby, které byly namočeny v blotovacím pufru a na které byl poté položen filtrační papír, také namočený v blotovacím pufru. Následovalo opatrné přenesení gelu na filtrační papír a přiložení PVDF membrány na gel. Na membránu byl položen druhý filtrační papír namočený v blotovacím pufru. Dále bylo nutné pomocí plastové zkumavky jemným převálcováním vytlačit vzduchové bubliny. Posledním krokem bylo umístění dalších dvou houbiček namočených v blotovacím pufru na filtrační papír a uzavření blotovacího modulu.

Blotovací modul byl naplněn blotovacím pufrem a přemístěn do elektroforézové vany. Poté bylo provedeno naplnění vany vychlazenou destilovanou vodou a její doplnění ledem, po kterém následovalo zapojení komory k elektrickému zdroji, přičemž byly nastaveny tyto parametry: 500 mA po dobu 1 hodiny a 30 minut.

Tabulka 4.9 Složení blotovacího pufru – Towbinova pufru

CHEMIKÁLIE	MNOŽSTVÍ
25 mM Tris	3 g
192 mM glycin	14,4 g
10% SDS	1 ml
Metanol (před použitím)	100 ml
H ₂ O	do 1000 ml

4.5.3 Blokování membrány s proteiny

Po přetištění proteinů z gelu na PVDF membránu bylo nezbytné zablokovat volná místa bez proteinů na PVDF membráně. Na všechna místa, kam se nenavázaly proteiny během přenosu, se naváží proteiny mléčného kaseinu nacházející se v roztoku. To má za následek znemožnění molekulám imunoglobulinů se nespecificky navázat na prázdný povrch membrány po přidání protilátky. Molekuly imunoglobulinů pak musí specificky detekovat svůj epitop, tedy antigenní determinant, na přebloetovaných antigenech. Následkem blokování je výrazně snížen šum pozadí a jsou odstraněny falešné positivity. K blokaci bylo použito 2% netučné mléko (Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie), ve kterém byly membrány inkubovány přes noc.

Tabulka 4.10 Složení PBST pufru

CHEMIKÁLIE	MNOŽSTVÍ
Na ₂ HPO ₄	29 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	2,96 g
NaCl (100 mM)	5,84 g
Tween 20	1 ml
H ₂ O	do 1000 ml

4.5.4 Imunodetekce

Zviditelnit daný protein lze pomocí specifické protilátky schopné se na tento protein navázat. Po blokování membrány v netučném mléce následovala její inkubace po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě s králičí polyklonální protilátkou anti-CD151 (Abcam, USA), která byla PBS dle doporučení výrobce, a to 1:250. Po uplynutí doby inkubace bylo provedeno promytí membrány 3 x 10 minut v PBST (PBS s Tween 20). Následně byla na promytou membránu aplikována sekundární protilátka anti-králičí IgG, který byl konjugovaný s křenovou peroxidázou (Sigma-Aldrich, Německo). Poměr ředění v PBS byl 1:3 000 a inkubace probíhala po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Po inkubaci následovalo promytí membrány v PBST za stálého míchání, a to 4 x 5 minut, a poté 2 x 5 minut v PBS. Za účelem detekce CD151 byl použit detekční kit pro Western blotting (ECL Advanced Western Blotting Detection Kit, Amersham Biosciences, Velká Británie). Množství proteinů přenesených na membránu v lyzátu analyzovaných buněk bylo detekováno pomocí specifických protilátek za využití ECL chemiluminiscenčního kitu a detekce signálu byla snímána pomocí přístroje Azure.

4.6 Imunocytochemická detekce CD151

Opakovaným nasáváním a vysáváním skrz úzkostěnnou skleněnou pipetu byly oocyty zbaveny kumulárních buněk. Následovalo odstranění vrstvy *zona pellucida* pomocí Tyrodova roztoku (Sigma-Aldrich, Německo). Oocyty byly poté opakovaně promyty 0,1% BSA (bovinní sérový albumin, Sigma-Aldrich, Německo) v PBS a fixovány v 2,5% paraformaldehydu v PBS při laboratorní teplotě. Pomocí 0,5% roztoku Tritonu X-100 v PBS proběhla za laboratorní teploty dvouhodinová permeabilizace fixovaných oocytů. Následoval nejdříve krátký oplach oocytů v 0,1% roztoku Tweenu 20 v PBS, a poté inkubace, která probíhala v inkubačním médiu s primární protilátkou ředěnou v poměru 1:1 000. Inkubace probíhala během noci, a to při 4 °C. Následné promytí oocytů bylo prováděno třikrát po 10 minutách v roztoku 0,1% Tween 20 v PBS. Tím došlo k odstranění nenavázaných protilátek. Následovala další inkubace, která trvala 1 hodinu a probíhala při laboratorní teplotě a ve tmě. Jednalo se o inkubaci se sekundární protilátkou anti-králičí IgG, která byla konjugovaná s fluorescenčně značeným isothiokyanátem (FITC) v poměru 1:3 000 (Sigma-Aldrich, Německo). Po barvení sekundární protilátkou byly oocyty promyty a montovány na podložní sklo pomocí montovacího média Vectashield s DAPI, které barví jaderné struktury. Preparáty s namontovanými oocyty v různém stadiu meiotického zrání byly mikroskopovány prostřednictvím laserového konfokálního mikroskopu (Leica SPE, Německo) umístěného v prostorách Technické fakulty ČZU v Praze. Ze získaných obrázků z konfokálního mikroskopu bylo následně provedeno snímání fluorescenčního signálu detekovaného proteinu CD151, přičemž sledována byla relativní intenzita signálu v průběhu meiotického zrání. Za účelem kontroly nespecifické vazby protilátky byly oocyty kultivovány pouze se sekundární protilátkou (negativní kontrola experimentu).

Použité chemikálie

2,5% paraformaldehyd v PBS	2,5 g paraformaldehydu + 50 ml redestilované H ₂ O
5% roztok BSA	1 g BSA + 20 ml redestilované H ₂ O
PBS + BSA	1 ml PBS + 20 μ l 5% BSA
PBS + Triton X-100 + BSA	1 ml PBS + 50 μ l Triton X-100 + 20 μ l 5% BSA
PBS + Tween 20	1 ml PBS + 10 μ l 10% Tween 20
Inkubační médium	1 ml PBS – 10 μ l 10% Tween 20 + 20 μ l 5% BSA

4.7 Statistika

U výsledných dat relativní intenzity fluorescence odečtené z obrázků nasnímaných na laserovém konfokálním mikroskopu byla provedena analýza statistickou metodou jednofaktorová ANOVA pomocí programu STATISTICA 6.0. Meziskupinové rozdíly pak byly hodnoceny Scheffého testem, přičemž hladina významnosti byla 0,05.

Každý experiment byl opakován 4x.

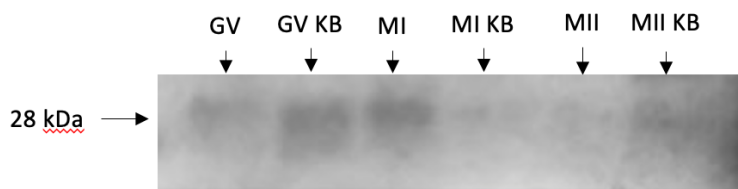
5 Výsledky

Metodou Western blot a následnou imunocytochemickou detekcí byl zjištěn výskyt proteinu CD151 v prasečích oocytech v průběhu meiotického zrání. Analyzovány byly oocyty ve stadiu zárodečného vajíčku (GV), první (MI) a druhé (MII) meiotické metafáze.

5.1 Detekce proteinu CD151 v oocytu prasete během meiotického zrání prostřednictvím metody Western blot

Byly analyzovány vzorky oocytů bez kultivace, ve stadiu zárodečného vajíčku a vzorky oocytů kultivovaných do stadia první a druhé meiotické metafáze, 24, popřípadě 48 hodin. Každý vzorek obsahoval proteiny ze 100 oocytů v daném stadiu meiotického zrání. Odděleně byly připraveny vzorky kumulárních buněk získaných z oocytů v dané fázi jaderného zrání. Po elektroforetické separaci proteinů byl proveden jejich přenos na PVDF membránu. Protein CD151 byl detekován polyklonální protilátkou. Pomocí protilátky proti alfa-tubulinu byla stanovena celková nanáška proteinů.

Western blot analýza prokázala reakci primární protilátky proti proteinu o molekulové hmotnosti kolem 28 kDa, která odpovídá molekulové hmotnosti proteinu CD151. V prasečích oocytech byla přítomnost proteinu CD151 potvrzena, přičemž protein byl detekován ve všech stadiích meiotického zrání, tedy ve stadiu zárodečného vajíčku (GV), ve stadiu první meiotické metafáze (MI) a také druhé meiotické metafáze (MII) a také v kumulárních buňkách získaných z těchto oocytů (viz Obrázek 5.1).

