

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory



Aneta Broulíková

Metody studia interakce spermie a vajíčka u savců
Methods for studying sperm-egg interaction in mammals

Bakalářská práce

Vedoucí práce

RNDr. Veronika Kraus, Ph.D.

Konzultant práce

doc. RNDr. Kateřina Komrsková, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 04.04.2024

Aneta Broulíková

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Veronice Kraus, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a odborné vedení při psaní této práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině, za obrovskou podporu po dobu celého mého studia a v neposlední řadě mému dědečkovi, který mi ukázal krásy biologie.

Abstrakt

Zaměření na porozumění mechanismů interakce mezi spermii a vajíčkem u savců je klíčové pro porozumění tajemství reprodukce a oplození. Analýza klíčových fází těchto procesů zahrnuje studium chemických signálů a proteinů, které ovlivňují vzájemnou přitažlivost spermií a vajíčka, a následně umožňují úspěšnou fúzi obou buněk. Cílem této práce je analyzovat metody používané ke studiu těchto interakcí s důrazem na účast proteinů, jako jsou tetraspaniny, fertiliny, MAIA a další, které se na interakci či fúzi gamet podílejí. Metody používané na studium interakce gamet zahrnují obrazové techniky jako mikroskopii a fluorescenční značení, biochemické analýzy a nově i pokročilé metody jako je genetická manipulace. Zvolení správné metody pro identifikaci a charakterizaci proteinů klíčových pro interakci spermií a vajíčka, je rozhodující pro pochopení molekulárních mechanismů za procesem oplození. Tato práce se zaměřuje na přehled moderních metodik, které umožňují zkoumat složité interakce mezi spermii a vajíčkem na molekulární úrovni, a to hlavně na metody využívající se na přípravu geneticky modifikovaných organismů anebo metody blokující vazbu mezi gametami. Studium interakce spermií a vajíčka u savců je klíčové, protože rozšiřuje nejen naše povědomí o reprodukční biologii, ale také otevírá perspektivy pro potenciální léčby neplodnosti a vylepšení reprodukčních technologií.

Klíčová slova: spermie, oocyt, oplození, GMO, blokace vazby

Abstract

Focusing on understanding the mechanisms of sperm-egg interaction in mammals is crucial for understanding the mysteries of reproduction and fertilization. The analysis of key phases of these processes involves the study of chemical signals and proteins that influence the mutual attraction of sperm and egg, and subsequently allow the successful fusion of these two cells. This thesis aims to analyze the methods used to study these interactions, with an emphasis on emphasizing the involvement of proteins such as tetraspanins, fertilins, MAIA, and others playing a role in the interaction or fusion of gametes. Methods used to study gamete interaction include imaging techniques such as microscopy and fluorescent labeling, biochemical analyses, and more recently, advanced methods such as genetic manipulation. Choosing the right method to identify and characterize the key proteins engaging in sperm-egg interaction is critical for understanding the molecular mechanisms behind the fertilization process. This work focuses on a review of modern methodologies that allow to investigation of the complex interactions between sperm and egg at the molecular level, mainly methods used to prepare genetically modified organisms or methods that block the binding between gametes. Studying sperm-egg interactions in mammals is crucial because these findings expand our understanding of reproductive biology and open perspectives for potential fertility treatments and improvements in reproductive technologies.

Key words: sperm, oocyte, fertilization, GMO, binding blocking

Seznam použitých zkratek

PGC	primordiální germatické buňky
IP3	inositol-1,4,5-trifosfát
mAb	monoklonální protilátka, z angl. <i>monoclonal antibody</i>
PM	plazmatická membrána
ZP	<i>zona pellucida</i>
AMP	adenosinmonofosfát
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
KO	<i>knock-out</i>
PKA	proteinkináza A
PTK	protein tyrozinkináza
ZP1	glykoprotein zony pellucidy 1
ZP2	glykoprotein zony pellucidy 2
ZP3	glykoprotein zony pellucidy 3
OAM	vnější akrozomová membrána, z angl. <i>outer acrosomal membrane</i>
IAM	vnitřní akrozomová membrána, z angl. <i>inner acrosomal membrane</i>
ERV	endogenní retroviry
GMO	geneticky modifikovaný organismus
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s hmotností spektrometrií
RT-PCR	<i>Real-time</i> polymerázová řetězová reakce.
G418	analog neomycin sulfátu
COCs	Komplexy kumulus-oocytů
K-ras	Kirsten rat sarcoma virový onkogenový homolog

Obsah

1	Úvod	1
2	Průběh interakce gamet	2
2.1	Gametogeneze	2
2.2	Morfologie gamet.....	4
2.3	Změny na gametách před oplozením.....	5
2.3.1	Maturace, kapacitace a akrozomální reakce spermií.....	5
2.4	Studium vazby gamet	8
2.4.1	Vazba na <i>zona pellucida</i>	9
2.4.2	Fúze gamet	9
3	Závěr	16
5	Reference	17

1 Úvod

Proces interakce je zásadním krokem v průběhu oplození, který představuje klíčový okamžik spojení dvou gamet a následný vznik nového jedince. Jedná se o složitý mechanismus, který zahrnuje specifické proteiny, jejichž úloha při tomto procesu je nezastupitelná. Mezi důležité proteiny zapojené do interakce spermie a vajíčka spadají tetraspaniny, protein MAIA, Izumo a fertiliny, nazývané též ADAM proteiny. Tyto proteiny hrají klíčovou roli při rozpoznávání a navázání spermie na povrch vajíčka. CD9 a CD81 jsou proteiny, které patří do skupiny tetraspaninů, které se nacházejí na povrchu oocytů a spermií a podílejí se na formování proteinových komplexů nezbytných pro interakci gamet. Protein MAIA zajišťuje stabilní interakci mezi proteiny Izumo a Juno, což je nezbytné pro fúzi gamet. ADAM proteiny jsou enzymy, které mají klíčovou úlohu při adhezi a interakci gamet a následném umožnění průniku spermie do vajíčka.

Důležitost těchto proteinů v procesu oplození byla prokázána díky metodám používaných při studiu interakce spermie a vajíčka. Mezi hlavní metody používané v současné době patří molekulární genetika, biochemické analýzy a mikroskopické techniky. Molekulární genetika umožňuje studium struktury a funkce genů zapojených do interakce spermie a vajíčka, zatímco biochemické analýzy umožňují detailní zkoumání proteinových interakcí. Mikroskopické techniky pak umožňují vizualizaci samotného procesu oplození a interakce gamet na buněčné úrovni. Tato bakalářská práce diskutuje současnou problematiku studia interakce spermie a vajíčka u savců, s důrazem na metody o studiu gamet, a to hlavně za využití GMO (geneticky modifikovaný organismus) a blokace vazby, které představují účinný nástroj pro studium interakce spermie a vajíčka. Porozumění interakcím mezi proteiny spermie a vajíčka může vést nejen k pochopení mechanismů ukryvajících se za procesem oplození, ale také k identifikaci nových terapeutických cílů pro léčbu neplodnosti a vytvoření inovativních metod asistované reprodukce.

Tato práce bude postavena na literární rešerši vědeckých studií a přístupů v oblasti studia reprodukce savců. V průběhu této práce budou zkoumány nejen metody samotné, ale také dosažené výsledky, přínosy, omezení a podněty, které vedly ke studiu interakce gamet.