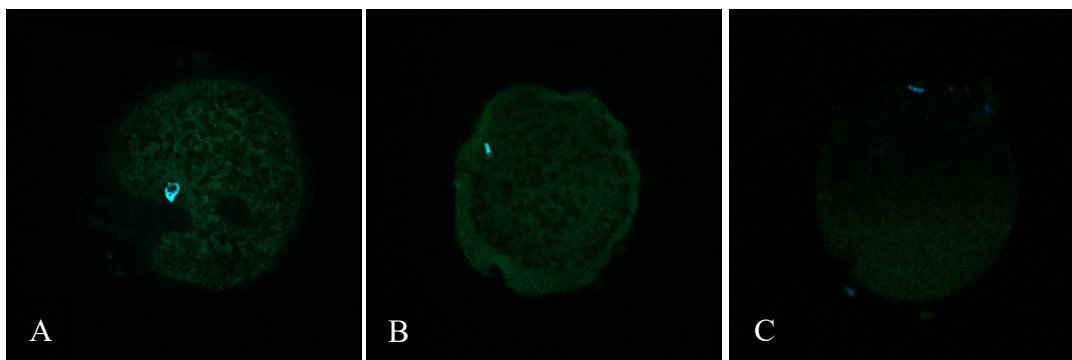


Obrázek 5.1 Detekce proteinu CD151 metodou Western blot. GV – oocyt ve stadiu zárodečného vajíčku, GV KB – kumulární buňky oocyt ve stadiu zárodečného vajíčku, MI – oocyty ve stadiu první meiotické metafáze, MI KB – kumulární buňky oocyt ve stadiu první meiotické metafáze, MII – oocyty ve stadiu druhé meiotické metafáze, MII KB – kumulární buňky oocytu ve stadiu druhé meiotické metafáze.

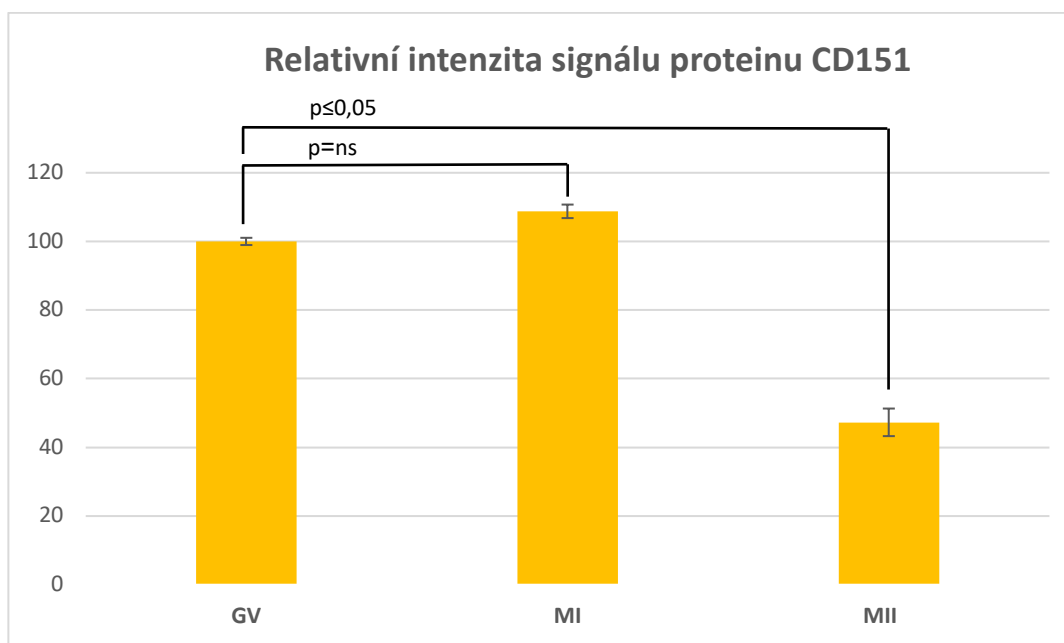
5.2 Detekce proteinu CD151 v oocytu prasete prostřednictvím imunocytochemie

Prasečí oocyty bez kumulárních buněk a *zona pellucida* byly inkubovány nejdříve s primární, a poté se sekundární protilátkou. Za účelem negativní kontroly byly některé oocyty inkubovány pouze se sekundární protilátkou. Sekundární protilátka obsahovala fluorescenční barvivo FITC, které zbarvilo detekovaný protein zeleně. Jaderné struktury pak byly obarveny modře pomocí barviva DAPI. Následně proběhlo snímání fluorescenčního signálu proteinu CD151 v oocytech v různých stadiích zrání, které potvrdilo přítomnost CD151 ve všech těchto

stadiích (Obrázek 5.2), přičemž byla hodnocena intenzita fluorescenčního signálu. Výsledné průměrné hodnoty relativní intenzity signálu jsou uvedeny v Grafu 5.1.



Obrázek 5.2 Lokalizace proteinu CD151 v prasečích oocytech v různých stadiích meiotického zrání pomocí imunocytochemie. A – oocyt ve stadiu zárodečného váčku (GV), B – oocyt ve stadiu první meiotické metafáze, C – oocyt ve stadiu druhé meiotické metafáze. Modře je za pomoci barviva DAPI označen chromatin. Zelenou fluorescencí je označen protein CD151.



Graf 5.1 Relativní intenzita signálu proteinu CD151 v prasečích oocytech v různých stadiích meiotického zrání. GV – oocyty ve stadiu zárodečného váčku, MI – oocyty ve stadiu první meiotické metafáze, MII – oocyty ve stadiu druhé meiotické metafáze. P=ns – nesignifikantní statistický rozdíl. P<0,05 – statisticky významný rozdíl.

Hodnota intenzity fluorescence proteinu CD151 v oocytech byla vztažena k hodnotě intenzity fluorescence v oocytech ve stadiu zárodečného váčku (100 %). Ve stadiu první meiotické metafáze se intenzita signálu oproti signálu v GV nelišila. Oproti tomu signál fluorescence v oocytech ve stadiu druhé meiotické metafáze byl proti signálu v oocytech ve stadiu GV statisticky významně nižší (45 %).

6 Diskuze

V předložené diplomové práci byla studována exprese proteinu CD151 během meiotického zrání oocyty prasete. V porovnání s bovinním či myším modelem je velkou výhodou prasečích oocytů jejich fyziologická podoba s oocyty lidskými. Výsledky získané na prasečím modelu mohou být proto extrapolovatelné na člověka (Braga et al. 2007).

Molekula CD151 patří mezi proteiny označované jako tetraspaniny (Uhlen et al. 2015). Výskyt tetraspaninů během procesu oplození a fúze gamet byl v minulosti popsán řadou autorů u různých živočišných druhů, například u myši (Ohnami et al. 2012), skotu (Jankovičová et al. 2019) a také člověka (Ziyyat et al. 2006). Tetraspaniny se kromě oocytů vyskytují rovněž v samčích pohlavních buňkách, spermích (Ziyyat et al. 2006; Jankovičová et al. 2020a). Exprese CD151 v oocyty prasete nebyla dosud prokázána, proto byla předmětem diplomové práce, kdy pomocí SDS elektroforézy byla provedena separace proteinů získaných z oocytů v různé fázi meiotického zrání (GV, MI a MII) a jejich kumulárních buněk. Využitím metody Western blot s následnou imunodetekcí byl zachycen výskyt proteinu o molekulové hmotnosti v oblasti kolem 28 kDa, která odpovídá molekulové hmotnosti tetraspaninu CD151.

CD151 patří do skupiny membránových proteinů – tetraspaninů. Tetraspaniny v membránách tvoří tzv. tetraspaninovou síť. Tuto síť je možné charakterizovat jako funkční oblasti v membránách, které jsou složeny z proteinů a uvnitř kterých dochází k nejrůznějším molekulárním interakcím (Berditchevski 2001; Boucheix & Rubinstein 2001; Hemler 2003). Vlastnost tetraspaninů tvořit v membránách rozsáhlou síť můžeme po mikroskopii oocytů na laserovém konfokálním mikroskopu potvrdit, jelikož výskyt tetraspaninu CD151 byl zřejmý v oblasti celé membrány oocytů. Uvnitř sítě tetraspaniny interagují kromě dalších tetraspaninů také například s integriny, které jsou nedílnou součástí tohoto systému (Jankovičová et al. 2020a). Například tetraspanin CD151 spojuje integriny $\alpha 3\beta 1$ a $\alpha 6\beta 1$ s dalšími tetraspaniny, jako jsou CD9 a CD81 (Charrin et al. 2003). Vědci také připouští možnou schopnost tetraspaninů regulovat funkce molekul, se kterými asociují (Ziyyat et al. 2006). Takto skrze integriny, jejichž vlastností je zprostředkovávání buněčné adheze, posléze i tetraspaniny ovlivňují právě adhezi (Berditchevski 2004; Rubinstein et al. 2013). Tedy i adhezi gamet během oplození (Lammerding et al. 2003). Předpokládali jsme proto, že i tetraspanin CD151 bude nějakým způsobem souviset s adhezí spermie k oocyty .