2 Průběh interakce gamet

2.1 Gametogeneze

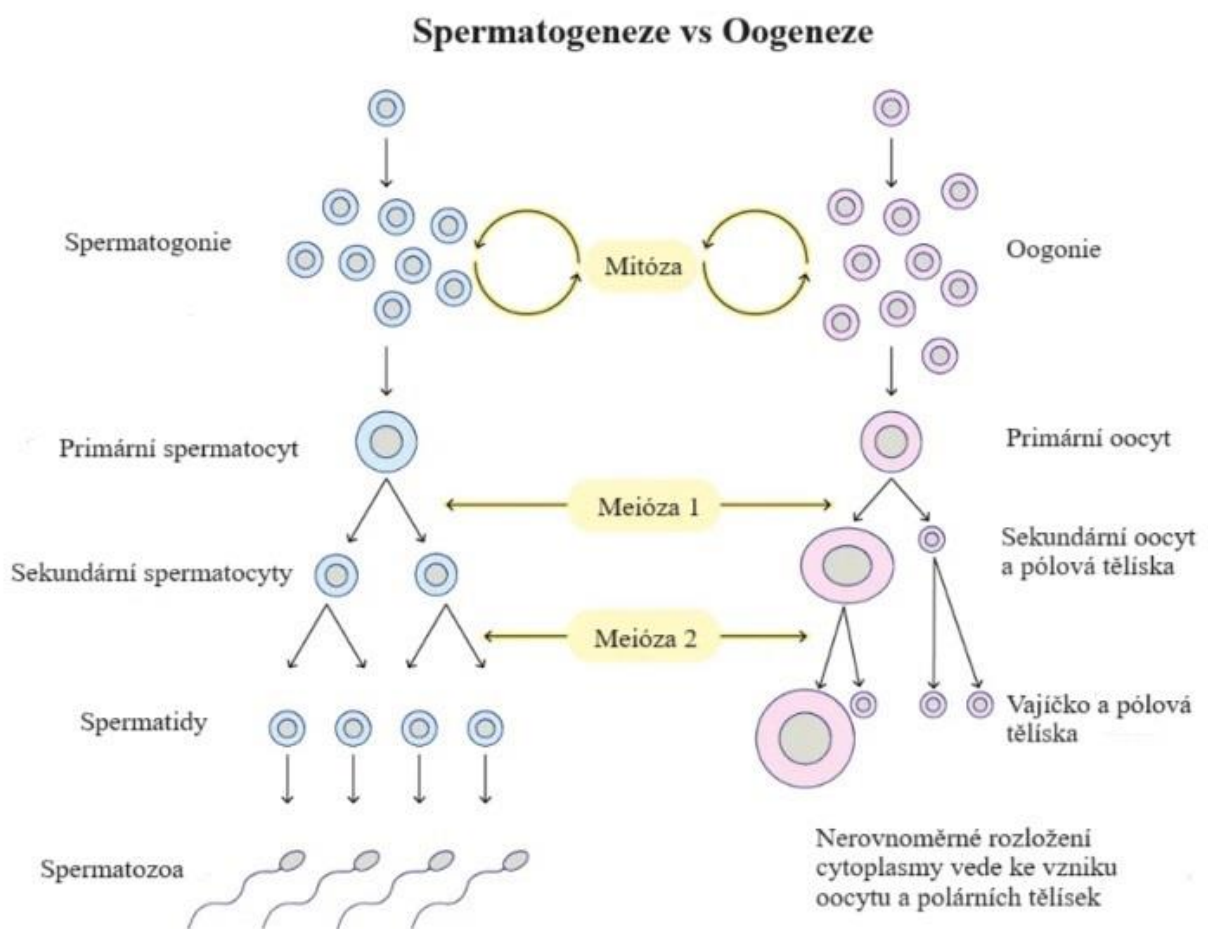
Lidské tělo je tvořeno triliony somatických buněk, které se procesem mitózy dělí na identické dceřiné buňky. Gamety se ale dělí jiným procesem, a to meiózou, jejímž výsledkem je vznik čtyř dceřiných buněk, ať už spermie nebo oocyty, skrz redukční dělení, za výsledku vzniku haploidních komplementárních chromozomů v každé z gamet (Gottlieb et al., 2023). *

Oocyty vznikají procesem oogeneze, který je zahájen již v průběhu vývoje plodu. Během oogeneze dochází ke dvěma klíčovým fázím, které propojují stav primárního oocyty s formací sekundárního oocyty. První fází je fáze růstu neboli proliferace, při které dochází k intenzivnímu mitotickému dělení primordiálních germinálních buněk (PGCs), a tím vznikají oogonie. Tato populace buněk pak přechází do druhé fáze, známé jako fáze zrání či meiotická fáze.

V průběhu fáze zrání se primární oocyty postupně transformují na oocyty sekundární, známé též jako dospělé oocyty. Během prvního dělení meiotické fáze dochází k redukci chromozomového počtu, a tak vznikají dvě buněčné jednotky, z nichž jedna je sekundární oocyt. Tato buněčná transformace představuje klíčový mezník v procesu oogeneze, kdy se primární oocyt přeměňuje na strukturu připravenou na možné oplození.

Takto propojené fáze oogeneze zajišťují plynulý přechod od primárního oocyty k sekundárnímu oocyty, přičemž každá fáze představuje důležitý krok směrem k vytvoření zralého oocyty, který je následně připraven k procesu oplození (Waters et al., 2022) *. Oocyty dosáhnou plné aktivační schopnosti pouze před ovulací, kdy opětovně vstoupí do meiózy. To znamená, že oocyty jsou zastavené v profázi I v druhém meiotickém dělení a v průběhu ovulačního cyklu dochází k obnovení meiózy pomocí folikul stimulačního hormonu gonadotropinu a luteinizačního hormonu, což stimuluje růst a vývoj folikulů, a následně spustí meiózu až do fáze metafáze II (Su et al., 2012). Což se může vyvíjet dvěma směry. Buď dochází k oplození vajíčka, a dokončení meiózy, nebo k oplození nedojde a oocyt zanikne a je vyloučen během menstruačního cyklu. Po oplození nastávají změny, které vedou k rozvoji aktivační kompetence, což umožňuje zralému oocyty vyvolat sekreci kortikálních granul a dokončení procesu meiózy. (Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 2005) *.

Proces vzniku spermie se nazývá spermatogeneze, která probíhá ve třech krocích. Nejdříve dojde k mitotickému pomnožení spermatogonií, následně se meiotickým dělením z diploidních buněk stanou haploidní a dojde k rozdělení, dokud nevznikne kulatá forma spermatid. Finální krok zahrnuje produkci spermatozoí, morfologicky zralých spermatických buněk, v procesu spermiogeneze (Suede et al.,2023) *. Na obrázku 1 je vidět rozdíl vzniku gamet. Spermatogenezí vznikají 4 stejné gamety, kdežto při oogenezi vzniká jedna gameta a 3 pólová tělíska, což jsou buňky, které vznikají jako vedlejší produkt při dělení oocytu a obvykle podléhají apoptóze.

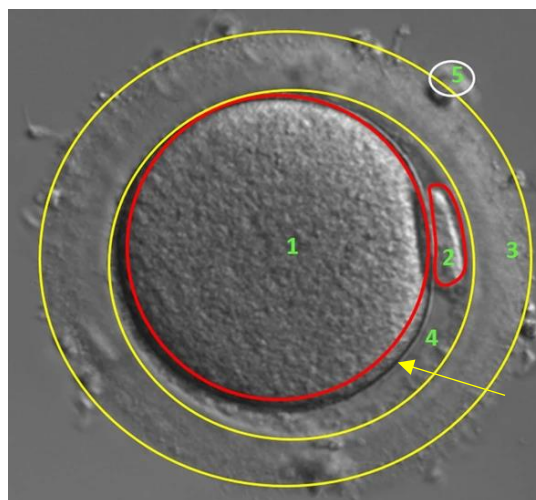


Obrázek 1: Porovnání průběhu spermatogeneze a oogeneze (upraveno podle Jack Westin, <https://jackwestin.com/resources/mcat-content/reproductive-system/gametogenesis-by-meiosis>)

2.2 Morfologie gamet

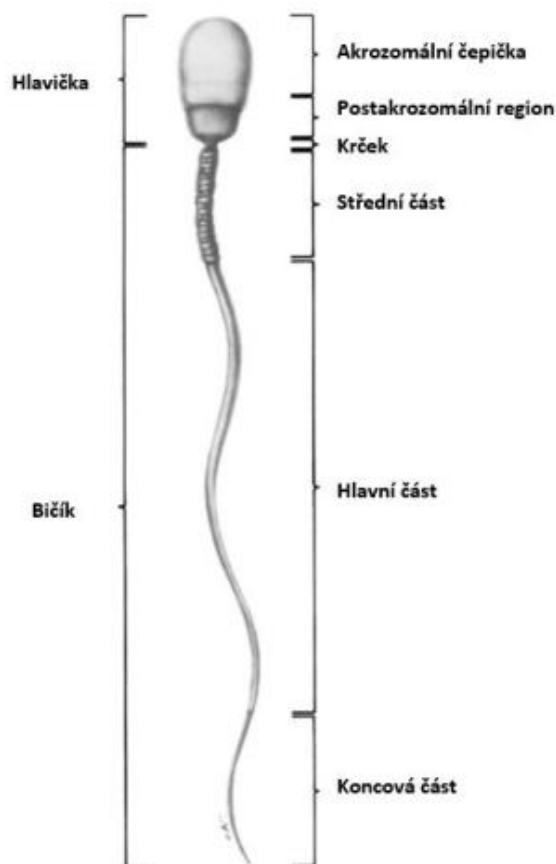
Samičí pohlavní buňkou, která je také největší buňkou lidského těla, je oocyt, jehož stavbu můžeme vidět na obrázku 2. Oocyt je nositelem samičí DNA a je největší buňkou těla. Kumulární buňky, obklopující oocyt, plní ochrannou roli, poskytují výživu, signalizují a regulují proces oplození (Turathum et al., 2007). Nejvnitřnější vrstvou kumulárních buněk jsou *corona radiata*, které jsou převrstvené do glykoproteinového obalu vajíčka, který se nazývá *zona pellucida* (ZP), jež má za úkol před oplozením zajistit kontakt gamet a po oplození je jejím úkolem blokovat polyspermii (Křížanovská et al., 2002, Tagosz et al., 2021).