Funkcí tetraspaninů na povrchu oocyty je prostřednictvím vazeb s jinými molekulami organizovat membránové komplexy, které obsahují proteiny důležité pro interakce mezi membránami oocyty a spermie (Ziyyat et al. 2006; Jankovičová et al. 2020b). Reorganizací membrány je pak ulehčena vzájemná komunikace a interakce proteinů vedoucí k úspěšné fertilizaci (Jankovičová et al. 2019). Organizace membrány oocyty jeho tetraspaninovou sítí je umožněna zejména vazbou tetraspaninů s membránovými integriny (Ziyyat et al. 2006). Co se týče konkrétně tetraspaninu CD151, v membráně oocyty asociuje s integrinem $\alpha 6\beta 1$, jedním ze dvou integrinů přítomných na povrchu oocyty (Serru et al. 1999). Almeida et al. (1995) ve své studii uvádí, že by tento integrin mohl být receptorem pro vazbu spermie k oocyty a vzhledem k jeho asociaci s CD151 se domníváme, že by právě tímto způsobem mohla být přisuzována funkce při vazbě i samotnému CD151. Lammerding et al. (2003) navíc prokázali, že CD151 může měnit funkci tohoto vazebného partnera, což potvrzuje naši domněnku. Tato skutečnosti byla ještě rozšířena ve studii Jankovičové et al. (2020b), kde autoři připouští,

že CD151 se může vzájemně ovlivňovat jak s integriny uvnitř oocyty, tak s integriny ve spermii. Na základě všech těchto důkazů a předpokladů jsme očekávali výskyt CD151 zejména v oocytech ve stadiu druhé meiotické metafáze, ve které se během adheze oocyt nachází. Nicméně provedená imunocytochemická analýza a měření fluorescenčního signálu v této práci prokázaly přítomnost proteinu CD151 v největším množství ve stadiu zárodečného vajíčku a první meiotické metafáze, kdy naměřené množství proteinu CD151 bylo srovnatelné. Zároveň byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi expresí CD151 ve stadiu zárodečného vajíčku a ve stadiu druhé meiotické metafáze, kdy ve stadiu MII došlo k výraznému poklesu exprese CD151. Můžeme se tedy domnívat, že k molekulárnímu uspořádání membrány oocyty před fertilizací prostřednictvím proteinu CD151 nedochází až bezprostředně před samotnou adhezí spermie k oocyty. Zároveň je možné, že těsně před oplozením dochází v komplexu CD151-integrin $\alpha 6\beta 1$ k poklesu množství CD151, a naopak ke zvýšení množství integrinu $\alpha 6\beta 1$. Na základě dosavadních studií na téma tetraspanin CD151 v oocytech se domníváme, že by další přínos mohly mít studie týkající se vazby CD151 s integrinem $\alpha 6\beta 1$, případně $\alpha 3\beta 1$, po fúzi spermie s oocytem. Dále předpokládáme, že i další a podrobnější experimenty zaměřené na tetraspanin CD151 během procesu oplození by pomohly k objasnění funkcí této zatím stále ještě málo prozkoumané molekuly.

7 Závěr

Touto prací bylo experimentálně potvrzeno, že se protein CD151 vyskytuje v membráně prasečích oocytů i kumulárních buněk, a to během procesu meiotického zrání. Imunocytochemickou metodou a snímáním fluorescenčního signálu byla popsána exprese a lokalizace CD151 v jednotlivých fázích meiotického zrání.

Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v intenzitě signálu proteinu CD151 mezi stadiem zárodečného vajíčku a stadiem první meiotické metafáze, množství CD151 bylo srovnatelné v obou stadiích. Oproti tomu byl prokázán signifikantní rozdíl v expresi CD151 mezi stadii zárodečného vajíčku a druhé meiotické metafáze. Nebyl potvrzen předpoklad, že exprese CD151 bude nejvíce průkazná ve stadiu druhé meiotické metafáze.

Z našich výsledků vyplývá, že protein CD151 zřejmě nemá nejvýznamnější roli až před adhezí spermie a oocytu, jak jsme předpokládali, ale již mnohem dříve před samotným oplozením. Kromě toho jsme došli k závěru, že těsně před oplozením může v komplexu CD151 s integrinem $\alpha 6\beta 1$ docházet ke snížení množství proteinu CD151 a zároveň zvýšení množství integrinu $\alpha 6\beta 1$.

Bude potřeba dalších experimentů na podobné bázi, nejlépe se zaměřením i na vazbu tetraspaninu CD151 k integrinu $\alpha 6\beta 1$ v oocytech.

8 Literatura

- Adhikari D, Liu K, Shen Y. 2012. Cdk1 drives meiosis and mitosis through two different mechanisms. *Cell Cycle*. **11**:2763-2764.
- Aguilar PS, Baylies MK, Fleissner A, Helming L, Inoue N, Podbilewicz B, Wang H, Wong M. 2013. Genetic basis of cell-cell fusion mechanisms. *Trends Genet*. **29**:427-437.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing. Ústí nad Labem.
- Alderton KW, Cooper ChE, Knowles GR. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemistry*. **357**:593-61.
- Alfieri JA, Martin AD, Takeda J, Kondoh G, Myles DG, Primakoff P. 2003. Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. *J Cell Sci*. **116**:2149-55.
- Almeida EA, Huovila AP, Sutherland AE, Stephens LE, Calarco PG. 1995. Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell*. **81**:1095-104.
- Ambrosino A, Russo D, Lamanna C, Assisi L, Rizzo M, Vittoria A, Cecio A. 2003. Isoforms of nitric oxide in the pig testis. *Acta Veterinaria*. **72**:493-498.
- Anderson DJ, Abbott AF, Jack RM. 1993. The role of complement component C3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. **90**:10051-5.
- Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Biol Sci*. **4**:581-596. DOI: 10.1071/bi9510581.
- Azevedo MF, et al. 2014. Clinical and Molecular Genetics of the Phosphodiesterases (PDEs), *Endocrine Reviews*. **35**:195-233.
- Baltus AE, Menke DB, Hu YC, Goodheart ML, Carpenter AE, de Rooij DG, Page DC. 2006. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet*. **38**:1430-4. DOI: 10.1038/ng1919.
- Barraud-Lange V, Naud-Barriant N, Saffar L, Gattegno L, Ducot B, Drillet AS, Bomsel M, Wolf JP, Ziyat A. 2007. Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization. *BMC Dev. Biol*. **7**:102. DOI: 10.1186/1471-213X-7-102.
- Bazzoni G, Hemler ME. 1998. Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized? *Trends Biochem. Sci*. **23**:30-34.
- Berditchevski F. 2001. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J. Cell Sci*. **114**:4143-4151.
- Berditchevski F, Odintsova E. 2007. Tetraspanins as Regulators of Protein Trafficking. *Traffic*. **8**:89-96.
- 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**:36991-37000.

- Bernal-Ulloa SM, et al. 2016. Cyclic AMP affects oocyte maturation and embryo development in prepubertal and adult cattle. *PLoS One* (e0150264) DOI: 10.1371/journal.pone.0150264.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **1**:11-21.
- Bielanska-Osuchowska Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology*. **6**:161-193.
- Bilodeau-Goeseels S. 2012. Bovine oocyte meiotic inhibition before in vitro maturation and its value to in vitro embryo production: does it improve developmental competence? *Reprod Domest Anim*. **47**:687-693.
- Bornslaeger EA, Mattei P, Schultz RM. 1986. Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Dev Biol*. **114**:453-462.
- Boucheix C, Rubinstein E. 2001. Tetraspanins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **58**:1189-1205.
- Bowles J, Koopman P. 2010. Sex determination in mammalian germ cells: extrinsic versus intrinsic factors. *Reproduction*. **139**:943-58.
- Braga D, Pasqualotto FF, Madaschi C, Bonetti TCD, Rodrigues D, Iaconelli A, Borges E. 2007. Use of pig oocytes for training new professionals in human assisted reproduction laboratories. *Fertility and Sterility*. **88**:1408-1412.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. **347**:768-770.
- Brevini-Gandolfi TAL, Gandolfi F. 2001. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*. **55**:1255-1276.
- Brunet S, Maro B. 2005. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: Integrating time and space. *Reproduction*. **130**:801-811.
- Bu S, Xia G, Tao Y, Lei L, Zhou B. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **207**:21-30.
- Caballero JN, Frenette G, Belleannée C, Sullivan R. 2013. CD9-positive microvesicles mediate the transfer of molecules to bovine spermatozoa during epididymal maturation. *PLoS One* **8** (e65364) DOI: 10.1371/journal.pone.0065364.
- Calarco PG. 1972. The kinetochore in oocyte maturation. Pages 65-89 in Biggers JD, Scheultz AW, editors. *Oogenesis*. Univ. Park., Pennsylvania.
- Claas C, Stipp CS, Hemler ME. 2001. Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J Biol Chem*. **276**:7974-84. DOI: 10.1074/jbc.M008650200.