ZP obklopuje cytoplazmatickou membránu a skládá se ze tří či čtyř vazebných glykoproteinů ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4. Každý z těchto proteinů má svojí funkci. ZP1 propojuje ZP2 a ZP3, ZP2 má za funkci udržet akrozomálně zreagované spermie na *zona pellucida*, tvoří sekundární vazby spermie-vajíčko a u myši a dalších živočichů vyvolává akrozomální reakci. ZP3 umožňuje primární vazbu spermií na vajíčko a ZP4 vyvolává akrozomální reakci (Jin et al., 2011). ZP4 se vyskytuje u člověka, prasat, krav či u psů. U myši je ZP4 pseudogen, tudíž u něj nedochází k expresi (Tagosz et al., 2021). Pod ZP se nachází oolema, neboli plazmatická membrána vajíčka, a má na svém povrchu proteiny, které se podílejí na interakci a fúzi gamet (Jiménez-Movilla, et al., 2021). Oolema je syntetizována oocytem během růstové fáze, čímž je oocyty poskytována nejen ochrana mechanická, ale i ochrana před již zmíněnou polyspermií. Pod oolemou se nacházejí na membránu vázané receptory, které po proniknutí spermie do oocyty mění vlastnosti ZP (Křížanovská et al., 2002, Tagosz et al., 2021).



Obrázek 2: Stavba oocyty: 1 – cytoplasma, 2 - polární tělísko, 3 – zona pellucida, 4 – perivitellinní prostor, 5 – kumulární/coronární buňky, šipkou je označena oolema (Tagosz et al., 2021).

Nově vzniklé spermie, jak ukazuje obrázek 3, se skládají z hlavičky s jádrem obsahujícím samčí DNA, akrozomového váčku a dalších struktur. Akrozomový váček obsahuje lytické enzymy a je klíčový pro akrozomální reakci. Hlavička rovněž obsahuje ekvatoriální segment a v zadním konci tohoto segmentu se nachází postakrozomální region (Toshimori et al., 2003)*. Krček slouží jako spoj mezi hlavičkou a bičíkem a obsahuje centriolu (Sadler et al., 2011)*. Třetí část spermie je bičík, který spermii umožňuje motilitu, kterou získávají v nadvarletí, lat. *epididymis*. Bičík spermie se skládá ze tří částí: střední části, která obsahuje spirálovitě uspořádané mitochondrie pro produkci energie potřebné k pohybu, hlavní části a koncové části (Fawcett, 1975)*.



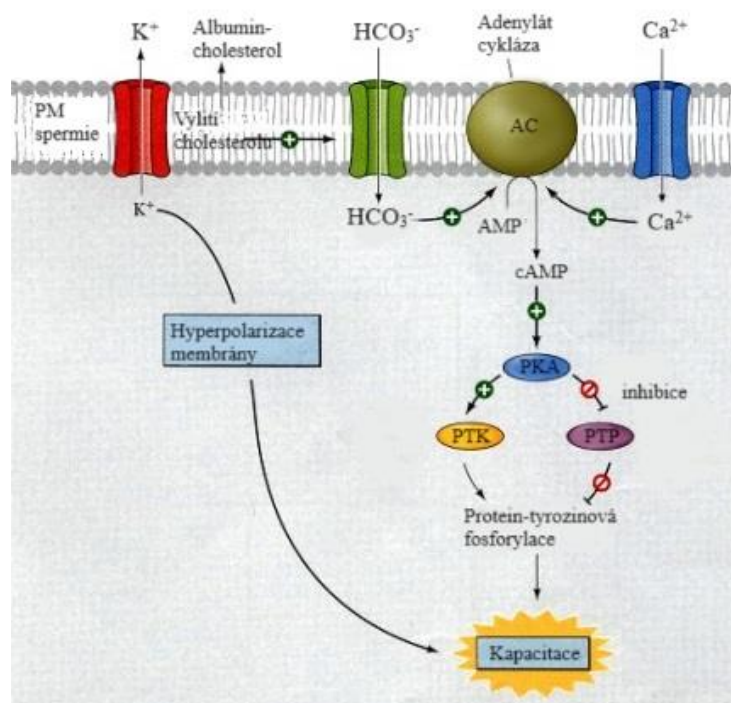
Obrázek 3: stavba spermie (Fwacett 1975)*

2.3 Změny na gametách před oplozením

2.3.1 Maturace, kapacitace a akrozomální reakce spermií

Aby spermie byly schopny oplodnit vajíčko, musí podstoupit několik změn jak v mužském, tak ale i v ženském reprodukčním traktu. V mužském reprodukčním traktu se

spermie po spermatogenezi dostávají do nadvarlete, kde prochází maturací, čímž získávají schopnost motility a oplození vajíčka. Tato maturace je klíčová, protože bez ní nejsou spermie schopné oplodnit vajíčko (Sutton et al., 2008). Další transformací procházejí během ejakulace, kdy přicházejí do kontaktu se semennou plazmou. Semenná plazma poskytuje spermiím výživu a vytváří pro ně přirozené prostředí. Zároveň také asistuje v transportu spermií přes ženský reprodukční trakt a napomáhá synchronizovat další důležité procesy, jako je kapacitace. (Yanagimachi et al., 1994, Morgan et al., 2008). Kapacitace je série mnoha změn, které vedou k tomu, aby spermie úspěšně prošla akrozomální reakcí a následně mohla oplodnit vajíčko. Tato fáze zahrnuje komplexní transformace na buněčné, biochemické a fyziologické úrovni, jak můžeme vidět na obrázku 4. Během kapacitace dochází ke snížení koncentrace cholesterolu na spermatické membráně, což vede ke zvýšení fluidity a permeability plazmatické membrány spermií. To vede k otevření iontových kanálů a změně membránového potenciálu. Výsledkem toho je, že se ionty vápníku a bikarbonátové ionty dostávají do spermie a aktivují adenylát cyklázu, která přeměňuje adenosinmonofosfát (AMP) na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), který následně aktivuje proteinkinázu A (PKA), jejíž aktivací se aktivuje protein tyrosin kináza (PTK), který bude aktivovat další řadu proteinů (Yanagimachi 1994, Bedford & Cross, 1999).

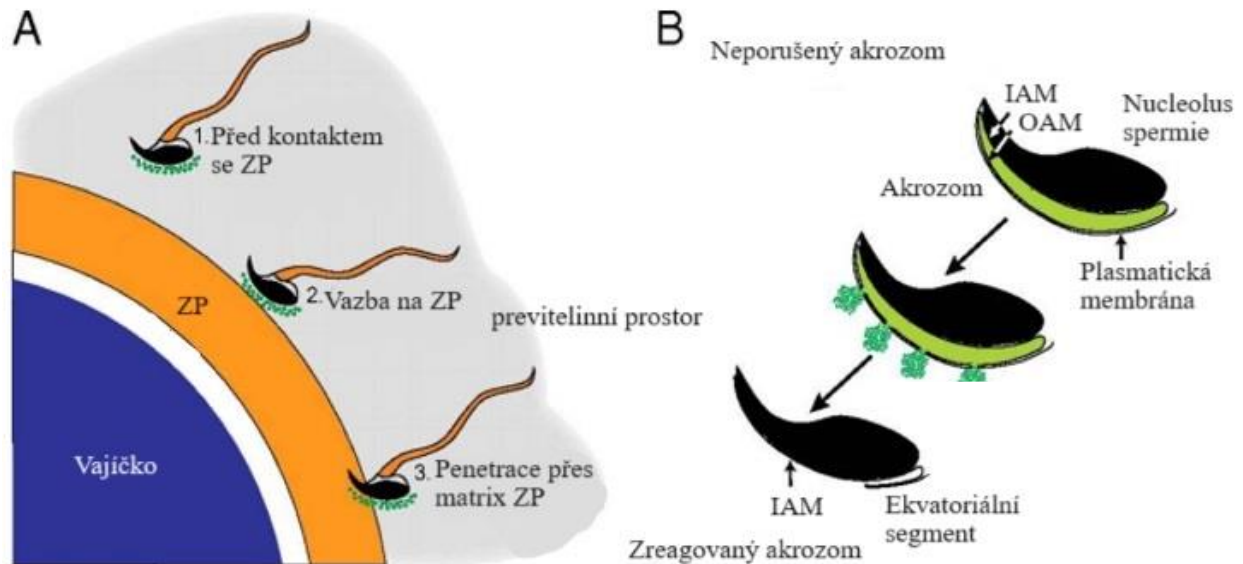


Obrázek 4 – zobrazení průběhu kapacitace spermie, AC – adenylát cykláza, AMP – adenosin monofosfát, cAMP – cyklický adenosin monofosfát, PAK – proteinkináza A, PTK – protein tyrosin kináza, PTP – fosfotyrosin fosfatáza (upraveno podle Scott F. Gilberts, 2003).