- Clarke PR. 1995. Cyclin-Dependent Kinases: CAK-handed kinase activation *Current. Biology.* **5**:40-42.
- Clarke H, Rossant J, Masui Y. 1988. Suppression of chromosome condensation during meiotic maturation induces parthenogenetic development of mouse oocytes. *Development.* **104**:97-103.
- Clift LE, Dvorakova-Hortova K, Frolikova M, Andrlíkova P, Salman S, Stopka P, Flanagan BF, Johnson PM. 2009. CD55 and CD59 protein expression by Apodemus (field mice) sperm in the absence of CD46. *Journal of Reproductive Immunology.* **81**:62-73.
- Cohen DJ, Busso D, Da Ros V, Ellerman DA, Maldera JA, Goldweic N, Cuasnicu PS. 2008. Participation of cysteine-rich secretory proteins (CRISP) in mammalian sperm-egg interaction. *Int J Dev Biol.* **52**:737-42.
- Cohen P. 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual review of biochemistry.* **58**:453-508.
- Combelles CM, Gupta S, Agarwal A. 2009. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes?. *Reproductive biomedicine online.* **18**:864-880.
- Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C, Tsafiri A. 2002. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol.* **187**:153-159.
- Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol.* **356**:65-73.
- Corbett EF, Michalak M. 2000. Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem Sci.* **25**:307-311.
- Coskun S, Elnour A, Hellani A, Gaafar T. 2003. CD9 is expressed on human oocytes. *Fertil. Steril.* **80**:268.
- Coticchio G, Albertini DF, De Santis L. 2013. *Oogenesis.* Springer, London. DOI: 1007/9780-85729-826-3.
- Coticchio G, Dal Canto M, Mignini Renzini M, Guglielmo MC, Brambillasca F, Turchi D, Novara PV, Fadini R. 2015. Oocyte maturation: Gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Hum Reprod.* **21**:427-54
- Da Ros VG, Maldera JA, Willis WD, Cohen DJ, Goulding EH, Gelman DM, Rubinstein M, Eddy EM, Cuasnicu PS. 2008. Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking cysteine-rich secretory protein 1 (CRISP1). *Dev Biol.* **320**: 12-8.
- Dai Y, Lee C, Hutchings A, Sun Y, Moor, R. 2000. Selective requirement for Cdc25C protein synthesis during meiotic progression in porcine oocytes. *Biology of reproduction.* **62**:519-532.
- Davis RJ. 2000. Signal transduction by the JNK Group of MAP kinases. *Cell.* **103**:239-252.

- de Jong MF, Cromwijk W, Veld P. 1991. The new pig disease-epidemiology and production losses in The Netherlands. Proc Meet PRRS- the New Pig Dis, Comm Eur Commun. **1**:9-19.
- De Santis L, Brevini TAL. 2013. Organelle Rearrangement in the Maturing Oocyte. Pages 209-217 in Coticchio G, Albertini D, De Santis L, editors. Oogenesis. Springer, London.
- de Souza GB, Costa J, da Cunha EV, Passos J, Ribeiro RP, Saraiva M, van den Hurk R, Silva J. 2017. Bovine ovarian stem cells differentiate into germ cells and oocyte-like structures after culture in vitro. Reprod Domest Anim. **52**:243-250. DOI: 10.1111/rda.12886.
- De Vantéry C, Stutz A, Vassalli JD, Schorderet-Slatkine S. 1997. Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocyte is controlled at both translational and posttranslational levels. Developmental Biology. **187**:43-54.
- Dixit DV, Parvizi N. 2001. Nitric oxide and the control of reproduction. Animal reproduction science. **65**:1-16.
- Domingo-Sananes MR, Kapuy O, Hunt T, Novák B. 2011. Switches and latches: a biochemical tug-of-war between the kinases and phosphatases that control mitosis. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. **366**:3584-3594.
- Du J, Shen J, Wang Y, Pan C, Pang W, Diao H, Dong W. 2016. Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. Oncotarget. **7**:58832.
- Ducibella T, Schultz RM, Ozil JP. 2006. Role of calcium signals in early development. Semin Cell Dev Biol. **17**:324-332. DOI: 10.1016/j.semcdb.2006.02.010.
- Dunphy W, Brizuela L, Beach D, Newport J. 1988. The Xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. Cell. **53**:423-431.
- Dupré A, Haccard O, Jessus C. 2011. Mos in the oocyte: how to use MAPK independently of growth factors and transcription to control meiotic divisions. Journal of signal transduction. (350412) DOI: 10.1155/2011/350412.
- Egbert JR, et al. 2016. Luteinizing hormone causes phosphorylation and activation of the cyclic GMP phosphodiesterase PDE5 in rat ovarian follicles, contributing, together with PDE1 activity, to the resumption of meiosis. Biol Reprod. **94**:110.
- Elkouby YM. 2017. All in one-integrating cell polarity, meiosis, mitosis and mechanical forces in early oocyte differentiation in vertebrates. Int J Dev Biol. **61**:179-93.
- Ellerman DA, Pei J, Gupta S, Snell WJ, Myles D, Primakoff P. 2009. Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. Mol Reprod Dev. **76**:1188-1199.
- Eppig JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction. **122**:810-837.
- Eppig JJ, Viveiros MM, Bivens C, De La Fuente R. 2004. Regulation of Mammalian Oocyte Maturation. Pages 113-129 in Leung P, Adashi EY, editors. The Ovary. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

- Escola J, 1998. Selective Enrichment of Tetraspan Proteins on the Internal Vesicles of Multivesicular Endosomes and on Exosomes Secreted by Human B-lymphocytes *. *The journal of biological chemistry*. **273**:20121-20127.
- Evinger AJ III, Levin ER. 2005. Requirements for estrogen receptor α membrane localization and function. *Steroids*. **70**:361-363.
- Fan HY, Li MY, Tong C, Chen DY, Xia GL, Song XF, Schatten H, Sun QY. 2002. Inhibitory effects of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. *Mol Reprod Dev*. **63**:480-7.
- Fan HY, Sun QY. 2004. Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals, *Biology of Reproduction*. **70**:535-547.
- Fan Z, Xinyi M, Liying Y, Jie Q. 2019. The Molecular Genetics of Oogenesis. Pages 155-172 in Leung PCK, Qiao J, editors. *Human Reproductive and Prenatal Genetics*. Academic Press, San Diego.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. **71**:836-48.
- Fitter S, Seldin MF, Ashman LK. 1998. Characterisation of the mouse homologue of CD151 (PETA-3/SFA-1); genomic structure, chromosomal localisation and identification of 2 novel splice forms. *Biochim Biophys Act*. **1398**:75-85.
- Fitter S, Sincock PM, Jolliffe CN, Ashman LK. 1999. Transmembrane 4 superfamily protein CD151 (PETA-3) associates with beta 1 and alpha IIb beta 3 integrins in haemopoietic cell lines and modulates cell-cell adhesion. *Biochem. J*. **338**:61-70.
- Florman HM, Fissore RA. 2015. Fertilization in Mammals. Pages 149-196 in Plant TM, Zeleznik AJ, editors. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Academic Press, San Diego.
- Frolíková M. 2012. Role of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 in reproduction. *Folia Zoologica*. **61**:84-94.
- Frolíková M, Sebkova N, Ded L, Dvorakova-Hortova K. 2016. Characterization of CD46 and β 1 integrin dynamics during sperm acrosome reaction. *Scientific Reports*. **6**:33714.
- Frolíková M, Manaskova-Postlerova P, Cerny J, Jankovicova J, Simonik O, Pohlova A, Secova P, Antalikova J, Dvorakova-Hortova K. 2018. CD9 and CD81 Interactions and Their Structural Modelling in Sperm Prior to Fertilization. *International journal of molecular sciences*. **19**:1236.
- Frolíková M, et al. 2019. Addressing the Compartmentalization of Specific Integrin Heterodimers in Mouse Sperm. *International journal of molecular sciences*. **20**:1004.
- Garcia-España A, Chung P, Sarkar IN, Stiner E, Sun T, DeSalle R. 2008. Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution. *GENOMICS*. **91**:326-334.

- Gautier J, Maller J. 1988. Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation. *The EMBO Journal*. **10**:177–182.
- Gautier J, Maller J, Langan T, Lohka M, Shwnoy S, Shalloway D, Nurse P. 1989. Maturation promoting factor and the regulation of the cell cycle. *Journal of Cell Science*. **12**:53-63.
- Gautier J, Solomon MJ, Booher RN, Bazan JF, Kirschner MW. 1991. Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell*. **67**:197-211.
- Georgadaki K, Khoury N, Spandidos DA, Zoumpourlis V. 2016. The molecular basis of fertilization (Review). *Int J Mol Med*. **38**:979-86.
- Gershon E, Maimon I, Galiani D, Elbaz M, Karasenti S, Dekel N. 2019. High cGMP and low PDE3A activity are associated with oocyte meiotic incompetence. *Cell Cycle*. **18**:2629-40.
- Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, Vos MD, Sugimura S, Smits J, Richard FJ, Thompson JG. 2016. Oocyte maturation and quality: Role of cyclic nucleotides. *Reproduction*. **152**:R143-57.
- Glander HJ, Schaller J. 1993. Beta 1-integrins of spermatozoa: a flow cytometric analysis. *International journal of andrology*. **16**:105–111.
- Glazar A, Evans JP. 2009. Immunoglobulin superfamily member IgSF8 (EWI-2) and CD9 in fertilisation : evidence of distinct functions for CD9 and a CD9-associated protein in mammalian sperm – egg interaction. *Reproduction, Fertility and Development*. **8**:293-303.
- Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. **349**:132-138.
- Gosden RG, Bownes M. 1995. Cellular and molecular aspects of oocyte development, Gametes-The Oocyte. Cambridge University Press. Cambridge.
- Goyal SM. 1993. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc*. **5**:656-664.
- Grasselli F, Ponderato N, Basini G, Tamanini C. 2001. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide/cyclic GMP pathway in swine granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology*. **20**:241-252.
- Gupta A, Tiwari M, Prasad S, Chaube SK. 2017. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. *J Cell Biochem*. **180**:446-52.
- Guraya SS. 2000. Comparative Cellular and Molecular Biology of Ovary in Mammals Fundamentals and Applications. Science Publishers. New Hampshire.
- Guthrie H, Garrett WM. 2000. Changes in porcine oocyte germinal vesicle development as follicles approach preovulatory maturity. *Theriogenology*. **54**:389-399.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation. Pages 68-82 in Hafez ESE, Hafez B, editors. *Reproduction in Farm Animals*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

- Hachem A, et al. 2017. PLC ζ is the physiological trigger of the Ca²⁺ oscillations that induce embryogenesis in mammals but conception can occur in its absence. *Development*. **144**:2914-2924.
- Hemler ME. 1998. Integrin associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**:578-585.
- Hemler ME. 2003. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**:397-422.
- Hemler M. 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**:801-811.
- Hemler M, Crouse C, Sonnenberg A. 1989. Association of the VLA alpha 6 subunit with a novel protein. A possible alternative to the common VLA beta 1 subunit on certain cell lines. *J. Biol. Chem.* **264**:6529-6535.
- Hinckley M, Vaccari S, Horner K, Chen R, Conti M. 2005. The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. *Dev Biol.* **28**:249-61.
- Hochheimer N, Sies R, Aschenbrenner AC, Schneider D, Lang T. 2019. Classes of non-conventional tetraspanins defined by alternative splicing. *Scientific reports*. **9**:1-13.
- Hojnik N, Kovačič B. 2019. Oocyte activation failure: physiological and clinical aspects. In *Embryology - theory and practice*. IntechOpen.
- Holt JE, Lane SIR, Jones KT. 2013. The Control of Meiotic Maturation in Mammalian Oocytes. Pages 207-226 in Wassarman PM, editor. *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press.
- Horváth G, Serru V, Clay D, Billard M, Boucheix, Rubinstein E. 1998. CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *J Biol Chem.* **273**:30537-30543.
- Hunnicutt GR, Koppel DE, Myles DG. 1997. Analysis of the process of localization of fertilin to the sperm posterior head plasma membrane domain during sperm maturation in the epididymis. *Dev Biol.* **191**:146-59.
- Hunt PA, Hassold TJ. 2008. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet.* **24**:86-93.
- Hunter M. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of reproduction.* **5**:122-130.
- Hynes RO. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* **110**:673-687.
- Hyttel P, Fair T, Avery B, Callesen H, Greve T. 1999. Transcriptional Activity and Ultrastructure in Bovine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals.* **34**:432-458.
- Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature.* **168**:697-698.
- Chang H, Suarez SS. 2011. Two distinct Ca²⁺ signaling pathways modulate sperm flagellar beating patterns in mice. *Biol Reprod.* **85**:296-305.

- Charrin S, le Naour F, Silvie O, Milhiet PE, Boucheix C, Rubinstein E. 2009. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem. J.* **420**:133-154.
- Charrin S, Jouannet S, Boucheix C, Rubinstein E. 2014. Tetraspanins at a glance. *Journal of cell science.* **127**:3641-3648.
- Chaube SK. 2001. Role of meiotic maturation regulatory factors in the meiotic competence of mammalian oocytes. *Health Popul Perspect Issues.* **24**:218-31.
- Chen H, Sampson NS. 1999. Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg alpha6beta1 integrin is the receptor for sperm fertilin beta. *Chem. Biol.* **6**:1-10.
- Chen L, Jiang JC, Dai XX, Fan HY. 2020. [Function and molecular mechanism of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in regulating oocyte meiotic maturation and ovulation]. *Sheng Li Xue Bao.* **72**:48-62.
- Chen MS, et al. 1999. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implication for murine fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:11830-11835.
- Chen W, Yang J, Li P. 2000. Effect of dexamethasone on the expression of p34cdc2 and cycline B1 in pig oocytes in vitro. *Molecular Reproduction and Development.* **56**:74-79.
- Liang CG, Su YQ, Fan HY, Schatten H, Sun QY. 2007. Mechanisms Regulating Oocyte Meiotic Resumption: Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase, *Molecular Endocrinology.* **21**:2037-2055.
- Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V, Mercurio S, Tolosano E. 2014. Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Frontiers in pharmacology.* **5**:61.
- Chmelíková E, Jeřeta M, Sedmíková M, Petr J, Tůmová L, Kott T, Lipovová P, Jílek F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote.* **18**:235-244.
- Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, Myles DG. 1998. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science.* **281**:1857-9.
- Cho WK, Stern S, Biggers JD. 1974. Inhibition effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *Journal of Experimental Zoology.* **187**:383-386.
- 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**:2614-22.
- Inoue N, Ikawa M, Okabe M. 2011. The mechanism of sperm-egg interaction and the involvement of IZUMO1 in fusion. *Asian J Androl.* **13**:81-87.

- Inoue M, Naito K, Nakazma T, Sato E. 1998. Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle break down in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. **58**:130-136.
- 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 and Tissue Research*. **340**:583-594.
- Ito C, Yamatoya K, Toshimori K. 2014. Equatorin-Related Subcellular and Molecular Events During Sperm Priming for Fertilization. Pages 85-95 in Sawada H, Inoue N, Iwano M, editors. *Sexual Reproduction in Animals and Plants*. Springer, Tokyo.
- Jablonka-Shariff A, Olson ML. 1997. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology*. **138**:460-468.
- Jankovičová J, et al. 2016. Characterization of tetraspanin protein CD81 in mouse spermatozoa and bovine gametes. *Reproduction*. **152**:785-793.
- Jankovičová J, et al. 2020a. Expression and distribution of CD151 as a partner of alpha6 integrin in male germ cells. *Scientific reports*. **10**:1-12.
- Jankovičová J, Neuerová Z, Sečová P, Bartóková M, Bubeníčková F, Komrsková K, Postlerová P, Antalíková J. 2020b. Tetraspanins in mammalian reproduction: spermatozoa, oocytes and embryos. *Med Microbiol Immunol*. **209**:407-425.
- Jankovičová J, et al. 2019. Detection of CD9 and CD81 tetraspanins in bovine and porcine oocytes and embryos. *International journal of biological macromolecules*. **123**:931-938.
- Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. 1992. *Journal of Biological Chemistry*. **267**:14519-14522.
- Jégou A, Ziyat A, Barraud-Lange V, Perez E, Wolf JP, Pincet F, Gourier C. 2011. CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108**:10946-51.
- Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*. **108**:4892-4896.
- Jones KT. 2005. Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction*. **130**:813-23.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru J., Tilly JL. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. **428**:145-150.
- Josefsberg LB, Galiani D, Lazar S, Kaufman O, Seger R, Dekel N. 2003. Maturation-promoting factor governs mitogen-activated protein kinase activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biology of Reproduction*. **68**:1282-1290.

- Kaji K, et al. 2000. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nature*. **24**:279-282.
- Kajiji S, Tamura RN, Quaranta V. 1989. A novel integrin (alpha E beta 4) from human epithelial cells suggests a fourth family of integrin adhesion receptors. *The EMBO journal*. **8**:673-680.
- Kamoun P. 2004. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids*. **26**:243-54.
- Kaneuchi T, Sartain CV, Takeo S, Horner VL, Buehner NA, Aigaki T, Wolfner MF. 2015. Calcium waves occur as *Drosophila* oocytes activate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1123**:791-796.
- Kim H, Moon C, Ahn M, Lee Y, Kim H, Kim S, Ha T, Jee Y, Shin T. 2005. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the porcine ovary during follicular development. *Journal of Veterinar Sciences*. **6**:97-101.
- King R, Deshaies R, Peters J, Kirschner M. 1996. How proteolysis drives the cell cycle. *Science*. **274**:1652-1658.
- Kingsbury TJ, Cunningham KW. 2000. A conserved family of calcineurin regulators. *Genes & development*. **14**:1595-1604.
- Kishimoto T. 2015. Entry into mitosis: a solution to the decades-long enigma of MPF. *Chromosoma*. **124**:417-428.
- Kitiyant Y, Chaisalee B, Pavasuthipaisit K. 2002. Evaluation of the acrosome reaction and viability in buffalo spermatozoa using two staining methods: the effects of heparin and calcium ionophore A23187. *International Journal of Andrology*. **25**:215-222.
- Kleiman DG, Thompson KV, Baer CK. 2010. *Wild mammals in captivity: principles and techniques for zoo management*. University of Chicago Press, Chicago.
- Kolluru GK, Shen X, Yuan S, Kevil CG. 2017. Gasotransmitter Heterocellular Signaling. *Antioxid Redox Signal*. **26**:936-960.
- Landim AF, Maziero R. 2014. Control of oocyte maturation. *Anim Reprod*. **11**:150-158
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. 1992. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**:6348-52.
- Lammerding J, Kazarov AR, Huang H, Lee RT, Hemler ME. 2003. Tetraspanin CD151 regulates $\alpha 6 \beta 1$ integrin adhesion strengthening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**:7616-7621.
- Lawrence Y, Whiteker M, Swann K. 1997. Spermegg fusion is the prelude to the initial Ca^{2+} increase at fertilization in the mouse. *Development*. **124**:233-241.
- Lefèvre B, Wolf JP, Ziyat A. 2010. Sperm-egg interaction: Is there a link between tetraspanin(s) and GPI-anchored protein(s)? *BioEssays*. **32**:143-152.