Aktivace těchto drah přináší významné změny v pohybu bičíku spermií, což se nazývá hyperaktivace. Je dokázáno, že nedošlo-li k procesu kapacitace, tak spermie mohou mít zpomalený pohyb ve srovnání s těmi, které touto fází prošly. To může výrazně omezit jejich schopnost dosáhnout k vajíčku a tím i jejich možnost ho oplodnit (Yanagimachi, 1994; Bedford & Cross, 1999). Další změny nastávají na proteinové úrovni, kdy dochází k uvolnění a relokaci proteinů na plazmatické membráně anebo také ke změnám některých povrchových sacharidových struktur glykoproteinů a glykolipidů. Po kapacitaci má spermie na svém povrchu proteiny (receptory), které mohou rozpoznat glykoproteiny ZP, přesněji ZP3. Pravděpodobně dochází k interakci spermií spíše se sacharidovými strukturami na ZP, než s jejími samotnými proteiny (Avilés et al., 2004). V důsledku této interakce nastává spuštění akrozomální reakce, k rozboření aktinových sítí kortikálního cytoskeletu spermie, fúzi vnější akrozomové membrány (OAM) s plazmatickou membránou (PM) a následnému uvolnění obsahu akrozomu (Spungin et al. 1995). Uvolněné akrozomální enzymy, nejznámějším z nichž je akrosin, rozvolňují matrix ZP, a to vede k vytvoření cesty pro spermii k oolemě vajíčka. Předpokládalo se, že akrosin hraje roli i ve fúzi s oolemou, ale bylo prokázáno, že i když je akrosin esenciální k penetraci ZP, není klíčový pro akrozomální reakci, ani pro fúzi spermie s oocytem (Vajner, L. et al., 2010, Hirose et al., 2020) *.

Obecně se předpokládá, že akrozomální reakce spermií je spuštěna kontaktem spermie se ZP. V předešlých studiích interakce spermie s oocytem u myši byl kumulus před inseminací odstraněn, aby se usnadnilo zkoumání interakcí spermie se ZP. Při použití spermií transgenních myši, které umožnily detekci počátku akrozomální reakce pomocí fluorescenční mikroskopie, bylo zjištěno, že spermie, které začaly akrozomální reakci před dosažením ZP, byly schopny do ZP proniknout a splynout s plazmatickou membránou oocytu. Skutečně většina oplodňujících spermií podstoupila akrozomální reakci před dosažením ZP oocytů uzavřených v kumulu, alespoň tedy v *in vitro* podmínkách. Incidence oplození oocytů bez kumulu *in vitro* se zvýšila přítomností oocytů s kumulárními buňkami, což poukazuje na důležitou roli kumulárních buněk a jejich matrix při přirozeném oplození (Jin et al., 2011). U jiných druhů savců, jako jsou lidé, prasata či býci, je akrozomální reakce indukována vazbou na ZP3 s jejími receptory na spermatické membráně. Tato vazba vede k tomu, že se otevrou vápenaté kanálky, aby se zvýšila koncentrace vápníku ve spermii (Scott F. Gilberts, 2003)*. Vazebná doména ZP2 spermií je nezbytná pro rozpoznání spermií a vajíčka u savců a následnou penetraci. Je také považována za primární ochranu proti polyspermii u savců. Bylo zjištěno, že vytvoření GMO, že ovastacin, což je proteolytický enzym kortikálních granul, je uvolněn, když dojde k vazbě

spermie na ZP2. Ovastacin následně štěpí ZP2, aby nemohlo dojít k tomu, že se další spermie naváže na ZP. Experimenty u myši, které neměly ovastacin prokázaly, že bez nich je ZP2 po oplození v celku a není rozštěpená (Vogt et al., 2019). Obrázek 5 odkazuje na interakci spermie se ZP (A) a na akrozomální reakci (B).



Obrázek 5: Průběh akrozomální reakce u myši, IAM – vnitřní akrozomová membrána, OAM – vnější akrozomová membrána (upraveno podle Avella & Dean, 2011).

2.4 Studium vazby gamet

Vazba gamet, jež je předmětem mnoha studií, které využívají různé přístupy pro studium interakce gamet a důležitost proteinů, které se oplození účastní, se zjistila několika způsoby. Jednou z nejčastěji využívaných metod je příprava geneticky modifikovaných organismů. Tato technika je často využívána v oblasti genového inženýrství, kdy dochází ke změnám genetického materiálu organismů. Jedná se hlavně o modely, kterých geny byly eliminované (*knock-out* modely), anebo měly zavedené jiné geny, anebo jejich geny byly přeskupené (Griffiths et al., 2000) *.

Příprava KO (*knock-out*) organismů představuje metodu, která selektivně vypíná neboli deaktivuje konkrétní gen v genomu zkoumaného organismu. Díky této metodě získáváme pochopení o funkci tohoto vypnutého genu, protože často můžeme odvodit jeho úlohu pouze z pozorovaného fenotypu. Tato technika může být provedena skrz různé metody, jako je CRISPR-Cas9 či alternativní sestřih (Griffiths et al., 2000) *. Jedna z velkých výhod metody KO je ta, že nám umožňuje studovat funkci specifického genu *in vivo*. Tato technika vyžaduje

maximální přesnost, protože ztráta i jenom jednoho genu nemusí 100 % ukázat, jaký má efekt na organismus (Innoue et al., 2005).

Metoda mikroinjekce je považována za nejběžnější metodu pro přípravu transgenního GMO. Její princip spočívá v tom, že genový produkt je vstříkovan do jednobuněčného zárodku, který může být u myši získán velmi snadno a ve velkém množství. Oplozená vajíčka, získaná z ovariálně stimulovaných samic, jsou připravena k *in vitro* maturaci a oplození. Cizorodá DNA je injikována do prvojádra, obvykle do samčího prvojádra. Přibližně 25 % myši zdědí injikovanou DNA. Zygoty jsou implantovány do vejcovodu recipientní matky s celkovou úspěšností kolem 5 %. Metoda má nevýhody, jako je náhodná integrace DNA, poziční efekt a pouze 50 % pravděpodobnost exprese transgenu (Brinster et al., 1985).

Ke studiu vazby se také využívají metody blokace vazby pomocí protilátky nebo peptidů, které jsou buď komerčně dostupné nebo specificky připravené vůči specifickým proteinům, které se inkubují buď s vajíčkem nebo se spermii a následně se sleduje jejich vazba.

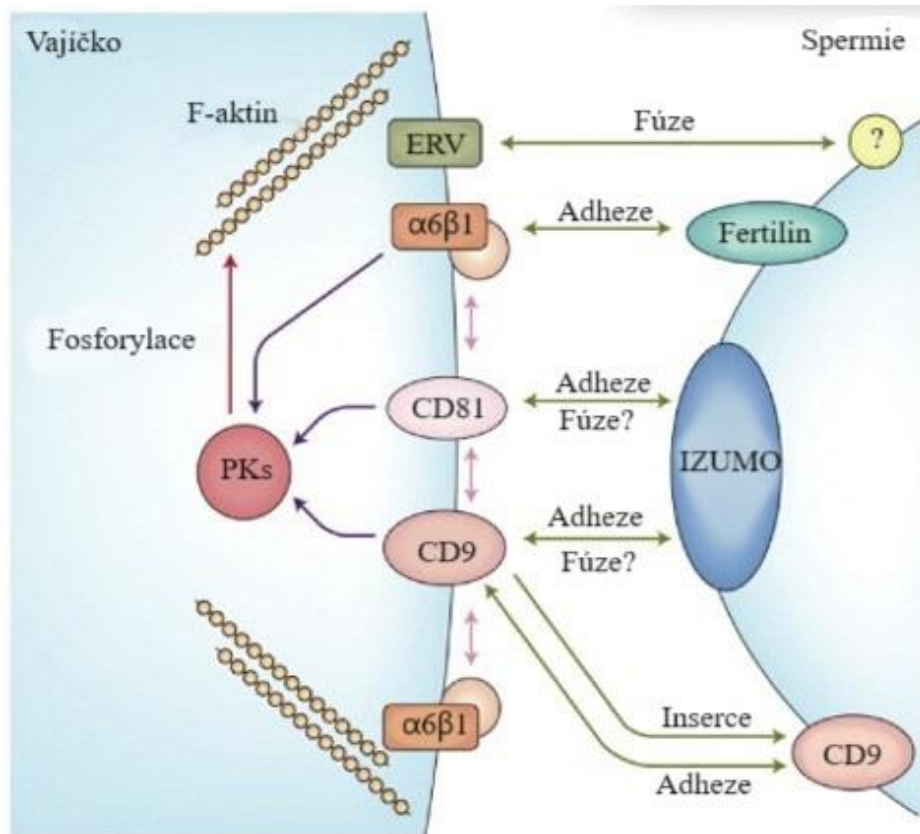
2.4.1 Vazba na *zona pellucida*

Metody blokace vazby byly využity při studiu interakce mezi spermii a ZP. Peptid, který by mohl ovlivnit vazbu na ZP je podle studie Naz (2000), peptid YLP(12), který specificky rozpoznává komplementární molekuly na oocytech, přesněji rozpoznává ZP3, což naznačuje, že peptid YLP(12) je důležitý pro úspěšnou vazbu k ZP3. Protilátky k YLP(12) inhibují vazbu spermie-vajíčko jak u myši, tak ale i u lidí. Peptid se nachází v akrozomovém kompartmentu, junkčním kompartmentu a v bičíku spermii (Naz et al., 2000). Pro vazbu spermii je také důležitý biofunkční protein SPAM 1, který plní svou funkci prostřednictvím dvou domén, které jsou umístěny na N-koncové (hyaluronidázové) doméně a na C-koncové doméně (tato doména je pro vazbu na ZP) proteinu. Tento protein byl identifikován u několika skupin savců, včetně člověka. Při oplození hraje klíčovou roli, nejen při průniku spermie skrz vrstvu buněk obklopujících vajíčko, ale také se podílí na adhezi s vajíčkem a na akrozomální exocytóze. V roce 2003 bylo navíc zjištěno, že tento protein má významnou úlohu ve zrání spermii, zejména u lidí (Evans et al., 2003).