- Levy S, Shoham T. 2005. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol.* **5**:136-48.
- Li HM, Rao A, Hogan PG. 2011. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends in Cell Biology.* **21**:91-103.
- Lew DJ, Kornbluth S. 1996. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol.* **8**:795-804.
- 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.
- Li YH, Kang H, Xu YN, Heo YT, Cui XS, Kim NH, Oh JS. 2013. Greatwall Kinase Is Required for Meiotic Maturation in Porcine Oocytes. *Biology of reproduction.* **89**:53.
- Li J, et al. 2010. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci.* **107**:10280-4.
- Li L, et al. 2017. Single-cell RNA-Seq analysis maps development of human germline cells and gonadal niche interactions. *Cell Stem Cell.* **20**:858–873.e4.
- Liddington RC, Ginsberg MH. 2002. Integrin activation takes shape. *J. Cell Biol.* **158**:833-839.
- Lodish H, Berk A, Kaiser ChA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira P. 2008. *Molecular Cell Biology.* W. H. Freeman. New York.
- Lotus MT, et al. 2000. The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin $\alpha 6\beta 4$ and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *The Journal of cell biology.* **149**:969-982.
- Lowenstein CJ, Snyder SH. 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell.* **70**:705-7.
- Lozahic S, et al. 2000. CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple I 1 integrins and tetraspans. *Eur. J. Immunol.* **30**:900-907.
- Lu Q, Smith GD, Chen DY, Yang Z, Han ZM, Schatten H, Sun QY. 2001. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase is regulated by protein kinase C, cyclic 3 5 -adenosine monophosphate, and protein phosphatase modulators during meiosis resumption in rat oocytes. *Biology of Reproduction.* **64**:1444-1450.
- Lundy T, Smith P, O'connell A, Hudson NL, McNatty KP. 1999. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *Journal of Reproduction and fertility.* **115**:251-262.
- MacLennan M, et al. 2015. Oocyte development, meiosis and aneuploidy. *Semin Cell Dev Biol.* **45**:68-76.
- Maecker HT, Todd SC, Levy S. 1997. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J.* **11**:428-42.
- Maines MD. 1997. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **37**:517-54.

- Mainiero F, et al. 1995. Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: distinct beta 4 subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes. *The EMBO journal*. **14**:4470-4481.
- Maller JL. 1980. Regulation of oocyte maturation. *Curr Top Cell Regul*. **16**:271-311.
- Marlovits G, Tyson ChJ, Novak B, Tyson JJ. 1998. Modeling M-phase control in *Xenopus* oocyte extracts: the surveillance mechanism for unreplicated DNA *Biophysical Chemistry*. **72**:169-184.
- Marvan F, et al. 2017. *Morfologie hospodářských zvířat*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Mattioli M, Galeati G, Bacci ML, Barboni B. 1991. Changes in maturation-promoting activity in the cytoplasm of pig oocytes throughout maturation. *Mol Reprod Dev*. **30**:119-25.
- Mc Cann SM, Mastronardi C, Walczewska A, Karanth S, Rettori V, Yu WH. 2003. The role of nitric oxide (NO) in control of LHRH release that mediates gonadotropin release and sexual behavior. *Current Pharmacological Design*. **9**:381-390.
- McGinnis, L. K., Limback, S. D., Albertini, D. F. 2012. Signaling Modalities During Oogenesis in Mammals. *Current topics in developmental biology*. **102**:227-242.
- Mehlmann LM. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. **130**:791-9.
- Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, Knowles BB, Eppig JJ, Jaffe LA. 2004. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science*. **306**:1947-50.
- Meinecke B, Krschek C. 2003. MAPK/ERK kinase (MEK) signalling is required for resumption of meiosis in cultured cumulus - enclosed pig oocytes. *Zygote*. **11**:7-16.
- Miao YL, Zhang X, Zhao JG, Spate L, Zhao MT, Murphy CN, Schatten H. 2012. Effects of griseofulvin on in vitro porcine oocyte maturation and embryo development. *Environmental and molecular mutagenesis*. **53**:561-566.
- Miyado K. 2000. Requirement of CD9 on the Egg Plasma Membrane for Fertilization. *Science*, **287**:321-324.
- Miyado K, et al. 2008. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **105**:12921-12926.
- Mochida S, Hunt T. 2012. Protein phosphatases and their regulation in the control of mitosis. *EMBO reports*. **13**:197-203.
- Mochida S, Maslen SL, Skehel M, Hunt T. 2010. Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis. *Science*. **330**:1670-1673.
- Motlík J, Fulka J. 1976. Breakdown of germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology*. **198**:155-162.

- Motlík J, Fulka J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. **25**:87-96.
- Motlík J, Kubelka M. 1990. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. **27**:366-375.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*. Lange Medical Books. McGraw Hill.
- Murray AW, Kirschner M. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*. **339**:275-280.
- Mustafa AK, et al. 2009. H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal*. **2**:ra72.
- Nakanishi T, Ikawa M, Yamada S, Parvinen M, Baba T, Nishimune Y, Okabe M. 1999. Real-time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein. *FEBS Lett*. **449**:277-83.
- Nakazawa Y, Sato S, Naito M, Kato Y, Mishima K, Arai H, Tsuruo T, Fujita N. 2016. Tetraspanin family member CD9 inhibits Aggrus / podoplanin-induced platelet aggregation and suppresses pulmonary metastasis. *Blood*. **112**:1730-1740.
- Nankivell P, Williams H, McConkey C, Webster K, High A, MacLennan K, Senguvan B, Rabbitts P, Mehanna H. 2013. Tetraspanins CD9 and CD151, epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 expression predict malignant progression in oral epithelial dysplasia. *Br J Cancer*. **109**:2864-74.
- Nathan C, Xie QW. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *The Journal of Biological Chemistry*. **269**:13725-13728.
- Němeček D, Dvořáková M, Sedmíková M. 2017. Heme oxygenase/carbon monoxide in the female reproductive system: an overlooked signalling pathway. *Int J Biochem Mol Biol*. **8**:1-12.
- Němeček D, Chmelikova E, Petr J, Kott T, Sedmíková M. 2021. The effect of carbon monoxide on meiotic maturation of porcine oocytes. *PeerJ*. (e10636) DOI: 10.7717/peerj.10636.
- Nevoral J, et al. 2014. Dual effects of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. *PLoS One* (e99613) DOI: 10.1371/journal.pone.0099613.
- Nevoral J, et al. 2015. Endogenously produced hydrogen sulfide is involved in porcine oocyte maturation in vitro. *Nitric Oxide*. **51**:24-35.
- Nielsen M, Bøgh IB, Schmidt M, Greve T. 2001. Immunohistochemical localization of estrogen receptor- α in sex ducts and gonads of newborn piglets. *Histochemistry and Cell Biology*. **115**:521-526.
- Nishimura H, Cho C, Branciforte DR, Myles DG, Primakoff P. 2001. Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol*. **233**:204-13.

- Nishimura H, Kim E, Nakanishi T, Baba T. 2004. Possible function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. *J Biol Chem.* **279**: 34957-62.
- Norris RP, et al. 2009. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development.* **136**:1869-78.
- Nurse P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature.* **344**:503-508.
- Oh JS, Han SJ, Conti M. 2010. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *J Cell Biol.* **188**:199-207.
- Ohnami N, et al. 2012. CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biology open.* **1**:640-647.
- Okunade GW, et al. 2004. Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J. Biol. Chem.* **279**:33742-33750.
- Olson LM, Jablonka-Shariff A, Beltsos AN. 2000. Ovarian nitric oxide: A modulator of ovulation and oocyte maturation. Pages 243-254 in Adashi EY, editor. *Ovulation-Evolving scientific and clinical concepts.* Springer-Verlag, New York.
- Pae HO, Lee YCh, Jo EK, Chung HT. 2009. Subtle Interplay of Endogenous Bioactive Gases (NO, CO and H₂S) in Inflammation. *Archives of Pharmacal Research.* **32**:1155-1162.
- Pan B, Li J. 2019. The art of oocyte meiotic arrest regulation. *Reprod Biol Endocrinol.* **17**:8.
- Parrington J, Arnoult C, Fissore RA. 2019. The eggstraordinary story of how life begins. *Molecular reproduction and development.* **86**:4-19.
- Pepling ME. 2006. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis.* **44**:622-32.
- Petersen TS, Stahlhut M, Andersen CY. 2015. Phosphodiesterases in the rat ovary: effect of cAMP in primordial follicles. *Reproduction.* **150**:11-20.
- Petr J, Rajmon R, Lánská V, Sedmíková M, Jílek F. 2005. Nitric-oxide-dependent activation of pig oocytes: the role of calcium. *Molecular and Cellular Endocrinology.* **242**:16-22.
- Prasad S, Tiwari M, Pandey AN, Shrivastav TG, Chaube SK. 2016. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. *Journal of biomedical science.* **23**:1-5.
- Primakoff P, Myles DG. 2002. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science.* **296**:2183-2185.
- Procházka R, Motlík J, Fulka J. 1989. Activity of maturation promoting factor in pig oocytes after microinjection and serial transfer of maturing cytoplasm. *Cellular Differ Development.* **27**:175-181.
- Pirino G, Wescott MP, Donovan PJ. 2009. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle.* **8**:665-670.

- Ramírez-Ramírez D, Salgado-Lucio ML, Roa-Espitia AL, Fierro R, González-Márquez H, Cordero-Martínez J, Hernández-González EO. 2019. Rac1 is necessary for capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *J. Cell. Biochem.* **121**:2864-2876.
- Reddy VRK, Rajeev SK, Gupta V. 2003. $\alpha 6\beta 1$ Integrin is a potential clinical marker for evaluating sperm quality in men. *Fertility and Sterility.* **79**:1590-1596.
- Reis A, Chang HY, Levasseur M, Jones KT. 2006. APC^{Cdh1} activity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division. *Nat Cell Biol.* **8**:539-540.
- Pandey AN, Tripathi A, Premkumar KV, Shrivastav TG, Chaube SK. 2010. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. *J Cell Biochem.* **111**:521-8.
- Reiss K, Saftig P. 2009. The ‘a disintegrin and metalloprotease’ (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol.* **20**:126-37.
- Richard FJ, Tsafiriri A, Conti M. 2001. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. *Biol Reprod.* **65**:1444-51.
- Richardson L, et al. 2014. EMAGE mouse embryo spatial gene expression database: 2014 update. *Nucleic Acids Res.* **42**:D835-D844.
- Rizzo P, Raffone E, Benedetto V. 2010. Effect of the treatment with myo-inositol plus folic acid plus melatonin in comparison with a treatment with myo-inositol plus folic acid on oocyte quality and pregnancy outcome in IVF cycles. A prospective, clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* **14**:555-61.
- Roberts KP, Johnston DS, Nolan MA, Wooters JL, Waxmonsky NC, Piehl LB, Ensrud-Bowlin KM, Hamilton DW. 2007. Structure and function of epididymal protein cysteine-rich secretory protein-1. *Asian J Androl.* **9**:508-14.
- Romanska HM, Berditchevski F. 2011. Tetraspanins in human epithelial malignancies. *J. Pathol.* **223**:4-14.
- Rosselli M, Imthurm B, Macas E, Keller PJ, Dubey RK. 1994. Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol-mediated NO release. *Biochem Biophys Res Commun.* **202**:1543-1552.
- Rozinek J, Rajmon R, Petr J, Rohlík J, Jeřeta M, Sedmíková M, Řehák D, Jílek F. 2006. Ultrastructural localisation of calcium deposits in pig ovarian follicles. *Animal Reproduction Science.* **91**:123-132.
- Rubinstein E, Charrin S, Tomlinson MG. 2013. Organisation of the Tetraspanin Web. Pages 47-90 in Berditchevski F, Rubinstein E, editors. *Tetraspanins. Proteins and Cell Regulation.* Springer, Dordrecht.
- Rubinstein E, Ziyat A, Wolf JP, Le Naour F, Boucheix C. 2006. The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Semin Cell Dev Biol.* **17**:254-263.
- 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**:351-358.

- Runge KE, Evans JE, He ZY, Gupta S, McDonald KL, Stahlberg H, Primakoff P, Myles DG. 2007. Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Dev Biol.* **304**:317-25.
- Rusnak F, Mertz P. 2000. Calcineurin: Form and function. *Physiological Reviews.* **80**:1483-1521.
- Ryter SW, Alam J, Choi AM. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev.* **86**:583-650.
- Ryter SW, Choi AM. 2016. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Transl Res.* **167**:7-34.
- Sabetian S, Shamsir MS, Naser MA. 2014. Functional features and protein network of human sperm-egg interaction. *Systems biology in reproductive medicine.* **60**:329-337.
- Sánchez F, Smitz J. 2012. Molecular control of oogenesis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* **1822**:1896-1912.
- Sanchez-Mateos P, Cabanas C, Sanchez-Madrid F. 1996. Regulation of integrin function. *Semin. Cancer Biol.* **7**:99-109.
- Santos RR, Schoevers EJ, Roelen BA. 2014. Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. *Reproductive Biology and Endocrinology.* **12**:1-12.
- 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**:4985-4990.
- Sawyer HT, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, McNatty KP. 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of Reproduction.* **66**:1134-1150.
- Sebkova N, Ded L, Vesela K, Dvorakova-Hortova K. 2014. Progress of sperm IZUMO1 relocation during spontaneous acrosome reaction. *Reproduction.* **147**:231-240.
- Secrist H, Levy S, DeKruyff RH, Umetsu DT. 1996. Ligation of TAPA-1 (CD81) or major histocompatibility complex class II in co-cultures of human B and T lymphocytes enhances interleukin-4 synthesis by antigen-specific CD4 + T cells. *Eur. J. Immunol.* **26**:1435-1442.
- 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. *Journal of Biological Chemistry.* **276**:40055-40064.
- Sengoku K, Takuma N, Horikawa M, Tsuchiya K, Komori H, Sharifa D, Tamate K, Ishikawa M. 2001. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. *Molecular Reproduction and Development.* **58**:262-268.
- Serru V, Le Naour F, Billard M, Azorsa DO, Lanza F, Boucheix C, Rubinstein E. 1999. Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1,

- CD151/ $\alpha 6\beta 1$) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochemical journal*. **340**:103-111.
- Sharma RK, Chowdhury S. 1998. Ultrastructure changes in oocytes of caprine antral follicles. *Indian Journal of Animal Sciences*. **68**:332-336.
- Shibuya H, Watanabe Y. 2014. The meiosis-specific modification of mammalian telomeres. *Cell Cycle*. **13**:2024-8.
- Shiina N, Moriguchi T, Ohta K, Gotoh Y, Nishida E. 1992. Regulation of a major microtubule-associated protein by MPF and MAP kinase. *The EMBO Journal*. **11**:3977-3984.
- Shuhaibar LC, Egbert JR, Edmund AB, Uliasz TF, Dickey DM, Yee SP, Potter LR, Jaffe LA. 2016. Dephosphorylation of juxta membrane serines and threonines of the NPR2 guanylyl cyclase is required for rapid resumption of oocyte meiosis in response to luteinizing hormone. *Dev Biol*. **409**:194-201.
- Schaeffer HJ, Weber MJ. 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and cellular biology*. **19**:2435-2444.
- Schmidt A, Rauh NR, Nigg EA, Mayer TU. 2006. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *Journal of Cell Science*. **119**:1213-1218.
- Schmitt A, Nebreda AR. 2002. Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *J Cell Sci*. **115**:2457-9.
- Schuh K, et al. 2004. Plasma membrane Ca^{2+} ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J. Biol. Chem*. **279**:28220-6.
- Schwartz MA. 1992. Transmembrane signalling by integrins. *Trends Cell Biol*. **2**:304-308.
- Simon-Assmann P, Duclos B, Orian-Rousseau V, Arnold C, Mathelin C, Engvall E, Kedinger M. 1994. Differential expression of laminin isoforms and $\alpha 6\beta 4$ integrin subunits in the developing human and mouse intestine. *Dev. Dyn*. **201**:71-85.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality, *Theriogenology*. **65**:126-136.
- Smith GD, Sadhu A, Mathies S, Wolf DP. 1998. Characterization of protein phosphatases in mouse oocytes. *Developmental biology*. **204**:537-549.
- Sousa M, Barros A, Silva J, Tesarik J. 1997. Developmental changes in calcium content of ultrastructurally distinct subcellular compartments of preimplantation human embryos. *Molecular human reproduction*. **3**:83-90.
- Srilatha B, Hu LX, Adaikan GP, Moore PK. 2009. Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. *J Sex Med*. **6**:1875-1884.
- Stefanelli C, Pignatti C, Tantini B, Stanić I, Bonavita F, Muscari C, Caldarella CM. 1999. Nitric oxide can function as either a killer molecule or an antiapoptotic effector in cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. **1450**:406-413.

- Stein KK, Primakoff P, Myles D. 2004. Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *J Cell Sci.* **117**:6269-6274.
- Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. 2003. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem. Sci.* **28**:106-112.
- Stojkovic M, Motlík J, Kölle S, Zakchartchenko V, Alberio R, Sinowatz F, Wolf E. 1999. Cell-cyclo control and oocyte maturation: Review of literature. *Reproduction in Domestic Animals.* **34**:335-342.
- Stricker SA. 1999. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Developmental biology.* **211**:157-176.
- Stuehr DJ. 1999. Mammalian nitric oxide synthase. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics.* **1411**:217-230.
- Su Y, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ. 2008. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development.* **135**:111-21.
- Sun XS, Liu Y, Yue KZ, Ma SF, Tan JH. 2004. Changes in germinal vesicle (GV) chromatin configurations during growth and maturation of porcine oocytes. *Molecular reproduction and development.* **69**:228-234.
- Sun QY, Nagai T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development.* **49**:347-359.
- Swain JE, Wang X, Saunders TL, Dunn R, Smith GD. 2003. Specific inhibition of mouse oocyte nuclear protein phosphatase-1 stimulates germinal vesicle breakdown. *Molecular reproduction and development.* **65**:96-103.
- Swann K. 1993. The soluble sperm oscllogen hypothesis. *Zygote.* **1**:273-276.
- Swann K, Larman MG, Saunders CM, Lai FA. 2004. The cytosolic sperm factor that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLC ζ . *Reproduction.* **127**:431-439.
- 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.
- Tan JH, Wang H, Sun X, Liu Y, Sui H, Zhang J. 2009. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Molecular Human Reproduction.* **15**:1-9.
- Tao Y, Fu Z, Zhang M, Xia G, Yang J, Xie H. 2004. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology.* **222**:93-103.
- Tash JS, Means AR. 1983. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod.* **28**:75-104.