2.4.2 Fúze gamet

Jakmile spermie projde akrozomální reakcí, tak dojde k odkrytí vnitřní akrozomální membrány spermie, což vede k odkrytí proteinů, které hrají roli při interakci a fúzi gamet.

Na spermiích i vajíčkách jsou přítomny různé proteiny, včetně Izumo1, Juno (který je specifický pouze pro vajíčka), CD9, CD81, fertilinů, integrinu $\alpha6\beta1$ a proteinu MAIA. Tento posledně jmenovaný protein MAIA navíc vytváří pevné spojení mezi proteiny Izumo a Juno, což je klíčové pro specifickou fúzi gamet (Vondráková et al., 2022). Grafická prezentace na obrázku 6 naznačuje předpokládané interakce mezi spermií a oocytem.



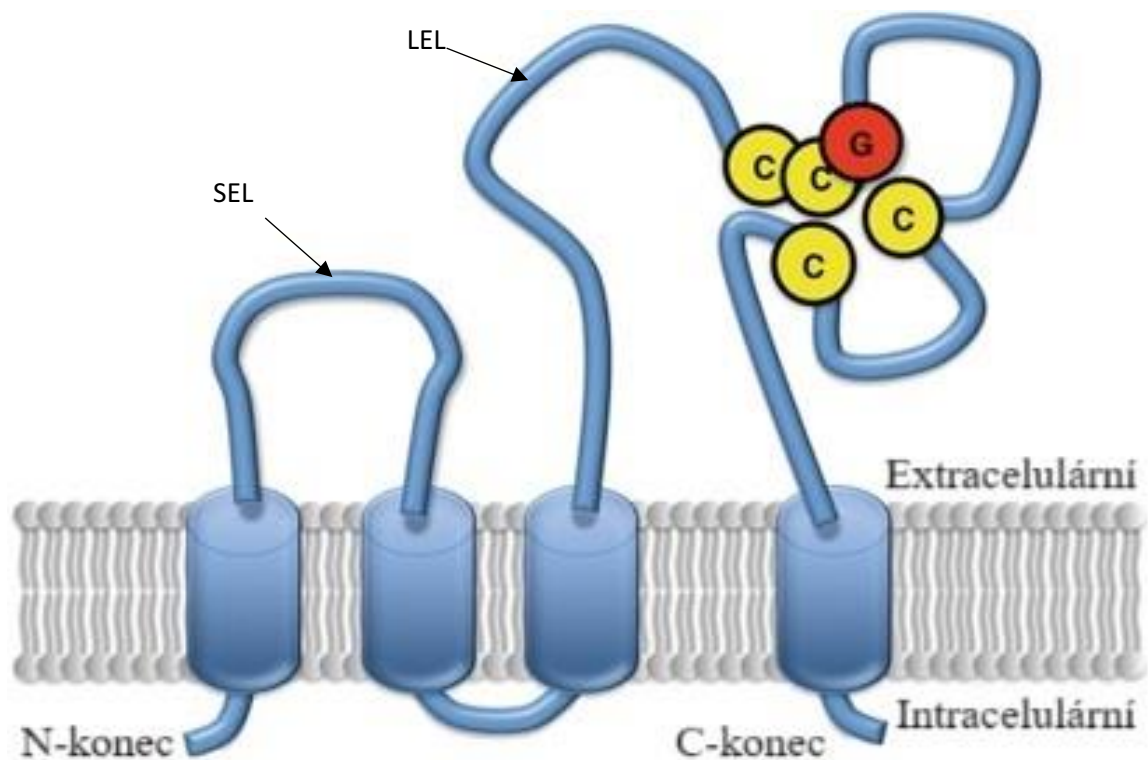
Obrázek 6: Prvky mechanismu adheze a fúze spermie a vajíčka. Izumo, protein přítomný na povrchu spermii, může vytvářet spojení s tetraspaniny oocytu, konkrétně s CD9 a/nebo CD81, a tím zprostředkovávat adhezi a fúzi. V síti tetraspaninů na povrchu oocytu mohou CD9 a CD81 vzájemně interagovat a také se vázat na integriny. Proces adheze spermii k oocytu je usnadňován interakcí mezi integriny na povrchu oocytu, například $\alpha6\beta1$, a dezintegriny na spermiích, jako je fertilin β . Endogenní proteiny obalu retrovirů (ERV) exprimované na oocytu mohou interagovat s neidentifikovanou složkou cytoplazmatické membrány spermii a zprostředkovávat tak fúzi. Integriny a tetraspaniny mohou ovlivňovat polymerizaci aktinu (F-aktinu) v kůře oocytu prostřednictvím signálních drah, které zahrnují několik proteinkináz (PK), což vede k vytvoření oplodovacího kužele (upraveno podle (Sutovsky, 2009)).

Pro fúzi gamet je klíčový transmembránový glykoprotein Izumo 1, který je potřebný pro splynutí oocytu a spermie (Inoue et al. 2005). Obsahuje N-koncovou část a jednu doménu imunoglobulinu. Je exprimován pouze ve varlatech (Tanihara et al. 2014). V průběhu

akrozomální reakce se protein Izumo1 přesouvá z vnější a vnitřní akrozomální membrány, do ekvatoriálního segmentu (Satouh et al 2012). Na jeho důležitost přišli v roce 2005 Inoue et al., kdy vytvořili Izumo KO myši za použití konstruktů, který nahradil exony 2-10 genem rezistentním na aneomicin (neor) (Inoue et al. 2001, Inoue et al., 2005). To proběhlo pomocí cíleného vektoru postaveného na pMulti-ND, který obsahoval neor jako pozitivní selekční značku a toxin A řetězce diftérie jako negativní selekční značku. Buněčné linie byly injikovány do blastocyst inbrední myši C57BL/6, což vedlo k narození samců chimérických myši. Tyto myši byly následně zkříženy s C57BL/6 k získání heterozygotních mutantů. Myši použité ve studii byly potomky křížení mezi generacemi F1 a/nebo F2 (Inoue et al., 2005). Výsledkem bylo, že samci se narodili sterilní. Spermie, které protein Izumo1 postrádají, jsou sice schopné penetrovat ZP, ale nejsou schopné fúze s oocytem, což poukázalo na to, že Izumo je esenciální pro fúzi gamet.

K Izumo1 neodmyslitelně patří i Juno, což je receptor zmíněného transmembránového proteinu. Juno se však na rozdíl od spermií nachází na oocyty a je esenciální pro oplození u savců (Chalbi et al., 2014). Výzkum Bianchi et al. (2014), který využil Juno deficientních transgenních myši, vylepšeného zeleného fluorescenčního proteinu EGFP a kontrolních vajíček probíhal tak, že byla provedena *in vitro* fertilizace (IVF) a intracytoplazmatická injekce spermií (ICSI). Oplození a aktivace vajíčka byly hodnoceny pomocí barvení DNA spermií a chromozomů vajíček, přičemž akrozom zreagované spermiie byly identifikovány pomocí myšičího zeleného fluorescenčního proteinu EGFP. Při analýze exprese Juno byla použita imunofluorescence a při kvantifikaci oplození se počítaly dekonzenzované hlavičky spermií nebo se hodnotil počet pronukleů. Tento výzkum však ukázal, že cílem interakce mezi Izumo1 a Juno není fúze gamet, ale spíše adhezivní funkce během oplození. Je to tím, že Juno se uvolňuje z oolemy a jde do periviteliní oblasti oocyty. Juno je pro oocyt klíčový a má širokou škálu funkcí, včetně inhibice polyspermie. Je také dokázáno, že oocyt, které jsou neoplozené mají velmi vysoké hladiny tohoto proteinu (Bianchi et al., 2014). Stejně jako u samců a nepřítomnosti Izumo1 proteinu má na reprodukci stejný dopad i nepřítomnost Juno u samic. Při nepřítomnosti či poruše tohoto proteinu dochází k tomu, že samice jsou neplodné (Chalbi et al., 2014).

Neplodnost také ovlivňují tetraspaniny, hlouběji budeme rozebírat tetraspanin CD9 a CD81. CD9, známý také jako Tspan 29, je protein, který se společně s Izumo1 a Juno podílí na fúzi gamet (Klinovska et al., 2014). Tetraspaninová rodina se obecně skládá ze čtyř transmembránových domén, které delimitují malou extracelulární smyčku, známou jako SEL nebo EC1, velkou extracelulární smyčku, která je známá pod názvem LEL nebo EC2, a také mají krátké intracelulární C a N koncové zbytky (Yoshida et al., 2014).



Obrázek 6: Struktura CD9 tetraspaninu. CCG – cystein-cystein-glycinový zbytek, C-cysteinový zbytek (upraveno podle Yoshida et al., 2014).

CD9 byl nalezen jak na plazmatické membráně oocytů a spermií, tak i ve vezikulách v perivitellinovém prostoru oocytů a embryí u skotu a dalších savců jako jsou myši, prasata i člověk. Bylo však zjištěno, že lokalizace tetraspaninů je druhově specifická, a že dochází k jejich přeskupení během akrozomální reakce (Jankovicova et al., 2019). Za vytvoření GMO a použití KO metody, stejně jako u Izumo1, bylo pomocí elektronové mikroskopie a imunobarvení zjištěno, že pokud dojde k poklesu nebo absenci CD9, tak výsledkem bude deformace *mikrovili* a spermie se nebude schopná navázat se na vajíčko (Żyłkiewicz, 2010). Ve studii Chen et al. (1999) byly protilátky využity k studiu interakce mezi vajíčkem a spermií. Vajíčka byla zbavena ZP a jádra byla zbarvena barvivem Hoechst, následně byla ošetřena monoklonálními protilátkami (mAbs). Spermie, odebrané od samců, byly kapacitovány a poté

společně inkubovány s vajíčky. Průměrný počet spermií vázaných na jedno vajíčko byl stanoven pomocí mikroskopie s fázovým kontrastem, zatímco počet dekonduzovaných jader spermií obarvených barvivem Hoechst uvnitř vajíček byl analyzován za účelem stanovení průměrného počtu spermií, které splynuly s jedním vajíčkem, což vedlo k tomu, že monoklonální protilátka (mAb) blokovala vazbu a také fúzi spermií na vajíčka. Jako kontrola byla použita protilátka proti integrinu $\alpha 6$ a antivirová protilátka, které neblokovaly tuto vazbu ani fúzi a spermie tedy vajíčko oplodnily. Výzkum také ukázal, že mAb anti-CD9 (JF9) vykazuje inhibiční účinky na spojení kuliček potažených fertilinem β s vajíčky. Bez ohledu na to, zda byly kuličky pokryté přirozeným fertilinem β získaným z lyzátu spermií z *caput epididymis* (hlava nadvarlete), nebo rekombinantním proteinem obsahujícím dezintegrinovou doménu fertilinu β , JF9 bránil vazbě. Funkci blokující mAb anti- $\alpha 6$ (GoH3), podobně inhibovala vazbu jak intaktního fertilinu β , tak rekombinantního konstruktů fertilinu β obsahujícího dezintegrinovou doménu. JF9 (protilátka proti CD9) nebránil vazbě kuliček potažených anti- $\alpha 6$ mAb nebo fragmentu štěpeného lamininu E8 v přítomnosti Mn^{2+} . Důležité je, že JF9 nezměnil povrchovou expresi integrinu $\alpha 6$, nezamaskoval epitopy protilátky GoH3, ani neaktivoval vazbu kuliček potažených lamininem E8 v přítomnosti Ca^{2+} (Chen et al., 1999).

Schopnost navázání spermie na vajíčko také ovlivňuje CD81 protein, který patří do stejné rodiny tetraspaninů jako protein CD9 a rovněž se účastní interakce a fúze membrán. Stejně jako CD9, i CD81 se nachází na membráně oocyty. Tetraspaniny vytvářejí tetraspaninové sítě, kde se nacházejí i další proteiny, jako například integriny, nejznámějším je integrin $\alpha 6\beta 1$ (Jégou et al., 2011). Tímto způsobem přispívají ke stabilizaci membrán a zajišťují interakce s ostatními proteiny. V rámci membrány vytvářejí cis interakce nebo při interakci mezi buňkami mohou vytvářet trans interakce (Jankovičová et al., 2020). Když dojde ke KO pouze u CD81, tak dojde pouze k mírnému snížení plodnosti. Když však ale dojde k takzvanému CD9/CD81 dvojitému KO, tak budou savčí samice kompletně neplodné, což dokazuje to, že jak CD9, tak CD81 mají komplementární funkce k fúzi oocyt-spermie, což znamená, že jsou pro oplození nezbytné a vzájemně se nemohou zastoupit (Rubinstein, et al., 2006). Defekty plodnosti je ale možné částečně zachránit u myši, které nemají CD9 po mikroinjekci CD81 mRNA. Nicméně, pohled na tyto výsledky je jaks kontroverzní a stále zanechává nejasný obraz na to, jak jsou na sobě CD9 a CD81 vzájemně závislé (Kaji et al., 2002). Na rozdíl od myších spermií, u lidí je patrná výhradně změna lokace pouze u proteinu CD9, protein CD81 se nepřemísťuje (Frolíková et al., 2018).

Dalšími důležitými proteiny, které hrají roli při adhezi jsou proteiny fertilin α a fertilin β . Tyto proteiny patří do rodiny proteinů nazývané ADAM, které jsou převážně exprimovány ve varlatech a hrají roli při interakci a adhezi gamet, což vede k fúzi spermií s oocelou. ADAM proteiny jsou kotvené na povrchu buněčné membrány obsahující dezintegrin a metaloproteázovou doménu. Skupina ADAM proteinů se rozděluje do čtyř domén: proteolýzní, adhezní, fúzní a intracelulární signální doména. Díky fúzní doméně se předpokládá, že hrají klíčovou roli během fúze pohlavních buněk (Sha et al., 2018). Fertilin β , nazývaný také jako ADAM2, hraje roli u myši, kde jeho nedostatek vede k inhibici vázání spermie na stěnu oocyty. Při interakci gamet jsou zapojeny nejen výše zmíněné proteiny, ale i ADAM 1, 2 a 3. U myši je ADAM3 nezbytný pro proces fertilizace. Na rozdíl od myši je u lidských spermií ADAM1 nefunkční, a proto je hlavní úloha této domény přisouzena dezintegrované doméně proteinu ADAM2. V případě myši s delecí ADAM2 bylo prokázáno, že nejen brání prezentaci člena proteinové rodiny ADAM1, ale také způsobuje u myši infertilitu (Cho et al., 1998). Tato studie poukazuje na klíčovou roli proteinů v procesu oplození. Dalším z těchto proteinů je protein SPACA6, který stejně jako Izumo1 je exprimován lidskými spermiemi a po akrozomální reakci zůstává na ekvatoriálním segmentu a hraje roli v lidském oplození. Samčí pohlavní buňky, které tento protein nemají, jsou sterilní a jejich spermie prokazují nahromadění v previtelinním prostoru, ale nejsou schopny fúze s oocyttem (Noda et al., 2020). Navzdory podobnosti fenotypů, která byla způsobena Spaca 6 a Izumo 1 KO, nejsou redundantní a esenciální relokace Izumo1 není ovlivněna nedostatkem Spaca 6. Pro lokalizaci SPACA6 v myších a lidských spermiích byly vytvořeny protilátky proti myším i lidským proteinům SPACA6. Protilátka proti myšimu proteinu poskytla nescifické signály při Western Blot analýze a imunofluorescenci na transfekovaných i netransfekovaných buňkách, což bylo potvrzeno u kontrolních spermií a spermií s vyjmutým Spaca6 genomem. Protilátka proti lidskému proteinu se však ukázala jako specifická v transfekovaných buňkách COS-7, kde rozpoznala lidskou formu SPACA6. U lidských spermií odhalila Western blot analýza proteinový proužek o velikosti 36 kDa odpovídající lidskému SPACA6. Imunofluorescence prokázala lokalizaci SPACA6 na membráně hlavičky spermie u akrozomálního váčku v intaktní spermii, což bylo potvrzeno kolokalizací s FITC-konjugovaným lektinem *Pisum sativum* Agglutinin (PSA). SPACA6 byl nalezen také v ekvatoriální oblasti, na krčku a uprostřed spermie. Po akrozomální reakci SPACA6 přetrvával v ekvatoriálním segmentu, zeslábl ve střední části a zmizel z akrozomálního váčku a krčku. Negativní kontroly naznačovaly určité nescifické barvení. Podobně jako IZUMO1 se zdá, že SPACA6 je akrozomální membránový protein, který není vystaven na membráně spermie před dokončením akrozomální reakce (Barboux et al., 2020).

Spermie SPACA6 KO vykazovaly samčí sterilitu a nedokázaly oplodnit kumulus-intaktní oocyty při IVF oplození. Zatímco kontrolní spermie úspěšně oplodnily více než 98 % oocytů, ze spermií Spaca6 KO nevzniklo žádné embryo. Přestože pronikly do ZP, nemohly KO spermie interagovat s plazmatickou membránou oocyty. Fúzní testy odhalily, že spermie Spaca6 KO přilnuly k povrchu oocyty, ale jen zřídka splynuly. V oocytech bez ZP dosáhly kontrolní spermie 96% míry oplození, zatímco spermie Spaca6 KO neoplodnily žádné vajíčko. Studie Noda et al. (2020) poukazuje na klíčovou roli Spaca6 při fúzi spermie s oocytem během oplození.