- Taylor CT, Bujan MM, Kingsland CR. 1994. Inhibition of human spermatozoon-oocyte interaction in vitro by monoclonal antibodies to CD46 (membrane cofactor protein). *Human Reproduction*. **9**:907-911.
- Thibault C, Szollosi D, Gerard M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev*. **27**:865-896.
- Tichovská, H. 2011. Vliv oxidu dusnatého na meiotickou kompetenci prasečích oocytů [MSc. Thesis]. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- Tiwari M, Gupta A, Sharma A, Prasad S, Pandey AN, Yadav PK, Pandey AK, Shrivastav TG, Chaube SK. 2018. Role of Mitogen Activated Protein Kinase and Maturation Promoting Factor During the Achievement of Meiotic Competency in Mammalian Oocytes. *J Cell Biochem*. **119**:123-129.
- Tiwari M, Chaube SK. 2017a. Maturation promoting factor destabilization mediates human chorionic gonadotropin induced meiotic resumption in rat oocytes. *Dev Growth Differ*. **59**:603-14.
- Tiwari M, Chaube SK. 2017b. Carbenoxolone reduces cyclic nucleotides level, destabilizes maturation promoting factor and induces meiotic exit from diplotene arrest in rat cumulus oocytes complexes cultured in vitro. *Biomed Pharmacother*. **94**:219-30.
- Tiwari M, Chaube SK. 2017c. Increase of reactive oxygen species associates with the achievement of meiotic competency in rat oocytes cultured in vitro. *React Oxyg Species*. **4**:320-35.
- Tomczuk M, et al. 2003. Role of multiple beta1 integrins in cell adhesion to the disintegrin domains of ADAMs 2 and 3. *Exp. Cell Res*. **290**:68-81.
- Tong C, Fan HY, Chen DY, Song, XF, Schatten H, Sun QY. 2003. Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocyte: microtubule organization, asymmetric division and metaphase II arrest. *Cell Research*. **13**:375-385.
- Tripathi A, Kumar KV, Chaube SK. 2010. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *J Cell Physiol*. **223**:592-600.
- Tosti E, Boni R. 2004. Electrical events during gamete maturation and fertilization in animals and humans. *Human reproduction update*. **10**:53-65.
- Touny LH, Banerjee PP. 2006. Identification of both Myt-1 and Wee-1 as necessary mediators of the p21-independent inactivation of the cdc-2/cyclin B1 complex and growth inhibition of TRAMP cancer cells by genistein. *Prostate*. **66**:1542-1555.
- Tripathi A, Kumar KV, Chaube SK. 2010. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *J Cell Physiol*. **223**:592-600.
- Tůmová L, Chmelíková E, Žalmanová T, Kučerová-Chrpová V, Romar R, Dvořáková M, Hošková K, Petr J. 2016. Calcineurin role in porcine oocyte activation. *Animal*. **10**:1998-2007.

- Tunquist BJ, Maller JL. 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Development*. **17**:683-710.
- Ueda Y, Yamaguchi R, Ikawa M, Okabe M, Morii E, Maeda Y, Kinoshita T. 2007. PGAP1 knock-out mice show otocephaly and male infertility. *J Biol Chem*. **282**:30373-80.
- Uhlen M, et al. 2015. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. **347**:1260419.
- Vaccari S, Weeks JL 2nd, Hsieh M, Menniti FS, Conti M. 2009. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod*. **813**:595-604.
- Van Voorhis BJ, Moore K, Strijbos PJJ, Nelson S, Baylis SA, Grzybicki D, Weiner CP. 1995. Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. *European Journal of clinical Investigation*. **96**:2719-2726.
- Wakai T, Fissore RA. 2013. Ca²⁺ homeostasis and regulation of ER Ca²⁺ in mammalian oocytes/eggs. *Cell Calcium*. **53**:63-67.
- Wang RUI. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal*. **16**:1792-1798.
- Wang R. 2004. *Signal Transduction and the Gasotransmitters: NO, CO and H₂S in Biology and Medicine*. Humana Press, New Jersey.
- Wang S, et al. 2008. PDE5 modulates oocyte spontaneous maturation via cGMP-cAMP but not cGMP-PKG signaling. *Front Biosci*. **13**:7087-95.
- Wang X1, Swain JE, Bollen M, Liu XT, Ohl DA, Smith GD. 2004. Endogenous regulators of protein phosphatase-1 during mouse oocyte development and meiosis. *Society for Reproduction and Fertility*. **128**:493-502.
- Wang S, Zickler D, Kleckner N, Zhang L. 2015. Meiotic crossover patterns: obligatory crossover, interference and homeostasis in a single process. *Cell cycle*. **14**:305-314.
- Wassarman PM. 1988. The mammalian ovum. Pages 70-102 in Knobil E, Neil J, editors. *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nat. Cell Biol*. **3**:E59-E64.
- Webb SE, Miller AL. 2003. Calcium signalling during embryonic development. *Nature reviews Molecular cell biology*. **4**:539-551.
- Whitaker M. 2006. Calcium at fertilization and in early development. *Physiological reviews*. **86**:25-88.
- Wolf DP, Zelinski-Wooten M. 2001. *Assisted Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals*. Human Press. Totowa, New Jersey.
- Wu L, Wang R. 2005. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev*. **57**:585-630.

- Yamauchi J, Miyazaki T, Iwasaki S, Kishi I, Kuroshima M, Tei C, Yoshimura Y. 1997. Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. *Endocrinology*. **138**:3630-3637.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. Pages 189-317 in Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York.
- Yang H, Bhat GK, Wadley R, Wright KL, Chung BM, Whittaker JA, Dharmarajan AM, Sridaran R. 2003. Gonadotropin-releasing hormone-agonist inhibits synthesis of nitric oxide and steroidogenesis by luteal cells in the pregnant rat. *Biology of reproduction*. **68**:2222-2231.
- Yauch RL, Berditchevski F, Harler MB, Reichner J, Hemler ME. 1998. Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin $\alpha 3\beta 1$ with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and may regulate cell migration. *Mol. Biol.* **9**:2751-2765.
- Yauch RL, Kazarov AR, Desai B, Lee RT, Hemler ME. 2000. Direct extracellular contact between integrin $\alpha 3\beta 1$ and TM4SF protein CD151. *J Biol Chem*. **275**:9230-9238.
- Yu K, et al. 2019. Melatonin Reduces Androgen Production and Upregulates Heme Oxygenase-1 Expression in Granulosa Cells from PCOS Patients with Hypoestrogenia and Hyperandrogenia. *Oxid Med Cell Longev*. (8218650) DOI: 10.1155/2019/8218650.
- Yunta M, Lazo PA. 2003. Apoptosis protection and survival signal by the CD53 tetraspanin antigen. *Oncogene*. **22**:1219-1224.
- Yurewicz EC, Sacco AG, Subramanian, MG. 1987. Structural characterization of the Mr = 55,000 antigen (ZP3) of porcine oocyte zona pellucida. Purification and characterization of alpha- and beta-glycoproteins following digestion of lactosaminoglycan with endo-beta-galactosidase. *Journal of Biological Chemistry*. **262**:564-71.
- Zenclussen ML, Jensen F, Rebelo S, El-Mousleh T, Casalis PA, Zenclussen AC. 2012. Heme oxygenase-1 expression in the ovary dictates a proper oocyte ovulation, fertilization, and corpora lutea maintenance. *Am J Reprod Immunol*. **67**:376-82.
- Zeng P, Wang YH, Si M, Gu JH, Li P, Lu PH, Chen MB. 2017. Tetraspanin CD151 as an emerging potential poor prognostic factor across solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. **8**:5592-5602.
- Zhang XA, Kazarov AR, Yang X, Bontrager AL, Stipp CS, Hemler ME. 2002. Function of the Tetraspanin CD151- $\alpha 6\beta 1$ Integrin Complex during Cellular Morphogenesis. *Mol. Biol. Cell*. **13**:1-11.
- Zhang X, Khimji I, Shao L, Safaee H, Desai K, Keles HO, Demirci U. 2012. Nanoliter droplet vitrification for oocyte cryopreservation. *Nanomedicine*. **7**:553-564.
- Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. 2010. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*. **330**:366-9.

- Zhang Y, Zhang Z, Xu XY, Li XS, Yu M, Yu AM, Zong ZH, Yu BZ. 2008. Protein kinase a modulates Cdc25B activity during meiotic resumption of mouse oocytes. *Dev Dyn.* **237**:3777-3786.
- Zhao H, Chan S-J, Ng Y-K, Wong PT-H. 2013. Brain 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST): cellular localization and downregulation after acute stroke. *PLoS ONE* 8 (e67322) DOI: 10.1371/journal.pone.0067322.
- 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**:416-424.
- Zoller M. 2009. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer.* **9**:40-55.
- Zuccotti M, Piccinelli A, Marziliano N, Mascheretti S, Redi CA. 1994. Development and loss of the ability of mouse oolemma to fuse with spermatozoa. *Zygote.* **2**:333-9.