V roce 2022 byl objeven protein MAIA, který se ukázal jako další klíčový protein, který hraje roli při fúzi gamet. Tento dosud neznámý ligand MAIA pochází z nadrodiny imunoglobulinů. MAIA je přítomný na lidské oolema a hraje klíčovou roli při adhezi a fúzi spermie a vajíčka. MAIA vytváří stabilní interakci se známým komplexem Izumo1/Juno, což usnadňuje specifické splnutí gamet. Složitá povaha izotypu MAIA naznačuje potenciální skrytý mechanismus pohlavního výběru, který podporuje genetickou kompatibilitu

Při této studii byly ovariální buňky čínského křečka (CHO) transfekovány plazmidy nesoucími lidské FcRL3, neboli MAIA a JUNO a společně kultivovány s kapacitovanými lidskými spermii, což vedlo k jejich přilnavosti a charakteristickým oscilacím hlavičky. Dvojitě transfekované buňky CHO vykazovaly expresi membránově vázaných MAIA a JUNO, přičemž jádra spermií byla pohlcena v cytoplazmě, což naznačuje možnou fúzi buněk. Spermie inkubované s kotransfekovanými buňkami lidských embryonálních ledvin (HEK) 293T, vykazovaly různé vzorce tlukotu ocásku, kvantifikované pomocí umělé inteligence. Většina spermií inkubovaných s kotransfekovanými buňkami vykazovala střední amplitudu tlukotu, což naznačuje příznivé podmínky pro potenciální fúzi. Buňky HEK kotransfekované MAIA, JUNO a plazmidem kódujícím GFP značený farnesylovaný Kirsten rat sarcoma virový onkogenový homolog (K-Ras) vykazovaly zvýšenou vazbu spermií a prokázaly schopnost spermií fúzovat s těmito buňkami. Předinkubace lidských spermií se syntetickým peptidem cAMWNEDc snížila vazbu spermií na kotransfekované buňky HEK. Korelační světelná a elektronová mikroskopie odhalila expozici hlavičky spermie cytoplazmě kotransfekovaných buněk, což svědčí o membránové fúzi. Inhibice FcRL3 pomocí krátké interferující RNA (siRNA) vedla ke snížení fúze spermií s B lymfocyty exprimujícími FcRL3. Kromě toho se rozpustná extracelulární doména proteinu FcRL3 vážala na Izumo1, což naznačuje její zapojení do fúze spermií s vajíčky (Vondráková et al., 2022).

3 Závěr

Studium interakce spermie a vajíčka je zásadní pro pochopení procesu oplození. Cílem bakalářské práce bylo diskutovat různé metody studia interakce mezi spermií a vajíčkem u savců. K dispozici jsou různé experimentální techniky, které umožňují sledovat a identifikovat klíčové momenty interakce spermie a vajíčka na molekulární úrovni. Mezi tyto techniky patří mikroskopie, biochemické analýzy a genetické metody. Jednou z nejvíce využívaných metod je příprava geneticky modifikovaných organismů (GMO), zejména KO modelů, které poskytují *in vivo* pohled na interakci spermie a vajíčka a jsou nezbytné pro hlubší studium reprodukčních procesů. Kromě přípravy GMO se používá také sledování interakce pomocí blokací vazby.

Během této práce jsme se zaměřili na analýzu těchto metod používaných ke studiu interakcí, se zvláštním důrazem na účast proteinů jako jsou CD9, CD81, fertiliny, MAIA, JUNO a Izumo. Tyto proteiny hrají klíčovou roli v procesu oplození a jsou důležité pro interakci mezi spermií a vajíčkem. CD9 a CD81 jsou tetraspaniny, které se podílejí na tvorbě tzv. tetraspaninových sítí na povrchu gamet, což usnadňuje jejich vzájemné rozpoznání. Fertiliny jsou proteiny obsahující disulfidické můstky, které se podílejí na fúzi plazmatických membrán gamet. MAIA je membránový protein vajíčka, který je klíčový pro adhezi spermie a vajíčka. JUNO je receptor na povrchu vajíčka, který se váže na spermie, zatímco Izumo je protein na povrchu spermie, který se váže na JUNO a je esenciální pro fúzi gamet.

Výsledky těchto studií mají široké implikace v oblasti reprodukční medicíny a biologie. Porozumění molekulárním mechanismům interakce spermie a vajíčka může vést k vývoji nových terapeutických přístupů k léčbě neplodnosti a k dalšímu poznání základních biologických procesů týkajících se rozmnožování u savců. Důkladné pochopení těchto procesů je klíčové nejen pro zlepšení léčby neplodnosti, ale také pro posílení našich znalostí v reprodukční biologii a vývoji nových technologií v této oblasti.

5 Reference

- Avilés, M.**, José, M., José, P., Castells, M. T., De Juan, J., Romeu, A., & Ballesta, J. (2004). Carbohydrate analysis of the zona pellucida and cortical granules of human oocytes by means of ultrastructural cytochemistry. *Human Reproduction*, 19(8), 1842-1855. DOI: 10.1093/humrep/deh311
- Barboux, S.**, Chalbi, M., Dybal, E., Do Cruzeiro, M., Vaiman, D., Wolf, J., & Ziyat, A. (2020). Sperm SPACA6 protein is required for mammalian Sperm-Egg Adhesion/Fusion. *Scientific Reports*, 10(1), 1-15
- Bianchi, E.**, Doe, B., Goulding, D., & Wlérigh, G. J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*, 508(7497), 483-487. DOI: 10.1038/nature13203
- Bianchi, E.**, Wright, G. J., Izumo meets Juno. *Cell Cycle*. 2014, 13(13), 2019- 2020. DOI: 10.4161/cc.29461. ISSN 1538-4101
- Brinster, R. L.**, Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Yagle, M. K., & Palmiter, R. D. (1985). Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(13), 4438-42
- Chalbi, M.**, Barraud-Lange, V., Ravaux, B., Howan, K., Rodriguez, N., Soule, P., Ndzoudi, A., Boucheix, C., Rubinstein, E., Wolf, J. P., Ziyat, A., Perez, E., Pincet, F., & Gourier, C. (2014). Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. *Development*, 141(19), 3732–3739. DOI: 10.1242/dev.111534>>, 14028-33.
- Chang, K.**, Qian, J., Jjang M., Liu, Yi-Hsin, Wu, C., Chen, Chi-Dar, et al. (2002). Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnology*, 13, 1-13.
- Chen, M. S.**, Tung, K. S., Coonrod, S. A., Takahashi, Y., Bigler, D., Chang, A., Yamashita, Y., Kincade, P. W., Herr, J. C., & White, J. M. (1999). Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin $\alpha 6\beta 1$: Implications for murine fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(21), 11830-11835. DOI: 10.1073/pnas.96.21.11830
- Cho, Ch.**, O'DELL BUNCH, D., FAURE, J., GOULDING, E.H. M. EDDY, E. PRIMAKOFF, P. And G. MYLES, D. Fertilization Defects in Sperm from Mice Lacking Fertilin β . *Science*. 1998, 281(5384), 1857-1859. DOI: 10.1126/science.281.5384.1857
- Dean, W.**, Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E., Rejk, W. (2001). Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 13734-13738.
- Evans, E. A.**, Zhang H. Anda Martin-Deleon, P.. SPAM1 (PH-20) protein and mRNA expression in the epididymides of humans and macaques: utilizing laser microdissection/RT-PCR. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003, 1(1), 54-65. DOI: 10.1186/1477-7827-1-54. ISSN 14777827.

***Fawcett**, Don W., 1975. The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology* [online]. 44(2), 394–436. ISSN 00121606. DOI: 10.1016/0012-1606(75)90411-X

Fecondo, J. V., Kent, S. B., & Boyd, A. W. (1991). Inhibition of intercellular adhesion molecule 1-dependent biological activities by a synthetic peptide analog. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(7), 2879-2882. DOI: 10.1073/pnas.88.7.2879

Frolikova, M., Manaskova-Postlerova, P., Cerny, J., et al. CD9 and CD81 Interactions and Their Structural Modelling in Sperm Prior to Fertilization. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(4). DOI: 10.3390/ijms19041236. ISSN 1422-0067.

***Gilbert**, S. F., *Developmental Biology*, 7th edition, Sinauer Associates inc (2003), ISBN-10 0878932585, pages 150-180

Gottlieb, Sf., Tupper, C., Kerndt, Cc., Tegay, Dh. Genetics, Nondisjunction. 2023 Aug 14. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 29489267.

***Griffiths**, Aj., Miller, Jh., Suzuki, Dt., Lewontin, Wc., Gelbart, Wm. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis* (7th ed.). New York: W. H. Freeman. pages 37-390

Hirose, M., Honda, A., Fulka, H., Matoba, S., Tomishima, T., Mochida, K., Hasegawa, A., Nagashima, K., Inoue, K., Ohtsuka, M., Baba, T., Yanagimachi, R., & Ogura, A. (2020). Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(5), 2513-2518. DOI: 10.1073/pnas.1917595117

Inoue, N., Fukui, A., Nomura, M., Matsumoto, M., Toyoshima, K., Seya, T. A Novel Chicken Membrane-Associated Complement Regulatory Protein: Molecular Cloning and Functional Characterization1. *J Immunol* 1 January 2001; 166 (1): 424–431. DOI: 10.1038/nature03362. PMID: 15759005

Jaenisch R. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Apr;73(4):1260-4. DOI: 10.1073/pnas.73.4.1260. PMID: 1063407; PMCID: PMC430242.

Jankovičová, J., Secova, P., Manaskova-Postlerova, P., Simonik, O., Frolikova, M., DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.161

Jankovičová, J., Neuerová, Z., Sečová, P. et al. Tetraspanins in mammalian reproduction: spermatozoa, oocytes and embryos. *Med Microbiol Immunol* 209, 407–425 (2020). DOI: 10.1007/s00430-020-00676-0

Jégou, A., Ziyat, A., Perez, E., Wolf, J. P., 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*, 108(27), 10946-10951. DOI: 10.1073/pnas.1017400108

Jiménez-Movilla, M., Hamze, J. G., & Romar, R. (2021). Oolemma Receptors in Mammalian Molecular Fertilization: Function and New Methods of Study. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. DOI: 10.3389/fcell.2021.662032

Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. A., Chiba, K., & Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), 4892-4896. DOI: 10.1073/pnas.1018202108

Jury, J. A., Frayne, J., Hall, L.. The human fertilin α gene is non-functional: implications for its proposed role in fertilization. *Biochemical Journal*. 1997, 321(3), 577-581. DOI: 10.1042/bj3210577. ISSN 0264-6021.

Kaji, K., Oda, S., Miyazaki, S., & Kudo, A. (2002). Infertility of CD9-Deficient Mouse Eggs Is Reversed by Mouse CD9, Human CD9, or Mouse CD81; Polyadenylated mRNA Injection Developed for Molecular Analysis of Sperm–Egg Fusion. *Developmental Biology*, 247(2), 327-334. DOI: 10.1006/dbio.2002.0694

Klinovska, K., Sebkova N., Dvorakova-Hortova, K.. Sperm-Egg Fusion: A Molecular Enigma of Mammalian Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, 15(6), 10652-10668. DOI: 10.3390/ijms150610652. ISSN 1422- 0067.

***Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.** 2006. Academic press, 2006. Pages 55-77, ISBN 978-0-12-515400-0.

Křížanovská K., Ulčová-Gallová Z., Bouše V., Švábek L., Rokyta P., Suchá R. Rokyta Z. 2002. „Analýza zona pellucida lidských oocytů a embryí v programu asistované reprodukce". *Česká gynekologie* (4) : 197-202.

Morgan, D. J., Weisenhaus, M., Shum, S., Su, T., Zheng, R., Zhang, C., Shokat, K. M., Hille, B., Babcock, D. F., & McKnight, G. S. (2008). Tissue-specific PKA inhibition using a chemical genetic approach and its application to studies on sperm capacitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20740-20745. Doi: 10.1073/pnas.0810971105

Naz RK, Zhu X, Kadam AL. Identification of human sperm peptide sequence involved in egg binding for immunocontraception. *Biol Reprod*. 2000 Feb;62(2):318-24. DOI: 10.1095/biolreprod62.2.318. PMID: 10642568.

Noda, T., Lu, Y., Fujihara, Y., Oura, S., Koyano, T., Kobayashi, S., Matzuk, M. M., & Ikawa, M. (2020). Sperm proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 are required for sperm–oocyte fusion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(21), 11493-11502. DOI: 10.1073/pnas.1922650117

Ovalle, S., Gutiérrez-López, M. D., Olmo, N., Turnay, J., Lizarbe, M. A., Majano, P., Molina-Jiménez, F., López-Cabrera, M., Yáñez-Mó, M., Sánchez-Madrid, F., & Cabañas, C. (2007). The tetraspanin CD9 inhibits the proliferation and tumorigenicity of human colon carcinoma cells. *International Journal of Cancer*, 121(10), 2140-2152. DOI: 10.1002/ijc.22902

Rubinstein, E., Ziyat, A., Prenant, M., Wrobel, E., Wolf, J., Levy, S., Le Naour, F., & Boucheix, C. (2006). Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Developmental Biology*, 290(2), 351-358. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.11.031

***Sadler, T.**, Sinha W. And M.D. Langmanova lékařská embryologie : Učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka. 1. české vydání. Praha : Grada, 2011.

- Satouh, Y.**, Inoue, N., Ikawa, M., & Okabe, M. (2012). Visualization of the moment of mouse sperm–egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *Journal of Cell Science*, 125(21), 4985–4990. DOI: 10.1242/jcs.100867
- Sha, W.**, Xu, X., Ji, Y., Mei, B., Qiu, P., Ji, H., Li, P., Li, L., & Liu, W. (2017). Sperm-egg fusion disorder in a Chinese male patient was associated with a rare ADAM20 variant. *Oncotarget*, 9(2), 2086-2091. DOI: 10.18632/oncotarget.23331
- Spungin, B.**, Margalit, I., & Breitbart, H. (1995). Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *Journal of Cell Science*, 108(6), 2525–2535. DOI: 10.1242/jcs.108.6.2525
- Su, Y.**, Sun, F., Handel, M. A., Schimenti, J. C., & Eppig, J. J. (2012). Meiosis arrest female 1 (MARF1) has nuage-like function in mamm DOI: 10.1073/pnas.1216904109
- *Suede, Sh.**, Malik, A., Sapra, A. Histology, Spermatogenesis. 2023 Mar 6. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 31985935.
- Sutovsky P.** Sperm-egg adhesion and fusion in mammals. *Expert Rev Mol Med*. 2009 Apr 1;11:e11. DOI: 10.1017/S1462399409001045. PMID: 19335925
- Sutton, K. A.**, Jungnickel, M. K., & Florman, H. M. (2008). A polycystin-1 controls postcopulatory reproductive selection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(25), 8661-8666. DOI: 10.1073/pnas.0800603105
- Tanihara, F.**, Nakai, M. Men, N. T., Kato, N., Kaneko, H., Noguchi, J., Otoi, T., Kikuchi, K. Roles of the zona pellucida and functional exposure of the sperm-egg fusion factor ‘IZUMO’ during in vitro fertilization in pigs. *Animal Science Journal*. 2014, 85, 395–404. DOI: 10.1111/asj.12164. ISSN 1740-0929
- Targosz, A.**, Przystalka, P., Wiaderkiewicz, R. et al. Semantic segmentation of human oocyte images using deep neural networks. *BioMed Eng OnLine* 20, 40 (2021). DOI: 10.1186/s12938-021-00864-w
- *Toshimori K**, Ito C. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Arch Histol Cytol*. 2003 Dec;66(5):383-96. DOI: 10.1679/aohc.66.383. PMID: 15018141.
- Tumova, L.**, Zigo, M., Sutovsky, P., Sedmikova, M., & Postlerova, P. (2020). Ligands and Receptors Involved in the Sperm-Zona Pellucida Interactions in Mammals. *Cells*, 10(1), 133. Doi: 10.3390/cells1001013
- Turathum B.**, Sroyraya M. Protein Profile Involved in Mammalian Oocyte Maturation, Fertilization and Early Embryogenesis (Pre-Implantation) *Cell Dev. Biol*. 2017;6:2. DOI: 10.4172/2168-9296.1000189.
- Vacquier, Vd.** Evolution of gamete recognition proteins. *Science*. 1998 Sep 25;281(5385):1995-8. DOI: 10.1126/science.281.5385.1995. PMID: 9748153.
- *Vajner, L.**, Uhlík, J., Konrádová, V. Lékařská histologie. 1, Cytologie a obecná histologie. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2010.
- Vogt, E.**, Tokuhiko, K., Guo, M., Dale, R., Yang, G., Shin, S., Movilla, M. J., Shroff, H., & Dean, J. (2019). Anchoring cortical granules in the cortex ensures trafficking to the plasma membrane for post-fertilization exocytosis. *Nature Communications*, 10(1), 1-13. DOI:10.1038/s41467-019-10171-7
- Vondrakova, J.**, Frolikova, M., Ded, L., Cerny, J., Postlerova, P., Palenikova, V., Simonik, O., Nahacka, Z., Basus, K., Valaskova, E., Machan, R., Pacey, A., Holubcova, Z., Koubek, P.,

Ezrova, Z., Park, S., Liu, R., Partha, R., Clark, N., . . . Komrskova, K. (2022). MAIA, Fc receptor-like 3, supersedes JUNO as IZUMO 1 receptor during human fertilization. *Science Advances*. DOI: abn0047

***Waters, M.**, Tadi, P. Genetics, Female Gametogenesis. 2022 Nov 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 32310377.

Yanagimachi, R. (1994) in *Physiology of Reproduction* (Knobil, E., and Neill, J. D., eds) Vol. 1, pp. 189-318, Raven Press, Ltd., New York

Żyłkiewicz, E., Nowakowska, J., & Maleszewski, M. (2010). Decrease in CD9 content and reorganization of microvilli may contribute to the oolemma block to sperm penetration during fertilization of mouse oocyte. *Zygote*, 18(3), 195-201. DOI: 10.1017/S0967199409990189